پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، صفحات ۱۴ تا ۲۲

مقاله اصلی
(Original Article)

طراحی و ساخت واکسن فاژی مهارکننده جهت سرطان پروستات

غلامرضا رفیعی ده بیدی[۱]، معصومه رجبی بذل[*۱]، سید لطیف موسوی[۲]،بهرام یغمایی[۱]

[۱]گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲]گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد

چکیده

سابقه و هدف: *از درمان‌های رایج جهت سرطان پروستات می‌توان برداشت پروستات و رادیوتراپی را نام برد، اما زمانی که بیماری توسعه یابد، روش‌های درمانی موجود کارآیی لازم را نخواهند داشت. با توجه به شیوع بالای سرطان پروستات، عوارض شناخته شده آن و اهمیت مهار و کنترل بیماری، مطالعه پیش رو جهت بررسی امکان طراحی و ساخت واکسن فاژی مهار کننده انجام گردید.*

روش بررسی: *تحقیق جهت ساخت و بررسی اثر واکسن فاژی در مرحله اول به روش اکتشافی (بیوانفورماتیک) و در مرحله بعد به روش تجربی و آزمایشگاهی انجام شد. روش نمایش فاژی جهت بیان آنتی ژن اختصاصی غشایی پروستات(PSMA) بر روی پروتئین پوششی اصلی VIII باکتریوفاژ M13 مورد استفاده قرار گرفت. ژن سازنده PSMA نوترکیب، در فاژمید pAK8-GVO77 که حاوی توالی پروتئین VIII می‌باشد کلون گردید. فاژمید نوترکیب درون باکتری TG1(سویه ای از E.coli)ترانسفورم شد و باکتری ترانسفورم شده با استفاده از فاژ کمکی M13k07 آلوده گردید. نوترکیبی فاژ با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال و روش الایزا بررسی شد. فاژهای نوترکیب جهت بررسی تحریک سیستم ایمنی به صورت زیر جلدی و داخل عضلانی به خرگوش سفید نیوزیلندی تزریق گردید. فعال شدن سیستم ایمنی بر علیه PSMA با روش الایزا بررسی شد.*

یافته‌ها: *تحقیق نشان داد که طراحی و ساخت واکسن فاژی بر علیه سرطان پروستات امکان‌پذیر است. هم‌چنین واکسن نام‌برده قادر به تحریک پاسخ ایمنی در حیوان آزمایشگاهی بود.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد که واکسن‌های فاژی قادر به تحریک ایمنی هومورال و احتمالا به دنبال آن ایمنی سلولی می‌باشند. بررسی اثر مهاری این واکسن نیازمند انجام مطالعات تجربی می‌باشد.*

واژگان کلیدی: *شدت درگیری عروق کرونر.*

مقدمه

میزان موارد سرطان پروستات در جهان بسیار گسترده می‌باشد. در ایالات متحده این بیماری دومین سرطان کشنده پس از سرطان ریه است (۱). مطالعه‌ای مربوط به نخستین گزارش شیوع سرطان در تهران نشان می‌دهد که سرطان پروستات دومین سرطان شایع در میان مردان پس از سرطان معده می‌باشد (۲). در حال حاضر جهت سرطان پروستات راهکارهای درمانی متفاوتی وجود دارد که از رایج‌ترین این درمان‌ها، جراحی و برداشت پروستات، رادیوتراپی، شیمی درمانی و هورمون درمانی (androgen suppression) را می‌توان نام برد (۳). جراحی جهت برداشت بافت سرطانی صورت می‌گیرد، اما در شرایط سرطان بدخیم، تعدادی از سلول‌های سرطانی باقی مانده که باعث افزایش خطر عود بیماری خواهند شد و در نهایت با رسیدن بیماری به مراحل پیشرفته، گزینه های درمانی نیز محدودتر خواهند شد (۴).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،دانشکده پزشکی،گروه بیوشیمی بالینی،دکترمعصومه رجبی بذل(**e-mail:** rajabi_m@sbmu.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۳/۱۹

بنابراین یافتن استراتژی‌های درمانی جدید جهت مقابله با سرطان پروستات، در شرایط پیشرفته یا عود بیماری ضروری به نظر می‌رسد.

مطالعات انجام شده روی حیوانات آزمایشگاهی و همچنین آزمایش‌های بالینی که در دهه‌های اخیر انجام شده چنین پیشنهاد می‌دهد که رویکردهای ایمونولوژیک می‌تواند جهت درمان سرطان پروستات موثر باشد(۵). در این راهکارها آنتی ژن های بافتی/ توموری توسط سلول‌های T سیتوتوکسیک و یا آنتی بادی‌ها مورد هدف قرار می‌گیرند. این آنتی‌ژن‌ها همچنین می‌توانند جهت طراحی واکسن نیز مورد استفاده قرار گیرند (۶).

ایمونوتراپی سرطان استفاده از سیستم ایمنی جهت از بین بردن سرطان می‌باشد که خود به دو دسته ایمونو تراپی فعال و غیرفعال تقسیم می‌شود (۷). در ایمونوتراپی فعال سیستم ایمنی بیمار جهت مقابله با سلول‌های سرطانی فعال می‌گردد. انواع استراتژی های واکسیناسیون با هدف تحریک پاسخ ایمنی ضد توموری در این دسته قرار می‌گیرند (۵).

واکسن سرطان (Cancer Vaccine) به واکسنی گفته میشود که یا از عفونت توسط ویروس‌های مولد سرطان جلوگیری می‌کند، یا سرطان موجود را درمان می نماید و یا از وقوع و پیشرفت سرطان در افراد در معرض خطر جلوگیری می‌کند (۸). این واکسن‌ها می‌توانند سبب توقف یا تأخیر رشد سلول‌های سرطانی و بنابراین کاهش حجم تومور گردند، همچنین از عود یا بازگشت مجدد تومورجلوگیری نموده و یا سلول‌های سرطانی که روش های دیگر قادر به از بین بردن آنها نبوده‌اند را حذف نمایند. واکسن‌های درمان کننده سرطان را می‌توان با استفاده از آنتی‌ژن‌های تومور تهیه کرد. آنتی‌ژن‌های تومور جهت شناسایی و تشخیص سلول های تومور مفید بوده و بالقوه امکان استفاده از آنها در درمان سرطان وجود دارد. به عنوان مثال در مورد سرطان پروستات می‌توان از آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA) و آنتی‌ژن اختصاصی غشایی پروستات (PSMA) نام برد که بیان آنها در سرطان پروستات به صورت قابل توجهی افزایش می‌یابد (۷).

یک رویکرد جهت واکسیناسیون سرطان، جداکردن پروتئین ها از سلول‌های سرطانی و ایمونیزه کردن بیمار در برابر آنها می‌باشد که موجب تحریک واکنش ایمنی، کشته شدن و از بین بردن سلول‌های سرطانی می‌گردد. یکی دیگر از راهکارها جهت ساخت واکسن‌های سرطان استفاده از سلول‌های ایمنی می‌باشد که جهت شناسایی یا ارائه یک آنتی ژن سرطانی تغییر یافته‌اند. واکسن‌های دندریتیک سل در این دسته قرار می‌گیرند. برخی دیگر از واکسن‌های درمان کننده سرطان با استفاده از DNA یا RNAحاوی رمز ژنتیکی آنتی‌ژن‌های سرطانی ساخته می‌شوند. این واکسن‌ها یا به صورت naked nucleic acid vaccine به بیمار تزریق می‌شوند و یا اینکه به ژنوم یک ویروس بی‌خطر اضافه می‌گردند. ویروس یا با ورود به سلول شروع به تولید آنتی‌ژن سرطانی می‌نماید و یا اینکه آنتی‌ژن را در سطح خود بیان می‌نمایند(۹).

آنتی‌ژن اختصاصی غشایی پروستات (PSMA) یک گلیکوپروتئین غشایی تیپ IIبا وزن مولکولی حدود ۱۰۰ kDa می‌باشد که در ابتدا در رده سلولی آدنوکارسینومای پروستاتیک غدد لنفاوی (LNCaP) شناسایی گردید.(10) بیان این مولکول در سرطان پروستات فراوان است، در حالی که در سایر بافت‌ها محدود می‌باشد. لذا PSMA به عنوان یک هدف ویژه جهت تشخیص و درمان سرطان پروستات مدنظر قرار گرفته است (۱۱).

این پروژه یکی از استراتژی‌های تولید واکسن را که در مورد سرطان پروستات کمتر مورد تحقیق قرار گرفته است بررسی می‌نماید. باکتریوفاژ رشته‌ای M13 با تکنولوژی نمایش فاژی جهت نمایش PSMA مورد استفاده قرار می‌گیرد. واکسن‌های فاژی قادر به تحریک پاسخ ایمنی سلولی و هومورال می‌باشند (۱۲)، لذا انتظار می‌رود که تحمل سیستم ایمنی بیمار پس از به کار بردن چنین واکسن‌هایی، نسبت به آنتی‌ژن‌های خودی شکسته شده و بنابراین سلول‌های سرطانی که دارای آنتی‌ژن مورد نظر می‌باشند را مورد حمله قرار دهند. هدف از این مطالعه، بررسی امکان طراحی و ساخت واکسن فاژی جهت سرطان پروستات و قابلیت تحریک سیستم ایمنی توسط آن می‌باشد.

مواد و روشها

این مطالعه بر پایه مطالعات بیوانفورماتیک و تحقیقات آزمایشگاهی می‌باشد. در مرحله اول، شاخص‌های توموری سرطان پروستات بررسی گردید و از میان آنها شاخص‌های آنتی‌ژنی پروتئین PSMA توسط مطالعات بیوانفورماتیک مشخص گردید. در مرحله دوم، ساخت سازه فاژمیدی حاوی آنتی‌ژن نوترکیب PSMA انجام شد و در نهایت ایمنی‌زایی فاژ نوترکیب در حیوان آزمایشگاهی بررسی گردید.

تهیه توالی ژنی وبیان PSMA نوترکیب (rPSMA)

توالی ژنی rPSMA جهت بیان در سیستم پروکاریوتی با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیک توسط Bce Pred

Prediction Server، اطلاعات سایر مقالات و بانک اطلاعاتی NCBI انتخاب گردید و سنتز شد. توالی انتخاب شده ۶۹۰ جفت باز طول داشته و اسیدهای آمینه۳۸۰-۱۵۰ آنتی ژن اصلی را کد می‌نماید. توالی مورد نظر در وکتور pET28a جهت بیان، به باکتریBL21 (سویه ای از *E.coli*) ترانسفرم گردید. باکتری ترانسفورم شده در محیط LB (Luria-Bertani) مایع حاوی ۷۰µg/ml کانامایسین کشت داده شد. پس از رسیدن کشت به جذب نوری ۰/۷ در طول موج ۶۰۰nm بیان پروتئین با افزودن IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) با غلظت نهایی ۱mM القا گردید. پس از تایید بیان rPSMA توسط SDS-PAGE، پروتئین نوترکیب با روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از ستون Ni-agarose (Qiagene) تخلیص گردید.

طراحی پرایمر و واکنش PCR

توالی پرایمرهای مورد نیاز، با توجه به توالی ژنی rPSMA و همچنین نقشه فاژمید pAK8-GVO77 طراحی گردید.

Forward Primer:5'-TGCggcccagccggccTACGAAAACGTTTCTGACAT-3'
Reverse Primer:5'AAAgcggccgcTTAAGAGTCACGGTGAC-3'

توالی هدف آنزیم‌های محدود الاثر Sfi1 و Not1 به ترتیب در سمت '5 پرایمرهای Forward و Reverse قرار داده شد. واکنش PCR با دناتوراسیون اولیه در دمای۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن۳۲ سیکل شامل دناتوراسیون در دمای۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه انجام گردید. به منظور انجام T/A کلونینگ، گسترش نهایی به مدت ۳۰ دقیقه در۷۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت. این مرحله جهت اطمینان از قرار گرفتن نوکلئوتید A اضافه در انتهاهای '3 محصول PCR می‌باشد. لازم به ذکر است که جهت ساخت وکتور فاژمیدی نوترکیب حاوی rPSMA، ابتدا کلونینگ در وکتور T/A صورت گرفته و پس از آن وکتور فاژمیدی ساخته شد. جهت تایید PCR الکتروفورز روی ژل آگاروز یک درصد انجام گرفت.

واکنش T/A کلونینگ

T/A کلونینگ با استفاده از وکتور تجاری pTZ57R/T(Fermentas) انجام شد. این وکتور دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین بوده و همچنین امکان جداسازی محصولات کلونینگ رابه صورت Blue-white screening فراهم می نماید. الکتروفورز بر روی محصول PCR (قطعه مورد نظر)انجام شد و تخلیص آن توسط کیت استخراج از ژل (Bioneer) صورت گرفت. سپس غلظت قطعه مورد نظر توسط فتومتر در طول موج ۲۶۰nm تعیین شده و واکنش لیگاسیون با رعایت نسبت مولی یک به سه (وکتور به قطعه) در دمای۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب و با استفاده از آنزیمT4DNA Ligase(Fermentas) انجام گردید. پس از انجام لیگاسیون، محصول کلونینگ با روش شیمیایی به سلول های مستعد *E.coli*، سویه TG1 ترانسفرم شد. جهت تایید ترانسفورماسیون و غربالگری کلونینگ، باکتری های ترانسفورم شده بر روی محیط LB agar حاوی ۱۰۰µg/mlآمپی سیلین، IPTG باغلظت ۱ mM و XGal با غلظت ۲۰ µg/ml کشت داده شد. پس از کشت شبانه، بر روی تعدادی از کلونی های سفید رنگ جهت تایید ورود ژن به وکتور، واکنش Colony PCR انجام شد. واکنش Colony PCRبا دناتوراسیون اولیه در دمای۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۲ سیکل شامل دناتوراسیون۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش پایانی به مدت ۵ دقیقه در۷۲ درجه سانتی گراد انجام گردید.

استخراج پلاسمید، هضم آنزیمی و کلونینگ

یکی از کلونی‌های تایید شده در مرحله قبل به صورت شبانه کشت داده شد و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Bioneer)، پلاسمید حاوی ژنrPSMA تخلیص شد. فاژمید pAK8-GVO77 جهت بیان rPSMA بر روی پروتئین VIII فاژ M13 انتخاب گردید. این فاژمید حاوی قطعه خارجی به طول ۱۳۰۰ جفت باز بود که جهت کلونینگ ژن مورد نظر، باید خارج گردد. فاژمید نامبرده و پلاسمید pTZ57R/T حاوی ژن rPSMA به طور هم زمان تحت واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود الاثر Sfi1 و Not1 قرار گرفتند. سپس تمام محصول هضم آنزیمی الکتروفورز شده و وکتور فاژمیدیpAK8-GVO77 و قطعه ژن rPSMA از ژل استخراج شدند. واکنش لیگاسیون با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase (Fermentas) انجام شد و محصول کلونینگ به باکتری مستعد TG1 وارد گردید. فاژمید pAK8-GVO77 دارای ژن مقاومت به آمپی سیلین می باشد، بنابراین محصول ترانسفورماسیون در محیطLB agar حاوی آمپی سیلین به صورت شبانه کشت داده شد. جهت تایید وجود ژن rPSMA در کلونی‌های تولید شده، واکنش Colony PCR انجام شد. جهت تایید بیشتر،

استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی بر روی یکی از کلونی‌های با واکنش PCR مثبت صورت گرفت.

نمایش فاژی (Phage Display)

جهت انجام نمایش فاژی، باکتری TG1 دارای pAK8-GVO77-rPSMA، در ۳۰ ml محیط Super Broth محتوی۱۰۰μg/ml آمپی سیلین کشت داده شد (Super Broth: Yeast extract 2 % , Tryptone 3 % , MOPS 1 %). محیط به مدت ۲ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۰۰rpm انکوباتور شیکردار قرار گرفت. بعد از رسیدن به جذب نوری حدود ۰/۵ در طول موج ۶۰۰nm، باکتریوفاژ کمکی M13K07 به میزان 10^{12} عدد به محیط باکتری تلقیح گردید. محیط حاوی باکتری در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در حالت سکون و ۳۰ دقیقهدر دور ۲۰۰ rpm انکوباتور شیکردار قرار گرفت. باکتریوفاژ کمکیM13K07 باعث ایجاد مقاومت به کانامایسین در باکتری میزبان می‌گردد، بنابراین آنتی‌بیوتیک کانامایسین تا غلظت ۷۰ μg/ml به محیط افزوده شد و انکوباسیون همراه با شیک یک ساعت دیگر ادامه یافت. در مرحله بعد۷۰ ml محیط SB حاوی آمپی‌سیلین و کانامایسین به کشت افزوده شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت با شرایط بالا ادامه یافت. پس از خاتمه مدت زمان انکوباسیون محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm و دمای۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. محلول رویی پس از جداسازی از رسوب، جهت از بین رفتن باکتریهای باقیمانده به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس مجددا با شرایط قبل سانتریفیوژ گردید. مایع رویی جهت تغلیظ فاژ استفاده گردید. جهت تغلیظ فاژ، به میزان ۲۰ درصد حجمی محلول PEG/NaCl به محلول حاوی فاژ افزوده شد و یک شب در۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید (PEG/NaCl: 20% polyethylene glycol 6000 in 2.5 M NaCl solution). پس از پایان انکوباسیون محیط با دور G ۱۵۰۰۰به مدت۲۰ دقیقه در دمای۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. پس از حذف محلول رویی، رسوب فاژی در ۱ ml بافر TBS(Tris Buffered Saline) حاوی یک درصد BSA(Bovin Serum Albomin) حل شد و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. مایع رویی از فیلتر μm ۰/۴۵ عبور داده شد و محلول به دست آمده جهت تعیین غلظت فاژها تیتر شد.

آزمون فاژ الایزا جهت تایید نمایش فاژی

جهت تایید بیان rPSMA بر روی سطح فاژ، آزمون فاژ الایزا انجام گردید. الایزا به صورت دوتایی (duplicate) در پلیت ۹۶ خانه‌ای انجام شد. 10^{9} عدد فاژ نوترکیب به عنوان تست در حجم ۱۰۰μlبافر PBS (Phosphate Buffered Saline) به هرچاهک افزوده شد. پروتئین rPSMA که در مرحله اول، بیان و تخلیص گردید به عنوان کنترل مثبت و BSA به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفتند که به صورت دوتایی و به میزان۱۰μg در حجم نهایی ۱۰۰μlبافر PBS به چاهک‌ها اضافه شدند. پلیت به مدت یک شب و در دمای۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از انکوباسیون چاهک‌ها سه مرتبه با PBST (PBS حاوی ۰/۰۵٪ توئین۲۰) شسته شدند. جهت بلاک کردن به هرکدام از چاهک‌ها ۱۵۰μlمحلول PBS حاوی ۴٪ BSA اضافه شد و پلیت به مدت یک ساعت در۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. شستشو شبیه مرحله قبل انجام گردید وسپس به تمام چاهک ها ۱۰۰ μl آنتی بادی مونوکلونال ضد PSMA افزوده شد و به مدت یک ساعت در۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و پس از شستشو به هر کدام۱۰۰ μl محلول تترا متیل بنزیدین (TMB) به عنوان سوبسترا اضافه گردید. توقف واکنش توسط ۵۰μl اسید کلریدریک ۱N انجام شد و جذب نوری در طول موج ۴۵۰nm توسط قرائت گر الایزا تعیین گردید.

واکسیناسیون حیوان آزمایشگاهی

جهت واکسیناسیون و بررسی اثر ایمنی‌زایی واکسن از خرگوش سفید نیوزیلندی استفاده گردید. جهت واکسیناسیون خرگوش، به میزان 2×10^{13} عددفاژ در ۱ ml محلول PBS به صورت زیرجلدی و داخل عضلانی تزریق گردید. تزریق‌های یادآور نیز در سه نوبت و با فاصله ۱۰ روز انجام شد. پس از هر مرحله تزریق از حیوان خونگیری به عمل آمده و سرم‌ها جداسازی شد. به منظور تهیه سرم کنترل، قبل از تزریق اول نیز خونگیری به عمل آمد. روند ایمنی‌زایی به روش الایزای غیرمستقیم بررسی گردید.

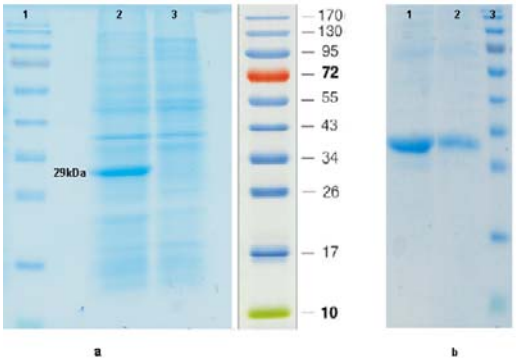
آزمون الایزا و بررسی روند ایمنی‌زایی

جهت بررسی روند ایمنی‌زایی چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای با۱۰μg پروتئین rPSMA پوشیده شد و پس از بلاک کردن، رقت‌های متفاوت از سرم در PBS، به عنوان آنتی‌بادی علیه rPSMA افزوده گردید. در نهایت پس از افزودن Anti-Rabbitantibodyمتصل به HRPو سپسTMB،واکنش متوقف شده و جذب نوری در۴۵۰nm قرائت شد.

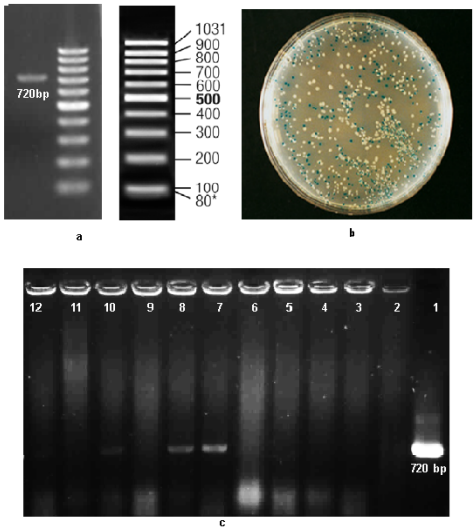
یافته‌ها

بیان و تخلیص PSMA نوترکیب (rPSMA)

SDS-PAGE بیان پروتئین rPSMA با وزن مولکولی حدود ۲۹kDa را تایید کرد. همچنین با انجام الکتروفورز بر روی نمونه‌های پس از کروماتوگرافی نیز روند خالص سازی تایید شد (شکل ۱).



شکل ۱- a) SDS-PAGE محصول سونیکاسیون رسوب باکتری BL21 حاوی پلاسمید نوترکیب pET28a-rPSMA. چاهک ۱-مارکر پروتئین، چاهک ۲- محصول سونیکاسیون رسوب باکتری محتوی پلاسمید نوترکیب، ۴ ساعت پس از القا با IPTG، چاهک ۳- محصول سونیکاسیون رسوب باکتری محتوی پلاسمید نوترکیب قبل از القا b) انجام SDS-PAGE بر روی محصول تخلیص پروتئین PSMA. چاهک ۱- elution اول، چاهک ۲- elution دوم، چاهک ۳- مارکر پروتئین



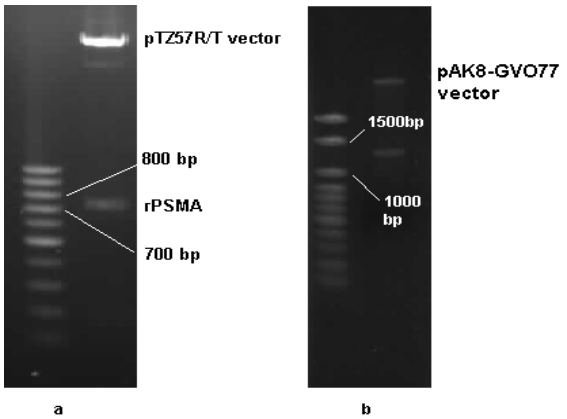
شکل ۲-a) الکتروفورز محصول PCR جهت تکثیر توالی ژنی rPSMA بر روی ژل آگاروز ۱٪ به همراه مارکر DNA. b) غربالگری کلونی‌های سفید-آبی جهت جداسازی محصولات کلونینگ بر روی محیط LB agar حاوی آمپی‌سیلین، IPTG و XGalc) الکتروفورز محصول ColonyPCR بر روی ژل آگاروز ۱٪: چاهک ۱- کنترل مثبت، چاهک ۲- کنترل منفی، چاهک‌های ۷ و ۸ و ۱۰ و ۱۲- واکنش مثبت ColonyPCR

واکنش PCR و T/A cloning

پس از انجام PCR جهت ژن سازنده rPSMA و الکتروفورز روی ژل آگاروز ساخت قطعه ۷۲۰ جفت بازی مشاهده گردید. پس از انجام T/A cloning و ترانسفورماسیون محصول لیگاسیون در باکتری TG1 ، باکتریهای ترانسفورم شده بر روی محیط LBagar حاوی آمپی سیلین، IPTG و XGal تولید کلونی های سفید و آبی نمودند که واکنش ColonyPCR در مورد تعدادی از کلونی‌های سفید انتخاب شده مثبت بود (شکل ۲).

هضم آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T حاوی PSMA و فاژمید pAK8-GVO77 حاوی قطعه خارجی

پس از استخراج پلاسمید از کلونی های مثبت شده در مرحله قبل و انجام هضم آنزیمی دوگانه توسط آنزیم های Sfi1 و Not1، قطعه حدودا ۷۰۰ جفت بازی از وکتور خارج گردید. انجام هضم آنزیمی توسط آنزیم های نامبرده بر روی فاژمید pAK8-GVO77 باعث خروج قطعه قرار داده شده به طول ۱۳۰۰ جفت باز (قطعه کنترل) از وکتور گردید (شکل ۳).

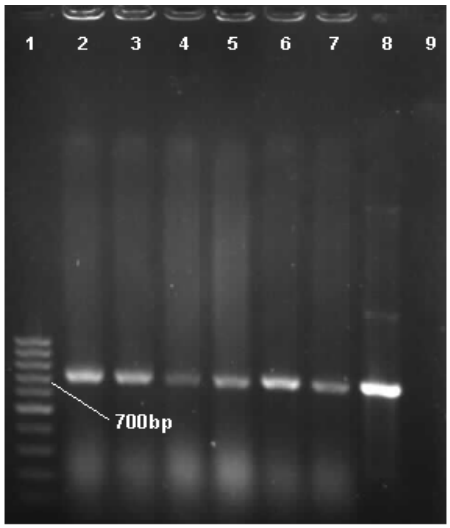


شکل ۳- هضم آنزیمی با آنزیم های محدودالاثر Sfi1 و Not1. a) هضم آنزیمی وکتور pTZ57R/T حاوی توالی rPSMA و خروج قطعه با وزن حدود ۷۰۰ bp b) هضم آنزیمی وکتور فازمیدی pAK8-GVO77 و خروج قطعه داخلی با وزن حدود ۱۳۰۰ bp از وکتور

کلونینگ و ساخت وکتور نوترکیب فاژمیدی

ترانسفورم کردن محصول لیگاسیون ژن rPSMA در وکتور pAK8-GVO77 منجر به رشد باکتری TG1 در محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین گردید و واکنش ColonyPCR در مورد تمام کلونی های انتخاب شده مثبت بود (شکل ۴). پس از

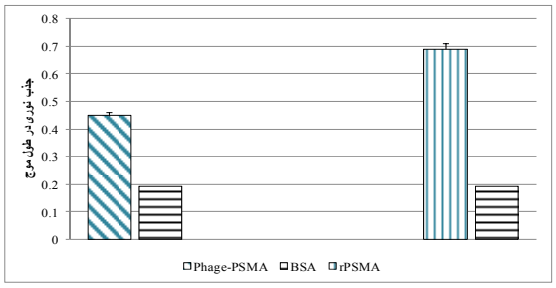
استخراج پلاسمید از باکتری نام برده و انجام هضم آنزیمی، ورود قطعه مورد نظر به وکتور تایید شد.



شکل ۴- واکنش colony PCR. چاهک ۱- مارکر DNA، چاهکهای ۲ تا ۷- واکنش مثبتcolony PCR، چاهک ۸- کنترل مثبت، چاهک ۹- کنترل منفی

نتیجه فاژ الایزا و تایید نمایش فاژی

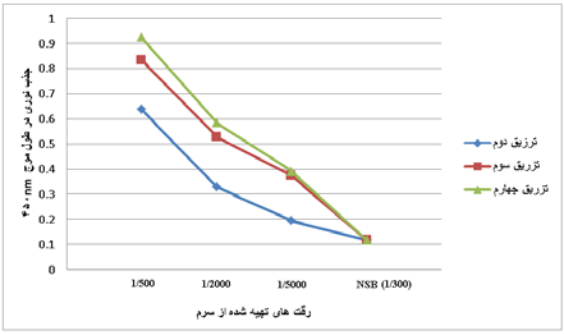
آزمون الایزای فاژی قرار گرفتن rPSMA بر روی سطح فاژ را تایید نمود (نمودار ۱).



نمودار ۱- تایید بیان rPSMA بر روی باکتریوفاژ M13 توسط الایزا. پروتئین PSMA نوترکیب به عنوان کنترل مثبت و BSA به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفته است. تست ها به صورت دوتایی (duplicate) انجام شده و میانگین جذب نوری جهت رسم نمودار استفاده گردیده است.

بررسی روند ایمنی زایی

آزمون الایزای انجام شده جهت بررسی روند ایمنی زایی توسط واکسن فاژی، تحریک پاسخ ایمنی هومورال حیوان آزمایشگاهی بر علیه آنتی ژن rPSMA را تایید نمود (نمودار ۲).



نمودار ۲- تایید تحریک سیستم ایمنی هومورال بر علیه آنتی ژن rPSMA. رقت های متفاوت تهیه شده از سرم خرگوش پس از هر تزریق، افزایش میزان آنتی بادی های تولید شده بر علیه rPSMA را نشان می دهد. سرم خرگوش قبل از هر گونه تزریق واکسن با رقت 1/300 به عنوان NSB (None Specific Binding) مورد استفاده قرار گرفته است. تمامی تست ها به صورت دوتایی انجام شده و نمودار بر اساس میانگین داده ها رسم گردیده است.

بحث

تحقیق حاصل نشان دادکه یکی از آنتی‌ژن‌های شاخص در سرطان پروستات قادر به تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی-بادی می‌باشد. همانطور که در مقدمه ذکر شده است تاکنون واکسن فاژی جهت آنتی‌ژن‌های سرطان پروستات ساخته نشده است تا تشابهات و مغایرت ها قابل بررسی باشند.

راهکارهای مقابله با سرطان پروستات شامل جراحی و برداشت پروستات، رادیوتراپی، شیمی‌درمانی و هورمون‌درمانی میباشد. جهت موثر واقع شدن درمان معمولا دو یا چند روش به صورت توام انجام می‌شوند. برخی از این روش‌ها دارای آثار جانبی بوده و برخی در شرایط بیماری پیشرفته پاسخگو نمی‌باشند (۳). واکسن‌های سرطان به دلیل نداشتن آثار جانبی و هدفمند بودن درمان مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این میان واکسن‌های فاژی به دلیل سهولت تولید، هزینه پایین و تحریک توام سیستم ایمنی سلولی و هومورال از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند.

در آوریل ۲۰۱۰، اداره غذا و داروی ایالات متحده (FDA) نخستین واکسن درمان کننده سرطان را تأیید کرد. این واکسن Sipuleucel-T (با نام تجاریProvenge) نام دارد که جهت استفاده در تعدادی از مردان با سرطان پروستات متاستاتیک تأیید شده است. این واکسن جهت تحریک پاسخ ایمنی برعلیه اسیدفسفاتاز پروستاتیک (PAP) که یک آنتی‌ژن سطحی سلول‌های پروستات می‌باشد، طراحی گردیده است. در آزمایش‌های بالینی، این واکسن طول عمر مردان با تیپ

ویژه‌ای از سرطان پروستات متاستاتیک را تا حدود ۴ ماه افزایش داد(13). محققان در فاز III آزمایش های بالینی بر روی لنفوم فولیکولار (یک نوع لنفوم غیرهوجکین) گزارش کردند که واکسن Biovax ID باعث افزایش طول عمر از ۳۰/۶ ماه (کنترل) به ۴۴/۲ ماه می‌شود. Biovax IDیک واکسن درمان کننده سرطان است که از کنژوگه کردن ایدیوتایپ موجود بر روی سلول‌هایB بدخیم با پروتئین ناقل Keyhole limpet Hemocyanin(KLH) تهیه شده است که همراه با GM-CSF مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۴, ۱۵). یک رویکرد جهت واکسیناسیون درمانی سرطان، فعال کردن پاسخ ایمنی در محل سرطان می‌باشد. این رویکرد به طور موفقیت آمیزی در واکسن Onco VEX GM-CSF به انجام رسید. این واکسن یک سویه از ویروس هرپس سیمپلکس می‌باشد که جهت تکثیر انتخابی در بافت تومور مهندسی شده است و همچنین پروتئین GM-CSF که تحریک کننده سیستم ایمنی می‌باشد را بیان می‌کند. این امر موجب تسریع در پاسخ ایمنی ضدتومور به آنتی‌ژن های تومورال می‌گردد که به دنبال تکثیر لیتیک ویروس در بافت آزاد می‌گردند. این واکسن اخیراً جهت درمان ملانوما در فاز III آزمایش های بالینی قرار گرفته است (۱۶).

باکتریوفاژیا فاژها ویروس‌های مربوط به باکتری‌ها هستند که از یک ژنوم DNA یا RNA که توسط پوششی از پروتئین پوشیده شده است تشکیل شده‌اند. امروزه کاربرد و استفاده از فاژها در تکنیک‌هایی از قبیل فاژتراپی، نمایش فاژی، رهاسازی واکسن DNA، ژن درمانی و ... به وضوح قابل مشاهده می‌باشد (۱۷). ذرات کامل باکتریوفاژ خصوصیات فراوانی دارند که باعث می‌شود به عنوان یک حامل ایده آل جهت طراحی واکسن مورد استفاده قرار گیرند. واکسن‌های فاژی ارزان بوده و این قابلیت را دارند که به آسانی در مقادیر زیاد تولید شوند. فاژها بسیار مقاوم بوده و حتی در pH حدود ۳ یا ۱۱ بیش از ۲۴ ساعت پایدار می‌مانند؛ بنابراین تجویز دهانی آنها نیز امکان پذیر خواهد بود (۱۸). فاژها قادر به تکثیر در میزبان-هاییوکاریوتی نمی‌باشند و همین خصوصیت سبب شده که گزینه‌ای مناسب وبی‌خطر جهت طراحی واکسن‌های سرطان باشند. خود ذره فاژ این قابلیت را دارد که به عنوان یک ادجوانت عمل نماید. زیرا فاژها به دلیل ماهیت ویروس بودن خود، توسط سیستم ایمنی به عنوان آنتی ژن خارجی تشخیص داده می‌شوند و پاسخ ایمنی برعلیه آنها تحریک می‌شود. بنابراین واکسن های فاژی نیازی به ادجوانت ندارند (۱۹). واکسیناسیون با ذره کامل فاژی همچنین باعث القای یک سیگنال ایمونولوژیک قوی در برابر پروتئین های پوششی فاژ می‌گردد، بنابراین یک سیگنال قابل خوانش جهت تایید اثر واکسیناسیون ارائه می‌دهد. از طرف دیگر تیتر بالای آنتی بادی بر علیه فاژ با پاسخ ایمنی بر علیه آنتی ژن واکسن (بیان شده بر روی فاژ) تداخلی نداشته و اتفاقا مورد هدف واقع شدن فاژ توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن را نیز افزایش می‌دهد (۲۰).

واکسیناسیون حیوانات آزمایشگاهی نشان داده است که پاسخ ایمنی بعد از استفاده از فاژ به عنوان واکسن نسبت به زمانی که از naked DNA به عنوان واکسن استفاده می‌شود، به طورچشمگیری شدیدتر و طولانی‌تر می‌باشد. فاژها قابلیت برداشته شدن، پردازش شدن به طور موثر و نمایش داده شدن بر روی MHC کلاس I و II را حتی توسط سلول‌های غیرحرفه‌ای عرضه کننده آنتی‌ژن (APC) هم دارند. این یک خصوصیت مهم جهت ایجاد یک پاسخ ایمنی قوی و سریع در برابر آنتی‌ژن آزاد شده توسط فاژ می‌باشد (۷). همین خصوصیت اساس و مکانیسم استفاده از فاژ جهت طراحی و ساخت واکسن‌های مهار کننده می‌باشد.

مسئله بی خطر بودن استفاده از واکسن‌های فاژی موضوعی مهم و حائز اهمیت می‌باشد. بررسی‌های انجام شده بر روی افراد داوطلب نشان می‌دهد که فاژهایی که به صورت دهانی تجویز شده‌اند بی خطر بوده و هیچ پیامدناخوشایندی در رابطه با به کار بردن فاژها گزارش نشده است (۲۱). همچنین در مطالعه‌ای دیگر که بر روی خوک‌ها انجام شد هیچ واکنش موضعی یا سیستمیک نامساعد به دنبال ایمونیزاسیون با واکسن فاژی مشاهده نشد (۲۲).

اولین استفاده از ذره کامل فاژ جهت تحریک پاسخ ایمنی برعلیه پپتید خارجی بیان شده روی آن در سال ۱۹۸۸ صورت گرفت. در صورتی که ذرات فاژی با فیوزکردن پپتیدهای ایمونوژن به پروتئین های سطحی آنها، به عنوان واکسن مورداستفاده قرارگیرند، واکسن حاصل را phage-display vaccine می نامند. در phage-display vaccine آنتی‌ژن‌های مدنظر جهت تحریک پاسخ ایمنی یا با انتقال ژن و بیان آن بر روی سطح فاژ و یا با اتصال مصنوعی آنها به سطح فاژ، بر روی ذره ویروسی قرار می گیرند. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که در مدل‌های حیوانی، ایمونیزاسیون حیوان با ذره کامل فاژ که آنتی‌ژن هدف را روی سطح خود بیان کرده است، قادر به القای پاسخ‌های آنتی‌بادی اختصاصی می‌باشد. هرچند نتایج به دست آمده در مدل های حیوانی ، الزاما بیانگر شرایط در

گونه‌های هدف نمی‌باشد، اما می‌تواند اعتبار و صحت استراتژی‌ها را اثبات نماید (۱۲).

بررسی‌های صورت گرفته بر روی بیان PSMA آشکار ساخته است که بیان این مولکول به شدت به سلول‌های ترشحی اپی-تلیوم پروستات محدود می‌گردد (۲۳). این مولکول بیان خارج پروستاتی محدودی دارد که در مغز، روده کوچک، کبد، توبول‌های پروگزیمال کلیه وغدد بزاقی مشاهده می‌گردد. بیان PSMA در سرطان پروستات ۱۰ بار بیشتر از بافت نرمال پروستات می باشد و بیان آن در پروستات نرمال نیز به نوبه خود ۱۰ بار بیشتر از بیان در مغز و ۵۰ تا ۱۰۰ بار بیش از بیان کبدی یا کلیوی می باشد. این پروتئین در سایر بافت‌های بدن بیان قابل مشاهده‌ای ندارد (۱۱).

بیان محدود PSMA و افزایش چشمگیر آن در سرطان پیشرفته پروستات و نیز ماهیت غشایی بودن آن باعث شده که این مولکول به عنوان یک هدف بالقوه مفید و کارآمد جهت تشخیص، مدیریت و درمان سرطان پروستات مورد توجه قرار گیرد. آزمایشات بالینی اخیر شواهد قابل توجهی برای استفاده از PSMA به عنوان یک هدف، جهت درمان سرطان پروستات ارائه می‌دهند. مطالعات جهت تهیه واکسن با استفاده از PSMA در مراحل ابتدایی نشان داده است که پاسخ‌های ایمنی ضد PSMA بدون هیچ گونه سمیتی در بیماران مبتلا به سرطان پروستات قابل تولید شدن می‌باشد. تحقیقات صورت گرفته، پایه‌های اطمینان بخشی برای جستجوی درمان‌های بهینه بر اساس آنتی‌بادی و واکسن فراهم کرده است (۱۱).

این پروژه یکی از استراتژی‌های تولید واکسن، که در مورد سرطان پروستات کمتر مورد مطالعه قرار گرفته بود را مورد بررسی قرار داد. آنتی‌ژن PSMA نوترکیب بر روی باکتریوفاژ رشته‌ای M13 بیان گردید. از آنجا که واکسن های فاژی سیستم‌های ایمنی سلولی و هومورال را به صورت توام تحریک می‌نمایند و با توجه به امکانات و هزینه موجود، تنها تحریک پاسخ ایمنی هومورال پس از مطالعه بر روی حیوان آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاکی از تحریک شدید پاسخ ایمنی هومورال به دنبال تزریق واکسن بود. همچنین در طی مطالعه حیوانات هیچ واکنش ناخواسته‌ای مشاهده نشد که این امر محققین را در استفاده از واکسن‌های فاژی ترغیب می‌نماید. در مراحل بعد جهت بررسی اثر مهاری واکسن تولید شده بر روی سلول‌های سرطانی، سنجش پاسخ ایمنی سلولی و مطالعات تومور در حیوان آزمایشگاهی در اولویت قرار خواهند گرفت.

REFERENCES

1. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011. CA: A Cancer Journal for Clinicians; 2011.
2. Mohagheghi MA, Mosavi-Jarrahi A, Malekzadeh R, Parkin M. Cancer incidence in Tehran metropolis: the first report from the Tehran Population-based Cancer Registry, 1998–2001. Arch Iran Med 2009;12:15-23.
3. Prostate cancer. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Prostate_cancer.
4. Voeks DJ, Martiniello-Wilks R, Russell PJ, Editors. Derivation of MPR and TRAMP models of prostate cancer and prostate cancer metastasis for evaluation of therapeutic strategies. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations; Elsevier; 2002:
5. McNeel DG, Malkovsky M. Immune-based therapies for prostate cancer. Immunology letters 2005;96:3-9.
6. Hurwitz AA, Yanover P, Markowitz M, Allison JP, Kwon ED. Prostate cancer: advances in immunotherapy. BioDrugs 2003;17:131-38.
7. Jacobson T. Development and evaluation of a phage-display based vaccine against prostate cancer. Stockholm, Sweden: Royal Institute of Technology; 2007.
8. Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, Forni G. Vaccines for tumour prevention. Nature Rev Cancer 2006;6:204-16.
9. Cancer Vaccines. 2011; Available from: http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/cancer-vaccines#r7.
10. Rajasekaran AK, Anilkumar G, Christiansen JJ. Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein? Am J Physiol 2005;288:C975-C81.
11. Olson WC, Heston WDW, Rajasekaran AK. Clinical trials of cancer therapies targeting prostate-specific membrane antigen. Rev Recent Clin Trials2007;2:182-90.
12. Gao J, Wang Y, Liu Z, Wang Z. Phage display and its application in vaccine design. Ann Microbiol 2010;60:13-19.
13. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. New Engl J Med 2010;363:411-22.
14. Lee ST, Jiang YF, Park KU, Woo AF, Neelapu SS. BiovaxID™: a personalized therapeutic cancer vaccine for non-Hodgkin's lymphoma. Expert Opinion on Biological Therapy 2007;113-22

15. Schuster S, Neelapu S, Gause B, Muggia F, Gockerman J, Sotomayor E, et al. Idiotype vaccine therapy (BiovaxID) in follicular lymphoma in first complete remission: phase III clinical trial results. J Clin Oncol 2009;27:793s.

16. Kaufman HL, Kim DW, DeRaffele G, Mitcham J, Coffin RS, Kim-Schulze S. Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. Ann Surg Oncol 2010;17:718-30.

17. Clark JR, March JB. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. Trends in Biotechnology 2006;24:212-18.

18. Jepson CD, March JB. Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. Vaccine 2004;22:2413-19.

19. Willis AE, Perham RN, Wraith D. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. Gene1993;128:79-83.

20. March JB, Clark JR, Jepson CD. Genetic immunisation against hepatitis B using whole bacteriophage λ particles. Vaccine 2004;22:1666-71.

21. Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:2874-78.

22. Gamage L, Ellis J, Hayes S. Immunogenicity of bacteriophage lambda particles displaying porcine Circovirus 2 (PCV2) capsid protein epitopes. Vaccine 2009;6595-604.

23. Chang SS, O'Keefe DS, Bacich DJ, Reuter VE, Heston WDW, Gaudin PB. Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. Clin Cancer Res 1999;5:2674-81.