

دارای رتبه علمی-پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

طراحی و ساخت سازه ژنی کدکننده فاکتور رشد فیبروبلاستی-۲ متصل به بخش ایمونودامیننت توکسین سودوموناس آئروژینوزا

چکیده

زمینه و هدف: توقف رنگ زایی تومور، رشد سلول‌های توموری را به طور قابل ملاحظه ای کاهش می‌دهد. در این میان پروتئین فاکتور رشد فیبروبلاست-۲ (bFGF) به عنوان یک فاکتور رنگ زایی مهم هدف مناسبی در مهار رنگ زایی تومور و درمان سرطان است. هدف این مطالعه طراحی، ارزیابی و ساخت سازه ژنی نو ترکیب در جهت بیان کارآمد فیوژن پروتئینی است که دارای بخش های ایمونودامیننت توکسین سودوموناس همراه با bFGF است.

روش بررسی: چگونگی حضور لینکرهای مختلف، بهینه‌سازی کدون های کدکننده اسیدهای آمینه و افزودن توالی سیگنال جهت افزایش ایمونوژنیسیته فیوژن پروتئین از جمله فاکتورهای مهم بوده که در این طراحی لحاظ گردیده است. پس از حصول اطمینان از کارآمد بودن قطعه طراحی شده، قطعه نوکلئوتیدی کدکننده برای سنتز در وکتور کلونینگ pUC57 سفارش داده شد. سپس قطعه ژنی در سایت کلونینگ وکتور بیانی pET28-a قرار گرفت. با استفاده از آزمون های تکثیر ژنی و هضم آنزیمی وجود قطعه طراحی شده در وکتور بیانی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: بهینه سازی کدون های کدکننده سازه ژنی منجر به افزایش سازگاری کدون های خوانش از ۰/۶۹ به ۰/۸۳ شد. همچنین میزان محتوی GC (GC content) پس از بهینه سازی از ۶۱ به ۵۴/۷۷ کاهش یافت. حضور بانده ۱۲۱۴ جفت بازی به روش تکثیر ژنی و بانده ۱۰۲۹ جفت بازی به روش هضم آنزیمی در الگوی الکتروفورز تأییدکننده فرایند صحیح کلونینگ می‌باشد.

نتیجه گیری: براساس مطالعات صورت پذیرفته، این نخستین مطالعه در خصوص طراحی، ارزیابی و ساخت قطعه کدکننده مربوط به فیوژن پروتئینی است که واجد قطعات مربوط به دومین های ایمونودامیننت فاکتور رشد فیبروبلاست-۲ و بخش ایمونودامیننت توکسین سودوموناس است.

واژه های کلیدی: رنگ زایی تومور، بخش ایمونودامیننت توکسین سودوموناس

ائروژینوزا، فاکتور رشد فیبروبلاست ۲، نرم افزار DNA2

حمید حقیقت فرد

دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

یعقوب یزدانی

استادیار ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

نویسنده مسئول: یعقوب یزدانی

پست الکترونیک: yaghobyazdani59@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۲۵۷۵۷۲۹۲

آدرس: مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

دریافت: ۹۳/۳/۱۷

ویرایش پایانی: ۹۳/۶/۲۱

پذیرش: ۹۳/۶/۲۴

آدرس مقاله

حقیقت فرد ح، یزدانی ی "طراحی و ساخت سازه ژنی کدکننده فاکتور رشد فیبروبلاستی-۲ متصل به بخش ایمونودامیننت توکسین سودوموناس آئروژینوزا" مجله علوم آزمایشگاهی، فروردین و اردیبهشت ۹۴، دوره نهم (شماره ۱): ۴۵-۵۲

مقدمه

وایمنی زایی پایین، به تنهایی قادر به ایجاد یک پاسخ ایمنی قوی نمی‌باشد. بنابراین هدف قرار دادن این ملکول بوسیله سیستم ایمنی بسیار دشوار می‌باشد (۱۳). رویکردهای متعددی بمنظور ایمونوژن کردن این پپتید می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از ادجوان‌ها و بهره‌گیری از پپتید ایمونوژن قدرتمند به‌عنوان ناقل (هاپتن - کریر) از جمله این موارد است (۱۴). توکسین سودوموناس آئروژینوزا از جمله بهترین این پپتیدها می‌باشد (۱۵). این توکسین به ترتیب دارای دومین‌های Ia، II، Ib و III می‌باشد که دومین III قسمت سمی این توکسین می‌باشد (۱۶). در مطالعات مختلفی برای افزایش پاسخ ایمنی علیه قطعات آنتی ژنی از قطعات ایمونوژن توکسین سودوموناس استفاده شده است که نتایج حاصله نشان می‌دهد با اتصال این توکسین به آنتی ژن‌های پپتیدی پاسخ ایمنی قدرتمندی علیه آنها ایجاد شد (۱۵، ۱۷، ۱۸). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد دومین‌های II و Ib توانایی بسیار بالایی برای تحریک پاسخ ایمنی را دارا می‌باشند (۱۵، ۱۹، ۲۰). یکی از راه‌های تولید پروتئین در مقیاس انبوه، تولید پروتئین در میزبان بیانی باکتریایی می‌باشد (۲۱). یکی از بهترین باکتری‌های مهندسی شده باکتری *E. coli* BL21(DE3) است (۲۲). هدف ما در این مطالعه اتصال توالی کدکننده فاکتور رشد فیروبلاستی-۲ متصل به قطعه کدکننده بخش ایمونوژن توکسین سودوموناس آئروژینوزا است. به منظور ایجاد الگوی خوانش صحیح، بیان بهینه و در دسترس بودن دومین‌های ایمونودامینت فیوژن پروتئین، متغیر آزمایشگاهی متعددی مورد بررسی قرار گرفت. سازگار بودن کدون‌های خوانش CAI (Codon Adaptation Index)، محتوای GC و لینکر مناسب از جمله موارد مورد بررسی است.

روش بررسی

طراحی و ارزیابی توالی کدکننده فیوژن پروتئین:

در ابتدا توالی نوکلئوتیدی فاکتور رشد فیروبلاست-۲ (NCBI Reference Sequence: NM:002006) و توکسین سودوموناس آئروژینوزا (GenBank: K01397.1) از پایگاه اطلاعاتی NCBI و توالی آمینواسیدی فاکتور رشد

رگ زایی (آنژیوژنز) به تشکیل عروق خونی جدید از عروق موجود گفته می‌شود (۱). رگ زایی در طیف گسترده‌ای از فرایندهای پاتولوژیکی و فیزیولوژیکی از جمله رشد و نمو جنینی، التیام زخم، التهاب، بیماری‌های عروق کرونر، تومور و متاستاز و نزدیک به ۷۰ بیماری انسانی دیگر نقش دارد. رشد تومورها به تولید رگ‌های خونی جدید و تغذیه تومور بستگی دارد (۲). هنگامی که مقدار فاکتورهای رشد رگ زایی بیش از فاکتورهای مهارکننده رگ زایی باشد تعادل به هم خورده و عمل رگ زایی شروع می‌شود (۳). در این شرایط تکثیر سلول‌های اندوتلیال تومور ۲۰ تا ۲۰۰۰۰ برابر سریع‌تر از سلول‌های اندوتلیال طبیعی در افراد بالغ رخ می‌دهد (۴). عامل آغازکننده رگ زایی در تومور کمبود اکسیژن است که در نتیجه ی تکثیر بی‌رویه سلول‌های توموری ایجاد می‌گردد (۵). کمبود اکسیژن موجب القاء بیان ژن‌های متعدد می‌گردد که از جمله این ژن‌ها می‌توان به فاکتور رشد فیروبلاست-۲ (bFGF) (basic fibroblast growth factor) و فاکتور رشد اندوتلیوم عروقی (VEGF) (vascular endothelial growth factor) اشاره کرد که امروزه به‌عنوان مهمترین فاکتورهای فعال‌کننده رگ زایی مطرح می‌باشند (۶). تا کنون در جهت مقابله با رگ زایی تلاش‌های زیادی انجام گرفته است، از جمله می‌توان تولید آنتی‌بادی مونوکلونال ضد VEGF با نام اواستین (Bevacizumab) را نام برد (۷). امروزه مطالعات نشان می‌دهد، مصرف طولانی مدت این دارو اغلب مقاومت دارویی را ایجاد می‌نماید (۸). بررسی‌ها بر روی مدل‌های توموری آزمایشگاهی و بیماران سرطانی مشخص نموده است که این مقاومت دارویی بخاطر فعال‌سازی مجدد رگ زایی در اثر عملکرد ملکول bFGF است (۹، ۱۰). پروتئین bFGF یکی از ۲۳ عضو شناخته شده خانواده FGF (fibroblast growth factor) می‌باشد که یک پلی پپتید غیرگلیکوزیله و متصل به هپارین است (۱۱). با توجه به فعالیت رگ زایی قوی فاکتور bFGF، می‌تواند به‌عنوان هدف در توسعه استراتژی‌های جدید ضد آنژیوژنز معرفی گردد (۱۲). پروتئین bFGF به خاطر نیمه عمر کوتاه در درون بدن

مقاومت به آمپی سیلین در پلاسمید مورد نظر و حضور آمپی سیلین در محیط کشت LB برات، کلون هایی که به طور صحیح ترانسفورم شده بود انتخاب شدند. در مرحله ی بعد با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (شرکت کیاژن)، پلاسمیدهای تکثیر یافته استخراج شدند. پس از اطمینان از کیفیت مناسب پلاسمید استخراج شده، واکنش هضم آنزیمی با آنزیم های برشی *XhoI* و *NcoI* (شرکت vivantis) صورت پذیرفت. پس از برش قطعه طراحی شده از درون پلاسمید تکثیری (pUC57)، پلاسمید بیانی pET28-a نیز با استفاده از همین آنزیم های برش خورد و به صورت خطی درآمد. سپس قطعات برش خورده ژن و پلاسمید بیانی خطی شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد جداسازی شدند. در مرحله بعد قطعات ژنی و پلاسمید بیانی خطی شده با کیت استخراج ژن از روی ژل (شرکت کیاژن) از آگاروز تخلیص شدند. سپس الحاق قطعه طراحی شده به درون سایت کلونینگ پلاسمید pET28-a انجام گرفت. با روش شوک حرارتی ترانسفورماسیون محصول لیگاسیون pET28-a نو ترکیب به درون سلول های صلاحیت دار *E. coli* bl21(DE3) انجام شد. در نهایت جهت انتخاب باکتری هایی که به فرم صحیح ترانسفورم شده بودند از فشار آنتی بیوتیکی کانامایسین استفاده شد (پلاسمید pET28-a دارای ژن مقاومت به کانامایسین است).

بررسی کیفیت پلاسمید نو ترکیب به روش تکثیر ژنی: به منظور حصول اطمینان از کیفیت پلاسمید نو ترکیب ساخته شده، واکنش تکثیر ژنی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی پروموتور T₇ و واکنش هضم آنزیمی بوسیله آنزیم های برشی *XhoI* و *NcoI* صورت پذیرفت. واکنش تکثیر تحت شرایط دمایی، واسرشتی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد برای یک دور و به تعداد ۳۰ دور به مدت ۵۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۰ ثانیه در ۴۶ درجه سانتیگراد، ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد و در پایان ۵ دقیقه در ۷۲ درجه به عنوان گسترش نهایی قرار گرفت. برای برش پلاسمید نو ترکیب با آنزیم های برشی، مقادیر یک میکرولیتر از پلاسمید نو ترکیب و نیم میکرولیتر از آنزیم های برشی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در محیط بافری یکسان با یکدیگر مخلوط شدند و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه هضم آنزیمی صورت

فیروپلاست-۲ (Uniprot N: P09038) و توکسین سودوموناس آئروژینوزا (Uniprot N: P11439) از پایگاه اطلاعاتی UNIPROT اخذ گردید. طراحی قطعات ژنی کدکننده مربوط به فیوژن پروتئین: در ابتدا توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای مربوط به فاکتور رشد فیروپلاست-۲ و توکسین سودوموناس آئروژینوزا از سایت NCBI و UNIPROT اخذ شد. در این مطالعه توالی مربوط به دومین های Ib و-II توکسین سودوموناس مورد استفاده قرار گرفت. به منظور حفظ ساختار فضایی دومین ها از پلی لینکر Rigid استفاده شد (AEAAAAKEAAAAKEAAAAKEAAAAKA). توالی های مربوط به سیگنال 3*KDEL به انتهای کربوکسیل و توالی مربوط به پلی هیستیدین در قسمت N ترمینال قطعه طراحی شده اضافه شد. بعد از توالی پلی هیستیدین توالی جایگاه برش آنزیم انتروکیناز قرار گرفت. برای برش توالی نوکلئوتیدی هنگام قراردادن در پلاسمید، آنزیم های محدود کننده *NcoI* در قسمت 5'-end و *XhoI* در 3'-end استفاده شد. به منظور اطمینان یافتن از صحت خاتمه ترجمه دو تکرار از کدون خاتمه TAA در انتهای توالی طراحی شده در نظر گرفته شد.

بهینه کردن توالی مربوط به فیوژن پروتئین: با استفاده از نرم افزار DNA2 توالی نوکلئوتیدی قطعه طراحی شده بهینه گردید. بدین منظور کدون هایی را که در سیستم بیانی باکتری بیشتر مورد استفاده قرار می گرفتند انتخاب شدند. علاوه بر این، محتوای GC و جایگاه های برش آنزیمی در توالی کدکننده مربوط به فیوژن پروتئین نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. نرم افزارهای PSIPRED و I-TASSER به منظور پیش بینی ساختار فضایی فیوژن پروتئین و چگونگی در دسترس قرار گرفتن اپی توپ های مختلف مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت و کلونینگ قطعه کدکننده فیوژن پروتئین: سنتز ژن بهینه شده، توسط شرکت Shine Gene کشور چین انجام گردید. قطعه سنتز شده دارای طولی ۱۰۲۹ جفت باز بود. این ژن به صورت کلون شده در شاخص کلونینگ pUC57 دریافت شد. سپس پلاسمید سفارش داده شده با روش شوک حرارتی (Heat shock transformation) به درون باکتری مستعد *E. coli* DH5α منتقل گردید. با توجه به حضور ژن

آنتروژینوز (Domain 2,1b) به کار رفته در فیوژن پروتئین برابر با ۱۳۲ اسید آمینه می‌باشد. تمامی قطعات کدکننده در فرم آرایشی صحیح در سایت کلونینگ پلاسمید بیانی قرار داده شد. توالی های مربوط به KDEL در انتهای کربوکسیل و توالی مربوط به هیستیدین در ناحیه N ترمینال قطعه طراحی شده واقع شد (شکل ۱).

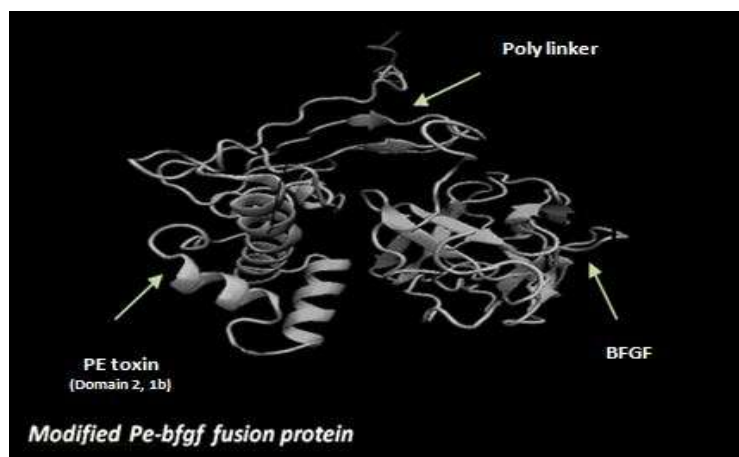
گرفت. در نهایت محصول واکنش بر روی آگار ۱ درصد جدا سازی شد.

یافته ها

طراحی و ارزیابی توالی کدکننده فیوژن پروتئین:
تعداد اسیدهای آمینه انتخاب شده فاکتور رشد فیروبلستی ۲، ۱۵۴ اسید آمینه و تعداد اسیدهای آمینه توکسین سودوموناس



شکل ۱- نمایش قسمت های مختلف فیوژن پروتئین طراحی شده در سایت کلونینگ پلاسمید بیانی PET28-a



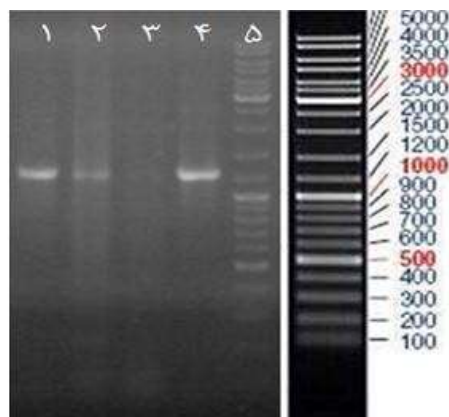
شکل ۲- نتیجه پیش بینی ساختار فضایی فیوژن پروتئین طراحی شده توسط نرم افزار I-TASSER

پس از هضم آنزیمی وکتور کلونینگ pUC57 نو ترکیب و استخراج توالی ژنی از روی ژل، قطعه طراحی شده درون سایت کلونینگ پلاسمید بیانی PET28-a قرار گرفت. باکتری های ترانسفورم شده با پلاسمید نو ترکیب روی پلیت آگار حاوی کانامیسین کشت داده شدند. پلاسمید استخراج شده با استفاده از روش تکثیر ژنی و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت.

حضور باند ۱۲۱۴ جفت بازی (۱۰۲۹ جفت باز مربوط به قطعه کدکننده بعلاوه 1۷۷ جفت باز مربوط به سایت اتصال پرایمرهای T7) تأییدکننده حضور قطعه ژنی در سایت کلونینگ پلاسمید بیانی PET28-a نو ترکیب می‌باشد.

پیش بینی شده است ساختمان سوم دو قطعه پروتئینی به خوبی توسط پلی لینکر سخت (Rigid) از همدیگر جدا شده و دو قطعه پروتئینی هیچ تداخل ساختاری با همدیگر نداشته باشند (شکل ۲).

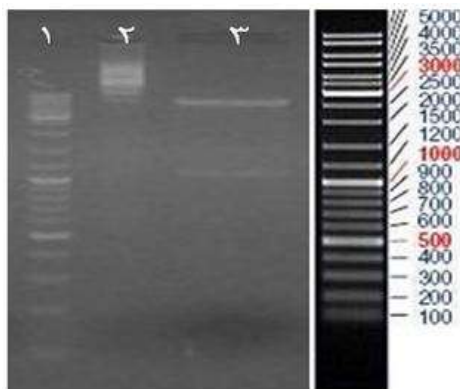
ساخت و ارزیابی سازه ژنی کدکننده فیوژن پروتئین:
پس از طراحی، ارزیابی و تأیید نرم افزاری قطعه کدکننده توالی مربوطه ساخته شد. شکل شماره چهار نتایج مربوط به هضم آنزیمی پلاسمید بیانی نو ترکیب با استفاده از آنزیم های محدودالثر *NcoI* و *XhoI* و حضور باند ۱۰۲۹ جفت بازی تأییدکننده حضور قطعه ژنی طراحی شده است.



شکل ۳- محصول Colony-PCR فیوژن ژن PE-bFGF بر روی ژل آگاروز ۱٪ جهت تأیید کلونینگ ژن‌ها در پلاسمید PET28-a

- چاهک ۱: واکنش PCR تأییدی بر روی کلون ۲ پلاسمید PET28-a
 چاهک ۲: واکنش PCR تأییدی بر روی کلون ۴ پلاسمید PET28-a
 چاهک ۳: واکنش PCR تأییدی بر روی کلون ۶ پلاسمید PET28-a
 چاهک ۴: واکنش PCR تأییدی بر روی کلون ۸ پلاسمید PET28-a
 چاهک ۵: مارکر DNA ایبی

حضور باند ۱۰۲۹ جفت بازی حاصل از هضم آنزیمی در الگوی الکتروفورز در شکل شماره ۴ نشان‌دهنده فرآیند صحیح تکثیر قطعه طراحی شده در سایت



شکل ۴- پلاسمید برش خورده بر روی ژل آگاروز-۱٪

علیه آنتی‌ژن هدف می‌باشد. یکی از روش‌های نوین تحریک سیستم ایمنی استفاده از قطعات ایمونوژن توکسین‌های باکتریایی است (۲۵). از جمله بهترین این پپتیدهای ایمونوژن توکسین سودوموناس آئروژینوزا است (۱۵). در یک مطالعه برای طراحی DNA واکسن علیه پاپیلوما ویروس انسانی از توالی آنتی‌ژن E7 ویروس پاپیلوما انسانی (HPV)، دومین‌های I و II توکسین سودوموناس و توالی KDEL استفاده شد. پس از تولید این واکسن به موش آزمایشگاهی مدل سرطانی تزریق شد. بررسی‌ها نشان‌دهنده القاء پاسخ ایمنی سلولی و هورمونی با افزایش قابل توجه تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن E7 است (۱۸). در مطالعه دیگر مشاهده شد که با اتصال آنتی‌ژن

اواستین (Bevasizumab) به‌عنوان یک آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی ضد فاکتور رگ‌زایی VEGF، رگ‌زایی و رشد تومور را متوقف می‌نماید (۸). مصرف طولانی‌مدت اواستین مقاومت دارویی را ایجاد می‌نماید (۸). این مقاومت دارویی به خاطر فعال‌سازی مجدد آنتی‌ژن‌ها از طریق بیان بیش‌ازحد فاکتور bFGF می‌باشد (۹، ۱۰). بنابراین با توجه به فعالیت رگ‌زایی بالای bFGF، این ملکول می‌تواند به‌عنوان یک هدف مناسب برای توقف رگ‌زایی و درمان تومور مطرح شود. ملکول bFGF به خاطر نیمه عمر کوتاه و ایمونوژنیسته پایین به‌تنهایی قادر به ایجاد یک پاسخ ایمنی قدرتمند نیست (۱۳). استفاده از ادجوان‌ها یک راهکار معمول در جهت افزایش پاسخ ایمنی

ساختاری توسط نرم افزار I-TASSER، پلی لینکر پپتیدی سخت (Rigid) به منظور جدا نگه داشتن دومین های پروتئینی از یکدیگر انتخاب شد. یکی از بهترین پلی لینکر ها AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA می باشد که در مطالعات مختلف مشاهده شده است که به خوبی ساختار فضایی قطعات پروتئینی را از همدیگر جدا می کند (۲۸). بررسی پایداری فیوژن پروتئین به وسیله نرم افزار PROTPARAM نشان دهنده stability Index (II) برابر با ۳۳/۴۹ است که این مقدار نشان دهنده پایداری مناسب فیوژن پروتئین طراحی شده می باشد. پس از بهینه سازی کدون های قطعه طراحی شده، مقدار سازگاری کدون های خوانش (CAI) از ۰/۶۹ به ۰/۸۳ افزایش پیدا کرد. همچنین میزان محتوای GC در توالی طراحی شده پس از بهینه سازی از ۶۱ به ۵۴/۷۷ کاهش یافت. متغیرهای به دست آمده نشان دهنده کارآمدی بالا توالی ژنی طراحی شده برای بیان در سیستم بیانی باکتریایی می باشد.

نتیجه گیری

بر پایه مطالعات منابع علمی موجود، این مطالعه نخستین مورد در خصوص طراحی، بهینه سازی و ساخت سازه ژنی نو ترکیب واجد قطعات کدکننده مربوط به پروتئین فاکتور رشد فیرو بلاستی-۲ متصل به قطعه ایمونوژن توکسین سودوموناس آئروژینوزا (Domain 2,1b) می باشد که می تواند به عنوان یک واکنش احتمالی قوی در درمان تومور مورد ارزیابی قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

با تشکر فراوان از جناب آقای دکتر احد یامچی و سرکار خانم دکتر آیلر جمالی که از راهنمایی ارزشمند ایشان در اجرای این طرح بهره مند شدیم. این مقاله دارای حمایت مالی با شماره ۳۵/۲۰۶۹ به تاریخ ۱۳۹۲/۱۰/۷ از دانشگاه علوم پزشکی گلستان می باشد.

References

1. Carmeliet P. *Angiogenesis in life, disease and medicine*. Nature. 2005; 438(7070): 932-6.
2. Maragoudakis ME. *Angiogenesis in health and disease*. General Pharmacology: The Vascular System. 2000; 35(5): 225-6.
3. Risau W. *Mechanisms of angiogenesis*. Nature. 1997; 386(6626): 671-4.
4. Denekamp J. *Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours*. Acta Oncologica. 1984; 23(4): 217-25.

ضعیف به توالی ایمونوژن توکسین سودوموناس، آنتی ژن از طریق MHC کلاس I و II به سطح سلول ها ارائه شده و یک پاسخ ایمنی قدرتمند علیه آن صورت گرفته است (۱۵). در بررسی دیگر به منظور افزایش پاسخ ایمنی علیه آنتی ژن F2 سیرکوپروس پیکورنا (PCV)، با استفاده از دومین های ایمونوژن I و II توکسین سودوموناس و توالی KDEL فیوژن پروتئین PE-F2-KDEL طراحی و تولید گردید. پس از تزریق این فیوژن پروتئین به موش آزمایشگاهی، پاسخ ایمنی قدرتمند علیه آنتی ژن ویروسی القاء شد و سطح سرمی آنتی بادی اختصاصی علیه این آنتی ژن به طرز چشم گیری افزایش یافت (۱۷). بررسی های بیشتر نشان می دهد دومین های Ib و دومین II در ساختار پروتئینی این توکسین دارای بیشترین خاصیت تحریک پاسخ ایمنی هستند (۱۹، ۲۰، ۲۶). هدف این مطالعه فیوژن کردن قطعات کد کننده دومین های Ib و II توکسین سودوموناس آئروژینوزا با فاکتور رگ زایی bFGF برای تولید یک فیوژن پروتئین ایمونوژن بود که بتواند هر دو پاسخ ایمنی سلولی و هورمونی را علیه فاکتور bFGF القاء کند. در انتهای کربوکسیلی فیوژن پروتئین، توالی KDEL قرار گرفته است. این توالی توسط شبکه آندوپلاسمی شناخته می شود و در نهایت منجر به ارائه فیوژن پروتئین از مسیر MHC کلاس I و تحریک قدرتمند پاسخ لنفوسیت های T سایتوتوکسیک می شود (۲۷). پلاسمید بیانی مورد استفاده در این مطالعه PET28-a بود که دارای ویژگی های مهمی از قبیل پروموتور قدرتمند T7 برای تولید حداکثری پروتئین، توالی His-tag در دو انتهای کربوکسیلی و آمینی برای تسهیل خالص سازی پروتئین هدف و ژن مقاومت به کانامایسین برای غربالگری آسان می باشد. به منظور جدا کردن توالی پلی هیستیدین بعد از خالص سازی، پس از توالی جایگاه برش پروتئاز انتروکیناز درج شد. پس از بررسی های

5. Folkman J. *Fundamental concepts of the angiogenic process*. Current molecular medicine. 2003; 3(7): 643-51.
6. Pepper M, Ferrara N, Orci L, Montesano R. *Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro*. Biochemical and biophysical research communications. 1992; 189(2): 824-31.
7. Abe M, Sato Y. *cDNA microarray analysis of the gene expression profile of VEGF-activated human umbilical vein endothelial cells*. Angiogenesis. 2001; 4(4): 289-98.

8. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. *Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors*. *Cancer cell*. 2005; 8(4): 299-309.
9. Brower V. *How well do angiogenesis inhibitors work? Biomarkers of response prove elusive*. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009; 101(12): 846-7.
10. Itoh N, Ornitz DM. *Evolution of the Fgf and Fgfr gene families*. *Trends in Genetics*. 2004; 20(11): 563-9.
11. Burgess WH, Maciag T. *The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins*. *Annual review of biochemistry*. 1989; 58(1): 575-602.
12. Rusnati M, Presta M. *Fibroblast growth factors/fibroblast growth factor receptors as targets for the development of anti-angiogenesis strategies*. *Current pharmaceutical design*. 2007; 13(20): 2025-44.
13. Zhang H-L, Yuan C, Zhang D-M, Shi H-S, Li M, Luo Z-C, et al. *A novel combined conjugate vaccine: Enhanced immunogenicity of bFGF with CRM197 as a carrier protein*. *Molecular medicine reports*. 2011; 4(5): 857-63.
14. Neveu P, Borduas A. *Carrier and hapten functions in immune deviation. I. Contrary effects of hapten and carrier on cellular and helper functions of T cells*. *Immunology*. 1975; 28(2): 315-22.
15. Lippolis JD, Denis-Mize KS, Brinckerhoff LH, Slingluff Jr CL, Galloway DR, Engelhard VH. *seudomonas exotoxin-mediated delivery of exogenous antigens to MHC class I and class II processing pathways*. *Cellular immunology*. 2000; 203(2): 75-83.
16. Allured VS, Collier RJ, Carroll SF, McKay DB. *Structure of exotoxin A of Pseudomonas aeruginosa at 3.0-Angstrom resolution*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986; 83(5): 1320-4.
17. Chen H-Cg, Yang S-H, Chen Y-S, Lai S-S. *Detoxified Exotoxin A Enhanced the Immune Response of a Porcine Circovirus type 2 (PCV2) ORF2 Recombinant Protein*. *Taiwan Vet J*. 2011; 37(4): 233-245.
18. Liao C-W, Chen C-A, Lee C-N, Su Y-N, Chang M-C, Syu M-H, et al. *Fusion protein vaccine by domains of bacterial exotoxin linked with a tumor antigen generates potent immunologic responses and antitumor effects*. *Cancer research*. 2005; 65(19): 9089-98.
19. Nouri Gharajelar S, Ahmadi M, Hosseini B. *Cloning and expression of the immunogenic moiety of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A*. *Biological Journal of Microorganism*. 2013; 1(4): 7-14.
20. Rutault K, Coin D, Vacheron MJ, Guinand M, Wallach J, Michel G. *Identification of a small epitope in domain Ib of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A that elicits enzyme-neutralizing antibodies*. *FEMS Microbiology Letters*. 1992; 89(5): 267-72.
21. Demain AL, Vaishnav P. *Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms*. *Biotechnology advances*. 2009; 27(3): 297-306.
22. Robichon C, Luo J, Causey TB, Benner JS, Samuelson JC. *Engineering Escherichia coli BL21 (DE3) derivative strains to minimize E. coli protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography*. *Applied and environmental microbiology*. 2011; 77(13): 4634-46.
23. Kubota Y. *Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy*. *Keio J Med*. 2012; 61(2): 47-56.
24. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. *Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes*. *Bioessays*. 1994; 16(12): 901-6.
25. Corradin G, Giudice GD. *Novel adjuvants for vaccines*. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*. 2005; 4(2): 185-91.
26. Hung C-F, Cheng W-F, Hsu K-F, Chai C-Y, He L, Ling M, et al. *Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen*. *Cancer research*. 2001; 61(9): 3698-703.
27. Cheng W-F, Chang M-C, Sun W-Z, Jen Y-W, Liao C-W, Chen Y-Y, et al. *Fusion Protein Vaccines Targeting Two Tumor Antigens Generate Synergistic Anti-Tumor Effects*. *PloS one*. 2013; 8(9): e71216.
28. Arai R, Ueda H, Kitayama A, Kamiya N, Nagamune T. *Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein*. *Protein engineering*. 2001; 14(8): 529-32.

Designing and Construction of Recombinant Plasmid Consisting of Basic Fibroblast Growth Factor and Immunodominant Fragments of Pseudomonas Exotoxin

Haghighatfard, H. (BSc)

MSc Student of Medical
Biotechnology, Faculty of
Advanced Medical Technologies,
Golestan University of Medical
Science, Gorgan, Iran

Yazdani, Y. (PhD)

Assistant Professor of Immunology,
Infectious Diseases Research
Center and Laboratory Science
Research Center, Golestan
University of Medical Sciences,
Gorgan, Iran

Corresponding Author: Yazdani,
Y.

Email: yaghobyazdani59@yahoo.com

Received: 7 Jun 2014

Revised: 12 Sep 2014

Accepted: 15 Sep 2014

Abstract

Background and Objective: the inhibition of tumor-associated angiogenesis can significantly reduce the tumor proliferation. The basic fibroblast growth factor (bFGF), an important angiogenic factor, is considered as a potential therapeutic target for cancer therapy. The purpose of this study was evaluating, designing and construction of new recombinant DNA molecule in order to have efficient expression of a fusion protein consisting of the bFGF and immunodominant epitopes of Pseudomonas toxin.

Material and Methods: Different types of peptide linker, codon adaptation index (CAI) and adding signal peptide were considered in designing of immunogenic coding sequence. After software evaluation, the recombinant DNA molecule was ordered in the puc57 cloning vector. Then, coding sequence inserted into the multiple cloning site of pET28-a plasmid. Finally, PCR and enzymatic digestion tests were done for evaluation of recombinant expression vector.

Results: Optimization of DNA sequence, codon adaptation index (CAI) increased from 0.69 to 0.83 and GC content decreased from 61 to 54.77. The presence of 1214-bp PCR product and 1029-bp one obtaining from enzymatic digestion confirmed the correction of the cloning process.

Conclusion: According to the previous studies, it is the first work for designing, optimizing and synthesis of recombinant DNA consisting of bFGF and immunodominant epitopes of Pseudomonas toxin.

Keywords: Tumor angiogenesis, immunodominant epitopes of Pseudomonas toxin, Fibroblast growth factor 2, DNA 2 software