

Designing pLEX-LAMP-DARPin Lentiviral Vector for Expression of HER2 Targeted DARPin on Exosome Surface

Shabanali Khodashenas Limoni¹,
Fatemeh Salimi²,
Mehdi Forouzandeh Moghaddam³

¹ Assistant Professor, Immunogenetic Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² PhD Student in Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received Jan 15, 2017 Accepted May 15, 2017)

Abstract

Background and purpose: Exosome as drug delivery system is a novel and smart methodology enabling delivery of exosome cargo into specific tissue. This aim could be accessed by manipulation of exosome producer cells for expression of specific transmembrane-anchored ligand on exosomes surface. Accordingly, Lysosomal Associated Membrane Protein (LAMP) is one of the best choices for anchoring and chimerization with any ligand for this propose. In current study we designed a lentiviral vector which carries a chimeric gene for expression of LAMP2-DARPin in exosome to attach to HER2 on cancer cell surfaces.

Materials and methods: RNA was extracted from mouse skeletal muscle, then, cDNA was produced by RT-PCR and CDS of LAMP2b gene was amplified by specific primers. Two restriction sites were introduced between signal and mature peptide sequence by SOEing PCR. This fragment was inserted into pLEX-MCS lentiviral vector and cloned in E.coli. DARPin gene was designed, optimized and synthesized, then cloned between signal and mature peptide. Positive clone was confirmed by colony PCR and DNA sequencing.

Results: Electrophoresis of SOEing PCR product showed 1290 bp DNA fragment of LAMP2B CDS. Insertion of LAMP2 in pLEX vector was confirmed by electrophoresis and sequencing. Accordingly, DARPins was synthesized and inserted into pLEX-LAMP vector, electrophoresis and sequencing of purified plasmid from positive clone confirmed the insertion of DARPins into pLEX-LAMP vector.

Conclusion: We generated two lentiviral vectors, pLEX-LAMP for expression of any ligands in exosome surface and pLEX-LAMP DARPin for expression of DARPin on exosome surface for HER2 targeting.

Keywords: exosome, lentiviral vector, DARPins, SOEing PCR, LAMP2b

طراحی وکتور لنتی ویروسی pLEX-LAMP-DARPin جهت بیان دارپین هدفمند علیه HER2 در سطح آگروزوم

شعبانعلی خدانشناس لیمونی¹

فاطمه سلیمی²

مهدی فروزنده مقدم³

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های زنده به منظور ارتباط با محیط اطرافشان نانوذرات آگروزومی آزاد می‌کنند. امروزه آگروزوم به عنوان حامل دارو در تحقیقات مطرح است. این ذرات را می‌توان با بیان لیگاند مخصوص سرطان/بیماری هدفمند ساخت. پروتئین اتصال‌ی غشا LAMP که در آگروزوم بیان می‌شود بهترین انتخاب به عنوان نگهدارنده لیگاندی است که می‌تواند به رسپتورهای اختصاصی سلول هدف متصل گردد. هدف از این مطالعه طراحی وکتور لنتی ویروسی بوده است که حامل ژن کایمر جهت بیان پروتئین کایمر LAMP-DARPin در سطح آگروزوم برای اتصال به گیرنده‌های HER2 در سطح سلول‌های سرطانی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی با RNA استخراج شده از ماهیچه اسکلتی موش cDNA سنتز گردید و با پرایمرهای اختصاصی، ژن LAMP2b تکثیر گردید. با روش SOEing PCR دو سایت برش بین توالی کدکننده سیگنال پپتید و پپتید بالغ ایجاد شد و سپس در وکتور لنتی ویروسی pLEX کلون شد. ژن دارپین طراحی، اپتیمایز، سنتز و وکتور pLEX-LAMP بین توالی سیگنال و پپتید بالغ کلون شد و کلونینگ با colony-PCR با تعیین توالی تایید شد.

یافته‌ها: ژل الکتروفورز محصول واکنش SOEing PCR، بیان گر تکثیر بخش کدکننده ژن LAMP2b است. بعد از کلونینگ و جداسازی پلاسمید از کلون‌های مثبت، تعیین توالی انجام شد که بلاست توالی در NCBI تایید کننده توالی ژن LAMP2b است. هم‌چنین ورود توالی دارپین بین توالی پپتید سیگنال و پپتید بالغ به وسیله الکتروفورز و توالی‌یابی تایید شد. **استنتاج:** در این مطالعه وکتور لنتی ویروسی PLEX LAMP-DARPin طراحی گردید که با کمک آن می‌توان لیگاند دارپین را جهت هدفگیری سلول‌های سرطانی HER2 مثبت در سطح آگروزوم بیان نمود.

واژه های کلیدی: آگروزوم، وکتور لنتی ویروسی، دارپین، SOEing PCR، LAMP2b

مقدمه

سالم را در پی دارد (4، 3). جهت جلوگیری از نابودی سلول‌های سالم مکانیسم‌هایی باید طراحی گردد که دارو را به سلول‌های سرطانی برساند و سلول‌های سالم از اثر دارو در امان بمانند. چنین مشکلاتی تحقیقات را به

سرطان چهارمین عامل مرگ و میر در جهان و سرطان سینه اولین عامل مرگ و میر زنان در بین انواع سرطان‌هاست (2، 1). درمان‌های رایج شیمی‌درمانی مشکلاتی نظیر تروما، نکروز و از بین بردن سلول‌های

Email: foroz@modares.ac.ir

مؤلف مسئول: مهدی فروزنده مقدم - تهران دانشگاه تربیت مدرس دانشکده پزشکی گروه بیوتکنولوژی پزشکی

1. استاد بار، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

تاریخ دریافت: 1395/10/26 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1395/10/27 تاریخ تصویب: 1396/2/25

طرف درمان‌های هدفمند سوق داد(5).

اگزوزوم‌ها نانو ذرات طبیعی به‌اندازه 40 تا 90 نانومتر هستند که از سلول‌های مختلف نظیر سلول‌های ایمنی، سلول‌های سرطانی، سلول‌های بنیادی و سلول‌های عصبی رها می‌شوند (6، 7). این نانو ذرات در مایعات بیولوژیک نظیر سرم، شیر، ادرار و مایع سینوویال یافت می‌شوند و توانایی عبور از سد خونی - مغزی را دارند(7). اگزوزوم‌ها از سلول‌های خاصی رها شده و به سلول‌های هدف خود متصل شده و مواد بیولوژیک نظیر پروتئین miRNA و mRNA را به سلول‌های هدف خود می‌رسانند و فعالیت آن‌ها را تغییر می‌دهند(8). اتصال اگزوزوم به سلول‌های هدف بر اساس واکنش لیگاند و رسیپتور است و بر این اساس اگزوزوم‌های رها شده از سلول‌های خاص محتویات خود را به سلول‌های مورد نظر انتقال می‌دهند(9).

استفاده از اگزوزوم در انتقال هدفمند به وسیله بیان لیگاند در سطح این ساختار ممکن است بر این اساس Alvarez-Erviti و همکاران با بیان لیگاند رسیپتورهای استیل کولین در سطح اگزوزوم توانستند اگزوزوم‌های هدفمند جهت انتقال siRNA به سلول‌های مغزی تولید کنند(10). هدفمند سازی اگزوزوم به‌وسیله بیان یک گیرنده متصل به پروتئین طبیعی بین غشایی اگزوزوم صورت می‌گیرد. پروتئین همراه غشاء لیزوزومی LAMP از پروتئین‌های بین‌غشایی اگزوزوم بوده و در آن به‌طور طبیعی موجود است. از این پروتئین برای اتصال لیگاند برای هدفمند سازی اگزوزوم استفاده شده است.

لیگاندهای پپتیدی که برای اتصال با یک پروتئین دیگر انتخاب می‌گردند تا به همراه آن در بخش خاصی از سلول بیان شوند باید ویژگی‌های خاصی، از جمله عدم توانایی ایجاد باند دی سولفید، بیان بالا، عدم برهم کنش با پروتئین حامل و داشتن فعالیت بیولوژیک بعد از کامپریزاسیون(11) را داشته باشند. دارپین‌ها گروهی از پپتیدهای سنتزی هستند که از تکرار دو موتیف مارپیچ

آلفا و یک صفحه بتا ساخته شده‌اند و توانایی اتصال بالایی با لیگاند خود دارند. این ترکیبات فاقد سیستمین هستند و باند دی سولفید ایجاد نمی‌کنند و بیان بالایی دارند(12). G3 دارپین یکی از انواع دارپین‌هاست که جهت اتصال به HER2 طراحی شد. این ملکول توانایی بالایی در اتصال به گیرنده مورد نظر دارد(13).

در این مطالعه وکتور ویروسی طراحی گردید که با کمک آن بتوان لیگاند دارپین G3 را در سطح اگزوزوم جهت انتقال هدفمند دارو و مواد ژنتیکی به سلول‌های سرطانی HER2 مثبت بیان نمود که برای این هدف ژن کایمر LAMP-DARPin ساخته شد و در وکتورلنتی ویروسی PLEX کلون شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر به روش تجربی بوده است.

تخلیص RNA و ساخت cDNA

جهت تخلیص RNA 50 میکروگرم ماهیچه ران موش جداسازی گردید و سریعاً در محلول RNxplus (شرکت سیناژن) قرار گرفت. سپس سلول‌های ماهیچه تخریب شد و محلول هموژن از لیز سلولی تهیه گردید. جهت تخلیص RNA از لیزات هموژن بافت ماهیچه از کیت تخلیص RNA توتال (RNeasy mini kit, Qiagen) استفاده گردید. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز رشته اول (Fermentas) cDNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. جهت تولید cDNA از روی تمام RNA ها، از پرایمرهای تصادفی استفاده شد.

طراحی پرایمر و واکنش SOEing PCR

4 پرایمر با استفاده از نرم افزار (gene runner <http://www.generunner.net>) بر اساس جایگاه‌های برشی موجود در وکتور PLEX-MCS و هم‌چنین

توالی‌های مورد نیاز برای جای‌گیری آنزیم‌های برشی و توالی جداکننده مخصوص دو آنزیم طراحی گردید. واکنش SOEing برای ایجاد جهش‌های یک یا چند نوکلئوتیدی و یا ایجاد یک محل برش آنزیمی برای وارد کردن توالی الیگونوکلئوتیدی در داخل یک ژن استفاده می‌شود. این واکنش از سه واکنش PCR جداگانه و با استفاده از دو جفت پرایمر صورت گرفت. در واکنش اول با استفاده از پرایمرهای F و S2 توالی سیگنال ژن LAMP2B تکثیر شد (شرایط واکنش: 95 درجه 4 دقیقه، تکثیر با 30 بار تکرار: 95 درجه 30 ثانیه، 60 درجه 30 ثانیه و 72 درجه 30 ثانیه و مرحله تکثیر نهایی 5 دقیقه 72 درجه) و در واکنش دوم (شرایط واکنش: 95 درجه 4 دقیقه، تکثیر با 30 بار تکرار: 95 درجه 30 ثانیه، 60 درجه 30 ثانیه و 72 درجه 120 ثانیه و مرحله تکثیر نهایی 5 دقیقه 72 درجه) استفاده از پرایمرهای S2, R توالی پروتئین بالغ ژن مورد نظر تکثیر شد و در واکنش سوم با توجه به بخش هم‌پوشان موجود در محصول PCR واکنش اول و دوم، بخش تکثیر شده با هم ادغام و اتصال یافته و با پرایمرهای R, F تکثیر نهایی صورت گرفت (شرایط واکنش: 95 درجه 4 دقیقه، 30 ثانیه 60 درجه، 10 دقیقه 72 درجه سپس تکثیر با 30 بار تکرار: 95 درجه 30 ثانیه، 60 درجه 30 ثانیه و 72 درجه 120 ثانیه و مرحله تکثیر نهایی 5 دقیقه 72 درجه). محصول واکنش اول، دوم و نهایی روی ژل برده شد و از نظر اندازه تایید شد. تایید نهایی با تعیین توالی محصول نهایی PCR توسط شرکت ژن فن آوران انجام گردید.

کلون کردن قطعه *LAMP2b* در وکتور-*pLEX-MSC*
جهت وارد کردن قطعه *LAMP2b* در داخل وکتور *pLEX-MCS* LentiORF™ (Thermoscientific)، وکتور و قطعه تخلیص شده طی واکنش‌های جداگانه با آنزیم‌های محدودکننده *MluI*

و *BamH1* (Takara Bio Inc) دچار هضم آنزیمی شدند. کلون کردن قطعه در وکتور با استفاده از *T4* لیگاز (Fermentas) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. سازه مورد نظر با روش ترانسفورماسیون الکتریکی به باکتری مستعد الکتریکی وارد و سپس برای بیان فاکتور مقاومت 1 ساعت در محیط مایع در 37 درجه چرخانده شد. پس از 24 ساعت کشت روی محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین در 37 درجه کلونی‌های مثبت با استفاده از کلونی PCR جدا سازی شده و یکی از کلون‌های مثبت برای تخلیص پلاسمید با استفاده از کیت تخلیص (Bioneer) کشت داده شد. وکتور تخلیص شده برای تعیین توالی و تأیید سازه (شرکت فراپژوه) ارسال شد.

ساخت سازه پلاسمید *pLEX-LAMP-DARPin*
ژن *DARPin* با استفاده از ویژگی *reverse translation* (ترجمه معکوس) از *workbench CLC main* (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-main-workbench/>) از روی توالی پروتئینی آن ایجاد و بعد از بهینه کردن کدون‌ها برای بیان در سلول‌های موشی و اضافه کردن محل برش آنزیمی *NotI* و *XhoI* و نیز توالی شناساگر هیستیدین (*His-tag*) برای سنتز به شرکت *Gene Script* ارسال شد. این ژن در وکتور *pUC* دریافت گردید و با آنزیم‌های مربوطه بریده شد.

برای ساخت ژن کایمر *LAMP/DARPin*، ژن *DARPin* می‌بایست بین توالی پپتید پیام و توالی پروتئین بالغ *LAMP* قرار بگیرد. به این منظور محل برش آنزیمی که با واکنش *SOEing* بین توالی پپتید پیام و توالی پروتئین بالغ *LAMP* ایجاد شده در وکتور *pLEX-LAMP2b* مورد هضم آنزیم‌های *NotI* و *XhoI* (Takara Bio Inc) قرار گرفتند. واکنش اتصال بین قطعه هضم شده *DARPin* و وکتور با استفاده از *T4* لیگاز صورت گرفت. باکتری مستعد الکتریکی تهیه شد

و محصول اتصال به روش الکتريکی به باکتری‌ها وارد شد. پس از اضافه کردن محیط LB مایع و گرماگذاری 1 ساعته در دمای 37 درجه به منظور بیان فاکتور مقاومتی، کشت باکتری روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک انتخابی (آمپی سیلین) منتقل شد. پس از 24 ساعت قرار دادن پلیت در 37 درجه، کلونی‌های مثبت با استفاده از کلونی PCR شناسایی شدند و وکتور تخلیص شده از یکی از کلون‌های مثبت برای تعیین توالی به شرکت فزاپژوه فرستاده شد.

یافته ها

طراحی primer جهت تکثیر و تغییر در ژن LAMP2b

جهت استفاده از پروتئین LAMP2b به عنوان نگهدارنده لیگاند دارپین در سطح آگروزوم، نیاز به تکثیر ژن، تغییر و ایجاد جایگاه‌های برش آنزیمی در آن بوده ایم. برای این کار از overlap extention PCR یا SOEing PCR استفاده شد. با توجه به ساختار این ژن که دارای چند آگروزوم و اینترون است برای حذف اینترون‌ها و به دست آوردن توالی کد کننده DNA از mRNA توتال جهت تولید cDNA استفاده شده است. جهت تکثیر و تغییر در ژن مورد نظر نیاز به پرایمر است که بر اساس توالی ژن مورد نظر، جایگاه‌های آنزیم محدود کننده واقع در محل کلونینگ وکتور ویروسی و توالی‌های فاصله انداز لازم طراحی شد.

جهت تکثیر ژن LAMP2b از cDNA توتال، توالی‌های مرتبط از پایگاه داده‌های بانک ژنی دریافت گردید و بعد از blast کردن آن‌ها و تعیین جایگاه حفاظت شده، هم چنین با توجه به توالی جایگاه‌های برشی مورد نیاز جهت کلون کردن ژن، 4 پرایمر برای واکنش SOEing طراحی شد. این پرایمرها دو سایت برش آنزیم محدود کننده در انتهای 3' و انتهای 5' و هم چنین دو سایت برشی در محل ورود ژن DARPin

که بین توالی سیگنال و توالی پروتئین بالغ قرار دارد ایجاد می کنند (جدول شماره 1).

جدول شماره 1: مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای

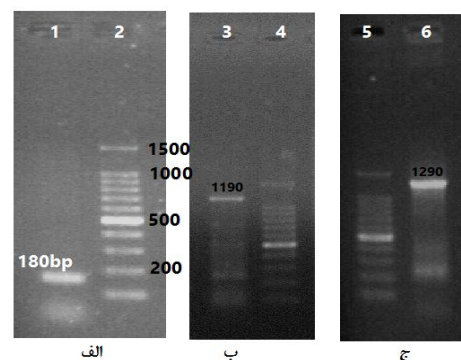
واکنش SOEing		
نام	توالی	سایت برش
F=LAMP-forward	CGGGATCC GCCACCATGTGCCTCTCTCCGGTT	BamHI
R=LAMP-reverse	ACGACGCGTCGTTAGTGTACAGA GTCTGATATCC	MluI
S1=SOEing forward	CTCAGTACAACATATGCGGCCGCA GCAGATGGGAGATGAATTCA	XhoI, NotI
S2=SOEing reverse	TGCGGCCGCATAGTTGTAATCGAG ATAAAGGCAAG TACCCCTTGA	XhoI, NotI

تولید و تکثیر ژن LAMP2b نو ترکیب

تولید و تکثیر اختصاصی ژن LAMP2b و ایجاد تغییرات لازم در توالی آن در سه واکنش PCR جداگانه با استفاده از cDNA تولید شده از ماهیچه موش انجام گردید. ابتدا جهت ایجاد مکان برش برای ورود و اتصال ژن DARPin به ژن LAMP2b با واکنش PCR دو قطعه از ژن LAMP2b به صورت جداگانه تکثیر گردید. سپس با واکنش SOEing و پرایمرهای F و R این دو بخش علاوه بر اتصال با هم دو مکان برش آنزیمی در محل اتصال نیز به ژن اضافه شد. بخش سیگنال ژن LAMP با توجه به بررسی‌های انجام شده دارای 25 اسید آمینه و 75 نوکلئوتید است. جهت اطمینان از درستی محل برش و عملکرد درست توالی سیگنال پپتید طی بررسی‌های بیو انفورماتیکی حدود 117 نوکلئوتید برای تکثیر بخش سیگنال انتخاب گردید که به انتهای 5' سایت برش BamHI و در انتهای 3' دو سایت برش XhoI، NotI به همراه بخش‌های جدا کننده مخصوص دو توالی اضافه گردید که قطعه‌ای به اندازه 180 نوکلئوتید ایجاد می کند (تصویر شماره 1-الف).

بخش پپتید بالغ ژن دارای 1140 نوکلئوتید است که با دو پرایمر R، S1 تکثیر شد. این دو پرایمر دارای دو جایگاه اثر آنزیم محدود کننده در خود هستند. با توجه به تکثیر

این بخش اضافه شدن این جایگاه‌ها به آن، طول این بخش به 1190 نوکلئوتید می‌رسد. با استفاده از پرایمرهای گفته شده به انتهای 3' دو سایت برش Xho1، Not1 با یک توالی فاصله‌انداز و در انتهای بخش 5' سایت برش آنزیم Mlu1 اضافه شده است (تصویر شماره 1 - ب).



تصویر شماره 1: تصویر الکتروفورز محصول PCR واکنش های سه گانه. SOEing

الف: محصول PCR واکنش 1 SOEing و تکثیر بخش پپتید سیگنال ژن LAMP2b با استفاده پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد و در انتهای 5' سایت برش BamH1 و در انتهای 3' آن دو سایت برش Not1 و Xho1 ایجاد شد.

ب: محصول PCR واکنش 2. SOEing 2 بخش پپتید بالغ ژن LAMP2b با استفاده پرایمرهای اختصاصی تکثیر شده و در انتهای 5' دو سایت برش Not1 BamH1 و در انتهای 3' آن جایگاه برش Xho1 ایجاد شد.

ج: محصول واکنش SOEing PCR: با استفاده از پرایمرهای F و R قطعات بخش سیگنال و پپتید بالغ با هم متصل شدند.

در واکنش نهایی بخش سیگنال و بخش پپتید بالغ با استفاده از دو پرایمر F و R به هم متصل شدند. برای این کار محصول PCR واکنش های دو مرحله قبل با هم مخلوط شدند. بخش پپتید سیگنال دارای یک بخش مکمل در انتهای 5 خود با بخش 3 ژن پپتید بالغ است که بعد از باز شدن رشته‌ها از هم این دو بخش با

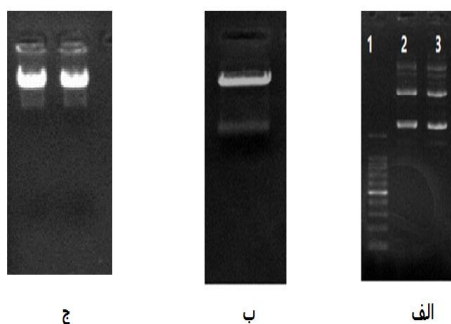
هم ترکیب شده و با استفاده از پرایمرهای F و R علاوه بر دوخته شدن تکثیر شدند. در نهایت قطعه‌ای با اندازه 1290 نوکلئوتید شکل گرفت. این قطعه دارای یک سایت برش BamH1 در انتهای 5' و یک سایت برش Mlu1 در انتهای 5' و دو سایت برش Not1، Xho1 به همراه یک بخش فاصله‌انداز، بین بخش سیگنال و پپتید بالغ است (تصویر شماره 1 - ج).

کلون کردن ژن LAMP2b در وکتور PLEX-MCS

برای کلون کردن قطعه LAMP2b در وکتور لنتی ویروسی pLEX-MCS، ابتدا قطعه فوق از روی محصول PCR واکنش SOEing تکثیر و سپس با آنزیم‌های محدود کننده BamH1، Mlu1 بریده شد. به طور هم‌زمان وکتور نیز برای ایجاد جایگاه‌های مکمل با این دو آنزیم برش خورد. سپس این دو، طی واکنش اتصال آنزیمی به هم متصل شدند تا سازه pLEX-MCS-LAMP2b حاصل شود. سازه تولید شده به باکتری E-coli نوع Stbl4 انتقال داده شد. از کلنی‌های رشد کرده روی پلیت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی R، F کلنی PCR انجام شد (تصویر شماره 2 - الف). طول قطعه تکثیر شده در این واکنش حدود 1290 bp است.

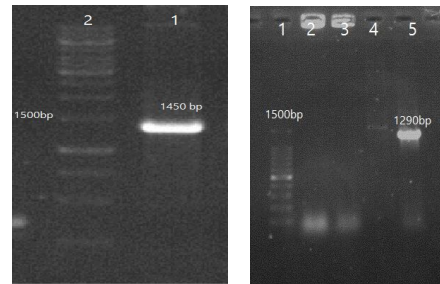
در مرحله بعد برای اطمینان بیش تر ابتدا کلونی‌ها در محیط مایع دارای آنتی بیوتیک رشد داده شدند سپس تخلیص پلاسمید از یکی از کلونی‌های مثبت انجام گرفت و روی پلاسمید تخلیص شده واکنش PCR با پرایمرهای وکتور انجام شد (تصویر شماره 2 - ب).

برای ورود قطعه DARPin در وکتور لنتی ویروسی pLEX-LAMP2b، قطعه فوق از روی وکتور pUC/DARPin با آنزیم‌های محدودکننده XhoI و NotI بریده شد. به‌طور هم‌زمان وکتور نیز برای ایجاد جایگاه‌های مکمل، با این دو آنزیم برش خورد (تصویر شماره 3). سپس این دو، طی واکنش اتصال آنزیمی به هم متصل شدند تا سازه pLEX-MCS-LAMP2b-DARPin حاصل شود.



تصویر شماره 3: الکتروفورز ژل آگاروز پلاسمید puc-DARPin قبل (الف) و بعد (ب) از برش پلاسمید با آنزیم‌های XhoI، NotI (ج). هضم آنزیمی پلاسمید pLEX-LAMP با آنزیم‌های XhoI، NotI

بعد از هضم آنزیمی وکتور وژن، واکنش اتصال آنزیمی انجام گردید سپس با استفاده از الکتروپوریشن محصول واکنش اتصال جهت تکثیر ژن به سلول‌های کامپنت stb14 انتقال داده شد. بعد از 16 ساعت از روی کلون‌های مثبت واکنش PCR colony برای تایید بیش‌تر انجام شد (تصویر شماره 4-الف). بعد از جداسازی کلون‌های مثبت باکتری و کشت آن‌ها پلاسمید جداسازی و برای تایید بیش‌تر با پرایمرهای ژن DARPin، واکنش PCR انجام و ورود ژن تایید شد (تصویر شماره 4-ب). در نهایت تایید نهایی با تعیین توالی ژن صورت گرفت.



الف: واکنش: Colony PCR باکتری‌های رشد یافته در روی محیط دارای آنتی بیوتیک جدا شده وبا پرایمرهای اختصاصی ژن، PCR colony انجام شد. نمونه 5 کلون دارای پلاسمید حاوی ژن LAMP2B هستند. 1- نشانگر DNA 2- پلاسمید فاقد ژن به عنوان کنترل منفی 3 و 4- کلون های منفی 5- کلون مثبت ب: الکتروفورز محصول PCR پلاسمید pLEX-LAMP2b. پلاسمید از کلون های مثبت جداسازی گردید وبا پرایمرهای اختصاصی پلاسمید تکثیر انجام گردید. اندازه باند 1450 بیان گر وجود پلاسمید وکلون شدن ژن LAMP2b در باکتری است. 1- محصول PCR 2- نشان گر DNA.

برای اطمینان از صحت توالی ژن، پلاسمید جداسازی و برای تعیین توالی ارسال گردید. ژن فوق بعد از تعیین توالی با ترادف‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن NCBI، BLAST شد و مشخص گردید که ژن کلون شده در وکتور PLEX همان LAMP2b موشی استو تغییرات مورد نظر نیز در آن ایجاد گردید.

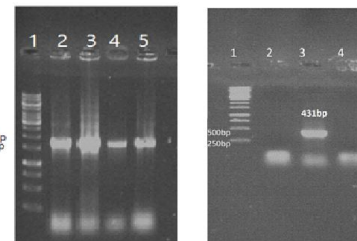
ساخت سازه pLEXMCS-LAPM-DARPin

لیگاند دارپین برای اتصال به گیرنده HER2 انتخاب شد. ابتدا با ایجاد تغییراتی در توالی ژن دارپین این ژن سنتز گردید و جهت اتصال آن به ژن LAMP2b محل‌های برش آنزیمی در ابتدا و انتهای ژن ایجاد گردید. برای انتخاب آنزیم‌های مورد نظر برای کلون کردن ژن DARPin، در وکتور pLEX-LAMP، MCS وکتور مبدأ و مقصد به منظور یافتن آنزیم‌های سازگار بررسی شدند.

وسلول‌های بینیادی مزانشیمال از منابع اصلی تولید آگزوزوم هستند و بیش از 10 برابر سلول‌های دیگر این ذرات را تولید می‌کنند (14، 15) و از طرفی نیز این سلول‌ها نسبت به ورود ژن خارجی مقاومند. بررسی‌های انجام شده نشان داد که وکتورهای لنتی ویروسی مناسب‌ترین حامل برای انجام این کار هستند. از این وکتور برای ترانس داکشن سلول‌های دندریتیک جهت ایمونوتراپی استفاده گردید (16).

در این پروژه وکتور لنتی ویروسی ساخته شد که با کمک آن بتوان هر نوع آنتی ژن یا لیگاندی را در سطح آگزوزوم بیان نمود و از آگزوزوم‌های حاصل می‌توان به عنوان حامل دارو و محصولات ژنی یا عنوان عرضه کننده آنتی ژن به سلول‌های ایمنی استفاده کرد. جهت بیان لیگاند در سطح آگزوزوم باید لیگاند مورد نظر با یکی از پروتئین‌های سطح آگزوزوم به صورت کایمر بیان گردد. ایجاد و توسعه ژن‌های کایمر کاربردهای وسیعی در شناسایی و عملکرد پروتئین‌ها دارد. روش‌های نمایش فازی که در آن یک پروتئین یا لیگاند به پروتئین سطحی فاژ متصل می‌گردد و فعالیت بیولوژیکی آن بررسی می‌گردد و هم‌چنین تولید رستپورهای کایمریک سلول لنفوسیت T که انقلابی در درمان سرطان ایجاد نموده است مثالی از کاربرد تولید ژن‌های کایمر است (17، 18). مناسب‌ترین روش تولید ژن‌های کایمر استفاده از overlap extension PCR یا SOEing است که با این روش می‌توان 2 یا چند ژن را به هم متصل نمود. هم‌چنین با کمک این روش می‌توان با ایجاد جهش‌های ژنی به بررسی اثر جهش در عملکرد پروتئین مورد نظر پرداخت (19).

در سال 2011 Alvarez-Erviti و همکاران، با بیان گیرنده استیل کولین در سطح آگزوزوم برای انتقال siRNA، به سلول‌های مغزی استفاده کردند. در این تحقیق از روش SOEing PCR جایگاه ورود لیگاند RVG بین توالی ژن سگنال پپتید و پپتید بالغ پروتئین LAMP2b ایجاد شد (20). متعاقب این کار در سال



تصویر شماره 4: تایید کلونینگ وکتور PLEX-LAMP-DARPIN

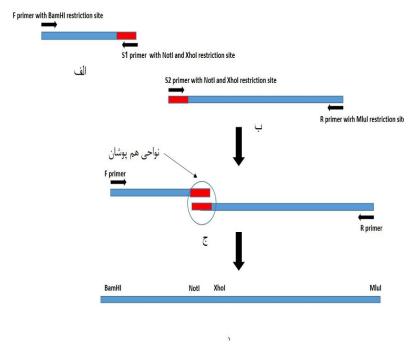
الف. تصویر الکتروفورز ژل آگاروز محصول واکنش کلونی PCR. کلون‌های مثبت حاصل از واکنش الکتروپوریشن دارای باند 1700 BP هستند. 1- نشانگر 2. DNA تا 5 محصول PCR واکنش کلونی PCR

ب: الکتروفورز ژل آگاروز محصول PCR از روی پلاسمید جدا شده از باکتری. باند 431 bp بیان گر تایید ورود ژن دارپین در وکتور PLEX-LAMP2B و تایید ساخت ژن کایمر LAMP-DARPIN است. 1- نشان گر 2 DNA - محصول PCR وکتور PLEX-LAMP 3- محصول PCR وکتور 4 PLEX-LAMP-DARPIN - کنترل منفی. باند 431 نوکلوتیدی در چاهک 3 نشان‌دهنده تکثیر ژن دارپین و در نتیجه کلونینگ آن در وکتور است. در حالی که در چاهک شماره 2 باندی دیده نمی‌شود.

بحث

سیستم‌های ویروسی کارایی بالاتری از سایر روش‌های انتقال ژن دارند. در بین وکتورهای ویروسی، لنتی ویروس‌ها توانایی انتقال ژن به انواع سلول‌ها همانند سلول بنیادی مغز استخوان، مزانشیمال و سلول‌های تمایز یافته و فاقد قدرت تقسیم مانند سلول‌های عصبی، دندریتیک سل‌ها و ماکروفاژها را دارند. این سلول‌ها به سایر روش‌های ویروسی انتقال ژن مقاومت نشان می‌دهند. بین روش‌های انتقال ژن جهت تولید فرآورده‌های زیستی، استفاده از لنتی ویروس به دلیل ورود ژن انتقالی در ژنوم میزبان، توانایی انتقال ژن‌هایی با اندازه بزرگ‌تر و ایجاد سلول‌هایی با بیان پایدار در مقایسه با سایر روش‌ها، کاربرد بیش‌تری دارد. هدف از این مطالعه تولید وکتور جهت تولید آگزوزوم‌های هدفمند بود. سلول‌های دندریتیک

سرسین بین دو بخش قرار گرفت. برای این کار بین بخش پپتید سیگنال و پپتید بالغ ژن جایگاه برشی برای اتصال لیگاند ایجاد گردید. برای ایجاد سایت برش و تداخل ژن دارپین بین این دو قسمت از روش SOEing PCR استفاده گردید (تصویر شماره 1). با استفاده از پرایمرهای F و S1 بخش پپتید پیام ژن LAMP2b و با پرایمرهای R و S2 بخش پپتید بالغ تکثیر گردید. محصول PCR واکنش اول و دوم به هم متصل و با استفاده از پرایمرهای F و R به یکدیگر اتصال یافتند. با توجه به مشخصات پرایمرهای موجود محصول PCR نهایی در بخش 3' سایت برشی آنزیم BamH1 و در بخش 5' جایگاه برش آنزیم Mlu1 را دارد. هم چنین بین پپتید پیام و پروتئین بالغ دو سایت برش Xho1 و Not1 ایجاد شده است.

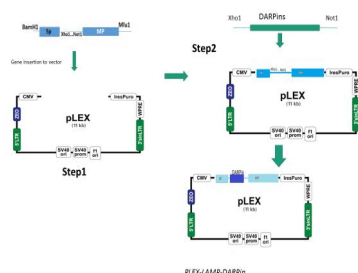


تصویر شماره 5: نمایش شماتیک آماده سازی ژن LAMP2b برای قرار گرفتن در داخل وکتور ویروسی و نیز پذیرش قطعه DARPin. الف: تکثیر قطعه پپتید پیام ژن LAMP2b؛ ب: تکثیر قطعه پپتید بالغ ژن LAMP2b؛ ج: اتصال دو قطعه تولید شده در واکنش PCR SOEing؛ د: قطعه تولید شده با جایگاههای برشی آنزیم BamHI و MluI در دو انتها برای قرار گرفتن در وکتور ویروسی و جایگاههای برشی دو آنزیم XhoI و NotI در وسط ژن برای کلون کردن قطعه DARPin

با توجه به شکل جایگاه برش آنزیمی Xho1 و Not1 در هریک از پرایمرهای S1, S2 قرار گرفت. هم چنین این دو جایگاه با فاصله اندازه‌های مناسب جهت عملکرد آنزیمهای برشی انتخاب شدند. ابتدا

Ohno 2013 و همکاران با مهندسی سلولهای HEK اگزوزومهایی هدفمند جهت انتقال miRNA به سلولهای سرطان سینه EGFR مثبت طراحی نمودند (21). در سال 2014 Tian و همکارانش از اگزوزومهای هدفمند شده با RVG که با LAMP2b به صورت کایمر در آمده بود برای انتقال دوکسی رویسین به سلولهای MDA231 استفاده نمودند (22). هم چنین در آخرین گزارش این روش برای انتقال هدفمند siRNA به سلولهای مغزی برای درمان معتادین به مورفین به کار رفت (22, 23). در همه تحقیقات انجام شده فوق از یک پروتئین سطحی اگزوزوم به عنوان نگهدارنده لیگاند استفاده شده است.

پروتئین LAMP2 یا پروتئین همراه با غشاء لیزوزوم (Lysosomal associated membrane protein 2) در انواع سلولها بیان می گردد (24). و دارای سه واریانت مختلف و واریانت b این پروتئین در سلولهای مغز و ماهیچه بیش تر بیان می گردد (25). این پروتئین درون غشایی لیزوزومی، شدیداً گلیکوزیله بوده و در اگزوزومهای سلولهای مختلف بیان می شود. با توجه به این که بخش انتهایی آمین این پروتئین در خارج از اگزوزوم قرار می گیرد، محل ورود لیگاند باید بین ترادف سیگنال و ترادف پپتید بالغ باشد. ژن این پروتئین با ژن دارپین به صورت کایمر در آمد تا بتوان این پروتئین را به عنوان لیگاند در سطح اگزوزومهای تولید شده توسط سلولهای مختلف بیان کرد. در تحقیقات گذشته پپتید DARPin G3 با پروتئین پوششی ویروس به صورت کایمر در آمد و در تولید ویروسهای هدفمند آدنو و لنتی ویروس علیه سلولهای سرطانی HER2 مثبت به کار رفت (26). هم چنین این پپتید به صورت کایمر با پروتئین سطحی باکتری برای هدفمند سازی باکتری جهت انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفت (27). تاکنون گزارشی مبنی بر بیان این لیگاند در سطح اگزوزوم وجود ندارد. هم چنین جهت ممانعت از برهم کنش دو پروتئین، توالی اتصال دهنده گلیسین-گلیسین



تصویر شماره 6: مراحل تولید وکتور ویروسی pLEX-LAMP2b-DARPin

مرحله اول: ورود قطعه LAMP2b از طریق جایگاه های برشی طراحی شده به درون وکتور ویروسی، مرحله دوم: وارد شدن قطعه DARPin داخل قطعه LAMP2b.

بعد از کلونینگ ژن LAMP2b در وکتور pLEX، وکتور pLEX-LAMP ایجاد گردید. با کمک این وکتور، ژن هر لیگاند را می توان بین توالی سیگنال وپتید بالغ قرار داد ولیگاند مورد نظر را در سطح آگروزوم بیان نمود. در این مطالعه لیگاند متصل شونده به HER2 که توسط polekhtum و همکارانش (12) طراحی گردید انتخاب شد. بر این اساس ژن لیگاند مورد نظر برای بیان در سلول های یوکاریوتی بهینه سازی و سنتز شد و در وکتور pLEX-LAMP شد و وکتور pLEX-LAMP-DARPin ایجاد گردید.

در این مطالعه دو وکتور لنتی ویروسی جدید طراحی گردید. وکتور plex-lamp وکتوری است که می توان ژن هر لیگاند یا آنتی ژنی را برای بیان در سطح آگروزوم و هدفمند سازی آن علیه سلول خاص، بیان نمود. وکتور plex-lamp-darpin جهت تولید آگروزوم های هدفمند علیه سلول های سرطانی با بیان بالای HER2 تولید گردید.

در ادامه این مطالعه وکتور های تهیه شده در ویروس لنتی بسته بندی شده و برای انتقال ژن به سلول های دندریتیک و مزانشیمال مشتق از مغز استخوان و بافت چربی استفاده خواهد شد.

بخش سیگنال ژن از روی cDNA با کمک پرایمرهای S2، F تکثیر گردید و در انتهای 3 آن جایگاه برش BamH1 و در انتهای 5 آن جایگاه برش Xho1، Not1 ایجاد شد. با کمک پرایمرهای s1، R بخش پپتید بالغ تکثیر گردید و در انتهای 3 آن جایگاه برشی آنزیم Xho1، Not1 و در انتهای 5 آن جایگاه برشی Mlu1 ایجاد گردید. با توجه به این که انتهای 5 بخش سیگنال با انتهای 3 پپتید بالغ همپوشان هستند. در واکنش سوم PCR بین دو بخش با هم ترکیب گردید و اتصال بخش سیگنال و بالغ صورت گرفت و بین این دو بخش نواحی برشی مورد نظر ایجاد شد که بررسی توالی موارد فوق را تایید نمود. توالی سایت برشی، Not1 از 8 نوکلئوتید تشکیل شده است. اضافه شدن این توالی، فریم خواندن ژن را تغییر داده، باعث جهش می گردد. بنابراین برای جلوگیری از این اتفاق، یک نوکلئوتید با استفاده از پرایمر به این محل اضافه شد. اضافه کردن هر یک از چهار نوکلئوتید، باعث ایجاد اسید آمینه ای متفاوت در این مکان می گردید. با توجه به این که سه اسید آمینه قبلی آلانین است، بهترین گزینه نوکلئوتید آدنین (A) بود. اضافه کردن این نوکلئوتید باعث ایجاد یک اسید آمینه آلانین دیگر و ایجاد 4 آلانین در ساختار می شود. با توجه به این که برای شکل گیری هر مارپیچ 3/6 اسید آمینه مورد نیاز است این حالت باعث ایجاد یک مارپیچ آلفا می گردد که به پایداری ساختار و عدم برهم کنش لیگاند اتصال، به پروتئین اصلی کمک می کند (28، 29).

ژن LAMP2b که اکنون دارای جایگاه های برشی مناسب (تصویر شماره 5) برای کلون کردن در وکتور ویروسی pLEX-MCS LentiORF™ می باشد، وارد وکتور گردید (تصویر شماره 6). ژن تولید شده دارای دو آنزیم برشی در ناحیه بین پپتید پیام و پپتید بالغ است که از طریق این دو آنزیم قطعه دارپین می تواند داخل آن قرار بگیرد (تصویر شماره 6).

سپاسگزاری

این مطالعه در گروه بیوتکنولوژی تربیت مدرس با حمایت دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری اجرا گردید. از همه

عزیزانی که در این پروژه قبول زحمت نموده‌اند تشکر می‌کنیم

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*.2015;136(5):E359-E386.
2. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):52-62.
3. Shapiro CL, Recht A. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 2001;344(26):1997-2008.
4. Redd WH, Montgomery GH, DuHamel KN. Behavioral intervention for cancer treatment side effects. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(11):810-823.
5. Sawyers C. Targeted cancer therapy. *Nature* 2004;432(7015):294-297.
6. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*. 2006;107(2):102-108.
7. Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32(3-4):623-642.
8. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-659.
9. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011;2:282.
10. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*.2011;29(4):341-345.
11. Gu FX, Karnik R, Wang AZ, Alexis F, Levy-Nissenbaum E, Hong S, et al. Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano today* 2007;2(3):14-21.
12. Zahnd C, Wyler E, Schwenk JM, Steiner D, Lawrence MC, McKern NM, et al. A designed ankyrin repeat protein evolved to picomolar affinity to HER2. *J Mol Biol*. 2007;369(4):1015-1028.
13. Zahnd C, Pecorari F, Straumann N, Wyler E, Plückthun A. Selection and characterization of HER2 binding-designed ankyrin repeat proteins. *J Biol Chem*.2006;281(46):35167-35175.
14. Lamparski HG, Metha-Damani A, Yao J-Y, Patel S, Hsu D-H, Ruegg C, et al. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J Immunol Methods*.2002;270(2):211-226.
15. Viaud S, Ploix S, Lapierre V, Théry C, Commere P-H, Tramalloni D, et al. Updated technology to produce highly immunogenic dendritic cell-derived exosomes of clinical

- grade: a critical role of interferon- γ . *J Immunother*. 2011;34(1):65-75.
16. Toscano MG, Delgado M, Kong W, Martin F, Skarica M, Ganea D. Dendritic cells transduced with lentiviral vectors expressing VIP differentiate into VIP-secreting tolerogenic-like DCs. *Mol Ther*. 2010;18(5):1035-1045.
 17. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(24):10024-10028.
 18. Kay BK, Winter J, McCafferty J. Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual. Cambridge, Academic Press; 1996.
 19. Escrevente C, Keller S, Altevogt P, Costa J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 2011;11:108.
 20. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 2011;29(4):341-345.
 21. Ohno S-i, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther*. 2013;21(1):185-191.
 22. Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, Anderson GJ, et al.. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* 2014;35(7):2383-2390.
 23. Liu Y, Li D, Liu Z, Zhou Y, Chu D, Li X, et al. Targeted exosome-mediated delivery of opioid receptor Mu siRNA for the treatment of morphine relapse. *Sci Rep*. 2015;5: 17543.
 24. de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin J-J, Ait-Yahia S, et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 1998;9(3):325-336.
 25. Gough NR1, Hatem CL, Fambrough DM. The family of LAMP-2 proteins arises by alternative splicing from a single gene: characterization of the avian LAMP-2 gene and identification of mammalian homologs of LAMP-2b and LAMP-2c. *DNA and cell biology* 1995;14(10):863-867.
 26. Dreier B, Honegger A, Hess C, Nagy-Davidescu G, Mittl PR, Grütter MG, et al. Development of a generic adenovirus delivery system based on structure-guided design of bispecific trimeric DARPins adapters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(10):E869-E877.
 27. Zadavec P, Štrukelj B, Berlec A. Improvement of LysM-mediated surface display of designed ankyrin repeat proteins (DARPs) in recombinant and nonrecombinant strains of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus* Species. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(6):2098-2106.
 28. Cochran W, Crick F, Vand V. The structure of synthetic polypeptides. I. The transform of atoms on a helix. *Acta Crystallographica* 1952;5(5):581-586.
 29. Uchida E, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, Hayakawa T. Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells. *Biol Pharm Bull*. 2002;25(7):891-897.