



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی استان اصفهان  
دانشکده داروسازی و علوم دارویی

«گروه بیوتکنولوژی»  
پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

طرح تحقیقاتی شماره 393322

عنوان :

ساخت سازه ی باکولوویروسی بیان کننده ی  
زیر واحد A1 شیگاتوکسین تحت کنترل  
پروموتور آلفافیتوپروتئین به منظور درمان  
هدفمند هیپاتوسلولار کارسینوما

به راهنمایی :

دکتر علی جهانیان نجف آبادی  
دکتر عباس جعفریان دهکردی

توسط :

شقایق حیدرپور

زمستان 1394

خلاصه فارسی

# ساخت سازه ی باکولوویروسی بیان کننده ی زیر واحد A1 شیگاتوکسین تحت کنترل پروموتور آلفا فیتوپروتئین به منظور درمان هدفمند هپاتوسلولار کارسینوما

دکتر علی جهانیان نجف آبادی، دکتر عباس جعفریان دهکردی، شقایق  
حیدرپور

## مقدمه :

هپاتوسلولار کارسینوما (HCC) پنجمین سرطان رایج در جهان می باشد که با مرگ و میر بالایی روبه رو است. شیمی درمانی، پرتو درمانی و پیوند کبد راه های درمانی هستند که تا کنون با موفقیت چندانی روبه رو نبوده اند. ژن درمانی بعنوان روشی جدید جهت درمان HCC بیان شده است. از آنجا که یکی از راهکارهای درمانی بیان یک ژن کد کننده سم کشنده سلولی تحت کنترل یک پروموتور اختصاصی تومور می باشد در مطالعه حاضر اقدام به بررسی امکان ژن درمانی کشنده سلول های سرطانی هپاتوسلولار کارسینوما توسط کنترل بیان ژن سم A1 شیگاتوکسین تحت کنترل پروموتور اختصاصی تومورهای هپاتوسلولار کارسینوما نمودیم.

## روش کار:

ابتدا توالی آلفافیتوپروتئین سنتز و در پلاسمید pUltra-Bac1 کلون گردید. ژن زیر واحد A1 شیگاتوکسین نیز کلون گردید و ساخت باکمید نو ترکیب نیز طبق کیت Bac-to-Bac انجام شد. ترانسفکشن سلول های Sf9 با استفاده از سلفکتین II جهت وارد

کردن باکمیدهای نوترکیب انجام و درنهایت تیتراسیون ویروسی صورت گرفت. توالی کد کننده A202 و A254 در پلاسمید نوترکیب pUltra-AFP با استفاده از آنزیم های برش دهنده *XhoI* و *NcoI* کلون گردید. باکتری نوترکیب DH10-Bac با استفاده از انتخاب کلونی های سفید بزرگ تشکیل شده بر روی پلیت LB آگار جداسازی گردید و به سلول های *Sf9* ترانسفکت گردید و اطمینان از انجام ترانسفکشن با مشاهده سلول ها و بررسی ظهور اثرات سایتوپاتیک انجام گردید.

### نتیجه گیری:

الکتروفورز قطعات حاصل از برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pUltra-AFP- با قطعاتی با اندازه 4888 و 289 جفت باز را نشان داد که تایید کننده صحت انجام کلونینگ بود. همچنین از برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب حاوی توالی های A202 و A254 باندهایی با اندازه 5000 جفت باز مربوط به پلاسمید نوترکیب pUltra-AFP و 600 و 700 جفت باز برای A202 و A254 به دست آمد که تایید کننده صحت کلونینگ بود و نهایتاً تعیین توالی DNA صحت کلونینگ را اثبات کرد. سپس با استفاده از دستورالعمل کیت Bac-to-Bac ، DNA ویروسی نوترکیب ساخته شد و توسط انتخاب کلونی های سفید و نیز PCR با استفاده از پرایمرهای M13 جهت ساخت DNA ویروسی تایید گردید.

ترانسفکت باکمیدهای نوترکیب به سلول های *Sf9* انجام شد و صحت ترانسفکشن با بررسی اثرات سایتوپاتیک مورد تایید قرار گرفت و در نهایت اثر سه غلظت 10،20 و 40 آن ها بر روی سلول های HepG2 و HeLa با استفاده از تکنیک MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز آماری داده های حاصل از تست MTT نشان دهنده

اختلاف معنی دار بین سلول های HeLa و HepG2 تیمار شده با ویروس های نوترکیب بود.

### **بحث:**

همانطور که در قسمت های قبل گفته شد، ما توانستیم به طور موفقیت آمیزی یک باکمید نوترکیب با استفاده از سیستم Bac-to-Bac بیانی باکولوویروس بسازیم که بجای ساخت پروتئین نوترکیب در سلول های حشره، دارای توانایی بیان پروتئین تحت کنترل پروموتور آلفافیتوپروتئین در سلول های مبتلا به HCC می باشند. بنابراین این ویروس های DNA دار که توانایی ترانسدیوس کردن به سلول ها را داشته اما قادر به عفونت زایی نیستند، می توانند جهت انتقال و بیان انتخابی زیرواحد A1 شیگاتوکسین در سلول های توموری درخودکشی ژن درمانی استفاده گردند.

**واژه های کلیدی:** هپاتوسلولار کارسینوما، ژن درمانی، آلفافیتوپروتئین، شیگاتوکسین.

## فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
أ	فهرست مطالب.....
ه	فهرست جداول.....
ز	فهرست اشكال.....
ط	فهرست نمودارها.....
1	خلاصه فارسی.....

### فصل اول: مقدمه و هدف

3.....	1-1 : سرطان
4.....	1-1-2: مکانیسم بروز سرطان
4.....	1-2: سرطان کبد
5.....	1-2-1: درمان سرطان کبد
5.....	1-3: ژن درمانی
6.....	1-4: tumor-specific promoter
7.....	1-5: آلفا فیتو پروتئین
8.....	1-6: وکتورهای مورد استفاده در ژن درمانی
8.....	1-6-1: وکتورهای غیر ویروسی
9.....	1-6-2: وکتورهای ویروسی
10.....	1-6-2-1: آدنوویروس
11.....	1-6-2-2: رتروویروس
11.....	1-6-2-3: لنتی ویروس
12.....	1-6-2-4: باکلوویروس
13.....	1-7: اگزوتوکسین ها
14.....	1-8: اهداف و فرضیات

---

---

**فصل دوم: مواد، دستگاه ها و روش ها**

- 17-2: مواد مورد استفاده در این پژوهش..... 17
- 18-2-2: دستگاه های مورد استفاده در این پژوهش ..... 18
- 19-2-3: تهیه محیط کشت و محلول های مورد نیاز ..... 19
- 19-2-3-1: بافر 5X TBE ..... 19
- 19-2-3-2: بافر نمونه (6X loading buffer) ..... 19
- 19-2-3-3: تهیه محلول MTT ..... 19
- 19-2-4: محیط های کشت ..... 19
- 19-2-4-1: محیط کشت LB مایع ..... 19
- 20-2-4-2: محیط کشت LB جامد ..... 20
- 20-2-5: روش ها ..... 20
- 20-2-5-1: تهیه ی سلول های پذیرا ..... 20
- 20-2-5-2: انتقال پلاسمید به سلولهای پذیرا (Transformation) ..... 20
- 21-2-5-3: استخراج پلاسمید ..... 21
- 22-2-5-4: الکتروفورز روی ژل آگاروز ..... 22
- 23-2-5-5: استخراج قطعات DNA از ژل آگاروز ..... 23
- 24-2-5-6: کلونینگ ..... 24
- 25-2-5-6-1: برش و آماده سازی پلاسمید pUltra-Bac ..... 25
- 25-2-5-6-2: برش آنزیمی و جداسازی قطعه AFP از پلاسمید PGH ..... 25
- 26-2-5-6-3: کلونینگ قطعه AFP در پلاسمید pUltra-Bac ..... 26
- 26-2-5-6-4: برش آنزیمی و جداسازی قطعه A254 از پلاسمید pFast-Bac-A254 ..... 26
- 27-2-5-5-5: برش آنزیمی و آماده سازی پلاسمید نو ترکیب pUltra-AFP ..... 27
- 27-2-5-6-6: کلونینگ قطعه A254 در پلاسمید pUltra-AFP ..... 27
- 28-2-5-6-6: کلونینگ قطعه A254 در پلاسمید pUltra-AFP ..... 28

2-5-6-7	: بررسی صحت پلاسمید نوترکیب pUltra-AFP-A254 برش
29	آنزیمی .....
2-5-6-8	: برش آنزیمی و جداسازی قطعه A202 از پلاسمید
29	pFastBac- A202 .....
2-5-6-9	: کلونینگ قطعه A202 در پلاسمید pUltra-AFP ..
2-5-6-10	: بررسی صحت پلاسمید نوترکیب pUltra-AFP- A202
30	توسط برش آنزیمی .....
2-5-6-11	: تایید صحت پلاسمیدهای نوترکیب .....
2-5-8	: ساخت DNA ویروسی .....
2-5-8-1	: آماده سازی DNA نوترکیب باکولوویروسی ..
2-5-8-2	: تهیه سلولهای پذیرای <i>E.coli</i> DH10 Bac .....
2-5-8-3	: انتقال پلاسمیدهای نوترکیب به سلولهای پذیرای
33	نوع <i>E.coli</i> DH10 Bac (Transformation) .....
2-5-8-4	: تایید مجدد باکمیدهای نوترکیب از طریق کلونی
34	PCR .....
2-5-9	: ساخت ویروس نوترکیب .....
2-5-9-1	: کشت سلولهای حشره .....
2-5-9-2	: ترانسفکشن سلولهای حشره .....
2-5-9-3	: جداسازی، تقویت و تعیین تیتراسیون ذرات
37	ویروسی .....
2-5-9-4	: کشت سلول های انسانی HepG2 و Hela .....
2-5-9-5	: واکشت سلول های HepG2 و HeLa .....
2-5-9-6	: ارزیابی اثر کشندگی سلولی ویروس های
40	نوترکیب بر سلول های HepG2 و HeLa با روش MTT ..
2-5-10	: آنالیز آماری .....
<b>فصل سوم: نتایج</b>	
3-1	: کلونینگ .....

---

3-1-1: کلونینگ و جایگزینی توالی AFP در پلاسمید	
pUltraBac	42
3-1-2: کلونینگ توالی A254 در پلاسمید نوترکیب pUltra-	
AFP	43
3-1-9: کلونینگ توالی A202 در پلاسمید نوترکیب pUltra-	
AFP	44
3-2: ساخت DNA ویروسی	45
3-2-1: انتقال پلازمیدهای نوترکیب به سلول های پذیرای	
نوع <i>E.coli</i> DH10Bac	45
3-2-2: تایید نهایی باکمیدهای نوترکیب از طریق PCR	
	46
3-3: ساخت ویروس نوترکیب	48
3-3-1: ترانسفکشن سلول های <i>Sf9</i> با باکمیدهای نوترکیب	
	48
3-3-2: اثر سایتوتوکسیک ویروس های نوترکیب بر رده های	
سلولی	49
<b>فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری</b>	
4-1: بحث	54
4-2- نتیجه گیری	62
4-3- پیشنهادات	62
منابع	63
خلاصه انگلیسی	70
ضمائم	72



## فهرست جدا اول

عنوان

صفحه

جدول 1-1: مقایسه معایب و مزایای حامل های ویروسی و غیرویروسی.....	9
جدول 1-2: معایب و مزایای حامل های ویروسی.....	10
جدول 1-3: مزایا و معایب وکتور آدنوویروسی.....	10
جدول 1-4: مزایا و معایب وکتور رتروویروسی.....	11
جدول 1-5: مزایا و معایب وکتور لنتی ویروسی.....	11
جدول 1-2. لیست مواد مورد استفاده در این مطالعه به همراه شرکت و کشور سازنده.....	17
جدول 2-2: دستگاه های به کار رفته در مطالعه به همراه مدل ، کارخانه و کشور سازنده.....	18
جدول 2-3: مواد مخلوط شده جهت انجام برش آنزیمی پلاسمید pUltra-Bac و مقادیر آنها.....	25
جدول 2-4: مواد مخلوط شده جهت انجام برش آنزیمی قطعه AFP از پلاسمید PGH و مقادیر آنها.....	26
جدول 2-5: مخلوط ligation به منظور الحاق ژن AFP در پلاسمید pUltra-Bac.....	27
جدول 2-6: مواد مخلوط شده جهت انجام برش آنزیمی قطعه A254 از پلاسمید pFast-Bac- A254 و مقادیر آنها.....	27
جدول 2-7: مواد مخلوط شده جهت انجام برش آنزیمی پلاسمید p-Ultra-AFP و مقادیر آنها.....	28
جدول 2-8: مخلوط ligation به منظور الحاق ژن A254 در پلاسمید pUltra-AFP.....	28
جدول 2-9: مواد مخلوط شده جهت انجام برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pUltra-AFP-A254 و مقادیر آنها.....	29

---

---

جدول 10-2: مواد مخلوط شده جهت انجام برش آنزیمی قطعه A202 از پلاسمید pFastBac-A202 و مقادیر آنها	29.....
جدول 11-2: مخلوط ligation به منظور الحاق ژن A202 در پلاسمید pUltra-AFP	30.....
جدول 12-2: مواد مخلوط شده جهت انجام برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pUltra-AFP-A202 و مقادیر آنها	31.....
جدول 13-2: مواد و مقادیر مورد استفاده از آنها در انجام کلونی PCR	35.....
جدول 14-2: توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای بکاررفته در انجام کلونی PCR تاییدکننده ادغام ژنی در باکمید	35
جدول 15-2: علایم سایتوپاتیک که در صورت ترانسفکشن موفق DNA باکمیدی به داخل سلولهای Sf9 بروز می‌کند	37.

---

---

فهرست اشکال

عنوان  
صفحه

- شکل 1-2: شکل شماتیک مراحل ساخت سازه های ژن درمانی در مطالعه حاضر ..... 20
- شکل 2-2: دیاگرام مارکر DNA استاندارد بکار رفته در الکتروفورز آگاروز..... 23
- شکل 2-3: نقشه پلاسمید pUltra-Bac ..... 24
- شکل 2-4: شکل شماتیک مراحل Bac-to-Bac ..... 34
- شکل 2-5: توالی pFast-Bac ترانسپوز شده..... 38
- شکل 1-3: قطعات حاصل از برش آنزیمی ران شده روی ژل آگاروز..... 43
- شکل 2-3: تایید صحت کلونینگ پلاسمید نوترکیب با استفاده از برش آنزیمی..... 43
- شکل 3-3: تایید صحت کلونینگ پلاسمید نوترکیب به وسیله برش آنزیمی..... 44
- شکل 3-4: تایید صحت کلونینگ پلاسمید نوترکیب pUltra-AFP و توالی کد کننده A202 با استفاده از برش آنزیمی.. 45
- شکل 5-3 : انتخاب آبی و سفید سلول های DH10Bac حاوی باکمیدهای نوترکیب..... 45
- شکل 3-6: الحاق صحیح توالی ژنی pUltra-AFP در DNA باکمیدی باکتری DH10Bac با استفاده از PCR..... 46
- شکل 3-7: الحاق صحیح توالی ژنی pUltra-AFP-A254 در DNA باکمیدی باکتری DH10Bac با استفاده از pcr..... 47
- شکل 3-8: الحاق صحیح توالی ژنی pUltra-AFP-A202 در DNA باکمیدی باکتری DH10Bac است..... 47

- 
- شکل 9-3: عکس میکروسکوپی از سلول های حشره Sf9 به صورت تک لایه..... 48
- شکل 10-3: ظاهر اثرات سایتوپاتیک..... 49
- شکل 1-4: ساختمان شیگاتوکسین: زیرواحد A و زیرواحد پنتامری B..... 59
- شکل 2-4: مسیر ورود شیگاتوکسین به داخل سلول..... 60

---

---

فهرست نمودارها

عنوان  
صفحه

نمودار 1-3: ارزیابی اثرات ستیتوتوکسیک ویروس نوترکیب حاوی ژن A254 ، ویروس نوترکیب حاوی ژن A202 و ویروس نوترکیب فاقد ژن شیگاتوکسین روی رده سلولی HeLa...	51.....
نمودار 2-3: ارزیابی اثرات سایتوتوکسیک ویروس نوترکیب حاوی ژن A254 ، ویروس نوترکیب حاوی ژن A202 و ویروس نوترکیب فاقد ژن شیگاتوکسین روی رده سلولی HepG2.....	52.....
نمودار 3-3: مقایسه اثرات سایتوتوکسیک ویروس نوترکیب حاوی ژن A254 ، ویروس نوترکیب حاوی ژن A202 و ویروس نوترکیب فاقد ژن شیگاتوکسین روی دو رده سلولی HeLa و HepG2.....	53.....

## منابع

1. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24.
2. Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(12):5258-65.
3. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264-73. e1.
4. Li W, Li DM, Chen K, Chen Z, Zong Y, Yin H, et al. Development of a gene therapy strategy to target hepatocellular carcinoma based inhibition of protein phosphatase 2A using the alpha-fetoprotein promoter enhancer and pgk promoter: an in vitro and in vivo study. *BMC Cancer*. 2012;12:547.
5. Moroz P, Jones SK, Gray BN. Status of hyperthermia in the treatment of advanced liver cancer. *Journal of Surgical Oncology*. 2001;77(4):259-69.
6. Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Tateishi R, Fujishima T, et al. A randomized controlled trial of radiofrequency ablation with ethanol injection for small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2005;129(1):122-30.
7. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011;53(3):1020-2.
8. Cainap C, Qin S, Huang W-T, Chung IJ, Pan H, Cheng Y, et al. Linifanib versus Sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: results of a randomized phase III trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;JCO. 2013.54. 3298.
9. Wood LS. Managing the side effects of sorafenib and sunitinib. *Community Oncology*. 2006;9(3):558-62.
10. Villanueva A, Llovet JM. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2011;140(5):1410-26.
11. Qiao J, Doubrovin M, Sauter B, Huang Y, Guo Z, Balatoni J, et al. Tumor-specific transcriptional targeting of suicide gene therapy. *Gene Therapy*. 2002;9(3):168-75.

12. Gonzalez-Aseguinolaza G, Prieto J, Hernandez-Alcoceba R. Gene therapy of liver cancer: an update. *Journal africain du cancer/African Journal of Cancer*. 2011;3(3):180-92.
13. Springer CJ, Niculescu-Duvaz I. Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *The Journal of Clinical Investigation*. 2000;105(9):1161-7.
14. Pourzadegan F, Shariati L, Taghizadeh R, Khanahmad H, Mohammadi Z, Tabatabaiefar M. Using intron splicing trick for preferential gene expression in transduced cells: an approach for suicide Gene Therapy. *Cancer gene therapy*. 2016;23(1):7-12.
15. Shalev M, Kadmon D, TEH BS, BUTLER EB, Aguilar-Cordova E, Thompson TC, et al. Suicide gene therapy toxicity after multiple and repeat injections in patients with localized prostate cancer. *The Journal of Urology*. 2000;163(6):1747-50.
16. Nettelbeck DM, Jérôme V, Müller R. Gene therapy: designer promoters for tumour targeting. *Trends in Genetics*. 2000;16(4):174-81.
17. Chen L, Zheng J, Zhang Y, Yang L, Wang J, Ni J, et al. Tumor-specific expression of microRNA-26a suppresses human hepatocellular carcinoma growth via cyclin-dependent and-independent pathways. *Molecular Therapy*. 2011;19(8):1521-8.
18. Chen GG, Ho RL, Wong J, Lee KF, Lai PB. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of human alpha-fetoprotein (AFP) gene and its significance in hepatocellular carcinoma (HCC). *European Journal of Surgical Oncology : the Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2007;33(7):882-6.
19. Johnson PJ. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Clinics in Liver Disease*. 2001;5(1):145-59.
20. Peng SY, Chen WJ, Lai PL, Jeng YM, Sheu JC, Hsu HC. High  $\alpha$ -fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus

- 
- infection, age, p53 and  $\beta$ -catenin mutations. *International Journal of Cancer*. 2004;112(1):44-50.
21. Chen GG, Ho RL, Wong J, Lee KF, Lai PB. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of human alpha-fetoprotein (AFP) gene and its significance in hepatocellular carcinoma (HCC). *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2007;33(7):882-6.
  22. K, Ichikawa T. Recent topics on alpha-fetoprotein. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2013;43(8):820-5.
  23. Zhang KJ, Qian J, Wang SB, Yang Y. Targeting Gene-Viro-Therapy with AFP driving Apoptin gene shows potent antitumor effect in hepatocarcinoma. *Journal of Biomedical Science*. 2012;19:20.
  24. Choi I-K, Ko DH, Kim J, Yoo J-y, Yoon A-R, Kim M-J, et al. 1019. Enhanced Therapeutic Effects of Recombinant Adenovirus Ad-AFP $\Delta$ 19, Selectively Replicating in  $\alpha$ -Fetoprotein-Producing Human Liver Cancer Cells. *Molecular Therapy*. 2005;11:S394-S.
  25. Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Experimental Biology and Medicine*. 2001;226(5):377-408 .
  26. Liu F, Huang L. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *Journal of Controlled Release*. 2002;78(1):259-66.
  27. Thomas M, Klibanov A. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003;62(1):27-34.
  28. Takae S, Miyata K, Oba M, Ishii T, Nishiyama N, Itaka K, et al. PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive nonviral gene vectors. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(18):6001-9.
  29. Bader D, Riskin A, Vafsi O, Tamir A, Peskin B, Israel N, et al. Alpha-fetoprotein in the early neonatal period—a large study and review of the literature. *Clinica Chimica Acta*. 2004;349(1):15-23.



- 
30. Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 1998;80(1):35-47.
  31. Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol*. 2013;36(1):1-22.
  32. Brondyk WH. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods Enzymol*. 2009;463:131-47.
  33. van Oers MM. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *J Invertebr Pathol*. 2011;107 Suppl:S3-15.
  34. Kost TA, Condreay JP. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends in Biotechnology*. 2002;20(4):173-80.
  35. Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 2005;23(5):567-75.
  36. Ghosh S, Parvez MK, Banerjee K, Sarin SK, Hasnain SE. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2002;6(1):5-11.
  37. Hu YC. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta pharmacologica Sinica*. 2005;26(4):405-16.
  38. Guo R, Tian L, Han B, Xu H, Zhang M, Li B. Feasibility of a novel positive feedback effect of 131I-promoted Bac-Egr1-hNIS expression in malignant glioma via baculovirus. *Nuclear Medicine and Biology*. 2011;38(4):599-604.
  39. Wang CY, Wang S. Astrocytic expression of transgene in the rat brain mediated by baculovirus vectors containing an astrocyte-specific promoter. *Gene Therapy*. 2006;13(20):1447-56.
  40. Luz-Madrigal A, Clapp C, Aranda J, Vaca L. In vivo transcriptional targeting into the retinal vasculature using recombinant baculovirus carrying the human flt-1 promoter. *Virology Journal*. 2007;4:88.

41. Paul A, Jardin BA, Kulamarva A, Malhotra M, Elias CB, Prakash S. Recombinant baculovirus as a highly potent vector for gene therapy of human colorectal carcinoma: molecular cloning, expression, and in vitro characterization. *Molecular Biotechnology*. 2010;45(2):129-39.
42. Wang CY, Li F, Yang Y, Guo HY, Wu CX, Wang S. Recombinant baculovirus containing the diphtheria toxin A gene for malignant glioma therapy. *Cancer Research*. 2006;66(11):5798-806.
43. Blissard GW, Wenz JR. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *Journal of Virology*. 1992;66(11):6829-35.
44. Sandvig K. Shiga toxins. *Toxicon*. 2001;39(11):1629-35.
45. Johannes L, Römer W. Shiga toxins—from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(2):105-16.
46. Hartley MR, Lord JM. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1701(1-2):1-14.
47. Tesh VL. Induction of apoptosis by Shiga toxins. *Future Microbiol*. 2010;5(3):431-53.
48. Thorburn A, Thorburn J, Frankel AE. Induction of apoptosis by tumor cell-targeted toxins. *Apoptosis*. 2004;9(1):19-25.
49. Lord MJ, Jolliffe NA, Marsden CJ, Pateman CS, Smith DC, Spooner RA, et al. Ricin. Mechanisms of cytotoxicity. *Toxicol Rev*. 2003;22(1):53-64.
50. Haddad JE, al-Jaufy AY, Jackson MP. Minimum domain of the Shiga toxin A subunit required for enzymatic activity. *J Bacteriol*. 1993;175(16):4970-8
51. Engedal N, Skotland T, Torgersen ML, Sandvig K. Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. *Microb Biotechnol*. 2011;4(1):32-46.
52. Sandvig K, Van Deurs B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiological Reviews*. 1996;76(4):949-66.

- 
53. Sandvig K, Van Deurs B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiological Reviews*. 1996;76(4):949-66.
  54. Al-Jaufy AY, Haddad J, King S, McPhee R, Jackson M. Cytotoxicity of a shiga toxin A subunit-CD4 fusion protein to human immunodeficiency virus-infected cells. *Infection and Immunity*. 1994;62(3):956-60.
  55. Hofmann C, Sandig V, Jennings G, Rudolph M, Schlag P, Strauss M. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(22):10099-103.
  56. Park S-W, Lee H-K, Kim T-G, Yoon S-K, Paik S-Y. Hepatocyte-specific gene expression by baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;289(2):444-50.
  57. Kanai F, Shiratori Y, Yoshida Y, Wakimoto H, Hamada H, Kanegae Y, et al. Gene therapy for  $\alpha$ -fetoprotein-producing human hepatoma cells by adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Hepatology*. 1996;23(6):1359-68.
  58. Nakaya H, Ishizu A, Ikeda H, Tahara M, Shindo J, Itoh R, et al. In vitro model of suicide gene therapy for alpha-fetoprotein-producing gastric cancer. *Anticancer Research*. 2002;23(5A):3795-800.
  59. Lai Y, Lin C, Chen S, Tai C. Tumor-specific suicide gene therapy for hepatocellular carcinoma by transcriptionally targeted retroviral replicating vectors. *Gene Therapy*. 2015;22(2):155-62.
  60. Qu L, Wang Y, Gong L, Zhu J, Gong R, Si J. Suicide gene therapy for hepatocellular carcinoma cells by survivin promoter-driven expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Oncology Reports*. 2013;29(4):1435-40.
  61. Jeong DK. The Suicide Gene Diphtheria Toxin A Based Therapy in Cancer Treatment. *Development and Reproduction*. 2012;16(3):155-68.
  62. Fujii J, Matsui T, Heatherly DP, Schlegel KH, Lobo PI, Yutsudo T, et al. Rapid apoptosis induced by Shiga toxin in HeLa cells. *Infect Immun*. 2003;71(5):2724-35.

- 
63. Gariepy J. The use of Shiga-like toxin 1 in cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2001;39(1-2):99-106.
  64. Oloomi M, Bouzari S, Imani M, Akhtarian N. Construction of a Baculovirus vector containing A subunit of Shiga toxin for protein delivery. *Iranian Journal of Microbiology.* 2013; 5(4):350.
  65. Jahanian-Najafabadi A, Bouzari S, Oloomi M, HABIBI ROUDKENAR M, Mayr LM. Attempts to express the A1-GMCSF immunotoxin in the baculovirus expression vector system. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2012;76(4):749-54.
  66. Reilly O, Miller DR, Luckow VA. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, W.H. Freeman and Co, NY, 1992, pp 304-305.

---

## **Production of recombinant baculovirus vector expressing shigatoxin A1 subunit under control of the alpha-fetoprotein promoter for gene therapy of hepatocellular carcinoma**

### **Introduction**

Hepatocellular carcinoma (HCC), the most frequent form of liver cancer in adults, is the fifth most common malignancy. Chemotherapy, radiation therapy and liver transplantation are the treatment options that have not much success. Recently, attempts to treat HCC by gene therapy have been reported. Alpha-fetoprotein (AFP) is a single chain glycoprotein and produces in the developing fetus by the yolk sac and the fetal liver. AFP gene transcription declines rapidly after birth. However, the expression of AFP is reactivated under some conditions, such as HCC and it can be used as a tumor specific promoter to be used in gene therapy for HCC. Shigatoxin is including bacterial toxins for use in the treatment of cancer cells. The Shiga toxins comprise a family of related protein toxins secreted by *Shigelladysenteriae* and can stop protein synthesis in the cell. The aim of this study was to produce a recombinant baculovirus vector containing A1 shiga toxin subunit under the control of AFP promoter.

### **Method**

The sequence of Alpha-feto protein promoter was synthesized and subcloned in pUltraBac-1 plasmid and then the shigatoxin A1 subunit gene was cloned and production of Bacmid plasmid was performed according to the manufacturer's Bac-to-Bac system protocol. Transfection of the Sf9 cells was performed using Cellfectin II in order to enter the obtained recombinant bacmids and finally viral titers were determined. Cloning of the AT254 and AT202 fragment coding sequences into the recombinant pUltAFP plasmid were confirmed with *NcoI* and *XhoI* double digestion. Recombinant DH10Bac bacteria were screened on LB-agar plates as large white colonies and transfected Sf9 cells were selected on the basis of cytopathic effects comparing to the negative non-transfected controls.

---

## Result

Cloning of the AFP fragment into the backbone of the pUltraBac plasmid was confirmed by double digestion with *KpnI* and *EcoRI* enzymes by releasing a fragment of about 289 bp corresponding to the AFP promoter sequence and a fragment of about 4888 bp related to the pUltraBac plasmid backbone. This plasmid was designated as pUltAFP. Cloning of the AT254 and AT202 coding sequence into the recombinant pUltAFP plasmid were confirmed with *NcoI* and *XhoI* double digestion by releasing three fragments of about 600bp, 700bp and 5200 bp corresponding to the AT202, AT254 and pUltAFP fragments, respectively. Finally, DNA sequencing has confirmed the fidelity of these clonings.

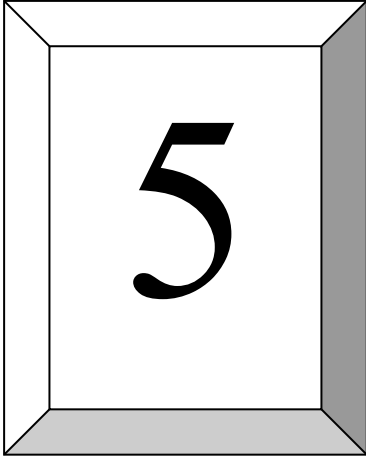
Recombinant DH10Bac bacteria were screened on the selective LB-agar plates (refer to materials and methods) as large white colonies, and finally the correctness of the transpositions and recombinant bacmids was confirmed by PCR using M13 forward and reverse primers.

Sf9 cells were transfected by the recombinant bacmids and transfected wells were selected on the basis of cytopathic effects comparing to the negative non-transfected controls. Finally its effect on human cells, Hela and Hepg2, was evaluated by MTT technique.

## Discussion

As it has been described here, we successfully constructed a new donor plasmid for the Bac-to-Bac baculovirus expression system, which instead of expressing high level recombinant proteins in insect cell lines, is capable of expressing recombinant proteins in hepatocellular carcinoma cells under the control of alpha-feto protein promoter. Therefore, such non-mammalian-origin DNA viruses which previously have been shown to transduce but not infect some mammalian cell lines, could be used for delivery and selective expression of shigatoxin A1 subunit in the tumor cells for selective suicide gene therapy.

**Key words:** Hepatocellular carcinoma, Gene therapy, Alpha-fetoprotein, Shiga toxin



5-ضمائم

1-5: ضمیمه 1

### **Baculovirus Titer Determination By Limiting Dilution Method**

- 1- Set up a 96 well dish with cells in all wells except column 1 (A1, B1, C1 etc). Put 20,000 cells in 200 ul of media into each of the other wells (A2 - A12, B2 - B12, etc).
- 2- Make serial dilutions in column 1 of the 96 well dish (A1 = 1/10, B1 1/100, C1 1/1000, etc) as follows. Put 110 ul media in wells A1 - H1. Put 12.2 ul of the virus into A1 and then transfer 12.2 ul of each well to the well below to make the serial dilution. Thus 12.2 ul of A1 goes into B1, then 12.2 ul of B1 goes into C1, 12.2 ul of C1 goes into D1 etc.) Mix by pipetting up and down several times and change the tip between each dilution.
- 3- After making the dilutions, starting with row H, take 10 ul from H1 and add it to H2, then take another 10 ul from H1 to H3, 10 ul from H1 to H4 etc up to H11 (thus all of the wells in row H have the same dilution). Leave H12 uninfected as a control. You can use the same tip for the whole plate providing you start at row H and work up, as you are going from the most dilute fractions to the least dilute.

---

Continue working up the plate (G1 to G2, G1 to G3, G1 to G4, etc). Don't forget to leave column 12 of each row as an uninfected control.

- 4- After 10 -14 days, read the plate by seeing which wells are infected - check the whole well, as sometimes only a corner is infected. Infected cells are either lysed or evident by their enlarged nuclei. This can sometimes be subtle, as dividing cells may have enlarged nuclei and older plates (closer to 14 days) may have some lysed cells. Use the controls for comparison, and only score wells you are sure are infected.
- 5- Put the results into the Excel spreadsheet program in cells B6 though B9 and your titer will be calculated in pfu/ml and appear in cell B20. In most cases you can use the dilutions shown in the program, corresponding to rows E, F G and H. If you have a low titer you may need to adjust the values of the dilutions on the spreadsheet, as only rows A and B might be infected, for example. Also, if you have an extremely high titer, you might need to redo the plate starting in A1 with a 1/100 dilution, and adjust the dilutions on the spreadsheet accordingly (66).



5-: ضمیمه 1

**Baculovirus Titer Determination By Limiting Dilution Method**

- 1- Set up a 96 well dish with cells in all wells except column 1 (A1, B1, C1 etc). Put 20,000 cells in 200 ul of media into each of the other wells (A2 - A12, B2 - B12, etc).
- 2- Make serial dilutions in column 1 of the 96 well dish (A1 = 1/10, B1 1/100, C1 1/1000, etc) as follows. Put 110 ul media in wells A1 - H1. Put 12.2 ul of the virus into A1 and then transfer 12.2 ul of each well to the well below to make the serial dilution. Thus 12.2 ul of A1 goes into B1, then 12.2 ul of B1 goes into C1, 12.2 ul of C1 goes into D1 etc.) Mix by pipetting up and down several times and change the tip between each dilution.
- 3- After making the dilutions, starting with row H, take 10 ul from H1 and add it to H2, then take another 10 ul from H1 to H3, 10 ul from H1 to H4 etc up to H11 (thus all of the wells in row H have the same dilution). Leave H12 uninfected as a control. You can use the same tip for the whole plate providing you start at row H and work up, as you are going from the most dilute fractions to the least dilute. Continue working up the plate (G1 to G2, G1 to G3, G1 to G4, etc). Don't forget to leave column 12 of each row as an uninfected control.
- 4- After 10 -14 days, read the plate by seeing which wells are infected - check the whole well, as sometimes only a corner is infected. Infected cells are either lysed or evident by their enlarged nuclei. This can sometimes be subtle, as dividing cells may have enlarged nuclei and older plates (closer to 14 days) may have some lysed cells. Use the controls for comparison, and only score wells you are sure are infected.

- 5- Put the results into the Excel spreadsheet program in cells B6 through B9 and your titer will be calculated in pfu/ml and appear in cell B20. In most cases you can use the dilutions shown in the program, corresponding to rows E, F G and H. If you have a low titer you may need to adjust the values of the dilutions on the spreadsheet, as only rows A and B might be infected, for example. Also, if you have an extremely high titer, you might need to redo the plate starting in A1 with a 1/100 dilution, and adjust the dilutions on the spreadsheet accordingly (66).