

دانشور پزشکی

کلونینگ و بیان پروتئین سطحی HER2 انسانی در سطح سلول‌های یوکاریوتی با استفاده از تکنیک‌های ترانسفکشن و ترانسداکشن به منظور تولید تومور در موش

نویسندگان: یقظان ناجح طاهر^۱، فاطمه رهبری زاده^{۲*}، بتول ثقفی^۳، زهیر حسن صراف^۴

۱. کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴. استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

E-mail: rahbarif@modares.ac.ir

*نویسنده مسئول: فاطمه رهبری زاده

چکیده

مقدمه و هدف: سرطان پستان، پنجمین عامل شایع مرگومیر در سراسر دنیا بوده و در بین زنان شایع‌ترین سرطان کشنده است. HER2 یک آنتی‌ژن سطحی است که در حدود ۳۰ درصد سرطان‌های پستان، بیان افزایش یافته دارد. هدف این مطالعه کلونینگ ژن کپرنده HER2 در وکتور بیانی pCDNA3.1/Hygro⁺ و بیان این پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی LL2 و ایجاد مدل موشی سرطان پستان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: با تخلیص RNA، تکثیر ژن HER2 و کلون کردن آن در وکتور pCDNA3.1/Hygro⁺، سازه بیان‌کننده ژن HER2 ایجاد و از طریق توالی‌یابی تأیید گشت. در مرحله بعد، این سازه به سلول‌های سرطانی موشی LL2 منتقل گردید. برای ایجاد رده سلولی پایدار، سلول‌های ترانسفکته به مدت یک ماه در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین قرار داده شدند. سلول‌های حاصله، سرعت رشد کمی داشتند و منجر به ایجاد تومور نشدند. در کنار این کار، از سلول‌های LL2 ترانسداکت شده با لنتی‌ویروس حاوی HER2 استفاده کردیم که حدود ۱۰ سلول ترانسداکت شده به موش‌های C57BL/6 به روش زیرجلدی تزریق گردید. ده تا دوازده روز بعد از تزریق، تومور قابل لمس بود.

نتایج: ژن HER2 با موفقیت تکثیر و در وکتور پلاسمیدی pCDNA3.1/Hygro⁺ کلون شد. تزریق سلول‌های LL2 ترانسداکت و ترانسفکته شده با سازه حاوی HER2 به موش، نشان داد که فقط سلول‌های LL2 ترانسداکت شده با وکتور ویروسی pLEX HER2 قادر به بیان پایدار HER2 انسانی هستند.

نتیجه‌گیری: با کلونینگ و بیان HER2 در سلول‌های یوکاریوتی LL2 می‌توان مدل سرطان پستان HER2⁺ در موش ایجاد کرد.

واژگان کلیدی: کلونینگ، HER2، رده سلولی موشی LL2، تومور پستان، مدل موشی، ترانسفکشن

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و چهارم-شماره ۱۲۶
دی ۱۳۹۵

دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۰۸

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۵/۰۹/۲۲

پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۹

مقدمه

روش‌های درمانی سرطان پستان، عدم وجود مدل حیوانی مناسب است که بتوان به کمک آن به صورت قابل اطمینان، پروسه‌های مربوطه را در شرایط *in vivo* شبیه‌سازی نمود. بدین منظور اغلب از مدل‌های موشی گزنوگرافت استفاده می‌شود که در آن‌ها سلول‌های توموری انسانی به موش‌های فاقد سیستم ایمنی تزریق می‌شوند (۱۰). رده‌های سلولی سرطانی انسان، به خوبی در موش تومور نمی‌دهند و در صورت ایجاد تومور، اغلب ویژگی‌های غیرمنتظره مشاهده می‌شود. در مقابل، مدل‌هایی که با استفاده از رده‌های سلولی توموری موشی ایجاد شده‌اند، به نحو مؤثرتری تومور ایجاد می‌کنند و برای شبیه‌سازی خصوصیتی که در بیماران سرطانی دیده می‌شود، مناسب‌تر هستند (۱۱).

از طرفی موش‌های فاقد سیستم ایمنی علاوه بر هزینه بالای تهیه آن‌ها، نیازمند شرایط نگهداری خاصی نیز می‌باشند؛ چرا که باید در شرایط کاملاً استریل و با مراقبت‌های ویژه نگهداری شوند که خود باعث افزایش هزینه‌ها و دشواری انجام پروسه‌های تحقیقاتی می‌شود. بنابراین در صورتی که بتوان یک مدل تومور حاوی HER2 انسانی در موش آزمایشگاهی معمولی ایجاد کرد، برای تحقیقات با استفاده از مولکول HER2 بسیار مطلوب می‌باشد. مزیت دیگر این نوع مدل‌ها این است که امکان بررسی تومور را در یک مدل حیوانی با سیستم ایمنی طبیعی فراهم می‌کنند و از آنجایی که سیستم ایمنی، نقش مهمی در بروز سرطان و پروسه‌های مربوط به آن دارد، ایجاد چنین مدلی برای ارزیابی پروسه‌های پیشرفت سرطان و بررسی اثر داروها یا سایر روش‌های درمانی از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۲).

سلول‌های سرطان‌زای لوئیس مربوط به ریه، یک رده سلولی برگرفته از ریه موش C57BL است. LL2 یک رده سلولی جالب توجه می‌باشد که از رده سلولی Lewis Lung Carcinoma Cell مشتق می‌گردد (۱۳، ۱۴).

باتوجه به مطالب ذکر شده، در این مطالعه هدف ایجاد سلول‌های سرطانی موشی LL2 بیان‌کننده پروتئین HER2

سرطان پستان، پنجمین عامل شایع مرگ در سراسر دنیاست و در بین زنان، دومین عامل مرگ ناشی از سرطان است. ابتلا به این نوع سرطان در زنان بیشتر بوده، به گونه‌ای که ریسک ابتلا به این بیماری در زنان صد برابر بیشتر از مردان است (۱).

نشان داده شده که گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی - ۱۲ (Her-2/neu یا ERBB2)، در حدود ۳۰ درصد موارد سرطان پستان تکثیر یا بیان بیش از حد دارد، این امر HER2 را تبدیل به یک هدف درمانی مناسب برای سازندگان دارو کرده است (۲). رابطه‌ای معکوس بین گیرنده استروژن/ پروژسترون و بیان HER2 وجود دارد (۳). این گیرنده در سلول‌های طبیعی، نقش مهمی در تمام مراحل توسعه سلولی دارد (۴)؛ با این حال، جهش یا بیان بیش از حد HER2 به طور مستقیم می‌تواند منجر به ایجاد تومور و همچنین متاستاز گردد (۵-۳). ژن HER2 پروتئینی با وزن مولکولی ۱۸۵ کیلوالتون را رمزگذاری می‌کند. این مولکول در انسان، توسط ژن پروتوآنکوژن^۱ بر بازوی بلند کروموزوم ۱۷ کد می‌شود (17q21) و در بالغین به میزان کم بر روی برخی از بافت‌ها شامل قلب، پوست، اپیتلیوم مجرای گوارش، پستان، تخمدان، سلول‌های کبدی و آلوئل‌ها بیان می‌شود. این ژن در موش صحرایی روی کروموزوم 10q32.1 و در موش روی کروموزوم 11 قرار دارد (۶). Her2/ErbB2/neu یک گلیکوپروتئین داخل غشایی با فعالیت تیروزین‌کینازی می‌باشد و شباهت بسیار زیادی به مولکول‌های EGFR، HER4، HER3، HER1 دارد؛ به همین دلیل، آن‌ها را تحت عنوان «خانواده گیرنده فاکتور رشد»، CD340 یا p185 نام‌گذاری می‌کنند. اعضای این خانواده تمایل به جفت‌شدن با دیگر اعضا و ترجیحاً با HER2 را دارند. عنوان neu به این دلیل است که از یک رده سلولی موش صحرایی به نام نوروگلیوبلاستوما^۳ جدا شده است (۹-۶). یکی از مهم‌ترین موانع بر سر راه مطالعه و ارزیابی

1. Human epidermal growth factor receptor

2. Proto-oncogene

3. Neuroblastoma glioblastoma

شرکت Bioneer تخلیص و با روش الکتروفورز تأیید شد.

در مرحله بعد محصول PCR و پلاسمید pCDNA3.1/Hygro⁺ هر دو با استفاده از آنزیم‌های محدودالایر HindIII و XhoI برش داده شده و واکنش لیگیشن با استفاده از آنزیم ligase T4 DNA انجام گردید. پس از انجام واکنش لیگیشن، محصول واکنش به روش شیمیایی به باکتری TG1 ترانسفورمه گشت.

آماده‌سازی سلول‌ها

رده سلولی LL2 از بانک سلولی ایران (انستیتو پاستور) تهیه شده و در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO₂ ۵ درصد کشت داده شد.

ترانسفکشن و ترانسداکشن سلول‌های LL2

ترانسفکشن سلول‌های LL2 با سازه pCDNA3.1/Hygro⁺ حاوی ژن HER2 طبق روش توصیه‌شده شرکت به وسیله لیپوفکتامین انجام شد. یک روز قبل از انجام ترانسفکشن، سلول‌ها توسط لام هموسایتومتر شمارش شده و به تعداد $10^6 \times 4$ سلول در پلیت ۱۰ سانتی‌متری مخصوص کشت سلول، در محیط کشت EMEM حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شد. برای هر نمونه کمپلکس لیپوفکتامین به شرح زیر آماده شد: مقدار ۱۰۰ پیک مولار از نمونه وکتور موردنظر در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM بدون سرم رقیق شده و به آرامی چند بار مخلوط شد. دو میکرولیتر از لیپوفکتامین (Lipofectamine TM 2000- (Invitrogen) در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM بدون سرم مخلوط شده و ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس ترکیب وکتور و لیپوفکتامین رقیق شده با یکدیگر مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا کمپلکس Lipofectamin-DNA تشکیل شود. کمپلکس تشکیل شده به آرامی و به صورت قطره‌قطره به محیط سلول‌ها اضافه شده و پلیت چند بار به آرامی تکان داده می‌شود تا کمپلکس در سطح سلول‌ها به صورت

انسانی در سطح و نهایتاً بررسی امکان به‌کارگیری رده سلولی LL2 فوق جهت ایجاد مدل سلول موشی سرطانی بیان‌کننده پروتئین HER-2 انسانی است.

مواد و روش‌ها

تخلیص RNA از رده سلولی سرطانی پستان (BT 474) و ساخت cDNA

برای تخلیص RNA سلول‌های سرطانی (BT 474) از پروتکل استاندارد کیت استخراج RNA از شرکت MN استفاده شد. در ادامه برای تولید cDNA از mRNA استخراج‌شده، از آنزیم نسخه‌بردار معکوس (Invitrogen) و پرایمر Oligo dT (شرکت سیناکلون) استفاده شد.

طراحی پرایمر و کلونینگ در پلاسمید pCDNA3.1/Hygro⁺

پرایمر ژن HER2 با در دست داشتن توالی بخش رمزکننده آن (cgs)، به وسیله نرم‌افزار Gene Runner طراحی شده و سپس با نرم‌افزار Oligo مورد بررسی قرار گرفت. در طراحی این پرایمر، جایگاه شناسایی آنزیم‌های HindIII و XhoI در دو انتهای ۵' پرایمر Forward (جایگاه HindIII) و ۵' پرایمر Reverse (جایگاه XhoI) منظور گردید. پس از طراحی پرایمر، برای قطعه HER2، منحصر به بودن آن جهت تکثیر قطعه ژن با نرم‌افزار Blast اثبات گردید. توالی پرایمرها به شرح زیر می‌باشد:

Forward -5' CTAGCAGTGAGCACCATGGAGC
Reverse -5' CTCGAG CAAATGGACAAAGTGGGTGTGG

سپس جهت سنتز به شرکت ژن فناوران سفارش داده شد. پس از تکثیر ژن HER2، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد نمونه‌گذاری شد و پس از الکتروفورز، قطعه موردنظر از روی ژل بریده شده و جهت استخراج از ژل طبق کیت تخلیص از ژل شرکت MN عمل شد (۱۵).

برای تکثیر وکتور pCDNA3.1/Hygro⁺ ابتدا از باکتری E.coli سوش TG1 استفاده شد. تهیه باکتری مستعد TG1 با کمک محلول سرد CaCl₂ (50 mM) و نیز به روش الکتریکی انجام شد. پس از ترانسفورمه کردن پلاسمید موردنظر به درون میزبان TG1 به روش شوک حرارتی، پلاسمید در میزبان فوق تکثیر شده و با استفاده از کیت

بررسی بیان ژن HER2 به روش فلوسایتومتری

تست فلوسایتومتری با استفاده از پروتکل استاندارد برای بررسی اتصال آنتی‌بادی HER2 به سلول‌های LL2 ترانسفرم و ترانسداکت‌شده با سازه انجام شد. برای انجام فلوسایتومتری از آنتی‌بادی هرسپتین به‌عنوان آنتی‌بادی اولیهٔ مونوکلونال انسانی علیه HER2 با رقت ۱:۱۰۰ و آنتی‌بادی ثانویهٔ پلی‌کلونال ضد IgG انسانی متصل به FITC با رقت ۱:۵۰ استفاده شد. در نمونهٔ کنترل از آنتی‌بادی اولیه استفاده نشده بود.

ایجاد تومور در حیوانات

موش‌های C57BL/6 ماده با سن شش تا هشت هفته از حیوان‌خانهٔ انستیتو پاستور ایران واقع در کرج خریداری شده، پس از زمان دو هفته (به‌منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاه جدید)، موش‌ها به چهار گروه با تعداد چهار سر موش در هر گروه تقسیم شدند: دو گروه کنترل و دو گروه آزمون. سلول‌های سرطانی LL2 ترانسفکت‌شده با وکتور پلاسمیدی و نیز سلول‌های LL2 ترانسداکت‌شده با وکتور لنتی‌ویروس pLEX-MCS حامل ژن HER2 در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شده و پس از تکثیر آن‌ها به‌میزان مطلوب، سلول‌ها تریپسینه شده، با بافر PBS استریل شست‌و‌شو داده شده و شمارش شدند و رقت‌های 10^6 در هر ۰/۵ میلی‌لیتر از سلول‌ها تهیه شد. سپس به حیوانات گروه آزمون اول تعداد 10^6 سلول ترانسفکت‌شده با وکتور پلاسمیدی حاوی ژن HER2 و به گروه آزمون دوم 10^6 سلول ترانسداکت‌شده با وکتور ویروسی pLEX-MCS حامل HER2 و به موش‌های گروه کنترل اول نرمال سالین استریل و گروه کنترل دوم سلول‌های LL2 دست‌کاری‌نشده به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. موش‌ها به‌صورت روزانه از لحاظ خصوصیات ظاهری، تشکیل تومور قابل مشاهده و اندازه‌گیری قطر تومور مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یکنواخت پخش شود. پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد حاوی CO_2 ۵ درصد قرار داده شد.

بعد از انجام ترانسفکشن، سلول‌های LL2 به فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری، برای انتخاب توسط آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین با غلظت $800 \mu g/ml$ منتقل شد. در مدت سه ماه با فواصل دو تا سه روز تعویض محیط کشت صورت گرفت و هر بار آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین اضافه شد. این فرایند سه بار تکرار گردید؛ ولی هر بار سرعت تکثیر نزدیک به سرعت مرگ‌ومیر سلول‌ها بود. به‌دلیل عدم تکثیر مناسب سلول‌های ترانسفکت‌شده، به‌طور موازی اقدام به تکثیر سلول‌های ترانسداکت‌شده با لنتی‌ویروس حاوی HER2 (تهیه‌شده در آزمایشگاه ما) در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک پورومایسین (با غلظت $2 mg/ml$) نمودیم. مقدار آنتی‌بیوتیک موردنظر از آزمون تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سلول‌های LL2 به‌دست آمد. سلول‌های زنده، رشد داده شده و پس از چندین بار پاساژ بیان HER2 توسط فلوسایتومتری مورد تأیید قرار گرفت.

به‌طور خلاصه برای تولید لنتی‌ویروس‌های نو ترکیب و فعال حاوی ژن HER2، سلول‌های مولد ویروس (HEK293T) هم‌زمان با سه ناقل ویروسی به‌میزان ۲۱ میکروگرم از ناقل ترانسفر حاوی ژن HER2 و مقدار ۱۰۵ میکروگرم از هریک از ناقلین بسته‌بندی و غشایی با روش استاندارد فسفات کلسیم ترانسفکت شد. به‌دنبال آن، سلول‌های مولد ویروس تا زمان بسته‌بندی و رهاسازی ویروس‌ها در شرایط انکوباتوری فوق‌الذکر نگهداری شدند. محیط سلول‌های ترانسفکت‌شده در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد جمع‌آوری شده و پس از فیلتراسیون با استفاده از سانتریفوژ دور ۱۹۰۰۰ به مدت ۲ ساعت تغلیظ شدند. برای آلوده‌سازی سلول‌های هدف، مقادیر مشخص از استوک تغلیظ‌شده ویرونی به محیط کشت سلول‌ها (مشابه شرایط ترانسفکشن سلول‌های LL2) به‌آرامی افزوده شده و در شرایط انکوباسیون مذکور نگهداری شد.

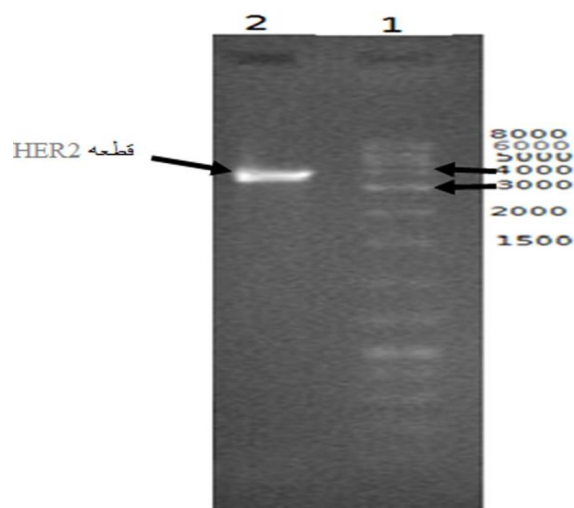
نتایج و یافته‌ها

تخلیص RNA از رده سلولی سرطان پستان (BT 474) و ساخت cDNA

پس از انجام پروسه استخراج RNA و ساخت cDNA و سپس انجام PCR بر روی آن، مطابق با روشی که در بخش قبلی اشاره شد، برای آنالیز از هر دو محصول (cDNA و RNA) با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ODهای ۲۸۰ و ۲۶۰ قرائت شد که نتایج عدد حدود ۲ را نشان می‌داد که دال بر تأیید تخلیص RNA و ساخت cDNA می‌باشد.

کلونینگ قطعه HER2 در پلاسمید pCDNA3.1/Hygro⁺

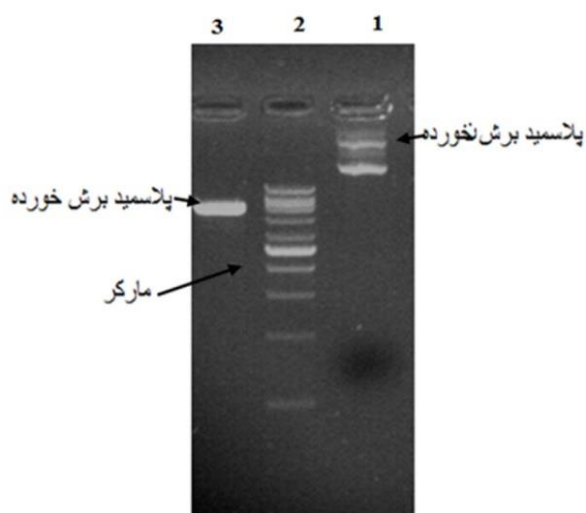
از پلاسمید استخراج شده، قرائت جذب نوری (OD) در ۲۶۰ nm انجام شد و محاسبه ضریب رقت با ضریب ثابت ۵۰ برای DNA دورشته‌ای انجام شد که معادل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و در ناحیه حدود ۳۰۰۰ تا ۴۰۰۰ bp باند موردنظر مشاهده شد. نتیجه انجام الکتروفورز در شکل ۱ آورده شده است. باند موردنظر از روی ژل بریده و استخراج شده، مورد هضم آنزیمی قرار گرفت.



شکل ۱. تکثیر محصول قطعه HER2 بر روی ژل آگارز ۱ درصد.

ردیف ۱ مارکر و ردیف ۲ مربوط به تکثیر قطعه HER2 می‌باشد که حضور باند با اندازه ۳۷۶۵bp تأیید می‌شود.

برای ساخت سازه حاوی HER2، پلاسمید pCDNA3.1/Hygro⁺ مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و محصول واکنش روی ژل آگارز الکتروفورز شد (شکل ۲).

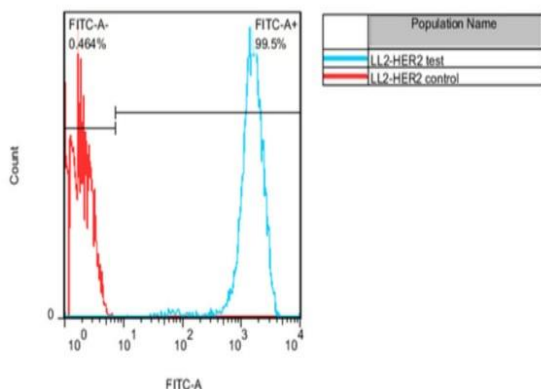


شکل ۲. هضم آنزیمی پلاسمید با دو آنزیم XhoI و HindIII.

ردیف ۱ نشان‌دهنده پلاسمید هضم نشده، ردیف ۲ نشان‌دهنده مارکر و ردیف ۳ نشان‌دهنده پلاسمید هضم شده می‌باشد.

در مرحله بعد محصول PCR هضم آنزیمی شده، با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase به وکتور پلاسمیدی دوخته شد. سپس محصول دوخت و دوز مولکولی به روش الکتروپوریشن به باکتری TG1 ترانسفورمه شد. به منظور بررسی صحت انجام کلونینگ، روی سازه‌های تخلیص شده از تک‌کلون‌های حاصله، با آنزیم‌های XhoI و HindIII، هضم آنزیمی انجام شد و نتیجه روی ژل آگارز الکتروفورز شد. نتایج حاصل در شکل ۳ مشاهده می‌شود.

سلول‌ها به ۱۰۶ عدد رسید که این تعداد برای انجام فلوسایتومتری و تزریق کافی نبود، پس فقط مبادرت به تزریق سلول‌های ایجادشده به موش کردیم.



نمودار ۱. تست فلوسایتومتری.

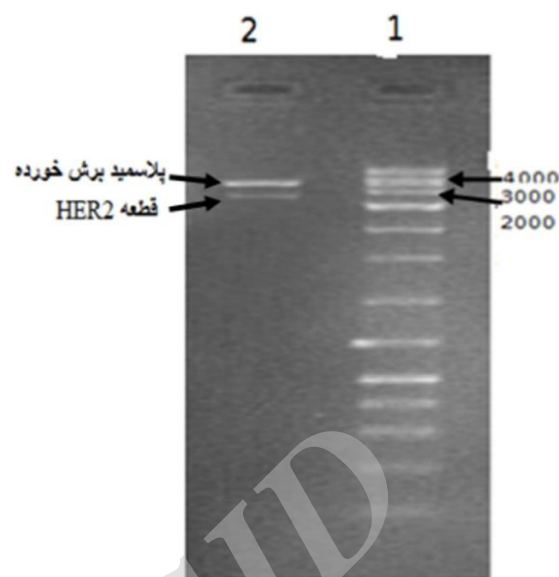
منحنی خاکستری مربوط به سلول‌های LL2 تیمارشده با آنتی‌بادی اولیه هرسپتین می‌باشد و منحنی سیاه مربوط به کنترل منفی است که با آنتی‌بادی اولیه تیمار نشده‌اند. نتایج نشان می‌دهد که آنتی‌بادی هرسپتین به ۹۹/۵ درصد سلول‌ها متصل شده است.

تومورزایی در حیوانات

نتایج نشان داد که در گروه کنترل اول که به‌عنوان گروه کنترل منفی نرمال سالین دریافت کرده بودند، همان‌طور که انتظار داشتیم هیچ‌یک از حیوانات علائم بیماری یا تومور نشان ندادند. در گروه کنترل دوم که به‌عنوان گروه کنترل مثبت سلول‌های LL2 دست‌کاری‌نشده تزریق شده بود، تمامی حیوانات حدود ده روز پس از تزریق، تومور قابل لمس تولید کردند که پس از گذشت دو هفته اندازه تومورها به حد قابل اندازه‌گیری رسید.

در گروه آزمون اول که سلول‌های ترانسفکت‌شده با وکتور pcDNA3.1/Hygro+ حاوی ژن HER2 را به‌روش زیرجلدی دریافت کرده بودند، در هیچ‌یک از حیوانات تومور قابل مشاهده و یا علائم بالینی مربوطه ارزیابی نشد.

در گروه سوم که سلول‌های ترانسداکت‌شده با وکتور لنتی‌ویروسی به‌صورت زیرجلدی تزریق شده بود، حدود



شکل ۳. هضم آنزیمی سازه جهت تأیید کلونینگ.

ردیف ۱ مارکر و ردیف ۲ هضم آنزیمی سازه را نشان می‌دهد.

پس از تأیید کلونینگ به‌روش هضم آنزیمی، نمونه پلاسمید تحت آنالیز تعیین توالی قرار گرفت. نتیجه تعیین توالی مؤید صحت کلونینگ قطعه HER2 در پلاسمید pCDNA3.1/Hygro+ می‌باشد.

ترانسفکشن سلول‌های LL2 حاوی HER2

پس از ترانسفکشن سلول‌های LL2، با کمک هیگرومایسین سلول‌های ترانسفکته جداسازی شدند؛ ولی به‌دلیل ایجاد سلول‌های با پایداری کم، بعد از چندین ماه کشت فقط حدود 5×10^6 سلول حاصل شد.

تست فلوسایتومتری

به‌دلیل تعداد کم سلول‌های ترانسفکت‌شده با پلاسمید حاوی ژن HER2، به‌ناچار مابقی تحقیق را با سلول‌های ترانسداکته بیان‌کننده HER2 که در آزمایشگاه قبلاً به‌وسیله سرکار خانم رشادمنش و همکاران تهیه شده بود، انجام دادیم. همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، نتایج فلوسایتومتری نشان داد که ۹۹/۵ درصد سلول‌های LL2 ترانسداکت‌شده با ویروس حاوی HER2، پروتئین HER2 انسانی را بیان کرده‌اند. درمورد سلول‌های LL2 حاوی سازه pcDNA3.1/Hygro+-HER2 به‌دلیل پایداری کم سلول‌ها، به‌زحمت بعد از چندین ماه کشت، تعداد

توالی‌یابی و بررسی آن‌ها با نرم‌افزار MegAlign نشان‌دهنده صحت توالی مولکول HRE2 بود.

از ابزارهای مهم در تحقیقات سرطانی در *in vivo* استفاده از موش‌های آزمایشگاهی است که به‌طور مصنوعی مبتلا به سرطان شده باشند. با توجه به اینکه مولکول HER2 یکی از رسپتورهای شناخته‌شده در مطالعات سرطان پستان است، تیم پژوهشی ما به‌دلیل کارهای تحقیقاتی روی مولکول HER2، نیاز به یک مدل موشی که بتواند HER2 انسانی را بیان کند، احساس می‌نمود؛ ولی از طرفی لازم بود که بتوان بدون استفاده از موش‌های نیود و سختی کار با آن‌ها، موش‌های عادی مثل C57BL/6 را برای این هدف به‌کار برد که با استفاده از سلول‌های دست‌کاری‌شده ژنتیکی که در سطحشان HER2 انسانی بیان می‌کنند، ولی سلول‌های موشی هستند و برای ایجاد تومور در موش نیاز به ایجاد شرایط خاص و یا استفاده از داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی ندارند و با هزینه کم کشت و تکثیر داده می‌شوند. در این تحقیق برای ایجاد مدل حیوانی توموری از رده سلولی LL2 و از موش‌های C57BL/6 استفاده شد. رده سلولی LL2 به‌طور خودبه‌خودی در ریه موش‌های C57BL/6 ماده ایجاد می‌شود. دلیل انتخاب این سلول‌ها، توان بالای تومورزایی این سلول‌ها در موش‌های C57BL/6 است (۲۲-۲۰) که این مسئله نه تنها در گزارش‌های متعدد محققان جهان، بلکه در آزمایشگاه ما نیز بارها مورد انجام و تأیید قرار گرفته است (۲۳).

در ابتدا به‌عنوان تومور HER2 منفی از سلول‌های LL2 دست‌کاری‌نشده استفاده نموده و مبادرت به تزریق این سلول‌ها به‌صورت زیرجلدی (تزریق تعداد 10^6 سلول سرطانی) در موش‌های پنج تا هفت‌هفته‌ای نمودیم که با ایجاد تومور و اندازه‌گیری آن از تولید تومور در این موش‌ها مطمئن شدیم.

از آنجایی که هدف از این تحقیق تولید تومور بیان‌کننده HRE2 در سطح سلول‌ها می‌باشد، در قدم بعدی باید این سازه‌های حاوی HRE2 را به سلول‌های LL2 منتقل می‌کردیم. بدین منظور سازه بیان‌کننده ژن

ده تا دوازده روز بعد از تزریق در سه سر از چهار سر موش مورد مطالعه، تومور قابل لمس در موش‌ها ایجاد شد.

بحث و نتیجه‌گیری

HER2/ErbB2 که یک آنتی‌ژن مهم در سرطان پستان است، به‌صورت‌های مختلف کلون، بیان و بررسی شده است، برای مثال طی تحقیقی که قبلاً انجام شده است، HER2/ErbB2 را در سلول‌های MCF-7 کلون و بیان کرده‌اند. در آن مطالعه HER2 به‌صورت کامل از روی RNA تخلیص‌شده از سلول‌های سرطان پستان تکثیر شد و سپس وارد وکتور پلاسمیدی pCDNA3.1 شد و با استفاده از لیپوفکتامین به داخل سلول‌های MCF-7 ترانسفکت شد، سپس سلول‌های حاوی وکتور، انتخاب شده و بیان پروتئین موردنظر با روش‌های مختلف بررسی شد (۱۶). در مطالعه دیگر به‌منظور درک ساختار و عملکرد HER2/ErbB2، این پروتئین در سلول‌های CHO کلون و بیان گردید. در این مطالعه ژن مذکور به داخل وکتور پلاسمیدی pSV کلون گردیده و با استفاده از لیپوفکتامین به داخل سلول‌های CHO ترانسفکت شد (۱۷). در مطالعه‌ای دیگر برای بررسی و درک نقش واریانت‌های مختلف HER2، واریانت کوتاهی از این پروتئین را در سلول‌های MCF-7 کلون کردند و مشخص شد که این واریانت ناقص به‌عنوان مهارکننده تکثیر سلول عمل می‌کند (۱۸). همچنین در مطالعه دیگری، HER2/ErbB2 را در داخل وکتور pCDNA6 کلون کرده و به سلول‌های سرطان EMT-6 (سلول سرطان پستان موش) ترانسفکت شده و در آن به‌صورت پایدار بیان کردند. این وکتور حاوی ژن قسمت دومین خارج سلولی HER2/ErbB2 بوده که تکثیر و سپس کلون شدن (۱۹). ما نیز در این تحقیق به‌منظور تولید مدل موشی سرطان پستان بیان‌کننده HER2 انسانی در سطح سلول‌های توموری، مبادرت به تخلیص RNA، ساخت cDNA، تکثیر و کلونینگ مولکول HRE2 نمودیم. نتایج کلونینگ دال بر موفقیت این فرایند بود؛ زیرا که نتایج

والد (سلول‌های LL2 دست‌کاری‌نشده) حدود ۷۵ درصد است؛ هرچند برای به‌دست‌آوردن میزان معنی‌دار نرخ تومورزایی سلول‌های ترانسداکت‌شده نسبت به سلول‌های والد بایستی این آزمون با تعداد موش بیشتر در دو گروه انجام پذیرد.

در بحث این نکته که چرا سلول‌های ترانسفکت‌شده با pcDNA3.1/Hygro⁺ حاوی HER2 سرعت مرگ‌ومیر بالایی داشتند و نتوانستیم با آن‌ها تومور ایجاد کنیم، به‌نظر می‌رسد که باید دلایل ذیل قابل‌ذکر باشد:

۱. به‌دلیل ترانسفکشن سلول‌های LL2 به‌وسیله لیپوفکتامین، احتمالاً میزان ورود ژن HER2 به داخل سلول‌ها کم است؛ پس متعاقباً بیان پایدار HER2 در تعداد اندکی از سلول‌ها صورت می‌گیرد و در نتیجه، ایجاد تومورهای HER2 در موش‌ها میسر نشد.

۲. وقتی که وکتور پلاسمیدی به داخل هسته سلول‌ها وارد شده، احتمالاً محل دخول ژن جدید در کروموزوم‌های سلول جایی است که بر تکثیر سلول‌ها اثر منفی می‌گذارد.

سایر احتمالاتی را که در این زمینه می‌توان در نظر گرفت به‌شرح ذیل است:

وکتورهای مختلف در رده‌های سلولی مختلف بیان متفاوت دارند؛ پس شاید وکتور پلاسمیدی pcDNA3/Hygro⁺ حاوی ژن HER2 وکتور مناسبی برای رده سلولی LL2 نباشد.

شاید رده سلولی LL2 توانایی بالایی در بیان پروتئین HER2 بر روی سطح خود ندارد و با بیان HER2 در سطح سلول مستعد مرگ سریع می‌شود.

به‌همین دلیل و برای آزمون اینکه آیا پروتئین HER2 که در سطح سلول بیان می‌شود، موجبات مرگ‌ومیر سریع سلول را فراهم می‌کند یا اینکه سلول LL2 می‌تواند بیان HER2 را در سطح داشته باشد و نیز ایجاد تومور در موش بکند، از سلول‌های ترانسداکت‌شده با وکتور ویروسی حاوی ژن HER2 استفاده شد. وکتورهای لنتی‌ویروسی نرخ بالایی در ترانسداکشن سلول‌ها و واردکردن ژنوم خود به داخل ژنوم سلول‌های

HER2 به‌کمک لیپوفکتامین به سلول‌های سرطانی موشی (LL2) منتقل گردید. در مرحله بعد با استفاده از آنتی‌بادی هیگرومایسین، سلول‌های ترانسفکت‌شده به‌مدت یک ماه مورد تیمار آنتی‌بیوتیکی قرار گرفتند؛ اما سرعت رشد و تکثیر سلول‌های حاوی این سازه کم بود و سلول‌های باقی‌مانده بعد از یک ماه تعداد بسیار کمی داشتند و هر بار در تعویض محیط می‌دیدیم تعداد زیادی از سلول‌های مرده در فلاسک کشت سلول دیده می‌شود. به‌عبارت‌دیگر تعداد سلول‌های حاصل از تکثیر با تعداد سلول‌های دچار مرگ‌ومیر شده نزدیک بود؛ بدین معنی که سلول‌های ترانسفکت‌شده سرعت مرگ‌ومیر بالایی داشتند. بعد از سه بار تکرار ترانسفکشن و تیمار با هیگرومایسین (حدود هشت تا نه ماه تلاش) تعداد سلول‌های زنده (و نزدیک به مرگ) نهایتاً نزدیک به 5×10^6 عدد رسید که بعد از تزریق به موش هیچ توموری ایجاد نکرد. سرعت بالای مرگ‌ومیر این سلول‌ها و اینکه نمی‌توانستیم تعداد زیادی سلول زنده داشته باشیم، از جمله عواملی بودند که تأیید بیان آنتی‌ژن HRE2 در سطح این سلول‌ها با روش فلوسایتومتری را ناممکن می‌کردند. به‌همین دلیل سلول‌های حاصل از ترانسفکشن بدون سنجش بیان HER2 مستقیماً به موش C57BL/6 تزریق شدند تا در صورت توفیق در ایجاد تومور، از نمونه توموری برای سنجش ایمنو‌هیستوشیمی (تأیید بیان HER2 بعد از تولید تومور) استفاده کنیم؛ ولی نتیجه این تلاش نیز عدم ایجاد تومور بود، به‌همین دلیل در مرحله بعدی از سلول‌های LL2 ترانسداکت‌شده با وکتور ویروسی pLEX-HER2 که قبلاً در آزمایشگاه ما تولید شده بود، استفاده کردیم. در ابتدا بیان پروتئین HER2 در سطح آن‌ها با روش فلوسایتومتری تأیید شد و سپس حدود 10^6 سلول به موش‌های C57BL/6 به‌صورت زیرجلدی تزریق گردید. ده تا دوازده روز بعد، تومور در محل تزریق قابل‌لمس بود. نتایج نشان داد که سلول‌های موشی بیان‌کننده HER2 انسانی قادر به ایجاد تومور در موش می‌باشند. همچنین نتایج بیانگر این بود که میزان تومورزایی مدل سلولی حاصله نسبت به سلول

موش وجود داشت، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های LL2 بیان‌کننده HER2 می‌تواند در موش‌های C57BL/6 تومور ایجاد نماید.

تشکر و قدر دانی

این تحقیق حاصل پایان نامه ارشد بیوتکنولوژی پزشکی است و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران کشور به طرح مصوب دکتر فاطمه رهبری‌زاده به شماره ۹۴۰۱۱۱۱۶ انجام شده است

منابع

1. Cancer-Its various types along with causes, symptoms, treatments and stages, in: cancer info guide. 2009.
2. Bookman MA, Darcy KM, Clarke-Pearson D, Boothby RA, Horowitz IR. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21(2): 283-90.
3. Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2010; 146(3): 264-75.
4. Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members". *Breast Cancer Research* 2001; 3(6): 385-9.
5. Garcia-Solis P, Yahia EM, Morales-Tlalpan V, Diaz-Munoz M. Screening of antiproliferative effect of aqueous extracts of plant foods consumed in Mexico on the breast cancer cell line MCF-7. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2009; 60(6): 39-46.
6. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230(4730): 1132-9.
7. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009; 14(4): 320-68.
8. Arteaga CL. ERBB receptors in cancer: signaling from the inside. *Breast Cancer Research* 2011; 13(2):304.
9. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 2001; 2(2):127-37.
10. Heppner GH, Miller FR, Shekhar PM. Nontransgenic models of breast cancer. *Breast Cancer Research* 2000; 2(5): 331-4.
11. Jonkers J, Derksen PW. Modeling metastatic breast cancer in mice. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2007; 12(2-3): 191-203.
12. Xanthopoulos JM, Romano AE, Majumdar SK. Response of Mouse Breast Cancer Cells to Anastrozole, Tamoxifen, and the Combination. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2005; 2005(1): 10-9.
13. Duś D, Budzyński W, Radzikowski C. LL2 cell line derived from transplantable murine Lewis lung carcinoma--maintenance in vitro and growth characteristics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)* 1985; 33(6):817-23.
14. Hoffman J, Schirner M, Menrad A. A highly sensitive model for quantification of in vivo tumor angiogenesis induced by alginate-encapsulated tumor cell. *Cancer Research* 1997; 57: 3847- 51.

15. Mepheron MJ. PCR the basics from background to bench, Springer-Verlag Telos. 2003.
16. Li R, Zheng H, Luo RC. Cloning and expression of the HER2 gene in MCF-7 cells. *Di 1 jun yi da xue xue bao: Academic Journal of the First Medical College of PLA* 2005; 25(10):1264-7.
17. O'Connor S, Li E, Majors BS, He L, Placone J, Baycin D, Betenbaugh MJ, Hristova K. Increased Expression of the Integral Membrane Protein ErbB2 in Chinese Hamster Ovary Cells Expressing the Anti-apoptotic Gene Bcl-xL. *Protein Expression and Purification* 2009; 67(1): 41-7.
18. Aigner A, Juhl H, Malerczyk C, Tkybusch A, Benz CC, Czubyko F. Expression of a truncated 100 kDa HER2 splice variant acts as an endogenous inhibitor of tumour cell proliferation. *Oncogene* 2001; 20, 2101-11.
19. Xu TF, Zhang WQ, Yu H, Li D. Construction of an eukaryotic plasmid encoding HER2 and screening of a cell line stably expressing clones. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi: Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology* 2009; 25(3): 226-8.
20. Dus D, Budzynski W, Radzikowski C. LL2 cell line derived from transplantable murine Lewis lung carcinoma-maintenance in vitro and growth characteristics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)* 1985; 33(6): 817-23.
21. Ramírez BS, Pestana ES, Hidalgo GG, García TH, Rodríguez RP, Ullrich A, Fernández LE. Active antimetastatic immunotherapy in Lewis lung carcinoma with self EGFR extracellular domain protein in VSSP adjuvant. *International Journal of Cancer* 2006; 119(9): 2190-9.
22. Lu Y, Wei YQ, Tian L, Zhao X, Yang L, Hu B, Kan B, Wen YJ, Liu F, Deng HX, Li J, Mao YQ, Lei S, Huang MJ, Peng F, Jiang Y, Zhou H, Zhou LQ, Luo F. Immunogene therapy of tumors with vaccine based on xenogeneic epidermal growth factor receptor. *Journal of Immunology* 2003; 15; 170(6): 3162-70.
23. Ghaem Maghami M. Tumor inhibitory effects of immunization with nano phage particle displaying super mimotope of EGFR on pVIII in animal model. [Dissertation]. Tarbiat Modares University: 2010.

Daneshvar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
24th Year, No.126
December 2016-
January 2017*

Received: 29/10/2016

Last revised: 12/12/2016

Accepted: 19/12/2016

Cloning and expression of human HER2 protein on eukaryotic cell surface by transfection and transduction techniques for tumorigenesis in a mouse model

Yaqzan Najeh Taher¹, Fatemeh Rahbarizadeh¹, Batoul Saqafi¹, Hasan Zoheir Sarraf²

1. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* Corresponding author e-mail: rahbarif@modares.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Breast cancer is the fifth common cause of death in the world and is considered as the leading cause of cancer related death among females. HER2 is a surface antigen which is overexpressed in 30% of breast cancer cases. The aim of this study was cloning of HER2 receptor gene in pCDNA3.1\Hygro⁺ expression vector, expression of this protein in LL2 eukaryotic cell line and production of a breast cancer mouse model.

Materials and Methods: The construct expressing HER2 gene was synthesized by RNA extraction, HER2 gene amplification and its cloning into pCDNA3.1\Hygro⁺ vector. The accuracy of cloning was approved by sequencing. In the next step, the construct was transfected into LL2 mouse cancer cells. To establish a stable cell line, transfected LL2 cells were cultured in hygromycin enriched medium for 1 month. The resultant cells had a very low growth rate. Having repeated the process three times, 10⁶ cells were eventually produced. Injection of these cells into mice led to no tumor formation. Moreover, LL2 cells transduced by HER2 containing lenti-viruses were used collaterally to form tumors. Meanwhile, 10⁶ transduced LL2 cells were injected subcutaneously into C57BL/6 mice. A tumor nodule was tangible 10 to 12 days post injection.

Results: The HER2 gene was successfully amplified and cloned into pCDNA3.1\Hygro⁺. Injection of transfected and transduced LL2 cells into mice demonstrated that only the LL2 cells transduced by the viral vector pLEX HER2 were able to express human HER2 gene stably.

Conclusion: By cloning and expression of HER2 on the LL2 cells, we could produce breast cancer model in mice expressing human HER2 on cells surface.

Key words: Cloning, HER2, LL2 cell line, Breast cancer, Mouse model, Transfection.