

ساخت نانوحامل دندریمری پلی آمیدوآمین-پلی اتیلن گلیکول هدف گیرنده TAG72 برای انتقال ژن t-Bid به سلول‌های توموری کولورکتال

فاطمه صفریان^۱، فاطمه رهبری زاده^{۲*}، سعید امانپور^۳، زهرا شریف زاده^۴

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استادیار، مرکز تحقیقات سرطان (انستیتو کانسر)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۴- دانشجوی دکتری تخصصی، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۹۰/۰۴/۰۵

دریافت مقاله: ۸۹/۱۲/۲۵

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق ساخت و بررسی اثر نانوحامل‌های پلی آمیدوآمین-پلی اتیلن گلیکول هدفمند شده با نانوبادی علیه TAG72 برای انتقال سازه کد کننده ژن t-Bid به سلول‌های آدنوکارسینومای کولون انسانی است.

مواد و روش‌ها: ساب‌کلونینگ ژن نانوبادی در ناقل بیانی pSJ برای تولید انبوه پروتئین نانوبادی انجام و سپس نانوبادی با کاربرد ستون نیکل جداسازی شد. فرآیند جداسازی با SDS-PAGE و وسترن بلائینگ تأیید شد. افزودن پلی اتیلن گلیکول به نانوذرات پلی آمیدوآمین با نسبت مولی ۱ به ۲ (پلی آمیدوآمین به پلی اتیلن گلیکول) و هدفمندسازی با نانوبادی علیه TAG72 با نسبت مولی ۱ به ۱ انجام شد. بار سطحی و اندازه نانوذرات به ترتیب با دستگاه زتا سایزر مالورن و نانوسایت بررسی و کارایی حامل ژنی ساخته شده در انتقال ژن کشنده t-Bid به سلول‌های آدنوکارسینومای کولون در محیط آزمایشگاه با آزمون‌های Real Time PCR و تعیین میزان مرگ و میر سلولی بررسی شد.

نتایج: نتایج بررسی با نانوسایت و زتا سایزر مالورن، به ترتیب ساخت نانوذرات هدفمند با اندازه 162 ± 92 نانومتر و پتانسیل سطحی $+4/57$ را نشان می‌دهد. آزمون تأخیر حرکت در ژل، کارایی حامل ساخته شده را برای دربرگیری و فشرده‌سازی سازه ژنی تأیید می‌کند. نتایج Real Time PCR افزایش بیان ژن هدف در سلول‌های توموری را تأیید می‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه کارایی دندریمرهای پلی آمیدوآمین در انتقال ژن و نیز تأثیر مثبت افزودن پلی اتیلن گلیکول و اتصال نانوبادی علیه TAG72 به این نانوحامل ژنی (برای هدفمندسازی انتقال ژن به سلول) را تأیید می‌کند.

کلیدواژگان: نانوحامل پلی آمیدوآمین-پلی اتیلن گلیکول، نانوبادی علیه TAG72، ژن درمانی هدفمند، آدنوکارسینومای کولون انسانی

۱- مقدمه

تومورهای کولون و رکتوم یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها هستند. ماهیت مهاجم، رشد بدون کنترل و مکانیسم‌های پیچیده

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶
Email: Rahbarif@modares.ac.ir

دخیل در رشد و تکثیر تومورهای کولون سبب شده است که درمان‌های اولیه (مانند جراحی، شیمی‌درمانی و رادیودرمانی) ناکارآمد باشند. این درحالی است که ژن‌درمانی به‌عنوان راه‌کاری انقلابی امیدهای تازه‌ای را به همراه داشته است [۱]. موفقیت ژن‌درمانی تا حدود زیادی به ساخت حاملین ژنی کارآمد و ایمن وابستگی نشان داده است. تاکنون نیز گروه‌های تحقیقاتی زیادی حاملین ژنی متعددی که به‌طور کلی در دو دسته حاملین ژنی ویروسی و غیرویروسی قرار می‌گیرند را ساخته و بررسی کرده‌اند. اگرچه حاملین ژنی ویروسی هم در انتقال و هم تضمین بیان ژن انتقالی بسیار کارآمد است ولی مشکلات مربوط به ایمنی زیستی و هزینه‌های بالای تولید آن‌ها محققان را برآن داشته که به سیستم‌های غیرویروسی توجه بیشتری کنند [۲، ۳]. در میان پلیمرهای کاتیونی به‌عنوان حاملین ژنی غیرویروسی، دندریمرهای پلی آمیدوآمین (Poly Amido Amine (PAMAM) Dendrimers) کلاس جدیدی از نانوپلیمرها با ساختار سه بعدی پرانشعاب و بسیار یکنواختی است که قابلیت زیادی در بسته‌بندی مولکول‌های دیگر در فضای درونی خود را دارند. با داشتن گروه‌های آمین باردار مثبت در سطح می‌تواند با مولکول‌های اسیدنوکلئیک (DNA) واکنش داده و آن‌ها را در درون خود فشرده ساخته و ساختارهایی به نام پلی‌پلکس (Polyplex) را ایجاد کند که در انتقال ژن بسیار کارآمد ارزیابی شده است [۴، ۵].

مشکل اصلی پلی‌پلکس‌های DNA-PAMAM، بار مثبت سطح آن‌هاست که سبب واکنش‌های نامطلوب بین آن‌ها و سلول‌های غیرهدف و اجزای خون، کاهش نیمه عمر خونی کمپلکس و سمیت سلولی در موجود زنده (In vivo) می‌شود. در راستای کاهش بارهای مثبت سطحی، پوشاندن بارهای سطح پلی‌پلکس‌ها با پلیمرهای محلول در آب پلی اتیلن گلیکول (Polyethylene Glycol: PEG) (که به آن پگیله کردن می‌گویند) نتایج امیدوارکننده‌ای را نشان داده است [۶-۸]. از سوی دیگر زمانی یک سیستم انتقال دارو/ژن به‌عنوان یک سیستم مؤثر و کارآمد در درمان سرطان در نظر گرفته می‌شود که بتواند محموله خود را بدون هیچ آسیبی به بافت‌های سالم

به محل تومور منتقل کند. بنابراین ظرفیت هدف‌گیری دقیق و اختصاصی تومور یک ویژگی بسیار مهم برای راه‌کارهای درمانی سرطان خواهد بود [۹]. فولیک اسید [۱۰]، پپتیدهایی مانند آرژنین-گلیسین-آسپارتیک اسید (RGD) و آسپارژین-گلیسین-آسپارتیک اسید (NGD) [۱۱]، قطعات آنتی‌بادی‌ها [۱۲] و آنتی‌بادی‌ها [۱۳] تاکنون برای هدفمند کردن انتقال ژن به تومور بسیار مطالعه شده‌اند. اولین بار کاربرد نانوبادی شتری علیه نشانگرهای توموری توسط گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس [۱۴] مطرح و بررسی شد. در این مطالعه نیز از نانوبادی شتری علیه آنتی‌ژن توموری TAG72 (Tumor-associated Glycoprotein 72) که گلیکوپروتئینی از خانواده بزرگ موسین‌هاست و در سطح بسیاری از تومورها از جمله کارسینومای کولون افزایش بیان نشان می‌دهد [۱۵] برای هدفمندسازی انتقال ژن درمانی با نانوحامل استفاده شده است.

هدف این تحقیق ساخت و بررسی نانوذرات PAMAM پوشیده شده با پلی اتیلن گلیکول و هدفمند شده با نانوبادی علیه TAG72 برای انتقال سازه درمانی کد کننده ژن t-Bid (HRE/ERE-pMUC1-t-Bid) به رده‌های سلولی تومورهای کولون در محیط آزمایشگاه (In vitro) و بررسی میزان مرگ و میر سلولی ناشی از بیان ژن هدف است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

در این تحقیق از DNA پلیمراز *Taq*، DNA لیگاز T4 و آنزیم‌های هضم کننده محدودالایر *EcoRI*، *BamHI*، *BbsI* (Fermentas)، کیت‌های تخلیص از ژل (NucleoTrap®)، تخلیص پلاسمید (NucleoSpin® Plasmid) و تخلیص پروتئین دارای His-Tag (Protino® Ni-IDA Packed Columns) شرکت MACHEREY-NAGEL (MN)، کیت تخلیص RNA (RNX-Plus) شرکت Cinnagen، سلول‌های یوکاریوتی رده‌های LS174T و HT29 (هر دو آدنوکارسینومای کولون انسان هستند)، NIH3T3 (رده فیروپلاست موشی)، دندریمر پلی

۲-۲-۲- کشت انبوه و تولید و جداسازی نانوبادی

علیه TAG72

تک کلون تأیید شده در مرحله قبل، در ۵۰ میلی‌لیتر محیط 2XYT حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (به میزان ۱۷۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) برای ۲۴ ساعت در انکوباتور با حرکت چرخشی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد (کشت اولیه). کشت اولیه به یک لیتر محیط 2XYT حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (به میزان ۱۷۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) اضافه شده و تا رسیدن به جذب نوری (Optical Density: OD) برابر $0.9/0.060$ ، در انکوباتور با حرکت چرخشی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (Isopropyl thiogalactoside: IPTG) تا رسیدن به غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به آن اضافه شد تا پروموتور القا شود. پس از افزودن IPTG، انکوباسیون به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با حرکت چرخشی انجام شد. پس از اتمام ۲۰ ساعت از القای باکتری‌ها، آن‌ها با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. عصاره سیتوزولی حاوی نانوبادی مورد نظر با سونیکاسیون (Sonication) جدا و پس از افزودن سدیم آزاید (Sodium Azide) (۰/۰۱ میلی‌گرم در هر لیتر) در یخچال نگهداری شد.

۲-۲-۳- جداسازی و تعیین ویژگی‌های نانوبادی

با توجه به این‌که ساب‌کلونینگ در این ناقل بیانی منجر به افزوده شدن توالی His-tag در انتهای کربوکسیل نانوبادی در هنگام ترجمه می‌شود، می‌توان برای جداسازی پروتئین هدف از محلول رویی به دست آمده از کروماتوگرافی تمایلی ستون‌های نیکل استفاده کرد. در این‌جا با استفاده از ستون‌های Protino® Ni-IDA Packed شرکت MN و طبق دستورالعمل شرکت سازنده این کار انجام شد. نانوبادی هدف در شیب غلظتی ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول (Imidazole) از ستون جدا شده و

آمیدوآمین نسل ۵ (با وزن مولکولی ۲۸۸۲۶) (شرکت Sigma)، ان هیدورکسی سوکسینامید-پلی اتیلن گلیکول-مالئیمید (N-hydroxysuccinimide- Polyethylen Glycol- Maleimide: NHS-PEG-MAL) (با وزن مولکولی ۳۴۰۰) (شرکت Jenkem) استفاده شد.

۲-۲-۲- روش‌ها

۱-۲-۲- ساب‌کلونینگ ژن نانوبادی علیه TAG72

ابتدا توالی نانوبادی علیه TAG72 (در روی ناقل pCOMb3X، جدا شده از کتابخانه ژنی شتری)، با استفاده از دو جفت آغازگر (Primer) مذکور در پایین که دارای جایگاه برش توسط آنزیم‌های محدودساز *BbsI* (در آغازگر رفت) و *BamHI* (در آغازگر برگشت) است به روش PCR تکثیر شد.

Nano-BbsI: آغازگر رفت (Forward)

5'-TATGAAGACACCAGGAGGTGCAGCTGGAGCAGTC-3'

Nano-BamHI-Cys: آغازگر برگشتی (Reverse)

5'-TATGGATCCGCATGAGGAGACGGTGACCTG-3'

ژن نانوبادی تکثیر شده و پلاسمید بیانی pSJ تحت اثر آنزیم‌های محدودالتر *BamHI* و *BbsI* هضم و سپس از ژل آگارز طبق دستورالعمل کیت تخلیص از ژل Nucleo Trap-MN تخلیص شد. اتصال قطعه ژنی به درون پلاسمید طبق دستورالعمل شرکت Fermentas انجام و محصول نو ترکیب به روش القای الکتریکی وارد باکتری *E. coli* TG1 شد. کلون‌های تشکیل شده روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، توسط کلونی PCR (با کاربرد آغازگرهای فوق) بررسی و کلون‌های حاوی ژن نانوبادی شناسایی شد. پس از آن یکی از کلون‌های مرحله قبل برای ادامه کارها انتخاب شد. پلاسمید کلون منتخب تخلیص و با هضم تأییدی (با دو آنزیم *BamHI* و *EcoRI*) و توالی‌خوانی تأیید شد. این پلاسمید تأیید شده به نام pSJ-TAG10 نام‌گذاری شد.

۶-۲-۲- ترکیب سازه ژنی با نانوذرات هدفمند شده

ابتدا یک میلی گرم PAMAM یا PAMAM-PEG- نانوبادی در یک میلی لیتر بافر PBS تهیه و از آن رقتی به صورت ۱۰۰ میکروگرم PAMAM در هر میلی لیتر بافر PBS ($pH=7/4$) یا محیط کشت سلولی فاقد سرم (در این جا محیط DMEM خام استفاده شد) تهیه شد. محلول ذخیره (Stock Solution) پلاسمید (HRE/ERE-pMUC1-tBid) با غلظت ۱۰۰ میکروگرم DNA در هر میلی لیتر آب چهار بار تقطیر تهیه شد. سپس محلول استوک DNA به آرامی به رقت دندریمری تهیه شده تا رسیدن به نسبت وزنی ۱۰ به ۱ (این نسبت وزنی تأمین کننده نسبت نیتروژن نانوذره به فسفات DNA) همان نسبت N به P برابر با ۱۵ خواهد شد) اضافه شد. سپس بلافاصله ورتکس (Vortex) سریع به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق انجام شد.

۷-۲-۲- تعیین خصوصیات نانوذرات هدفمند شده

و حاوی سازه ژنی

برای اطمینان از مجتمع شدن پلاسمید در نانوذرات، از هر یک از کمپلکس های pDNA/PAMAM، پگیده شده/پدنا/پامام پگیده شده هدفمند شده با نانوبادی/پدنا/پامام به میزان ۱۰ میکرولیتر در ژل آگارز ۱ درصد برده و به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز انجام شد. باندهای DNA با نور ماورای بنفش (UV) مشاهده شد. اندازه و پتانسیل زتای (Zeta Potential) نانوکمپلکس ها به ترتیب با کمک دستگاه نانوسایت (Nanosight) و دستگاه زتاسایزر (Zeta Sizer) ساخت شرکت Malvern بررسی شد.

۸-۲-۲- ترانسفکشن سلول های یوکاریوتی

سلول های رده LS174T (رده سلولی آدنوکارسینومای کولون انسان دارای بیان بالای آنتی ژن TAG72) به عنوان سلول هدف، رده HT29 و رده NIH3T3 به عنوان شاهد، در محیط

یک روز در بافر فسفات سالین (Phosphate Buffered Saline) ($pH=7/2$) در ۴ درجه سانتی گراد دیالیز (Dialyze) شد. فرآیند جداسازی با ستون نیکل با کاربرد روش SDS-PAGE (Sodium dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) بررسی شد. با کاربرد آنتی بادی علیه توالی C-myc در وسترن بلاتینگ (Western Blotting) حضور نانوبادی در نمونه تأیید شد. غلظت نانوبادی به روش برادفورد (Bradford) و اختصاصیت واکنش پذیری نانوبادی با آنتی ژن TAG72 در مقایسه با ۸ پروتئین دیگر به روش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) تعیین و بررسی شد.

۹-۲-۲- آماده سازی نانوذرات PAMAM-PEG

مقدار ۱ میلی گرم ($0/0346$ میکرومول) از PAMAM و $0/24$ میلی گرم ($0/0693$ میکرومول) از NHS-PEG-MAL در نیم میلی لیتر PBS ($pH=8$) ترکیب و ۲ ساعت در دمای اتاق با هم زدن مخلوط شد. گروه های آمین انتهایی نانوذره به طور اختصاصی با گروه های NHS در PEG واکنش می دهد. کونژوگه های حاصل از فیلترهای اولتراسانتریفیوژی آمیکون (میلی پور) با محدوده وزنی ۱۰ کیلودالتون عبور داده شد تا هم کونژوگه ها از پلی اتیلن گلیکول متصل نشده جداسازی شود و هم بافر با 500 میکرولیتر PBS ($pH=7$) تعویض شود.

۱۰-۲-۲- اتصال نانوبادی علیه TAG72 به نانوذرات

PAMAM/PEG

کونژوگه های تازه تهیه شده با $0/0346$ میکرومول از نانوبادی در یک میلی لیتر از بافر PBS ($pH=7$) ترکیب و ۲۴ ساعت در دمای اتاق با هم زدن مخلوط شد. در این واکنش گروه های مالئیمید آزاد انتهای پلی اتیلن گلیکول به گروه های سیستمینی که به واسطه آغازگر برگشت به انتهای نانوبادی اضافه شده بود متصل شد. کمپلکس های حاصل با استفاده از فیلترهای اولتراسانتریفیوژی آمیکون با محدوده وزنی ۳۰ کیلودالتون جداسازی و بافر نیز با PBS ($pH=7/4$) تعویض شد.

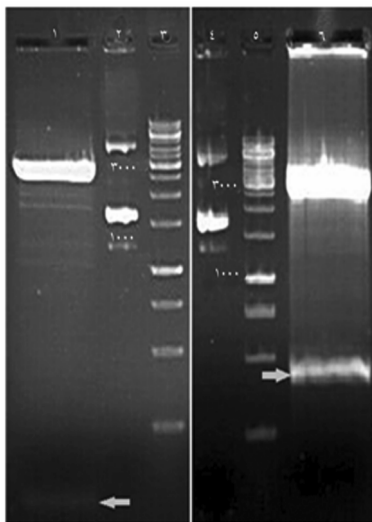
۲-۱۰-۲- بررسی میزان مرگ و میر سلول‌ها

پس از تریپسینه کردن سلول‌ها و جداسازی آن‌ها از کف حجم ۱۰ میکرولیتر از سلول‌ها با حجم برابر از رنگ حیاتی تریپان بلو (Trypan Blue) ترکیب و زیر میکروسکوپ تعداد سلول‌های زنده شمارش شدند.

۳- نتایج

۳-۱- ساب کلونینگ ژن نانوبادی علیه TAG72

توالی ژنی نانوبادی علیه آنتی‌ژن توموری TAG72 در ناقل بیانی pSJ ساب کلون شد. محصول نو ترکیب به درون باکتری‌های *E. coli* TG1 القا شده و کلون‌های تشکیل شده روی پلید حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به روش کلونی-PCR بررسی شدند. پلاسمید ساب کلون شده pSJ-TAG-10 تخلیص شده و با دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI هضم تأییدی انجام شد (شکل ۱).



شکل ۱ به ترتیب از چپ به راست: ستون ۱) پلاسمید pSJ هضم شده (برش با *Eco*RI و *Bam*HI منجر به خروج قطعه‌ای نزدیک به ۹۰ جفت‌باز از ناقل می‌شود)، ستون ۲ و ۳) پلاسمید pSJ هضم نشده به عنوان کنترل، ستون ۴ و ۵) DNA Ladder ۱ کیلوبازی، ستون ۶) پلاسمید pSJ-TAG-10 هضم شده (برش با *Eco*RI و *Bam*HI منجر به خروج قطعه‌ای نزدیک به ۴۵۰ جفت‌باز از ناقل ساب کلون شده می‌شود). قطعات خروجی در محل پیکان نشان داده شده است. (اعداد مشخص شده در شکل با واحد جفت‌باز هستند).

DMEM با FCS (Fetal Calf Serum) ۱۰ درصد کشت و به پلید ۲۴ خانه منتقل شدند تا به تراکم محیطی (Confluency) ۸۰ درصد (۴۸ تا ۷۲ ساعت) برسند. در این مدت آن‌ها در محیط DMEM با مقادیر کاهشی FCS انکوبه شدند تا این که ۱۴ ساعت قبل ترانسفکشن به آن‌ها محیط DMEM با FCS ۱ درصد و بدون آنتی‌بیوتیک اضافه شدند. برای ترانسفکشن ابتدا محیط سطح سلول‌ها را تخلیه و سپس به هر چاهک از پلید ۲۴ خانه، ۵۰ میکرولیتر محیط DMEM فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک به همراه مخلوط‌های ترانسفکشن تازه تهیه شده (تا رسیدن به غلظت نهایی PAMAM به صورت ۱۵ میکروگرم در چاهک) اضافه شد. پلید ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با دی‌اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شده و سپس مخلوط‌ها از روی سلول‌ها برداشته و سلول‌ها یک‌بار با محیط کشت خام شسته شدند. سپس به هر چاهک محیط کشت DMEM کامل و حاوی FCS ۱۰ درصد اضافه و پلید به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. پس از اتمام این مدت سلول‌ها بررسی شدند.

۲-۲-۹- انجام Real Time PCR برای بررسی

کمی بیان ژن t-Bid در سلول‌ها

RNA سلول‌های منجمد شده (در مرحله قبل) با استفاده از برنامه کیت RNX-Plus شرکت CinnaGen تخلیص و سپس غلظت RNA ها با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (Biophotometer) با طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس M-MuLV شرکت Fermentas cDNA تمام آن‌ها ساخته شد.

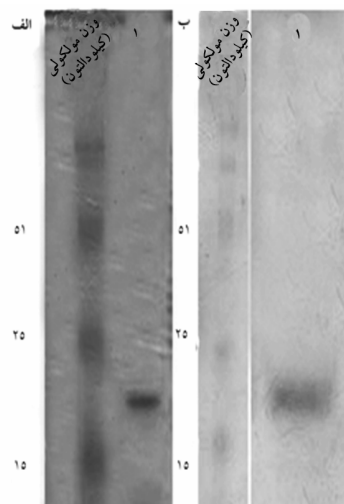
به منظور بررسی کمی بیان ژن و با استفاده از دستگاه Real Time PCR (شرکت Applied Biosystem StepOne) روی تمام cDNA های سنتز شده انجام شد. نسبت بیان ژن هدف (ژن t-Bid) در مقایسه با ژن کنترل بتا-اکتین با کاربرد فرمول Pfaffle برای تمام تیمارها محاسبه شد.

$$\text{نسبت بیان ژن} = \frac{(\text{هدف-کنترل}) \Delta C_E (\text{هدف})}{(\text{هدف-کنترل}) \Delta C_E (\text{مرجع})}$$

۳-۲- تولید، جداسازی و تعیین ویژگی‌های نانوبادی

علیه TAG72

با توجه به این‌که ساب‌کلونینگ در ناقل pSJ منجر به افزوده شدن توالی His-tag و C-myc در انتهای کربوکسیل نانوبادی می‌شود، کروماتوگرافی تمایلی با کاربرد ستون نیکل انجام و اتصالات اسیدآمین‌های هیستیدین انتهای نانوبادی به نیکل‌های این ستون با کاربرد شیب غلظتی ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول شکسته شد و نانوبادی جداسازی شد. نتایج SDS-PAGE (شکل ۲) این فرآیند جداسازی را تأیید می‌کند. در وسترن بلاتینگ با کاربرد آنتی‌بادی موشی علیه C-myc حضور تک باند نانوبادی در ناحیه حدود ۲۰ کیلودالتون تأیید شد (شکل ۲).



شکل ۲ الف) SDS-PAGE، ب) وسترن بلاتینگ، ۱) تک باند نانوبادی علیه TAG72 که با غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول از ستون نیکل جداسازی شده است، در محدوده ۲۰ کیلودالتون مشاهده می‌شود و MW: نشانگر وزن مولکولی است.

جدول ۱ نتایج الیزا در OD ۴۵۰ نانومتر؛ نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است.

آنتی ژن	TAG72	BSA	BSM	PSM
۴۵۰ نانومتر OD	$6/1 \pm 0/23$	$5/0 \pm 0/20$	$5/0 \pm 0/20$	$5/0 \pm 3/0$
فاکتور رشد اپیدرمی-۲ ^۴	SK-Milk ^۵	کازئین ^۶	Muc1	اندوگلین ^۷
۴۵۰ نانومتر OD	$5/0 \pm 3/0$	$5/0 \pm 0/27$	$7/0 \pm 0/3$	$5/0 \pm 0/19$

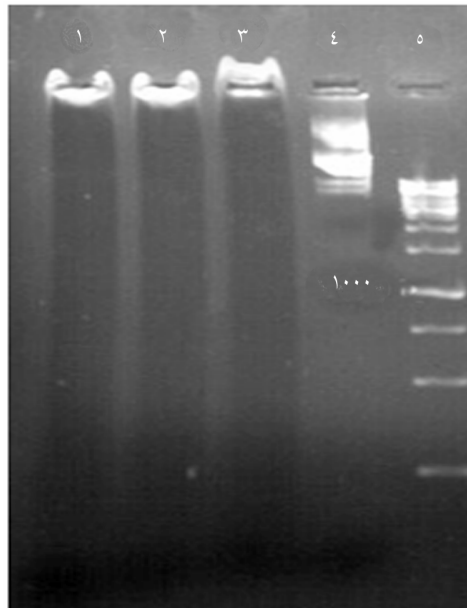
۱: Bovine Serum Albumin ۲: Bovine Submaxillary Mucin ۳: Porcine Submaxillary Mucin ۴: Epidermal Growth Factor-2/Her-2 ۵: شیر خشک بدون چربی (Skim- Milk) ۶: Casein ۷: Endoglin

حرکت آن را به صورت معکوس یعنی از مثبت به منفی تغییر می‌دهد) در شکل ۳ نشان داده شده است. سازه ژنی به تنهایی (به عنوان کنترل) که به راحتی در ژل حرکت می‌کند، در این آزمون آورده شده است.

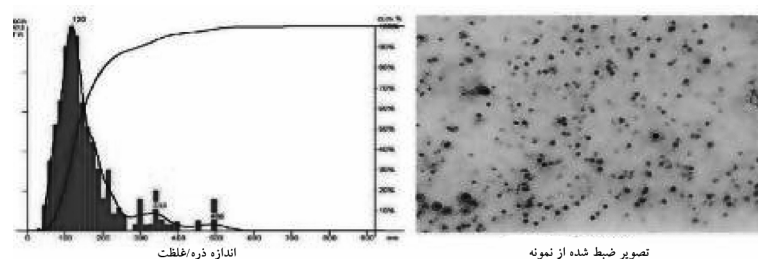
نتایج بررسی نانوکمپلکس‌های پلی آمیدوآمین پگیله شده هدفمند شده با نانوبادی/pDNA با دستگاه نانو سایت نشان دهنده تشکیل کمپلکس‌هایی با شکل‌های کروی و با میانگین اندازه 162 ± 92 نانومتر (شکل ۴) است. همچنین بررسی نانوذرات وجود متوسط پتانسیل زتای $+4/57$ را تأیید کرد (جدول ۲).

۳-۳- تعیین خصوصیات نانوذرات

کمپلکس‌های pDNA/PAMAM، پگیله شده PAMAM و pDNA/نانوبادی طبق روش اشاره شده بالا (همگی با نسبت وزنی PAMAM به DNA ی ۱۰ به ۱) سنتز شده و ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های تازه تهیه شده در ژل آگارز ۱ درصد برای ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد. توانایی نانوذرات برای دربرگیری و بسته‌بندی سازه ژنی و در نتیجه ممانعت از حرکت الکتروفورزی آن در جهت قطب مثبت (بار مثبت غالب در نانوذره



شکل ۳ نتیجه تأخیر حرکت در ژل: در ستون (۱) PAMAM پگیله شده هدفمند شده با نانوبادی/سازه ژنی، ستون (۲) PAMAM پگیله شده/سازه ژنی، ستون (۳) کمپلکس‌های PAMAM/سازه ژنی، نسبت وزنی نانوذره به DNA در سازه ژنی یک به ده و نسبت نیتروژن نانوذره به فسفات DNA برابر ۱۵ در نظر گرفته شده است (بار مثبت غالب در نانو ذره حرکت آن را به صورت معکوس یعنی از مثبت به منفی تغییر می‌دهد)، ستون (۴) پلاسمید حاوی ژن کدکننده t-Bid، ستون (۵) DNA Ladder (اعداد در شکل با واحد جفت‌باز هستند).



شکل ۴ نتیجه بررسی اندازه نانوکمپلکس‌های PAMAM پگیله شده هدفمند شده با نانوبادی/pDNA به صورت میانگین ± انحراف معیار در نمودار نشان داده شده است. میانگین اندازه نانوکمپلکس‌ها ۱۶۲ نانومتر با انحراف معیار ۹۲ نانومتر گزارش شده است. تصویر سمت راست تشکیل نانوکمپلکس‌هایی با اشکال یکنواخت و عدم تشکیل تجمعات بین ذره‌ای را در نمونه مورد بررسی نمایش می‌دهد.

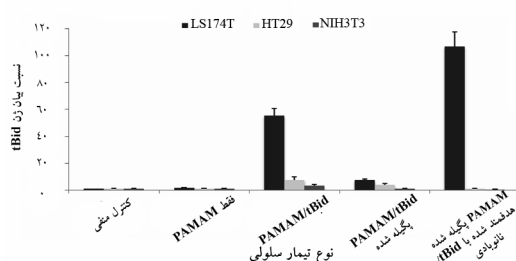
جدول ۲ نتیجه بررسی پتانسیل زتا نانوکمپلکس‌های PAMAM پگیله شده هدفمند شده با نانوبادی/pDNA در سه نوبت نشان داده شده است. میانگین پتانسیل زتا ذرات به صورت $4.57 \pm$ است.

شماره نمونه	نوع بررسی	دما (سانتی گراد)	پتانسیل زتا (میلی ولت)	حرک الکتروفورزی (میکرومتر × سانتی متر / ولت × ثانیه)	هدایت کنندگی (میلی سیمن / سانتی متر)
۱	اندازه‌گیری پتانسیل زتا	۲۵	۴/۵۴	۰/۳۵۵۵	۲۴
۲	اندازه‌گیری پتانسیل زتا	۲۵	۵/۱۲	۰/۴۰۱۳	۲۶/۸
۳	اندازه‌گیری پتانسیل زتا	۲۵	۴/۰۷	۰/۳۱۸۵	۲۷/۲

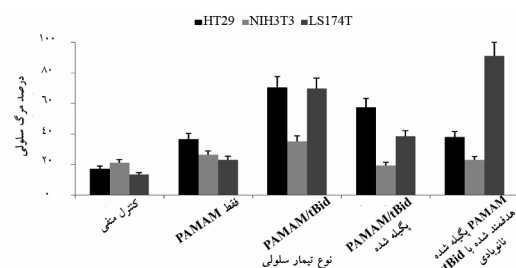
۳-۴- نتایج Real Time PCR و بررسی کمی

بیان ژن هدف در سلول‌ها

نتایج Real Time PCR پس از محاسبه نسبت بیان ژن t-Bid در مقایسه با ژن کنترل بتا-اکتین (با کاربرد فرمول Pfaffle) در نمودار ۱ مشاهده می‌شود. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است.



نمودار ۱ نسبت بیان ژن t-Bid در مقایسه با ژن کنترل (بتا-اکتین) در هر سه رده سلولی در اثر تیمارهای مختلف؛ نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است.



نمودار ۲ نتایج شمارش سلولی رده‌های سلولی LS174T, HT29 و NIH3T3؛ درصد مرگ سلولی به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار برای هر سه رده سلولی نشان داده شده است.

۳-۵- نتایج شمارش سلولی پس از ترانسفکشن

میزان مرگ سلولی در اثر تیمارهای مختلف در مقایسه با حالت تیمار نشده راه کاری مناسبی برای ارزیابی میزان سمیت سلولی و نیز کارایی حامل ژنی ساخته شده در انتقال ژن کشنده (tBid) است. نمودار ۲ نتایج شمارش سلول‌های زنده و مرده را براساس نوع سلول و نوع تیمار به صورت میانگین $\pm$ انحراف

معیار نشان می‌دهد. در مورد سمیت سلولی حاصل از خود نانوذرات، با توجه به اثر نانوذرات بر سلول‌های NIH3T3 که به عنوان سلول عادی و غیر بیان کننده آنتی ژن در نظر گرفته شده و از طرفی از تیمار سلول‌ها به پلی پلکس بدون سازه، مشاهده می‌شود که اثر نانوذره و پلی پلکس بدون سازه بر این سلول‌ها خیلی نزدیک به کنترل منفی و نیز خیلی نزدیک به مرگ و میر این سلول بدون تیمار است که بر اثر سمی پایین نانوذره بر سلول‌های عادی دلالت دارد.

۴- بحث

تحقیقات متعدد روی دندریمرهای PAMAM با انتهای آمینی، توانایی ترکیب با مولکول‌های DNA، تشکیل پلی پلکس‌های پایدار و کارایی ترانسفکشن این پلیمرهای کاتیونی را بسیار کارآ ارزیابی کرده به نحوی که آن‌ها را به عنوان یکی از مؤثرترین حاملین ژنی غیرویروسی معرفی می‌کند. مهندسی دندریمرهای PAMAM با زنجیره‌های PEG (منظور فرم پگیده شده است) ویژگی‌های زیست‌شناختی و فارماکولوژیکی مناسبی مانند بهبود سازگاری زیستی و حلالیت در محیط آبی، افزایش نیمه عمر و کاهش سمیت سلولی و تحریک ایمنی را به همراه داشته است. از طرفی کاهش بارهای مثبت سطحی ناشی از پگیده شدن، توانایی اندوسیتوز و در نتیجه، کارایی ترانسفکشن این دندریمرها را کاهش می‌دهد [۱۶]. برای بهبود این شرایط انواعی از مولکول‌های هدف‌یاب مانند لیگاندهای کوچک (مثل فولات)، پپتیدها (مثل ترانسفرین) و پروتئین‌ها (مثل آنتی‌بادی و قطعات آن‌ها) به سطح آن‌ها اضافه شده است تا به این ترتیب ناقلی هدفمند تولید شود که با داشتن امکان اندوسیتوز به واسطه گیرنده به صورت اختصاصی، کارایی ترانسفکشن بالایی را نشان دهد [۱۷].

در اکثر مطالعات انجام شده روی هدفمندسازی انتقال ژن با دندریمرهای PAMAM، از فرم پگیده شده و هدفمند آن استفاده شده است. در یک مطالعه با در نظر گرفتن گزارش بهبود کارایی ترانسفکشن سلول‌های نوروبی با متصل کردن پپتید ترانسفرین به

سطح سلول سرطانی باعث ایجاد آثار کشندگی سلولی با مکانیسم‌های «کشندگی سلولی وابسته به آنتی‌بادی»، «کشندگی سلولی به واسطه کمپلمان» و القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) در آن‌ها می‌شود ولی هزینه‌های بالای تولید، نفوذ کم به بافت توموری و تحریک سیستم ایمنی، کاربرد آنتی‌بادی‌های مونوکلونال را با مشکلاتی مواجه کرده است [۲۱].

قطعات آنتی‌بادی که فرم‌های کوچک‌تر آنتی‌بادی‌ها با ظرفیت اتصال به آنتی‌ژن است، توانایی نفوذ بیشتری به بافت دارد؛ ولی به دلیل فقدان ناحیه FC، قادر به تحریک مؤثر سیستم ایمنی و القای مرگ این سلول‌ها نیست [۲۲]. آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین به‌طور طبیعی در سرم شترسانان یافت می‌شود. از آن‌جا که این آنتی‌بادی‌ها خصوصیات منحصر به فردی دارد (از جمله توانایی نفوذ راحت‌تر به تومور (به دلیل اندازه کوچک)، ۸۰ درصد همولوژی با توالی VH₃ آنتی‌بادی انسان، سهولت دست‌ورزی و تولید انبوه و صرفه اقتصادی) به‌عنوان جایگزین مناسب (single-chain variable fragment) scFv یا آنتی‌بادی‌های تک رشته‌ای مطرح است [۲۳].

در این مطالعه نیز از نانوبادی علیه آنتی‌ژن توموری TAG72 (که نوعی گلیکوپروتئین با بیان بالا در سطح بافت پوششی بسیاری از تومورها به‌ویژه تومورهای کولون است) استفاده شده است [۲۴]. رده‌های سلولی LS174T (رده سلولی دارای بیان بالا از آنتی‌ژن TAG72)، HT29 (رده سلولی فاقد بیان این آنتی‌ژن) و NIH3T3 (کنترل دوم) به‌کار گرفته شدند. کارآیی سازه ژنی کدکننده ژن هدف HRE/ERE-pMUC1 (HRE/ERE-pMUC1-t-Bid) در القای مرگ سلول‌های توموری در مطالعات قبلی همین گروه با کاربرد لیپوفکتامین (Lipofectamine) [۲۵] و نانوذرات پلی اتیلن ایمین (Polyethyleneimine) پیگیده شده [۲۶] تأیید شده است. در این مطالعه برای انتقال هدفمند این سازه ژنی به سلول‌های مذکور در محیط آزمایشگاه از نانوذرات PAMAM پیگیده شده استفاده شده است.

با مقایسه نتایج نسبت بیان ژن هدف به ژن کنترل در اثر تیمارهای مختلف روی این سه رده سلولی نتیجه می‌گیریم در

سطح دندیرم‌های PAMAM G5-PEG₃₅₀₀ بررسی مقایسه‌ای درمورد تأثیر اتصال لیگاند لاکتوفرین (Lactoferrin) به این دندیرم‌ها با لیگاند ترانسفرین به آن‌ها انجام شد. این گروه افزایش ۲، ۳ برابری میزان بیان ژن لوسیفراز (Luciferase) منتقل شده با PAMAM G5-PEG₃₅₀₀-Lf نسبت به PAMAM G5-PEG₃₅₀₀-Tf در نوروها هم در محیط کشت و هم در مغز موش‌های مورد آزمایش را گزارش دادند [۱۸]. پیپتیدهای LAB (Low Affinity Binding) و HAB (High Affinity Binding) به‌طور اختصاصی به گیرنده‌های غشای سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) متصل می‌شود. سانتوس (Santos) و همکارانش، با اتصال ۴ و ۸ عدد از این پیپتیدها به سطح دندیرم‌های PAMAM G5-PEG₃₄₀₀ پیگیده شده، به‌ترتیب افزایش ۱۰ و ۵/۵ برابری کارآیی ترانسفکشن را نسبت به حالت غیرهدفمند شده این دندیرم نشان دادند. کاربرد این حالت علاوه بر افزایش بیان ژن، کاهش سمیت سلولی و افزایش بقای سلول‌های بنیادین را به همراه داشت (در حالی که تنها حدود ۴۰ درصد سلول‌ها، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن با PAMAM دست‌ورزی نشده زنده ماندند، این رقم برای حالت تیمار با PAMAM پیگیده شده و هدفمند در این بررسی ۸۰ تا ۹۰ درصد بود) [۱۹]. این مطالعات و نیز گزارش‌های مشابه همگی بر اهمیت هدفمندکردن نانوذرات دندیرمی برای انتقال ژن دلالت دارد.

کاربرد آنتی‌بادی‌ها برای هدفمندسازی نانوحامل‌ها بسیار مورد توجه بوده است. به‌طور نمونه تأثیر مثبت اتصال آنتی‌بادی علیه E-سلکتین (E-Selectin) به سطح دندیرم‌های PAMAM متصل و تأثیر این هدفمندسازی در انتقال ژن به سلول‌ها بررسی شده است. کارآیی ترانسفکشن سلول‌های رده (Chinese Hamster Ovary) CHO، ۴ برابر و سلول‌های رده (Human Saphenous Vein Endothelial Cells) HSVEC ۵ برابر (نسبت به کاربرد دندیرم غیرهدفمند) افزایش نشان داده است [۲۰]. اگرچه مولکول‌های مونوکلونال آنتی‌بادی کایمیریک یا انسانی شده به دنبال اتصال به آنتی‌ژن (نشانگر)

حالی که تیمار با PAMAM حاوی سازه ژنی در مقایسه با حالت تیمار با نانوذره خالی افزایش بیان ۳۰ و ۲۷ برابری را به ترتیب در سلول‌های رده LS174T و HT29 به همراه دارد، هدفمندسازی انتقال سازه (منظور تیمار با PAMAM پگیله شده هدفمند شده با نانوبادی/pDNA) نیز در مقایسه با حالت غیرهدفمند منجر به افزایش بیان ۵۰ درصدی در رده سلولی LS174T و کاهش ۹۶ و ۸۲ درصدی به ترتیب در رده‌های سلولی HT29 و NIH3T3 می‌شود. این تغییر الگوی بیان ژن هدف بر تأثیر مثبت این هدفمندسازی انتقال ژن با نانوحامل در افزایش ورود به سلول و به دنبالش افزایش میزان بیان ژن انتقالی در مقایسه با حالت غیرهدفمند شده دلالت می‌کند. بدون هدفمندسازی انتقال ژن، بیان ژن t-BID تابعی از میزان بیان ژن MUC1 در سلول‌هاست و چون در این مطالعه، سلول‌ها از نظر بیان ژن t-Bid به صورت LS174T>HT29>NIH3T3 بودند، بنابراین افزایش بیان ژن هدف در رده سلولی LS174T نسبت به حالت کنترل آن، نشان می‌دهد که نه تنها بیان بالای TAG72 در سطح سلول‌های LS174T به افزایش توان انتقال نانوحامل هدفمند کمک می‌کند بلکه از سوی دیگر احتمالاً بیان بالاتر ژن MUC1 در همین رده سلولی منجر می‌شود که حتی در حالت هدفمند نشده نیز نسبت به رده سلولی HT29 (که آن هم MUC1 را بیان می‌شود) نتایج بهتری را نشان دهد. عدم بیان ژن MUC1 انسانی در رده سلولی NIH3T3، بیان بسیار پایین ژن هدف (که تحت پروموتور MUC1 انسانی بیان می‌یابد) را تا

حدودی در این رده سلولی توجیه می‌کند. شایان ذکر است که بررسی‌های هیستولوژیکی بیشتری برای تأیید این یافته نیاز است. در بررسی میزان سمیت سلولی نانوذرات PAMAM روی این رده‌های سلولی، حالت بدون تیمار به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. درحالی که تیمار با نانوذرات PAMAM منجر به حدود ۲ برابر شدن درصد مرگ سلولی در رده HT29 نسبت به حالت کنترل می‌شود، در دو رده سلولی LS174T و NIH3T3 به ترتیب تنها افزایش حدود ۱/۷ و ۱/۲ برابری این درصد مشاهده شد. همچنین می‌توان از مقایسه نتایج مرگ سلولی پس از ۴۸ ساعت مشاهده کرد که ترتیب سمیت سلولی این نانوذرات به صورت HT29>LS174T>NIH3T3 است. به طور کلی این مطالعه تأییدی بر کارایی دندریمرهای PAMAM در انتقال ژن و نیز تأثیر مثبت پگیله کردن و اتصال نانوبادی علیه TAG72 به این نانوحامل ژنی (برای هدفمندسازی انتقال ژن به سلول) است.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد (بیوتکنولوژی پزشکی) است و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و نیز کمیته نانو فناوری دانشگاه تربیت مدرس (به طرح تصویب شده دکتر فاطمه رهبری زاده- از محل برنامه حمایت از توسعه فناوری های راهبردی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری) انجام شده است.

۶- منابع

- [1] Scanlon KJ. Cancer gene therapy: challenges and opportunities. *Anticancer Res* 2004; 24(2A): 501-4.
- [2] El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* 2004; 94(1): 1-14.
- [3] Louise C. Nonviral vectors. *Methods Mol Biol* 2006; 333: 201-26.
- [4] Haensler J, Szoka FC Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconj Chem* 1993; 4(5): 372-9.
- [5] Navarro G, Tros de Ilarduya C. Activated and non-activated PAMAM dendrimers for gene

- delivery in vitro and in vivo. *Nanomedicine* 2009; 5(3): 287-97.
- [6] Luo D, Haverstick K, Belcheva N, Han E, Saltzman WM. Poly(ethylene glycol)-Conjugated PAMAM Dendrimer for Biocompatible, High-Efficiency DNA Delivery. *Macromolecules* 2002; 35(9): 3456-62.
- [7] Kojima C, Regino C, Umeda Y, Kobayashi H, Kono K. Influence of dendrimer generation and polyethylene glycol length on the biodistribution of PEGylated dendrimers. *Int J Pharm* 2010; 383(1-2): 293-6.
- [8] Qi R, Gao Y, Tang Y, He RR, Liu TL, He Y, Sun S, Li BY, Li YB, Liu G. PEG-conjugated PAMAM dendrimers mediate efficient intramuscular gene expression. *AAPS J* 2009; 11(3): 395-405.
- [9] Kircheis R, Blessing T, Brunner S, Wightman L, Wagner E. Tumor targeting with surface-shielded ligand--polycation DNA complexes. *J Control Release* 2001; 72(1-3): 165-70.
- [10] Singh P, Gupta U, Asthana A, Jain NK. Folate and folate-PEG-PAMAM dendrimers: synthesis, characterization, and targeted anticancer drug delivery potential in tumor bearing mice. *Bioconjug Chem* 2008; 19(11): 2239-52.
- [11] Kunath K, Merdan T, Hegener O, Häberlein H, Kissel T. Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer. *J Gene Med* 2003; 5(7): 588-99.
- [12] Xu L, Tang WH, Huang CC, Alexander W, Xiang LM, Pirollo KF, Rait A, Chang EH. Systemic p53 gene therapy of cancer with immunolipoplexes targeted by anti-transferrin receptor scFv. *Mol Med* 2001; 7(10): 723-34.
- [13] Deckert PM. Current constructs and targets in clinical development for antibody-based cancer therapy. *Curr Drug Targets* 2009; 10(2): 158-75.
- [14] Rahbarizadeh F, Rasaei MJ, Forouzandeh Moghadam M, Allameh AA, Sadroddiny E. Production of novel recombinant single-domain antibodies against tandem repeat region of MUC1 mucin. *Hybrid Hybridomics* 2004; 23(3): 151-9.
- [15] Chen L, Wang Y, Liu X, Dou S, Liu G, Hnatowich DJ, Rusckowski M. A new TAG-72 cancer marker peptide identified by phage display. *Cancer Lett* 2008; 272(1): 122-32.
- [16] Lee H, Larson RG. Molecular dynamics study of the structure and interparticle interactions of polyethylene glycol-conjugated PAMAM dendrimers. *J Phys Chem B* 2009; 113(40): 13202-7.
- [17] Yang W, Cheng Y, Xu T, Wang X, Wen LP. Targeting cancer cells with biotin-dendrimer conjugates. *Eur J Med Chem* 2009; 44(2): 862-8.
- [18] Huang R, Ke W, Liu Y, Jiang C, Pei Y. The use of lactoferrin as a ligand for targeting the polyamidoamine-based gene delivery system to the brain. *Biomaterials* 2008; 29(2): 238-46.
- [19] Santos JL, Pandita D, Rodrigues J, Pêgo AP, Granja PL, Balian G, Tomás H. Receptor-mediated gene delivery using PAMAM dendrimers conjugated with peptides recognized by mesenchymal stem cells. *Mol Pharm* 2010; 7(3): 763-74.
- [20] Theoharis S, Krueger U, Tan PH, Haskard DO, Weber M, George AJ. Targeting gene delivery to activated vascular endothelium using anti E/P-Selectin antibody linked to PAMAM

- dendrimers. *J Immunol Methods* 2009; 343(2): 79-90.
- [21] Jaracz S, Chen J, Kuznetsova LV, Ojima I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorg Med Chem* 2005; 13(17): 5043-54.
- [22] Begent RH, Verhaar MJ, Chester KA, Casey JL, Green AJ, Napier MP, Hope-Stone LD, Cushen N, Keep PA, Johnson CJ. Clinical evidence of efficient tumor targeting based on single-chain Fv antibody selected from a combinatorial library. *Nat Med* 1996; 2(9): 979-84.
- [23] Cortez-Retamozo V, Lauwereys M, Hassanzadeh Gh G, Gobert M, Conrath K, Muyldermans S, De Baetselier P, Revets H. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int J Cancer* 2002; 98(3): 456-62.
- [24] Kuroki M, Fernsten PD, Wunderlich D, Colcher D, Simpson JF, Poole DJ, Schlom J. Serological Mapping of the TAG-72 Tumor-associated Antigen Using 19 Distinct Monoclonal Antibodies. *Cancer Res* 1990; 50(15): 4872-9.
- [25] Farrokhimanesh S. The Construction and Analysis of Vector Containing tBid (a proapoptotic gene) Induced MUC1 Promoter, Survivin Promoter Estrogen and Hypoxia Responsive Elements. Presented For the M.Sc., 2008; Tarbiyat Modarres University: Tehran, Iran. (Persian)
- [26] Sadeqzadeh E. Construction and Analysis of targeted polyplexes containing HRE/ERE-pMUC1-tBid construct using nanobody against MUC1. Presented For the M.Sc., 2009; Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. (Persian)