Archive of SID

بیان همزمان اینترلوکین-2 و B7.1 توسط وکتور آدنوویروس نوترکیب با استفاده از یک کاست بیان کننده محتوی جایگاه میانی ورود ریبوزوم (IRES)

دکتر محمد سعید حجازی [1] -پروفسور فرزین فرزانه [2]

تاریخ پذیرش: 82/4/8

Title: Simultaneous Expression of Interleukin-2 and B7.1 using a Recombinant Adenovirus Vector with a Single Expression Cassette Containing IRES.

Authors: Hejazi M.S.[1], Farzaneh F.[2]

Abstract: Immunogene therapy is one of the recently developed approaches for the potential treatment of leukaemia based on the leukaemic cells engineered to express immune stimulates and returning them to the patient after irradiation. In this case returned cells are expected to act as a vaccine and stimulate the immune system, specially T lymphocytes. Experiments have shown that expression of either IL-2 or B7.1 molecules have curative effect in murine leukaemia models. Recently, further studies showed that expression of IL-2 and B7.1 molecules together is more curative and reject the neoplastic cells resulting in the survival of up to 100% of the mice. This study aimed to evaluate the potency of recombinant adenovirus IL-2/IRES-B7.1 in expression of two IL-2 and B7.1 molecules simultaneously driven by one promoter and using IRES (internal ribosome entry site) sequence. Adenovirus GFP was used as a marker vector to evaluate the potency of recombinant adenoviruses in infection of the cells and induction of the transgene in mouse leukaemic C1498 cells. Adenovirus delta, a similar vector but without the two genes, was used as the control vector. The expression of B7.1 molecule on the surface of the cells was determined by FACS analysis and secretion of IL-2 was evaluated by ELISA. The results showed that adenovirus GFP can transduce C1498 and induce expression of GFP in these cells. This result indicates that adenovirus vectors can transduce C1498 cells. Adenovirus IL-2/IRES/B7.1 vector infection induces the expression of B7.1 on the surface of about 38% of the cells and also secretion of IL-2 at about 150 $\rho g/ml/10^6$ cells/24 hours by the transduced cells. As the conclusion it can be said that two IL-2 and B7.1 gene can be expressed using a single expression cassette with employing IRES. Additionally, adenovirus vectors transduce C1498 cells and adenovirus IL-2/IRES/B7.1 vector is able to induce the expression and secretion of B7.1 and IL-2 respectively.

Key words: Recombinant adenovirus, Vector, Expression, Interleukin-2, B7.1, Internal rebosome entry site (IRES).

1- Assistant Professor, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences. 1- استادیار دانشکده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي تبريز.

2- Prof. and Head of Molecular Medicine Dept., Rayne Institute, GKS' School of Medicine, London, UK. 2- پروفسور و رئیس دپارتمان طب مولكولي، انستیتو رین كینگز كالج لندن، انگلیس.

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده

ایمونوژن درمانی یکی از روش های تازه ابداع شده است که توانائی آن در درمان بیماری های سرطان خون امیدوارکننده است. مطالعات نشان داده اند که بیان مولکول های تحریک کننده ایمنی مانند GM-CSF، ICAM-1 ، اینترلوکین-12 ، اینترفرون –گاما، اینترلوکین -2 و B7.1 در مدل های حیوانی اثرات قابل توجهی در درمان سرطان خون داشته اند. مطالعات بعدی نشان دادند که بیان همزمان IL-2 وB7.1 منجر به درمان 100٪ موش های آزمایشی شد. با توجه به اثر مطلوب بیان همزمان IL-2 و B7.1 در درمان سرطان لازم است تا وکتور مناسبی برای بیان همزمان این دو پروتئین طراحی و ساخته شود. در این مطالعه از وکتور آدنو ویروس نوترکیبIL-2/IRES/B7.1 برای بیان همزمان IL-2 و B7.1 درسلول های C1498 لوکمیک موش استفاده گردید. بدین منظور سلول ها با وکتور نوترکیب آلوده شده و سپس ترشح IL-2 و بیان B7.1 روی سلول های آلوده شده بررسی گردید. بیان مولکول های B7.1 روی سلول با استفاده از دستگاهFACS و ترشح IL-2 با استفاده از آزمایش ELISA اندازه گیری شد. در این مطالعه از آدنوویروس GFP بعنوان حامل نشانگر استفاده گردید. علاوه بر این آدنوویروس دلتا بعنوان حامل کنترل بکار گرفته شد. این وکتور شبیه وکتورهای قبلی بود تنها با این تفاوت که فاقد دو ژن IL-2 و B7.1 یا GFP بود. نتایج آزمایش آلودگی با آدنوویروس GFP نشان دادند که آدنوویروس نوترکیب توانائی آلوده سازی سلول های لوکمیکC1498 را دارد و می تواند باعث القاء بیان پروتئین GFP در این سلول ها می شود. همچنین نتایج نشان دادند که وکتور آدنوویروس نوترکیب IL-2/IRES/B7.1 توانائی القاء بیان همزمان دو پروتئین IL-2 و B7.1 درسلولهای آلوده شده را دارد. براساس این نتایج آدنوویروس IL-2/IRES/B7.1 بیان مولکولB7.1 و ترشح اینترلوکین 2–را بترتیب بیش از 9 و 10 برابر افزایش می دهد. آلودگی سلول ها با این ویروس منجر به بیان B7.1 روی سطح 38٪ سلولها و ترشح IL-2 به مقدار 150pg/ml/106cells/24 hours توسط سلول های آلوده گردید. به عنوان نتیجه می توان گفت که وکتورهای آدنوویروس نوترکیب توانائی آلوده سازی و القاء بیان ژن در سلول های لوکمیک C1498 را دارند . بدین معنی که آدنوویروس نوترکیب به رسپتورهای سطح سلولی سلول های C1498 متصل شده ، وارد سلول گشته و نهایتا ژنوم خود را وارد هسته نموده و بیان پروتئین نوترکیب را بر روی سطح سلول ها القاء می کند. علاوه بر این دو پروتئین IL-2 وB7.1 می توانند با استفاده از یک پروموتور و بکارگیری جایگاه میانی ورود ریبوزوم (internal ribosome entry site; IRES) در این سلول ها بیان شوند. این مطالعه همچنین نشان داد که وکتورهای آدنوویروس نوترکیب که محتوی یک کاست بیان کننده با جایگاه میانی ورود ریبوزوم (IRES) هستند توانائی بیان دو پروتئین اینترلوکین-2 و B7.1 با استفاده از یک پروموتور را در این سلول ها دارند.

گل واژه گان : آدنو ویروس نو ترکیب، وکتور، بیان، اینترلوکین –2 ، B7.1 ، جایگاه میانی ورود ریبوزوم.

مقدمه

ایمونوژن درماني يكي از روش هاي تازه ابداع شده است كه بيشتر بر اساس انتقال ژن هاي تقويت كننده سيستم ايمني به سلول هاي بدن است. توانائي ايمونوژن درماني در درمان بيماري هاي سرطان خون امیدوارکننده است. این روش درمان بر اساس مهندسي

www.SID.ir

Archive of SID

ژنتيكي سلول هاي خوني بمنظور بيان عوامل تحريك كننده سيستم ايمني ورادياسيون سلول هاي تغيير يافته و در نهايت تزريق مجدد آنها به بدن بيمار است. مطالعات نشان داده اند كه بيان مولكول هاي تحريك كننده ايمني به صورت منفرد ويا توام با هم مانند GM-CSF (1)، ICAM-1 (2)، اينترلوكين-2 (3-7)، B7.1 (8)، اينترفرون –گاما و GM-CSF (9)، اينترلوكين-2 و p53 (10)، B7.1 و ICAM-1 (11)، اينترلوكين-12و B7.1 (12-14)، B7.1 و GM-CSF (15)، اينترلوكين-2 و اينترلوكين-12 (16-17) در مدل هاي حيواني اثرات متفاوت و قابل توجهي در درمان سرطان خون داشته اند.

سلول هاي سايتوتوكسيك T براي فعال شدن به اينترلوكين-2 نياز دارند. اينترلوكين-2 باعث تكثير[1]، تمايز[2] و فعال شدن سلول هاي T مي شوند. مطالعات درون تني در مدل هاي حيواني و انساني نشان داده اند كه مصرف دوزهاي بالاي اينترلوكين-2 باعث از بين رفتن و حذف سلول هاي لوكميك از بدن مي شود (18). سلول هاي T آنرژيك نفوذ كننده شونده به درون تومورها[3] كه به حالت غير فعال هستند، متعاقب مصرف اينترلوكين-2 خارجي به صورت درون تني به شكل فعال در آيند و توانائي شناسائي آنتي ژن هاي توموري را كسب كنند (19). Fearon و همكاران همچنين گزارش نمودند كه اينترلوكين-2 پاسخ ايمني بر عليه تومور را با بلوكه نمودن ايجاد آنرژي نيز تقويت مي كند (19). ديگر محققين نشان دادند كه تزريق همزمان سلول هاي ترشح كننده اينترلوكين-2 با سلول هاي لوكميك وحشي[4] مانع تشكيل تومور مي شود و باعث القاء سطح بالائي از فعاليت ايمني سلولي اختصاصي توموري مي گردد (20-21).

محققين نشان داده اند كه بيان مولكول B7.1(CD80) يا B7.2(CD86) بر روي سلول هاي توموري نيز منجر به فعال شدن سلول هاي T سايتوتوكسيك و سلول هاي CD4+ T بر عليه سلول هاي توموري به صورت *in vivo* و *in vitro* مي شود. در واقع بيان اين مولكول ها بر روي سلول هاي توموري باعث مي گردد تا سلول هاي توموري توسط سلول هاي T و NK بهتر و بيشتر شناخته شوند و از بين روند (22).

بيان اين مولكول ها نه تنها براي شروع فعال سازي سلول هاي T لازم است بلكه در افزايش آسيب پذيري سلول هاي توموري در مرحله فعال پاسخ ايمني نيز ضروري است. Hirona و همكارانش نشان دادند كه تزريق چند باره سلول هاي توموري M1 بيان كننده مولكول B7.1 باعث درمان 67% موش هائي شد كه قبلا دوزهاي كشنده سلول تومورزاي M1 دريافت كرده بودند (8).

مطالعات ديگر نشان دادند كه خاصيت تومورزائي سلول هاي توموري[5] با بيان مولكول اينترلوكين-2 يا B7.1 به تنهائي كاهش نمي يابد (23). تحقيقات Cayeux و همكارانش به نتايج مشابهي در سلول هاي توموري J558L منجر گرديد. آنان هم چنين نشان دادند كه بيان همزمان دو مولكول اينترلوكين-2 و B7.1 منجر به حذف سريع و مؤثر سلول هاي توموري مي گردد نسبت به زماني كه هر يك از اين مولكول ها به تنهائي در سلول هاي توموري بيان مي گردند (24). مطالعات Emtage و هكارانش نيزبه نتايج مشابهي در خصوص خاصيت سينرژيستي IL-2 و B7.1 منجر

1- proliferation
2- differentiation
3- anergic tumour infiltrating lymphocytes; TILs
4- wild type leukaemic cells
5- NC (MHCI positive and MHCII negative)

www.SID.ir

Archive of SID

گردید (25). مطالعات دیگراین گروه نشان داد که بیان همزمان این دو مولکول منجر به حذف کامل سلول هاي توموري در مدل هاي حيواني شد (26).
به علت اثرات جانبي مصرف سيستميك اينترلوكين -2 و همچنين عدم امكان مصرف سيستميك مؤثر B7.1 لازم است اين دو پروتئين بصورت موضعي به بافت هدف رسانده شوند.براي نيل به اين هدف وجود وكتور مناسبي كه بتواند سلول هاي هسته دار را آلوده نموده و ژن هاي دو پروتئين مزبور را بطور مؤثر به درون سلول ها رسانده و توانائي القاء بيان همزمان هر دوژن را داشته باشد حائز اهميت ويژه است. آدنوويروس هاي انساني كه مسئول ايجاد بيماري هاي خفيف نظير عفونت دستگاه تنفسي فوقاني در انسان هستند جزء وكتورهاي ويروسي هستند كه در پروتكل هاي انتقال ژن و ژن درماني استفاده مي شوند. بيش از 40 سروتيپ مختف آدنوويروسي تا كنون شناسائي شده اند. از بين سروتيپ هاي مختلف معمولا سروتيپ هاي 2 و 5 در پروتكل هاي ژن درماني استفاده مي شوند. آدنوويروس ها, وكتورهاي مناسبي براي ژن درماني هستند زيرا آنها در جريان خون پايدار بوده و ژن مورد نظر را بطور مؤثر به محل مي رسانند. آلودگي با تيپ وحشي آدنوويروس عوارض و علائم شديد توليد نمي كند. علاوه بر اين آدنوويروس ها با بيماري هاي بدخيم مرتبط نيستند (27-28).
يكي ازروش هائي كه براي بيان همزمان بيش از يك پروتئين با استفاده از يك شروع كننده[1] پروموتور ابداع شده است، بكارگيري جايگاه مياني ورود ريبوزم است كه اولين بار براي وكتورهاي رتروويروسي ابداع گرديد (29-30). هدف از انجام اين مطالعه بررسي توانائي آلوده سازي و القاء بيان همزمان دو مولكول اينترلوكين-2 و B7.1 با استفاده از يك كاست بيان كننده و به كارگيري توالي IRES در سلول هاي حيواني توسط آدنوويروس نوتركيب ساخته شده بود.

مواد و روش كار

رده سلولی C1498: سلول هاي C1498 (موجود در دپارتمان طب مولكولي) سلول هاي لوكميك موش از نوع سلول هاي (T cells) هستند. اين سلول ها در محيط RPMI 1640 محتوي 10% سرم جنين گاو (FCS) ، پني سيلين به مقدار (100 IU/ml) و استرپتومايسين به ميزان 100µg/ml كشت داده شدند. سلول هاي C1498 ماركر گرانولويست-1 (gran-1) و دو نوع ماركر مختلف ماكروفاژي Mac-1 و Mac-2 را بر سطح خود بيان مي كنند. اين سلول ها هر دو مولكول ICAM-1 و ICAM-2 و همچنين مقادير زيادي مولكول LFA-1 را بيان مي كنند. تخريب اين سلول ها توسط سلول هاي T و NK بصورت *in vitro* وابسته به وجود مولكول هاي CD8 و LFA-1 بر روي سلول هاي عامل و مولكول هاي MHCI ، ICAM-1 و ICAM-2 بر روي اين سلول ها است. پوشاندن هر يك از اين مولكول ها منجر به كاهش تخريب اين سلول ها توسط سلول هاي عامل ايمني مي شود بطوريكه اين اثر حدود 40% در مورد مولكول هاي ICAM-1 يا ICAM-2 و حدود 100% در مورد مولكول LFA-1 است. اين سلول ها آنتي ژن هاي خود را بر روي MHCI كه به مولكول سطحي CD8 در روي سلول هاي T متصل مي شود بيان مي كنند. حضور آنتي ژن بر روي مولكول MHCI كه به مولكول CD8 متصل مي شود براي تحريك سلول هايT سايتو توكسيك لازم است. بيان ژن IL-2 در اين سلول ها توسط وكتور

1- Promotor.

www.SID.ir

Archive of SID

رتروويروسي تومورزائي اين سلول ها را بـدليل تحريـك سلول هاي T توسط مولكول سطحي CD8 كم مي كنـد (31).

محيط كشت **RPMI1640** : محيط RPMI1640 (سيگما) بـراي كشـت سـلول هـاي C1498 مـورد اسـتفاده قـرار گرفـت . ايـن محـيط محتـوي نمـك هـاي آلـي ، كربوهيدراتها، آمينو اسيد ها ، ويتامين ها و گلوتامـاكس است كه براي رشد سلول ها لازم است. قبـل از اسـتفاده به ايـن محيط سرم جنـين گـاو (FCS) بـه مقـدار 10% ، پني سيلين و استرپتومايسين افزوده گرديد.

حامل آدنـوويروس نوتركيـب **IL-2/IRES/B7.1** : ايـن وكتور يك حامل ويروسي باپايه آدنوويروس (تهيه شـده در دپارتمان طب مولكولي) است كه در آن با استفاده از وكتور pCA13 كه يك وكتور 6/9 kb اسـت cDNA ي كد كننده اينترلوكين-2 انساني و مولكول سـطحي B7.1 انسـاني بـه همـراه سـكوئنس ميـاني ورود ريبـوزوم[1] ويروس انسفالوميوكاردايتيس وارد شده است. هـدف از گنجانـدن سـكوئنس IRES مـا بـين دو cDNA فـراهم سازي امكان بيان دو مولكول با استفاده از يك پروموتور اسـت . ايـن cDNA هـا توسـط پروموتـور ويـروس سـيتومگالو رانـده شـده و توسـط سـيگنال آدنيلاسـيون ويروس SV40 آدنيله مي شوند (شكل 1a).

حامل آدنوويروس نوتركيب **GFP** : اين وكتـور بعنـوان حامـل نشـانگر بـــراي بـــررسي امكـان آلـوده سـازي سلول هاي C1498 توسط وكتور آدنوويروس نوتركيـب مورد استفاده قـرار گرفـت. ايـن وكتـور (تهيـه شـده در دپارتمان طب مولكـولي) محتـوي اينسـرت pCA13 بـه طول 6/9 kb است كـه مـابين Pcmv و SV40 PolyA ژن كد كننده پروتئين سـبز فلئورسـانت گنجانـده شـده است (شكل 1b).

حامل آدنوويروس دلتا (خالي) : اين ويروس (تهيه شـده در دپارتمان طب مولكولي) محتوي اينسرت pCA13 به طول 6/9kb است كه در آن سـيگنال پلـي آدنيلاسـيون ويـروس SV40 بلافاصـله بعـد از پروموتـور ويـروس سيتومگالو قرارگرفته است و ما بـين آنهـا هـيچ cDNA ئي كلون نشده است (شكل 1c) .

كشت دادن سلول ها : بعد از ذوب كردن سلول هـا، دي متيل سولفوكساييد[2] از محيط شسته شد. براي اين منظور 10 ml از محيط كشـت بـر روي سـلول هـا افـزوده شـد وسپس به مدت 10 دقيقه سانتريفوژ گرديد.

بعد از دور ريختن مايع روئي سلول ها در محـيط كشـت تـازه پراكنـده شـده و سـپس در ظـروف T25 ودر انكوباتور در دمـاي 37°C و در حضـور $CO_2$5% كشـت داده شدند. سلول ها هر 3-2 روز تقسيم شدند.

آلوده سـازی سـلول هـا بـا وكتـور آدنـوويروس: آلـوده سازي سـلول هـا بـا ويـروس در محـيط بهينـه محتـوي FCS %0/5 انجام گرفت. در اين روش $1 x10^6$ سـلول پس از شستشو در 50 ميكرو ليتر محـيط كشـت پخـش شدند و بر روي آنها ويروس افزوده شد. نسبت ويروس به سلول 100 به 1 بود. پس از 2 ساعت انكوباسيون -كه هر 15 دقيقه يكبار به هم زده مي شد- سلول هـا شسـته شـده و پـس از 24 سـاعت كشـت در محـيط كشـت RPMI1640 براي اندازه گيري بيان ژن مورد آزمـايش قرار گرفتند.

آزمـــــــايش انـــــــدازه گيـــــــری **ELISA (Enzyme linked immuno-sorbent assay)** :

اندازه گيري مقدار اينترلوكين ترشحي توسط سـلول هـا با آزمـايش ELISA انجـام گرفـت. در ايـن آزمـايش از

1- internal ribosome entry site; IRES

2- dimethyl sulfoxide (DMSO)

www.SID.ir

Archive of SID

آنتي بادي منوکلونال ضد اینترلوکین-2 انساني موش[1] به عنوان آنتي بادي پوشاننده و از آنتي بادي بیوتینه شده بز که بر علیه آنتي بادي ضد اینترلوکین-2 انساني[2] بود بعنوان آنتي بادي شناساگر[3] استفاده شد. عامل فعال در این روش HRPO[4] کونژوگه شده به استرپتوآویدین بود. این آنزیم بر روي تترا متیل بنزیدین دي هیدروکلراید[5] اثر نموده و تولید متابولیت زردرنگ مي کند که در حضور اسید سولفوریك 2 مولار تولید رنگ آبي مي کند. نهایتا جذب نوري نمونه ها در 450 نانومتر خوانده شد.

آنالیز (Fluorescence-activated cell sorter) FACS: وجود مولکول B7.1 بر روي سلول ها با دستگاه فلوسیتومترساخت کارخانه بکتون دیکینسون (Becton Dickinson FACScan machine) وبا روش نشاندار نمودن مستقیم با آنتي بادي بررسي شد. در این آزمایش از آنتي بادي منوکلونال ضد اینترلوکین-2 انساني موش که به فیتواریترین[6] کونژوگه شده بود[7] و تولید رنگ قرمز مي کرد استفاده گردید. بیان پروتئین سبز بر روي سلول ها با استفاده ازدستگاه FACS و با آنالیز فلئورسانس سبز اندازه گیري شد.

نتایج

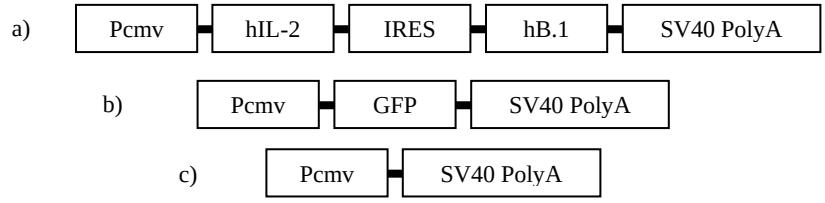
اندازه گیری بیان پروتئین سبز فلئورسانس GFP (Green Fluorescent Protein) در سلول های آلوده نشده: براي اینکه قدرت آلوده سازي و بیان پروتئین GFP توسط وکتور آدنو ویروس بررسي شود لازم بود نخست مقدار فلئورسانس سبز منتشر شده از سلول هاي طبیعي (آلوده نشده) C1498 اندازه گیري شود. براي این کار مقدار فلئورسانس سبز منتشر شده از سلول هاي آلوده نشده توسط دستگاه FACS اندازه گیري شد. نتایج آزمایش (شکل 2- I) نشان داد که تنها 1/02% سلول هاي انتخاب شده (gated) و 0/81% کل سلول ها فلئورسانس سبز از خود منتشر نمودند که در بیانگر عدم بیان این مولکول و هم چنین عدم انتشار فلئورسانس سبز توسط سلول هاي C1498 بود.

اندازه گیری بیان GFP توسط سلول های آلوده شده با ویروس خالی (دلتا): در این مطالعه آدنوویروس خالي به عنوان وکتور شاهد بکار گرفته شد. براي بررسي میزان تغییرات فلئورسانس انتشاري توسط سلول ها متعاقب آلودگي با آدنو ویروس نوترکیب صرف نظر از بیان مولکول GFP لازم بود میزان فلئورسانس سلول ها پس از آلوده شدن با ویروس دلتا بررسي گردد. از آنجائي که ویروس نوترکیب انتخابي براي بیان پروتئین هاي IL-2 و B7.1 از نوع آدنو ویروسي بود وکتور شاهد نیز از نوع آدنوویروس انتخاب گردید. در این مرحله سلول ها با ویروس خالي آلوده شدند و سپس مقدار فلئورسانس سبز اندزه گیري شد. مقدار سلول برداشته شده 10^6 سلول در هر چاهك ومقدار ویروس بکاررفته نسبت به سلول ها به نسبت 100 به 1 بود. این آزمایش سه بار انجام گرفت و نتایج مندرج معدل مخلوط نمونه ها است.

1- monoclonal mouse anti-human-IL-2 antibody
2- biotinated goat anti-human-IL-2 antibody
3- Pharmingen, San Diago
4- horse radish peroxidase
5- tetramethyl-benzidine dihydrochloride
6- phytoerythrin; PE
7- R&D Systems, Minneapolis

www.SID.ir

Archive of SID



شكل 1: ساختمان كاست هاي گنجانده شده درون حامل هاي آدنوويروس نو تركيب a: حامل آدنـوويروس IL-2/IRES/B7.1 يـك وكتـور نـو تركيـب آدنوويروسـي است كه در آن cDNAي دو پروتئين اينترلوكين- 2 انساني (hIL-2) و B7.1 انساني (hB7.1) داخل گرديده است. در اين كاست دو cDNA ي مزبور توسط پروموتـور ويروس سيتومگالو (Pcmv) رانده شده و توسط سيگنال پلي آدنيلاسيون ويروس SV40 (SV40 PolyA) آدنيله مي شوند. وجود توالي IRES در اين كاست امكان بيان دو مولكول مزبور را با استفاده از يك پروموتور (پروموتور ويروس سيتومگالو) فراهم مي كند. b: اين كاست محتوي ژن GFP است كه توسـط پروموتـور ويـروس سيتومگالو (Pcmv) رانده شده و با سيگنال آدنيله كننده ويروس SV40 (SV40 PolyA) آدنيله مي شود. c: اين ويروس محتوي پروموتور ويروس سيتومگالو است كه بلافاصله بعد از آن سيگنال آدنيلاسيون ويروس SV40 قرار گرفته، گنجانده شده است. از آنجاييكه بين Pcmv و SV40 PolyA هيچ cDNA ئي قـرار نگرفتـه و ايـن ويروس پروتئين خاصي را كد نميماند، حامل مزبور آدنوويروس نو تركيب دلتا (خالي) نامگذاري شد.

همان طـور كه در شكل (II –2) نشـان داده شـده اسـت 0/89% سلـــول هـــاي انتـــخاب شـده و 0/81% كـل سلول هاي آلوده شده با ويروس خالي نـور فلئورسـانس سبز از خود ساطع نمودند. اين نتايج تقريبا معادل نتـايج FACS سلول هـاي نرمـال اسـت. ايـن نتـايج بيـانگر آن است كه آلودگي با ويروس دلتا تغييري در فلئورسانس سبز سلول ها ايجا نمي كند.

بيان پروتئين سبز فلئورسانس توسط سلول هـاى آلـوده شـده بـا ويـروس GFP: هـدف از انجـام ايـن آزمـايش بررسي امكان آلـوده سـازي و القـاء بيـان ژن در سـلول هـاي C1498 بـا وكتورهـاي آدنوويروسـي بـود. ايـن پروتئين يك ماركر پروتئينـي فلئورسـانس اسـت كـه در طول موج 395 نانومتر تحريك شده و نور سبزي از خود منتشر مي كند كـه در طـول مـوج509 نانومتـــر انـدازه گيري مي شود. اين پروتئين بسـيار پايـدار اسـت. GFP در حـــال ســـنتز فلئورســـانت نيســـت ولـــي متعاقـــب اكسيداسيون درون سلولي و تحمل تغييـرات كروموفـور حالت فلئورسانت مي گيرد. از آنجائي كه ايـن پـروتئين سمي نيست و به سلول ها آسيب نمي رسـاند بـه عنـوان پروتئين ماركر انتخاب گرديد. نتايج آنـاليز FACS بـراي اندازه گيري پروتئين GFP بر روي سطح سلول ها نشان داد كـه آدنـوويروس نوتركيـب ايـن سـلول هـا را بـا مـوفقيت آلوده كرده وGFP بـــرروي سطح سلول هاي آلوده شده بيان مي گردد. همـان طـور كـــه در (شـكل III –2) نشان داده شـــده اسـت پـروتئين GFP بـر روي حدود 65/78% سـلول هـاي انتخـاب شـده و 54/09% كل سلول هاي آلوده شده بيـــان گـرديـد. بر اساس اين داده ها مقدار فلئورسـانس سـبز در سـلول هـاي آلـوده شـده بـا ويـروس GFP بـيش از 65 برابـــر مقـــدار فلئورسانس سبز سلول هاي آلوده نشـده و سـلول هـاي آلوده شده با ويروس دلتا است.

آناليز بيانB7.1 برروى سلول هاى نرمال C1498: براي آنـاليز مقـدار بيـان مولكـول B7.1 متعاقـب آلـودگي بـا ويروس نوتركيب ابتداء مقدار اين مولكول كه به صورت طبـيـعي بر روي سطـح سلـول هـاي آلـوده نشـده بيـان مـي شـود آنـاليز گرديـد. بيـان مولكـول B7.1 بـر روي سطح سلول هـا بـا اسـتفاده از دسـتگاه فلـوريمتري و بـا اندازه گيري رنگ قرمز منتشر شده بررسي شد.

نـــتـايـج آنـــالـيـــزفـلـــوسـيـتـومـتـري كـه در شـكل 3I– نمـــايش داده شـــده است نـــشان داد كه پـروتئين B7.1(CD80) در 4/17% سلـــول هـــاي انـتحـــاب شـــده و2/44% كـــل سلـــول هـاي آلـوده نـشـده بـيـان مـي گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه گیری بیان B7.1 برروی سلول های آلوده شده با ویروس خالی: براي بررسي و آناليز بيان مولكول B7.1 توسط آدنوويروس IL-2/IRES/B7.1 صرف نظر از اثرات القائي ناشي از آلودگي با ويروس كه مي تواند بر روي ميزان بيان مولكول هاي ايمني تاثير گذارد، سلول ها با وكتور آدنو ويروس خالي آلوده و سپس مقدار بيان پروتئين B7.1 بر روي سلول ها اندازه گيري شد. در صورت عدم انجام اين آزمايش اثر احتمالي افزايش بيان مولكول B7.1 متعاقب آلودگي با ويروس با اثر القاء بيان اين مولكول توسط ويروس آدنو ويروس نوتركيب كه محتوي كاست و cDNA ي لازم براي بيان اين مولكول بود، جمع مي شد و تفكيك اين دو پديده از همديگر را غير ممكن مي ساخت. آناليز بيان مولكول B7.1 بر روي سلول هاي آلوده شده با ويروس خالي (شكل II-3) مشخص نمود كه اين مولكول بر روي سطح 14/43% سلول هاي انتخاب شده و 4/6% كل سلول هاي آلوده شده با ويروس خالي بيان مي گردد. اين مقادير تقريبا 3 برابر مقدار بيان اين مولكول بر روي

www.SID.ir

Archive of SID

سلول هاي آلوده نشده است که بطور طبيعي بر روي اين سلول ها بيان مي گردد.

آنالیز بیان B7.1 برروی سلول های آلوده شده با ویروس نوترکیب IL-2/IRES/B7.1: آناليز بيان مولکول B7.1 روي سطح سلولهاي آلوده شده با ويروس IL-2/IRES/B7.1 نشان داد که ميزان بيان اين مولکول به 38/24% سلول هاي انتخاب شده و 15/52% کل سلول هاي آلوده شده با ويروس مزبور افزايش يافت (شکلIII –3). مقايسه داده ها نشان مي دهد که آلودگي با ويروس خالي (دلتا) و ويروس IL-2/IRES/B7.1 ميزان بيان مولکول B7.1 را به ترتيب 3 و 9 برابر افزايش داده است. در واقع ويروس IL-2/IRES/B7.1 بيان مولکول B7.1 را بيش از 2/5 برابر نسبت به ويروس خالي افزايش داده است. اين نتايج نشان مي دهند که آدنوويروس نوترکيب IL-2/IRES/B7.1 که محتوي يك کاست بيان کننده براي بيان توام دو پروتئين با استفاده از سکوئنس IRES است و در آن مولکول B7.1 در قسمت '3 سکوئنس IRES قرار گرفته اند بيان اين مولکول را در سلول هاي لوکميك C1498 به اندازه 9 برابر افزايش مي دهد.

ترشح IL-2 توسط سلول های لوکمیک نرمال و آلوده شده: مقدار IL-2 ترشحي در محيط کشت به روش ELISA **با حساسیت** 15ρg/ml/10^6 cells/24 hours **انجام گرفت. نتايج آزمايش** ELISA **نشان داد که ميزان** IL-2 **ترشح شده به محيط کشت سلول هاي آلوده شده با ويروس نوترکيب** IL-2/IRES/B7.1 **به مقدار** 150 ρg/ml/10^6 cells/24 hours **بود. اين در حالي بود که آزمايش** ELISA **هيچگونه** IL-2 **قابل اندازه گيري در محيط کشت سلول هاي لوکميك آلوده نشده و آلوده شده با ويروس خالي را نشان نداد (جدول 1). بنابراين با توجه به حساسيت اندازه گيري آزمايش** ELISA **مي توان گفت که آدنوويروس** IL-2/IRES/B7.1 **ترشح** IL-2 **را حداقل به ميزان** 10 **برابر افزايش مي دهد. اين نتايج نشان مي دهند که وکتور آدنو ويروسي مي تواند اين سلول ها را آلوده نموده و آدنوويروس نوترکيب که محتوي سکوئنس کدکننده اينترلوکين-2 در قسمت** '5 **سکوئنس** IRES **است توانائي القاء بيان اين مولکول را در سلول هاي لوکميك** C1498 **دارد و مي تواند براي بيان** IL-2 **به کارگرفته شوند.**

جدول 1: مقدار اينترلوکين –2 ترشح شده توسط نرمال C1498 **، سلول هاي آلوده شده با ويروس خالي (دلتا) و ويروس** IL-2/IRES/B7.1**:**

	سلول هاي نرمال (الوده نشده)	سلول هاي آلوده شده با ويروس خالي	سلول هاي آلوده شده با ويروس IL-2/IRES/B7.1
مقدار IL-2 ترشحي اندازه گيری شده	<15ρg/ml/10^6 cells/24 hours	<15ρg/ml/10^6 cells/24 hours	<150ρg/ml/10^6 cells/24 hours

مقدار اينترلويکن ترشح شده توسط سلولهاي نرمال C1498 **(آلوده نشده)، سلول هاي آلوده شده با ويروس خالي و ويروس نوترکيب توسط** ELISA **و با دقت** 15 ρg/ml/10^6 cells/24 hours**انجام گرفت. آزمايش** ELISA **هيچگونه اينترلوکين –2 ترشح شده اي در مايع روئي سلول هاي آلوده نشده و آلوده شده با ويروس خالي (دلتا) نشان نداد که دليل بر عدم ترشح اينترلوکين –2 و يا ترشح آن در مقاديري کمتر از آستانه حساسيت آزمايش** ELISA **بود. به عبارتي حداکثر اينترلوکين –2ترشح شده توسط سلول هاي آلوده نشده و آلوده شده با ويروس خالي** 15ρg/ml/10^6 cells/24 hours **بود. اين در حالي است که اينترلوکين-2 ترشح شده توسط سلول هاي آلوده شده با ويروس** IL-2/IRES/B7.1 **به مقدار** 150ρg/ml/10^6 cells/24 hours **بود.**

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در برخي موارد بيولوژيك لازم است چند ژن بصورت همزمان بيان شوند. يكي از روش هاي بيان توام بيش از يك ژن استفاده از توالي IRES است. با توجه به كاربردها و اهميتي كه بيان همزمان دو پروتئين IL-2 و B7.1 دارد در اين مطالعه توانائي آدنوويروس نوتركيب IL-2/IRES/B7.1 محتوي يك كاست بيان كننده با توالي IRES در بيان توام دو پروتئين IL-2 و B7.1 بررسي شده است. در اين مطالعه علاوه بر ويروس مزبور از ويروس خالي بعنوان وكتور شاهد و ويروس GFP بعنوان حامل نشان گر استفاده شد.

نتايج بررسي بيان پروتئين GFP بر روي سلول هاي لوكميك متعاقب آلودگي با آدنوويروس GFP نشان داد كه وكتور آدنوويروس نوتركيب GFP سلول هاي لوكميك C1498 را آلوده و در در آن ها بيان اين مولكول را القاء مي كند. اين نتيجه بيان گر اين است كه آدنوويروس نوتركيب به رسپتورهاي سطح سلولي سلول هاي C1498 متصل شده ، وارد سلول گشته و نهايتا ژنوم خود را وارد هسته نموده و بيان پروتئين GFP نوتركيب را بر روي سطح سلول ها القاء مي كند. پس از محرز شدن امكان آلوده سازي و القاء بيان پروتئين در سلول هاي لوكميك توسط آدنوويروس نوتركيب آزمايش ها با آلوده سازي سلول ها با ويروس نوتركيب IL-2/IRES/B7.1 ادامه يافت.

آزمايشات FACS نشان دادند كه 4/17% سلول هاي آلوده نشده مولكول B7.1 را بيان مي كنند كه متعاقب آلودگي با وكتور خالي اين ميزان به 14/43% افزايش مي يابد.

بر اساس اين نتايج وكتور خالي حدود 3 برابر بيان B7.1 را بر روي سلول هاي لوكميك افزايش مي دهد. اين پديده مي تواند مربوط به پاسخ سلول ها به آلودگي با ويروس باشد. در واقع آلودگي ويروسي سلول هاي ايمني را وادار به بيان مولكول تحريكي B7.1 برروي خود ميكند.

بيان اين مولكول بر روي سلول آلوده باعث مي گردد تا سلول آلوده بهتر بتواند توسط سلول هاي T شناخته شده و از بين برود. بر اساس همين نتايج ميزان بيان اين مولكول بر روي سلول هاي آلوده شده با وكتور IL-2/IRES/B7.1 حدود 38/24% بود كه اين ميزان 9 برابر بيانB7.1 بر روي سلول هاي لوكميك آلوده نشده است. افزايش 9 برابر بيان اين مولكول متعاقب آلودگي با وكتور IL-2/IRES/B7.1 ناشي از وجود ژن B7.1 دركاست بيان كننده اين وكتور است. اين نتايج نشان مي دهند كه وكتور آدنوويروس IL-2/IRES/B7.1 با موفقيت بيان اين مولكول را در اين سلول ها القاء مي كند. بر اساس داده هاي حاصل از اين مطاله ميزان ترشح IL-2 در سلول هاي نرمال C1498 و سلول هاي آلوده شده با ويروس دلتا كمتر از ميزان حساسيت تست ELISA (15ρg/ml/106cells/24hours) بود كه متعاقب آلودگي با ويروس IL-2/IRES/B7.1 به مقدار 150ρg/ml/106cells/24 hours افزايش يافت. اين نتايج بيانگر آن است كه ويروس IL-2/IRES/B7.1 ميزان ترشح اينترلوكين-2 را در سلول هاي آلوده شده آزمايشي حداقل 10 برابر افزايش مي دهد.

اين مطالعه نشان داد كه آدنوويروس نوتركيب با موفقيت به رسپتورهاي سطح سلولي سلول هاي C1498 متصل شده ، وارد سلول گشته و نهايتا ژنوم خود را وارد هسته نموده و بيان پروتئين را در اين سلول ها القاء مي كند. همچنين آدنوويروس نوتركيب ساخته شده قادر است با استفاده از يك پروموتور بيان دو پروتئين IL-2 و B7.1 را با بكارگيري توالي IRES -كه در آن

www.SID.ir

Archive of SID

IL-2 در قسمت 5' و B7.1 در قسمت 3' سکوئنس IRES قرارداده شده اند، به طور همزمان القاء کند.

References:

1- Kayaga J., Souberbielle BE., Sheikh N., Morrow WJ., Scott-Taylor T., Vile R. Chong H., Dalgleish AG., Anti-tumour activity against B16-F10 melanoma with a GM-CSF secreting allogeneic tumour cell vaccine. Gene Therapy. 1999, 6(8):1475-1481.

2- Kikuchi T., Joki T., Akasaki Y., Abe T., Ohno T., Induction of antitumor immunity using intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) transfection in mouse glioma cells. Cancer Letters. 1999, 142(2):201-206.

3- Foa R., Meloni G., Guarini A., Vignetti M., Marchis D., Tosti S., Gillio Tos A., Mandelli F., Gavosto F. Interleukin-2-based immunotherapy in the management of minimal residual disease in acute leukemia patients. Recent Results in Cancer Research. 1993; 131:207-214.

4- Foa R., Meloni G., Guarini A., Vignetti M., Mandelli F., Gavosto F., Interleukin 2 in the management of hematologic malignancies. Pharmacological Research. 1992, 26 Suppl 2:82-83.

5- Foa R., Guarini A., Gillio Tos A., Cardona S., Fierro MT., Meloni G., Tosti S., Mandelli F., Gavosto F., Peripheral blood and bone marrow immunophenotypic and functional modifications induced in acute leukemia patients treated with interleukin 2: evidence of in vivo lymphokine activated killer cell generation. Cancer Research. 1991, 51(3):964-968.

6- Roth C., Mir LM., Cressent M., Quintin-Colonna F., Ley V., Fradelizi D., Kourilsky P., Inhibition of tumor growth by histoincompatible cells expressing interleukin-2., International Immunology, 1992, 4(12):1429-1436.

7- Meloni G., Vignetti M., Andrizzi C., Capria S., Foa R., Mandelli F. Interleukin-2 for the treatment of advanced acute myelogenous leukemia patients with limited disease: updated experience with 20 cases., Leukemia & Lymphoma, 1996, 21(5-6):429-435.

8- Hirano N., Takahashi T., Takahashi T., Azuma M., Okumura K., Yazaki Y., Yagita H., Hirai H. Protective and therapeutic immunity against leukemia induced by irradiated B7-1 (CD80)-transduced leukemic cells. Human Gene

www.SID.ir

Archive of SID

Therapy, 1997, 8(11):1375-1384.

9-Yoon SJ., Heo DS., Kang JO., Lee SG., Kim CD., Sung MW., Kim NK. Synergistic anti-tumor effects with co-expression of GM-CSF and IFN-gamma in murine tumors. International Journal of Cancer, 1998. 77(6):907-912.

10-Putzer BM., Bramson JL., Addison CL., Hitt M., Siegel PM., Muller WJ., Graham FL. Combination therapy with interleukin-2 and wild-type p53 expressed by adenoviral vectors potentiates tumor regression in a murine model of breast cancer, Human Gene Therapy, 1998, 9(5):707-718.

11-Joki T., Kikuchi T., Akasaki Y., Saitoh S., Abe T., Ohno T., Induction of effective antitumor immunity in a mouse brain tumor model using B7-1 (CD80) and intercellular adhesive molecule 1 (ICAM-1; CD54) transfection and recombinant interleukin 12., International Journal of Cancer. 1999, 82(5):714-720.

12- Putzer BM., Hitt M., Muller WJ., Emtage P., Gauldie J., Graham FL. Interleukin 12 and B7-1 costimulatory molecule expressed by an adenovirus vector act synergistically to facilitate tumor regression., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997, 94(20):10889-10894.

13- Putzer BM., Rodicker F., Hitt MM., Stiewe T., Esche H. Improved treatment of pancreatic cancer by IL-12 and B7.1 costimulation: antitumor efficacy and immunoregulation in a nonimmunogenic tumor model., Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy, 2002, 5(4):405-412.

14- Pizzoferrato E., Chu NR., Hawley TS., Lieu FH., Barber BH., Hawley RG., Watts TH., Berinstein NL. Enhanced immunogenicity of B cell lymphoma genetically engineered to express both B7-1 and interleukin-12., Human Gene Therapy, 1997, 8(18):2217-2228.

15- Sumimoto H., Tani K., Nakazaki Y., Tanabe T., Hibino H., Hamada H., Azuma M., Asano S., GM-CSF and B7-1 (CD80) co-stimulatory signals co-operate in the induction of effective anti-tumor immunity in syngeneic mice. International Journal of Cancer, 1997, 73(4):556-561.

16- Emtage PC., Wan Y., Hitt M., Graham FL., Muller WJ., Zlotnik A., Gauldie J., Adenoviral vectors expressing lymphotactin and interleukin 2 or lymphotactin and interleukin 12 synergize to facilitate tumor regression in murine breast cancer models., Human Gene Therapy, 1999, 10(5):697-709.

17- Kikuchi T., Joki T., Abe T., Ohno T., Antitumor activity of killer cells stimulated with both interleukin-2 and interleukin-12 on mouse glioma cells., Journal of Immunotherapy, 1999, 22(3):245-250.

18- Meloni G., Foa R., Vignetti M., Guarini A., Fenu S., Tosti S., Tos AG., Mandelli F.,

www.SID.ir

Archive of SID

Interleukin-2 may induce prolonged remissions in advanced acute myelogenous leukemia., Blood, 1994, 84(7):2158-2163.

19- Fearon ER., Pardoll DM.. Itaya T., Golumbek P., Levitsky HI., Simons JW., Karasuyama H., Vogelstein B., Frost P. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response., Cell, 1990, 60(3):397-403.

20- Ley V., Langlade-Demoyen P., Kourilsky P., Larsson-Sciard EL. Interleukin 2-dependent activation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo., European Journal of Immunology, 1991, 21(3):851-854.

21- Gansbacher B., Zier K., Daniels B., Cronin K., Bannerji R., Gilboa E. Intrleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity., Journal of Experimental Medicine, 1990, 172(4): 1217-1224.

22- Azuma M., Cayabyab M., Buck D., Phillips JH., Lanier LL. Involvement of CD28 in MHC-unrestricted cytotoxicity mediated by a human natural killer leukemia cell line., Journal of Immunology, 1992, 149(4):1115-1123.

23- Gaken JA., Hollingsworth SJ., Hirst WJ., Buggins AG., Galea-Lauri J., Peakman M., Kuiper M., Patel P., Towner P., Patel PM., Collins MK., Mufti GJ., Farzaneh F., Darling DC. Irradiated NC adenocarcinoma cells transduced with both B7.1 and interleukin-2 induce CD4+-mediated rejection of established tumors., Human Gene Therapy, 1997, 8(4):477-488.

24- Cayeux S., Richter G., Becker C., Beck C., Aicher A., Pezzutto A., Dorken B., Blankenstein T. Lack of correlation between rejection of tumor cells co-expressing interleukin-2 and B7.1 and vaccine efficiency., European Journal of Immunology, 1997, 27(7):1657-1662.

25- Emtage PC., Wan Y., Muller W., Graham FL., Gauldie J. Enhanced interleukin-2 gene transfer immunotherapy of breast cancer by coexpression of B7-1 and B7-2., Journal of Interferon & Cytokine Research, 1998, 18(11):927-937.

26- Emtage PC., Wan Y., Bramson JL., Graham FL., Gauldie J. A double recombinant adenovirus expressing the costimulatory molecule B7-1 (murine) and human IL-2 induces complete tumor regression in a murine breast adenocarcinoma model., Journal of Immunology, 1998, 160(5):2531-2538.

27- Kay M A., Liu D., Hoogerbrugge P M., Gene Therapy., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94: 12744-12746.

28- Douglas J T., Curiel D T., Adenoviruses as Vectors for Gene Therapy, Science & Medicine, 1997, March/April: 44-53.

29- Morgan R A., Couture L., Elroy Stein O., Ragheb J., Moss B., Anderson W F. Retroviral

www.SID.ir

Archive of SID

Vectors Containing Putative Internal Ribosome Entry Sites: Development of a Polycistronic Gene Transfer System and Application to Human Gene Therapy., Nucleic Acids Research, 1992, 20: 1293-1299.

30- Zitvogel L., Tahara H., Cai Q., Storkus WJ., Muller G., Wolf S F., Gately M., Robbins P D., Lotze M T. Construction and Characterization of Retroviral Vectors Exoressin Biologically Active Human Interleukin-12., Human Gene Therapy, 1994, 5: 1493-1506.

31- Boyer MW., Orchard PJ., Gorden KB., Anderson PM., Mclvor RS., Blazar BR. Dependency on intercellular adhesion molecule recognition and local interleukin-2 provision in generation of an in vivo CD8+ T-cell immune response to murine myeloid leukemia., Blood, 1995, 85(9): 2498-2506.

www.SID.ir