ORIGINAL ARTICLE

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

Shabanali Khodashenas Limoni[1],
Fatemeh Salimi[2],
Mehdi Forouzandeh Moghaddam[3]

[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

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (151):12-23 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-15]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره 151 مرداد سال 1396 (23-12)

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

شعبانعلی خداشناس لیمونی[1]
فاطمه سلیمی[2]
مهدی فروزنده مقدم[3]

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های زنده به‌منظور ارتباط با محیط اطرافشان نانوذرات اگزوزومی آزاد می کنند.امروزه اگزوزوم 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 اگزوزوم 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 اگزوزوم 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 وبا پرایمرهای اختصاصی، ژن LAMP2b تکثیر گردید. با روش SOEing PCR دو سایت برش بین توالی کدکننده سیگنال پپتید وپپتید بالغ ایجاد شد وسپس در وکتور لنتی ویروسی pLEX کلون شد. ژن دارپین طراحی ،اپتیمایز ، سنتزودر وکتور pLEX-LAMP بین توالی سیگنال وپپتید بالغ کلون شد و کلونیگ با colony-PCR با تعیین توالی تایید شد.

یافته‌ها: ژل الکتروفورز محصول واکنش SOEing PCR، بیان‌گر تکثیر بخش کدکننده ژن LAMP2b است. بعد از کلونیگ وجداسازی 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 به‌وسیله الکتروفورز وتوالی‌یابی 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 سرطا نی HER2 مثبت در سطح اگزوزوم بیان نمود.

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

مقدمه

سرطان چهارمین عامل مرگ ومیر در جهان وسرطان سینه اولین عامل مرگ ومیر زنان در بین انواع سرطان‌هاست(2 ،1). درمان‌های رایج شیمی‌درمانی مشکلاتی نظیر تروما، نکروز و از بین بردن سلول‌های سالم را در پی دارد(4 ،3). جهت جلوگیری از نابودی سلول‌های سالم مکانیسم‌هایی باید طراحی گردد که دارو را به سلول‌های سرطانی برساند وسلول‌های سالم از اثر دارو در امان بمانند. چنین مشکلاتی تحقیقات را به

مولف مسئول: مهدی فروزنده مقدم - تهران دانشگاه تربیت مدرس دانشکده پزشکی گروه بیوتکنولوژی پزشکی Email: foroz@modares.ac.ir
1. استادیار، 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-15]

طرف درمان‌های هدفمند سوق داد(5).

اگزوزوم‌ها نانو ذرات طبیعی به‌اندازه 40 تا90 نانومتر هستند که از سلول‌های مختلف نظیر سلول‌های ایمنی، سلول‌های سرطانی، سلول‌های بنیادی و سلول‌های عصبی رها می‌شوند(7،6). این نانو ذرات در مایعات بیولوژیک نظیر سرم ، شیر، ادرار ومایع سینوویال یافت می‌شوند وتوانایی عبور از سد خونی- مغزی را دارند(7). اگزوزوم‌ها از سلول‌های خاصی رها شده وبه سلول‌های هدف خود متصل شده ومواد بیولوژیک نظیر پروتئین miRNAو mRNAرا به سلول‌های هدف خود می‌رسانند وفعالیت آن‌ها را تغییر می‌دهند(8). اتصال اگزوزوم به سلول‌های هدف بر اساس واکنش لیگاند ورسپتور 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-Ervitiوهمکاران با بیان لیگاند رسپتورهای استیل کولین در سطح اگزوزوم توانستند اگزوزوم‌های هدفمند جهت انتقال siRNA به سلول‌های مغزی تولید کند(10). هدفمند سازی اگزوزوم به‌وسیله بیان یک گیرنده متصل به پروتئین طبیعی بین غشایی اگزوزوم صورت می‌گیرد .پروتئین همراه غشاء لیزوزومی LAMPاز پروتئین‌های بین‌غشایی اگزوزوم بوده ودر 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 بر هم‌کنش با پروتئین حامل و داشتن فعالیت بیولوژیک بعد از کایمریزاسیون(11) را داشته باشند. دارپین‌ها گروهی از پپتیدهای سنتزی هستند که از تکرار دو موتیف مارپیچ آلفا ویک صفحه بتا ساخته شده‌اند و توانایی اتصال بالایی با لیگاند خود دارند. این ترکیبات فاقد سیستئین هستند و باند دی سولفید ایجاد نمی‌کنند وبیان 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 رادر سطح اگزوزوم جهت انتقال هدفمند دارو ومواد ژنتیکی به سلول‌های سرطانی HER2 مثبت بیان نمود که برای این هدف ژن کایمر LAMP-DARPIN ساخته شد ودر وکتورلنتی ویروسی PLEX کلون شد.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر به روش تجربی بوده است.

تخلیص RNA و ساخت cDNA

جهت تخلیص RNA 50 میکروگرم ماهیچه ران موش جداسازی گردید وسریعاً 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) (Qiagenاستفاده گردید. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز رشته اول (Fermentas) cDNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. جهت تولید cDNAاز 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 وهم‌چنین

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-15]

توالی‌های مورد نیاز برای جای‌گیری آنزیم‌های برشی و توالی جداکننده مخصوص دو آنزیم طراحی گردید.

واکنش SOEing برای ایجاد جهش‌های یک یا چند نوکلئوتیدی ویا ایجاد یک محل برش آنزیمی برای وارد کردن توالی الیگونوکلئوتیدی در داخل یک ژن استفاده می‌شود. این واکنش از سه واکنش PCR جداگانه وبا 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 4دقیقه، تکثیربا 30 بار تکرار: 95 درجه 30ثانیه،60 درجه 30 ثانیه و72 درجه 30 ثانیه ومرحله تکثیر نهایی 5 دقیقه 72 درجه) و در واکنش دوم (شرایط واکنش: 95 درجه 4دقیقه، تکثیربا 30 بار تکرار: 95 درجه 30ثانیه،60 درجه 30 ثانیه و72 درجه 120ثانیه ومرحله تکثیر نهایی 5 دقیقه 72 درجه) استفاده از پرایمرهای R ,S2 توالی پروتئین بالغ ژن مورد نظر تکثیر شدودر واکنش سوم با توجه به‌بخش هم‌پوشان موجود درمحصول PCR واکنش اول ودوم ،بخش تکثیر شده با هم ادغام واتصال یافته وبا پرایمرهای R,F تکثیر نهایی صورت گرفت(شرایط واکنش: 95 درجه 4دقیقه، 30 ثانیه 60 درجه، 10 دقیقه 72 درجه سپس تکثیربا 30 بار تکرار: 95 درجه 30ثانیه،60 درجه 30 ثانیه و72 درجه 120ثانیه ومرحله تکثیر نهایی 5 دقیقه 72 درجه).محصول واکنش اول ، دوم و نهایی روی ژل برده شد واز 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 پروتوکل 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 کلونی های 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 فزاپژوه) ارسال شد.

ساخت سازه پلاسمید pLEX-LAPM-DARPin

ژنDARPin با استفاده از ویژگی reverse translationنرم افزار) 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 NotIو 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 وتوالی پروتئین بالغ LAMP قرار بگیرد. به‌این منظور محل برش آنزیمی که با واکنش SOEing بین توالی پپتید پیام و توالی پروتئین بالغ LAMP ایجاد شده در وکتور pLEX-MSC-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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-15]

و محصول اتصال به روش الکتریکی 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، کلونی های 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 وتغییر در ژن LAMP2b

جهت استفاده از پروتئین LAMP2b به‌عنوان نگهدارنده لیگاند دارپین در سطح اگزوزوم، نیاز به تکثیر ژن ، تغییر وایجاد جایگاه‌های برش آنزیمی در آن بوده‌ایم. برای این کار از overlap extention PCR یا SOEing PCRاستفاده شد. با توجه به ساختار این ژن که دارای چند اگزوزون واینترون است برای حذف اینترون ها وبه‌دست آوردن توالی کد کننده DNA از mRNAتوتال جهت تولید cDNA استفاده شده است.جهت تکثیر وتغییر در ژن مورد نظر نیاز به پرایمراست که بر اساس توالی ژن مورد نظر، جایگاه‌های آنزیم محدودکننده واقع در محل کلونیگ وکتور ویروسی و توالی‌های فاصله‌انداز لازم طراحی شد.

جهت تکثیر ژن LAMP2b از cDNA توتال ،توالی‌های مرتبط از پایگاه داده‌های بانک ژنی دریافت گردید وبعد از blast کردن آن‌ها وتعیین جایگاه حفاظت شده، هم‌چنین با توجه به توالی جایگاه‌های برشی مورد نیاز جهت کلون کردن ژن ، 4 پرایمر برای واکنشSOEing طراحی شد.این پرایمرها دو سایت برش آنزیم محدودکننده در انتهای ′3 وانتهای ′5 و هم‌چنین 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	*BamH1*
R=LAMP-reverse	ACGACGCGTCGTTAGTGTTACAGA GTCTGATATCC	*Mlu1*
S1=SOEing forward	CTCGAGTACAACTATGCGGCCGCA GCAGAATGGGAGATGAATTTCA	*Xho1،Not1*
S2=SOEing reverse	TGCGGCCGCATAGTTGTACTCGAG ATAAAGGCAAG TACCCTTTGAA	*Xho1،Not1*

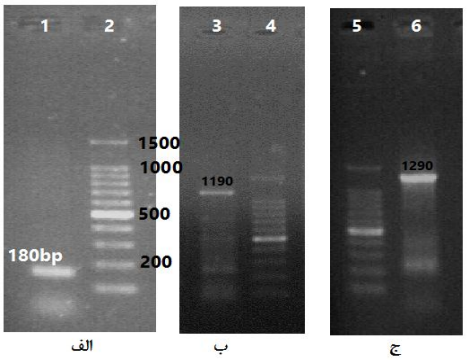
تولید وتکثیر ژنLAMP2b نوترکیب

تولید وتکثیر 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. ابتداجهت ایجاد مکان برش برای ورود واتصال 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 Rاین دو بخش علاوه بر اتصال با هم دو مکان برش آنزیمی در محل اتصال نیز به ژن اضافه شد.بخش سیگنال ژن LAMPبا توجه به بررسی‌های انجام شده دارای 25 اسید امینه و75 نوکلئوتید است.جهت اطمینان از درستی محل برش و عملکرد درست توالی سیگنال پپتید طی بررسی‌های بیو انفورماتیکی حدود 117 نوکلئوتید برا ی تکثیر بخش سیگنال انتخاب گردیدکه به انتهای ′5 سایت برش BamH1 و در انتهای′3 دو سایت برش Xho1 ، Not1به همراه بخش های 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 نوکلوتید است که با دو پرایمر R،S1 تکثیر شد. این دو پرایمر دارای دو جایگاه اثر آنزیم محدودکننده در خود هستند. با توجه به تکثیر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-15]

این بخش واضافه 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 SOEing 1 وتکثیر بخش پپتید سیگنال ژن LAMP2b با استفاده پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد ودر انتهای ′5 سایت برش BamH1 و در انتهای ′3آن دو سایت برش Not1و Xho1 ایجاد شد .

ب: محصول PCR واکنش-2. SOEing 2 بخش پپتید بالغ ژن LAMP2bبا استفاده پرایمرهای اختصاصی تکثیر شده ودر انتهای′5 دو سایت برشBamH1 Not1 و در انتهای ′3آن جایگاه برش Xho1ایجاد شد.

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

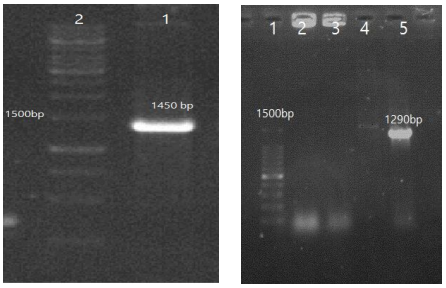
در واکنش نهایی بخش سیگنال و بخش پپتید بالغ با استفاده از دو پرایمر F وR به‌هم متصل شدند. برای این کار محصول PCRواکنش‌های دو مرحله قبل با هم مخلوط شدند. بخش پپتید سیگنال دارای یک بخش مکمل در انتهای 5 خود با بخش 3 ژن پپتید بالغ است که بعد از باز شدن رشته‌ها از هم این دو بخش با هم ترکیب شده وبا استفاده 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 ویک سایت برش *Mlu1* در انتهای ′5 و دو سایت برش *Xho1*،*Not1* به همراه یک بخش فاصله انداز، بین بخش سیگنال و پپتید بالغ است(تصویر شماره 1- ج).

کلون کردن ژن LAMP2bدر 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 محدودکننده *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 به‌هم 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 F،R کلنی PCR انجام شد (تصویر شماره 2- الف).طول قطعه تکثیر شده در این واکنش حدود bp 1290است.

در مرحله بعد برای اطمینان بیش‌تر 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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-15]



الف ب

تصویر شماره 2: الکتروفورز ژل آگاروز واکنشPCR جهت بررسی کلونینگ ژن.LAMP2b

الف: واکنش : Colony PCR باکتری‌های رشد یافته در روی محیط دارای آنتی بیوتیک جدا شده وبا پرایمرهای اختصاصی ژن، colony PCRانجام شد.نمونه 5 کلون دارای پلاسمید حاوی ژن LAMP2Bهستند.1-نشانگر -2 DNA پلاسمید فاقد ژن به عنوان کنترل منفی 3 و4- کلون های منفی 5- کلون مثبت

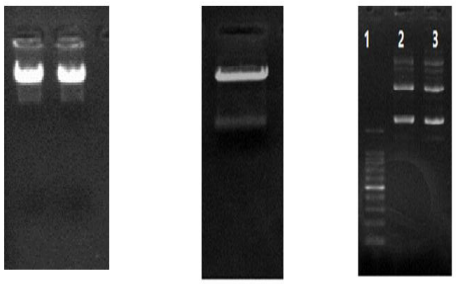
ب:الکتروفورز محصول PCR پلاسمیدpLEX-LAMP2b. پلاسمید از کلون های مثبت جداسازی گردید وبا پرایمرهای اختصاصی پلاسمید تکثیر انجام گردید. اندازه باند 1450بیان گر وجودپلاسمید وکلون شدن ژن LAMP2b در باکتری است.1-محصول 2 PCR- نشان گر DNA .

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 ، BLASTشد ومشخص گردیدکه ژن کلون شده در وکتور PLEX همان LAMP2b موشی استوتغییرات مورد نظر نیز در آن ایجاد گردید.

ساخت سازه pLEXMCS-LAPM-DARPin

لیگاند داروین برای اتصال به گیرنده HER2 انتخاب شد .ابتدا با ایجاد تغییراتی در توالی ژن داروین این ژن سنتز گردید وجهت 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 ، MCSوکتور مبدأ و مقصد به منظور یافتن آنزیم‌های سازگار بررسی شدند.

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.

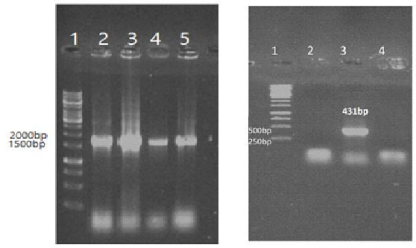


ج ب الف

تصویر شماره 3: الکتروفورز ژل آگاروز پلاسمید puc-DARPin قبل(الف)وبعد(ب)از برش پلاسمید با آنزیم‌های Not1،Xho1 .(ج) هضم آنزیمی پلاسمید pLEX-LAMP با آنزیم‌های Not1،Xho1

بعد از هضم آنزیمی وکتور وژن ،واکنش اتصال آنزیمی انجام گردید سپس با استفاده از الکتروپوریشن محصول واکنش اتصال جهت تکثیر ژن به سلول‌های کامپتنت stbl4 انتقال داده شد. بعد از 16 ساعت از روی کلون‌های مثبت واکنش colony PCR برای تایید بیش‌ترانجام شد (تصویر شماره 4-الف). بعد از جداسازی کلون‌های مثبت باکتری وکشت آن‌ها پلاسمیدجداسازی وبرای 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-15]



تصویر شماره 4: تایید کلونیگ وکتورPLEX-LAPM-DARPIN
الف. تصویر الکتروفورز ژل آگاروز محصول واکنش کلونی PCR.کلون‌های مثبت حاصل از واکنش الکتروپوریشن دارای باند1700 BPهستند. 1-نشانگر 2 . DNA تا5 محصول PCR واکنش کلونی PCR
ب: الکتروفورز ژل آگاروز محصول PCR از روی پلاسمید جدا شده از باکتری.باند bp431 بیان گر تایید ورود ژن دارپین در وکتور PLEX-LAMP2B و تایید ساخت ژن کایمر LAPM-DARPIN است.1-نشان‌گر 2 DNA- محصول PCR وکتور PLEX-LAMP 3- محصول PCR وکتور 4 PLEX-LAPM-DARPIN- کنترل منفی.باند 431 نوکلوتیدی در چاهک 3 نشان‌دهنده تکثیر ژن دارپین و در نتیجه کلونیگ آن در وکتور است.در حالی‌که در چاهک شماره 2 باندی دیده نمی‌شود.

بحث

سیستم‌های ویروسی کارایی بالاتری از سایرروش‌های انتقال ژن دارند. در بین وکتورهای ویروسی ، لنتی ویروس‌ها توانایی انتقال ژن به انواع سلول‌ها همانند سلول بنیادی مغز استخوان ، مزانشیمال وسلول‌های تمایزیافته و فاقد قدرت تقسیم مانند سلول‌های عصبی ،دندریتیک سل‌ها و ماکروفاژها را دارند. این سلول‌ها به سایرروش‌های 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 اگزوزوم‌های هدفمند بود. سلول‌های دندریتیک وسلول‌های بنیادی مزانشیمال از منابع اصلی تولید اگزوزوم هستند و بیش از 10 برابر سلول‌های دیگر این ذرات را تولید می کنند(15،14) واز طرفی نیز این سلول‌ها نسبت به ورود ژن خارجی مقاومند. بررسی‌های انجام شده نشان داد که وکتورهای لنتی ویروسی مناسب‌ترین حامل برای انجام این کارهستند.از این وکتور برای ترانس داکشن سلول‌های دندریتیک جهت ایمونوتراپی استفاده گردید(16).

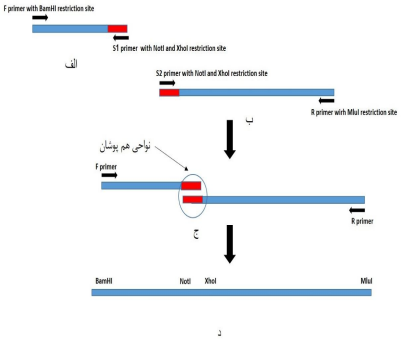
در این پروژه وکتور لنتی ویروسی ساخته شد که با کمک آن بتوان هر نوع آنتی ژن یا لیگاندی را در سطح اگزوزوم بیان نمود و از اگزوزوم‌های حاصل می‌توان به عنوان حامل دارو و محصولات ژنی یا عنوان عرضه کننده آنتی‌ژن به سلول‌های ایمنی استفاده کرد.جهت بیان لیگاند در سطح اگزوزم باید لیگاند مورد نظر با یکی از پروتئین‌های سطح اگزوزوم به‌صورت کایمر بیان گردد. ایجاد و توسعه ژن‌های کایمر کاربردهای وسیعی در شناسایی و عملکرد پروتئین‌ها دارد.روش‌های نمایش فاژی که در آن یک پروتئین یا لیگاند به پرو تئین سطحی فاژمتصل می گردد وفعالیت بیولوژیکی آن بررسی می‌گردد و هم‌چنین تولید رسپتورهای کایمریک سلول لنفوسیت T که انقلابی در درمان سرطان ایجاد نموده است مثالی از کاربرد تولید ژن‌های کایمر است(18 ،17). مناسب‌ترین روش تولید ژن‌های کایمر استفاده از overlape extention PCR یا SOEing PCRاست 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 RVGبین توالی ژن سگنال پپتید وپپتید بالغ پروتئین LAMP2bایجاد شد(20). متعاقب این کار در سال

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-15]

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

پروتئینLAMP2 یا پروتئین همراه با غشاء لیزوزوم (Lysosomal associated membrane protein 2) در انواع سلول‌ها بیان می‌گردد(24). ودارای سه واریانت مختلف و واریانت b این پروتئین در سلول‌های مغز و ماهیچه بیش‌تر بیان می‌گردد(25). این پروتئین درون غشایی لیزوزومی، شدیداً گلیکوزیله بوده ودر اگزوزوم‌های سلول‌های مختلف بیان می‌شود. با توجه به‌این‌که بخش انتهای آمین این پروتئین در خارج از اگزوزوم قرار می‌گیرد ،محل ورود لیگاند باید بین ترادف سیگنال و ترادف پپتید بالغ باشد. ژن این پروتئین با ژن دارپین به صورت کایمر در آمدتا بتوان این پروتئین رابه عنوان لیگاند در سطح اگزوزوم های تولید شده توسط سلول‌های مختلف بیان کرد. در تحقیقات گذشته پپتید G3 DARPin با پروتئین پوششی ویروس به‌صورت کایمر در آمد و در تولید ویروس‌های هدفمند آدنو و لنتی ویروس علیه سلول‌های سرطانی HER2 مثبت به‌کار رفت(26). هم‌چنین 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.هم‌چنین جهت ممانعت از بر هم کنش دو پروتئین ،توالی اتصال‌دهنده گلیسین –گلیسین –سرین بین دو بخش قرار گرفت. برای این کار بین بخش پپتید سیگنال وپپتید بالغ ژن جایگاه برشی برای اتصال لیگاند ایجاد گردید.برای ایجاد سایت برش وتداخل 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 LAPM2b و با پرایمرهای R وS2 بخش پپتید بالغ تکثیر گردید. محصول PCR واکنش اول و دوم به‌هم 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 ودر بخش ′5 جایگاه برش آنزیم Mlu1 را دارد. هم‌چنین بین پپتید پیام و پروتئین بالغ دو سایت برش Not1 و Xho1 ایجاد شده است.



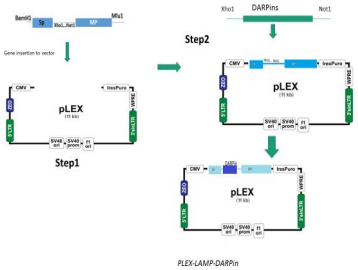
تصویر شماره 5: نمایش شماتیک آماده سازی ژن LAMP2b برای قرار گرفتن در داخل وکتور ویروسی و نیز پذیرش قطعه DARPin. الف: تکثیر قطعه پپتید پیام ژن LAMP2b، ب: تکثیر قطعه پپتید بالغ ژن LMAP2b، ج: اتصال دو قطعه تولید شده در واکنش SOEing PCR، د: قطعه تولید شده با جایگاه‌های برشی دو آنزیم BamHI و MluI در دو انتها برای قرار گرفتن در وکتور ویروسی و جایگاه‌های برشی دو آنزیم NotI و XhoI در وسط ژن برای کلون کردن قطعه DARPin

با توجه به شکل جایگاه برش آنزیمی Xho1 و Not1در هریک از پرایمرهای S1, S2 قرار گرفت .هم‌چنین این دو جایگاه با فاصله اندازه‌های مناسب جهت عملکرد آنزیم‌های برشی انتخاب شدند. ابتدا

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-15]

بخش سیگنال ژن از روی cDNA با کمک پرایمرهای S2, Fتکثیر گردید ودر انتهای 3 آن جایگاه برش BamH1ودر انتهای 5 آن جایگاه برش Not1, Xho1 ایجاد شد.با کمک پرایمرهای s1,R بخش پپتید بالغ تکثیر گردیدو در انتهای 3 ان جایگاه برشی آنزیم Not1, Xho1ودر انتهای 5 آن جایگاه برشی Mlu1 ایجاد گردید.با توجه به‌این‌که انتهای 5 بخش سیگنال با انتهای 3 پپتید بالغ همپوشان هستند. در واکنش سوم PCRاین دو بخش با هم ترکیب گردید و اتصال بخش سیگنا ل و بالغ صورت گرفت و بین این دوبخش نواحی برشی مورد نظر ایجاد شد که بررسی توالی موارد فوق را تایید نمود. توالی سایت برشی ، Not1از 8 نوکلئوتید تشکیل شده است. اضافه شدن این توالی ،فریم خواندن ژن را تغییر داده، باعث جهش می‌گردد. بنابراین برای جلوگیری از این اتفاق، یک نوکلئوتید با استفاده از پرایمر به این محل اضافه شد.اضافه کردن هر یک از چهارنوکلئوتید، باعث ایجاد اسید آمینه‌ای متفاوت در این مکان می‌گردید. با توجه به‌این‌که سه اسید آمینه قبلی آلانین است، بهترین گزینه نوکلئوتید آدنین (A) بود. اضافه کردن این نوکلئوتید باعث ایجاد یک اسید آمینه آلانین دیگر وایجاد 4 آلانین در ساختار می‌شود. با توجه به‌این‌که برای شکل‌گیری هر مارپیچ 3/6 اسیدآمینه مورد نیاز است این حالت باعث ایجاد یک مارپیچ آلفا می‌گردد که به پایداری ساختار و عدم برهم کنش لیگاند اتصالی، به پروتئین اصلی کمک می‌کند(28،29).

ژن LAMP2b که اکنون دارای جایگاه‌های برشی مناسب (تصویر شماره 5) برای کلون کردن در وکتور ویروسی pLEX-MCS LentiORF™ می‌باشد، 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 می‌تواند داخل آن قرار بگیرد(تصویر شماره 6).



تصویر شماره 6: مراحل تولید وکتورویروسی pLEX-LAMP2b-DARPin

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

بعد از کلونیگ ژنLAMP2b در وکتور pLEX ،وکتور pLEX-LAMPایجاد گردید. با کمک این وکتور،ژن هر لیگاندی را می‌توان بین توالی سیگنال وپپتید بالغ قرار داد ولیگاند مورد نظر را در سطح اگزوزوم بیان نمود. در این مطالعه لیگاند متصل شونده به HER2 که توسط polekhtumو همکارانش (12) طراحی گردید انتخاب شد. بر این اساس ژن لیگاند مورد نظر برای بیان در سلول‌های یوکاریوتی بهینه‌سازی و سنتز شد و در وکتور pLEX-LAMPشد و وکتور pLEX-LAMP DARPinایجاد گردید.

در این مطالعه دو وکتور لنتی ویروسی جدید طراحی گردید. وکتور plex-lamp وکتوری است که می‌توان ژن هر لیگاند یا آنتی‌ژنی را برای بیان در سطح اگزوزوم وهدفمندسازی آن علیه سلول خاص ،بیان نمود.وکتور plex-lam-darpinG3جهت تولید اگزوزوم‌های هدفمند علیه سلول‌های سرطانی با بیان بالای HER2 تولید گردید.

در ادامه این مطالعه وکتورهای تهیه شده در ویروس لنتی بسته‌بندی شده وبرای انتقال ژن به سلول‌های دندریتیک ومزانشیمال مشتق از مغز استخوان وبافت چربی استفاده خواهد شد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-15]

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, etal. 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,etal. 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, etal. 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, etal. 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-15]

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, etal. 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, etal. 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, etal. Development of a generic adenovirus delivery system based on structure-guided design of bispecific trimeric DARPin adapters. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(10):E869-E877.

27. Zadravec P, Štrukelj B, Berlec A. Improvement of LysM-mediated surface display of designed ankyrin repeat proteins (DARPins) 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-15]