

طراحی و ساخت پلاسمید حاوی ژن‌های "هر ۲" و "جی پی ۹۶" به شکل فیوژن و بیان آن با استفاده از ژن کد کننده پروتئین سبز فلورسنت

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

چکیده

واکسن‌های "دی.ان.ای" که با استفاده از ژن "هر ۲" 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 گلیکوپروتئین ۹۶ (عضو خانواده خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی ۹۰) به دلیل خاصیت ادجونت آن استفاده شد و این پژوهش با دو هدف انجام شد: اولاً تولید ساختار ژنتیکی (پلاسمید) واجد هر دو ژن "هر ۲" و "جی.پی.۹۶" به شکل فیوژن و ثانیاً بررسی بیان ساختار تولید شده با استفاده از ژن کد کننده پروتئین سبز فلورسنت^۵. به این منظور، انتهای ۵' C ژن "جی.پی.۹۶" به قسمت خارج سلولی و بین غشایی ژن "هر ۲" در پلاسمید "پی.سی.دی.ان.ای.۳"^۶ متصل و تحت عنوان پی.سی.تی/هر ۲ نامگذاری شد. ژن "جی.اف.پی" در پایی ن دست این دو قسمت کلون شد که تحت عنوان "پی.سی.تی/هر ۲/جی.اف.پی" نامگذاری شد تا بیان این ساختار در شرایط "این.ویترو"^۹ بررسی شود. هضم آنزیمی بر روی محصول اتصال دو ژن "هر ۲" و "جی.پی.۹۶" نشان‌گر کلون شدن دو ژن به شکل متصل به هم بود. سپس، پلاسمید پی.سی.تی/هر ۲/جی.اف.پی با استفاده از پلی فکت به داخل سلول‌های "هک.۲۹۳ تی"^{۱۰} منتقل شدند. بررسی میکروسکوپی سلول‌های "هک.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 "هر ۲" و "جی.پی.۹۶" بود. ضمناً امکان بررسی تولید قسمتی از پروتئین "هر ۲" به صورت فیوز شده به "جی.پی.۹۶" 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 ارزان است، نشان داده شد. واکسن "دی.ان.ای" ایی آماده شده در این پژوهش قابل استفاده در ایمنی درمانی مدل‌های توموری "هر ۲" مثبت است.

واژه‌های کلیدی: فیوژن، "هر ۲"، "جی.پی.۹۶"، "جی.اف.پی"

پذیرش ۸۸/۱۰/۲

دریافت ۸۸/۲/۶

hasan_zm@modares.ac.ir

*نویسنده مسئول

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

مقدمه

واکسن های "دی.ان.ای" به دلیل تولید پاسخ های ایمنی سلولی و ملکولی قوی در مدل های حیوانی مورد توجه قرار گرفته اند. این نوع واکسن ها کاندیدای برای درمان بیماری های آلرژیک و سرطان هستند. بررسی بیان ژن کدشونده با واکسن "دی.ان.ای" با استفاده از روش های مبتنی بر بلاتینگ^۱ "پی.سی.آر" و یا ایمنو/هیستوشیمی^۲ انجام می شود.

از جمله بیماری هایی که "دی.ان.ای" واکسن برای آن طراحی شده است تومورهای با مارکر "هر ۲" است. پروتئونکوژن "هر ۲" پروتئینی با وزن ملکولی ۱۸۵ کیلو دالتون را تولید می کند. این پروتئین فعالیت تیروزین کینازی دارد و عضو خانواده گیرنده فاکتور رشد است. افزایش تولید این پروتئین در سرطان تخمدان، پستان، و گوارش دیده می شود که با پیش آگهی بد همراه است [۱]. وجود پادتن ها و پاسخ سلول های "تی"^۳ علیه این ملکول در بیماران مبتلا به تومور "هر ۲" 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 ملکول ها وجود دارد. معهذا، پاسخ های ایمنی موجود در این بیماران برای ممانعت از رشد تومور کافی نیست. وجود این پاسخ های ایمنی، درگیری این ملکول در پیشرفت تومور و پیش آگهی بد آن باعث شده که این ملکول نامزد ایمنی درمانی شود. بنا بر این به منظور 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 پیش گیری کننده "دی.ان.ای" واکسن های حاوی "هر ۲" در برخی از بررسی ها نشان داده شده است [۶]-[۳].

همچنین پژوهش ها نشان داده اند که ملکول های شوک حرارتی به عنوان ادجونت های قوی عمل می کنند [۷]. آن ها خانواده ای از ملکول ها هستند که توالی شان در طول تکامل حفاظت شده است، و در داخل سلول به مقادیر زیاد یافت می شوند. این ملکول ها چاپرون های^۴ هستند که در فعال سازی سلول های عرضه کننده آنتی ژن نقش دارند. پژوهش ها نشان داده اند که ملکول "جی.پی ۹۶" نقش مهمی در پاسخ های ایمنی ذاتی و اکتسابی [۸] و [۹] دارد و خاصیت ادجوانتی قوی در پاسخ های ایمنی ضد تومور داشته است [۱۰]. پژوهش های دیگر نشان داده اند که اتصال ملکول شوک حرارتی به آنتی ژن مورد نظر باعث افزایش ایمنی زایی واکسن شده است.

با استفاده از نتایج این پژوهش ها ما "دی.ان.ای" واکسنی را طراحی کرده و ساخته ایم که حاوی قسمتی از ژن های هر دو ملکول "جی.پی ۹۶" و "هر ۲" پشت سر هم و به هم پیوسته است. به علاوه امکان بررسی بیان این ساختار با استفاده از کلون کردن ژن کدکننده پروتئین سبز فلورسنت در انتهای ژن های متصل بهم "جی.پی ۹۶" و "هر ۲" نشان داده شده است. این روش از روش های مبتنی بر بلاتینگ، "پی.سی.آر" و یا ایمنو/هیستوشیمی ساده تر است.

۱. Blotting

۲. Immunohistochemistry

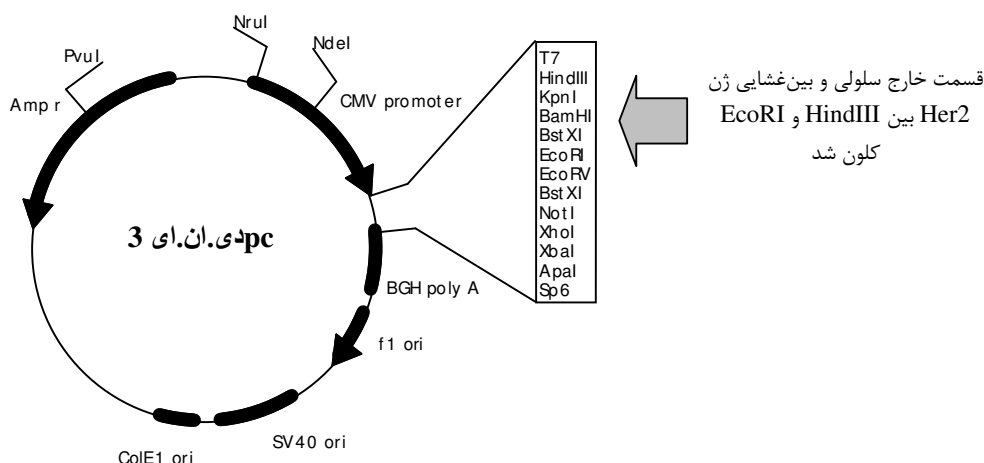
۳. T cells

۴. Chaperons

مواد و روش ها

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

نوکلئوتیدهای ۹۰ تا ۲۱۸۰ از ژن "هر ۲" (اهدایی از طرف پروفیسور کوالو، دانشگاه تورین ایتالیا، که قسمت خارج سلولی و بین غشایی آن را کد می کند بین سایت های آنزیمی "هیند ۳/ای. کو. آر ۱" پلاسمید "پی. سی. دی. ان ای ۳" [۳] کلون شد. به این منظور پلاسمید "پی. سی. دی. ان ای ۳" با آنزیم های "هیند ۳" و "ای. کو. آر ۱" هضم شد. از طرف دیگر پلاسمید حاوی قسمت خارج سلولی و بین غشایی "هر ۲" با آنزیم های "هیند ۳" و "ای. کو. آر ۱" 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 ای ۳" کلون شد (شکل ۱).



شکل ۱. نمایی از پلاسمید "پی. سی. دی. ان ای ۳" و محلی که ژن "هر ۲" در آن کلون شده است (این ویتروژن، بریتانیا) با استفاده از محل برش آنزیم "نر ۱"^۳ که در ابتدای ژن "هر ۲" قرار دارد (شکل ۲)، سایت آنزیمی لازم برای کلون کردن ژن "جی.پی ۹۶" در قسمت فرادست ژن "هر ۲" ایجاد شد. به این منظور لینکر ۱ (جدول ۱) در قسمت فرادست "هر ۲" بین محل "هیند ۳/نر ۱"^۴ کلون شد. آرایش آنزیم های محدودالایتر پس از این که لینکر ۱ در فرادست ژن "هر ۲" قرار گرفت در شکل ۲ نشان داده شده است.

لینکر ۱ علاوه بر این که فضای لازم برای کلون کردن "جی.پی ۹۶" در قسمت بالای "هر ۲" را فراهم می آورد، همچنین حاوی توالی کدکننده سه گلیسین^۵ است که بین "هر ۲" و "جی.پی ۹۶" قرار می گیرد.

۱. Hind III/Eco RI

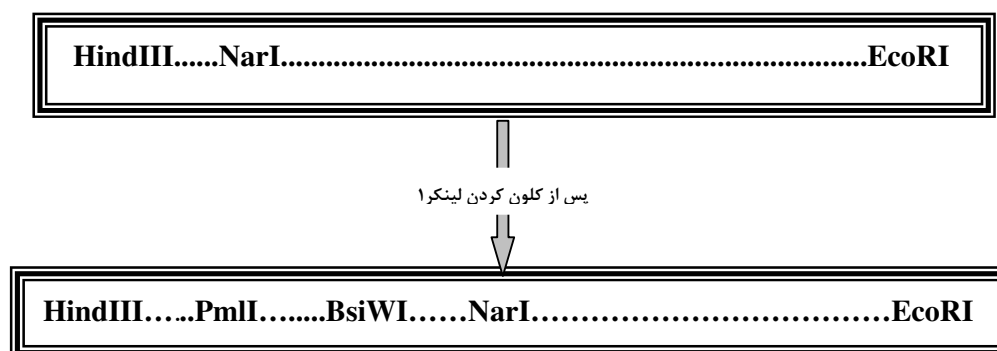
۲. Ligation

۳. Nar I

۴. Hind III/Nar I

۵. Glycine

۶. Eco RI



شکل ۲. نمای شماتیکی از محل برش آنزیم های محدودالای در توالی ژن "هر ۲". این ژن با سایت "هیند ۳" شروع و با "ای.کو.آر ۱" خاتمه می یابد. از سایت "نر ۱" در ابتدای ژن "هر ۲" استفاده شده و لینکر ۱ در ابتدای آن کلون شده است. بازهای حذفی محل اثر آنزیم های محدودالای با نقطه چین نمایش داده شده است.

جدول ۱. توالی لینکرها

لینکر ۱ برای کلون کردن ژن "جی.پی ۹۶" حد فاصل محل "پی.ام.ال ۱" و "پی.ای.آی.دیلوی ۱" در فرادست ژن "هر ۲" استفاده شد. لینکر ۲ حاوی قسمت انتهایی ژن "جی.پی ۹۶" بدون کدون خاتمه است. این لینکر در پلاسمید "پی.تندم-۱" حاوی قطعه "پی.ام.ال ۱/نوت ۱" یا انتهای سی از ژن "جی.پی ۹۶" کلون شد تا کدون خاتمه آن حذف شود. لینکر ۳ برای حذف کدون خاتمه ژن "هر ۲" استفاده شد.

توالی کد کننده گلیسین های حد فاصل دو ژن

Linker1 (5'- 3'): AAGCTTgcgcgCACGTGgcgCGTACGGGCGGCGGGCGCC
HindIII PmlI BsiWI NarI

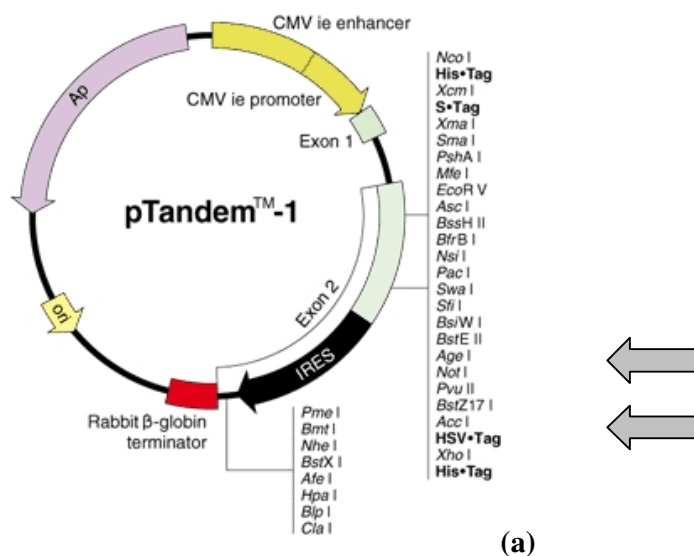
Linker2 (5'- 3'): CAGCTG AAAAAGATGAATTG CGTACG
PvuII BsiWI

EcoRI
Linker3 (5'- 3'): CGTACGAATTCCCGGG
BsiWI XmaI

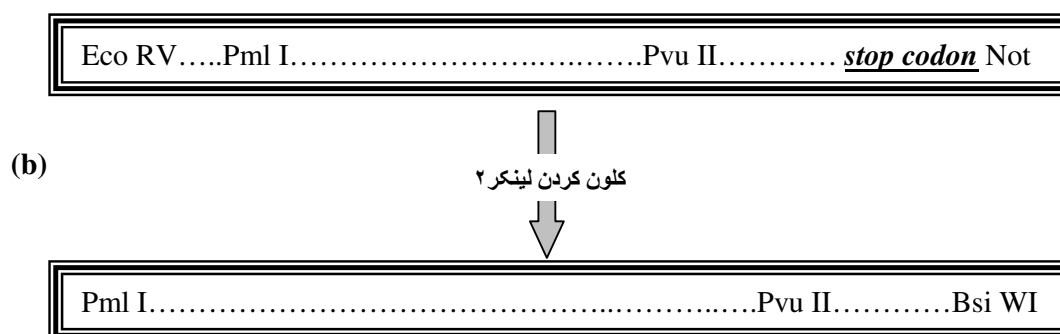
ساخت پلاسمید حاوی قسمت خارج سلولی و بین غشایی "هر ۲" متصل به انتهای سی ژن "پی.سی.تی/هر ۲" انتهای C ژن "جی.پی ۹۶" انسان (اهدایی دکتر سید، بیمارستان ماساچوست، امریکا، و نوکلئوتیدهای ۱۳۰۰ تا ۲۵۳۰) که ۴۱۰ اسیدآمینو انتهایی "جی.پی ۹۶" انسان را کد می کند (شکل ۳) با استفاده از آنزیم های "ای.کو.آر ۵/نوت ۱" در بین سایت های "پی.وی.یو ۲/نوت ۱" موجود در پلاسمید "پی.تندم-۱" (نواژن) کلون شد (شکل ۳). در واقع از پلاسمید "پی.تندم-۱" فقط به عنوان یک حامل بیانی استفاده شد تا بتوانیم لینکر ۲ را در

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

انتهایی "جی.پی ۹۶" کلون و کدون خاتمه را در ژن "جی.پی ۹۶" حذف کنیم. امکان حذف کدون خاتمه در پلاسمید "پی.یو. ۲" (پی.سی.دی.ان.ای ۳ حاوی ژن "هر ۲") وجود نداشت چون این پلاسمید حاوی محل اثر آنزیم "پی.وی.یو. ۲" است. به علاوه محل اثر آنزیم "بی.اس.آی.دبلیو ۱" در فرودست وجود دارد که کمک به حذف کدون خاتمه و جداسازی ژن "جی.پی ۹۶" با کمک برش آنزیمی "پی.ام.ال ۱/بی.ای.آی.دبلیو ۱" می‌کند. قطعه "پی.ام.ال ۱/بی.ای.آی.دبلیو ۱" این ساختار جدا و در حد واسط سایت‌های مشابه در فرادست ژن "هر ۲" در پلاسمید پی. "هر ۲" کلون شد و تحت عنوان پی.سی.تی/هر ۲ نام‌گذاری شد.



(a)

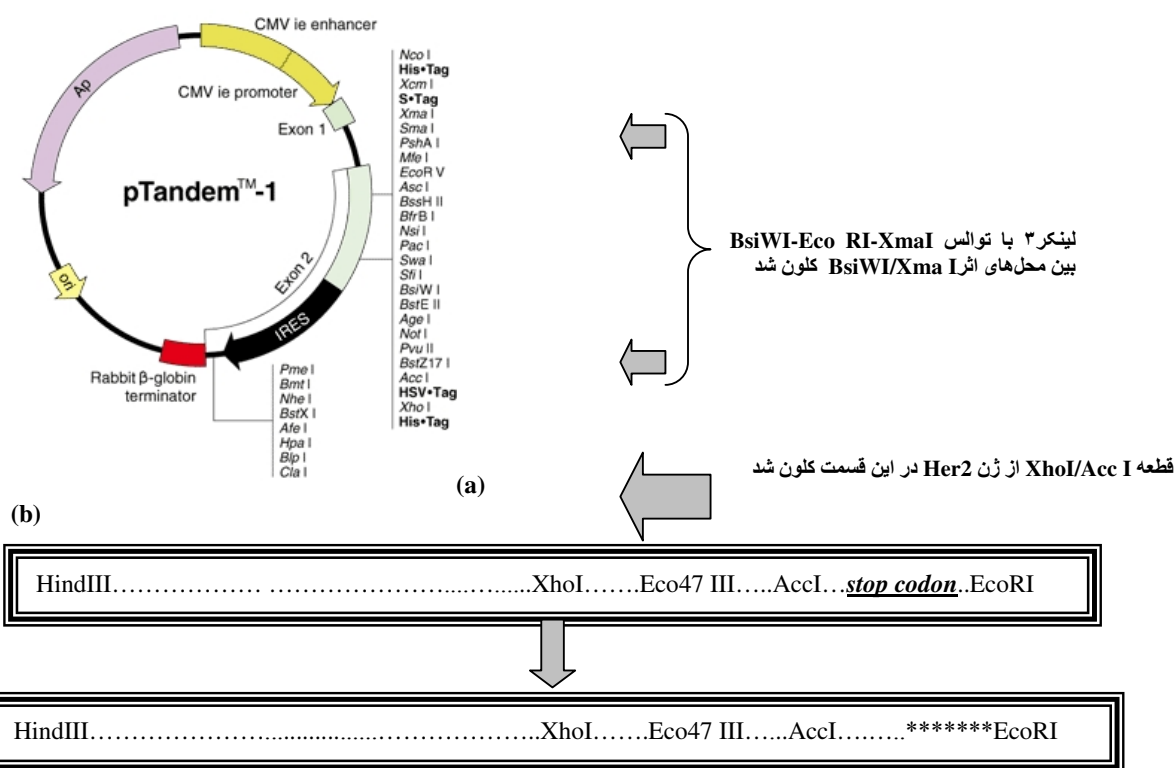


شکل ۳. نمایی از پلاسمید "پی.تندم ۱" (نواژن، بریتانیا) نشان داده شده است (a) که انتهای سی از ژن "جی.پی ۹۶" بین "بی. کو. آر. ۵/نت ۱" کلون شد. قابل توجه است که اتصال "بی. کو. آر. ۵" موجود در "جی.پی ۹۶" به "پی.وی.یو. ۲" موجود در "پی.تندم ۱" باعث از بین رفتن "پی.وی.یو. ۲" در "پی.تندم ۱" می‌شود و در این صورت می‌توان از "پی.وی.یو. ۲" نزدیک به کدون خاتمه در "جی.پی ۹۶" استفاده نمود و با کلون کردن لینکر ۲ کدون خاتمه حذف شد. این فرایند در قسمت (b) نشان داده شده است.

۱. PmlI/BsiWI

ساخت پلاسمید واجد ژن سبز فلورسنت (پی.سی.تی/هر ۲/جی اف پی)

به منظور کلون کردن ژن کد کننده پروتئین سبز فلورسنت در انتهای "جی.پی ۹۶" متصل شده به "هر ۲"، ژن "جی.اف.پی" از پلاسمید "پی.ای.جی.اف.پی-ان"^۱ (کلون تک) با آنزیم های "اس.ام.ای ۱/نت ۱" جدا و در بین سایت های "ای.کو.آر.۵/نت ۱"^۲ از پلاسمید پی.سی.تی/هر ۲ کلون و "پی.سی.تی/هر ۲/جی.اف.پی ۱"^۳ نامگذاری شد. به منظور حذف کدون خاتمه ژن "هر ۲" در این پلاسمید ابتدا لینکر ۳ (جدول ۱) بین سایت های "بی.اس.آی.دبلیو ۱/ایکس.ام.ای ۱"^۴ در پلاسمید "پی.تندم-۱" کلون شد. از طرف دیگر قطعه "ایکس.اچ.او ۱/ای.سی.سی.سی ۱"^۵ از "هر ۲" (شکل ۴) بین سایت های مشابه از پلاسمید "پی.تندم-۱" حاوی لینکر ۳ کلون شد و متعاقباً، قطعه "ای.کو.آر.۳-۴۷/ای.کو.آر.۱"^۶ از آن جدا و در حد فاصل سایت های مشابه از "پی.سی.تی/هر ۲/جی.اف.پی ۱" کلون و تحت عنوان "پی.سی.تی/هر ۲/جی.اف.پی" نامگذاری شد. همه آنزیم از شرکت فرمنتاز تهیه شدند.



شکل ۴. نمایی از پلاسمید "پی.تندم-۱" نشان داده شده است (a) که لینکر ۳ و قطعه "ایکس.اچ.او ۱/ای.سی.سی.سی ۱" از انتهای ژن "هر ۲" در آن کلون شد. با جدا سازی قطعه "ای.کو.آر.۳-۴۷/ای.کو.آر.۱" از پلاسمید طراحی شده در قسمت (a) این شکل و کلون کردن آن در پلاسمید "پی.سی.تی/هر ۲/جی.اف.پی ۱" کدون خاتمه ای که درست پیش از سایت "ای.کو.آر.۱" در انتهای ژن "هر ۲" قرار دارد حذف می شود. زیرا قسمتی که حاوی کدون خاتمه بود با توالی که بین "بی.اس.آی.دبلیو ۱" و "بی.اس.آی.دبلیو ۱" موجود در پلاسمید طراحی شده در قسمت (a) این شکل جایگزین شد (در شکل b این قسمت با ستاره نشان داده شده است). علت اتخاذ این استراتژی کاهش هزینه سنتز لینکر بود، زیرا فقط لینکر ۳ که طول کمی دارد سنتز شد که ضمناً در پروژه های دیگر نیز قابل استفاده است

۱. pEGFP-N
۵. BsiWI/Xma I

۲. SmaI/NotI
۶. XhoI/AccI

۳. EcoRV/NotI
۷. Eco47III/EcoRI

۴. pCT/Her2/GFP1

تخلیص و بیان پلاسمید پی.سی.تی/هر ۲/جی.اف.پی در شرایط "این ویترو"

باکتری اشیریشیا 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/هر ۲/جی.اف.پی" و "پی.سی.تی/هر ۲" با استفاده از روش لیز قلیایی [۱۱] انجام گرفت.

برای بررسی بیان ساختار "پی.سی.تی/هر ۲/جی.اف.پی" لاین سلولی "هک ۲۹۳ 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 میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۲۵ میلی‌مولار "هیپس"^۳ کشت شدند. انتقال پلاسمید "پی.سی.تی/هر ۲/جی.اف.پی" به داخل این سلول‌ها با استفاده از پلی فکت (کیژن) انجام گرفت. به این منظور تعداد 7×10^4 سلول از لاین سلولی "هک ۲۹۳ 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 کیژن 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 "هر ۲" و "جی.پی. ۹۶" به فرم فیوژن

دی.ان.ای واکسن واجد ژن‌های "هر ۲" و "جی.پی. ۹۶" با استفاده از لینکر مذکور در جدول ۱ ساخته شد. این ساختار با استفاده از برش با آنزیم‌های محدودالاکتر و تعیین توالی تأیید شدند. بین دو توالی "هر ۲" و "جی.پی. ۹۶" 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.ال ۱" ژن "جی.پی. ۹۶" را به دو قسمت مساوی (۴۱۰+۴۱۰) کد کننده ۴۱۰ اسید آمینه تقسیم میکند. این امر باعث تسهیل کلون کردن انتهای سی ژن "جی.پی. ۹۶" 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 بانک ژن مورد استفاده قرار گیرد.

نهایتاً کلون کردن‌های متوالی باعث تولید دو ساختار شد: اولی ساختاری بر پلاسمید "پی.سی.تی/ان ای ۳" که در آن به ترتیب "جی.پی. ۹۶" و "هر ۲" به شکل پشت سر هم قرار گرفته‌اند. دومی ساختاری بر پلاسمید "پی.سی.تی/ان ای ۳" که در آن به ترتیب "جی.پی. ۹۶"، "هر ۲" 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 پروتئین است. در ساختار دوم که حاوی "جی اف پی" است در واقع پروتئین تولید شده با پروتئین سبز فلورسنت برچسب‌دار شده و

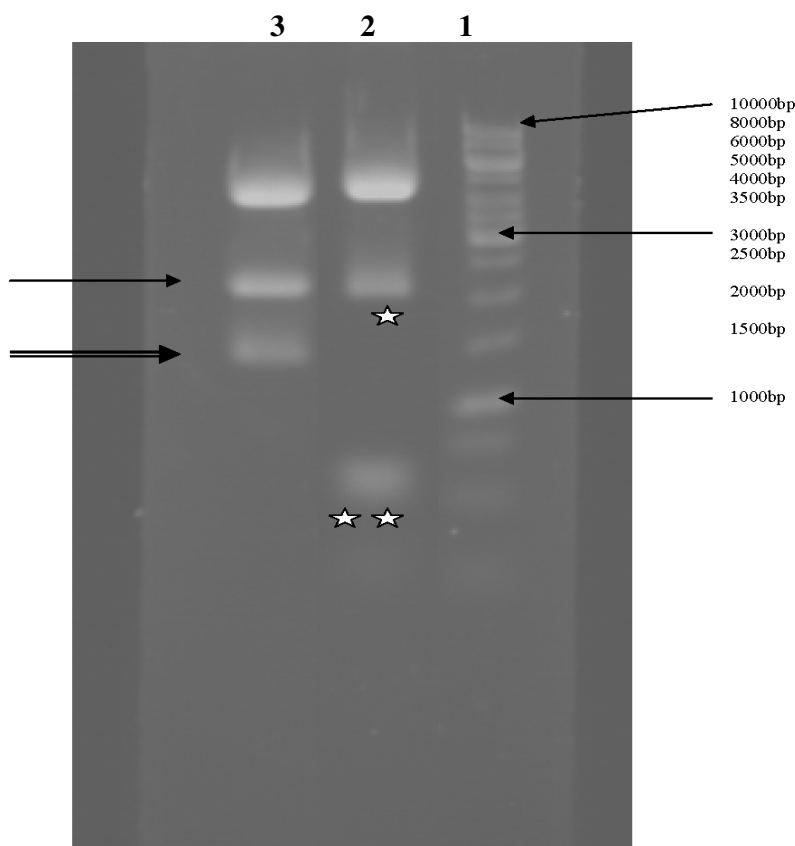
۱. DH5α

۲. DMEM

۳. HEPES

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/هر ۲ با آنزیم‌های "پی.ام.ال ۱" (موجود در توالی "جی.پی ۹۶" و "ایکس.اچ.او ۱" (موجود در توالی "هر ۲" 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/هر ۲/جی.اف.پی با آنزیم‌های "هیند ۳" (موجود در توالی "جی.پی ۹۶" و "ایکس.اچ.او ۱" (موجود در توالی "هر ۲" 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/هر ۲ و پی.سی تی/هر ۲/جی.اف.پی.

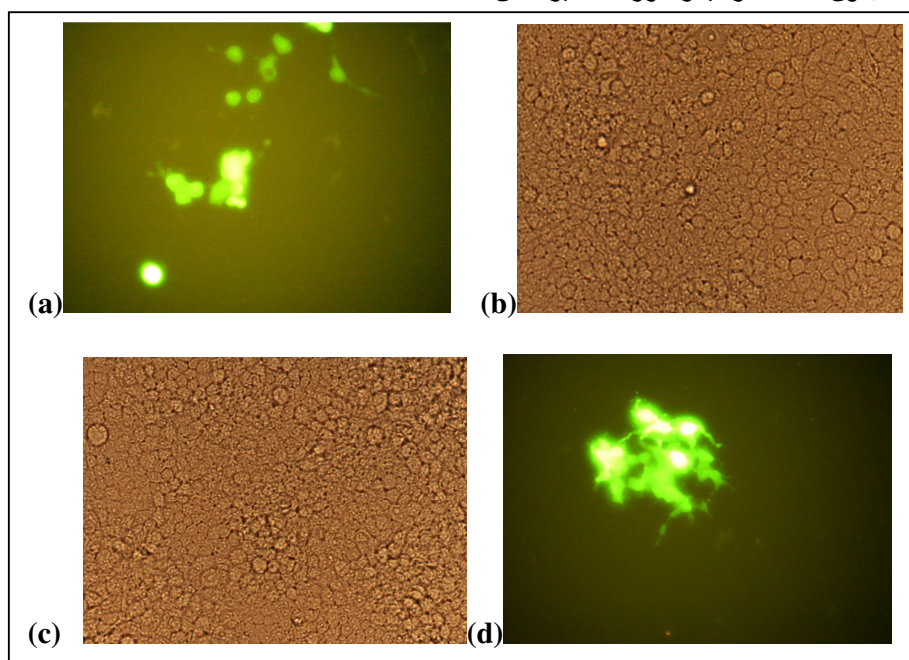
لاین ۱ مارکر (فرمنتاز) که اندازه هریک از باندها از بالا به پایین نشان داده شده است.

لاین ۲ هضم ساختار پی.سی تی/هر ۲ با آنزیم‌های "پی.ام.ال ۱" و "ایکس.اچ.او ۱". باندهای ۲۲۰۰ و ۵۰۰ جفت باز به ترتیب با یک ستاره و دو ستاره مشخص شده است.

لاین ۳ هضم ساختار پی.سی تی/هر ۲/جی.اف.پی با آنزیم‌های "هیند ۳" و "ایکس.اچ.او ۱". باندهای ۲۲۰۰ و ۱۴۰۰ جفت باز به ترتیب با فلش یک خطی و دو خطی نشان داده شده‌اند.

بیان دی.ان.ای واکسن واجد "هر ۲" و "جی.پی ۹۶" در شرایط آزمایشگاهی

بهمنظور ارزیابی بیان ساختار تولید شده، از لاین سلولی "هک ۲۹۳ تی" استفاده شد. ۴۸ ساعت پس از انتقال ساختارهای پی.سی تی/هر ۲/جی.اف.پی، "پی سی دی ان ای ۳" (کنترل منفی) و "پی.ای.جی.اف.پی-ان"^۱ (کنترل مثبت) به داخل سلول، تولید رنگ سبز فلورسنت بررسی شد. تولید سبز فلورسنت که نمایانگر بیان ژن در سلول های حاوی ساختار "پی.سی تی/هر ۲/جی.اف.پی" است در مقطع مشاهده شد (شکل ۶). سلول های حاوی وکتور بدون ژن که به عنوان کنترل منفی استفاده شد رنگ سبز تولید نکردند (عکس گرفته نشد). به علاوه سلول هایی که حاوی "پی.ای.جی.اف.پی-ان" بودند نیز رنگ سبز تولید کردند. در شکل ۶ تصویر سلول ها بدون استفاده از فیلتر فلورسنت نیز نشان داده شده است.



شکل ۶. نمای میکروسکوپی (بزرگنمایی ۴۰) سلول های ترانسفکت شده^۲ با ساختارهای مشروح در زیر:
(a) و (b) تصویر سلول های ترانسفکت شده با ساختار پی.سی تی/هر ۲/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 سلول های ترانسفکت شده با ساختار "پی.ای.جی.اف.پی-ان" با میکروسکوپ فلورسنت با فیلتر فلورسنت (c) و بدون فیلتر فلورسنت (d).
سلول هایی که با پلاسمید "پی.سی. دی. ان ای ۳"، به عنوان 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 "هر ۲" و "جی.پی ۹۶" به شکل فیوژن و

^۱. pEGFP-N

^۲. Transfect

بررسی بیان این ساختار تولید شده با استفاده از ژن کد کننده پروتئین سبز فلورسنت بود. به همین منظور ساختاری بر پایه پی.سی.دی.ان.ای ۳ که در آن به ترتیب "جی.پی ۹۶" و "هر ۲" به شکل پشت سر هم قرار گرفته اند ساخته شد. در این برای از لینکرها استفاده شد که توالی های کوچکی هستند و به آسانی قابل کلون کردن هستند. این امر نیاز ما را از "پی سی آر" برای ایجاد محل های اثر آنزیم های محدودالایر بی نیاز می کند که اولاً صرفه جویی 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 پروتئین سبز فلورسنت استفاده شد. در دید اول ممکن است استدلال شود که هر پلاسمید حاوی ژن کد کننده پروتئین سبز فلورسنت تولید پروتئین سبز فلورسنت می کند. اما با بررسی ساختار تولید شده می توان نتیجه گرفت که تولید رنگ سبز فلورسنت معرف بیان ژن های "هر ۲" و "جی.پی ۹۶" به شکل فیوژن است. ژن های "هر ۲" و "جی.پی ۹۶" 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.پی ۹۶" تا کدون خاتمه در ژن کد کننده پروتئین سبز فلورسنت (حدود ۴۱۵۰ جفت باز) وجود دارد. به همین دلیل چیدمان و طراحی بازها در لینکرها و ژن ها با دقت طراحی و استفاده شدند. بنا بر این، در صورتی که ژن ها اصطلاحاً "این فریم"^۱ نبوندند، ژن کد کننده سبز فلورسنت نیز بیان نمی شد. پس می توان نتیجه گرفت که به دلیل قرار گرفتن ژن سبز فلورسنت در انتهای هر دو ژن "هر ۲" و "جی.پی ۹۶"، تولید رنگ سبز حاصل از پروتئین سبز فلورسنت نشانگر بیان هر دو ژن "هر ۲" و "جی.پی ۹۶" به شکل فیوژن است. در صورتی که ژن کد کننده پروتئین سبز فلورسنت در ابتدای هر دو ژن "هر ۲" و "جی.پی ۹۶" قرار می گرفت احتمال وجود شائبه در بیان ژن های "هر ۲" و "جی.پی ۹۶" قابل بررسی بود.

بیان ژن با استفاده از روش های متفاوتی از جمله وسترن بلات و "آر تی پی سی آر" تأیید می شود. روش مورد استفاده در این پژوهش با استفاده از ژن کد کننده پروتئین سبز فلورسنت ساده و ارزان است و می تواند راه دیگر بررسی بیان ژن، علاوه بر روش های وسترن بلات و "آر تی-پی سی آر" باشد چرا که تولید پروتئین را در زیر میکروسکوپ به تصویر می کشد. از مزایای دیگر این روش کاربرد آن در تأیید بیان ژن های کوچک، مانند شاخص ها یا اپی توپ های ویروسی و باکتریایی، است که قابل انجام با روش وسترن بلات نیست.

اگر چه ژن "هر ۲" مورد استفاده در این پژوهش حاوی توالی کد کننده قسمت بین غشایی 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 "هر ۲" نیست، بلکه حذف قسمت داخل سلولی و گلیکوزیلاسیون صحیح ملکول باعث ترشح ملکول "هر ۲" است. گلیکوزیلاسیون صحیح به واسطه توالی های بین قسمت خارج سلولی و بین غشایی انجام می گیرد. به علاوه این پروتئین از سطح سلول به خارج از سلول افشاند^۱ می شود [۱۲].

^۱. In-frame

در بسیاری از پژوهش‌ها، ادجوانت‌های متفاوتی به همراه "هر ۲" 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 به عنوان 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.پی ۹۶"، نقش آن در ارتباط با سیستم ایمنی ذاتی و اختصاصی است [۹]. از آن‌جا که چاپرون طبیعی "هر ۲" ملکول "جی.پی ۹۶" [۱۳] و این ملکول یک ادجونت قوی است، پیش‌بینی می‌شود که این ساختار تولید پاسخ ایمنی قوی علیه تومور نماید. به علاوه طراحی این واکسن به فرم "دی.ان.ای واکسن"، که مولد پاسخ ایمنی قوی به خصوص پاسخ سیتوتوکسیک است، میتواند تقویت کننده این سیستم فیوژن در پاسخ‌های ایمنی باشد.

تشکر و قدردانی

از پروفیسور کاوالو و دکتر سید به خاطر اهدا سخاوتمندانه ژن‌های "هر ۲" و "جی.پی ۹۶" 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

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.