

## ساخت کاست pcDNA/*fimH* به عنوان کاندید واکسن ژنی علیه عفونت ادراری و بررسی بیان آن در رده سلولی COS7

جلیل فلاح مهرآبادی<sup>۱</sup> PhD، نیما خرم‌آبادی<sup>۲</sup> PhD، مهدی مهدوی<sup>۳</sup> PhD، عباسعلی ایمانی فولادی<sup>\*</sup> PhD

\*مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله... (عج)، تهران، ایران  
۱مرکز تحقیقات کلیه و مجاری ادراری، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله... (عج)، تهران، ایران  
۲گروه باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
۳گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** مهم‌ترین عامل عفونت ادراری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن دارای پیلی تیپ یک است. *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن پس از تهاجم به سلول‌های اپی‌تلیال مثانه، به صورت داخل سلولی تکثیر می‌شود و حضور ایمنی سلولی در این‌جا مهم است. هدف از این مطالعه، ساخت یک کاست ژنی بود که بتواند سیستم ایمنی سلولی را تحریک نماید.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا ژن *fimH* را با PCR تکثیر شد و در وکتور یوکاریوتی pcDNA.1 کلون شد. پس از توالی‌یابی و تایید کلون، به منظور بررسی بیان ژن و عملکرد صحیح کاست تهیه‌شده در سلول یوکاریوتی، در سلول COS7 وارد شد و به منظور بیان ژن با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. بیان ژن در سطح mRNA با میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد.

**یافته‌ها:** ژن *fimH* با روش PCR به خوبی تکثیر شد. محصول PCR در وکتور pcDNA.1 قرار گرفت و کاست ژنی pcDNA/*fimH* ساخته شد. برای بررسی عملکرد صحیح این کاست سلول‌های COS7 ترانسفکت شدند و بیان ژن *fimH* با روش RT-PCR مورد تایید قرار گرفت.

**نتیجه‌گیری:** کاست ژنی pcDNA/*fimH* می‌تواند ژن *fimH* را در سلول یوکاریوتی بیان کند و به عنوان یک کاست DNA ارزشمند جهت واکسیناسیون بر ضد عفونت‌های ادراری است.

**کلیدواژه‌ها:** پیلی تیپ I، *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن، واکسن ژنی، FimH

## Construction of pcDNA/*fimH* cassette as a DNA vaccine candidate against urinary tract infection and evaluate its expression in COS7 cell line

Fallah Mehrabadi J.<sup>1</sup> PhD, Khorramabadi N.<sup>2</sup> PhD, Mahdavi M.<sup>3</sup> PhD, Imani Fooladi A. A.\* PhD

\*Research Centers of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran  
<sup>1</sup>Research Center of Nephrology & Urology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran  
<sup>2</sup>Department of Bacteriology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
<sup>3</sup>Department of Immunology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

### Abstract

**Aims:** The most important cause of urinary tract infection is Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) which produces type I pili. UPEC has intracellular duplication after invasion to bladder epithelial cells; therefore, cellular immunity is important in this case. This study was performed in order to design a gene cassette inducing cellular immune system against Uropathogenic *Escherichia coli*.

**Materials & Methods:** At first, *fimH* gene was amplified by PCR. PCR product was inserted to pcDNA.1 eukaryotic expression vector and the recombinant vector was confirmed by sequencing. The clone was inserted into COS7 cell and then assessed by RT-PCR in order to evaluate gene expression and the correct function of the gene cassette. Gene expression at mRNA level was evaluated by fluorescence microscope.

**Results:** *fimH* gene was well amplified by PCR. PCR product was inserted to pcDNA.1 eukaryotic expression vector and pcDNA/*fimH* gene cassette was constructed. COS7 cells were transfected in order to evaluate the correct function of this cassette. Expression of *fimH* gene in COS7 was confirmed by RT-PCR.

**Conclusion:** pcDNA/*fimH* cassette could express inserted *fimH* gene in eukaryotic cells and is a valuable DNA cassette for urinary tract infection vaccination.

**Keywords:** Type I Pili, Uropathogenic *Escherichia Coli*, Genetic Vaccine, FimH

## مقدمه

عفونت دستگاه ادراری (UTI) یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در انسان است. این عفونت در بین زنان جوان شایع است، به طوری که ۲۰ تا ۳۰٪ زنان، به طور مکرر به این عفونت مبتلا می‌شوند. زمانی که پاتوژن‌های ادراری فقط نواحی تحتانی مجرای ادراری را درگیر می‌کنند، علائم سیستمیک به همراه سوزش ادرار ظاهر می‌شود. گاهی باکتری‌های مهاجم، از میزبان گذشته و وارد کلیه می‌شوند و با تکثیر در لگنچه کلیه و بافت پارانشیمی، ایجاد پیلونفریت می‌نمایند [۱].

مهم‌ترین عامل عفونت ادراری، *اشریشیاکلی* دارای پیلی تیپ یک است که اغلب تمایل به چسبیدن به نسج مخاطی واژن و مجاری ادراری دارد [۲]. *اشریشیاکلی یوروپاتوژن* (UPEC) پس از مهاجم به سلول‌های اپی‌تلیال مثانه، به صورت داخل سلولی تکثیر می‌یابد که این امر موجب پایداری باکتری در بافت مثانه می‌شود [۳]. مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین نوک‌پیلی (FimH) برای جذب باکتری به داخل سلول اپی‌تلیال مثانه ضروری است [۴]. یکی از راه‌های محدود نمودن و کاهش عفونت‌های حاد ادراری، تهیه واکسن علیه این عفونت‌هاست. از آن جایی که مرحله اتصال در کلونیزاسیون و به دنبال آن ایجاد عفونت بسیار مهم است، یکی از استراتژی‌های کاربردی، مهار اتصال باکتری است. از این رو تهیه واکسن حاوی آدهسین‌های سویه‌های UPEC مورد توجه است [۵، ۶]. در سال ۱۹۹۷، واکسنی که حاوی FimH بود، تهیه شد که آنتی‌بادی ضد آن از اتصال سویه‌های UPEC به کشت سلول‌های مثانه انسانی جلوگیری نمود و پس از ایمن‌سازی مدل حیوانی (موش)، کلونیزاسیون باکتری تا ۹۹٪ کاهش یافت و در ادرار آنها IgG-FimH قابل شناسایی بود [۷]. در سال ۲۰۰۶ سوک‌نیونگ و همکاران، پروتئین FimH را با CTXA2B و LTXA2B به صورت فیوژن تهیه کردند تا ایمنی‌زایی FimH را افزایش دهند و این پروتئین‌های ادغامی را به صورت دهانی به موش‌ها تلقیح نمودند [۸]. با توجه به تکثیر داخل سلولی UPEC ضرورت دارد واکسنی طراحی شود که پاسخ ایمنی سلولی را تحریک نماید.

بنابراین هدف از این تحقیق، ساخت یک کاست ژنی بود که توانایی تحریک سیستم ایمنی سلولی را داشته باشد.

## مواد و روش‌ها

**استخراج ژنوم باکتری و انجام PCR به منظور تخلیص ژن *fimH*:** باکتری *E. coli* 35218 که مولد پیلی تیپ I است، از بانک میکروب انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت BHI Broth کشت داده شد. سپس با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (Bioneer؛ کره جنوبی)، DNA ژنومی استخراج شد. توالی ژن *fimH* از بانک ژن گرفته شد. این ژن با شماره AY392527 در بانک ژن ثبت شده و ۹۰۳ bp طول دارد. سپس با استفاده از نرم‌افزار

gene runner، پرایمرهای مناسب طراحی شدند. توالی این پرایمرها عبارت بودند از:

TCCCGTTACAGGTCAGAGC پرایمر پیش‌رو

CCTGAAGCTAAAACCTGCAC پرایمر معکوس

از آنزیم DNA پلیمرز pfu در واکنش PCR استفاده شد.

**کلونینگ ژن *fimH* در وکتور کلونینگ و وکتور بیانی:** محصول حاصل از PCR اولیه در وکتور بیانی pBluescript که با آنزیم *EcoRV* برش داده شده بود، وارد شد. پس از انتقال وکتور به *E. coli* Top10F (به عنوان میزبان کلون)، باکتری کشت داده شد و بعد از ایجاد کلونی‌های سفید روی محیط آگاردار حاوی X-gal و IPTG، وکتور حاوی ژن مورد نظر به دست آمد و با انجام آزمایش توالی‌یابی، تایید شد. این پلاسمیدها با آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI* برش داده شده و قطعه ژنی مورد نظر از آنها خارج شد. پرایمرهایی که حاوی توالی سایت برش آنزیم‌های فوق بودند، طراحی شدند تا بتوان ژن *fimH* را طی PCR (که وکتور نوترکیب به عنوان الگو است)، تکثیر داده و آن را وارد وکتور بیانی pcDNA1 نمود. توالی این پرایمرها عبارت بودند از:

پیش‌رو:

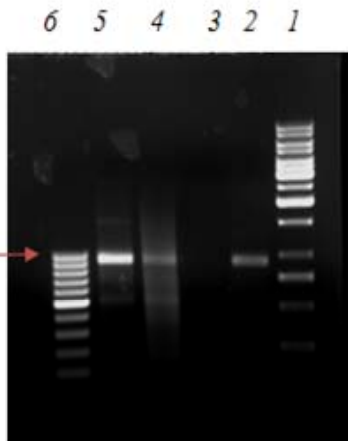
پرایمر  
CTGGATCCACCACCATGGTTGTAATGA  
TGT GAATTC TTTATTGATAAAC پرایمر معکوس:

در پرایمر پیش‌رو، سایت برش آنزیم *BamHI* و توالی کوزاک تعبیه شد. در پرایمر معکوس نیز سایت برش آنزیم *EcoRI* طراحی شد. ژن *fimH* پس از PCR در سایت برشی *BamHI* و *EcoRI* وکتور وارد شد. حضور ژن *fimH* در وکتور pcDNA.1 با آنزیم‌های فوق و توالی‌یابی، تایید شد.

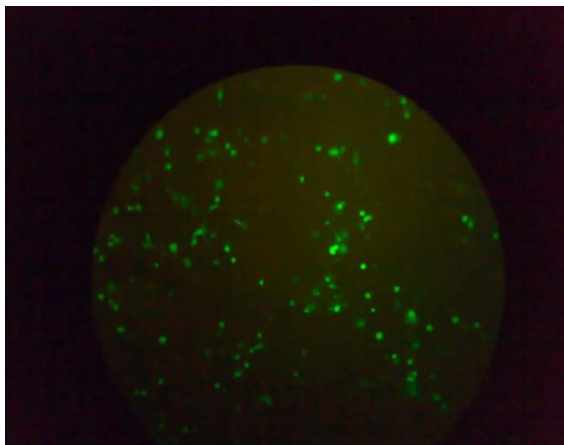
**انتقال وکتور بیانی نوترکیب به سلول COS7:** این وکتور نوترکیب به رده سلولی COS7 که از بانک سلول انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود، منتقل شد. با استفاده از پلیمر کاتیونی ExGen 500 (Fermentas؛ آلمان) انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول صورت پذیرفت. همچنین برای کنترل ترنسفکت شدن سلول‌ها از وکتور حاوی ژن GFP نیز استفاده شد. بیان ژن *fimH* در رده سلولی با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار، سلول COS7 در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FCS در پلیت عخانهای کشت داده شد. پس از آن که در هر خانه از پلیت، رشد سلول‌ها به حدود ۵۰٪ رسید (کانفلوانسی ۵۰٪)، یک میکروگرم وکتور نوترکیب با ۱۳ میکرولیتر پلیمر ExGen و ۵۰۰ میکرولیتر محلول NaCl ۱۵۰ میلی‌مولار مخلوط و به کشت سلول اضافه شد. همین مراحل برای وکتور حاوی ژن GFP نیز صورت پذیرفت.

**انجام RT-PCR و بررسی بیان ژن در سطح mRNA:** پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، سلول‌های تیمار شده با pcDNA/*fimH* با اضافه کردن یک میلی‌لیتر محلول RNx plus (شرکت سیناژن؛ ایران) از خانه‌های پلیت جمع‌آوری و طبق دستورالعمل کیت، مجموع

ساخت کاست *pcDNA/fimH* به عنوان کاندید واکسن ژنی علیه عفونت ادراری و بررسی بیان آن در رده سلولی COS7 ۲۰۵ می تواند دلیلی بر حضور تعداد بیشتر نسخه های ژن *fimH* در سلول باشد. این نتیجه نشان داد که کاست تهیه شده در سلول های یوکاریوتیک، عملکرد مناسب داشته و ژن *fimH* بیان شده است. شکل ۳ بیان GFP در سلول های COS7 را پس از ۴۸ ساعت ترنسفکت شدن نشان می دهد. این نتیجه موید صحت انجام مراحل ترنسفکت کردن سلول های COS7 بود. در ۲۴ ساعت اول ترنسفکت کردن سلول های COS7، هیچ کدام از آنها GFP را بیان نکرده بودند. همچنین نتایج زمان های ۴۸ و ۷۲ ساعت مشابه بودند (شکل ۳).



شکل ۲) نتایج RT-PCR سلول های ترنسفکت شده و نشده  
۱) ۱kb Ladder (۲) PCR کنترل مثبت که الگو در آن وکتور دارای ژن *fimH* است، (۳) RT-PCR روی سلول COS7 ترنسفکت نشده،  
۴) RT-PCR روی سلول COS7 ترنسفکت شده ۲۴ ساعته، (۵) RT-PCR روی سلول COS7 ترنسفکت شده ۴۸ ساعته، (۶) ۱۰۰bp Ladder

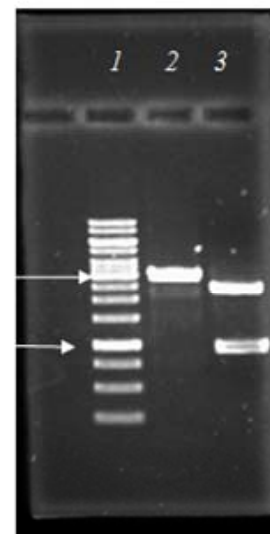


شکل ۳) سلول های COS7 ترنسفکت شده با وکتور حاوی ژن GFP پس از ۴۸ ساعت

کل RNA تخلیص شد. این مراحل برای سلول های COS7 که با وکتور تیمار نشده بودند نیز به عنوان کنترل منفی انجام شد. سپس با استفاده از کیت “Revert Aid First Strand cDNA Synthesis” (Fermentas؛ آلمان) از RNA سلول های ترنسفکت شده و نشده، cDNA تهیه شد و با پرایمرهای طراحی شده برای مرحله ساب کلونینگ، PCR انجام شد. همچنین سلول های تیمار شده با وکتور حاوی GFP، پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به منظور مطالعه بیان GFP با میکروسکوپ فلورسانس بررسی شدند.

## نتایج

پس از کلونینگ ژن *fimH* در وکتور بیانی با برش آنزیمی توسط آنزیم های استفاده شده در مرحله کلونینگ، کلون انجام شده مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱). پس از توالی یابی وکتور *pBluescript/fimH* توالی ژن *fimH* با سایر توالی های موجود این ژن در بانک ژن و با کمک نرم افزار MEGA4 همتراز شد. این ژن دارای تنوع توالی است و این یکی از دلایل تمایل متفاوت سویه های اشریشیاکلی به سلول های یوروپایی تلیال است. ژن *fimH* دارای ۶ نوکلئوتید اختلاف و در سطح آمینواسید دارای ۲ اختلاف با ژن *fimH* سویه یوروپاتوژن UTI89 (که ژنوم آن به طور کامل توالی یابی شده)، بود.



شکل ۱) نتایج آنزیمی روی وکتور نوترکیب حاوی ژن *fimH* به منظور تایید کلونینگ. (۱) Ladder، (۲) وکتور دارای ژن *fimH* است، (۳) ژن *fimH* که بعد از برش از داخل وکتور جدا شده است، به همراه وکتور برش خورده بدون ژن *fimH*

پس از آن که کاست ژنی *pcDNA/fimH* ساخته شد، صحت قالب خواندنی آن با توالی یابی تایید شد. شدت باند محصول PCR سلول هایی که RNA آنها پس از ۴۸ ساعت ترنسفکت شدن، تخلیص شده بودند، نسبت به سلول های ۲۴ ساعته بیشتر بود (شکل ۲) و این

## بحث

فاکتورهای زیادی در اکتساب و پیشرفت عفونت های ادراری ناشی از *E. coli* نقش دارند. به طور کلی کلونیزاسیون باکتری در سلول های اپی تلیوم مجاری ادراری به منظور شروع عفونت ضروری است [۹]. لذا

mRNA در لاین سلولی COS7 بیان شود و آماده استفاده برای ایمونیزاسیون در مدل حیوانی است.

### منابع

- 1- Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Kuskowski MA. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *E. coli* isolates from women with an acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):6064-72.
- 2- Langermann S, Ballou WR. Development of a recombinant FimCH vaccine for urinary tract infections. *Adv Exp Med Biol.* 2003;539(2):635-48.
- 3- Hooton TM. Recurrent urinary tract infection in women. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;3:259-68.
- 4- Thanassi DG, Hultgren SJ. Assembly of complex organelles: Pilus biogenesis in gram-negative bacteria as a model system. *Methods.* 2000;20(1):111-26.
- 5- Langermann S, Ballou WR. Vaccination utilizing the FimCH complex as a strategy to prevent *Escherichia coli* urinary tract infection. *J Infect Dis.* 2001;183(1):84-6.
- 6- Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establishment of a persistent *E. coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun.* 2001;69:4572-9.
- 7- Langermann S, Palaszynski S, Barnhart M, Auguste G, Pinkner JS, Burlin J. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science.* 1997;276(5312):533.
- 8- Suhk-Neung P, Yong-Hwa L. Recombinant DNA, plasmid, transformed microorganism and vaccine protein for prevention and therapy of urinary tract infection. USA: Patent 7001744; 2006.
- 9- Johnson RJ. Virulence factors in *E. coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev.* 1991;4:80-128.
- 10- Hopkins JW, Heisey MD, Uehling TD. Association of human leukocyte antigen phenotype with vaccine efficacy in patients receiving vaginal mucosal immunization for recurrent urinary tract infection. *Vaccine.* 1999;17:169-71.
- 11- Yong-Hwa L, Ryu DK, Kim BO, Pyo S. Expression and characterization of uropathogenic *Escherichia coli* adhesin protein linked to cholera toxin a2b subunit in *Escherichia coli* tb1. *J Microbiol Biotechnol.* 2003;13:552-9.
- 12- Reigstad S, Hultgren CH, Gordon IJ. Functional genomics studies of uropathogenic *E. coli* and host urothelial cells when intracellular bacterial communities are assembled. *J Biol Chem.* 2007;282:21259-67.
- 13- Sokurenko VE, Feldgarden M, Trintchina M, Weissman JS, Avagyan S. Selection footprint in the *fimH* adhesin shows pathoadaptive niche differentiation in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol.* 2004;21:1373-83.
- 14- Kozak M. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene.* 2002;299:1-34.

گسستن یا جلوگیری از اتصال به واسطه پیلای *E. coli* ممکن است منجر به پیشگیری یا درمان عفونت‌های ادراری شود [۵]. مطالعات متعددی درباره نقش پیلای در ایجاد عفونت‌های ادراری انجام شده است. هاپکینز و همکاران در سال ۱۹۹۹ از واکسن کشته‌شده *E. coli* و سایر باکتری‌های عامل عفونت ادراری استفاده کردند [۱۰]. لانگرمن و همکاران در سال‌های ۱۹۹۷ و ۲۰۰۰، مصونیت‌بخشی FimH را در مدل موشی سیستمی تا حد ۹۹٪ به اثبات رساندند [۷]. یانگ‌هوآ و همکاران در سال ۲۰۰۳ پروتئین نوترکیب برمبنای ساب‌یونیت CTX2B و *ویبریولکلا* و FimH را طراحی و بیان کردند [۱۱]. در تمامی مطالعات، تیترا آنتی‌بادی IgG به‌عنوان شاخص پاسخ ایمنی همورال اندازه‌گیری شد. اما ریگستاد و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند که باکتری *E. coli* یوروپاتوژنیک می‌تواند به‌صورت داخل سلولی درآید [۱۲]. لذا پاسخ ایمنی سلولی در جلوگیری از عود مجدد عفونت ادراری مهم خواهد بود. در این تحقیق واکسن DNA به‌منظور تحریک پاسخ ایمنی سلولی در مدل موشی طراحی شد.

در *E. coli* یوروپاتوژنیک، FimH شاخصه مهم اتصال به اپی‌تلیوم در عفونت ادراری است. لذا ژن *fimH* به‌عنوان ژن انتخابی در طراحی کاست ژنی *pcDNA/fimH* استفاده شد. در حقیقت، ساختارهای متنوعی از FimH وجود دارد که به سلول‌های یوروپایی تلیال متصل می‌شود [۱۳]. مثلاً FimH در *E. coli* 35218، فقط در یک اسیدآمین با *E. coli* UTI89 تفاوت دارد و این باعث تبدیل اسیدآمین آلانین به سرین شده است. توالی کوزاک برای شروع بیان ژن در سلول‌های یوکاریوتی بسیار مفید است [۱۴]. عمومی‌ترین و قابل‌قبول‌ترین توالی کوزاک، ACCACCATGG است، لذا این توالی در پرایمر پیش‌رو به‌منظور تکثیر ژن *fimH* در پروسه کلونینگ استفاده شد. در ژن *FimH* بعد از کدون شروع، کدون AAA قرار دارد. اگر ATG توالی کوزاک به‌عنوان کدون شروع استفاده می‌شد، باز G مربوط به توالی کوزاک، به‌جای باز A قرار گرفته و دومین کدون ژن *fimH* به‌جای AAA به GAA و نهایتاً لیزین (اسیدآمین بازی) به گلوتامیک‌اسید (اسیدآمین اسیدی) تبدیل می‌شد. لذا نباید از ATG توالی کوزاک به‌عنوان توالی شروع استفاده کرد و باید از توالی شروع‌کننده مربوط به ژن *fimH* در پرایمر پیش‌رو استفاده شود.

### نتیجه‌گیری

کاست ژنی *pcDNA/fimH* می‌تواند به‌راحتی و با موفقیت در سطح