بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه شاهد

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی گرایش میکروبی

عنوان

تهیه نانوبادی‌های نوترکیب مشتق شده از آنتی بادی‌های زنجیره سنگین شتری علیه آنتی ژن CA IX سلول‌های سرطانی

دانشجو

فاطمه آراسته

اساتید راهنما

دکتر سید لطیف موسوی گرگری

دکتر معصومه رجبی بذل

زمستان ۱۳۹۱

چکیده:

CA IX (کربونیک انهیدراز۹) عضوی از خانواده کربونیک انهیدرازهاست که به عنوان مارکر تشخیصی در تومورهای هیپوکسیک شناخته شده است. این آنزیم علاوه بر تنظیم pH –که مشخصه اصلی تمام کربونیک انهیدرازها می‌باشد- و شرکت در فرآیندهای تومورزایی، در چسبندگی سلول نیز نقش بازی می‌کند. تاکنون تلاش‌های زیادی در جهت تشخیص و/یا درمان بر اساس شناسایی و/یا ممانعت از عمل این آنزیم انجام گرفته است. در این پژوهش با استفاده از تخلیص لنفوسیت‌های شتر تک کوهانه ایمن شده علیه جایگاه فعال CA IX، کتابخانه فاژمیدی حاوی ژن‌های VHH ساخته شد. پس از آن بالاترین VHH متصل به فاژ با بیشترین تمایل با استفاده از روش غنی سازی جدا و درون وکتوری بیانی زیرهمسانه سازی گردید. VHH حاصل تخلیص و در تست الایزا با CA IX نوترکیب و سلول‌های هلا استفاده شد. VHH به دست آمده مولکول‌های CA IX را بر روی سلول‌های هلا شناسایی کرد و بر روی سلول‌های PC3 به عنوان کنترل ایمنی نداشت.

کلمات کلیدی: کربونیک انهیدراز۹(CA IX)، نانوبادی، نمایش فاژی

فهرست مطالب

چکیده: ۳

فصل اول مقدمه ۱

۱-۱ کلیه ۲

۱-۲ شناخت سرطان ۲

۱-۲-۱ سرطان کلیه ۲

۱-۲-۲ تشخیص بیماری سرطان کلیه ۳

۱-۲-۳ شیوه‌های درمان ۳

۱-۳ کربونیک انهیدراز ۹ (Carbonic Anhydrase IX) ۴

۱-۳-۱ کربونیک انهیدرازها ۴

۱-۳-۲ کشف کربونیک انهیدراز۹ ۴

۱-۳-۳ بیان و پراکندگی CA IX ۵

۱-۳-۴ ساختار و فعالیت کاتالیتیکی CA IX ۸

۱-۳-۵ نحوه ی عملکرد CA IX ۱۲

۱-۳-۶ تنظیم بیان ژن و عملکرد CA IX ۱۳

۱-۴ هایپوکسی تومور و پیامدهای آن ۱۵

۱-۵ مهار آنزیم کربونیک انهیدراز ۹ ۱۸

۱-۶ آنتی بادی ۲۳

۱-۶-۱ ساختار آنتی بادی‌ها: ۲۳

۱-۶-۱ قطعات آنتی بادی ۲۴

۱-۶-۱-۱ قطعه Fab : ۲۴

۱-۶-۱-۲ قطعه Fv: ۲۴

۱-۶-۱-۳ قطعه sdAb : ۲۴

۱-۶-۱-۴ قطعه scFv : ۲۵

۱-۶-۱-۵ قطعه Fc : ۲۵
۱-۶-۲ ناحیه اتصال به آنتی ژن: ۲۶
۱-۶-۳ آنتی بادیهای زنجیره سنگین شتری (HCAb) ۲۶
۱-۶-۳-۱ VHHs ۲۷
۱-۷ نمایش فاژی ۳۱
۱-۸ غربالگری ۳۲
۱-۹ انواع کتابخانه‌ها ۳۳
۱-۹-۱ کتابخانه ی ایمن ۳۳
۱-۹-۲ کتابخانه ی غیر ایمن یا naive ۳۳
۱-۹-۳ کتابخانه سنتتیک ۳۴
۱-۹-۴ کتابخانه نیمه سنتتیک ۳۴
۱-۱۰ اهداف و فرضیات پژوهش ۳۴
فصل دوم مواد و روشها ۳۵
۲-۱ مواد مورد نیاز: ۳۶
۲-۱-۱ مواد و محلول های مورد استفاده ۳۶
۲-۲ وسایل و دستگاههای استفاده شده ۳۸
۲-۳ مراحل تولید نانوبادی علیه آنتی ژن CA IX ۳۹
۲-۳-۱ تهیه ی ایمونوژن ۳۹
۲-۳-۱-۱ انتقال قطعه ژنی کد کننده rCA IX به وکتور بیانی pET32a ۳۹
۲-۳-۱-۲ هضم وکتور pUC57 برای جدا سازی ژن نوترکیب CA IX ۴۴
۲-۳-۱-۳ تکثیر، تخلیص و هضم وکتور بیانی pET32a ۴۶
۲-۳-۱-۴ واکنش اتصال قطعه ژن CA IX و وکتور pET32a ۴۷
۲-۳-۱-۵ تراریخت کردن DNA نوترکیب به سلولهای میزبان *E.coli Bl21-DE3* ۴۸
۲-۳-۱-۶ بیان پروتئین نوترکیب CA IX ۴۹
۲-۳-۱-۷ تخلیص پروتئینهای نوترکیب به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA ۵۱
۲-۳-۱-۸تعیین غلظت پروتئین، از محلول حاوی پروتئین‌های نوترکیب ۵۲
۲-۳-۲ تهیه کتابخانهٔ ژنی از منبع ژنهای ایمونوگلوبولین شتر یک کوهانه ۵۳

۲-۳-۲-۱ ایمن سازی شتر با پروتئین نوترکیبCA IX ۵۳
۲-۳-۲-۲ خون گیری و تهیه سرم..... ۵۴
۲-۳-۲-۳ بررسی تولید آنتی بادی در شتر به وسیله تست الایزا..... ۵۴
۲-۳-۲-۴ جدا کردن لنفوسیت از خون محیطی..... ۵۶
۲-۳-۲-۵ استخراج RNA..... ۵۶
۲-۳-۲-۶ ساخت cDNA با استفاده از کیت فرمنتاز..... ۵۹
۲-۳-۲-۷ PCR ژن VHH..... ۵۹
۲-۳-۲-۸ استخراج پلاسمید(فاژمید)..... ۶۴
۲-۳-۲-۹ هضم آنزیمی وکتور pComb3x و ژن VHH (محصول PCR ثانویه)..... ۶۶
۲-۳-۲-۱۰ لیگاسیون قطعه هدف با وکتور برش خورده..... ۶۷
۲-۳-۲-۱۱ انتقال الکتریکی محصول لیگاسیون به باکتری مستعد..... ۶۸
۲-۳-۲-۱۲ تأیید اتصال قطعات ژن VHH و DNA فاژمیدی..... ۷۱
۲-۳-۲-۱۳ تهیه فاژ کمکی..... ۷۲
۲-۳-۲-۱۴ رهاسازی و تخلیص فاژ نوترکیب و تعیین تیتر آن..... ۷۳
۲-۳-۲-۱۵ تهیه ذخیره سلولی..... ۷۴
۲-۳-۳ غنی سازی..... ۷۵
۲-۳-۳-۱ مراحل غنی سازی با استفاده از آنتی ژن پوشیده شده بر سطوح چاهک پلیت الایزا..... ۷۵
۲-۳-۳-۲ آلوده سازی مجدد باکتری *TG1* با فاژ نوترکیب..... ۷۶
۲-۳-۴ بررسی پیشرفت مراحل غنی سازی با استفاده از روش الایزا..... ۷۷
۲-۳-۵ مراحل انجام الایزا پلی کلونال فاژی..... ۷۷
۲-۳-۶ انتخاب کلونهای مناسب..... ۷۸
۲-۳-۷ بررسی کلون انتخاب شده (کلون K24)..... ۷۸
۲-۳-۸ تعیین توالی نانوبادی ساخته شده ضد *CA IX*..... ۷۹
۲-۳-۹ بیان آنتی بادی در فاز محلول..... ۷۹
۲-۳-۹-۱ بیان نانوبادی ضد *CA IX* در باکتری *TOP10F'* ۷۹
۲-۳-۹-۲ بیان نانوبادی ضد CA IX در وکتور pET-28a..... ۸۰
۲-۳-۹-۳ بررسی نانوبادی بیان شده علیه CA IX روی ژل اکریل آمید..... ۸۹

۲-۳-۹-۴ بیان نانوبادی تولید شده علیه CA IX در مقیاس آزمایشگاهی ۸۹
۲-۳-۱۰ تخلیص نانو بادی علیه CA IX بهکمک کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA ۸۹
۲-۳-۱۱ انجام لکه گذاری وسترن به منظور تأیید نانوبادی بیان شده علیه CA IX ۹۰
۲-۳-۱۲ تعیین میزان افینیتی نانوبادی علیه CA IX ، با روش الایزا ۹۱
۲-۳-۱۳ انجام واکنش الایزا با استفاده از نانوبادی تولید شده علیه CA IX بر روی سلولهای HeLa ۹۲
فصل سوم نتایج ۹۵
۳-۱ توالی ژنCA IX ۹۶
۳-۲ بلاست توالی نوکلئوتیدی در نظر گرفته شده ۹۶
۳-۲ تولید پروتئین نوترکیبCA9 ۹۸
۳-۲-۱ تخلیص پلاسمیدهای pUC57 و pET32a ۹۸
۳-۲-۲ زیرهمسانه سازی CA9 نوترکیب به درون وکتورpET32a ۹۹
۳-۲-۳ آنالیز کلونهای حاصل از واکنش اتصال ۹۹
۳-۲-۴ تخلیص پروتئینهای نوترکیب ۱۰۰
۳-۲-۵ تأیید پروتئین توسط آزمایش لکه گذاری وسترن ۱۰۱
۳-۲-۶ سنجش غلظت پروتئین ۱۰۱
۳-۳ ایمن سازی شتر با محصول نوترکیب ۱۰۲
۳-۳-۱ تزریق پروتئین به شتر ۱۰۲
۳-۳-۲ بررسی تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین نوترکیب CA9 در سرم شتر بعد از تزریق آنتی ژن ۱۰۳
۳-۴ خونگیری و تخلیص لنفوسیت: ۱۰۳
۳-۵ استخراج RNA تام از لنفوسیت‌های شتری ۱۰۴
۳-۶ ساختcDNA ۱۰۵
۳-۷ تهیه کتابخانه ۱۰۵
۳-۷-۱ PCR ژن VHH ۱۰۵
۳-۷-۱-۱ PCR ژنهای VHH (PCR اولیه) ۱۰۵
۳-۷-۱-۲ PCR ژنهای VHH (PCR ثانویه) ۱۰۶
۳-۷-۲ استخراج وکتور فاژمیدی ۱۰۷
۳-۷-۳ هضم آنزیمی فاژمید و ژنهای VHH تکثیر شده ۱۰۸

۳-۷-۴ اتصال قطعات ژنی VHH (نانو بادیهای اختصاصی بر علیه CA9) و وکتورهای فاژمیدی جهت ساخت کتابخانه ژنی ۱۰۹
۳-۷-۵ تایید کلون حاوی VHH نوترکیب از کتابخانه فاژمیدی با روش واکنش زنجیرهایی پلیمراز ۱۰۹
۳-۷-۶ هضم آنزیمی فاژمیدهای نوترکیب کتابخانه فاژمیدی ۱۰۹
۳-۸ تهیه فاژ کمکی و تعیین تیتر آن ۱۱۰
۳-۹ ارزیابی پیشرفت مراحل غنی سازی با استفاده از روش الایزا ۱۱۰
۳-۱۰ انجام فاژالایزای مونوکلونال برای مرحله غنی سازی دارای بالاترین شدت جذب ۱۱۱
۳-۱۱ بررسی کلونk24 به روش هضم آنزیمی ۱۱۲
۳-۱۲ تعیین توالی کلون k24 ۱۱۲
۳-۱۳ بیان نانوبادی در فاز محلول ۱۱۳
۳-۱۳-۱ بیان نانوبادی در میزبان 'TOP10F ۱۱۳
۳-۱۳-۲ انتقال نانوبادی به وکتور بیانیpET-28a ۱۱۴
۳-۱۳-۲-۱ تخلیص پلاسمید pET-28a ۱۱۴
۳-۱۳-۲-۲ هضم آنزیمی پلاسمید pET-28a و ژن VHH تکثیر شده ۱۱۴
۳-۱۳-۲-۳ تایید کلونهای نوترکیب حاوی VHH به روش PCR ۱۱۵
۳-۱۳-۲-۴ هضم آنزیمی کلون‌های نوترکیب حاوی VHH ۱۱۶
۳-۱۳-۲-۵ بیان نانوبادی در میزبان BL21 ۱۱۷
۳-۱۴ تخلیص نانوبادی با استفاده از ستون IMAC با روش دناتوره ۱۱۸
۳-۱۵ آنالیز نانوبادی تولیدی با روش لکه گذاری وسترن با کمک آنتی بادی بر علیه His-tag ۱۱۸
۳-۱۶ انجام آزمایش الایزا با استفاده از نانوبادی‌های علیه CA9 بر روی آنتی ژن نوترکیب CA9 ۱۱۹
۳-۱۷ انجام آزمایش الایزا با استفاده از نانوبادیهای علیه CA9 بر روی سلولهای HeLa ۱۱۹
۳-۱۸ تعیین تمایل نانوبادی علیه CA9 با استفاده از روش الایزا ۱۲۰
۳-۱۹ بلاست توالی اسید امینه‌ای نانوبادی در پایگاه داده NCBI ۱۲۰
فصل چهارم بحث و پیشنهادات ۱۲۱
۴-۱- بحث ۱۲۲
۴-۲- پیشنهادات ۱۳۰
منابع ۱۳۱

فهرست منابع ۱۲۵
فصل پنجم پیوست ۱۴۷
طرز تهیه آنتی بیوتیک ۱۴۷
طرز تهیه پرایمر ۱۴۸
طرز تهیه محیط‌های کشت ۱۴۸
a) محیط کشت LB : ۱۴۸
b) محیط کشت SB : ۱۴۸
c) محیط کشت LB- Agar ۱۴۸
d) محیط کشت LB- Top Agar ۱۴۸
e) محیط SOC (۲۰۰ میلی لیتر) ۱۴۸
f) محیط کشت ذخیره سازی باکتری ۱۴۹
بافرهای مورد نیاز جهت الکتروفورز ژل آگارز ۱۴۹
a) بافر TAE(50x) ۱۴۹
b) بافر TBE (10x) ۱۴۹
c) بافر بارگذاری(Loading 6x) ۱۴۹
d) d.محلول رنگ آمیزی ۱۴۹
محلولهای مورد نیاز جهت تهیه سلول مستعد ۱۴۹
a. تهیه سلول مستعد جهت روش الکتروپوریشن ۱۴۹
b. تهیه سلول مستعد جهت روش شوک گرما – سرما ۱۴۹
بافرها و محلول‌های لازم جهت مراحل غنی سازی ۱۵۰
a. محلول رسوب دهی فاژ PEG / NaCl ۱۵۰
PEG (6000) ۲۰۰ NaCl , ۱۵۰gr ۱۵۰
b. بافرهای لازم جهت شستشو در مراحل غنی سازی ۱۵۰
c. محلول رهاسازی (elution) ۱۵۰
d. محلول خنثی کننده ۱۵۰
بافرهای مورد نیاز در روش ELISA ۱۵۰
a. محلول پوشاننده پلیت ۱۵۰

b. محلول بلاک کننده..... ۱۵۰

c. بافر شستشو(PBST)..... ۱۵۰

محلول استوک IPTG ۱۰۰ mM ، جهت القا بیان..... ۱۵۰

محلولها و بافرهای مورد نیاز برای ژل SDS-PAGE..... ۱۵۱

بافرهای مورد نیاز جهت تخلیص پروتئین از ستون Ni-NTA..... ۱۵۲

مواد مورد نیاز جهت تهیه معرف برادفورد..... ۱۵۳

محلولهای مورد نیاز جهت وسترن بلاتینگ..... ۱۵۳

فصل اول

مقدمه

۱-۱ کلیه

کلیه‌ها یک جفت از اندام بدن انسان هستند که در دو سوی ستون فقرات و در قسمت پایین شکم قرار دارند. بالای هر کلیه یک غده آدرنال (Adrenal Gland) چسبیده است. توده‌ای از بافت چربی و یک لایه بیرونی از بافت فیبری (فاسیای ژروتا) (Gerotas Fascia)، کلیه‌ها و غده‌های آدرنال را در بر می‌گیرد.

کلیه‌ها بخشی از مجاری ادرار هستند. آنها با جداسازی مواد زائد و آب اضافی از خون، ادرار تولید می‌کنند. ادرار در فضایی خالی (لگنچه کلیه) در وسط هر کلیه جمع می‌شود، و سپس از طریق لوله‌ای به نام حالب (Ureter) به مثانه می‌ریزد، و از طریق لوله دیگری به نام پیشابراه (Urethra) از بدن دفع می‌شود.

کلیه‌ها همچنین ماده‌ای تولید می‌کنند که به کنترل فشار خون و تولید گلبول‌های قرمز خون کمک می‌کند[۱].

۱-۲ شناخت سرطان

گاهی سلول‌های جدید زمانی‌که بدن به آنها نیاز ندارد تشکیل می‌شوند و سلول‌های پیر نیز در زمانی‌که باید حذف شوند، از بین نمی‌روند؛ لذا سلول‌های اضافه، تشکیل توده‌ای از بافت را می‌دهند که به تومور معروف است. البته تمام تومورها سرطان نیستند.

تومورها به دو گروه خوش‌خیم (غیرسرطانی) و یا بدخیم (سرطانی) دسته بندی می‌شوند. معمولاً، تومورهای خوش‌خیم می‌توانند برداشته شوند و به‌ندرت دوباره رشد می‌کنند. تومورهای بدخیم، سرطانی هستند. سلول‌های تومورهای بدخیم به بافت‌ها و اندام اطراف هجوم برده و به آنها آسیب می‌رسانند. همچنین، سلول‌های سرطانی می‌توانند از تومور بدخیم جدا شده و وارد جریان خون و یا دستگاه لنفاوی شوند. به همین طریق است که سلول‌های سرطانی از سرطان اولیه (تومور اولیه) جدا شده و گسترش می‌یابد و تومورهای جدیدی در سایر اندام تولید می‌کند. گسترش سرطان متاستاز نامیده می‌شود. انواع مختلف سرطان، تمایل به گسترش به قسمت‌های مختلف بدن دارند[۲]. امروزه سرطان به دومین عامل مرگ و میر در دنیا تبدیل شده است[۳].

۱-۲-۱ سرطان کلیه

وقتی که سرطان کلیه به بیرون از کلیه گسترش می‌یابد، سلول‌های سرطانی اغلب در غدد لنفاوی اطراف یافت می‌شوند. سرطان کلیه همچنین گاهی به ریه‌ها، استخوان‌ها و یا کبد نفوذ می‌کند و نیز ممکن است از یک کلیه به کلیهٔ دیگر گسترش پیدا کند.

زمانی‌که سرطان از مکان اولیه خود به دیگر نقاط بدن گسترش می‌یابد (متاستاز)، تومور جدید دارای همان سلول‌های غیرطبیعی بوده و همان نام تومور اولیه را خواهد داشت. برای مثال، اگر سرطان کلیه به ریه‌ها سرایت کند، سلول‌های سرطانی در ریه‌ها در واقع سلول‌های سرطان کلیه هستند. این بیماری سرطان کلیه متاستاتیک است و نه سرطان ریه و به شکل سرطان کلیه، و نه سرطان ریه، درمان می‌شود. پزشکان تومور جدید را بیماری متاستاتیک و یا بیماری دوردست می‌نامند.

۱-۲-۲ تشخیص بیماری سرطان کلیه

ممکن است یک یا چند مورد از روش‌های زیر جهت تشخیص بیماری به‌کار رود :

- معاینه فیزیکی
- آزمایش ادرار
- آزمایش خون
- عکس رنگی (Intravenous Pyelogram -IVP)
- سونوگرافی (Ultrasound)
- بیوپسی (نمونه‌برداری)
- جراحی و بررسی بافت در زیر میکروسکوپ

۱-۲-۳ شیوه‌های درمان

مبتلایان به سرطان کلیه ممکن است تحت عمل جراحی، آمبولیزه (مسدود)کردن شریان (Embolization)، پرتودرمانی، درمان بیولوژیک، و یا شیمی‌درمانی قرار بگیرند. برخی از بیماران هم ترکیبی از درمان‌ها را دریافت می‌کنند[۴].

سرطان بدخیم کلیه (RCC[1]) ۲٪ از تمام سرطان‌های دنیا را تشکیل می‌دهد[۵] و در توبول‌های پروکسیمال کلیه تشخیص داده می‌شود مطالعات بعدی مشخص کرد در اثر تغییرات سلولی (سیوتوژنتیکی) می‌توان این سرطان را در توبول‌های دیستال نیز مشاهده کرد.

میزان شیوع این سرطان از سال ۱۹۷۷ تا کنون در حال افزایش است. یکی از علل مرگ و میر بالا در این سرطان این است که در حال حاضر برای تشخیص به موقع و درمان این سرطان روشی صحیح وجود ندارد؛ به ویژه اینکه این بیماری در برابر روش‌های معمول تیمار سرطان یعنی شیمی درمانی و پرتودرمانی نیز مقاوم است[۶].

[1] Renal Cell Carcinoma

بنابراین وجود یک بیومارکر برای تشخیص به هنگام و ایمونوتراپی این سرطان می‌تواند بسیار مورد نیاز باشد. تا کنون چندین آنتی بادی تک دودمانه که با اپی تلیوم پروکسیمال قسمت تیوبولار کلیه و به طور اختصاصی با RCC واکنش می‌دهند گزارش شده‌اند؛ اما استفاده‌ی کلینیکی از آنها در تشخیص و درمان RCC موثر نبوده است. از جمله این آنتی‌بادی‌ها، آنتی بادی های موشی mAbS23 و mAbS27 بودند که اثبات شده که به آنزیم ادنوزین دآمیناز(gp120) متصل می‌شدند[۷].

۱-۳ کربونیک انهیدراز ۹ (Carbonic Anhydrase IX)

۱-۳-۱ کربونیک انهیدرازها

α-کربونیک انهیدرازها متالوآنزیم‌های گسترده‌ای هستند که در مهره داران عالی از جمله انسان وجود دارند[۸]. تاکنون ۱۶ ایزوآنزیم از آنها کشف شده است که از لحاظ محل قرارگیری در سلول، فعالیت کاتالیتیک و پاسخگویی به ممانعت کننده‌های مختلف تفاوت دارند. بعضی از این آنزیم‌ها مثل کربونیک انهیدراز ۱، ۲، ۳، ۷ و ۱۳ سیتوسولی و بقیه یعنی ۹، ۴، ۱۲ و ۱۴ متصل به غشا هستند و یک نوع یعنی ۶ هم به درون بزاق ترشح می‌شود. ایزوفرم ۱۵ در انسان و پریمات‌ها بیان نمی‌شود و تنها به صورت سودوژن[1] باقی مانده است. اما در بسیاری جوندگان و مهره داران عالی بیان می‌شود[۹].

α-کربونیک انهیدرازها در تمامی نقاط بدن بیان می‌شوند. گلبول‌های قرمز خون و بافت‌های مغز، شش، روده، کبد، کلیه و بیضه بیشترین بیان آنزیم‌های کربونیک انهیدراز را دارند. ایزوفرم‌های کربونیک انهیدراز حاضر در این مناطق در عمل تنفس، انتقال سیناپسی، تولید مایعات چشمی، بازجذب مغز استخوان، ترشح اسید معده، اسیدی کردن ادرار، بلوغ اسپرم و غیره نقش دارند[۱۰].

تنها واکنش CA[2]ها که تاکنون به آن‌ها نسبت داده می‌شود واکنش برگشت‌پذیر CO2+H2O →HCO3+H است[۸]. کربونیک انهیدرازهای غشایی مثل CA IX، دارای جایگاه فعال خارج سلولی هستند که در طی فعالیت آن‌ها H^+ و $HCO3^-$ در فرآیندهای فیزیولوژیک تولید می‌شود که اسیدیفیکاسیون خارج سلولی نیز نام دارد. ایزوفرم‌های کربونیک انهیدراز داخل سلولی در پروسه‌های سلولی مثل تنفس، تنظیم اسید و باز، ترشح الکترولیت، تغذیه استخوان، کلسیفیکاسیون و دیگر واکنش‌های بیوسنتز که نیاز به $HCO3^-$ دارد مثل لیپوژنز، گلیکونئوژنز و تولید اوره دخیل هستند[۸].

۱-۳-۲ کشف کربونیک انهیدراز۹

[1] Pseudogene
[2] Carbonic Anhydrase

اولین بار در سال۱۹۸۶ اوسترویک[1] و همکاران مونوکلونال آنتی بادی G250 را معرفی کردند که علیه سرطان بدخیم کلیه (RCC) موثر بوده و الگوی اثر آن در بافت های نرمال بسیار نادر بود[۱۱] و در سرطان‌های غیر از کلیه نیز واکنش جانبی این آنتی بادی مشاهده گردید. از آنجا که بافت‌های سالم کلیه این آنتی ژن را بیان نمی‌کنند، این فرضیه در نظر گرفته شد که آنتی ژن مربوط به G250 در اثر عفونت ویروسی و یا در اثر انکوژن‌ها ایجاد می‌شود[۱۱].
گرابمایر[2] و همکاران در سال ۲۰۰۰ ملکول هدف این آنتی بادی را[3]MN/CA IX معرفی کردند[۱۲] که پاستورکوف[4] و همکاران این ملکول را در ۱۹۹۲ به عنوان یک پروتئین همراه با تومور شناسایی کرده بودند[۱۳].

بنابراین نقش این آنتی بادی ضد CA IX در شناسایی سرطان اثبات گردید.
تاکنون به روش‌های مختلف وجود CA IX را در انواع مختلفی از سرطان‌ها نشان داده‌اند. مثلا کلات و همکاران[5] در تحقیقی نشان دادند که از بین ۵۲۲ نمونه دارای تومور ابتدایی در نوعی سرطان مثانه،[6]TCC، ۳۸ نمونه تومور بدخیم TCC و ۱۵۵ نمونه سالم در یک ریزآرایه، که باروش ایمونوهیستوشیمیایی برای وجود CA IX رنگ آمیزی شده بودند، تمام نمونه‌های سالم از نظر وجود CA IX منفی، و ۷۹٪ نمونه‌های TCC، CA IX مثبت بودند[۱۴]. تزریق مونوکلونال آنتی بادی به نمونه موشی نیز، تجمع این ملکول را در تومورهای RCC نشان داده است[۱۵]. در یکی از مطالعات شیمیایی پروتئومیک در عمل جراحی کلیه سرطانی ، CA IX به عنوان یکی از مهم ترین مارکرهای RCC در انسان کشف شد. این عمل جراحی بر اساس خون‌رسانی ex vivo و شناسایی CA IX با استفاده از مشتق استری بیوتین و سپس به دام اندازی پروتئین‌های بیوتین دار شده و آنالیز آنها با اسپکترومتری جرمی انجام شده است[۱۶]. به دنبال این نتایج، تیمار تومور RCC با این آنتی بادی‌ها نیز در نظر گرفته شده است[۱۸;۱۷]. در حالت طبیعی در سلول‌های کلیوی ایزوآنزیم‌های نوع ۱ و ۲ کربونیک انهیدراز بیان می‌شوند[۱۹].

۱-۳-۳ بیان و پراکندگی CA IX

به تازگی نشان داده شده که دو ایزوفرم کربونیک انهیدراز در بسیاری تومورها با بیان بالایی همراهی می‌کنند و می‌توانند در پیشرفت تومور و پاسخ به درمان تومور ارتباط داشته باشند[۲۰-۲۲].

[1] Oosterwijk et al.
[2] Grabmair et al.
[3] MN, MN/CA IX; Carbonic Anhydrase 9
[4] Pastorek
[5] Klatte et al.
[6] Transitional Cell Carcinoma Of The bladder (TCC)

اولین کربونیک انهیدرازی که اثبات شده در سرطان‌ها بیان می‌شود CA IX بود که همان طور که گفته شد توسط پاستورکوف و همکاران[1] معرفی گردید[۲۱;۲۰]. دومین کربونیک انهیدراز سرطانی، CA XII بود که بعدا اثبات شد در بعضی تومورها به همراه CA IX بیان می‌شود و بیان آن در بافت‌های نرمال گستردگی بیشتری دارد[۲۱].

پراکندگی CA IX در بافت‌های انسانی غیر معمول است: این آنتی ژن در تعداد محدودی بافت‌های نرمال بیان می‌شود و در طی کارسینوژنز نیز، بیان آن کاسته یا قطع می‌شود، اما در تومورهای کارسینومای متعددی به صورت نابجا بیان می‌شود و این ویژگی غیرمعمول موجب شده تا به عنوان یک بیومارکر سرطانی در نظر گرفته شود[۲۴;۲۳;۲۱]. در این تحقیق، دنبال کردن CA IX بیان شده نابجای این سرطان‌ها مورد هدف است.

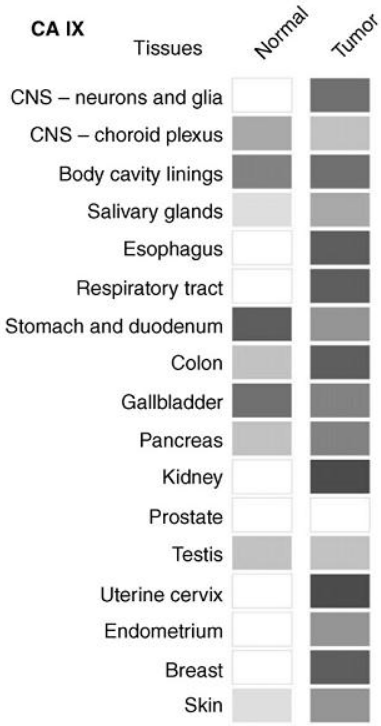
در ابتدای شناسایی این آنزیم گفته شد که در بعضی سرطان‌ها، به علت شرایط هایپوکسی ایجاد شده ناشی از عملکرد سلول‌های سرطانی، بیان این آنزیم زیاد می‌شود - مانند سرطان مثانه، ریه، کلیه، شش، مری، تخمدان، مغز و روده - و در این سرطان‌ها می‌تواند به عنوان مارکر سرطان شناخته شود[۲۵;۱۳]. همچنان که وجود CA IX در ۷۵٪ سرطان های سرویکس و کولون و در ۹۵٪ سرطان‌های کلیوی گزارش شده است[۲۶]. در صدها تا هزاران بیمار و استفاده از روش‌های ریزآرایه بافتی[2] در بسیاری تومورها، CA IX به عنوان یک بیومارکر معتبر در سرطان سینه، شش، تخمدان، مثانه و استروسیتوما شناخته شده است. همچنین، تحقیقات انجام گرفته نشان می‌دهد مقدار بیان CA IX می‌تواند با پیشرفت تومور و وخیم‌تر شدن حال بیمار ارتباط داشته باشد طوری‌که در بیمارانی که امید کمی به ادامه زندگی در آنها وجود دارد، میزان بیانCA IX نیز در آنها کاهش یافته است. بنابراین می‌توان شدت بیماری و مرحله پیشرفت را با این ملکول تا حدودی محاسبه کرد[۲۷]. البته تعداد کمی از مطالعات مانند مطالعه Debucquoyو همکاران این نتیجه را (شاید به علت تعداد کم بیماران نمونه گیری) تایید نکرده‌اند[۲۸].

در میان بافت‌هایی که به طور طبیعی CA IX را بیان می‌کنند مخاط غدد معده بیشترین بیان را نشان می‌دهند. نقش CA IX در این اندام احتمالا حفظ یکپارچگی شرایط مخاط و ایجاد تعادل بین تکثیر و تمایز سلول‌ها می‌باشد. علاوه بر معده در کیسه صفرا (و نه کبد) نیز سلول‌ها CA IX را در سطح پایه ای جانبی خود بیان می‌کنند. در سرطان‌های معده اغلب بیان CA IX کم می‌شود که علت آن به احتمال، تغییرات نئوپلاستیک مانند تمایز است[۲۱]. چنین مطالعاتی نشان داده که CA IX دارای نقشی مهم به عنوان عامل تمایز (تمایز به معنای موفوژنز و همئوستازی اپیتلیال معده) است[۲۱]. در تومورهای اپیتلیال صفراوی نیز مشابه وضعیت ذکر شده در مورد سلول‌های معده با افزایش میزان بدخیمی بیان

[1] Pastorekova et al.
[2] Tissue MicroArray(TMA)

CA IX کاهش می‌یابد که نشان دهنده نقش CA IX در تمایز این سلول‌ها می‌باشد[۲۱]. CA IX در غشای پایه‌ای جانبی سلول‌های حفره و مجرای پانکراس نیز یافت شده است و بیان آن در بعضی تومورهای پانکراس باقی می‌ماند و در بعضی مناطق هیپرپلاستیک نیز زیادتر می‌شود. CA IX در اپیتلیوم روده کوچک، جایی که به مناطق عمیق و پنهان تکثیر سلولی محدود می‌شود، نیز یافت شده است. در ادنوم کلورکتال سطحی و بدخیم بیان CA IX در هر دو بخش سطحی و عمقی افزایش می‌یابد[۲۱].

تنها اندامی که هیچگاه CA IX را چه در شرایط طبیعی و چه در شرایط توموری بیان نمی‌کند، پروستات است. کارسینوماهای دهانه رحم، کلیه، شش، مری ، سینه، مغز و وولوار بیان نسبتا بالاتری از CA IX را در انسان نشان می‌دهند (شکل۱-۱).



شکل۱-۱: بیان CA IX در بافت‌های مختلف و در وضعیت طبیعی و سرطانی. بیان بیشتر به صورت تیره‌تر نشان داده شده است. همان طور که ذکر شد، بیان CA IX در بعضی سرطان‌ها مانند سرطان‌های مثانه، ریه، کلیه، شش، مری، تخمدان، مغز و روده بیشتر می‌شود. شکل برگرفته از[۲۹]

با مقایسه توالی cDNA ژن CA IX بیان شده در سلولهای هلا[1] با cDNA ژن CA IX بیان شده در بافت‌های نرمال تفاوتی بین دو پروتئین مشاهده نشده است. این مقایسه نشان از آن دارد که جهش-

[1] HeLa cells

ها مسئول تجمع CA IX در تومور نیستند، بلکه مسیرهای تنظیمی وابسته به سرطان در کنترل بیان CA IX نقش دارند و این افزایش در نتیجه تنظیم‌های پاسخ دهنده به شرایط تومور است[۲۱].

۱-۳-۴ ساختار و فعالیت کاتالیتیکی CA IX

برخلاف ایزوفرم‌های دیگر CAها که دارای تنها یک زنجیره پلی پپتیدی شامل یک دومین کاتالیتیکی هستند CA IX پروتئینی چند دومینی و تراغشایی[1] با سازمان بندی پیچیده‌تری است.

ساختمان CA IX شامل بخش‌های زیر است:

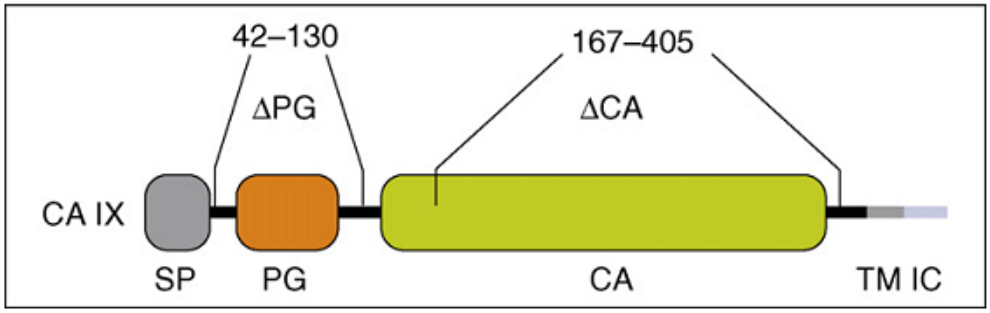
۱. یک بخش داخل سیتوزولی کوچک با عملکردی ناشناخته

۲. یک قسمت تراغشایی کوچک

۳. دومین کاتالیتیکی خارج سلولی که همسانی بالایی با دومین کاتالیتیک دیگر α- کربونیک-انهیدرازها دارد.

۴. یک دومین شبه پروتئوگلیکان که منحصرا در ایزوفرم CA IX یافت می‌شود.

۵. یک پپتید نشانه[2] کوچک



شکل۱-۲: ساختمان CA IX و قسمتهای مختلف آن: ناحیه تراغشاییTM، ناحیه درون سیتوزولیIC، ناحیه کاتالیتیکCA، ناحیه پروتئوگلیکانPG، و ناحیه پپتید نشانهSP

بسیاری آزمایشات نشان داده که دومین شبه پروتئوگلیکان و دومین کاتالیتیک در عملکرد و نقش این پروتئین در تومورزایی موثر هستند. دومین PG کمک می‌کند تا CA IX در pHهای پایین -که بیشتر آنزیم‌ها را غیرفعال می‌کند- با فعالیت بالا باقی بماند[۳۰]. ممانعت از CA IX موجب افزایش pH خارج سلولی و کاهش زنده ماندن سلول توموری می‌شود. pH خارج سلولی پایین با ترانسفورماسیون سلولی، بازآرایی کروموزومی، شکست ماتریکس خارج سلولی، مهاجرت و حمله، فعالیت پروتئاز و تولید فاکتورهای رشد همراه است که ممانعت از CA IX موجب تقلیل این پروسه‌ها و در نتیجه کاهش رشد و حمله تومور نیز خواهد شد[۳۲;۳۱].

[1] Transmembrane
[2] Signal Peptide

نتیجه عمل این آنزیم در تنفس، رسوب کلسیم از خون، تعادل اسید و باز در بدن ،ترمیم استخوان و ترشح مایعاتی مثل بزاق، اسید معده و مایع مغزی نخاعی است. سلول‌های توموری نسبت به سلول‌های طبیعی، تمایل به داشتن pH داخل سلولی قلیایی‌تری هستند[۳۳]. قرارگیری جایگاه فعال CA IX در سطح خارج سلولی غشای پلاسمایی موجب اسیدی سازی خارج سلولی محیط تومور می‌گردد و گاهی CA IX را به عنوان "مبدل کاتالیتیک" برای خروج اسید از داخل به خارج سلول می‌دانند[۳۴]. بیکربنات برای بافری کردن محیط داخل سلول به داخل فرستاده شده و پروتون‌ها در فضای خارج سلولی باقی می‌مانند. به این ترتیب CA IX در رشد تومورهای هیپوکسیک نقش دوگانه‌ای دارد: اول اینکه pH داخل سلولی را برای رشد تومور قلیایی نگه می‌دارد و دوم اینکه در تولید فضای اسیدی خارج سلولی که برای تسهیل حمله سلول تومور لازم است، دخالت دارد[۳۵;۳۴].

تعیین ساختار این پروتئین با استفاده از پرتو X مشخص کرده که ساختار چهارم CA IX متفاوت از سایر ایزوآنزیم‌های دیگر است و بنابراین ایجاد داروی ضدتوموری بر اساس ساختار، یکی از اهداف بسیاری از محققین شده است[۳۶]. این ایزوفرم در مقایسه با ایزوفرم‌های کلاسیک مثل ۱و۲ دارای زنجیره‌ی پروتئینی پیچیده‌تری است[۲۱;۸].

الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید نشان داده که CA IX دایمر بوده و زیرواحدهای آن با پیوند دی‌سولفید به هم متصل شده اند[۳۸;۳۷]. بعضی از کربونیک انهیدرازهای انسانی فعالیت کاتالیتیکی خیلی بالایی دارند که ایزوفرم CA IX جزء این دسته از ایزوفرم‌هاست[۳۹;۲۱;۸].

توالی امینواسیدی CA IX به این صورت است:

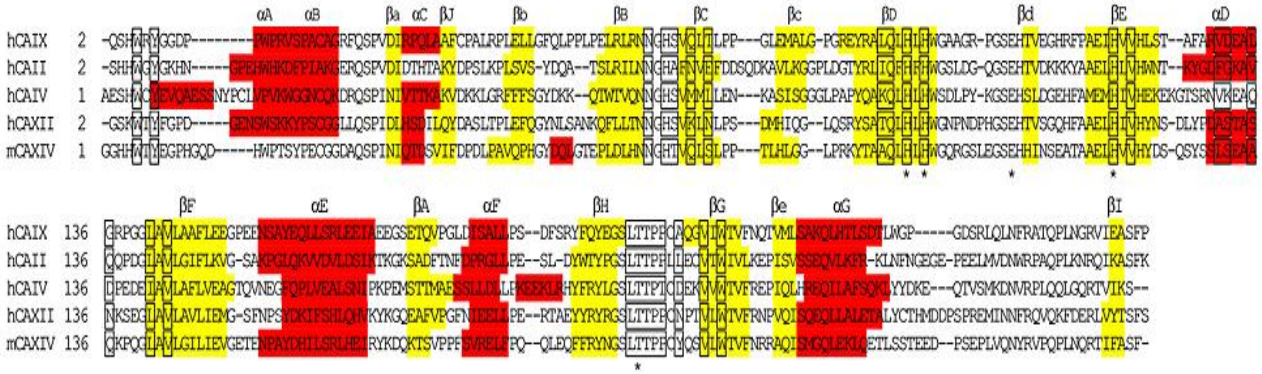
MAPLCPSPWLPLLIPAPAPGLTVQLLLSLLLLVPVHPQRLPRMQEDSPLGGGSSGEDDPLGEEDLPSE
EDSPREEDPPGEEDLPGEEDLPGEEDLPEVKPKSEEEGSLKLEDLPTVEAPGDPQEPQNNAHRDKEG
DDQSHWRYGGDPPWPRVSPA**C**[156]AGRFQSPVDIRPQLAAF**C**[174]PALRPLELLGFQLPPLPELRLRN
NGHSVQLTLPPGLEMALGPGREYRALQLHLHWGAAGRPGSEHTVEGHRFPAEIHVVHLSTAFARV
DEALGRPGGLAVLAAFLEEGPEENSAYEQLLSRLEEIAEEGSETQVPGLDISALLPSDFSRYFQYEGSLT
TPP**C**[336]AQGVIWTVFNQTVMLSAKQLHTLSDTLWGPGDSRLQLNFRATQPLNGRVIEASFPAGVD
SSPRAAEPVQLNS**C**[409]LAAGDILALVFGLLFAVTSVAFLVQMRRQHRRGTKGGVSYRPAEVAETGA

توالی اسیدامینه‌ای CA IX نشان می‌دهد این پروتئین دارای چهار پیوند دی سولفیدی است که سه تا از آنها در جایگاه فعال و یکی از آنها در قسمت پروکسیمال لنگرگاهی ناحیه تراغشایی است.

سیستئین‌های شماره ۱۵۶ و ۳۳۶ در موقعیت پیوند دی سولفیدی مشابه دیگر ایزوفرم‌های کربونیک انهیدرازها می‌باشند اما سیستئین‌های شماره ۱۷۴ و ۴۰۹ در ایجاد ساختمان دایمر پروتئین کمک می-کنند.

جهش در اسیدامینه‌های دنباله داخل سلولی آنزیم موجب تغییر در عملکرد آنزیم می‌شود و می‌تواند نشان از نقش این دنباله در سیگنالینگ آنزیم باشد. مناطق فسفریله شونده در دم داخل سلولی در ترئونین۴۴۳، سرین۴۴۸ و تیروزین۴۴۹ دارد. تیروزین۴۴۹ در سیگنالینگ Akt نقش دارد[۴۰] و ترئونین۴۴۳ نیز توسط پروتئین کینازA (PKA) و تحت تاثیر هیپوکسی فسفریله شده و فسفریله شدن آن موجب افزایش فعالیت CA IX می‌شود[۴۱]. فعالیت کامل CA IX نیز به دفسفریله شدن سرین۴۴۸ وابسته است[۴۱].

همانند دیگر ایزوفرم‌های کربونیک انهیدرازها که تاکنون بررسی شده دومین کاتالیتیک CA IX شامل یون ضروری روی(Zn^{2+}) است که با سه ریشه His و یک ملکول آب در جداسازی پروتون در جایگاه



فعال همکاری می‌کند که این فرایند منجر به شکل‌گیری یون هیدروکسید روی می‌شود که خود این یون به عنوان یک هسته دوست[۱] در جایگاه فعال عمل می‌کند.

شکل ۱-۳: مقایسه[۲] جایگاه فعال در کربونیک انهیدرازهای مختلف، مناطق رنگی شده مناطق α-هلیکس را در ساختار کربونیک انهیدرازها نشان می‌دهند. مناطق نقطه‌دار، رزیدوهای کاتالیتیکی را نشان می‌دهند و مناطقی که دورشان خط کشیده شده، مناطق تشکیل دهنده حفره جایگاه فعال هستند. کربونیک انهیدراز انسانی= hCA، کربونیک انهیدراز موشی=mCA، شکل برگرفته از[۳۶]

[1] Nucleophyl
[2] Alignment