نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم
جلد ۱۰، شماره ۳
تاریخ چاپ تابستان ۱۳۹۱

طراحی و ساخت پلاسمید حاوی ژن‌های "هر۲"[۱] و "جی.پی ۹۶"[۲] به شکل فیوژن وبیان آن با استفاده از ژن کد کننده پروتیئن سبز فلورسنت

نفیسه پاکروان، حوریه سلیمانجاهی، *زهیر محمد حسن:
دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی

چکیده

واکسن‌های" دی.ان.ای"[۳] که با استفاده از ژن "هر۲" تاکنون طراحی و در مدل‌های آزمایشگاهی استفاده شده‌اند موفقیت نسبی داشته‌اند. این امر نیاز به افزایش پتانسیل این واکسن‌ها را نشان می‌دهد. شواهد موجود حاکی از این است که ملکول‌های شوک حرارتی[۴] ادجونت‌های قوی در ایمنی درمانی تومور هستند. این ملکول‌ها قسمت‌های مختلف سیستم ایمنی ذاتی و اختصاصی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در این پژوهش از گلیکوپروتیئن ۹۶ (عضو خانواده خانواده پروتیئن‌های شوك حرارتی ۹۰) به دلیل خاصیت ادجونتی آن استفاده شد و این پژوهش با دو هدف انجام شد: اوّلاً تولید ساختار ژنتیکی (پلاسمید) واجد هر دو ژن "هر۲" و "جی.پی۹۶" به شکل فیوژن و ثانیاً بررسی بیان ساختار تولید شده با استفاده از ژن کد کنندهٔ پروتیئن سبز فلورسنت[۵]. به این منظور، انتهای C[۶] ژن "جی.پی۹۶" به قسمت خارج سلولی و بین غشایی ژن "هر۲" در پلاسمید "پی.سی. دی.ان.ای.۳"[۷] متصل و تحت عنوان پی.سی تی/هر۲ نامگذاری شد. ژن "جی.اف. پی" در پایی ن دست این دو قسمت کلون شد که تحت عنوان "پی.سی تی/هر۲/جی.اف.پی"[۸] نامگذاری شد تا بیان این ساختار در شرایط "این.ویترو"[۹] بررسی شود. هضم آنزیمی بر روی محصول اتصال دو ژن "هر۲" و "جی.پی۹۶" نشانگر کلون شدن دو ژن به شکل متصل به هم بود. سپس، پلاسمید پی.سی تی/هر۲/جی.اف.پی با استفاده از پلی فکت به داخل سلول‌های "هك.۲۹۳ تی"[۱۰] منتقل شدند. بررسی میکروسکوپی سلول‌های "هك.۲۹۳ تی" نشان داد که این سلول‌ها رنگ سبز فلورسنت تولید می‌کنند در حالی که سلول‌های حاوی پلاسمید بدون ژن رنگ سبز فلورسنت را تولید نکردند. نتایج این پژوهش حاکی از طراحی و بیان موفق ساختار است زیرا تولید رنگ سبز فلورسنت نشانگر قابل بیان بودن ساختار ژنی حاوی دو ژن "هر۲" و "جی.پی۹۶" بود. ضمناً امکان بررسی تولید قسمتی از پروتیئن "هر۲" به صورت فیوز شده به "جی.پی۹۶" با استفاده از ژن "جی.اف.پی" که در مقایسه با روش‌های متداول مانند وسترن بلات[۱۱] و یا "آر.تی- پی.سی.آر" [۱۲] روشی ساده و اررزان است، نشان داده شد. واکسن "دی.ان.ای" ایی آماده شده در این پژوهش قابل استفاده در ایمنی درمانی مدل‌های توموری "هر۲" مثبت است.

واژه‌های کلیدی: فیوژن، "هر۲"، "جی.پی۹۶"، "جی.اف.پی"
دریافت ۸۸/۲/۶ پذیرش۸۸/۱۰/۲
*نویسنده مسئول hasan_zm@modares.ac.ir

۱. Her2 ۲. gp96 ۳. DNA ۴. Heat Shock Proteins
۵. Green Fluorescent Protein or GFP ۶. C-terminal ۷. pcDNA3 ۸. pCT/Her2/GFP
۹. In vitro ۱۰. HEK 293 T ۱۱. Western Blot ۱۲. RT-PCR

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-29]

مقدمه

واکسن‌های ''دی.ان.ای'' به دلیل تولید پاسخ‌های ایمنی سلولی و ملکولی قوی در مدل‌های حیوانی مورد توجه قرار گرفته‌اند. این نوع واکسن‌ها کاندیدای برای درمان بیماری‌های آلرژیک و سرطان هستند. بررسی بیان ژن کدشونده با واکسن ''دی.ان.ای'' با استفاده از روش‌های مبتنی بر بلاتینگ[۱] ''پی.سی.آر'' و یا ایمنو/ هیستوشیمی[۲] انجام می‌شود.

از جمله بیماری‌هایی که ''دی.ان.ای'' واکسن برای آن طراحی شده است تومورهای با مارکر ''هر۲'' است. پروتواونکوژن ''هر۲'' پروتیئنی با وزن ملکولی ۱۸۵ کیلو دالتون را تولید می‌کند. این پروتیئن فعالیت تیروزین کینازی دارد و عضو خانواده گیرندهٔ فاکتور رشد است. افزایش تولید این پروتیئن در سرطان تخمدان، پستان، و گوارش دیده می‌شود که با پیش آگهی بد همراه است [۱]. وجود پادتن‌ها و پاسخ سلول‌های ''تی''[۳] علیه این ملکول در بیماران مبتلا به تومور ''هر۲'' مثبت نشان داده شده است، در نتیجه تحمل سیستم ایمنی بدن به این ملکول مطلق نیست [۲]، به عبارت دیگر امکان تولید پاسخ ایمنی نسبت به این ملکول‌ها وجود دارد. معهذا، پاسخ‌های ایمنی موجود در این بیماران برای ممانعت از رشد تومور کافی نیست. وجود این پاسخ‌های ایمنی، درگیری این ملکول در پیشرفت تومور و پیش آگهی بد آن باعث شده که این ملکول نامزد ایمنی درمانی شود. بنا بر این به‌منظور استفاده از این ملکول در ایمنی درمانی تومور نیاز به طراحی و ساخت واکسنی شود تا پاسخ ایمنی را افزایش دهد. اثرات نسبی درمانی و پیش‌گیری کننده ''دی.ان.ای'' واکسن‌های حاوی ''هر۲'' در برخی از بررسی‌ها نشان داده شده است [۶]-[۳].

همچنین پژوهش‌ها نشان داده‌اند که ملکول‌های شوک حرارتی به‌عنوان ادجونت‌های قوی عمل می‌کنند [۷]. آن‌ها خانواده‌ای از ملکول‌ها هستند که توالی‌شان در طول تکامل حفاظت شده است، و در داخل سلول به مقادیر زیاد یافت می‌شوند. این ملکول‌ها چاپرون‌هایی[۴] هستند که در فعال‌سازی سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن نقش دارند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که ملکول ''جی.پی۹۶'' نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی [۸] و [۹] دارد و خاصیت ادجوانتی قوی در پاسخ‌های ایمنی ضد تومور داشته است [۱۰]. پژوهش‌های دیگر نشان داده‌اند که اتصال ملکول شوك حرارتی به آنتی‌ژن مورد نظر باعث افزایش ایمنی‌زایی واکسن شده است.

با استفاده از نتایج این پژوهش‌ها ما ''دی.ان.ای'' واکسنی را طراحی کرده و ساخته‌ایم که حاوی قسمتی از ژن‌های هر دو ملکول''جی.پی۹۶'' و ''هر۲'' پشت سر هم و به‌هم پیوسته است. به‌علاوه امکان بررسی بیان این ساختار با استفاده از کلون کردن ژن کدکننده پروتیئن سبز فلورسنت در انتهای ژن‌های متصل بهم ''جی.پی۹۶''و ''هر۲'' نشان داده شده است. این روش از روش‌های مبتنی بر بلاتینگ، ''پی.سی.آر'' و یا ایمنو/هیستوشیمی ساده‌تر است.

---

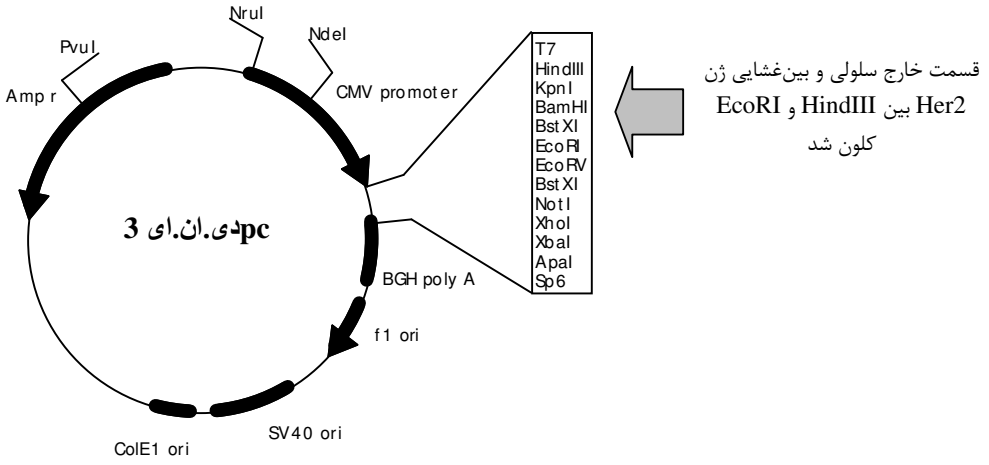
۱. Blotting ۲. Immunohistochemistry ۳. T cells ۴. Chaperons

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-29]

مواد و روش‌ها

ساخت پلاسمید حاوی قسمت خارج سلولی و بین‌غشایی Her2/neu (pHer2)

نوکلئوتیدهای ۹۰ تا ۲۱۸۰ از ژن ”هر۲“ (اهدایی از طرف پروفسور کاوالو، دانشگاه تورین ایتالیا، که قسمت خارج سلولی و بین غشایی آن را کد می‌کند بین سایت‌های آنزیمی ”هیند۳/ایی .کو.آر۱“[۱] پلاسمید ”پی. سی. دی.ان ای۳“[۳] کلون شد. به این منظور پلاسمید ”پی. سی. دی.ان ای۳“ با آنزیم‌های ”هیند۳“ و”ایی .کو.آر۱“ هضم شد. از طرف دیگر پلاسمید حاوی قسمت خارج سلولی و بین غشایی ”هر۲“ با آنزیم‌های ”هیند۳“ و ”ایی .کو.آر۱“ هضم و با استفاده از کیت کیاژن از ژل آگارز تخلیص شد. قطعه تخلیص شده با استفاده از واکنش اتصال[۲] در پلاسمید ”پی. سی. دی.ان ای۳“ کلون شد (شکل ۱) .



شکل ۱. نمایی از پلاسمید ”پی. سی. دی.ان ای۳“و محلی که ژن”هر۲“ در آن کلون شده است (این ویتروژن، بریتانیا)

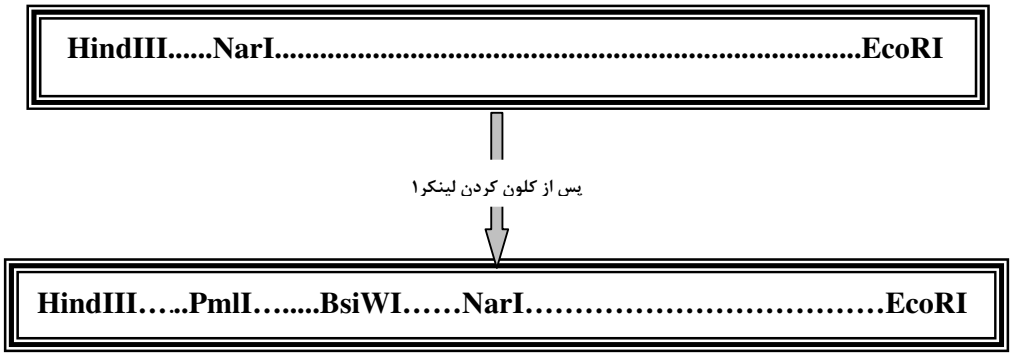
با استفاده از محل برش آنزیم ”نَر۱“[۳] که در ابتدای ژن ”هر۲“ قرار دارد (شکل۲)، سایت آنزیمی لازم برای کلون کردن ژن ”جی.پی۹۶“ در قسمت فرادست ژن ”هر۲“ ایجاد شد. به این منظور لینکر۱ (جدول ۱) در قسمت فرادست ”هر ۲“ بین محل ”هیند۳/نَر۱“[۴] کلون شد. آرایش آنزیم‌های محدودالاثر پس از این‌که لینکر۱ در فرادست ژن ”هر۲“ قرار گرفت در شکل ۲ نشان داده شده است.

لینکر۱ علاوه بر این‌که فضای لازم برای کلون کردن ”جی.پی۹۶“ در قسمت بالای ”هر۲“ را فراهم می‌آورد، همچنین حاوی توالی کدکننده سه گلایسین[۵] است که بین ”هر۲“ و ”جی.پی۹۶“ قرار می‌گیرد.

---

۱. Hind III/Eco RI ۲. Ligation ۳. Nar I ۴. Hind III/Nar I ۵. Glycine
۶. Eco RI

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-29]



شکل ۲. نمای شماتیکی از محل برش آنزیم‌های محدودالاثر در توالی ژن ”هر۲“. این ژن با سایت ”هیند ۳“ شروع و با ”ایی .کو.آر۱“[۴] خاتمه می‌یابد. از سایت ”نُر ۱“ در ابتدای ژن ”هر۲“ استفاده شده و لینکر۱ در ابتدای آن کلون شده است. بازهای حدفاصل محل اثر آنزیم‌های محدودالاثر با نقطه چین نمایش داده شده است.

جدول ۱. توالی لینکرها

لینکر۱ برای کلون کردن ژن ”جی.پی۹۶“ حد فاصل محل ”پی.ام.ال۱“[۱] و ”بی.ای.آی.دبلیو۱“[۲] در فرادست ژن ”هر۲“ استفاده شد. لینکر۲ حاوی قسمت انتهایی ژن ”جی.پی۹۶“ بدون کدون خاتمه است. این لینکر در پلاسمید ”پی. تندم-۱“[۳] حاوی قطعه ”پی.ام.ال۱/نوت۱“[۴] یا انتهای سی از ژن ”جی.پی۹۶“ کلون شد تا کدون خاتمه آن حذف شود . لینکر۳ برای حذف کدون خاتمه ژن ”هر۲“ استفاده شد.

توالی کد کننده گلیسین‌های حد فاصل دو ژن

Linker1 (5'- 3'): AAGCTTgcgcgCACGTGgcgcCGTACG*GGCGGCGGG*GCGCC
HindIII PmlI BsiWI NarI

Linker2 (5'- 3'): CAGCTG AAAAAGATGAATTG CGTACG
PvuII BsiWI

E coRI
Linker3 (5'- 3'): CGTACGAATTCCCGGG
BsiWI XmaI

ساخت پلاسمید حاوی قسمت خارج سلولی و بین غشایی ”هر۲“ متصل به انتهای سی ژن (”پی.سی.تی/هر۲)

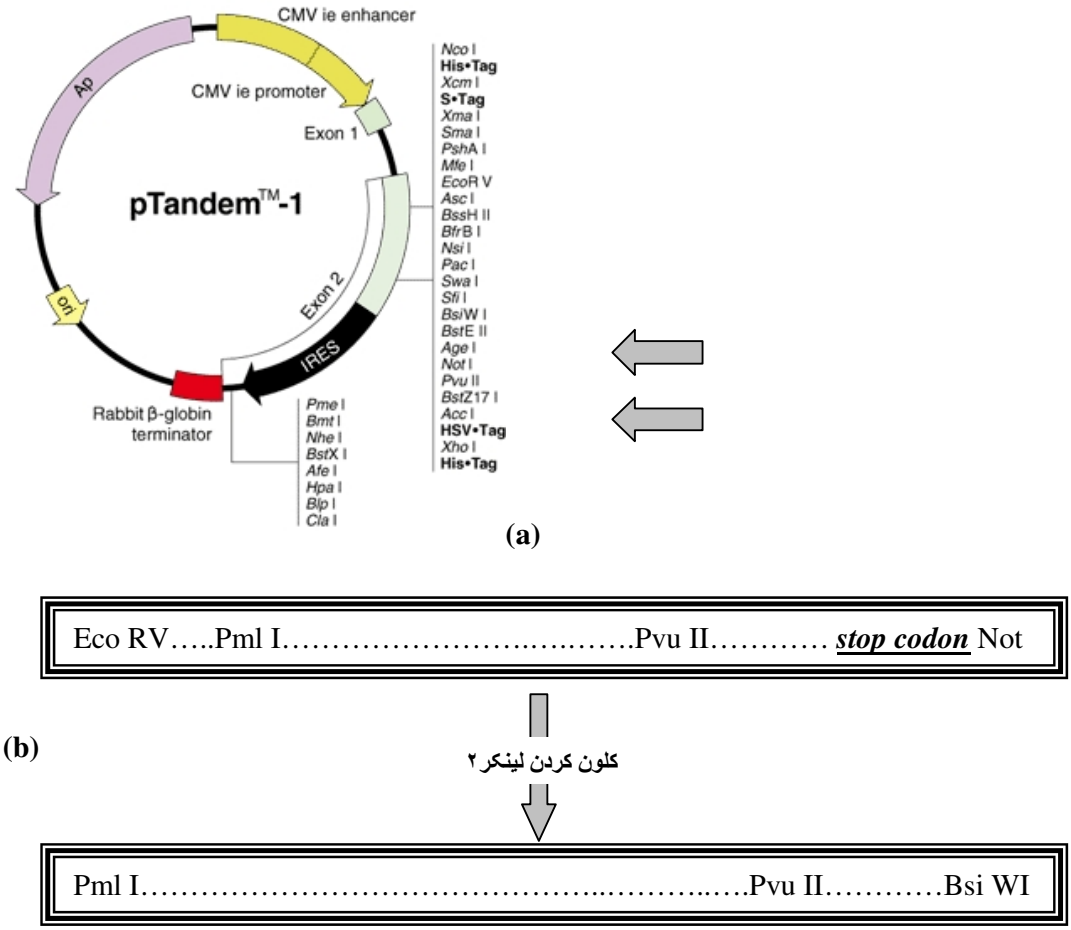
انتهای C ژن ”جی.پی۹۶“ انسان (اهدایی دکتر سید، بیمارستان ماساچوست، امریکا، و نوکلئوتیدهای ۱۳۰۰ تا ۲۵۳۰) که ۴۱۰ اسیدآمینه انتهایی ”جی.پی۹۶“ انسان را کد می‌کند (شکل ۳) با استفاده از آنزیم‌های ”ایی.کو.آر۵/نت۱“[۵] در بین سایت‌های ”پی.وی.یو۲/نت۱“[۶] موجود در پلاسمید ”پی.تندم-۱“ (نواژن) کلون شد (شکل ۳). در واقع از پلاسمید ”پی.تندم-۱“ فقط به‌عنوان یک حامل بیانی استفاده شد تا بتوانیم لینکر ۲ را در

۱. Pml I ۲. BsiWI ۳. pTandam-1 ۴. Pml I/ Not I ۵. Eco RV/Not I
۶. PvuII/NotI

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-29]

انتهایی ”جی.پی۹۶“ کلون و کدون خاتمه را در ژن ”جی.پی۹۶“ حذف کنیم. امکان حذف کدون خاتمه در پلاسمید ”پی.هر۲“ (پی.سی.دی.ان.ای۳ حاوی ژن ”هر۲“) وجود نداشت چون این پلاسمید حاوی محل اثر آنزیم ”پی.وی.یو۲“ است. به‌علاوه محل اثر آنزیم ”بی.اس.آی.دبلیو ۱“ در فرودست وجود دارد که کمک به حذف کدون خاتمه و جداسازی ژن ”جی.پی۹۶“ با کمک برش آنزیمی ”پی.ام.ال۱/بی.ای.آی.دبلیو۱“[۱] می‌کند.

قطعه ”پی.ام.ال۱/بی.ای.آی.دبلیو۱“ این ساختار جدا و در حد واسط سایت‌های مشابه در فرادست ژن ”هر۲“ در پلاسمید پی. ”هر۲“ کلون شد و تحت عنوان پی.سی تی/هر۲ نامگذاری شد.



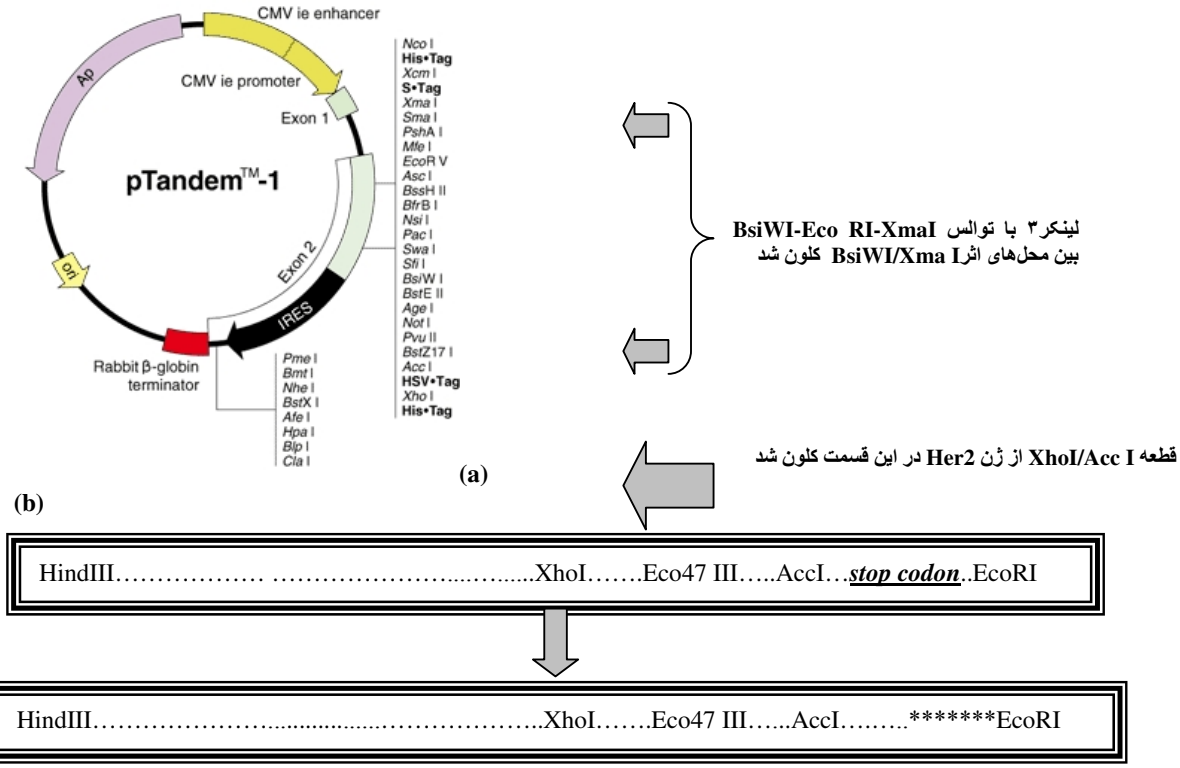
شکل۳. نمایی از پلاسمید ”پی.تندم ۱“ (نواژن، بریتانیا) نشان داده شده است (a) که انتهای سی از ژن ”جی.پی۹۶“ بین ”ایی. کو.آر۵/نت۱“ کلون شد. قابل توجه است که اتصال ”ایی . کو. آر۵“ موجود در ”جی.پی۹۶“ به ”پی.وی.یو۲“ موجود در ”پی.تندم۱“ باعث از بین رفتن ”پی.وی.یو۲“ در ”پی.تندم۱“ می‌شود و در این صورت می‌توان از”پی.وی.یو۲“ نزدیک به کدون خاتمه در ”جی.پی۹۶“ استفاده نمود و با کلون کردن لینکر۲ کدون خاتمه حذف شد. این فرایند در قسمت(b) نشان داده شده است.

۱. PmlI/BsiWI

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-29]

ساخت پلاسمید واجد ژن سبز فلورسنت (پی.سی تی/هر۲/جی اف پی)

به منظور کلون کردن ژن کد کننده پروتیئن سبز فلورسنت در انتهای ”جی.پی ۹۶“ متصل شده به ”هر۲“ ، ژن ”جی.اف.پی“ از پلاسمید ”پی.ایی .جی.اف.پی-ان“[۱] (کلون تك)با آنزیم‌های ”اس.ام.ای۱/نت۱“[۲] جدا و در بین سایت‌های ”ایی .کو.آر۵/نت۱“[۳] از پلاسمید پی.سی تی/هر۲ کلون و ”پی.سی.تی/هر۲/جی.اف.پی۱“[۴] نامگذاری شد. به منظور حذف کدون خاتمه ژن ”هر۲“ در این پلاسمید ابتدا لینکر۳ (جدول ۱) بین سایت‌های ”بی.اس.آی.دبلیو۱/ایکس.ام.ای۱“[۵] در پلاسمید ”پی.تندم-۱“ کلون شد. از طرف دیگر قطعه ”ایکس.اچ.او ۱/ ای.سی.سی۱“[۶] از ”هر۲“ (شکل ۴) بین سایت‌های مشابه از پلاسمید ”پی.تندم-۱“ حاوی لینکر۳ کلون شد و متعاقباً، قطعه ”ایی .کو۳-۴۷/ایی .کو.آر۱“[۷] از آن جدا و در حد فاصل سایت‌های مشابه از ”پی.سی. تی/هر۲/جی.اف.پی۱“ کلون و تحت عنوان ”پی.سی. تی/هر۲/جی.اف.پی“ نامگذاری شد. همهٔ آنزیم از شرکت فرمنتاز تهیه شدند.



شکل ۴. نمایی از پلاسمید ”پی.تندم-۱“ نشان داده شده است (a)که لینکر۳ و قطعه ”ایکس.اچ.او ۱/ ای.سی.سی۱“ از انتهای ژن ”هر۲“ در آن کلون شد. با جدا سازی قطعه ”ایی .کو۳-۴۷/ایی .کو.آر۱“ از پلاسمید طراحی شده در قسمت(a) این شکل و کلون کردن آن در پلاسمید ”پی.سی تی/هر۲/جی.اف.پی۱“ کدون خاتمه‌ای که درست پیش از سایت ”ایی .کو.آر۱“ در انتهای ژن ”هر۲“ قرار دارد حذف می‌شود. زیرا قسمتی که حاوی کدون خاتمه بود با توالی که بین ”ای.سی.سی۱“ و ”بی.اس.آی.دبلیو۱“ موجود در پلاسمید طراحی شده در قسمت (a) این شکل جای‌گزین شد (در شکلb این قسمت با ستاره نشان داده شده است). علت اتخاذ این استراتژی کاهش هزینه سنتز لینکر بود، زیرا فقط لینکر۳ که طول کمی دارد سنتز شد که ضمناً در پروژه‌های دیگر نیز قابل استفاده است

۱. pEGFP-N ۲. SmaI/NotI ۳. EcoRV/NotI ۴. pCT/Her2/GFP1
۵. BsiWI/Xma I ۶. XhoI/AccI ۷. Eco47III/EcoRI

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-29]

تخلیص و بیان پلاسمید پی.سی تی/هر۲/جی.اف.پی در شرایط "این ویترو"

باکتری اشریشیا کلی سویه "در اچ ۵ آلفا"[۱] با استفاده از روش کلرید کلسیم صلاحیتدار و با ساختارهای آماده شده ترانسفورم شد. تخلیص ساختارهای" پی.سی تی/هر۲/جی.اف.پی" و "پی.سی تی/هر۲" با استفاده از روش لیز قلیایی [۱۱] انجام گرفت.

برای بررسی بیان ساختار "پی.سی تی/هر۲/جی.اف.پی" لاین سلولی "هك۲۹۳ تی" در محیط "دی.مم"[۲] واجد ۱۵ درصد سرم جنین گاوی، ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین، ۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین جی ، ۱۰۰ میلی گرم در هر میلی‌لیتراستربتومایسین و ۲۵ میلی‌مولار "هیپس"[۳] کشت شدند. انتقال پلاسمید "پی.سی تی/هر۲/جی.اف.پی" به داخل این سلول‌ها با استفاده از پلی فکت (کیاژن) انجام گرفت. به این منظور تعداد ۷×۱۰^{۴} سلول از لاین سلولی "هك۲۹۳ تی" در پلیت‌های ۲۴ خانه ای کشت و محیط آن ۳ ساعت قبل از انتقال پلاسمید به داخل سلول‌ها تعویض شد. انتقال پلاسمید با افزودن مخلوط حاوی ۴۰۰ نانوگرم پلاسمید و ۴ میکرولیتر پلی فکت مطابق دستورالعمل کیاژن برای هر چاهک انجام شد. پس از ۴۸ ساعت تولید رنگ سبز فلورسنت با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد.

نتایج

بررسی پلاسمید واجد ژن‌های "هر۲" و "جی.پی۹۶" به فرم فیوژن

دی.ان.ای واکسن واجد ژن‌های "هر۲" و "جی.پی۹۶" با استفاده از لینکر مذکور در جدول ۱ ساخته شد. این ساختار با استفاده از برش با آنزیم‌های محدودالاثر و تعیین توالی تأیید شدند. بین دو توالی "هر۲" و "جی.پی۹۶" توالی کد کننده گلیسین قرار داده شد تا متضمن آزادی حرکت دو ملکول متصل به هم باشد. این توالی کمک می‌کند تا هر ملکول فرم خود را با آزادی و بدون تداخل پیدا کند. سایت آنزیمی "پی.ام.ال۱" ژن "جی.پی۹۶" را به دو قسمت مساوی (۴۱۰+۴۱۰) کد کننده ۴۱۰ اسید آمینه تقسیم میکند. این امر باعث تسهیل کلون کردن انتهای سی ژن "جی.پی۹۶" شد. در این پژوهش کدون خاتمه با استفاده از لینکرها، و نه "پی.سی.آر"، حذف شد تا از هر گونه تغییر احتمالی در توالی ژن‌ها ممانعت شود و دقیقاً توالی کد کننده مذکور در بانك ژن مورد استفاده قرار گیرد.

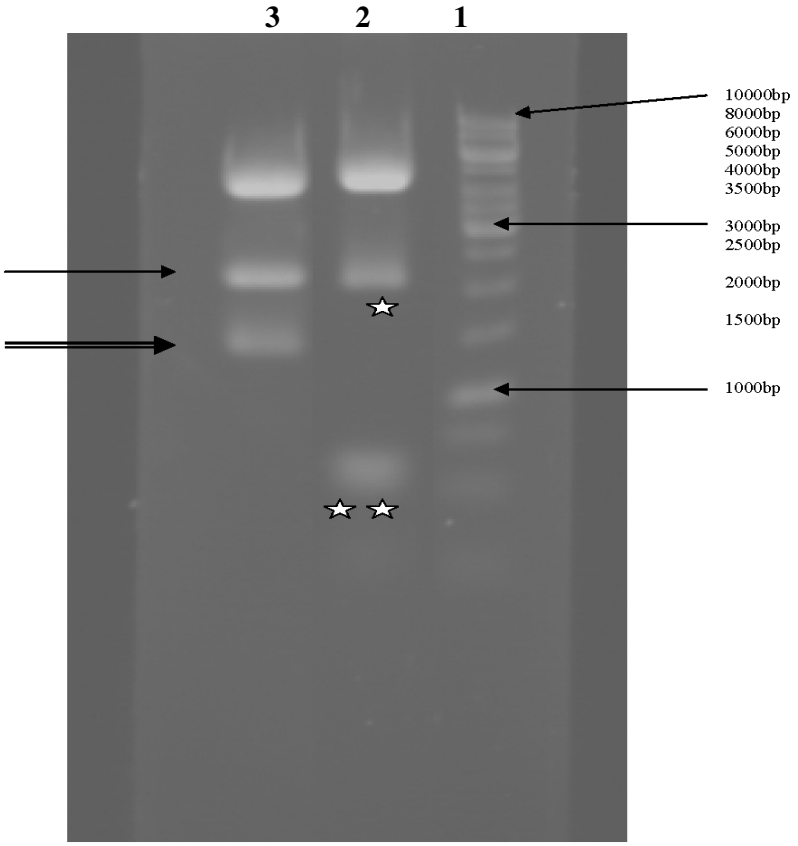
نهایتاً کلون کردن‌های متوالی باعث تولید دو ساختار شد: اولی ساختاری بر پلاسمید "پی سی دی ان ای ۳" که در آن به ترتیب "جی.پی۹۶" و"هر۲" به شکل پشت سر هم قرار گرفته‌اند. دومی ساختاری بر پلاسمید "پی.سی.دی.ان.ای۳" که در آن به ترتیب "جی.پی۹۶"، "هر۲" و "جی اف پی" به شکل پشت سر هم قرار گرفته‌اند. در واقع ساختار دوم به این منظور تولید شد تا نشان دهد ساختار اول قادر به تولید پروتیئن است. در ساختار دوم که حاوی "جی اف پی" است در واقع پروتیئن تولید شده با پروتیئن سبز فلورسنت برچسب‌دار شده و

۱. DH5α ۲. DMEM ۳. HEPES

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-29]

ما فقط رنگ سبز را پس از بیان ساختار مشاهده می‌کنیم. ساختارهای تولید شده هضم آنزیمی شدند که با الکتروفورز ژل آگارز صحت ساختار تأیید شد (شکل ۵).

هضم آنزیمی ساختار پی.سی تی/هر۲ با آنزیم‌های ”پی.ام.ال۱“ (موجود در توالی)”جی.پی۹۶“ و ”ایکس.اچ.او۱“ (موجود در توالی ”هر۲“ منجر به تولید سه باند به ترتیب به اندازه‌های حدود ۲۲۰۰ و ۵۰۰ (شکل ۵) جفت باز می‌شود. نتیجه هضم آنزیمی ساختار پی.سی تی/هر۲/جی.اف.پی با آنزیم‌های ”هیند۳“ (موجود در توالی ”جی.پی۹۶“) و ”ایکس.اچ.او۱“ (موجود در توالی ”هر۲“) منجر به تولید سه باند به ترتیب به اندازه‌های حدود ۲۲۰۰ و ۱۴۰۰ جفت باز (شکل ۵) می‌شود. نتیجه تعیین توالی نیز صحت ساختارها را تأیید کرد.



شکل ۵ . تصویر الکتروفورز ژل آگارز از هضم آنزیمی ساختارهای پی.سی تی/هر۲ و پی.سی تی/هر۲/جی.اف.پی .

لاین ۱ مارکر (فرمنتاز) که اندازه هریک از باندها از بالا به پایین نشان داده شده است.

لاین ۲ هضم ساختار پی.سی تی/هر۲ با آنزیم‌های ”پی.ام.ال۱“ و ”ایکس.اچ.او۱“. باندهای ۲۲۰۰ و ۵۰۰ جفت باز به ترتیب با یک ستاره و دو ستاره مشخص شده است.

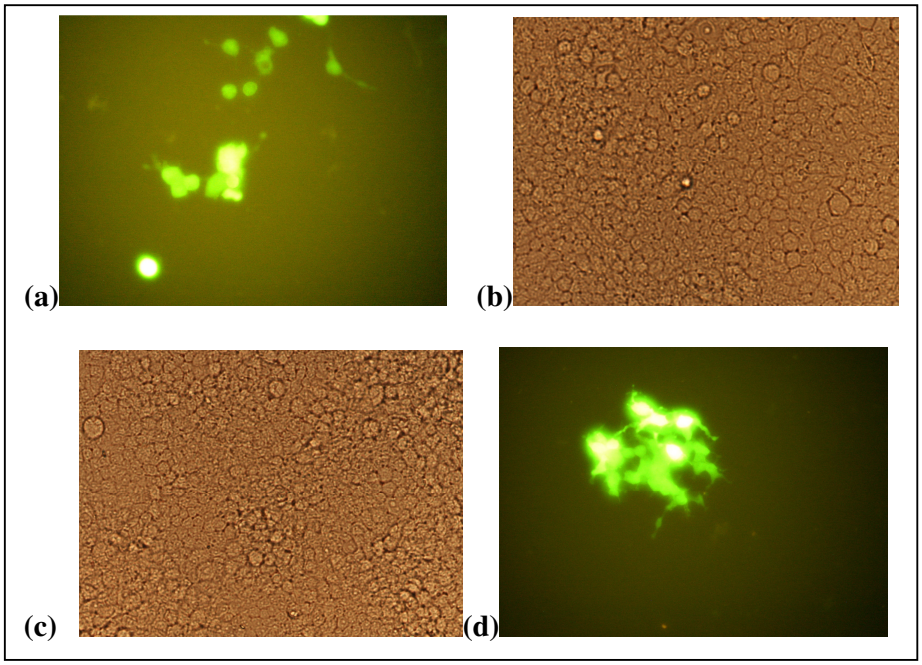
لاین ۳ هضم ساختار پی.سی تی/هر۲/جی.اف.پی با آنزیم‌های ”هیند۳“ و ”ایکس.اچ.او۱“. باندهای ۲۲۰۰ و ۱۴۰۰ جفت باز به ترتیب با فلش یک خطی و دو خطی نشان داده شده‌اند.

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-29]

بیان دی.ان.ای واکسن واجد "هر۲" و "جی.پی۹۶" در شرایط آزمایشگاهی

به‌منظور ارزیابی بیان ساختار تولید شده، از لاین سلولی "هك ۲۹۳ تی" استفاده شد. ۴۸ ساعت پس از انتقال ساختارهای پی.سی تی/هر۲/جی.اف.پی ، "پی سی دی ان ای ۳" (کنترل منفی) و "پی.ایی .جی.اف.پی-ان"[۱] (کنترل مثبت) به داخل سلول، تولید رنگ سبز فلورسنت بررسی شد. تولید سبز فلورسنت که نمایانگر بیان ژن در سلول‌های حاوی ساختار "پی.سی تی/هر۲/جی.اف.پی" است در مقطع مشاهده شد (شکل ۶). سلول‌های حاوی وکتور بدون ژن که به عنوان کنترل منفی استفاده شد رنگ سبز تولید نکردند (عکس گرفته نشد).

به علاوه سلول‌هایی که حاوی "پی.ایی .جی.اف.پی-ان" بودند نیز رنگ سبز تولید کردند. در شکل ۶ تصویر سلول‌ها بدون استفاده از فیلتر فلورسنت نیز نشان داده شده است.



شکل ۶. نمای میکروسکوپی (بزرگ‌نمایی ۴۰) سلول‌های ترانسفکت شده[۲] با ساختارهای مشروح در زیر:
(a) و (b) تصویر سلول‌های ترانسفکت شده با ساختار پی.سی تی/هر۲/جی.اف.پی با میکروسکوپ فلورسنت با فیلتر فلورسنت (a) و بدون فیلتر فلورسنت (b). تولید رنگ سبز در نتیجه بیان ساختار است.
(c) و (d) تصویر سلول‌های ترانسفکت شده با ساختار "پی.ایی .جی.اف.پی-ان" با میکروسکوپ فلورسنت با فیلتر فلورسنت (c) و بدون فیلتر فلورسنت (d).

سلول‌هایی که با پلاسمید"پی. سی. دی. ان. ای ۳"، به‌عنوان کنترل منفی، ترانسفکت شده بودند تولید رنگ نکردند (تصویر نشان داده نشده است).

بحث

هدف از انجام این پژوهش تولید ساختار ژنتیکی واجد هر دو ژن "هر۲" و "جی.پی۹۶" به شکل فیوژن و

۱. pEGFP-N ۲. Transfect

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-29]

بررسی بیان این ساختار تولید شده با استفاده از ژن کد کننده پروتیئن سبز فلورسنت بود. به‌همین منظور ساختاری بر پایه پی.سی.دی.ان.ای۳ که در آن به ترتیب ''جی.پی۹۶'' و''هر۲'' به شکل پشت سر هم قرار گرفته‌اند ساخته شد. در این برای از لینکرها استفاده شد که توالی‌های کوچکی هستند و به آسانی قابل کلون کردن هستند. این امر نیاز ما را از ''پی سی آر'' برای ایجاد محل‌های اثر آنزیم‌های محدودالاثر بی نیاز می‌کند که اوّلاً صرفه‌جویی در وقت است و ثانیاً باعث حفظ توالی ژن مورد استفاده است.

قبل از معرفی یک دی.ان.ای واکسن کاندید، باید قدرت بیان آن ساختار تأیید شود. بنا بر این از ژن کد کننده پروتیئن سبز فلورسنت استفاده شد. در دید اول ممکن است استدلال شود که هر پلاسمید حاوی ژن کد کننده پروتیئن سبز فلورسنت تولید پروتیئن سبز فلورسنت می‌کند. اما با بررسی ساختار تولید شده می‌توان نتیجه گرفت که تولید رنگ سبز فلورسنت معرف بیان ژن‌های ''هر۲'' و ''جی.پی۹۶'' به شکل فیوژن است. ژن‌های ''هر۲'' و ''جی.پی۹۶'' مورد استفاده در این پژوهش به ترتیب حدود ۲۱۰۰ و ۱۲۵۰ جفت باز طول دارند. در انتهای این دو، ژن ''جی اف پی'' با طول حدود ۸۰۰ جفت باز قرار گرفته است. در نتیجه یک مسیر طولانی از کدون شروع در ژن ''جی.پی۹۶'' تا کدون خاتمه در ژن کد کننده پروتیئن سبز فلورسنت (حدود ۴۱۵۰ جفت باز) وجود دارد. به‌همین دلیل چیدمان و طراحی بازها در لینکرها و ژن‌ها با دقت طراحی و استفاده شدند . بنا بر این، در صورتی که ژن‌ها اصطلاحاً ''این فریم''[۱] نبودند، ژن کد کننده سبز فلورسنت نیز بیان نمی‌شد. پس می‌توان نتیجه گرفت که به دلیل قرار گرفتن ژن سبز فلورسنت در انتهای هر دو ژن ''هر۲'' و ''جی.پی۹۶''، تولید رنگ سبز حاصل ازپروتیئن سبز فلورسنت نشان‌گر بیان هر دو ژن ''هر۲'' و ''جی.پی۹۶'' به شکل فیوژن است. در صورتی که ژن کد کننده پروتیئن سبز فلورسنت در ابتدای هر دو دو ژن ''هر۲'' و ''جی.پی۹۶'' قرار می‌گرفت احتمال وجود شائبه در بیان ژن‌های ''هر۲'' و ''جی.پی۹۶'' قابل بررسی بود.

بیان ژن با استفاده از روش‌های متفاوتی از جمله وسترن بلات و ''آر تی پی سی آر'' تأیید می‌شود. روش مورد استفاده در این پژوهش با استفاده از ژن کد کننده پروتیئن سبز فلورسنت ساده و ارزان است و می‌تواند راه دیگر بررسی بیان ژن، علاوه بر روش‌های وسترن بلات و ''آر تی- پی سی آر'' باشد چرا که تولید پروتیئن را در زیر میکروسکوپ به تصویر می‌کشد. از مزایای دیگر این روش کاربرد آن در تأیید بیان ژن‌های کوچک، مانند شاخص‌ها یا اپی توپ‌های ویروسی و باکتریایی، است که قابل انجام با روش وسترن بلات نیست.

اگر چه ژن ''هر۲'' مورد استفاده در این پژوهش حاوی توالی کد کننده قسمت بین‌غشایی است، ولی این ساختار قابل تولید و ترشح است زیرا در یک پژوهش نشان داده شده است که قسمت بین غشایی باعث اتصال آن به غشا و مانع ترشح ملکول ''هر۲'' نیست، بلکه حذف قسمت داخل سلولی و گلیکوزیلاسیون صحیح ملکول باعث ترشح ملکول ''هر۲'' است. گلیکوزیلاسیون صحیح به واسطه توالی‌های بین قسمت خارج سلولی و بین غشایی انجام می‌گیرد. به علاوه این پروتیئن از سطح سلول به خارج از سلول افشانده[۱] می‌شود [۱۲].

۱. In-frame

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-29]

در بسیاری از پژوهش‌ها، ادجوانت‌های متفاوتی به همراه ”هر۲“ استفاده شده است تا پاسخ ایمنی مناسب و قوی را علیه تومورهای بیان کننده این آنتی‌ژن ایجاد شود. شواهد موجود حاکی از این است که ملکول‌های شوک حرارتی می‌توانند به‌عنوان ادجونت قوی در ایمنی درمانی تومور استفاده شود و آن‌ها را تحت عنوان "چاپروکاین"[۲] (چاپرون+ سیتوکین)[۳] نیز نامیده‌اند [۷]. جالب توجه‌ترین جنبه عمل‌کرد ”جی.پی۹۶“، نقش آن در ارتباط با سیستم ایمنی ذاتی و اختصاصی است [۹]. از آن‌جا که چاپرون طبیعی ”هر۲“ ملکول ”جی.پی۹۶“ [۱۳] و این ملکول یک ادجونت قوی است، پیش‌بینی می‌شود که این ساختار تولید پاسخ ایمنی قوی علیه تومور نماید. به‌علاوه طراحی این واکسن به فرم "دی.ان.ای واکسن"، که مولد پاسخ ایمنی قوی به خصوص پاسخ سیتوتوکسیك است، میتواند تقویت کننده این سیستم فیوژن در پاسخ‌های ایمنی باشد.

تشکر و قدردانی

از پروفسورکاوالو و دکتر سید به خاطر اهدا سخاوتمندانه ژن‌های ”هر۲“ و ”جی.پی۹۶“ قدردانی می‌شود.

منابع

1. T. Ishikawa, Kobayashi M, Mai M, Suzuki T, Ooi A. Amplification of the c-erbB-2 (Her-2/neu) gene in gastric cancer cells. Amer. J. Pathol. 151 (1997) 761-8
2. Disis ML, Calenoff E, McLaughlin G, Murphy AE, Chen W, Groner B, Jeschke M, Lydon N, McGlynn E, Livingston RB, et al. Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. Cancer Res. 54 (1994) 16–20.
3. Rovero S, Amici A, Carlo ED, Bei R, Nanni P, Quaglino E, et al. DNA vaccination against rat Her-2/neu p185 more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice. J. Immunol. 165(9) (2000) 5133–42.
4. Rovero S, Amici A, Carlo ED, Bei R, Nanni P, Quaglino E, et al. DNA vaccination against rat Her-2/neu p185 more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice. J. Immunol. 165(9) (2000) 5133–42.

۱. Shed ۲. Chaperokine ۳. Cytokine

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-29]

5. Chang SY, Lee KC, Ko SY, Ko HJ, Kang CY. Enhanced efficacy of DNA vaccination against Her-2/neu tumor antigen by genetic adjuvants. Int. J. Cancer. 111(1) (2004) 86-95.
6. Kim JH, Majumder N, Lin H, Chen J, Falo LD Jr, You Z. Enhanced immunity by NeuEDhsp70 DNA vaccine Is needed to combat an aggressive spontaneous metastatic breast cancer. Mol. Ther. 11(6) 2005 941-9.
7. Spadaro M, Ambrosino E, Iezzi M, Di Carlo E, Sacchetti P, Curcio C, Amici A, Wei WZ, Musiani P, Lollini PL, Cavallo F, Forni G. Cure of mammary carcinomas in Her-2 transgenic mice through sequential stimulation of innate (neoadjuvant interleukin-12) and adaptive (DNA vaccine electroporation) immunity. Clin Cancer Res.11(5) (2005) 1941-52.
8. Binder RJ. Heat-shock protein-based vaccines for cancer and infectious disease. Expert. Rev. Vaccines 7(3) (2008) 383-93.
9. Nicchitta CV. Re-evaluating the role of heat-shock protein peptide interactions in tumour immunity. Nat. Rev. Immunol. 3 (2003) 427–432.
10. Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. Annu. Rev. Immunol. 20 (2002) 395–425.
11. Baker-LePain JC, Sarzotti M, Nicchitta CV. Glucose-regulated protein 94/glycoprotein 96 elicits bystander activation of CD4+ T cell Th1 cytokine production in vivo. J. Immunol. 172 (2004) 4195–4203.
12. Sambrook, J., Russell, D.W., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, the third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
13. http://www.patentstorm.us/patents/6333169/fulltext.html
14. Chavany C, Mimnaugh E, Miller P, Bitton R, Nguyen P, Trepel J, Whitesell L, Schnur R, Moyer J, Neckers L. p185erbB2 binds to GRP94 in vivo. Dissociation of the p185erbB2/GRP94 heterocomplex by benzoquinone ansamycins precedes depletion of p185erbB2. J. Biol. Chem. 271(9) (1996) 4974-7.

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-04-29]