

طراحی یک پروموتور کایمیریک دارای منطقه پروموتوری شبیه به پروموتور سورویوین (Survivin) به منظور رونویسی هدفمند در سلول‌های سرطانی سینه

سامیلا فرخی منش^۱، فاطمه رهبری زاده^{۲*}، عباس کمالی^۳، غلامرضا مقدم پور^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

پذیرش مقاله: ۸۸/۰۴/۰۸

دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۱۲

چکیده

هدف: بزرگترین چالش در ژن‌درمانی سرطان دستیابی به بالاترین درجه اختصاصیت و کارایی در هدف‌گیری سلول‌های سرطانی است. به دلیل 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 پروموتور 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 پروموتور خاص سرطان با بیان بالا بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در راستای تکثیر و به‌کارگیری پروموتور خاص سرطان به‌منظور ایجاد یک سازه برای مقاصد ژن‌درمانی، با استفاده از Nested-PCR پروموتوری از ژنوم انسانی جداسازی شد که در حدود ۳۴ درصد به پروموتور سورویوین شباهت داشت. سورویوین یکی از اعضای خانواده ژن‌های ضد 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 Compel، Transfac، EPD، Promoter Scan و TRRD دارای دو جایگاه اتصال رونویسی مشابه با پروموتور سورویوین بود که به‌وسیله عوامل رونویسی E2F و STAT1 شناسایی می‌شد. این پروموتور به‌همراه بخش‌های پاسخ‌دهنده به شرایط محیطی هیپوکسی و استروژن (ریزمحیط سلول‌های سرطانی سینه) و ژن پیش‌آپتوزی *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 پروموتور سورویوین) دارای توانایی تقریباً برابر پروموتور CMV برای بیان ژن *tBid* است. **نتیجه‌گیری:** استفاده از یک پروموتور کایمیریک در هدایت یک ژن پیش‌آپتوزی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی ابزاری بسیار امیدوارکننده در راستای 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 پیش‌آپتوزی از خود نشان می‌دهد.

کلیدواژگان: رونویسی هدفمند، پروموتور سورویوین، ژن پیش‌آپتوزی

۱- مقدمه

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

سه روش برای هدف‌گیری بافت بدخیم وجود دارد:

- ۱- هدف قرار دادن رونویسی (Transcriptional targeting): با توجه به این‌که بعضی ژن‌ها در سلول‌های سرطانی بیان بالا و اختصاصی دارند، در این استراتژی با استفاده از پروموتور 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 به‌صورت هدف‌مند فراهم نمود.
- ۳- سومین روش درمانی هدف قرار دادن مسیرهای سلولی مرتبط با سرطان است [۱، ۲].

بهترین روش هدف‌گیری رونویسی یا به‌عبارتی استفاده از پروموتورهای اختصاصی سرطان است، چون ابتدایی‌ترین سطح بیان ژن است [۳]. پروموتورها به چند دسته تقسیم می‌شوند: پروموتورهای ویژه بافتی (Tissue specific promoter)، پروموتورهای ویژه توموری (Tumor specific promoter)، پروموتورهای قابل القا (Inducible promoter) و پروموتورهای مهندسی شده [۴، ۵].

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

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

۱- میزان بیان یک ژن درمانی به‌وسیله یک نوع پروموتور 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 پروموتور منفردی وجود ندارد که بتواند در تمام رده‌های سلولی توموری در حد کافی سبب هدایت بیان ژن درمانی شود و به‌صورت همگانی در تمام بیماران مبتلا به یک نوع سرطان خاص به‌کار گرفته شود [۹].

این محدودیت‌ها سبب جستجوی راه‌کارهایی برای بهبود توانایی‌های پروموتوری شده است که تحت عنوان پروموتورهای مهندسی‌شده معرفی می‌شود. ساده‌ترین بخش این روش، یافتن پروموتورهای جهش‌یافته‌ای است که توانایی بیشتری در راه‌اندازی رونویسی دارند ولی اختصاصیت بافتی - توموری آنها نسبت به پروموتور نوع طبیعی بالاتر است. روش بهتر ایجاد توانایی پروموتور - تشدیدگری با کوچک‌ترین اندازه ممکن (پروموتور مرکزی یا هسته پروموتوری) است که هنوز ویژگی‌های توانایی وحشی را حفظ کرده باشد. راه‌کار دیگر شامل ساخت پروموتورهای کایمیریک (Chimeric promoter) متشکل از عناصر تنظیمی پروموتورهای متفاوت با اختصاصیت بافتی است. این روش به‌دنبال به‌کارگیری مزایای هرکدام از پروموتورها و افزایش اختصاصیت بافتی است [۱۰].

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

باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) سوش TG1 به‌عنوان میزبان استفاده شد. ناقل پلاسمیدی pCDNA3.1/Hygro⁺ از شرکت Invitrogen (آمریکا) تهیه شد. آنزیم‌های *Taq* پلیمرز، *T4* لیگاز، آنزیم‌های محدودکننده داخلی، dNTPs، آگارز، انواع پودرهای محیط کشت باکتری و RPMI-1640 و اتیديوم بروماید (Ethidium bromide) از شرکت Roche (آلمان) و Sigma (آمریکا) تهیه شد.

۲-۲- ساخت سازه

۲-۲-۱- تخلیص mRNA و ساخت cDNA

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

۲-۲-۲- جداسازی DNA ژنومی

از رده سلولی HeLa و لنفوسیت‌های انسانی که قبلاً جداسازی شده بودند، به‌عنوان منبع ژنومی برای تکثیر قطعه ژنی شبه پروموتور سورویوین (Survivin-like promoter) استفاده شد [۱۱] و با استفاده از کیت Tissue NucleoSpin[®] (شرکت MN) تخلیص شدند.

۲-۳- تکثیر و کلونینگ قطعات ژنی

۲-۳-۱- تکثیر و کلونینگ ژن *tBid*

ژن *tBid* (۳۲۲ تا ۷۳۲ جفت‌باز 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، به‌دنبال انتخاب یک پروموتور 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) پروموتور ژن سورویوین انتخاب شد.

سورویوین 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، پروموتور مرکزی این ژن با استفاده از مقالات، مورد استفاده قرار گرفت و به‌منظور افزایش توانایی و ویژگی این پروموتور از ترکیب شبه پروموتور مرکزی ژن سورویوین و دو بخش پاسخ‌دهنده به هیپوکسی و استروژن (به‌عنوان قطعات تشدیدگر) در ساختار نهایی پروموتور کایمیریک استفاده شد. از آنجایی که هیچ پروموتور منفردی وجود ندارد که در تمام سلول‌های توده ناهمگون آدنوکارسینومای سینه بیان شود، در این تحقیق هدف اصلی طراحی یک پروموتور 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.

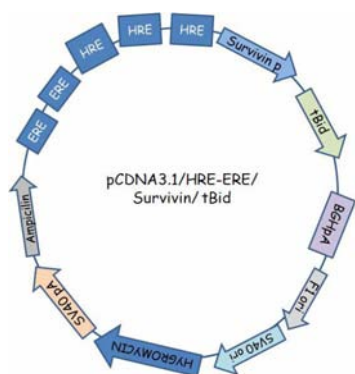
۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- 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 فیروبلاست پوست) از بانک سلول انستیتو پاستور ایران خریداری شد.

دومین واکنش PCR با استفاده از 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 *HindIII* و *BamHI* هستند و محصول نهایی PCR به وسیله این آنزیم‌ها در پلاسمید ۲ کلون شد و حاصل آن پلاسمید pC/tB/HE/Sur نام‌گذاری شد. در پایان کلونینگ به وسیله تعیین توالی ژنی مورد تأیید قرار گرفت. شکل ۱ تصویر شماتیک این سازه را نشان می‌دهد.



شکل ۱ تصویر شماتیک سازه pC/tB/HE/Sur

۲-۴-۲- بررسی بیوانفورماتیکی قطعه ژنی شبه

پروموتور سورویوین

توالی این قطعه ژنی با استفاده از برنامه‌های نرم‌افزاری و آنلاین (Online) شامل BLAST, Map Viewer, EPD, TRRD, Prosite, Comple, Promoter Scan, TransFac بررسی شد.

۲-۵- انتقال سازه به سلول‌های یوکاریوتی

به منظور تعیین فعالیت رونویسی پروموتور کایمیریک حاوی شبه پروموتور سورویوین (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'-ACGGGATCCGCCCATGGATGGCAACCGCAGCAG-3'
 Bid-rev: 5'-TTCCTAGATCAGTCCATCCCATTTCTGGCTAAGCTC-3' و تکثیر شد. آغازگر Bid-for دارای جایگاه شناسایی آنزیم *BamHI* در انتهای 5' و توالی کزاک (Kozak sequence) به منظور ترجمه بهینه است. آغازگر Bid-rev دارای جایگاه شناسایی *XbaI* است. محصول نهایی PCR به وسیله کیت QIAquick Gel Extraction (شرکت QIAGEN، آلمان) از ژل آگارز تخلیص و به وسیله آنزیم‌های *XbaI/BamHI* در پلاسمید pCDNA3.1/hygro⁺ کلون شد (پلاسمید pC/tB) و کلونینگ به وسیله تعیین توالی ژنی با آغازگرهای اختصاصی *tBid* تأیید شد.

۲-۳-۲- تکثیر و کلونینگ بخش‌های پاسخ‌دهنده

(Responsive modules) به هیپوکسی و استروژن

برای قرار دادن این بخش‌ها الیگومری شامل سه نسخه از عناصر پاسخ‌دهنده به هیپوکسی (5'-TGTCACGTCCTGCACGAC-3') و دو نسخه از عناصر پاسخ‌دهنده به استروژن (CGTCACAGTGACC) طراحی شد [۱۲] و برای ساخت به شرکت ژن فناوریان سفارش داده شد. این الیگومر با استفاده از آغازگرهای زیر تکثیر شد:

Oligo-for: 5'-TAACACGCGTATTTGTTCACGTCCTG-3'

Oligo-rev: 5'-TAACAAGCTTAGAGGTCAGTGTGAC-3'

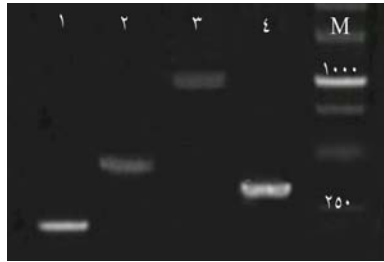
آغازگرهای Oligo-rev و Oligo-for به ترتیب دارای جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های *MluI* و *HindIII* بودند و به وسیله این دو آنزیم در پلاسمید ۱ کلون شدند (پلاسمید pC/tBid/HE) و کلونینگ به وسیله تعیین توالی ژنی تأیید شد.

۲-۳-۳- تکثیر و کلونینگ شبه پروموتور سورویوین

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

Sur1-for: 5'-AGAGAAGTGAGTGGATGTGTATG-3'

Sur1-rev: 5'-GAATGTAGAGATGCGGTGGT-3'



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

۳-۱-۲- 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.

۳-۲- نتایج بررسی بیوانفورماتیکی قطعه ژنی

شبه پروموتور سورویوین

توالی این قطعه ژنی که حدود ۳۴ درصد با توالی پروموتور سورویوین شباهت داشت، بعد از بررسی در پایگاه‌های بیوانفورماتیکی و تأیید وجود مناطق متصل‌شونده 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
CTCAAAGTGTGGGATCACAGGCATCAGCCATC
ATGCCAGCCCTATCCATCATTAGGAAGTACC
AGGAAACCTGGAACACAGAAGGTCTCCTACAT
AGCTTGACATGGGAAGGGAGTGAGGCCCTGGG
CTGATCTAAGGATGAGGAAGAGGACAAGTCTCA
CGCAGAAGTGCCCTCCATCCCTCTGCAGGCAGG
ATGTGACAGCAGCTGGAACATTTATGTCCCTTA
TGTTTATTGGGTCTGTCTCCCCAGCCAGCCCAAG
AGCTGCTTGTGGGCAGGACTGTAACCTGTGCAT
TATCCACCTCTGTGCCCAACGT

نتایج حاصل از برنامه‌های نرم‌افزاری و آنالیز نشان می‌دهد که این قطعه ژنی دارای نواحی متصل‌شونده به فاکتورهای رونویسی E2F و STAT1 (توالی‌های CGTTCTTTGAAAGCA و TTAACCGCCAG) است.

(Invitrogen) (Lipofectamine 2000) طبق برنامه شرکت تولیدکننده انجام شد. در این آزمایش ترانسفکشن با یک میکروگرم از هر یک از سازه‌های آزمون و کنترل (پلاسمید pC/tB و پلاسمید pC/tB/HE/Sur) به همراه ۲ میکرولیتر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ صورت گرفت و میزان القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطانی MCF7، SKBR-3 و سلول‌های طبیعی AGO با سازه کایمیریک حاوی شبه پروموتور سورویوین (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 17β -استرادیول ۲ نانومولار اضافه و برای اعمال تیمار هیپوکسی روی پلیت با پارافیلیم استریل بسته شد.

۲-۶- ارزیابی میزان بیان mRNA *tBid*

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

BA-for: 5'-AGTAGGCTTTGTGGTTGATG-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 *tBid*، بخش‌های الیگومری هیپوکسی- استروژن و شبه پروموتور سورویوین را نشان می‌دهد.

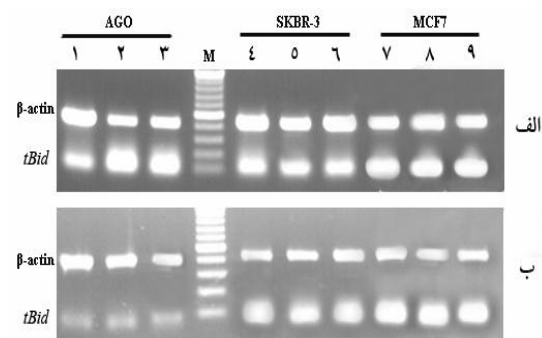
۳-۳- نتایج RT-PCR نیمه کمی

پس از انتقال سازه به سلول‌های یوکاریوتی و اعمال تیمارهای متفاوت، جداسازی RNA و سنتز cDNA، تکثیر 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 نمایش‌گر بیان نسبی *tBid* در شرایط و تیمارهای متفاوت بود (شکل ۴).

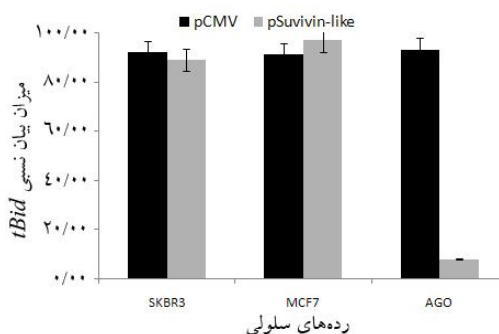
پروموتور CMV یکی از پروموتورهای قوی برای هدایت بیان ژن است پس نتایج به‌دست آمده نشان‌گر قدرت بالای شبه پروموتور سورویوین است. همچنین تیمار استروژن به‌تنهایی تأثیر بیشتری در افزایش بیان ژن *tBid* تحت هدایت هر دو نوع پروموتور در سلول‌های سرطانی MCF-7 دارد و میزان بیان سازه حاصل در سلول‌های سرطان سینه SKBR-3 و MCF7 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 آوردند [۱۳]. ژن‌درمانی سرطان تحویل ماده ژنتیکی به سلول بدخیم یا ترانسفورمه به‌منظور درمان است. در هر سیستم ژن‌درمانی ایده‌آل دو بخش کلیدی وجود دارد: ۱- ترانس ژن (Transgene) درمانی مناسب که می‌تواند تصحیح‌کننده، کشنده یا تحریک‌کننده ایمنی 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 به‌کار می‌برند. تحریک مسیرهای داخلی یا خارجی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی منجر به افزایش بیان و فعالیت تنظیم‌کننده‌های پیش‌آپوپتوزی شده و مرگ سلولی را القا می‌کند. توانایی طبیعی ژن‌های پیش‌آپوپتوزی 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) بسیار مورد توجه محققان بوده است که دارای چندین عضو پیش‌آپوپتوزی



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



شکل ۴ مقایسه نتایج RT-PCR نیمه کمی در رده‌های سلولی مختلف ترانسفکت شده با پلاسمید pC/tB [حاوی پروموتور CMV (pCMV)] و پلاسمید pC/tB/HE/Sur [حاوی شبه پروموتور سورویوین (pSurvivin-like)] در شرایط تیمار با استروژن

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

اختصاصی ترانسژن کشنده HSV-tk در سلول‌های سرطانی سینه استفاده کردند که سبب مرگ آن‌ها شد [۱۶]. PPAR-gamma 1 (Peroxisome proliferator-actiated receptor gamma 1) توسط وانگ (Wang) و همکاران در سال ۲۰۰۴ [۲۰۰۴] که بیان افزایش‌یافته در سرطان سینه داشت و میزان بیان آن در سرطان‌های دیگری چون سرطان تیروئید و کولون و ریه نیز افزایش می‌یافت [۱۷]. آلفا-لاکتالبومین (α -lactalbumin) [۱۸]، هپاراناز (Heparanase) [توسط بریندنباچ (Breidenbach) و همکاران در سال ۲۰۰۵] [۱۹]، ماماگلوبین (Mammaglobin) [توسط شی (Shi) و همکاران در سال ۲۰۰۶] [۲۰] و پروموتورهای دیگری چون L-پلاستین (L-plastin) و CXCR4 (CXC chemokine receptor type 4) توسط محققان دیگر در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی سینه چون MCF-7، MDA-MB4355، T47D، MDA-MB361 و ... با استفاده از ترانس‌ژن‌های کشنده مختلف مطالعه شد که دارای نتایج متفاوتی در رده‌های سلولی سرطان سینه هستند [۲۱، ۲۲].

پروموتوری که در این تحقیق بررسی شد شبیه پروموتور ژن سورویوین است و دارای هسته پروموتوری لازم برای به‌راه انداختن بیان ژن درمانی است و در ترکیب با بخش‌های پاسخ‌دهنده استفاده شد. در این تحقیق چگونگی جداسازی و تکثیر یک ناحیه پروموتوری از DNA انسانی بررسی شد. با توجه به مطالعات کتابخانه‌ای وسیعی که انجام شد پروموتور ژن سورویوین را که در گزارش‌ها نتایج خیلی خوبی داشت به این منظور انتخاب شد. بر این اساس تنها گزارش موجود از توالی این پروموتور 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 پروموتوری ژن سورویوین دارای نواحی غنی از GC است با آغازگرهای طراحی شده برای PCR آن منطقه نتیجه‌ای به‌دست نیامد و در نتیجه Nested-PCR و طراحی آغازگر برای مناطق فرادست و فرودست منطقه پروموتوری

است. با این وجود محدودیت بالقوه‌ای که در استفاده از ژن‌های پیش‌آپوآپتوزی به‌عنوان کشنده سلولی وجود دارد این است که فعالیت آن‌ها به‌شدت به‌وسیله 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]. به‌همین دلیل پیدا کردن ژن پیش‌آپوآپتوزی که برای فعالیت کامل خود نیاز به تغییرات اضافی نداشته باشد بسیار مورد توجه بود که به دلایل زیر، ژن Bid می‌تواند به‌صورتی به‌کار گرفته شود که نیازی به تغییرات پس از ترجمه برای فعالیتش نداشته باشد. ۱- برای این‌که پروتئین Bid نیاز به شکست (Cleavage) (برداشت بخشی از انتهای آمینوی آن) برای فعالیت کامل خود نداشته باشد فقط توالی ژنی بخش ۱۵/۵ کیلوالتونی Bid (Bid بریده شده یا tBid) در پلاسمید مربوطه کلون شد. ۲- پروتئین کامل Bid از اعضای خانواده فقط دارای ناحیه BH3 است که نسبت به سایر اعضا که دارای نواحی دیگر (BH1، BH2، BH4) هستند، اندازه‌ای کوچک‌تر دارد. ۳- توالی آن پس از شکست به‌وسیله کاسپاز ۸ کوچک‌تر می‌شود و در واقع مبدل به یکی از پروتئین‌های پیش‌آپوآپتوزی 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 اعضای پیش‌آپوآپتوزی بالقوه است که به محض برداشت ناحیه ممانعت‌کننده N ترمینال 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 پروموتور است. برای انتخاب پروموتور مناسب برای سلول‌های سرطان سینه مطالعات فراوانی صورت گرفته است. پاندها (Pandha) و همکاران در سال ۱۹۹۹ از پروموتور ژن Erb-B2 برای بیان

هیپوکسیک هستند. در این شرایط سلول‌ها یک فاکتور رونویسی تحت عنوان فاکتور قابل القا به‌وسیله 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 پروموتور این ژن‌ها متصل می‌شود [۲۴]. عناصر پاسخ‌دهنده به استروژن نیز به‌وسیله گیرنده استروژن شناسایی شدند. این گیرنده به‌عنوان 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 پروموتور دارای عناصر پاسخ‌دهنده به استروژن باشد در حضور استروژن فعال می‌شود. به‌علاوه استفاده از عناصر پاسخ‌دهنده به استروژن امکان تنظیم خارجی بیان ژن‌ها را به‌وسیله داروهای ضد استروژنی مثل تاموکسیفن (Tamoxifen) فراهم می‌آورد [۲۵، ۲۶]. نتایج نشان می‌دهد که استفاده از شبه پروموتور سورواپوین، با شرایط گفته شده برای هدایت بیان یک ژن پیش‌آپوپتوزی سبب القای مرگ سلولی به‌صورت اختصاصی با کارایی بالا در توده سلول‌های سرطانی ناهمگون می‌شود. امید است که به‌کارگیری 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 پروموتور و ۳۲۱ نوکلئوتید پایین‌تر از نوکلئوتید انتهایی آغازگر طراحی شد. منطقه انتخاب شده حاوی ۱۰۴۱ نوکلئوتید بود که در نتایج PCR موفق به تولید باندهای در همین منطقه وزنی شدیم. روی این محصول عمل PCR دوم با استفاده از آغازگرهای مکمل ابتدا و انتهای پروموتور ژن سورواپوین انجام شد و محصول این PCR قطعه باندهای 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 پروموتور سورواپوین که در مقاله لی گزارش شده بود، شباهت داشت. محققان حاضر با جستجو در برنامه‌های آنالیز (EPD, TransFac, Promoter Scan, Comple, Prosite, TRRD) موفق شدند که نواحی متصل‌شونده به فاکتورهای رونویسی E2F و STAT1 را که به‌ترتیب به توالی‌های TTAACCGCCAG و CGTTCTTTGAAAGCA متصل می‌شوند در این توالی پیدا کنند و از طرفی مطالعات عملکردی این پروموتور در سازه HRE-ERE-pSur-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 پروموتور جدید که در کروموزوم شماره ۸ قرار دارد و شباهت زیادی از نظر توالی با پروموتور سورواپوین دارد، پروموتور شبه سورواپوین نامیده شد. نتایج حاصل از این پروموتور در RT-PCR نشان می‌دهد که این پروموتور با قابلیت بسیار بالا و در حد پروموتور CMV قادر به بیان ژن پیش‌آپوپتوزی *tBid* است.

در مورد عناصر پاسخ‌دهنده به هیپوکسی باید خاطر نشان 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] Clackson 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 mammaglobin 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.