

طراحی یک پرموتر کایمیریک دارای منطقه پرموتری شبیه به پرموتر سوروایوین (Survivin) بهمنظور رونویسی هدفمند در سلول‌های سرطانی سینه

سامیلا فرخی‌منش^۱، فاطمه رهبری‌زاده^{۲*}، عباس کمالی^۳، غلام‌رضا مقدم‌پور^۴

۱- کارشناس 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، گروه لیزر، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- پزشک، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۱۲
پذیرش مقاله: ۸۸/۰۴/۰۸

چکیده

هدف: بزرگترین چالش در ژن‌درمانی سرطان دستیابی به بالاترین درجه اختصاصیت و کارایی در هدف‌گیری سلول‌های سرطانی است. بهدلیل این‌که هدف ژن‌درمانی سرطان ریشه‌کن کردن سلول‌های سرطانی است و بسیاری از ژن‌های درمانی اگر در سلول‌های طبیعی بیان شوند، می‌توانند مضر باشند. استفاده از پرموتر ژن‌هایی که به‌طور اختصاصی در سلول‌های سرطانی بیان می‌شوند یا نسبت به سلول‌های طبیعی بیان بسیار بالاتری دارند، در ژن‌درمانی سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق استفاده از یک پرموتر خاص سرطان با بیان بالا بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در راستای تکثیر و به‌کارگیری پرموتر خاص سرطان به‌منظور ایجاد یک سازه برای مقاصد ژن‌درمانی، با استفاده از Nested-PCR پرموتری از ژنوم انسانی جداسازی شد که در حدود ۳۴ درصد به پرموتر سوروایوین شباهت داشت. سوروایوین یکی از اعضای خانواده ژن‌های خد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است و در بیشتر سرطان‌های سینه افزایش بیان آن مشاهده شده است. این قطعه ژنی براساس بررسی‌های انجام شده در سایت‌های TRRD، Compel، Transfac، EPD، Promoter Scan و RT-PCR نتایج متفاوتی داشت. این رونویسی مشابه با پرموتر سوروایوین بود که به‌وسیله عوامل رونویسی E2F و STAT1 شناسایی می‌شد. این پرموتر به‌همراه بخش‌های پاسخ‌دهنده به شرایط محیطی هیپوكسی و استروژن (ریزمحیط سلول‌های سرطانی سینه) و ژن پیش‌آپوپتوزی *tBid* در ناقل pCDNA3.1/Hygro⁺ کلون شد.

نتایج: نتایج RT-PCR نیمه کمی سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده نشان می‌دهد که این قطعه ژنی (شبه پرموتر سوروایوین) دارای توانایی تقریباً برابر پرموتر CMV برای بیان ژن *tBid* است.

نتیجه‌گیری: استفاده از یک پرموتر کایمیریک در هدایت درمان سرطان است که با القای اختصاصی مرگ برنامه‌ریزی شده در این سلول‌ها به شکلی طبیعی باعث انهدام این سلول‌ها می‌شود. سازه حاصل در مقایسه با دو سازه کنترل، توانایی بالایی در بیان ژن پیش‌آپوپتوزی از خود نشان می‌دهد.

کلیدواژگان: رونویسی هدفمند، پرموتر سوروایوین، ژن پیش‌آپوپتوزی

[مثل هیپوکسی (Hypoxia) و استروژن] که با ریزمحیط سلول‌های طبیعی متفاوت است می‌توان کارایی و اختصاصیت پرموتر ویژه توموری را تعویت و تشدید نمود [۶-۸]. سیستم‌های پرموتری طبیعی دارای محدودیت‌های زیر هستند:

۱- میزان بیان یک ژن درمانی به وسیله یک نوع پرموتر اختصاصی بافت در تمام افراد مبتلا یکسان نیست. ۲- میزان بیان ژن‌های اختصاصی تومور یا بافت حتی در توده سلول‌های توموری متفاوت است که این به سبب ناهمگون بودن سلول‌های سرطانی است. ۳- هیچ پرموتر منفردی وجود ندارد که بتواند در تمام رده‌های سلولی توموری در حد کافی سبب هدایت بیان ژن درمانی شود و به صورت همگانی در تمام بیماران مبتلا به یک نوع سرطان خاص به کار گرفته شود [۹].

این محدودیت‌ها سبب جستجوی راهکارهایی برای بهبود توالی‌های پرموتری شده است که تحت عنوان پرموترهای مهندسی شده معرفی می‌شود. ساده‌ترین بخش این روش، یافتن پرموترهای جهش‌یافته‌ای است که توانایی بیشتری در راهاندازی رونویسی دارند ولی اختصاصیت بافتی - توموری آن‌ها نسبت به پرموتر نوع طبیعی بالاتر است. روش بهتر ایجاد توالی پرموتر - تشدیدگری با کوچک‌ترین اندازه ممکن (پرموتر مرکزی یا هسته پرموتری) است که هنوز ویژگی‌های توالی و حشی را حفظ کرده باشد. راهکار دیگر شامل ساخت پرموترهای کایمیریک (Chimeric promoter) متشکل از عناصر تنظیمی پرموترهای متفاوت با اختصاصیت بافتی است. این روش به دنبال به کارگیری مزایای هر کدام از پرموترها و افزایش اختصاصیت بافتی است [۱۰].

در این تحقیق با در نظر گرفتن دو نکته مهم، طراحی پرموتر کایمیریک صورت گرفت؛ مورد اول نوع بافت منشا تومور و نکته دوم اختصاصات آن بافت از قبیل ریزمحیط توموری بود. بنابراین در راستای ایجاد یک پرموتر کایمیریک که بتواند توده ناهمگون آدنوکارسینومای سینه (Lung adenocarcinome) را هدف قرار داده و ژن

۱- مقدمه

روش‌های مرسوم درمان سرطان مثل شیمی درمانی (Chemotherapy)، اشعه‌درمانی (Radiotherapy) و جراحی، اختصاصیت و کارایی بالایی برای درمان سرطان ندارند. در این میان ژن درمانی (Genetherapy) سرطان با ارائه انواع مختلفی از روش‌های درمانی توجه بسیاری از محققان را به خود معطوف کرده است. هر روش ژن درمانی دارای سه بخش انتخاب ژن درمانی مناسب، ابزار مناسب برای انتقال آن و هدف‌گیری اختصاصی بافت سرطانی مهم‌ترین بخش هر روش ژن درمانی است که آن را از سایر روش‌های درمانی متمایز می‌کند.

سه روش برای هدف‌گیری بافت بدینخیم وجود دارد:

۱- هدف قرار دادن رونویسی (Transcriptional targeting) با توجه به این که بعضی ژن‌ها در سلول‌های سرطانی بیان بالا و اختصاصی دارند، در این استراتژی با استفاده از پرموتر ژن‌های فوق می‌توان بیان ژن درمانی را منحصر به سلول سرطانی کرد.

۲- هدف قرار دادن روش انتقال (Transductional targeting) در این روش با استفاده از مولکول‌های هدف‌گیر در سطح ابزارهای انتقال ژن، می‌توان انتقال ژن درمانی مورد نظر را به سلول‌های سرطانی به صورت هدف‌مند فراهم نمود.

۳- سومین روش درمانی هدف قرار دادن مسیرهای سلولی مرتبط با سرطان است [۲].

بهترین روش هدف‌گیری رونویسی یا به عبارتی استفاده از پرموترهای اختصاصی سرطان است، چون ابتدایی‌ترین سطح بیان ژن است [۳]. پرموترها به چند دسته تقسیم می‌شوند: پرموترهای ویژه بافتی (Tissue specific promoter) پرموترهای ویژه توموری (Tumor specific promoter) و پرموترهای مهندسی شده (Inducible promoter).

در این راستا یافتن ژن‌هایی که در سرطان‌های خاص بیان بالایی پیدا می‌کنند راهکار بسیار مهمی برای استفاده از پرموتر آن‌ها در روش‌های هدف‌گیری بافت توموری ایجاد می‌کند. به علاوه با استفاده از شرایط ریزمحیطی حاکم بر محیط توموری

باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) سوش TG1 (Proapoptotic) را برای القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) در این سلول‌ها بیان کند، بهدلیل انتخاب یک پرموتور ویژه سرطانی بودیم. در این تحقیق پس از بررسی انواع ژن‌هایی که بیان‌شان در آدنوکارسینومای سینه افزایش می‌یابد (با استفاده از برنامه‌های RefExA, Unigene و GEO) پرموتور ژن سوروایوین انتخاب شد.

سوروایوین از اعضای خانواده مهارکنندگان مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Inhibitor of Apoptosis Protein: IAP) است که سبب مهار کاسپازها (Caspases) می‌شود. بیان این ژن در سلول‌های سرطانی سینه تا حدود ۷۰ درصد نسبت به سلول‌های طبیعی افزایش می‌یابد. برای تسهیل درج این قطعه، پرموتور مرکزی این ژن با استفاده از مقالات، مورد استفاده قرار گرفت و به منظور افزایش توانایی و ویژگی این پرموتور از ترکیب شبه هیپوکسی و استروژن (به عنوان قطعات تشیدیدگر) در ساختار نهایی پرموتور کایمیریک استفاده شد. از آنجایی که هیچ پرموتور منفرد وجود ندارد که در تمام سلول‌های توده ناهمگون آدنوکارسینومای سینه بیان شود، در این تحقیق هدف اصلی طراحی یک پرموتور کایمیریک یا چند اختصاصیتی بوده که اگر در یک سلول توموری امکان بهره‌وری از یک اختصاصیت پایین بود، اختصاصیت دیگر کمک به بیان ژن درمانی نماید.

۲-۲- ساخت سازه

۱-۲-۲- تخلیص mRNA و ساخت cDNA

۱۰ میلی لیتر خون انسانی به صورت استریل گرفته شد و با محلول ضدانعقاد (Ethylenediaminetetraacetic acid) EDTA محلوط شد. سلول‌های لنفوцит خون محیطی در شرایط استریل با استفاده از محلول فایکول (Ficoll) تخلیص شد. استخراج RNA از سلول‌های لنفوцит به‌وسیله کیت NucleoSpin RNA II شرکت MN (آلمان) صورت گرفت و سپس cDNA با استفاده از آنزیم رونویسی معکوس M-MuLV و الیگومن ۱۹ تایی (dT) از شرکت Fermentas (آلمان) صورت گرفت.

۲-۲-۲- جداسازی DNA ژنومی

از رده سلولی Hela و لنفوцит‌های انسانی که قبلاً جداسازی شده بودند، به عنوان منبع ژنومی برای تکثیر قطعه ژنی شبه پرموتور سوروایوین (Survivin-like promoter) استفاده شد [۱۱] و با استفاده از کیت Tissue NucleoSpin[®] (شرکت MN) تخلیص شدند.

۳-۲- تکثیر و کلونینگ قطعات ژنی

۱-۳-۲- تکثیر و کلونینگ ژن tBid

ژن tBid (7۳۲ تا ۳۲۲) جفت باز از ژن *Bid* با استفاده از الگوی cDNA و آغازگرهای (Primers) جلویی و برگشتی

پیش‌آپوپتوزی (tBid) Proapoptotic را برای القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) در این سلول‌ها بیان کند، بهدلیل انتخاب یک پرموتور ویژه سرطانی بودیم. در این تحقیق پس از بررسی انواع ژن‌هایی که بیان‌شان در آدنوکارسینومای سینه افزایش می‌یابد (با استفاده از برنامه‌های RefExA, Unigene و GEO) پرموتور ژن سوروایوین انتخاب شد.

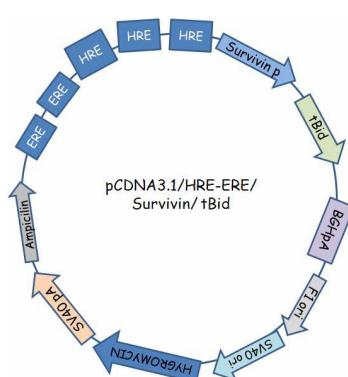
سوروایوین از اعضای خانواده مهارکنندگان مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (IAP) است که سبب مهار کاسپازها (Caspases) می‌شود. بیان این ژن در سلول‌های سرطانی سینه تا حدود ۷۰ درصد نسبت به سلول‌های طبیعی افزایش می‌یابد. برای تسهیل درج این قطعه، پرموتور مرکزی این ژن با استفاده از مقالات، مورد استفاده قرار گرفت و به منظور افزایش توانایی و ویژگی این پرموتور از ترکیب شبه هیپوکسی و استروژن (به عنوان قطعات تشیدیدگر) در ساختار نهایی پرموتور کایمیریک استفاده شد. از آنجایی که هیچ پرموتور منفرد وجود ندارد که در تمام سلول‌های توده ناهمگون آدنوکارسینومای سینه بیان شود، در این تحقیق هدف اصلی طراحی یک پرموتور کایمیریک یا چند اختصاصیتی بوده که اگر در یک سلول توموری امکان بهره‌وری از یک اختصاصیت پایین بود، اختصاصیت دیگر کمک به بیان ژن درمانی نماید.

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- مواد

رده‌های سلولی انسانی MCF-7 (رده سلولی آدنوکارسینومای سینه)، SKBR-3 (رده سلولی آدنوکارسینومای سینه)، سلول‌های Hela (رده سلولی سرطان دهانه رحم) و AGO (رده سلولی غیرتوموری فیبروبلاست پوست) از بانک سلول انسیتو پاستور ایران خریداری شد.

دومین واکنش PCR با استفاده آغازگرهای Sur2-for و Sur2-rev روی محصول PCR اول صورت گرفت.
 Sur2-for: 5'-ATCGAAGCTTCTCAAAGTGTGGGATTAC-3'
 Sur2-rev: 5'-ATAGGGATCCACGTCGGGGCAC-3'
 آغازگرهای Sur2-for و Sur2-rev به ترتیب دارای جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های BamHI و HindIII هستند و محصول نهایی PCR به‌وسیله این آنزیم‌ها در پلاسمید ۲ کلون شد و حاصل آن پلاسمید pC/tB/HE/Sur به‌وسیله PCR نام‌گذاری شد. در پایان کلوئینینگ به‌وسیله تعیین توالی زنی مورد تأیید قرار گرفت.
 شکل ۱ تصویر شماتیک این سازه را نشان می‌دهد.



شکل ۱ تصویر شماتیک سازه pC/tB/HE/Sur

۴- بررسی بیوانفورماتیکی قطعه زنی شبه پرومودر سوروایوین

توالی این قطعه زنی با استفاده از برنامه‌های نرم‌افزاری و آنلاین (Online) شامل BLAST, Map Viewer, Prosite, Comple, Promoter Scan, TransFac تردد، Prosite، Complex، Promoter Scan، TransFac بررسی شد.

۵- انتقال سازه به سلول‌های یوکاریوتی

به‌منظور تعیین فعالیت رونویسی پرومودر کایمیریک حاوی شبه پرومودر سوروایوین (تحت تیمارهای مختلف)، 5×10^4 سلول از رده‌های سلولی طبیعی و سرطانی در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند. انتقال سازه با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰

Bid-for: 5'-ACGGGATCCGCCCATGGATGGCAACCGCAGCG-3'
 Bid-rev: 5'-TTCTCTAGATCAGITCCATCCCATTCTGGCTAAGCTC-3'
 تکثیر شد. آغازگر Bid-for دارای جایگاه شناسایی آنزیم (Kozak sequence) در انتهای ۵' و توالی کزاک (BamHI) به‌منظور ترجمه بهینه است. آغازگر Bid-rev دارای جایگاه شناسایی XbaI است. محصول نهایی PCR به‌وسیله کیت QIAquick Gel Extraction (شرکت QIAGEN، آلمان) از ژل آگاراز تخلیص و به‌وسیله آنزیم‌های XbaI/BamHI در پلاسمید pCDNA3.1/hygro⁺ کلون شد (پلاسمید pCDNA3.1/hygro⁺) و کلوئینینگ به‌وسیله تعیین توالی زنی با آغازگرهای اختصاصی tBid تأیید شد.

۲-۳-۲- تکثیر و کلوئینینگ بخش‌های پاسخ‌دهنده به هیپوکسی و استروژن (Responsive modules)

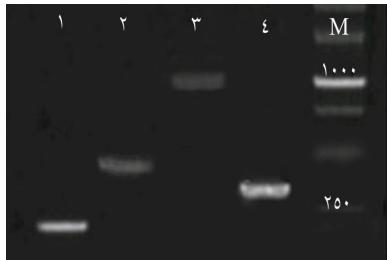
برای قرار دادن این بخش‌ها الیگومری شامل سه نسخه از عناصر پاسخ‌دهنده به هیپوکسی (3'-TGTACAGTCCTGCACGAC) و دو نسخه از عناصر پاسخ‌دهنده به استروژن (CGTCACAGTGACC) طراحی شد [۱۲] و برای ساخت به شرکت ژن فناوران سفارش داده شد. این الیگومر با استفاده از آغازگرهای زیر تکثیر شد:

Oligo-for: 5'-TAACACGCGTATTCACGTCCTG-3'
 Oligo-rev: 5'-TAAACAAGCTTAGAGGTCACTGTGAC-3'
 آغازگرهای Oligo-rev و Oligo-for به ترتیب دارای جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های MluI و HindIII بودند و به‌وسیله این دو آنزیم در پلاسمید ۱ کلون شدند (پلاسمید pC/tBid/HE) و کلوئینینگ به‌وسیله تعیین توالی زنی تأیید شد.

۳-۳-۲- تکثیر و کلوئینینگ شبه پرومودر سوروایوین

این پرومودر به‌وسیله Nested-PCR از DNA ژنومی سلول‌های Hela تکثیر شد. اولین واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای زیر صورت گرفت:

Sur1-for: 5'-AGAGAAGTGAGTGGATGTGATG-3'
 Sur1-rev: 5'-GAATGTAGAGATGCGGTGGTC-3'



شکل ۲ نتایج PCR قطعات ژنی، ستون ۱) بخش‌های الیگومری هیپوکسی-استروژن؛ ستون ۲) *Bid*؛ ستون ۳) PCR اول شبه پروموتور سوروایوین؛ ستون ۴) PCR دوم شبه پروموتور سوروایوین

۲-۱-۳- تأیید درج قطعات در ناقل

محصول اتصال ژنی به ناقل، در هر مرحله به داخل باکتری منتقل و توالی تمام قطعات بعد از کلون شدن در پلاسمید، با تعیین توالی تأیید شد.

۲-۲- نتایج بررسی بیوانفورماتیکی قطعه ژنی

شبه پروموتور سوروایوین

توالی این قطعه ژنی که حدود ۳۴ درصد با توالی پروموتور سوروایوین شباهت داشت، بعد از بررسی در پایگاه‌های بیوانفورماتیکی و تأیید وجود مناطق متصل شونده به فاکتورهای رونویسی، در بانک ژن جهانی با آدرس و توالی زیر ثبت شد.

gi|169647618|gb|EU447346.1| Homo sapiens BIRC5-like gene, promoter region
CTAAAGTGTGGATCACAGGCATGCCAT
ATGCCAGCCCTATCCATCATTTAGGAAGTACC
AGGAAACCTGGAAACACAGAAGGTCTCCTACAT
AGCTTGACATGGGAAGGGAGTGAGGCCCTGGG
CTGATCTAAGGATGAGGAAGAGGACAAGTCTCA
CGCAGAAGTGCCCTCCATCCCTCTGCAGGCAGG
ATGTGACAGCAGCTGAAACATTATGTCCCTTA
TGTTTATTGGGTCTGTCTCCCCAGCCAGCCCAAG
AGCTGTTGGGCAGGGACTGTAACCTGTGCAT
TATCCACCTCTGTGCCCAACGT

نتایج حاصل از برنامه‌های نرم‌افزاری و آنلاین نشان می‌دهد که این قطعه ژنی دارای نواحی متصل شونده به فاکتورهای رونویسی E2F و STAT1 (توالی‌های CGTTCTTGAAAGCA و TTAACCGCCAG) است.

(Invitrogen) (Lipofectamine 2000) طبق برنامه شرکت تولیدکننده انجام شد. در این آزمایش ترانسفکشن با یک میکروگرم از هریک از سازه‌های آزمون و کنترل (پلاسمید pC/tB/HE/Sur) (pC/tB) و پلاسمید $tBid$ به همراه ۲ میکرولیتر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ صورت گرفت و میزان القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطانی SKBR-3، MCF7 و سلول‌های طبیعی AGO با سازه کایمیریک حاوی شبه پروموتور سوروایوین (پلاسمید pC/tB/HE/Sur) و سازه کنترل حاوی پروموتور CMV (پلاسمید pC/tB) و تیمارهای مختلف مقایسه شد. شش ساعت بعد از ترانسفکشن تیمارهای استروژن و هیپوکسی اعمال شد. برای تیمار استروژن به محیط کشت ۱۷ β -استرادیول ۲ نانومولار اضافه و برای اعمال تیمار هیپوکسی روی پلیت با پارافیلم استریل بسته شد.

۶-۲- ارزیابی میزان بیان mRNA *tBid*

شانزده ساعت بعد از ترانسفکشن سلول‌های تیمار شده جمع‌آوری شدند و بعد از تخلیص RNA از این سلول‌ها، *tBid* cDNA با استفاده از دو سری آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای ژن β اکتین، RT-PCR نیمه‌کمی انجام شد. β اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد که آغازگرهای آن شامل:

BA-for: 5'-AGTAGGCTTGTGGTTGATG-3'

BA-rev: 5'-CTGTCAGGAAAGGAGAAATC-3'

بودند. در پایان محصول PCR به وسیله برنامه UVitec آنالیز شد.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج تهیه سازه

۳-۱-۱- تکثیر نواحی ژنی

شکل ۲ نتایج PCR قطعات ژنی *Bid*، بخش‌های الیگومری هیپوکسی-استروژن و شبه پروموتور سوروایوین را نشان می‌دهد.

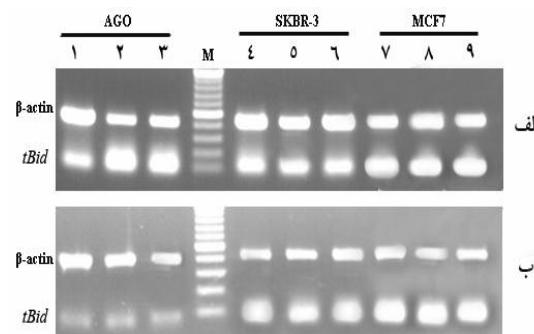
پرموتر CMV یکی از پرموترهای قوی برای هدایت بیان ژن است پس نتایج به دست آمده نشان‌گر قدرت بالای شبه پرموتر سورواپین است. همچنین تیمار استروژن به تنها بی تأثیر بیشتری در افزایش بیان ژن *tBid* تحت هدایت هر دو نوع پرموتر در سلول‌های سرطانی MCF-7 دارد و میزان بیان سازه حاصل در سلول‌های سرطان سینه MCF7 و SKBR-3 بالاتر از سلول‌های غیرسرطانی AGO است.

۴- بحث

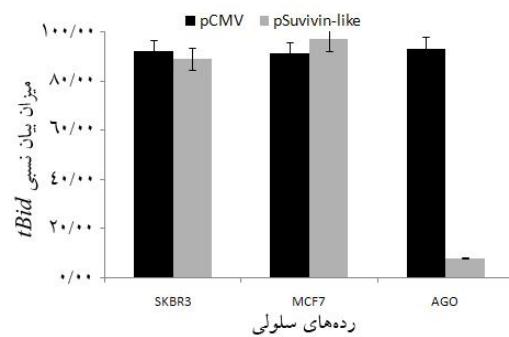
تلاش‌های قابل ملاحظه‌ای که در سه دهه اخیر برای بهبود روش‌های مرسوم درمان سرطان یعنی جراحی، اشعه‌درمانی و شیمی‌درمانی انجام شده است، تأثیر زیادی در بهتر شدن نتیجه درمان به‌ویژه در درجات پیشرفته بیماری نداشته است. بنابراین محققان به سمت روش‌های جدیدی در درمان سرطان از جمله ژن‌درمانی روی آوردن [۱۳]. ژن‌درمانی سرطان تحويل ماده ژنتیکی به سلول بدخیم یا ترانسفورم به منظور درمان است. در هر سیستم ژن‌درمانی ایده‌آل دو بخش کلیدی وجود دارد: ۱- ترانس ژن (Transgene) درمانی مناسب که می‌تواند تصحیح کننده، کشنده یا تحریک کننده اینمی و ... باشد و ۲- بیان اختصاصی ژن در سلول‌های سرطانی [۱۴]. از میان ژن‌های کشنده مختلف، مواردی که مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را القا می‌کنند، بسیار امیدوارکننده هستند. مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی فرایندی است که موجودات پرسلولی برای حذف سلول‌های زاید، صدمه‌دیده یا مضر به کار می‌برند. تحریک مسیرهای داخلی یا خارجی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی منجر به افزایش بیان و فعالیت تنظیم‌کننده‌های پیش‌آپوتوزی شده و مرگ سلولی را القا می‌کند. توانایی طبیعی ژن‌های پیش‌آپوتوزی برای از بین بردن سلول‌ها، آن‌ها را به گزینه‌ای ویژه برای ژن‌درمانی سرطان تبدیل نموده است. از میان خانواده‌های ژنی دخیل در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی خانواده بزرگ Bcl2 (B-cell lymphoma 2) مورد توجه محققان بوده است که دارای چندین عضو پیش‌آپوتوزی

۳-۳- RT-PCR نیمه‌کمی

پس از انتقال سازه به سلول‌های یوکاریوتی و اعمال تیمارهای متفاوت، جداسازی RNA و سنتز cDNA قطعات *tBid* و β -اکتین با دو سری آغازگرهای فوق‌الذکر صورت گرفت (شکل ۳). شدت هر باند با استفاده از برنامه UVitec تعیین و نسبت شدت خالص ژن *tBid* به ژن β -اکتین اندازه‌گیری شد که نمایش گر بیان نسبی *tBid* در شرایط و تیمارهای متفاوت بود (شکل ۴).



شکل ۳ نتایج RT-PCR نیمه‌کمی، (الف) pC/tB؛ (ب) pC/tB/HE/Sur؛ ستون‌های ۱، ۴، ۷ تیمار استروژن؛ ستون‌های ۲، ۵، ۸ بدون تیمار استروژن و هیبوکسی؛ ستون‌های ۳، ۶، ۹ بدون تیمار



شکل ۴ مقایسه نتایج RT-PCR نیمه‌کمی در رده‌های سلولی مختلف ترانسفکته با پلاسمید pC/tB [حاوی پرموتر CMV (pCMV)] و پلاسمید pC/tB/HE/Sur [حاوی شبه پرموتر سورواپین (pSurvivin-like)] در شرایط تیمار با استروژن

نتایج حاصل از این آزمون نشان می‌دهد که میزان بیان ژن *tBid* تحت هدایت پرموتر CMV قابل مقایسه با میزان بیان آن تحت هدایت شبه پرموتر سورواپین است. از آنجایی که

اختصاصی ترانسژن کشنده HSV-tk در سلول‌های سرطانی سینه استفاده کردند که سبب مرگ آنها شد [۱۶]. PPAR-gamma (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1) [توسط وانگ (Wang) و همکاران در سال ۲۰۰۴] که بیان افزایش یافته در سرطان سینه داشت و میزان بیان آن در سرطان‌های دیگری چون سرطان تیروئید و کولون و ریه نیز افزایش می‌یافتد [۱۷]. آلفا-لاکتالبومین (α -lactalbumin) [توسط لی (Li) و همکاران در سال ۲۰۰۵]، هپاراناز (Heparanase) [توسط بریندنباچ (Breidenbach) و همکاران در سال ۲۰۰۵]، مامالوگلوبین (Mammaglobin) [توسط شی (Shi) و همکاران در سال ۲۰۰۶] و پروموتراهای CXCR4 و L-plastin (L-plastin) (CXC chemokine receptor type 4) توسط محققان دیگر در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی سینه چون MCF-7، MDA-MB361، T47D، MDA-MB4355 از ترانسژن‌های کشنده مختلف مطالعه شد که دارای نتایج متفاوتی در رده‌های سلولی سرطان سینه هستند [۲۱، ۲۲].

پروموترا که در این تحقیق بررسی شد شبیه پروموترا ژن سوروایوین است و دارای هسته پرماتری لازم برای بهره‌انداختن بیان ژن درمانی است و در ترکیب با بخش‌های پاسخ‌دهنده استفاده شد. در این تحقیق چگونگی جداسازی و تکثیر یک ناحیه پرموترا از DNA انسانی بررسی شد. با توجه به مطالعات کتابخانه‌ای وسیعی که انجام شد پرموترا ژن سوروایوین را که در گزارش‌ها نتایج خیلی خوبی داشت به این منظور انتخاب شد. بر این اساس تنها گزارش موجود از توالی این پرموترا در مقاله لی (Li) و همکاران در سال ۱۹۹۹ [۲۳] بود و هیچ گزارشی از توالی این ژن در بانک ژن موجود نبود. بنابراین براساس اطلاعات این گزارش طراحی آغازگر انجام شد. چون مناطق پرموترا ژن سوروایوین دارای نواحی غنی از GC است با آغازگرهای طراحی شده برای PCR آن منطقه نتیجه‌ای به دست نیامد و در نتیجه Nested-PCR و طراحی آغازگر برای مناطق فرادست و فرودست منطقه پرموترا

است. با این وجود محدودیت بالقوه‌ای که در استفاده از ژن‌های پیش‌آپوپتوزی به عنوان کشنده سلولی وجود دارد این است که فعالیت آنها به شدت به وسیله تغییرات پس از ترجمه مانند دایمریزاسیون (Dimerization) (مثل پروتئین Bax)، ترانسلوکاسیون (Translocation) (مثل پروتئین Bim)، فسفریلاسیون (مثل پروتئین Bad) و شکسته شدن (مثل پروتئین Bid) و ... تنظیم می‌شود [۱۵]. به همین دلیل پیدا کردن ژن پیش‌آپوپتوزی که برای فعالیت کامل خود نیاز به تغییرات اضافی Bid نداشته باشد بسیار مورد توجه بود که به دلایل زیر، ژن Bid می‌تواند به صورتی به کار گرفته شود که نیازی به تغییرات پس از ترجمه برای فعالیتش نداشته باشد. ۱- برای این که پروتئین Bid نیاز به شکست (Cleavage) (برداشت بخشی از انتهای آمینوی آن) برای فعالیت کامل خود نداشته باشد فقط توالی ژنی بخش ۱۵/۵ کیلودالتونی Bid (Bid برباده شده یا tBid) در پلاسمید مربوطه کلون شد. ۲- پروتئین کامل Bid از اعضای خانواده فقط دارای ناحیه BH3 است که نسبت به سایر اعضاء که دارای نواحی دیگر (BH2، BH4) و (BH1) هستند، اندازه‌ای کوچک‌تر دارد. ۳- توالی آن پس از شکست به وسیله کاسپاز ۸ کوچک‌تر می‌شود و در واقع مبدل به یکی از پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی با کوچک‌ترین دومن (Domain) مرگ می‌شود که این مسئله سبب تسهیل کلون کردن آن در ناقل مربوطه می‌شود. ۴- همان‌طوری که گفته شد پروتئین Bid یکی از قدرتمندترین اعضاء پیش‌آپوپتوزی بالقوه است که به محض برداشت ناحیه ممانعت‌کننده N ترمinal توانایی القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را دارد.

با این وجود برای استفاده از این ترانسژن کشنده مناسب باید از روشی استفاده شود که قادر به هدف قرار دادن سلول‌های بدخیم باشد؛ چون در غیر این صورت سلول‌های طبیعی هم از بین خواهد رفت. همان‌طور که پیش از این گفته شد بهترین روش تنظیم، هدف قرار دادن رونویسی و ابزار آن پرموترا است. برای انتخاب پرموترا مناسب برای سلول‌های سرطان سینه مطالعات فراوانی صورت گرفته است. پاندھا (Pandha) و همکاران در سال ۱۹۹۹ از پرموترا ژن Erb-B2 برای بیان

هیپوکسیک هستند. در این شرایط سلول‌ها یک فاکتور رونویسی تحت عنوان فاکتور قابل القا به وسیله هیپوکسی یا HIF (Hypoxia-inducible factor) بیان می‌کنند که بیان تعدادی از ژن‌ها را در پاسخ به هیپوکسی فعال می‌کند. HIF به توالی‌های مورد توافقی تحت عنوان عناصر پاسخ‌دهنده به هیپوکسی یا HRE (Hypoxia responsive elements) در پرموتر این ژن‌ها متصل می‌شود [۲۴]. عناصر پاسخ‌دهنده به استروژن نیز به وسیله گیرنده استروژن شناسایی شدند. این گیرنده به عنوان فاکتور رونویسی برای فعال کردن بیان بعضی ژن‌ها در حضور استروژن عمل می‌کند. حدود ۷۰ درصد از سرطان‌های سینه گیرنده‌های استروژن را بیان می‌کنند و در صورتی که پرموتر دارای عناصر پاسخ‌دهنده به استروژن باشد در حضور استروژن فعال می‌شود. به علاوه استفاده از عناصر پاسخ‌دهنده به استروژن امکان تنظیم خارجی بیان ژن کشته را به وسیله داروهای ضداستروژنی مثل تاموکسیفین (Tamoxifen) فراهم می‌آورد [۲۵، ۲۶]. نتایج نشان می‌دهد که استفاده از شبیه پرموتر سوروایوین، با شرایط گفته شده برای هدایت بیان یک ژن پیش‌آپوپتوزی سبب القای مرگ سلولی به صورت اختصاصی با کارایی بالا در توده سلول‌های سرطانی ناهمگون می‌شود. امید است که به کارگیری سازه حاصل بتواند به شکل مؤثری راه‌گشای درمان سرطان سینه باشد.

۵- تشکر و قدردانی

این گزارش حاصل بخشی از تحقیق پایان‌نامه کارشناسی ارشد سامیلا فرخی‌منش به راهنمایی دکتر فاطمه رهبری‌زاده، عضو هیأت علمی دانشگاه تربیت مدرس گروه بیوتکنولوژی است.

انجام شد. برای حدود ۴۰۰ نوکلئوتید بالاتر از نوکلئوتید ابتدایی پرموتر و ۳۲۱ نوکلئوتید پایین‌تر از نوکلئوتید انتهایی آغازگر طراحی شد. منطقه انتخاب شده حاوی ۱۰۴۱ نوکلئوتید بود که در نتایج PCR موفق به تولید باندی در همین منطقه وزنی شدیم. روی این محصول عمل PCR دوم با استفاده از آغازگرهای مکمل ابتدا و انتهایی پرموتر ژن سوروایوین انجام شد و محصول این PCR قطعه باندی با وزن حدود ۳۲۴ جفت‌باز و از نظر وزنی مطابق ناحیه مورد نظر محققان حاضر بود. قطعه حاصل دو بار برای تعیین توالی ژن ارسال شد، ولی در هر دو دفعه توالی ژنی فقط در حدود ۳۴ درصد با توالی پرموتر سوروایوین که در مقاله لی گزارش شده بود، شباهت داشت. محققان حاضر با جستجو در برنامه‌های آنلاین (EPD, TransFac, Promoter Scan, Comple, Prosite, TRRD) موفق شدند که نواحی متصل‌شونده به فاکتورهای رونویسی E2F و STAT1 را که به ترتیب به توالی‌های CGTTCTTGAAAGCA و TTAACCGCCAG می‌شوند در این توالی پیدا کنند و از طرفی مطالعات عملکردی این پرموتر در سازه tBid-pCDNA و مقایسه آن با سازه tBid-pCDNA نشان‌دهنده بیان بالا و اختصاصی این ژن در سلول‌های سرطانی است. با توجه به نتایج فوق این پرموتر جدید که در کروموزوم شماره ۸ قرار دارد و شباهت زیادی از نظر توالی با پرموتر سوروایوین دارد، پرموتر شبیه سوروایوین نامیده شد. نتایج حاصل از این پرموتر در RT-PCR نشان می‌دهد که این پرموتر با قابلیت بسیار بالا و در حد پرموتر CMV قادر به بیان ژن پیش‌آپوپتوزی tBid است.

در مورد عناصر پاسخ‌دهنده به هیپوکسی باید خاطرنشان کرد که بسیاری از تومورهای جامد واجد ریزمحیط

۶- منابع

- [1] Wu L, Johnson M, Sato M. Transcriptionally targeted gene therapy to detect and treat cancer. Trends Mol Med 2003; 9(10): 421-9.
- [2] Dorer DE, Nettelbeck DM. Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis. Adv Drug Deliv

- Rev 2009; 61(7-8): 554-71.
- [3] Brown T.A. *Genomes* 3. Third edition, Garland Science, 2006.
- [4] Smale ST, Carey M. Transcriptional regulation in eukaryotes. Laboratory press; Cold Spring Harbor, 2000.
- [5] Robson T, Hirst DG. Transcriptional Targeting in Cancer Gene Therapy. *J Biomed Biotechnol* 2003; 2003(2): 110-37.
- [6] Harrington KJ, Linardakis E, Vile RG. Transcriptional control: an essential component of cancer gene therapy strategies? *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 44(2-3): 167-84.
- [7] Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 1993; 268(29): 21513-8.
- [8] Clarkson T. Controlling mammalian gene expression with small molecules. *Curr Opin Chem Biol* 1997; 1(2): 210-8.
- [9] Kazhdan I, Long L, Montellano R, Cavazos DA, Marciniak RA. Targeted gene therapy for breast cancer with truncated Bid. *Cancer Gene Ther* 2006; 13(2): 141-9.
- [10] Stein U, Walther W, Shoemaker RH. Vincristine induction of mutant and wild-type human multidrug-resistance promoters is cell-type-specific and dose-dependent. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122(5): 275-82.
- [11] Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2002; 277(5): 3247-57.
- [12] Hernandez-Alcoceba R, Pihalja M, Nunez G, Clarke MF. Evaluation of a new dual-specificity promoter for selective induction of apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2001; 8(4): 298-307.
- [13] Harrington KJ, Bateman AR, Melcher AA, Ahmed A, Vile RG. Cancer gene therapy: Part 1. Vector development and regulation of gene expression. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2002; 14(1): 3-16.
- [14] Curiel DT, Douglas JT. *Cancer Gene therapy*. First edition, Human Press Inc, 2005.
- [15] Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* 2006; 13(8): 1351-9.
- [16] Pandha HS, Martin LA, Rigg A, Hurst HC, Stamp GW, Sikora K, Lemoine NR. Genetic prodrug activation therapy for breast cancer: A phase I clinical trial of erbB-2-directed suicide gene expression. *J Clin Oncol* 1999; 17(7): 2180-9.
- [17] Wang X, Southard RC, Kilgore MW. The increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 in human breast cancer is mediated by selective promoter usage. *Cancer Res* 2004; 64(16): 5592-6.
- [18] Li X, Zhang J, Gao H, Vieth E, Bae KH, Zhang YP, Lee SJ, Raikwar S, Gardner TA, Hutchins GD, VanderPutten D, Kao C, Jeng MH. Transcriptional targeting modalities in breast cancer gene therapy using adenovirus vectors controlled by alpha-lactalbumin promoter. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(12): 1850-9.
- [19] Breidenbach M, Rein DT, Schöndorf T, Khan KN, Herrmann I, Schmidt T, Reynolds PN, Vlodavsky I, Haviv YS, Curiel DT. A new targeting approach for breast cancer gene

- therapy using the heparanase promoter. *Cancer Lett* 2006; 240(1): 114-22.
- [20] Shi CX, Graham FL, Hitt MM. A convenient plasmid system for construction of helper-dependent adenoviral vectors and its application for analysis of the breast-cancer-specific gammaglobin promoter. *J Gene Med* 2006; 8(4): 442-51.
- [21] Chung I, Schwartz PE, Crystal RG, Pizzorno G, Leavitt J, Deisseroth AB. Use of L-plastin promoter to develop an adenoviral system that confers transgene expression in ovarian cancer cells but not in normal mesothelial cells. *Cancer Gene Ther* 1999; 6(2): 99-106.
- [22] Stoff-Khalili MA, Stoff A, Rivera AA, Banerjee NS, Everts M, Young S, Siegal GP, Richter DF, Wang M, Dall P, Mathis JM, Zhu ZB, Curiel DT. Preclinical evaluation of transcriptional targeting strategies for carcinoma of the breast in a tissue slice model system. *Breast Cancer Res* 2005; 7(6): R1141-52.
- [23] Li F, Altieri DC. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J* 1999; 344 Pt 2: 305-11.
- [24] Kizaka-Kondoh S, Tanaka S, Harada H, Hiraoka M. The HIF-1-active micro-environment: an environmental target for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61(7-8): 623-32.
- [25] Lee M. Hypoxia targeting gene expression for breast cancer gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009. [Epub ahead of print]
- [26] Ekena K, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Determinants of ligand specificity of estrogen receptor-alpha: estrogen versus androgen discrimination. *J Biol Chem* 1998; 273(2): 693-9.