

Construction of a Plasmid Expressing MDA-7 Gene Modified by an iNGR Sequence and Its Evaluation for Apoptosis Induction in a Hepatocellular Cancer Cell Line

Ehsan Zare¹, Seyed Ebrahim Hosseini², Ghasem Mosayebi³, Majid Sadeghizadeh⁴,
Tayebeh Hashempour⁵, Seyed Younes Hosseini^{6*}, Behzad Khansarinejad^{7**}

- 1- M.Sc., Department of Biotechnology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
2- Ph.D. Candidate, Gastroenterohepatology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3- Professor, Department of Biotechnology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
4- Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5- Assistant Professor, Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
6- Assistant Professor, Gastroenterohepatology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
7- Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 7134845794, Gastroenterohepatology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
Email: Hosseini22@yahoo.com

**Corresponding Address: P.O.Code: 3819693345, Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
Email: khansarinajade@gmail.com

Received: 06/Jan/2017, Accepted: 24/May/2017

Abstract

Objective: Melanoma differentiation association gene-7 (MDA-7)/IL24 is a tumor suppressor gene. The iNGR peptide sequence, with excellent tropism to surface integrins has been employed for targeting of therapeutic molecules toward tumor cells. The purpose of our study was to construct a plasmid expressing modified MDA-7 fused with an iNGR peptide for better targeting to tumor cells.

Methods: At first, we amplified the MDA-7 sequence by PCR, while the reverse primer contained the iNGR peptide sequence to add it to the end of a new MDA-7 gene. The resultant MDA7-iNGR and MDA-7 were cloned into a pCDNA3.1 eukaryotic expression vector. The accuracy of cloning methods, integrity of the plasmids, and sequence were sequentially evaluated by digestions, colony-PCR, and sequencing. The expressions of the plasmid constructs were assayed by ELISA following their transfection into Ad-293 cells. Next, the plasmids were transfected into Hep-G2 cells and their mRNA were converted to cDNA. We assessed the gene expression levels of Gadd153 and Bax. As the final step, apoptosis induction of Hep-G2 cells following transfection was evaluated by the help of PI/Annexin V staining according to flow cytometry.

Results: The results showed the integrity of construct backbone in addition to reading frame of the MDA-7-iNGR sequence. A suitable expression/secretion of modified the MDA-7.iNGR protein was detected by ELISA assay of the culture supernatant when compared to the control construct that expressed unmodified MDA-7. The viability test demonstrated no benefit for this kind of modification of the MDA-7 protein. Real-time PCR and flow cytometry analyses revealed that the addition of iNGR to MDA-7 caused a decrease in its apoptotic effect on hepatic tumor cells compared to the normal protein. The modified protein had significant apoptosis induction compared to the negative control group ($P < 0.01$).

Conclusion: Although the new pCDNA/MDA-7.iNGR plasmid expressed iNGR-fused MDA-7 protein efficiently, it could not improve the natural apoptosis property of normal MDA-7.

Keywords: MDA-7, iNGR peptide, Apoptosis, Tumor gene therapy

ساخت سازه پلاسمیدی بیان کننده ژن mda-7 تغییر یافته به وسیله توالی iNGR و ارزیابی آن برای القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده در رده سلول سرطانی کبد

احسان زارع^۱، سید ابراهیم حسینی^۲، قاسم مصیبی^۳، مجید صادقی زاده^۴، طیب هاشم پور^۵، سید یونس حسینی^۶، بهزاد خوانساری نژاد^{۷*}

- ۱- کارشناس ارشد، بخش بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- ۲- دانشجوی دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات کبد و گوارش، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۳- استادیار، بخش بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- ۴- استادیار، بخش ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- استادیار، مرکز تحقیقات عفونی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۶- استادیار، مرکز تحقیقات کبد و گوارش، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۷- استادیار، بخش میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، شیراز، کدپستی: ۷۱۳۴۸۴۵۷۹۴، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات کبد و گوارش
Email: Hosseinisy22@yahoo.com

**آدرس نویسنده مسئول: ایران، اراک، کدپستی: ۳۸۱۹۶۹۳۳۴۵، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، بخش میکروب شناسی
Email: khansarinajade@gmail.com

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۳/۰۳

دریافت مقاله: ۹۴/۱۰/۱۶

چکیده

هدف: ژن mda-7/IL-24 یک ژن سرکوبگر تومور است. پپتید iNGR با گرایش به اینترگرین های سطح سلول سرطانی در هدفمندسازی عوامل درمانی علیه سلول های توموری به کار گرفته شده است. هدف این مطالعه ساخت ژن mda-7/IL-24 متصل به پپتید iNGR و مقایسه فعالیت آن با ژن طبیعی است.

مواد و روش ها: در ابتدا، mda-7 با استفاده از روش PCR تکثیر یافت. آغازگر برگشت حاوی توالی پپتید iNGR بود تا این توالی در انتهای ژن mda-7 ایجاد شود. توالی ژن تغییر یافته mda7/iNGR و mda7 (کنترل) در ناقل بیانی یوکاریوتی pCDNA3.1 دودمان سازی شدند. با استفاده از روش های هضم آنزیمی، colony-PCR و توالی یابی درستی دودمان سازی، یکپارچگی ناقل ها و توالی آن ها ارزیابی شد. با استفاده از لیپوفکتامین سازه ها در سلول های Ad-293 ترانسفکت و توانایی آن ها برای بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از آزمایش الایزا ارزیابی شد. در ادامه، این سازه ها به سلول های HepG2 ترانسفکت و بعد از استخراج mRNA با استفاده از روش Real time PCR بیان ژن های پیش آپوپتوزی Bax و Gadd153 اندازه گیری شد. با رنگ آمیزی Anxin/PI و فلوسیتومتری میزان مرگ برنامه ریزی شده در سلول HepG2 ارزیابی شد.

نتایج: نتایج، درستی و یکپارچگی سازه ها را نشان داد. بیان مناسب و ترشح محصول iNGR. mda-7. با کنترل آن یعنی mda-7 در سوپ رویی قابل مقایسه بود. نتایج زنده مان نشانگر عدم مفید بودن این تغییر بر پروتئین mda-7 بوده است. بررسی مرگ سلولی برنامه ریزی شده با سنجش بیان ژن و فلوسیتومتری نیز نشان داد که اتصال iNGR به mda-7 بر خاصیت مرگ زایی آن تأثیر کاهنده داشته ولی در مقایسه با گروه کنترل منفی همچنان مرگ زایی معنی داری دارد ($P < 0.01$).

نتیجه گیری: ناقل بیانی pCDNA/Mda-7.iNGR پروتئین mda-7 متصل به iNGR را به طور مناسب بیان کرد ولی بر خاصیت مرگ زایی طبیعی پروتئین تأثیر بهینه ای نداشت.

کلیدواژگان: mda-7، iNGR، مرگ سلولی، ژن درمانی تومور

مقدمه

درمانی با استفاده از سیتوکین ها شود [۴، ۵]. افزودن توالی RGD توسط محققان حاضر در مطالعه اخیر نشان گر تأثیر مثبت این توالی در میزان مرگ زایی پروتئین mda-7 بوده است [۶]. مطالعات بیشتر اما نتایج دیگری را از عدم مفید بودن هدفمندی با پپتید نشان داده است که البته همه با پپتید RGD انجام شده است [۷، ۸]. پپتید iNGR به عروق تومور و اینتگرین های (Integrins) ویژه مخصوص تومور متصل می شود و به میزان بیشتری نسبت به پپتیدهای RGD وارد بافت توموری می شود. توالی متصل شونده به تومور در این پپتید جدید توالی NGR (Asn_Gly_Arg) است که به CD13 اندوتلیالی که یک آنزیم درگیر در رشد تومور و رگ زایی است متصل می شود [۹]. با این فرض که افزودن توالی رمزگذار دنباله پپتیدی iNGR به ژن mda-7 در افتراق نواحی توموری از نواحی معمولی و ورود محصول ژن به بافت تومور مؤثر خواهد بود و باعث بهبود هدفمندی آن به نواحی توموری می شود، طراحی و تولید سازه بیانی تولیدکننده پروتئین mda-7 متصل به iNGR انجام شد و قابلیت بیان پروتئین نو ترکیب توسط این سازه بررسی شد. در نهایت کارآمدی ژن تغییر یافته در سرکوب سلول سرطانی HepG2 با کارآمدی عملکرد ژن فاقد تغییر مقایسه شد. چنین محصولی به ما این امکان را خواهد بخشید که به بررسی بیشتر این پروتئین تغییر یافته در برون تن و درون تن پردازیم.

مواد و روش ها

انجام PCR و دودمان سازی ژن mda-7

پلاسمید بیانی mda-7 مادر از محققین مشغول به کار در این زمینه تهیه شد [هدیه از خانم دکتر استیفانی کریس (Dr. Stephanie Kreis)] که قبلاً در مقاله دیگری به آن اشاره شده است [۷]. پلاسمید در مقیاس مینی پرپ (Miniprep)

mda-7 (melanoma differentiation associated gene-7) یا ایتترلوکین ۲۴ (IL-24: Interleukin 24) عضوی از خانواده سیتوکین های ۱۰ (Cytokines 10) (IL-10, IL-19, IL-22 و IL-26)، نخستین بار در سال ۱۹۹۵ با روش دورگه سازی (Hybridization) افتراقی در سلول های ملانومایی کشف شد [۱]. IL-24/mda-7 بیشتر در بافت های مرتبط با سیستم ایمنی به خصوص در منوسیت ها و همین طور کراتینوسیت ها (Keratinocytes) بیان می شود. جایگاه ژنومی، مشابهت توالی پروتئینی و فراساختارهای پروتئینی به علاوه الگوهای بیانی آن در مقایسه با سیتوکین های خانواده IL-10 منجر به تغییر نام mda-7 به ایتترلوکین ۲۴ شد و این ژن به عنوان عضو جدیدی از خانواده سیتوکین های IL-10 معرفی شد [۱، ۲].

افزایش بیان mda-7/IL-24 با استفاده از ناقل بیانی یا ویروس نو ترکیب باعث مهار رشد و مرگ برنامه ریزی شده (Apoptosis) سلول های توموری مختلف از جمله پوست، پروستات (Prostate)، سینه، سیستم عصبی مرکزی، رحم، روده بزرگ (Colorectal) و ریه می شود [۳].

مسیرهای پیام رسانی و مولکول های پیامبر سلولی از جمله کاسپازها (Caspases)، پروتئین کیناز R وابسته به RNA (Protein Kinase R: PKR)، پروتئین کیناز فعال شونده با میتوز (Mitogen-activated protein kinases: MAPK) و ۳ کیناز فسفاتیدیل اینوزیتول (phosphatidylinositol-3-kinases) و استرس شبکه اندوپلاسمی [Endoplasmic stress (ER) Reticulum]، به دنبال بیان mda-7/IL-24 در سلول سرطانی فعال می شوند و با القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی باعث سرکوب تومور می شوند [۱].

استفاده از پپتیدهای مشخصی مثل RGD (Arg-Gly Asp) (Arginylglycylaspartic acid) و NGR (CRNGRGPDC) در اشکال مختلف می تواند سبب بهبود ژن

تهیه و استخراج شد. لازم به ذکر است تمامی مراحل این پژوهش در کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی با کد ۹۲-۱۶۰-۱۸ تصویب شد.

در ابتدا توالی mda-7 با واکنش زنجیره‌ای پلیمر از (Polymerase chain reaction: PCR) تکثیر شد. آغازگر (Primer) برگشت حاوی توالی کدکننده پپتید iNGR بود که به منظور ساخت این توالی در انتهای ژن طراحی شد. PCR با استفاده از توالی‌های آغازگر رفت و برگشت (جدول ۱) با ۳۰ چرخه مطابق برنامه زمانی (جدول ۲) انجام گرفت. سپس محصول PCR به وسیله ژل الکتروفورز ۱ درصد تحلیل شد و در پی آن محصول PCR خالص‌سازی شد. سپس محصول PCR تخلیص شده و ناقل pCDNA3.1 با آنزیم‌های محدودکننده EcoRV و XhoI هضم آنزیمی شدند (Fermentase، لیتوانی). محصول هضم آنزیمی ناقل و قطعه

تکثیر یافته با کیت استخراج ژل خالص‌سازی شدند. سپس قطعه mda-7.iNGR خالص شده در ناقل هضم شده تخلیص یافته pCDNA 3.1 با استفاده از آنزیم T4 DNA لیگاز الحاق شد (Fermentase، لیتوانی) و ۲۰۰ نانوگرم از محصول الحاق با روش شیمیایی در باکتری میزبان اشریشیا کلی (*Escherichia coli: E. coli*) سویه DH5α ترانسفورم شدند.

باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین (Ampicillin) غربال شدند. سپس برای تأیید دودمان‌سازی تعدادی از کلونی‌ها به صورت تصادفی انتخاب شدند و به عنوان الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت (colony-PCR) بررسی شدند. درستی دودمان‌سازی و یکپارچگی ناقل‌ها با توالی‌یابی ناقل با استفاده از آغازگرهای رفت (جدول ۱) بررسی شد.

جدول ۱ توالی آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر mda-7 و mda-7.iNGR

5'-CCCCGATATCGCCATGAATTTTCAACAGAG-3	توالی آغازگر رفت Mda-7 و Mda-7.iNGR
**5'AAACTCGAGTCAGCCGCTGCCGCCGAGCTTGTAGAATTTCTGCATC-3	توالی آغازگر برگشت Mda-7
***5'AAACTCGAGTCAGCAGTCGGGGCCCCGGCCGTTCGGCAGCCGCTGCCGCCGAGCTTGTAGAATTTCTGCATC-3	توالی آغازگر برگشت Mda-7.iNGR

*توالی مشخص شده با خط زیرین جایگاه برش آنزیم محدودگر EcoRV است.

**توالی مشخص شده با خط زیرین جایگاه برش آنزیم محدودگر XhoI است.

***توالی مشخص شده با خط زیرین پیوسته جایگاه برش آنزیم محدودگر XhoI و توالی مشخص شده با خط زیرین منقطع کدکننده پپتید iNGR است.

جدول ۲ برنامه زمانی PCR برای تکثیر قطعات mda-7 و mda-7.iNGR

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد تکرار
واسرشتگی اولیه (Primary Denaturation)	۹۵	۵ دقیقه	۱
واسرشتگی	۹۵	۳۰ ثانیه	
اتصال (Annealing)	۵۸	۳۰ ثانیه	۳۰
بسط (Extension)	۷۲	۵۰ ثانیه	
بسط نهایی (Final Extension)	۷۲	۵ دقیقه	۱

آزمون الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent

(assay: ELIZA

بعد از کشت سلول های Ad-293 و ترانسفکشن ناقل های pCDNA3.1/Mda-7، pCDNA3.1/iNGR و pCDNA3.1/Mda-7 (کنترل منفی) محیط رویی سلول ها پس از ۴۸ ساعت جمع آوری شدند و با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس غلظت mda-7 در مایع رویی سلول های Ad-293 با استفاده از کیت الایزای سنجش IL-24 انسانی (eBioscience Inc.) ایالات متحده آمریکا) طبق دستورالعمل ارایه شده انجام شد. این آزمایش سه بار به طور مستقل انجام گرفت.

تکنیک Real-Time PCR

بیان GADD153 و Bax با استفاده از روش real-time PCR ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن سلول های HepG2 با هریک از سازه های pCDNA3.1/Mda-7، pCDNA3.1/Mda-7 و 7.iNGR انجام گرفت. به طور خلاصه، RNA تام سلول با استفاده از محلول استخراج RNA، TRIzol، استخراج شد (سیناژن، ایران) و رونویسی معکوس با استفاده از کیت Invitrogen (آمریکا) انجام گرفت. پس از ساخت cDNA از نمونه های RNA استخراج شده بیان mRNA ژن های Bax، GADD153 و PGK به عنوان ژن کنترل داخلی در دو گروه مداخله و کنترل با استفاده از تکنیک و با کمک آغازگرهای جدول ۳ سنجش شد. Real-Time PCR سنجش شد (Maxima SYBR Green، Fermentase، لیتوانی). بیان نسبی با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد. در این مطالعه برای تحلیل آماری از نرم افزارهای Exel، Graf pad prims استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون های Real-Time PCR با استفاده از آزمون آماری ANOVA (Analysis of variance) و با مقایسه

کشت سلولی و ترانسفکشن

رده سلولی Ad-293 و HepG2 از انستیتو پاستور خریداری شد و در محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) غنی شده با سرم گوساله ۱۰ درصد کشت داده شد. سلول Ad-293 به منظور بررسی قابلیت بیان سازه های نو ترکیب استفاده شد. از طرف دیگر؛ برای مقایسه اثر مرگ زایی ژن های mda-7 و mda-7/IL-24 رده سلولی HepG2 که یک رده سرطانی کبدی است به کار گرفته شد. سلول های مورد استفاده در این آزمایش سه تا شش پاساژ داده شدند. برای ترانسفکشن نمودن ناقل ها به درون سلول از محلول لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipofectamine 2000) (Invitrogen Inc، آمریکا) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده عمل شد. در کنار ناقل های pc/mda-7 و pc/mda-7/iNGR از ناقل بدون ژن و همچنین پلاسمید CAG-GFP به منظور بررسی و کنترل ترانسفکشن استفاده شد.

آزمون زنده مانی سلول

از آزمون MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] برای بررسی قابلیت زیست سلول های Ad-293 و HepG2 استفاده شد. به طور معمول 5×10^3 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه رشد داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، ترانسفکشن pCDNA3.1/Mda-7، pCDNA3.1/Mda-7/iNGR و 7، pCDNA3.1 انجام شد. پس از ۲۴ ساعت ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (۰/۵ درصد) به محیط افزوده شد و ۴ ساعت انکوبه شد. ۱۵۰ میکرولیتر محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه شد تا محصول فورمازان (Formazan) را حل کند. جذب محلول رنگی در طول موج ۵۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. کل آزمایش ها سه بار انجام شد.

میانگین داده‌ها تحلیل شد.

بافر اتصال ۱x افزوده شد. در ادامه ۵ میکرولیتر از آنکسین V کونژگه با فلوروکروم (Fluorochrome-conjugated annexin v) به ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی اضافه شد. به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و سپس سلول‌ها با بافر اتصال ۱x شسته شدند و ۲۰۰ میکرولیتر از بافر اتصال ۱x به آن اضافه شد. ۵ میکرولیتر از محلول رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یدید (Propidium iodide) اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از فلووسیتومتری سلول‌های رنگ‌آمیزی شده شمارش شدند. تحلیل نهایی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Flowjo انجام گرفت.

سنجش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده

سنجش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده با استفاده از کیت Annexin V Apoptosis Detection برای رنگ‌آمیزی سلول‌های HepG2 ترانسفکت شده با pCDNA3.1/Mda-7، iNCR و pCDNA3.1 انجام گرفت. سلول‌ها یک بار با PBS (Phosphate-buffered saline) و سپس یک بار با بافر اتصال ۱x (Binding Buffer) شسته شدند. سپس به غلظت نهایی 3×10^6 در میلی‌لیتر از سلول‌ها،

جدول ۳ توالی آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر GADD153، Bax و PGK

توالی (5' → 3')	
GCCCTTTTGCTTCAGGGTTTCA	BAX F1
CAGCTTCTTGGTGGACGCAT	BAX R1
CACCTCCTGGAAATGAAGAGGAAG	GADD153 F
GAGGTGCTTGTGACCTCTGC	GADD153 R
TAAAGCCGAGCCAGCCAAAA	PGK1 F1
CTCCTACCATGGAGCTGTGG	PGK R1

نتایج

pCDNA3.1 Mda-7، pCDNA3.1 Mda- و pCDNA3.1 iNCR و ناقل خالی pCDNA3.1 (کنترل) به ترتیب حدود ۲۴ درصد، ۲۳ درصد و ۱۱ درصد ارزیابی شد (شکل ۳). ناقل‌های pCDNA3.1 Mda-7، pCDNA3.1 Mda- و pCDNA3.1 iNCR به منظور بررسی میزان بیان نیز با استفاده از لیپوفکتامین به سلول‌های Ad-293 ترانسفکت شدند. بعد از ۴۸ ساعت، مایع رویی سلول‌ها برداشت و با روش الایزای اختصاصی بررسی شدند. نتایج ELISA نشان‌دهنده بیان mda-7 در مقادیر ۸ و ۷ نانوگرم/میلی‌لیتر به ترتیب توسط ناقل‌های نوترکیب pCDNA3.1-Mda-7-iNCR و pCDNA3.1-Mda-7 بودند که در مقایسه با بیان سلول‌های گروه کنترل (ترانسفکت شده با pCDNA3.1) کمتر از ۰/۵ نانوگرم/میلی‌لیتر بسیار بیشتر بود. تکرار آزمایش و بررسی آماری

pCDNA3.1 به عنوان ناقل بیانی برای بیان توالی Mda-7، iNCR در سلول‌های یوکاریوت انتخاب شد. پس از هضم آنزیمی قطعات تکثیر یافته و تخلیص شده Mda-7 و Mda- iNCR در ناقل بیانی هضم شده pCDNA3.1 دودمان‌سازی شد. برای تأیید همسان‌سازی Colony-PCR انجام شد (شکل ۱). همچنین درستی دودمان‌سازی و یکپارچگی ناقل‌ها با توالی‌یابی ناقل تأیید شد (شکل ۲).

نتایج بررسی زنده مانی با استفاده از آزمون MTT نشان داد که میزان مرگ در سلول‌های ۲۹۳ پس از ترانسفکشن ۲۴ ساعته با پلاسمیدهای نوترکیب در مقایسه با گروه پلاسمید خالی از لحاظ آماری با یکدیگر تفاوت دارند ($P < 0.05$). میزان مرگ و میر در سلول‌های ترانسفکت شده با ناقل‌های نوترکیب

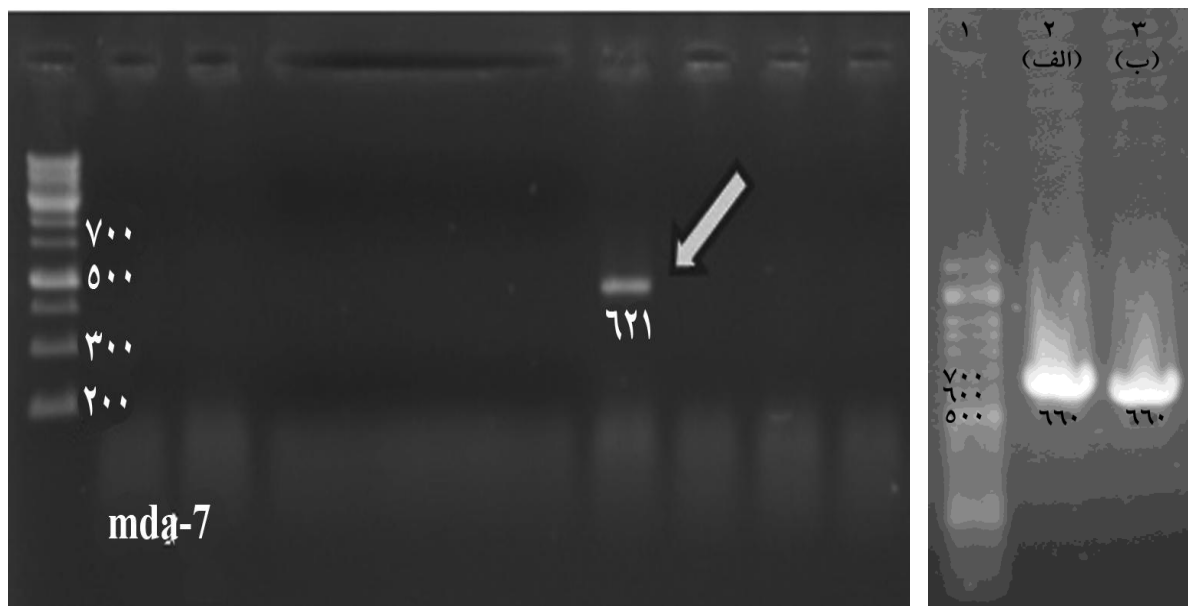
سازه پلاسمیدی بیان کننده ژن mda-7 تغییر یافته بوسیله توالی iNGR

تحلیل آماری نتایج نشان از آن داشت که افزایش بیان ژن‌های القاگر مرگ سلولی Gadd153 و Bax ناشی از القای سازه‌های نوترکیب به طور معنی‌داری نسبت به القای حاصل از سازه pCDNA3.1 تفاوت دارد با این وجود افزایش بیان ژن‌های القاگر مرگ سلولی Gadd153 و Bax ناشی از القای سازه‌های pCDNA3.1/Mda-7 و pCDNA3.1/Mda-7 iNGR یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد.

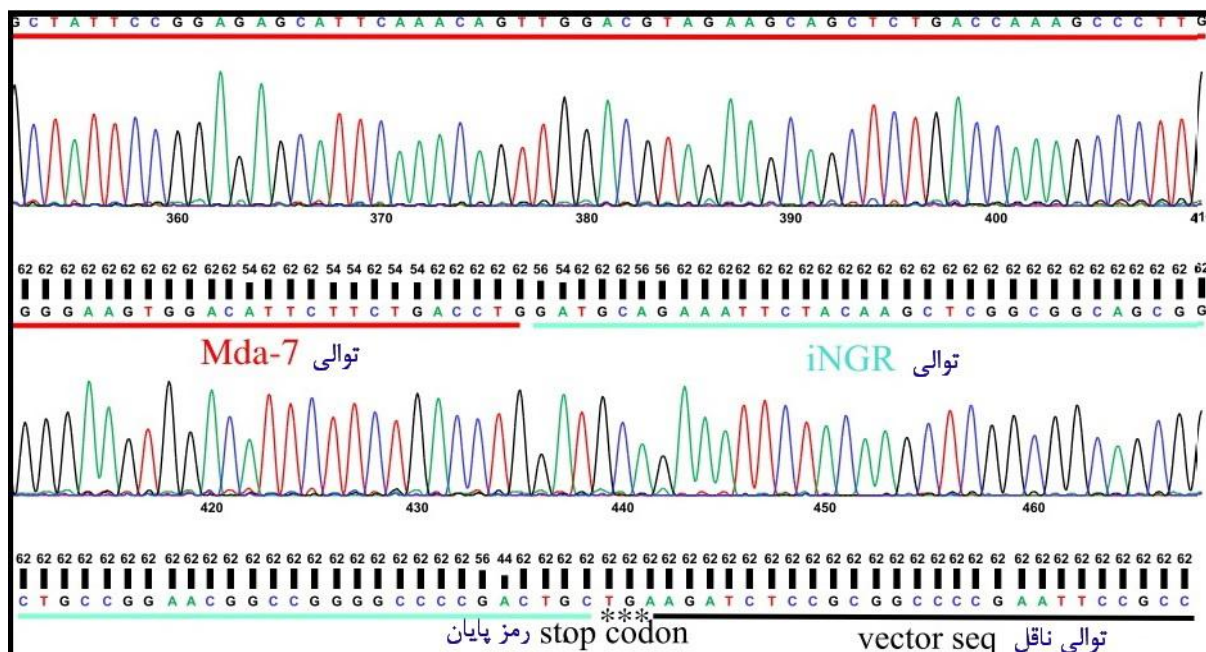
نتایج سنجش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نیز در تأیید القای ژن‌های القاگر مرگ سلولی نشان دهنده آن است که افزایش بیان موقت ژن‌های mda-7 و mda-7 iNGR مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های سرطانی HepG2 را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد ولی القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ایجاد شده توسط هریک از آن‌ها تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد (شکل ۶).

تأیید کننده معنی‌دار بودن تفاوت بیان القا شده با هریک از ناقل‌های بیانی نوترکیب نسبت به ناقل بیانی فاقد ژن mda-7 بود. از طرفی بیان القا شده با ناقل نوترکیب حاوی ژن تغییر یافته Mda-7 iNGR با بیان القا شده با ناقل نوترکیب حاوی ژن بدون تغییر mda-7 تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌داد (شکل ۴).

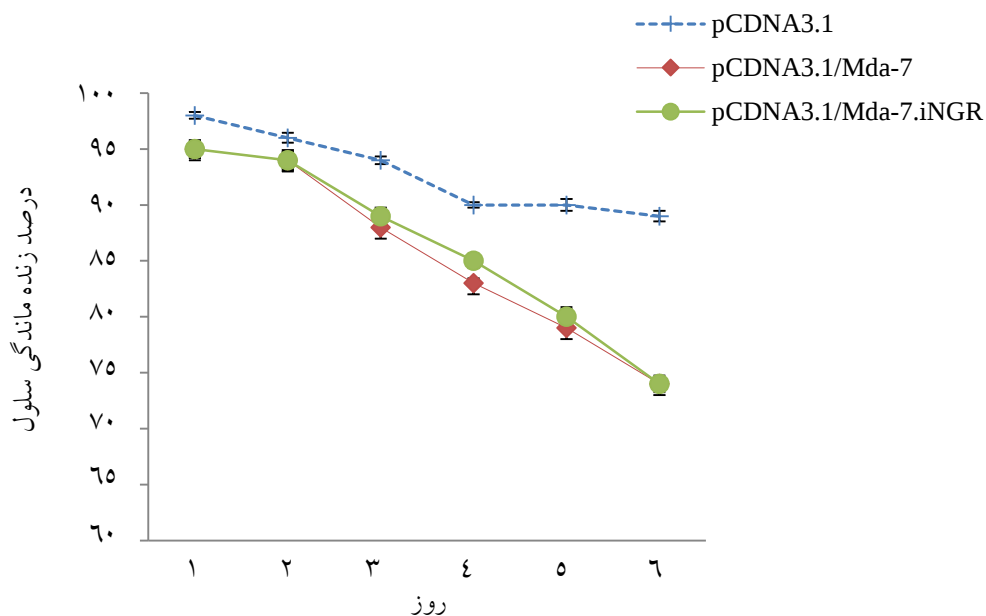
بررسی بیان ژن‌های القاگر مرگ سلولی در سلول‌های ترانسفکت شده با هریک از سازه‌های pCDNA3.1/Mda-7، pCDNA3.1/Mda-7 iNGR و pCDNA3.1 نشان داد که سازه‌های pCDNA3.1/Mda-7 و pCDNA3.1/Mda-7 iNGR به‌طور مشهود موجب افزایش بیان ژن‌های القاگر مرگ سلولی Gadd153 و Bax در رده سرطانی HepG2 می‌شوند و چنانچه انتظار می‌رود سازه pCDNA3.1 تأثیری بر بیان ژن‌های القاگر مرگ سلولی Gadd153 و Bax در سلول‌های سرطانی HepG2 ندارد (شکل ۵). تکرار آزمایش و



شکل ۱ colony-PCR برای بررسی وجود قطعات نوترکیب Mda-7 iNGR (۶۶۰ جفت باز) (راست) و Mda-7 (۶۲۱ جفت باز) (چپ) در کلونی‌های حاصل از ترانسفورم ناقل‌های نوترکیب pCDNA3.1-Mda-7 و pCDNA3.1-Mda-7 iNGR و غربال شده با محیط انتخابی حاوی آمپی‌سیلین انجام شد.

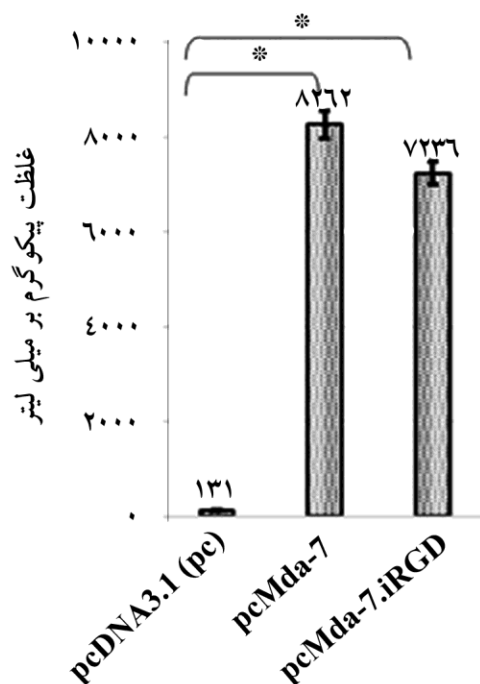


شکل ۲ تأیید توالی Mda-7.iNGR و حفظ چهارچوب صحیح خوانش در پیوستگی با توالی ناقل بیانی

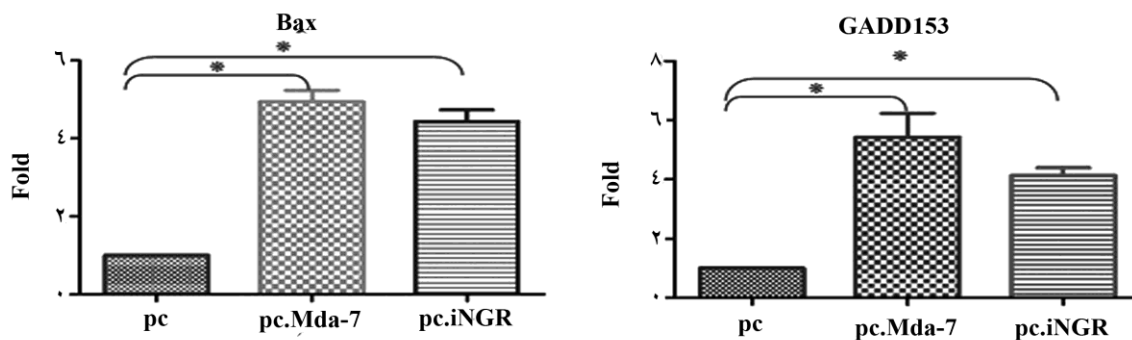


شکل ۳ بررسی زنده ماندگی سلول های HepG2 ترانسفکت شده با pCDNA3.1/Mda-7 و pCDNA3.1/Mda-7.iNGR در بازه زمانی شش روز با استفاده از آزمون MTT

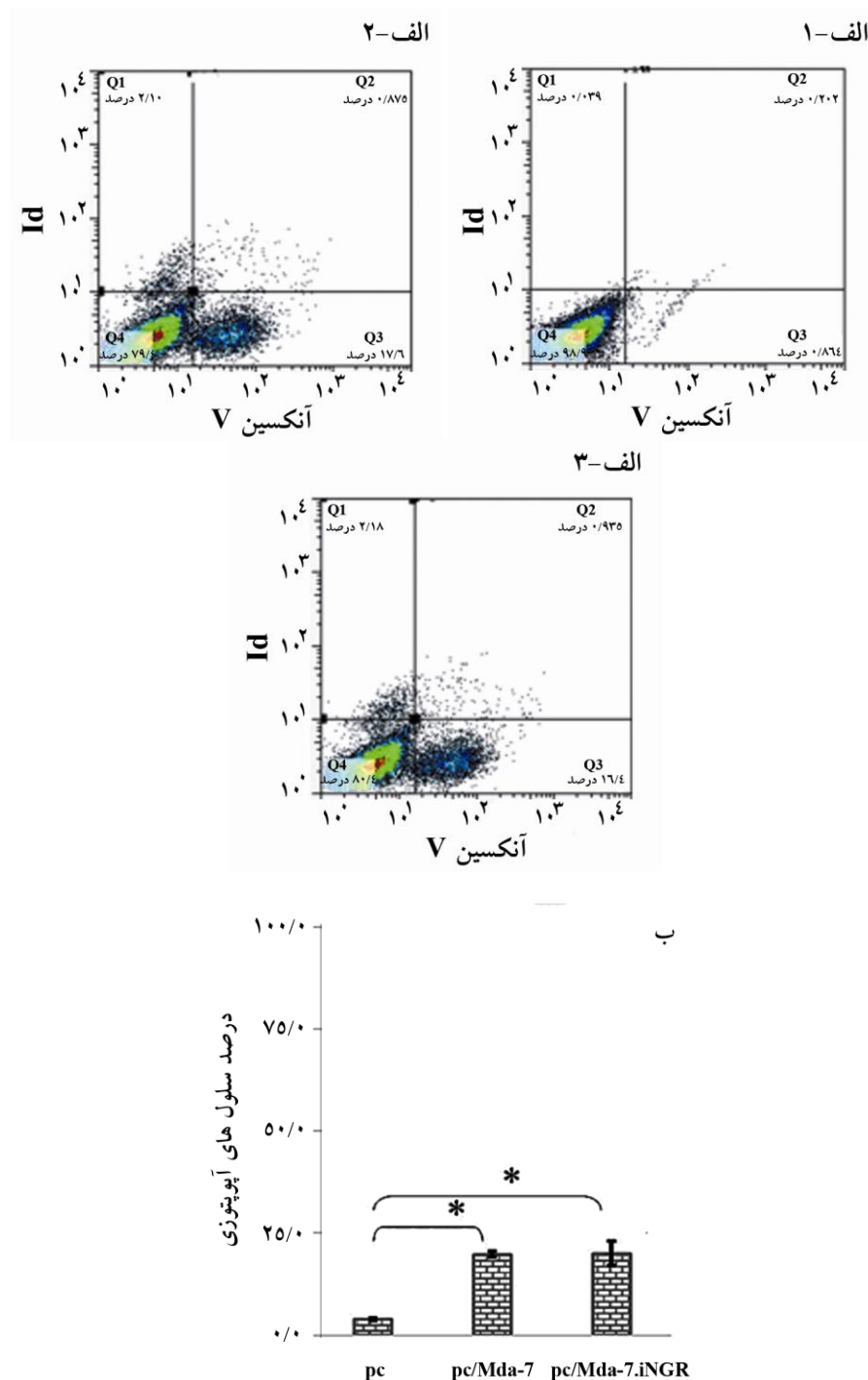
سازه پلاسمیدی بیان کننده ژن mda-7 تغییر یافته بوسیله توالی iNGR



شکل ۴ بررسی بیان ناقل های نو ترکیب pCDNA3.1/Mda-7 و pCDNA3.1/Mda-7.iNGR با انجام آزمایش اختصاصی ELISA علیه پروتئین Mda-7. اعداد بالای هر ستون میانگین غلظت پروتئین mda-7 بر حسب پیکوگرم/میلی لیتر را در سوپ روی سلول های Ad-293 ترانسفکت شده با هریک از ناقل های نو ترکیب pc/Mda-7 و 7.iNGR نشان می دهد. ناقل خالی pCDNA3.1 به عنوان کنترل آزمایش استفاده شده است. نوار خطا در بالای هر ستون معرف انحراف معیار سه آزمایش غیر وابسته است. علامت ستاره معنی دار بودن تفاوت دو گروه را در مقایسه با هم نشان می دهد.



شکل ۵ مقایسه افزایش بیان GADD153 و Bax در رده های سرطانی HepG2 ترانسفکت شده با ناقل های بیانی حاوی Mda-7 و Mda-7.iNGR نسبت به کنترل آزمایش [بیان ژن در سلول های ترانسفکت شده با ناقل pcDNA 3.1 (pc)]. هر ستون میانگین سه آزمایش مستقل است و نوار خطا در بالای هر ستون معرف انحراف معیار سه آزمایش غیر وابسته است. علامت ستاره معنی دار بودن تفاوت دو گروه را در مقایسه با هم نشان می دهد.



شکل ۶ (الف) سنجش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های سرطانی HepG2 به دنبال انتقال پلاسمیدها؛ الف-۱) گروه کنترل ترانسفکت شده با ناقل pcDNA 3.1، الف-۲) گروه ترانسفکت شده با پلاسمید بیانی Mda-7 و الف-۳) گروه ترانسفکت با پلاسمید بیانی Mda-7.iRGD. ناحیه Q2+Q3 درصد سلول‌های با مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را نشان می‌دهد. (ب) مقایسه میانگین درصد سلول‌های توموری با مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را در گروه‌های ترانسفکت شده با سازه‌های بیانی pc/Mda-7، pc/Mda-7.iNGR و ناقل کنترل pcDNA3.1 نشان می‌دهد. هر ستون میانگین سه آزمایش مستقل است و نوار خط در بالای هر ستون معرف انحراف معیار سه آزمایش غیر وابسته است. علامت ستاره معنی‌دار بودن تفاوت دو گروه را در مقایسه با هم نشان می‌دهد.

بحث

در حال حاضر ژن پروتئین mda-7/IL-24 با توانایی مهار رشد و القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده اختصاصی سلول های سرطانی، افزایش پاسخ ایمنی علیه تومور، نشان دادن خصوصیات ضد رگ زایی و تقویت درمان های شیمی درمانی سرطان به عنوان یک ژن پروتئین سرکوبگر تومور در درمان سرطان بسیار مورد توجه است [۲، ۱۰-۱۲].

استفاده از پپتیدها در درمان سرطان دستاوردی جدید و نوید بخش است. به کارگیری پپتیدها برای اتصال و هدایت پروتئین های درمان گر به جایگاه تومور می تواند با هدف گیری بهتر پروتئین درمان گر به سرکوب تومور کمک کند [۵، ۱۳-۱۵]. پپتیدهایی همانند NGR و RGD می توانند دارو را به سمت تومور سوق دهند و کارایی درمان را افزایش دهند. لی (Lei) و همکارانش از یک اکتین ۱۵ کیلو دالتونی تغییر یافته استفاده کردند که به پپتید NGR متصل می شد و آن نیز وارد تومور یا عروق توموری می شد [۱۵]. در این تحقیق مشخص شد که این پپتید می تواند با اتصال به داربست سلولی و اثر بر روی عملکرد داربست سلولی مرگ برنامه ریزی شده سلول های HepG2 و HeLa را القا کند. در مطالعه دیگر، پی (Pei) و همکارانش با جایگزینی اسید آمینه گلاپسین مابین اسید آمینه های آرژنین و اسید گلوتامیک در توالی IL-24 و ایجاد RGD در آن کشف کردند که این تغییر، عملکرد القا مرگ برنامه ریزی شده سلول های توموری توسط RGD-IL-24 را افزایش می دهد، با این وجود بر عدم عملکرد آن بر سلول های طبیعی تأثیری نمی گذارد [۱۶]. این امر در مورد پروتئین mda-7 در چند مطالعه دیگر بررسی شد و نتایج مناسبی ایجاد شد [۵، ۶، ۱۶].

برای رسیدن به سلول های توموری و سلول های پارانشیمی مرتبط با تومور، داروها باید از سد عروقی عبور کنند و وارد بستر توموری شوند. هدفمندسازی پروتئین های درمان گر به بستر تومور با کمک پپتیدهای هدف گیری مثل iNGR و RGD می تواند به تغلیظ پروتئین در جایگاه توموری و ایجاد آثار درمانی بیشتر در این موضع کمک نماید [۱۳].

در مطالعه کنونی با هدف بهبود عملکرد ژن mda-7 برای سرکوب تومور، طراحی و تولید ناقل بیانی pCDNA3.1-Mda-7.iNGR انجام شد. پلاسمید pCDNA3.1 در آزمایش های بسیاری استفاده شده است و کارایی این پلاسمید به مانند این پروژه مورد مطلوب بوده است. نتایج بیان گر درستی توالی و تمامیت ناقل نو ترکیب و همچنین درستی جهت ژن mda-7 بود. همچنین نتایج بررسی حاضر نشان داد که در سلول های Ad-293 که پلاسمیدهای pCDNA3.1-Mda-7 و pCDNA3.1-Mda-7.iNGR ترانسفکت شده بودند بیان mda-7 به طور قابل ملاحظه ای نسبت به گروه کنترل (سلول های ترانسفکت شده با pCDNA3.1) افزایش یافته بود. نکته مهم اینکه افزودن یک توالی iNGR به انتهای این پروتئین هیچ تغییر قابل توجهی در میزان تولید پروتئین نو ترکیب به همراه نداشت. این موضوع بیان گر این است که توالی اخیر نمی تواند در انتقال، ترشح و درستی تولید پروتئین نو ترکیب نهایی اختلالی ایجاد کند.

توالی پپتیدی iNGR به انتهای پروتئین مرگ زای mda-7 در سلول های HepG2 هیچ تأثیر سویی بر میزان بیان و ترشح آن نگذاشته و همچنین این پروتئین نیز روی سلول های طبیعی ۲۹۳ نیز خاصیت مرگ زایی ندارد. در مجموع افزودن توالی پپتیدی iNGR به انتهای پروتئین مرگ زای Mda-7 طبق نتایج فلوسیتومتری و Real-time PCR باعث افزایش خاصیت مرگ زایی این پروتئین نشد. این موضوع بایستی در محیط کامپیوتری مجدد بررسی شود تا علت این مشکل روشن شود. به طور خلاصه، این مطالعه نشان می دهد که همیشه افزودن توالی پپتیدی در انتهای یک پروتئین مناسب کار ایمنی درمانی با سیتوکین ها نبوده و حتماً نیاز به بررسی بیشتری دارد. بایستی اذعان داشت که همیشه افزودن توالی پپتیدی برای اهداف هدفمندسازی پروتئین مناسب درمان نیست و گاهی می تواند حتی باعث اختلال در عملکرد طبیعی آن نیز شود. در همین راستا استفاده از پپتیدهای دیگر برای افزایش میزان مرگ سلولی برنامه ریزی شده توسط mda-7 با مطالعه قبلی کامپیوتری و

مدل سازی و با دیگر پیوندهای هدفمندکننده توصیه می شود. البته استفاده از همین پیوند نیز در نقاط دیگری از پروتئین برای بررسی میزان مرگ سلولی برنامه ریزی شده mda-7 نیز به نظر منطقی می رسد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر، مربوط به رساله دانشجویی آقای احسان

زارع در مقطع ارشد بیوتکنولوژی بوده است که بخشی از آن با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اراک و بخش بیشتر آن نیز با حمایت دانشگاه علوم پزشکی شیراز (گرونت شماره 10679) انجام گرفته است. از پرسنل مرکز تحقیقات گوارش و کبد و نیز مرکز تحقیقات عفونی دکتر البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز برای کمک در انجام آزمایش های تحقیقی صمیمانه سپاسگزاریم.

منابع

- [1] Lebedeva IV, Emdad L, Su ZZ, Gupta P, Sauane M, Sarkar D, Staudt MR, Liu SJ, Taher MM, Xiao R, Barral P, Lee SG, Wang D, Vozhilla N, Park ES, Chatman L, Boukerche H, Ramesh R, Inoue S, Chada S, Li R, De Pass AL, Mahasreshti PJ, Dmitriev IP, Curiel DT, Yacoub A, Grant S, Dent P, Senzer N, Nemunaitis JJ, Fisher PB. mda-7/IL-24, novel anticancer cytokine: focus on bystander antitumor, radiosensitization and antiangiogenic properties and overview of the phase I clinical experience (Review). *Int J Oncol* 2007; 31(5): 985-1007.
- [2] Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV, Sauane M, Gopalkrishnan RV, Valerie K, Dent P, Fisher PB. mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(15): 10054-9.
- [3] Dent P, Yacoub A, Hamed HA, Park MA, Dash R, Bhutia SK, Sarkar D, Gupta P, Emdad L, Lebedeva IV, Sauane M, Su ZZ, Rahmani M, Broadus WC, Young HF, Lesniak M, Grant S, Curiel DT, Fisher PB. MDA-7/IL-24 as a cancer therapeutic: from bench to bedside. *Anticancer Drugs* 2010; 21(8): 725-31.
- [4] Ruoslahti E. The RGD story: a personal account. *Matrix Biol* 2003; 22(6): 459-65.
- [5] Xiao B, Li W, Yang J, Guo G, Mao XH, Zou QM. RGD-IL-24, a novel tumor-targeted fusion cytokine: expression, purification and functional evaluation. *Mol Biotechnol* 2009; 41(2): 138-44.
- [6] Hosseini E, Hosseini SY, Hashempour T, Fattahi MR, Sadeghizadeh M. Effect of RGD coupled MDA-7/IL-24 on apoptosis induction in a hepatocellular carcinoma cell line. *Mol Med Rep* 2017; 15(1): 495-501.
- [7] Khodadad M, Hosseini SY, Shenavar F, Erfani N, Bina S, Ahmadian S, Fattahi MR, Hajhosseini R. Construction of expressing vectors including melanoma differentiation-associated gene-7 (mda-7) fused with the RGD sequences for better tumor targeting. *Iran J Basic Med Sci* 2015; 18(8): 780-7.
- [8] Bina S, Shenavar F, Khodadad M, Haghshenas MR, Mortazavi M, Fattahi MR, Erfani N, Hosseini SY. Impact of RGD Peptide Tethering

- to IL24/mda-7 (Melanoma Differentiation Associated Gene-7) on Apoptosis Induction in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(14): 6073-80.
- [9] Craig R, Cutrera J, Zhu S, Xia X, Lee YH, Li S. Administering plasmid DNA encoding tumor vessel-anchored IFN-alpha for localizing gene product within or into tumors. *Mol Ther* 2008; 16(5): 901-6.
- [10] Emdad L, Lebedeva IV, Su ZZ, Gupta P, Sauane M, Dash R, Grant S, Dent P, Curiel DT, Sarkar D, Fisher PB. Historical perspective and recent insights into our understanding of the molecular and biochemical basis of the antitumor properties of mda-7/IL-24. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(5): 391-400.
- [11] Nishikawa T, Ramesh R, Munshi A, Chada S, Meyn RE. Adenovirus-mediated mda-7 (IL24) gene therapy suppresses angiogenesis and sensitizes NSCLC xenograft tumors to radiation. *Mol Ther* 2004; 9(6): 818-28.
- [12] Sieger KA, Mhashilkar AM, Stewart A, Sutton RB, Strube RW, Chen SY, Pataer A, Swisher SG, Grimm EA, Ramesh R, Chada S. The tumor suppressor activity of MDA-7/IL-24 is mediated by intracellular protein expression in NSCLC cells. *Mol Ther* 2004; 9(3): 355-67.
- [13] Assa-Munt N, Jia X, Laakkonen P, Ruoslahti E. Solution structures and integrin binding activities of an RGD peptide with two isomers. *Biochemistry* 2001; 40(8): 2373-8.
- [14] Dickerson EB, Akhtar N, Steinberg H, Wang ZY, Lindstrom MJ, Padilla ML, Auerbach R, Helfand SC. Enhancement of the antiangiogenic activity of interleukin-12 by peptide targeted delivery of the cytokine to alphavbeta3 integrin. *Mol Cancer Res* 2004; 2(12): 663-73.
- [15] Lei H, Cao P, Miao G, Lin Z, Diao Z. Expression and functional characterization of tumor-targeted fusion protein composed of NGR peptide and 15-kDa actin fragment. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 162(4): 988-95.
- [16] Pei DS, Yang ZX, Zhang BF, Yin XX, Li LT, Li HZ, Zheng JN. Enhanced apoptosis-inducing function of MDA-7/IL-24 RGD mutant via the increased adhesion to tumor cells. *J Interferon Cytokine Res* 2012; 32(2): 66-73.