

طراحی روش بررسی اتصال سلولی پروتئین‌ها بر پایه

الیزا قابل استفاده در ژن‌درمانی برون تن

ابراهیم حسینی^۱، سید یونس حسینی^۲، طیبه هاشم‌پور^۳، محمدرضا فتاحی^۴، مجید صادقی‌زاده^{۱*}

^۱ گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، ^۲ گروه ویروس‌شناسی و باکتری‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، ^۳ مرکز تحقیقات عفونی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، ^۴ مرکز تحقیقات کبد و گوارش، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: یکی از راهکارهای بهبود ژن‌درمانی، هدفمند کردن ژن، درمانگر می‌باشد. افزودن توالی‌های کدکننده پپتیدها و یا پروتئین‌های با گرایش بالا به سلول‌های هدف ژن‌درمانگر کدکننده پروتئین ترشحی، از جمله این روش‌ها محسوب می‌شود. با این وجود ارزیابی کارآمدی چنین تغییراتی در هدفمندسازی محصول ژن با روش‌های معمول بررسی اتصال سلولی پروتئین‌های درمانگر تولید شده در سیستم پروکاریوتی، به طور مستقیم امکان‌پذیر نیست. هدف از این مطالعه طراحی روشی بر مبنای آزمون الیزا برای بررسی اتصال سلولی پروتئین‌های حاصل از ژن‌درمانی بود.

مواد و روش‌ها: به منظور هدفمندسازی ژن‌درمانگر Mda-7، با روش مهندسی ژنتیک، توالی کدکننده پپتید RGD4C، که گرایش زیادی به اینتگرین‌های سطحی سلول‌های سرطانی دارد، را درست بعد از توالی پپتید نشانه مصنوعی و در ناحیه کدکننده انتهای آمین پروتئین تعبیه کردیم. سپس این cDNA تغییر یافته و cDNA بدون تغییر در ناقل بیانی یوکاریوتی pCDNA3.1 همسان‌سازی شد. ناقل‌ها در رده سلولی HEK-293 ترانسفکت شدند. سپس میزان بیان Mda-7 ترشح شده در محیط کشت سلول‌ها با آزمون الیزا سنجیده شد. پس از همسان کردن غلظت پروتئین Mda-7 و RGD.Mda-7 در محیط‌های کشت سلول‌های ترانسفکت شده، از آنها به عنوان منبع این پروتئین‌ها استفاده شد. کاهش غلظت محصول این ژن‌ها دو ساعت پس از مجاورت با رده‌های سلولی دارای اینتگرین HepG2، M21 و فاقد اینتگرین Saos-2 با روش الیزا بررسی و مقایسه شد. این آزمایش سه مرتبه به طور مستقل انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری تی تست تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: بررسی آماری نتایج، حاکی از این بود که محصول ژن RGD.Mda-7 نسبت به محصول ژن Mda-7 جهت اتصال به سلول‌های دارای اینتگرین HepG2 و M21 به طور معنی‌داری گرایش بیشتری دارد، در حالی که جهت اتصال به رده سلولی فاقد اینتگرین Saos-2 تفاوت معنی‌داری نداشتند.

بحث: به نظر می‌رسد روش طراحی شده در این تحقیق، راهکار مناسبی جهت ارزیابی اتصال سلولی پروتئین‌ها در کاربردهای ژن‌درمانی باشد.

واژه‌های کلیدی: سنجش اتصال سلولی، الیزا، RGD، RGD.Mda-7

* نویسنده مسئول: مجید صادقی‌زاده، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه ژنتیک مولکولی

Email: sadeghma@modares.ac.ir

مقدمه

یکی از چالش‌های پیش‌رو در درمان سرطان یافتن راه‌های مؤثر انتقال عوامل درمانی به جایگاه تومور می‌باشد. در این مورد هدفگیری پروتئین‌های سطح سلولی تغییر یافته با سرطان در زمینه بافت تومور بسیار مورد توجه است. این پروتئین‌ها می‌توانند گیرنده عوامل رشد، مولکول‌هایی که در اتصالات سلولی نقش دارند، اینتگرین‌ها و یا نشانگرهای سطحی سلول‌های اندوتلیالی باشند (۱-۳). اینتگرین $\alpha v \beta 3$ یک هترو دایمر سطح سلولی است که به عنوان گیرنده ماتریکس خارج سلولی و همچنین در اتصالات سلول به سلول نقش دارد (۴ و ۵). در سلول‌های اندوتلیالی رگ‌های خونی تومور بیان اینتگرین $\alpha v \beta 3$ افزایش می‌یابد. این افزایش بیان جهت تکوین تومور الزامی است (۶ و ۷). مهار اینتگرین موجب مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در سلول‌های اندوتلیالی می‌گردد (۸). هم‌چنین اینتگرین $\alpha v \beta 3$ نقش بالقوه‌ای در بقا و متاستاز برخی از انواع تومورها دارد (۹-۱۱).

هدفگیری اینتگرین $\alpha v \beta 3$ در زمینه بافت تومور به وسیله پپتیدهایی با گرایش اختصاصی نظیر RGD امکان‌پذیر شده است، بنابراین مجهز کردن عوامل درمانی به پپتید RGD از جمله راه کارهای مؤثر جهت انتقال هدفمند عوامل درمانی به جایگاه تومور می‌باشد (۱۲). از توالی کد کننده پپتید RGD هم‌چنین در هدفمندسازی ژن درمانی نیز استفاده می‌شود. با این وجود با توجه به تولید کم محصول ژن درمانگر در سیستم یوکاریوتی امکان ارزیابی کارآمدی این روش

در هدفمندسازی ژن درمانگر با روش‌های معمول آزمون سنجش اتصال سلولی مورد استفاده جهت پروتئین‌های نو ترکیب تولید شده در سیستم یوکاریوتی امکان‌پذیر نمی‌باشد.

Mda-7 از جمله ژن‌های سرکوبگر تومور است که می‌تواند به طور اختصاصی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را در بسیاری از سرطان‌های مختلف انسان القا نماید. محصول پروتئینی mda-7 بر اساس شباهت ساختاری، موقعیت کروموزومی و خواص شبه سیتوکاینی از گروه سیتوکاین‌های مرتبط با خانواده IL-10 می‌باشد و عملکردی مشابه آن در کنترل تکثیر بعضی از سلولهای بدن و تمایز آنها دارد، بنابراین آن را اینترلوکین -۲۴ نامیدند.

هدف از این تحقیق طراحی آزمون سنجش اتصال سلولی بر اساس روش الیزا و سپس کارامدی آن به طور تجربی و با استفاده از ژن درمانگر Mda-7 هدفمند شده با RGD آزمایش شد.

روش بررسی

به منظور ساخت سازه pc-Mda-7 ابتدا قطعه کد کننده Mda-7 با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران و آغازگرهای رفت p1 و برگشت p2 و cDNA حاصل از گلوبول‌های سفید خون به عنوان الگو تکثیر شد. آغازگرهای رفت و برگشت به ترتیب دارای جایگاه آنزیم‌های محدودالایر Bam H1 و Xho I بودند که امکان همسان‌سازی آنرا در ناقل بیانی یوکاریوتی

ناقل‌های pCDNA3.1 (کنترل منفی)، pc-Mda-7 و pc-SP.RGD.Mda-7 محیط رویی سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت جمع‌آوری و با دور (RPM) ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ شدند. سپس، غلظت Mda-7 در مایع رویی سلول‌های Hek-293 ترانسفکت شده، با استفاده از کیت الیزای سنجش IL-24 انسانی (Abcam) طبق دستورالعمل ارایه شده انجام شد.

به منظور سنجش اتصال سلولی پس از اندازه‌گیری غلظت پروتئین Mda-7، در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با pc-Mda-7 و pc-SP.RGD.Mda-7 از آنها به ترتیب به عنوان منبع پروتئین‌های Mda-7 و SP.RGD.Mda-7 در آزمون سنجش اتصال سلولی به شرح زیر استفاده شد.

با افزودن محیط کشت DMEM، محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با pc-Mda-7 تا همسان شدن غلظت Mda-7 با غلظت SP.RGD.Mda-7 در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با pc-SP.RGD.Mda-7، رقیق شد و جهت اطمینان، مجدداً غلظت Mda-7 در آنها اندازه‌گیری شد.

تعداد 4×10^5 سلول به ازای هر چاهک از رده‌های سلولی HepG2، M21 و Saos-2، هر کدام در شش چاهک از پلیت ۶ خانه کشت داده شدند. ۴۸ ساعت پس از کشت سلول‌ها، محیط کشت رویی سلول‌ها به طور کامل تخلیه شد و دو بار، با PBS شسته شدند. سپس به سه چاهک از هر یک از رده‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با pc-Mda-7 و به سه چاهک دیگر ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با

pCDNA3.1 فراهم آورد.

به منظور ساخت سازه pc-SP.RGD.Mda-7، ابتدا قطعه کد کننده پپتید نشانه سرکون RGD با روش گسترش آغازگرهای رفت (S1) و برگشت (S2) همپوشان ساخته شد (۱۳). آغازگرهای رفت و برگشت در انتهای ۳' خود در ۲۰ نوکلئوتید همپوشانی داشتند. هم‌چنین آغازگر برگشت در انتهای ۵' دارای ۲۵ نوکلئوتید همپوشان با قطعه کد کننده Mda-7 فاقد سیگنال پپتید بود. قطعه کد کننده Mda-7 فاقد سیگنال پپتید با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس از آغازگرهای رفت p3 و برگشت p2 و سازه pc-Mda-7 به عنوان الگو تکثیر شد. سپس قطعه کد کننده پپتید نشانه سرکون و قطعه کد کننده Mda-7 فاقد پپتید نشانه با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس سوئینگ به هم متصل شدند. وجود جایگاه آنزیم‌های محدودالانتر Bam H1 و Xho I به ترتیب در آغازگرهای S1 و p2 امکان همسان‌سازی آنرا در ناقل بیانی یوکاریوتی pCDNA3.1 فراهم آورد.

برای بررسی کشت سلولی و ترانسفکشن، رده‌های سلولی HepG2، Ad-293، M21 و Saos-2 از پاستور خریداری شد و در محیط DMEM غنی شده با سرم گوساله ۱۰ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 کشت داده شد.

برای ترانسفکت نمودن ناقل‌ها به درون سلول از محلول لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen, Inc, USA) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده عمل شد.

در مرحله بعد تست الیزا استفاده شد، به این منظور بعد از کشت سلول‌های Hek-293 و ترانسفکشن

Mda-7 pc-SP.RGD.Mda-7 اضافه شد و پس از دو ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محیط‌ها جمع‌آوری و مجدداً با کیت الیزا، غلظت پروتئین Mda-7 در آنها اندازه‌گیری شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری تی تست تجزیه و تحلیل شدند.

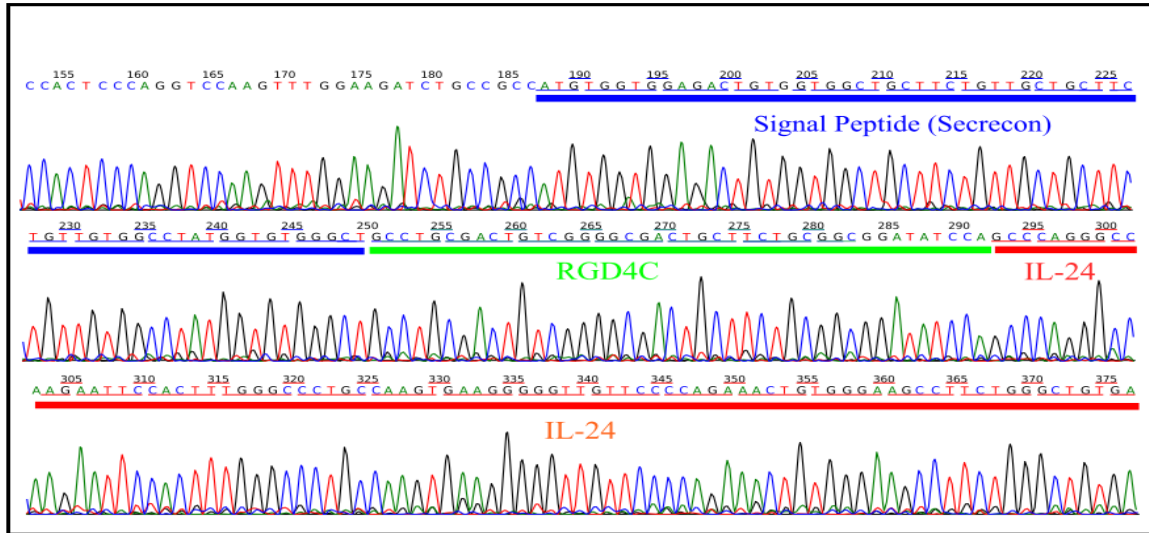
یافته‌ها

با انجام توالی یابی درستی و تمامیت سازه‌ها بررسی و تأیید شد (شکل ۱). ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن ناقل‌های بیانی در رده سلولی HEK-293، بیان و ترشح پروتئین Mda-7 و SP.RGD.Mda-7 با الیزای اختصاصی پروتئین Mda-7 در محیط کشت رویی سلول‌ها بررسی شد (نمودار ۱). سنجش اتصال سلولی Mda-7 و SP.RGD.Mda-7 با استفاده از روش الیزا و مطابق با توضیحات مربوط در قسمت مواد و روش‌ها انجام شد. نمودار ۲ نتایج حاصل از سنجش اتصال سلولی Mda-7 و SP.RGD.Mda-7 به سلول M21 که دارای اینتگرین‌های سطحی است را نشان می‌دهد. تفاوت غلظت Mda-7 و SP.RGD.Mda-7 قبل و بعد از مجاورت با سلول‌ها در نمودار حاکی از کاهش غلظت Mda-7 در حدود ۴۰۰ پیکوگرم و کاهش غلظت SP.RGD.Mda-7 تقریباً ۱۳۰۰ پیکوگرم می‌باشد. آزمون سه مرتبه انجام گرفت و میانگین تفاوت غلظت Mda-7 و SP.RGD.Mda-7 قبل و بعد از مجاورت با سلول‌ها (کاهش غلظت) با آزمون آماری تی تست، مقایسه شد که حاکی از تفاوت

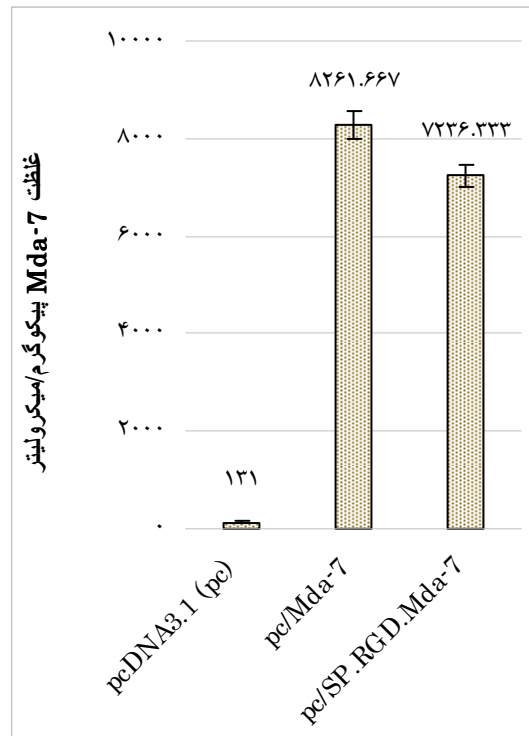
معنی‌دار کاهش غلظت SP.RGD.Mda-7 در مقایسه با Mda-7 بود ($P < 0.05$) (نمودار ۳). نتایج حاصل از سنجش اتصال سلولی Mda-7 و SP.RGD.Mda-7 به سلول Saos-2 فاقد اینتگرین‌های سطحی است را نشان می‌دهد. تفاوت غلظت Mda-7 و SP.RGD.Mda-7 قبل و بعد از مجاورت با سلول‌ها در نمودار حاکی از کاهش غلظت تقریباً یکسان حدود ۲۰۰ پیکوگرم می‌باشد و آزمون آماری تفاوت معنی‌داری در کاهش غلظت Mda-7 و SP.RGD.Mda-7 قبل و بعد از مجاورت با سلول‌های Saos-2، نشان نمی‌دهد ($P > 0.05$) (نمودار ۴). کاهش غلظت Mda-7 و SP.RGD.Mda-7 را بعد از مجاورت با سلول‌های HepG2 به ترتیب در حدود ۲۰۰ و ۱۱۰۰ پیکوگرم، نشان می‌دهد، در این مورد نیز آزمون حاکی از تفاوت معنی‌دار کاهش غلظت SP.RGD.Mda-7 در مقایسه با Mda-7 بود ($P < 0.05$).

بحث

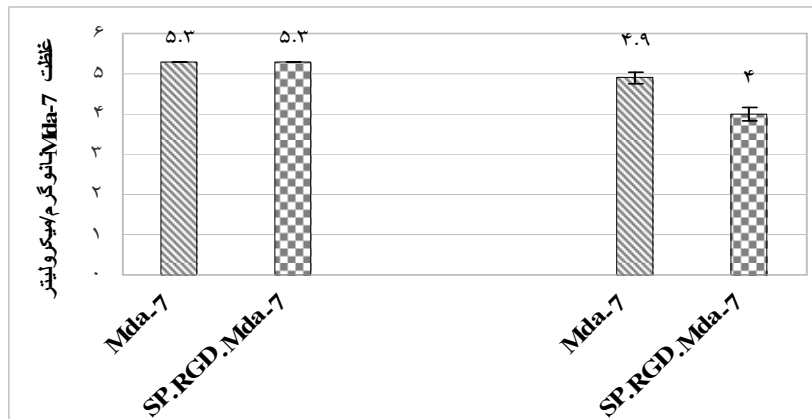
می‌توان با اضافه کردن پپتیدهای هدفمندساز به پروتئین‌های ترشحی درمانگر، اثر آنها را تقویت کرد. پپتیدهای هدفمندساز با گرایش بالا به عوامل سطح سلولی اختصاصی سلول‌های سرطانی، پروتئین درمانگر را به سمت جایگاه تومور هدفمند می‌سازند و با کاهش پراکندگی آن در سایر مناطق موجب تقویت اثر آن خواهند شد. از جمله عوامل سطح سلولی اختصاصی سلول‌های سرطانی cd13، اینتگرین‌ها، ویمنتین که به وسیله پپتیدهای با گرایش بالا هدفگیری می‌شوند.



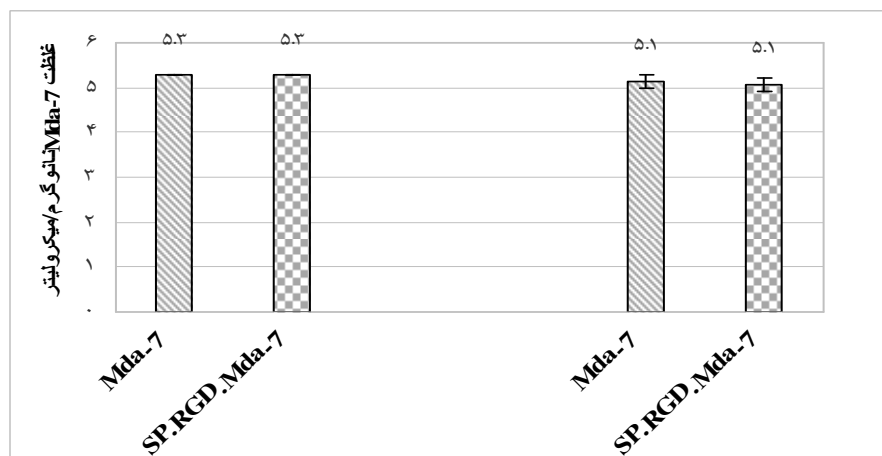
شکل ۱: توالی یابی سازه **pc-SP.RGD.Mda-7**. توالی سیگنال پپتید سکرکون و بلافاصله توالی کد کننده قطعه **RGD** و در ادامه توالی **IL-24** در قاب باز خواندنی صحیح



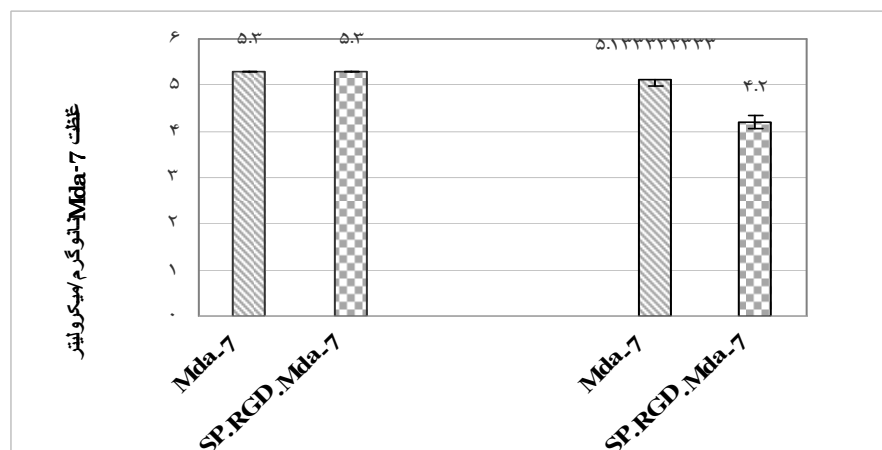
نمودار ۱: بررسی بیان و ترشح **Mda-7** در محیط کشت سلول‌های **HEK-293** ترانسفکت شده با **pcDNA3.1 (pc)**، **pc-Mda-7** و **pc-RGD.Mda-7**. **۷۲** ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌های **HEK-293** با ناقل‌های بیانی **pcDNA3.1 (pc)**، **pc-Mda-7** و **pc-RGD.Mda-7** محیط رویی این سلول‌ها جمع‌آوری شد و غلظت پروتئین **Mda-7** با استفاده از کیت الیزا مورد سنجش قرار گرفت. اعداد بالای هر ستون، میانگین برآورد غلظت **Mda-7** در سه آزمون مستقل هر مورد را نشان می‌دهد. نوار خطی بالای ستون، معرف انحراف معیار است.



نمودار ۲: بررسی غلظت Mda-7 و RGD.Mda-7 قبل (سمت چپ) و دو ساعت پس از مجاورت با سلول‌های M21 (سمت راست). اعداد بالای هر ستون، میانگین برآورد غلظت Mda-7 در سه آزمون مستقل هر مورد را نشان می‌دهد. نوار خطی بالای ستون، معرف انحراف معیار است.



نمودار ۳: بررسی غلظت Mda-7 و RGD.Mda-7 قبل (سمت چپ) و دو ساعت پس از مجاورت با سلول‌های Saos-2 (سمت راست). اعداد بالای هر ستون، میانگین برآورد غلظت Mda-7 در سه آزمون مستقل هر مورد را نشان می‌دهد. نوار خطی بالای ستون، معرف انحراف معیار است.



نمودار ۴: بررسی غلظت Mda-7 و RGD.Mda-7 قبل (سمت چپ) و دو ساعت پس از مجاورت با سلول‌های HepG2 (سمت راست). اعداد بالای هر ستون، میانگین برآورد غلظت Mda-7 در سه آزمون مستقل هر مورد را نشان می‌دهد. نوار خطی بالای ستون، معرف انحراف معیار است.

در روش ذکر شده غلظت بالا (۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از پروتئین فیوز شده با پپتید هدفمند مورد نیاز بود. غلظت پروتئین تولید شده از ناقل‌های بیانی مورد استفاده در ژن درمانی بسیار کمتر از غلظت مورد نیاز آزمایش سنجش اتصال سلولی می‌باشد. بنابراین با روش مرسوم آزمایش سنجش اتصال سلولی پروتئین نمی‌توان کارآمدی محصول ژن‌های فیوز شده با توالی کد کننده پپتید هدفمند را جهت هدفمندسازی ژن درمانی بررسی کرد. یکی از راهکارهای جایگزین روش مرسوم آزمایش سنجش اتصال سلولی در ژن درمانی بررسی هدفمندسازی پپتید به طور غیرمستقیم و با سنجش قدرت هدفمندسازی محصول ژن گزارشگر آلكالین فسفاتاز ترشخی در بدن موجود زنده می‌باشد (۱۲).

در تحقیق حاضر آزمونی جهت بررسی سنجش اتصال سلولی محصول ژن درمانی هدفمند شده بر پایه روش الیزا طراحی شد و سپس کارآمدی آن با روش تجربی بررسی شد. در این آزمون از ژن Mda-7 که مورد توجه محققین در ژن درمانی سرطان می‌باشد استفاده شد و با روش مهندسی ژنتیک توالی کد کننده پپتید هدفمندسازی RGD در ابتدای ژن و بعد از توالی پپتید نشانه قرار دادیم. سپس ژن درمان‌گر هدفمند شده RGD.Mda-7 و هم‌چنین ژن Mda-7 فاقد RGD (کنترل منفی) را با ناقل بیانی pCDNA3.1 در سلول HEK-293 بیان شد. از محیط کشت حاوی Mda-7 و RGD.Mda-7 ترشح شده از سلول‌های

یکی از روش‌های جایگزین استفاده از داروهای پروتئینی در انسان، تولید این پروتئین‌ها در بدن میزبان به شیوه ژن درمانی است. در این روش cDNA کد کننده پروتئین ترشخی با استفاده از ناقل‌های بیانی به میزبان عرضه می‌شود و سلول‌های میزبان پس از بیان پروتئین و ترشح آن، پروتئین درمانگر را به سایر مناطق بدن ارسال می‌کنند. در این مورد نیز می‌توان با اضافه کردن توالی کد کننده پپتیدهای هدفمندسازی به ژن درمانگر موجب تقویت ژن درمانی شد (۱۲).

نخستین گام در بررسی کارآمدی پپتیدهای هدفمندسازی از جنبه پروتئین درمانی، توانایی این پپتیدها جهت اتصال پروتئین به سلول‌های هدف است که به طور مرسوم با آزمایش سنجش اتصال سلولی امکان‌پذیر می‌باشد. در این آزمون کف میکروپلیت مخصوص پلی‌ونیل کلرید، با غلظت بالایی از پروتئین درمانی فیوز شده با پپتید هدفمند پوشانده شد و پس از یک روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با کلرید سدیم ۰/۹ درصد و سپس محیط کشت کامل شسته می‌شود. سپس سلول‌های هدف با تراکم (۳×۱۰^۴) در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل به پلیت اضافه شد و بعد از آن با محیط کشت شسته می‌شود تا سلول‌هایی که نجسپیده‌اند جدا شوند. در آخر سلول‌های چسبیده تثبیت می‌شوند و با رنگ کریستال ویولت رنگ‌آمیزی و سپس با انجام طیف سنجی، بررسی کمی شدند (۱۴).

نتیجه‌گیری

RGD قادر به هدفمندسازی محصول ژن ژن Mda-7 به سلول‌های سرطانی HepG2 می‌باشد. همچنین نتایج حاصل، کارایی آزمون طراحی شده در ارزیابی سنجش اتصال سلولی محصول ژن درمانگر Mda-7 هدفمند شده با توالی RGD را در برون تن به خوبی نشان می‌دهد و می‌توان انتظار داشت که این آزمون را جهت سنجش اتصال سلولی سایر ژن‌های درمانگر هدفمند شده با توالی‌های متنوع دیگر به کار برد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی پایان نامه دکتری مصوب دانشگاه تربیت مدرس تهران بود که با حمایت مرکز تحقیقات میکروبی‌شناسی علوم پزشکی شیراز انجام شد.

Hek-293 به عنوان منبع این دو پروتئین استفاده کردیم و اتصال آنها را به رده‌های سلولی HepG2، M21 و Saos-2 بررسی شد. دیکرسون و همکاران قبلاً بیان اینتگرین و عدم بیان آن را به ترتیب در سطح سلول‌های M21 و Saos-2 نشان داده بودند (۱۵). بنابراین از این دو رده سلولی به عنوان کنترل آزمایش استفاده شد. همچنین این آزمون را در مورد رده سلولی HepG2 بررسی شد. نتایج حاصل از سنجش اتصال سلولی Mda-7 و SP.RGD.Mda-7 به سلول‌های M21 و نشان Saos-2 دادند که توالی RGD، در ابتدای ژن Mda-7 (بعد از توالی نشانه) بخوبی قادر به هدایت محصول این ژن درمانگر به سلول‌های دارای اینتگرین سطحی M21 است، در صورتی که بر گرایش آن به سلول‌های Saos-2 فاقد اینتگرین سطحی تأثیر ندارد، بنابراین می‌توان گفت گرایش Mda-7 تغییر یافته با RGD به سلول‌های M21، به طور اختصاصی به دلیل حضور RGD در ابتدای محصول ژن Mda-7 می‌باشد. این آزمون به منظور بررسی گرایش محصول ژن Mda-7 تغییر یافته با RGD در مقایسه با گرایش محصول ژن Mda-7 فاقد تغییر به سلول‌های سرطانی HepG2 مورد استفاده قرار گرفت و تحلیل آماری نتایج نشان داد محصول ژن Mda-7 هدفمند شده با RGD با گرایش بیشتری نسبت به محصول ژن Mda-7 فاقد تغییر به سلول سرطانی HepG2 دارای اینتگرین‌های سطح سلولی متصل می‌گردد.

REFERENCES

1. Fairbrother WJ, Christinger HW, Cochran AG, Fuh G, Keenan CJ, Quan C, et al. Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site. *Biochemistry* 1998; 37(51): 17754-64.
2. Fukuda MN, Ohyama C, Lowitz K, Matsuo O, Pasqualini R, Ruoslahti E, et al. A peptide mimic of E-selectin ligand inhibits sialyl Lewis X-dependent lung colonization of tumor cells. *Cancer Research* 2000; 60(2): 450-6.
3. Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996; 380(6572): 364-6.
4. Davis GE. Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: alpha v beta 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992; 182(3): 1025-31.
5. Bischoff J. Cell adhesion and angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 1997; 100(11): S37-9.
6. Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 1994; 264(5158): 569-71.
7. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reissfeld RA, Hu T, Klier G, et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994; 79(7): 1157-64.
8. Luscinskas FW, Lawler J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *American Societies for Experimental Biology* 1994; 8(12): 929-38.
9. Kramer RH, Vu M, Cheng YF, Ramos DM. Integrin expression in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Reviews* 1991; 10(1): 49-59.
10. Gouon V, Tucker GC, Kraus-Berthier L, Atassi G, Kieffer N. Up-regulated expression of the beta3 integrin and the 92-kDa gelatinase in human HT-144 melanoma cell tumors grown in nude mice. *International Journal of Cancer Journal International DuCancer*. 1996; 68(5): 650-62.
11. Marshall JF, Hart IR. The role of alpha v-integrins in tumour progression and metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. 1996; 7(3): 129-38.
12. Craig R, Cutrera J, Zhu S, Xia X, Lee YH, Li S. Administering plasmid DNA encoding tumor vessel-anchored IFN-alpha for localizing gene product within or into tumors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2008; 16(5): 901-6.
13. Barash S, Wang W, Shi Y. Human secretory signal peptide description by hidden Markov model and generation of a strong artificial signal peptide for secreted protein expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002; 294(4): 835-42.
14. Curnis F, Gasparri A, Sacchi A, Longhi R, Corti A. Coupling tumor necrosis factor-alpha with alphaV integrin ligands improves its antineoplastic activity. *Cancer Research* 2004; 64(2): 565-71.
15. Dickerson EB, Akhtar N, Steinberg H, Wang ZY, Lindstrom MJ, Padilla ML, et al. Enhancement of the antiangiogenic activity of interleukin-12 by peptide targeted delivery of the cytokine to alphavbeta3 integrin. *Molecular Cancer Research (MCR)* 2004; 2(12): 663-73.

Design Methods of Cell Adhesion Proteins Based on ELISA Usable in-vitro in Gene Therapy

Hosseini E¹, Hosseini SY², Hashempour T³, Fattahi MR⁴, Sadeghizadeh M^{1*}

¹Department of Molecular Genetics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, ²Department of Bacteriology and Virology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, ³Department of Medical Virology, Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Namazi Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, ⁴Gastroenterohepatology Research Center (GEHRC), Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 12 May 2016 Accepted: 4 Jul 2016

Abstract

Background & aim: One of the strategies to improve the therapeutic gene is targeting gene therapy. A method which can be considered, is adding code sequences peptide or protein with high tendency to target cells and secreting the therapeutic gene encodes a protein. However, evaluating the effectiveness of such changes in the targeted cell binding protein gene product with the usual therapeutic methods produced in prokaryotic system is directly impossible. The purpose of this study was to evaluate the design methods of cell adhesion proteins based on ELISA usable in-vitro in gene therapy.

Methods: In order to target the therapeutic gene Mda-7 by using genetic engineering, peptide coding sequence RGD4C with the tendency to cancerous cell surface integrin were inserted shortly after the artificial signal peptide sequence and the N-terminal coding region of the protein. Then, the modified and unmodified cDNA eukaryotic expression vector pCDNA3.1 were matched. Vectors were transfected in HEK-293 cell line. Then Mda-7 secreted expression levels were measured in cell culture by ELISA. After adjusting the protein concentration of Mda-7 and RGD.Mda-7, in cells transfected media, they were used as a source of protein. Reduce the concentration of these genes was assessed two hours after exposure to the integrin cell lines with HepG2, M21 and lacking integrin Saos-2 were also determined by ELISA. The present study was conducted three times independently. Data were analyzed using t-test.

Results: Statistical analysis of the results suggested that the gene product of the gene product RGD.Mda-7 and Mda-7 to connect to HepG2 cells and M21 were more likely to have integrin. While binding to the cell lines of Saos-2, no significant difference were observed.

Conclusions: It seems the present ELISA based method was a suitable strategy for cell attachment assay in gene therapy research.

Key word: Cell adhesion assays, ELISA, RGD.Mda-7 · RGD

Corresponding author: Sadeghizadeh M, Department of Molecular Genetics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: sadeghma@modares.ac.ir

Please cite this article as follows:

Hosseini E, Hosseini SY, Hashempour T, Fattahi MR, Sadeghizadeh M. Design Methods of Cell Adhesion Proteins Based on ELISA Usable in-vitro in Gene Therapy. Armaghane-danesh 2016; 21 (4): 372-381.