مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۹
صفحات: ۲۰۶-۲۰۳

Kowsar Medical Journal
Vol. 15, No. 4, Winter 2011
Pages: 203-206

ساخت کاست pcDNA/*fimH* به‌عنوان کاندید واکسن ژنی علیه عفونت ادراری و بررسی بیان آن در رده سلولی COS7

جلیل فلاح مهرآبادی[۱] *PhD*، نیما خرم‌آبادی[۲] *PhD*، مهدی مهدوی[۳] *PhD*، عباسعلی ایمانی فولادی[*] *PhD*

[*]مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

[۱]مرکز تحقیقات کلیه و مجاری ادراری، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

[۲]گروه باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[۳]گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: مهم‌ترین عامل عفونت ادراری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن دارای پیلی تیپ یک است. *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن پس از تهاجم به سلول‌های اپی‌تلیال مثانه، به‌صورت داخل سلولی تکثیر می‌شود و حضور ایمنی سلولی در این‌جا مهم است. هدف از این مطالعه، ساخت یک کاست ژنی بود که بتواند سیستم ایمنی سلولی را تحریک نماید.

مواد و روش‌ها: ابتدا ژن *fimH* را با PCR تکثیر شد و در وکتور یوکاریوتی pcDNA.1 کلون شد. پس از توالی‌یابی و تایید کلون، به‌منظور بررسی بیان ژن و عملکرد صحیح کاست تهیه‌شده در سلول یوکاریوتی، در سلول COS7 وارد شد و به‌منظور بیان ژن با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. بیان ژن در سطح mRNA با میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد.

یافته‌ها: ژن *fimH* با روش PCR به‌خوبی تکثیر شد. محصول PCR در وکتور pcDNA.1 قرار گرفت و کاست ژنی pcDNA/fimH ساخته شد. برای بررسی عملکرد صحیح این کاست سلول‌های COS7 ترنسفکت شدند و بیان ژن *fimH* با روش RT-PCR مورد تایید قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: کاست ژنی pcDNA/*fimH* می‌تواند ژن *fimH* را در سلول یوکاریوتی بیان کند و به‌عنوان یک کاست DNA ارزشمند جهت واکسیناسیون بر ضد عفونت‌های ادراری است.

کلیدواژه‌ها: پیلی تیپ I، *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن، واکسن ژنی، FimH

Construction of pcDNA/*fimH* cassette as a DNA vaccine candidate against urinary tract infection and evaluate its expression in COS7 cell line

Fallah Mehrabadi J.[1] *PhD*, Khorramabadi N.[2] *PhD*, Mahdavi M.[3] *PhD*, Imani Fooladi A. A.[*] *PhD*

[*]Research Centers of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[1]Research Center of Nephrology & Urology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Department of Bacteriology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Department of Immunology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Aims: The most important cause of urinary tract infection is Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) which produces type I pili. UPEC has intracellular duplication after invasion to bladder epithelial cells; therefore, cellular immunity is important in this case. This study was performed in order to design a gene cassette inducing cellular immune system against Uropathogenic *Escherichia coli*.

Materials & Methods: At first, *fimH* gene was amplified by PCR. PCR product was inserted to pcDNA.1 eukaryotic expression vector and the recombinant vector was confirmed by sequencing. The clone was inserted into COS7 cell and then assessed by RT-PCR in order to evaluate gene expression and the correct function of the gene cassette. Gene expression at mRNA level was evaluated by florescence microscope.

Results: *fimH* gene was well amplified by PCR. PCR product was inserted to pcDNA.1 eukaryotic expression vector and pcDNA/*fimH* gene cassette was constructed. COS7 cells were transfected in order to evaluate the correct function of this cassette. Expression of *fimH* gene in COS7 was confirmed by RT-PCR.

Conclusion: pcDNA/*fimH* cassette could express inserted *fimH* gene in eukaryotic cells and is a valuable DNA cassette for urinary tract infection vaccination.

Keywords: Type I Pili, Uropathogenic *Escherichia Coli*, Genetic Vaccine, FimH

نویسنده مسئول: عباسعلی ایمانی فولادی. تمام درخواست‌ها باید به نشانی imanifouladi.a@gmail.com فرستاده شوند.

دریافت مقاله: ۸۹/۲/۲۸ پذیرش مقاله: ۸۹/۶/۱۵

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

عفونت دستگاه ادراری (UTI) یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در انسان است. این عفونت در بین زنان جوان شایع است، به‌طوری که ۲۰ تا ۳۰٪ زنان، به‌طور مکرر به این عفونت مبتلا می‌شوند. زمانی که پاتوژن‌های ادراری فقط نواحی تحتانی مجرای ادراری را درگیر می‌کنند، علایم سیستیت به‌همراه سوزش ادرار ظاهر می‌شود. گاهی باکتری‌های مهاجم، از میزنای گذشته و وارد کلیه می‌شوند و با تکثیر در لگنچه کلیه و بافت پارانشیمی، ایجاد پیلونفریت می‌نمایند [۱].

مهم‌ترین عامل عفونت ادراری، *اشریشیاکلی* دارای پیلی تیپ یک است که اغلب تمایل به چسبیدن به نسج مخاطی واژن و مجاری ادراری دارد [۲]. *اشریشیاکلی یوروپاتوژن* (UPEC) پس از تهاجم به سلول‌های اپی‌تلیال مثانه، به‌صورت داخل‌سلولی تکثیر می‌یابد که این امر موجب پایداری باکتری در بافت مثانه می‌شود [۳]. مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین نوک‌پیلی (FimH) برای جذب باکتری به داخل سلول اپی‌تلیال مثانه ضروری است [۴]. یکی از راه‌های محدودنمودن و کاهش عفونت‌های حاد ادراری، تهیه واکسن علیه این عفونت‌هاست. از آن‌جایی که مرحله اتصال در کلونیزاسیون و به‌دنبال آن ایجاد عفونت بسیار مهم است، یکی از استراتژی‌های کاربردی، مهار اتصال باکتری است. از این‌رو تهیه واکسن حاوی ادهسین‌های سویه‌های UPEC مورد توجه است [۵، ۶]. در سال ۱۹۹۷، واکسنی که حاوی FimH بود، تهیه شد که آنتی‌بادی ضد آن از اتصال سویه‌های UPEC به کشت سلول‌های مثانه انسانی جلوگیری نمود و پس از ایمن‌سازی مدل حیوانی (موش)، کلونیزاسیون باکتری تا ۹۹٪ کاهش یافت و در ادرار آنها IgG-FimH قابل شناسایی بود [۷]. در سال ۲۰۰۶ *سوک‌نیونگ* و همکاران، پروتئین FimH را با CTXA2B و LTXA2B به‌صورت فیوژن تهیه کردند تا ایمنی‌زایی FimH را افزایش دهند و این پروتئین‌های ادغامی را به‌صورت دهانی به موش‌ها تلقیح نمودند [۸]. با توجه به تکثیر داخل‌سلولی UPEC ضرورت دارد واکسنی طراحی شود که پاسخ ایمنی سلولی را تحریک نماید.

بنابراین هدف از این تحقیق، ساخت یک کاست ژنی بود که توانایی تحریک سیستم ایمنی سلولی را داشته باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج ژنوم باکتری و انجام PCR به‌منظور تخلیص ژن *fimH*:

باکتری *E. coli* 35218 که مولد پیلی تیپ I است، از بانک میکروب انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت BHI Broth کشت داده شد. سپس با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (Bioneer؛ کره جنوبی)، DNA ژنومی استخراج شد. توالی ژن *fimH* از بانک ژن گرفته شد. این ژن با شماره AY392527 در بانک ژن ثبت شده و ۹۰۳ bp طول دارد. سپس با استفاده از نرم‌افزار gene runner، پرایمرهای مناسب طراحی شدند. توالی این پرایمرها عبارت بودند از:

پرایمر پیش‌رو: TCCCGTTACAGGTCAGAGC

پرایمر معکوس: CCTGAAGCTAAAACCTGCAC

از آنزیم DNAپلیمراز pfu در واکنش PCR استفاده شد.

کلونینگ ژن *fimH* در وکتور کلونینگ و وکتور بیانی:

محصول حاصل از PCR اولیه در وکتور بیانی pBluescript که با آنزیم Eco*RV* برش داده شده بود، وارد شد. پس از انتقال وکتور به *E. coli* Top10F (به‌عنوان میزبان کلون)، باکتری کشت داده شد و بعد از ایجاد کلونی‌های سفید روی محیط آگاردار حاوی X-gal و IPTG، وکتور حاوی ژن مورد نظر به‌دست آمد و با انجام آزمایش توالی‌یابی، تایید شد. این پلاسمیدها با آنزیم‌های Hind*III* و Eco*RI* برش داده شده و قطعه ژنی مورد نظر از آنها خارج شد. پرایمرهایی که حاوی توالی سایت برش آنزیم‌های فوق بودند، طراحی شدند تا بتوان ژن *fimH* را طی PCR (که وکتور نوترکیب به‌عنوان الگو است)، تکثیر داده و آن را وارد وکتور بیانی pcDNA1 نمود. توالی این پرایمرها عبارت بودند از:

پرایمر پیش‌رو:

CTGGATCCACCACCATGGTTGTAATGA

پرایمر معکوس: TGT GAATTC TTTATTGATAAAC

در پرایمر پیش‌رو، سایت برش آنزیم BamH*I* و توالی *کوزاک* تعبیه شد. در پرایمر معکوس نیز سایت برش آنزیم Eco*RI* طراحی شد. ژن *fimH* پس از PCR در سایت برشی BamH*I* و Eco*RI* وکتور وارد شد. حضور ژن *fimH* در وکتور pcDNA.1 با آنزیم‌های فوق و توالی‌یابی، تایید شد.

انتقال وکتور بیانی نوترکیب به سلول COS7: این وکتور نوترکیب به رده سلولی COS7 که از بانک سلول انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود، منتقل شد. با استفاده از پلیمر کاتیونی ExGen 500 (Fermentas؛ آلمان) انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول صورت پذیرفت. همچنین برای کنترل ترنسفکت‌شدن سلول‌ها از وکتور حاوی ژن GFP نیز استفاده شد. بیان ژن *fimH* در رده سلولی با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار، سلول COS7 در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FCS در پلیت ۶خانه‌ای کشت داده شد. پس از آن که در هر خانه از پلیت، رشد سلول‌ها به حدود ۵۰٪ رسید (کانفلوانسی ۵۰٪)، یک میکروگرم وکتور نوترکیب با ۱۳ میکرولیتر پلیمر ExGen و ۵۰۰ میکرولیتر محلول NaCl ۱۵۰ میلی‌مولار مخلوط و به کشت سلول اضافه شد. همین مراحل برای وکتور حاوی ژن GFP نیز صورت پذیرفت.

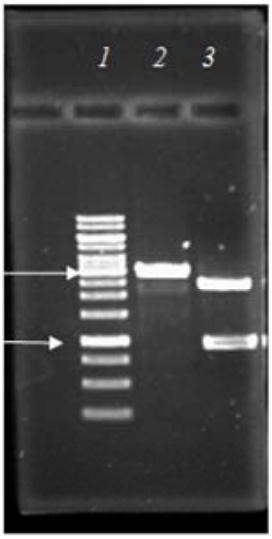
انجام RT-PCR و بررسی بیان ژن در سطح mRNA: پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، سلول‌های تیمارشده با pcDNA/*fimH*، با اضافه‌کردن یک میلی‌لیتر محلول RNX plus (شرکت سیناژن؛ ایران) از خانه‌های پلیت جمع‌آوری و طبق دستورالعمل کیت، مجموع

Archive of SID
www.SID.ir

کل RNA تخلیص شد. این مراحل برای سلول‌های COS7 که با وکتور تیمار نشده بودند نیز به‌عنوان کنترل منفی انجام شد. سپس با استفاده از کیت "Revert Aid First Strand cDNA Synthesis" (Fermentas؛ آلمان) از RNA سلول‌های ترنسفکت‌شده و نشده، cDNA تهیه شد و با پرایمرهای طراحی‌شده برای مرحله ساب‌کلونینگ، PCR انجام شد. همچنین سلول‌های تیمارشده با وکتور حاوی GFP، پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به‌منظور مطالعه بیان GFP با میکروسکوپ فلورسانس بررسی شدند.

نتایج

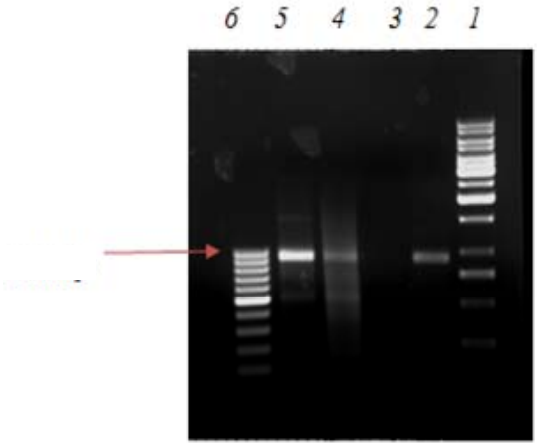
پس از کلونینگ ژن *fimH* در وکتور بیانی با برش آنزیمی توسط آنزیم‌های استفاده‌شده در مرحله کلونینگ، کلون انجام‌شده مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱). پس از توالی‌یابی وکتور pBluescript/*fimH*، توالی ژن *fimH* با سایر توالی‌های موجود این ژن در بانک ژن و با کمک نرم‌افزار MEGA4 همتراز شد. این ژن دارای تنوع توالی است و این یکی از دلایل تمایل متفاوت سویه‌های *اشریشیاکلی* به سلول‌های یورواپی‌تلیال است. ژن *fimH*، دارای ۶ نوکلئوتید اختلاف و در سطح آمینواسید دارای ۲ اختلاف با ژن *fimH* سویه یوروپاتوژن UTI89 (که ژنوم آن به‌طور کامل توالی‌یابی شده)، بود.



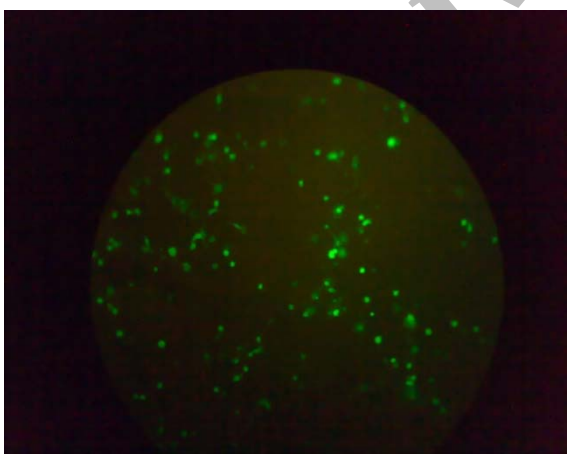
شکل ۱) نتایج آنزیمی روی وکتور نوترکیب حاوی ژن *fimH* به‌منظور تایید کلونینگ. ۱) Ladder، ۲) وکتور دارای ژن *fimH* است، ۳) ژن *fimH* که بعد از برش از داخل وکتور جدا شده است، به‌همراه وکتور برش‌خورده بدون ژن *fimH*

پس از آن که کاست ژنی pcDNA/*fimH* ساخته شد، صحت قالب خواندنی آن با توالی‌یابی تایید شد. شدت باند محصول PCR سلول‌هایی که RNA آنها پس از ۴۸ ساعت ترنسفکت‌شدن، تخلیص شده بودند، نسبت به سلول‌های ۲۴ساعته بیشتر بود (شکل ۲) و این می‌تواند دلیلی بر حضور تعداد بیشتر نسخه‌های ژن *fimH* در سلول باشد. این نتیجه نشان داد که کاست تهیه‌شده در سلول‌های یوکاریوتیک، عملکرد مناسب داشته و ژن *fimH* بیان شده است.

شکل ۳ بیان GFP در سلول‌های COS7 را پس از ۴۸ ساعت ترنسفکت‌شدن نشان می‌دهد. این نتیجه موید صحت انجام مراحل ترنسفکت‌کردن سلول‌های COS7 بود. در ۲۴ ساعت اول ترنسفکت‌کردن سلول‌های COS7، هیچ‌کدام از آنها GFP را بیان نکرده بودند. همچنین نتایج زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت مشابه بودند (شکل ۳).



شکل ۲) نتایج RT-PCR سلول‌های ترنسفکت‌شده و نشده ۱) kb Ladder۱، ۲) PCR کنترل مثبت که الگو در آن وکتور دارای ژن *fimH* است، ۳) RT-PCR روی سلول COS7 ترنسفکت‌نشده، ۴) RT-PCR روی سلول COS7 ترنسفکت‌شده ۲۴ساعته، ۵) RT-PCR روی سلول COS7 ترنسفکت‌شده ۴۸ساعته، ۶) ۱۰۰bp Ladder



شکل ۳) سلول‌های COS7 ترنسفکت‌شده با وکتور حاوی ژن GFP پس از ۴۸ ساعت

بحث

فاکتورهای زیادی در اکتساب و پیشرفت عفونت‌های ادراری ناشی از *E. coli* نقش دارند. به‌طور کلی کلونیزاسیون باکتری در سلول‌های اپی‌تلیوم مجاری ادراری به‌منظور شروع عفونت ضروری است [۹]. لذا

Archive of SID
www.SID.ir

گسستن یا جلوگیری از اتصال به‌واسطه پیلی *E. coli* ممکن است منجر به پیشگیری یا درمان عفونت‌های ادراری شود [۵]. مطالعات متعددی درباره نقش پیلی در ایجاد عفونت‌های ادراری انجام شده است. *هاپکینز* و همکاران در سال ۱۹۹۹ از واکسن کشته‌شده *E. coli* و سایر باکتری‌های عامل عفونت ادراری استفاده کردند [۱۰]. *لانگرمن* و همکاران در سال‌های ۱۹۹۷ و ۲۰۰۰، مصونیت‌بخشی FimH را در مدل موشی سیستیت تا حد ۹۹٪ به‌اثبات رساندند [۷]. *یانگ‌هوآ* و همکاران در سال ۲۰۰۳ پروتئین نوترکیب برمبنای ساب‌یونیت CTXA2B *ویبریوکلرا* و FimH را طراحی و بیان کردند [۱۱]. در تمامی مطالعات، تیتر آنتی‌بادی IgG به‌عنوان شاخص پاسخ ایمنی هومورال اندازه‌گیری شد. اما *ریگستاد* و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند که باکتری *E. coli* یوروپاتوژنیک می‌تواند به‌صورت داخل‌سلولی درآید [۱۲]. لذا پاسخ ایمنی سلولی در جلوگیری از عود مجدد عفونت ادراری مهم خواهد بود. در این تحقیق واکسن DNA به‌منظور تحریک پاسخ ایمنی سلولی در مدل موشی طراحی شد.

در *E. coli* یوروپاتوژنیک، FimH شاخصه مهم اتصال به اپی‌تلیوم در عفونت ادراری است. لذا ژن *fimH* به‌عنوان ژن انتخابی در طراحی کاست ژنی pcDNA/*fimH* استفاده شد. در حقیقت، ساختارهای متنوعی از FimH وجود دارد که به سلول‌های یوروپی‌تلیال متصل می‌شود [۱۳]. مثلا FimH در *E. coli* 35218، فقط در یک اسیدآمینه با *E. coli* UTI89 تفاوت دارد و این باعث تبدیل اسیدآمینه آلانین به سرین شده است. توالی *کوزاک* برای شروع بیان ژن در سلول‌های یوکاریوتی بسیار مفید است [۱۴]. عمومی‌ترین و قابل‌قبول‌ترین توالی *کوزاک*، ACCACCATGG است، لذا این توالی در پرایمر پیش‌رو به‌منظور تکثیر ژن *fimH* در پروسه کلونینگ استفاده شد. در ژن *FimH* بعد از کدون شروع، کدون AAA قرار دارد. اگر ATG توالی *کوزاک* به‌عنوان کدون شروع استفاده می‌شد، باز G مربوط به توالی *کوزاک*، به‌جای باز A قرار گرفته و دومین کدون ژن *fimH* به‌جای AAA به GAA و نهایتا لیزین (اسیدآمینه بازی) به گلوتامیک‌اسید (اسیدآمینه اسیدی) تبدیل می‌شد. لذا نباید از ATG توالی *کوزاک* به‌عنوان توالی شروع استفاده کرد و باید از توالی شروع‌کننده مربوط به ژن *fim*H در پرایمر پیش‌رو استفاده شود.

نتیجه‌گیری

کاست ژنی pcDNA/*fimH* می‌تواند به‌راحتی و با موفقیت در سطح mRNA در لاین سلولی COS7 بیان شود و آماده استفاده برای ایمونیزاسیون در مدل حیوانی است.

منابع

1- Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Kuskowski MA. Bacterial characteristics in relation to clinical source of E.coli isolates from women with an acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. J Clin Microbiol. 2005;43(12):6064-72.

2- Langermann S, Ballou WR. Development of a recombinant FimCH vaccine for urinary tract infections. Adv Exp Med Biol. 2003;539(2):635-48.

3- Hooton TM. Recurrent urinary tract infection in women. Int J Antimicrob Agents. 2001;3:259-68.

4- Thanassi DG, Hultgren SJ. Assembly of complex organelles: Pilus biogenesis in gram-negative bacteria as a model system. Methods. 2000;20(1):111-26.

5- Langermann S, Ballou WR. Vaccination utilizing the FimCH complex as a strategy to prevent Escherichia coli urinary tract infection. J Infect Dis. 2001;183(1):84-6.

6- Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establishment of a persistent E.coli reservoir during the acute phase of a bladder infection. Infect Immun. 2001;69:4572-9.

7- Langermann S, Palaszynski S, Barnhart M, Auguste G, Pinkner JS, Burlein J. Prevention of mucosal Escherichia coli infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. Science. 1997;276(5312):533.

8- Suhk-Neung P, Yong-Hwa L. Recombinant DNA, plasmid, transformed microorganism and vaccine protein for prevention and therapy of urinary tract infection. USA: Patent 7001744; 2006.

9- Johnson RJ. Virulence factors in E. coli urinary tract infection. Clin Microbiol Rev. 1991;4:80-128.

10- Hopkins JW, Heisey MD, Uehling TD. Association of human leukocyte antigen phenotype with vaccine efficacy in patients receiving vaginal mucosal immunization for recurrent urinary tract infection. Vaccine. 1999;17:169-71.

11- Yong-Hwa L, Ryu DK, Kim BO, Pyo S. Expression and characterization of uropathogenic Escherichia coli adhesin protein linked to cholera toxin a2b subunit in Escherichia coli tb1. J Microbiol Biotechnol. 2003;13:552-9.

12- Reigstad S, Hultgren CH, Gordon IJ. Functional genomics studies of uropathogenic E. coli and host urothelial cells when intracellular bacterial communities are assembled. J Biol Chem. 2007;282:21259-67.

13- Sokurenko VE, Feldgarden M, Trintchina M, Weissman JS, Avagyan S. Selection footprint in the fimH adhesin shows pathoadaptive niche differentiation in Escherichia coli. Mol Biol Evol. 2004;21:1373-83.

14- Kozak M. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. Gene. 2002;299:1-34.

Archive of SID

www.SID.ir