

مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران

سال ۲ شماره های ۳ و ۴ پاییز و زمستان ۱۳۸۷، صفحات ۸-۱

طراحی و ساخت BCG نو ترکیب حاوی ژن سیتوزین دآمیناز به منظور ارتقاء کارایی BCG اینتراویکال در درمان سرطان مثانه

آیدا فیض برارنده^۱، حسین خان احمد^{۲*}، غلامحسین ابراهیمی پور^۱، محمد ابوالحسنی^۲،
حسام الدین موثق^۲، طیبه سهرابی^۲

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه شهید بهشتی
۲) بخش تحقیقات BCG، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران
نویسنده رابط: حسین خان احمد، بخش تحقیقات BCG، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران
همراه: ۰۹۱۳۱۲۱۴۰۳۱ hossein_khanahmad@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۳/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: سرطان مثانه دومین سرطان شایع دستگاه ادراری- تناسلی در جهان است. ایمونوتراپی با BCG درمان انتخابی این سرطان می باشد. روش دیگر، ژن درمانی سرطان مثانه با سیستم CD/5-FC (Cytosine Deaminase/5- Fluorocytosine) است. هدف از ساخت شاتل وکتور مایکوباکتریال، انتقال ژن سیتوزین دآمیناز (CD) به BCG با روش الکتروپوریشن بود تا با تبدیل 5-FC به 5-Fluorouracil (5-FU) توسط آنزیم CD، سلول های توموری بیشتری نابود شوند. **روش بررسی:** قطعات ژنی شاتل وکتور مایکوباکتریال شامل، پروموتور hsp60، توالی سیگنال آلفا آنتی ژن و ژن CD مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) پس از تکثیر با PCR و هضم آنزیمی و با استفاده از فناوری های کلونینگ در پلاسمید pBGGT و pVN2 به ترتیب کلون و ساب کلون شدند. پلاسمید نهائی با روش الکتروپوریشن به داخل BCG هدایت گردید و وجود آن در BCG بررسی شد.

یافته ها: نتایج تعیین توالی وکتور نهایی صحت آن را تأیید و وکتور pHARA نامگذاری شد. سلول هائی که pHARA را دریافت کردند پس از ۱۷ روز روی محیط میدل بروک H₁₀ ۷ حاوی غلظت نهائی ۲۰ µg/ml کانامایسین، کلنی تشکیل دادند. **نتیجه گیری:** BCG نو ترکیب فوق علاوه بر فراخوانی موضعی سیستم ایمنی، با تبدیل داروی 5-FC به 5-FU توسط آنزیم CD، می تواند سلول های توموری بیشتری را نابود نماید.

کلید واژه ها: BCG، سرطان مثانه، ایمونوتراپی، ژن درمانی، الکتروپوریشن

مقدمه:

تحقیق شاتل وکتور مایکوباکتریال بیانی- ترشحي حاوی پروموتور (hsp ۶۰) Heat Shok Protein (۱۲)، ژن CD و سیگنال ترشحي آلفا آنتی ژن مایکوباکتریوم (۱۳) طراحی و ساخته شد و با روش الکتروپوریشن به BCG منتقل گردید. بدین ترتیب سعی شده است تا برای اولین بار با ترکیب ایمونوترایی و ژن درمانی علاوه بر استفاده از خاصیت ادجوانتی BCG و تحریک پاسخ‌های ایمنی، از راهکار ژن درمانی آنزیم- پیش دارو در جهت نابودی هر چه بیشتر سلول‌های توموری مثانه استفاده گردد.

مواد و روش‌ها:

سویه های باکتری و مخمر، پرایمرها و وکتورها :

سویه‌های باکتری استفاده شده در این تحقیق عبارتند از: سویه *Saccharomyces* ، *E. coli* Top10F¹ Code: BEC 009 *cerevisiae* INVSc1 Code: YSC 006 دریافت شده از بانک پلاسمید و میزبان انستیتو پاستور و *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2 دریافت شده از بخش BCG انستیتو پاستور. پرایمرهای مورد استفاده به منظور جداسازی و تکثیر ژن‌های مورد نظر از ژنوم BCG و تکثیر سازه ژنتیکی حاوی پروموتور hsp ۶۰، سیگنال ترشحي آلفا آنتی ژن و ژن CD از وکتور pBGGT در جدول ۱ خلاصه شده است. این پرایمرها با استفاده از نرم افزار Gene Runner و توالی ژن‌های مورد نظر در NCBI طراحی گردید. به منظور کلونینگ این قطعات در Multiple Cloning Site (MCS) و وکتور pBGGT، از سایت‌های آنزیمی موجود در MCS این وکتور در انتهای ۵' پرایمرها استفاده شد. وکتورهای مورد استفاده عبارتند از: وکتور pBGGT تهیه شده از بانک پلاسمید انستیتو پاستور ایران، pTZ57T/A شرکت Fermentas و وکتور pVN2 از انستیتو پاستور پاریس.

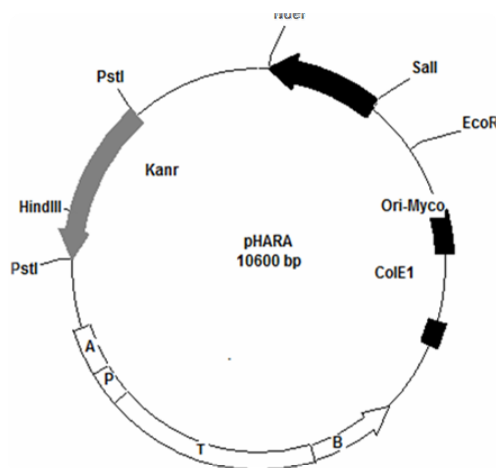
استخراج DNA ژنومیک BCG ، *S. cerevisiae* و پلاسمید: جهت استخراج DNA ژنومیک BCG از ۲۰۰ mg کیک تازه BCG استفاده گردید. پس از ورتکس شدید کیک BCG با گلوله‌های شیشه‌ای و سانتریفوژ در دور ۸۰۰۰ rpm ، رسوب باقی مانده در آب دوبار تقطیر به صورت تعلیق در آمده و به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید و مجدداً در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در مراحل بعدی جهت لیزبakterی از بافر لیز و برای جداسازی DNA و رسوب پروتئین‌ها

سرطان مثانه دومین سرطان شایع دستگاه ادراری- تناسلی در جهان است (۱). ۷۰ تا ۸۰٪ سرطان‌های مثانه تحت عنوان سرطان سطحی مثانه (Superficial Bladder Cancer) طبقه بندی می‌شوند (۲). اولین روش برای درمان سرطان سطحی مثانه، برش تومور از طریق مجرای ادراری یا TUR (Transurethral Resection) است. از دیگر روش‌ها، درمان اینتراوزیکال می‌باشد که به صورت تجویز مستقیم دارو شامل ترکیبات شیمی درمانی یا Bacillus of Calmette and Guérin (BCG) به داخل مثانه است (۳). درمان اینتراوزیکال با BCG یا ایمونوترایی، درمان انتخابی کارسینومای درجا (Carcinoma in situ) برای سرطان سطحی مثانه به شمار می‌رود (۴). BCG به عنوان تغییر دهنده پاسخ بیولوژیک، سیستم ایمنی بدن را به سوی پاسخ ایمنی T helper 1 (Th1) و مهار تومور هدایت می‌نماید. لذا، وجود یک سیستم ایمنی سالم و کامل برای اثرات ضد توموری BCG حائز اهمیت می‌باشد (۵). ژن درمانی از دیگر روش‌هایی است که برای درمان سرطان مثانه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶). از میان روش‌های اخیر، راهکار آنزیم - پیش دارو با نابودی انتخابی سلول‌های توموری، حداقل آسیب را به بافت‌های سالم وارد می‌آورد (۷). از جمله ترکیبات آنزیم- پیش دارو که در تحقیق حاضر نیز مورد استفاده قرار گرفته است، سیستم 5-Cytosine Deaminase/5-Fluorocytosine (CD/5-FU) می‌باشد. در این سیستم از محصول ژن سیتوزین دآمیناز Cytosine Deaminase (CD) مخمر *Saccharomyces cerevisiae* برای تبدیل پیش داروی غیر سمی 5-FC به متابولیت سمی 5-Fluorouracil (5-FU) استفاده می‌گردد. آنزیم CD تنها در باکتری‌ها و قارچ‌ها وجود دارد و در پستانداران موجود نیست (۸ و ۹).

اگرچه BCG اینتراوزیکال استاندارد طلائی و مورد قبول درمان سرطان سطحی مثانه در طول ۳۰ سال گذشته است، اما این درمان در ۳۰٪ از افراد بی‌نتیجه مانده و در ۵٪ عوارض جانبی ایجاد می‌کند. به علاوه، ۳۰ الی ۴۰٪ از بیماران در طی ۵ سال پس از این درمان دچار عود مجدد تومورها می‌گردند (۱۰ و ۱۱). بنابراین، می‌بایست به دنبال یافتن روشی در جهت کاهش دوز BCG اینتراوزیکال به منظور پیشگیری از عوارض جانبی و راهی برای افزایش پتانسیل درمانی آن بود. در این

از فنل و کلروفرم با نسبت برابر استفاده گردید. پس از افزودن ایزوپروپانول به مایع روئی حاصل از سانتریفوژ مرحله قبل در دور 12000 rpm و 3 ساعت انکوباسیون در 20°C - درجه سانتی گراد، مجدداً 10 دقیقه سانتریفوژ در دور 12000 rpm انجام شد. طی دو مرحله از اتانول 96% و 70% و سانتریفوژ در دور 12000 rpm جهت تخلیص DNA و شستشوی آن استفاده شد. پس از تبخیر اتانول، رسوب باقی مانده در آب مقطر استریل حل گردید. به منظور استخراج DNA ژنومیک *S. cerevisiae* از مخمر رشد داده شده در محیط Soybean Digested Casein Broth و از کیت QIAamp[®] DNA Mini Kit شرکت QIAGEN استفاده شد. در هر یک از مراحل کلونینگ، جهت تخلیص پلاسمید از کلون های مورد نظر، کیت استخراج پلاسمید Gene JET[™] Plasmid Miniprep Kit شرکت Fermentas مورد استفاده قرار گرفت.

انتقال pHARA به BCG از طریق الکتروپوریشن: حدود $1\ \mu\text{g}$ پلاسمید عاری از نمک pHARA ($5\ \mu\text{l}$) به $0.4\ \text{ml}$ سوسپانسیون BCG اضافه و 10 دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس سوسپانسیون BCG و pHARA به کووت $0.2\ \text{cm}$ مخصوص الکتروپوریشن که 10 دقیقه بر روی یخ انکوبه شده بود منتقل گردید. پس از تنظیم دستگاه الکتروپوریشن بر روی برنامه $2/5\ \text{kV}$ ، $25\ \mu\text{F}$ و $1000\ \Omega$ ، پالس از کووت عبور داده شد. پس از 10 دقیقه انکوباسون کووت بر روی یخ، سوسپانسیون به یک لوله استریل حاوی $5\ \text{ml}$ محیط مایع $\text{VH}9$ غنی شده با OADC و Tween-80 منتقل شد و به مدت 3 ساعت به انکوباتور 37°C درجه انتقال یافت. پس از این مدت، سلول ها 10 دقیقه در دور $4000\ \text{rpm}$ سانتریفوژ شدند. مایع روئی دور ریخته شد و سلول های باقی مانده به پلیت های حاوی محیط جامد $\text{VH}10$ حاوی غلظت نهائی $20\ \mu\text{g/ml}$ کانامایسین غنی شده با OADC $10\% \text{ v/v}$ منتقل شد و به مدت 2 الی 4 هفته در انکوباتور 37°C درجه سانتی گراد قرار داده شدند.



شکل ۱: تصویر شماتیک وکتور pHARA

تکثیر و کلونینگ ژن های پروموتور $hsp60$ ، آلفا آنتی ژن از ژنوم BCG و ژن *CD* از ژنوم *S. cerevisiae* با استفاده از پرایمرهای جدول ۱ قطعات $hsp60$ و آلفا آنتی ژن از روی ژنوم BCG و ژن *CD* از روی ژنوم *S. cerevisiae* جداسازی و تکثیر شدند. قطعات $hsp60$ و *CD* ابتدا در وکتور pTA57T/A کلون شدند، سپس در وکتور pBGGT به ترتیب در جایگاه های آنزیمی *AflIII/XhoI* و *BglIII/SacI* ساب کلون گردیدند. قطعه آلفا آنتی ژن به طور مستقیم در جایگاه آنزیمی *SacI/AflIII* کلون شد.

ساب کلونینگ سازه ژنتیکی در وکتور pVN2: پس از تکثیر سازه ژنی با استفاده از پرایمرهای دارای جایگاه های آنزیمی *Sall* و *NdeI*، محصول PCR در جایگاه های آنزیمی *Sall/NdeI* و وکتور pVN2 که دارای ژن مقاومت به کانامایسین، Ori M (pAL5000) و Ori ColeI می باشد ساب کلون شدند. وکتور حاصل pHARA نام گذاری شد. (شکل ۱)

آماده سازی سلول های مستعد الکتروپوریشن: حدود $1\ \text{mg}$ یک تازه BCG در $5\ \text{ml}$ محیط مایع $\text{VH}9$ غنی شده با $0.05\% \text{ v/v}$ Tween-80 و OADC $10\% \text{ v/v}$ کشت داده شد و به مدت 1 هفته در انکوباتور شیکردار 37°C درجه سانتی گراد و دور $100\ \text{rpm}$ قرار گرفت. در هفته های دوم و سوم پس از کشت اولیه، حجم محیط کشت $\text{VH}9$ با فاصله یک هفته به $15\ \text{ml}$ و $300\ \text{ml}$ رسانده شد و لوله ها به ترتیب 1 و 3 هفته در انکوباتور 37°C درجه با دور $100\ \text{rpm}$ قرار گرفتند. در هر یک از مراحل Scale-up، به تناسب حجم $\text{VH}9$ اضافه شده، $0.05\% \text{ v/v}$ Tween-80

و $100\ \text{rpm}$ قرار گرفتند. در هر یک از مراحل Scale-up، به تناسب حجم $\text{VH}9$ اضافه شده، $0.05\% \text{ v/v}$ Tween-80

جدول ۱: فهرست پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر اختصاصی و تائید قطعات شاتل وکتور

نام پرایمر	توالی در جهت ۵' به ۳'	کاربرد
Phsp60-F	5' AGATCTGGTGACCACAACGACGC 3' <i>BglII</i>	تکثیر <i>Phsp60</i> از ژنوم BCG
Phsp60-R	5' GAGCTCTGCGAAGTGATTCCTCCG 3' <i>SacI</i>	
M13-F	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'	تائید کلونینگ
M13-R	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'	
CD-F	5' CTTAAGGTGACAGGGGGAATGGCA 3' <i>AflIII</i>	تکثیر <i>CD</i> از ژنوم <i>S. cerevisiae</i>
CD-R	5' CTCGAGCTACTACCAATATCTTCAAACCA 3' <i>XhoI</i>	
α Antigen-F1	5' CTCATGACAGACGTGAGCCGAAAGATTTCG 3' <i>SacI-</i>	تکثیر α Antigen از ژنوم BCG
α Antigen-R1	5' AAACCGCAGGTGAGTTGTTCCC 3'	
α Antigen-F2	5' ATTGAGCTCATGACAGACGTGAAGATTTCG 3' <i>- SacI</i>	تکثیر α Antigen از ژنوم BCG
α Antigen-R2	5' CTTAAGCGCGCCCGCGTTGC 3' <i>AflIII</i>	
Construct-F	5' ATTCATATGTCCCAGTCACGACGTTG 3' <i>NdeI</i>	تکثیر سازه از وکتور pBGGT
Construct-R	5' CAAGTCGACTTCACACAGGAAACA 3' <i>Sall</i>	

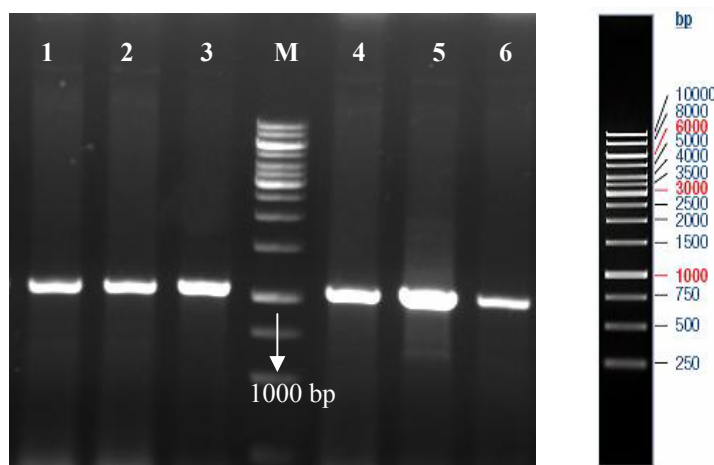
یافته ها:

اندازه و عدم وجود باندهای اضافی مورد بررسی قرار گرفتند. برای تایید کلونینگ قطعات *hsp60* و *CD* در وکتور pTZ57T/A از روش های Colony PCR با پرایمرهای ۱۳ Universal M، Quick Check و برش های آنزیمی و مقایسه وکتور حاوی قطعه مورد نظر با وکتور pTZ57R استفاده شد. صحت کلونینگ قطعه آلفا آنتی ژن در وکتور pBGGT توسط هضم آنزیمی با آنزیم های *BglIII* و *AflIII* بررسی شد. اختلاف اندازه وکتور حاوی *hsp60* و آنتی ژن بود. پس از تکثیر و جداسازی سازه ژنتیکی با پرایمرهای دارای جایگاه های آنزیمی *Sall* و *NdeI*، قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی حاصل از PCR بر روی ژل ۱ درصد و همراه با مارکر ۱ kb

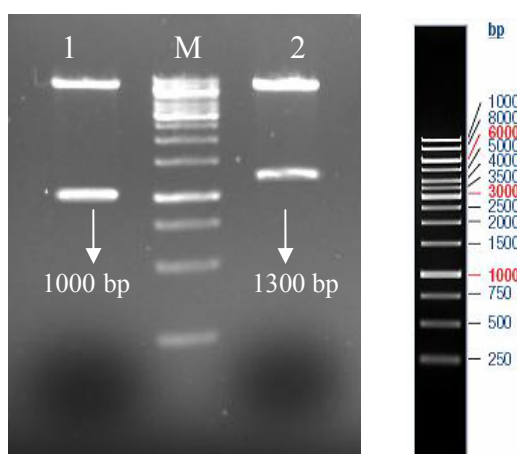
پس از استخراج ژنوم BCG و *S. cerevisiae*، برای تعیین میزان خلوص DNA و غلظت آن، جذب محلول حاوی DNA توسط اسپکتروفوتومتر و در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری و نسبت آن تعیین شد. این نسبت برابر با ۱/۹ بود که دلالت بر خلوص مناسب محلول DNA و عدم آلودگی با پروتئین دارد. علاوه بر این، DNA ژنومیک و پلاسمیدی پس از استخراج، بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و از لحاظ کمی مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه قطعه حاصل از PCR پرموتر *hsp60* با پرایمرهای اختصاصی ۴۰۰ bp، آلفا آنتی ژن ۱۲۰ bp و سیتوزین دامیناز ۴۷۷ bp بود. این قطعات همراه با مارکر ۱۰۰ bp از شرکت Fermentas بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و از نظر

از PCR و برش آنزیمی بیانگر وجود سازه در وکتور pVN2 می‌باشد. پس از گذشت ۱۷ روز از الکتروپوریشن BCG با شاتل وکتور pHARA، کلنی‌های نخودی رنگ و مقاوم به کانامایسین BCG بر روی محیط‌های H₁₀ ۷ ظاهر شدند. ظهور کلنی‌های نخودی رنگ و مقاوم به کانامایسین نشانگر انتقال پلاسمید کلون شده نهائی به سلول BCG است.

شرکت Fermentas الکتروفورز گردید. پس از ساب کلونینگ سازه ژنتیکی در وکتور pVN2 و ساخته شدن وکتور pHARA، جهت تایید حضور این قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی در pVN2 از PCR با پرایمرهای اختصاصی و برش آنزیمی pVN2 و pHARA با آنزیم‌های *NdeI* و *Sall* استفاده شد. (شکل‌های ۲ و ۳) قطعات حاصل از هضم آنزیمی با این دو آنزیم به ترتیب برابر با ۱۳۰۰ bp و ۱۰۰۰ bp بود. قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی حاصل



شکل ۲: PCR جهت تایید کلونینگ سازه ژنی در pVN2، ستون شماره ۱ تا ۶: جفت بازی سازه ژنی پس از کلونینگ در pVN2، M: مارکر وزن مولکولی (1kb DNA Ladder)



شکل ۳: برش pHARA و pVN2 با آنزیم‌های *Sall* و *NdeI*، ستون شماره ۱: قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی حاصل از برش آنزیمی pHARA، ستون شماره ۲: قطعه ۱۳۰۰ جفت بازی حاصل از برش آنزیمی pVN2، M: مارکر وزن مولکولی (1kb DNA Ladder)

بحث:

سرطان مثانه هشتمین سرطان شایع در میان مردان و چهارمین سرطان شایع در میان زنان می‌باشد. از جمله روش‌های درمان سرطان مثانه ایمونوتراپی یا به کارگیری سیستم ایمنی در درمان سرطان می‌باشد (۱). ویژگی‌های متعدد باکتری‌های زنده موجب استفاده از آنها به عنوان تحریک کننده‌های غیر اختصاصی سیستم ایمنی در ایمونوتراپی سرطان شده است. بهترین مورد شناخته شده که بیشترین مطالعات به عنوان تعدیل کننده سیستم ایمنی (Immunomodulator) بر روی آن انجام شده *BCG* می‌باشد *BCG* در طی سه دهه گذشته برای درمان تومورهای *High-grade* سرطان سطحی مثانه مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵ و ۱۶). در سال ۱۹۷۶، Morales و همکاران برای اولین بار استفاده از *BCG* اینتراوزیکال را در درمان سرطان سطحی مثانه گزارش کردند و نشان دادند که عود سرطان سطحی مثانه در ۹ بیمار درمان شده با *BCG* داخل مثانه ای به میزان ۱۲ برابر کمتر از گروه شاهد است (۱۷). درمان اینتراوزیکال با *BCG* که به عنوان استاندارد طلایی و مورد قبول درمان سرطان سطحی مثانه در طول ۳۰ سال گذشته است، تنها با موفقیت ۶۰ الی ۷۰ درصدی روبرو بوده و در بیش از ۳۰ درصد از افراد بی نتیجه می‌ماند. این در حالی است که *BCG* در ۵ درصد از افراد تولید عوارض جانبی می‌کند که این عوارض در ۵/۰ درصد از موارد تهدید کننده زندگی افراد است. علاوه بر این ۳۰ الی ۴۰ درصد از بیماران در طی گذشت ۵ سال از این درمان دچار عود مجدد تومورها می‌گردند (۱۰ و ۱۱). ژن درمانی برای سرطان مثانه نیز از روش‌هایی است که به طور وسیعی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. امکان انتقال ژن‌های درمانی از جمله سیتوزین دامیناز با استفاده از وکتورهای ویروسی و سایر روش‌ها در طی آزمایشات متعدد به اثبات رسیده است. اما، نتیجه حاصل از درمان با آنچه مورد انتظار است فاصله زیادی دارد. یکی از دلایل آن می‌تواند کرائی پایین انتقال ژن در *in vivo* باشد (۶ و ۱۸). بنابراین می‌بایست به دنبال یافتن روشی در جهت کاهش مقدار *BCG* اینتراوزیکال برای پیشگیری از ایجاد عوارض جانبی و راهکاری برای افزایش پتانسیل درمانی ایمونوتراپی و ژن درمانی آن بود.

ترکیب دو راهکار ژن درمانی و ایمونوتراپی اینتراوزیکال با *BCG* می‌تواند موجب تقویت بازده درمان گردد. در حالی که اثر بخشی راهکار ترکیب آنزیم-پیش دارو یا *Suicide Gene Therapy* و سایتوکاین‌هایی مانند اینترلوکین ۱۲ طی مطالعات مختلف به اثبات رسیده است (۱۹)، اما تا کنون از *BCG* در این راهکار و برای

انتقال ژن‌های خودکشی کننده استفاده نشده است. در ایمونوتراپی اینتراوزیکال با *BCG* پس از اتصال *BCG* به فیبرونکتین سطح اپی تلیال مثانه و ترشح کموکاین‌های مختلف از سلول‌های اوروتیلیال و ماکروفاژها، سلول‌های *Th1* فعال می‌گردند. از سایتوکاین‌های کلیدی در پاسخ ایمنی *Th1*، اینترلوکین ۱۲ و اینترفرون گاما می‌باشند که نه تنها محرک تولید یکدیگر هستند، بلکه تولید سلول‌های فعال شده با *BCG* یا *BAK*، که سلول‌های توموری را به واسطه تولید پرفورین و مستقل از مسیر *Fas-Fas* از بین می‌برند، وابسته به حضور سایتوکاین‌های *Th1* یعنی اینترلوکین ۱۲ و اینترفرون گاما است (۲۰ و ۲۱). کارایی *BCG* اینتراوزیکال در درمان سرطان سطحی مثانه (۱۶)، پتانسیل درمانی بالای راهکار ژن درمانی *CD/5-FC* در از بین بردن سلول‌های توموری (۲۲)، سینتریزم میان *BCG* به عنوان عامل ترشح اینترلوکین ۱۲ و سیستم *CD/5-FC* (۲۴) و موقعیت خاص مثانه به عنوان اندامی قابل دسترس برای تزریق اینتراوزیکال و عدم نیاز به استعمال سیستمیک داروی سمی *5-FU* (۲۵) همگی امتیازات قابل توجهی هستند. وجود این امتیازات موجب شد تا در تحقیق حاضر شاتل وکتور مایکوباکتریال حاوی ژن خودکشی سیتوزین دامیناز تحت کنترل پروموتور *hsp60* و سیگنال ترشیی آلفا آنتی ژن یا آنتی ژن *B 85* طراحی و ساخته شود. شاتل مذکور متعاقباً از طریق الکتروپوریشن به *BCG* منتقل شد. به این ترتیب با بهره گیری از روشی جدید در ایمونو - ژن درمانی، برای اولین بار از *BCG* به عنوان وکتور بیانی- ترشیی ژن *CD* مخمر *S. cerevisiae* و برای افزایش پتانسیل درمانی *BCG* در درمان سرطان مثانه استفاده گردد. در حالی که تولید داخل سلولی *5-FU* می‌تواند منجر به از بین رفتن *BCG* شود، ترشیی بودن آنزیم *CD* موجب تبدیل *5-FC* موجود در فضای بین سلولی به *5-FU* می‌گردد. *5-FU* دارای خاصیت بالقوه *Bystander Effect* است. بدین ترتیب *5-FU* مستقل از اتصالات بین سلولی *Gap Junctional Intercellular Communication (GJIC)* که در اکثر سلول‌های سرطانی از میان می‌رود، قادر به انتشار در میان سلول‌های توموری می‌باشد که به دلیل عدم اتصال *BCG* به آنها ژن سیتوزین دامیناز را بیان نمی‌نمایند (۲۶). امید است تا با استفاده هم زمان از دو راهکار ژن درمانی و ایمونوتراپی، علاوه بر مرتفع ساختن مشکل ایجاد عوارض جانبی توسط *BCG*، با نابود سازی هر چه بیشتر سلول‌های توموری از طریق تعامل پتانسیل‌های درمانی این دو روش، افراد مبتلا به سرطان سطحی مثانه از طول عمر بیشتر، کیفیت زندگی بالاتر و کاهش مواجهه با عود مجدد تومور برخوردار گردند.

نتیجه گیری:

بیشتری بر سلول‌های سرطانی مثانه خواهد داشت. این امر خود گامی مهم در جهت درمان موثرتر سرطان مثانه و کاهش اثرات جانبی مرتبط با مصرف BCG است.

BCG نو ترکیبی که در تحقیق حاضر طراحی و ساخته شد، علاوه بر دارا بودن خاصیت ادجوانتی و ایمنی موضعی که در جهت نابودی سلول‌های توموری در مثانه ایجاد می‌کند، با تبدیل داروی 5-FU به 5-FC توسط سیتوزین دامیناز، اثرات سیتوپاتولوژیکی

فهرست مراجع:

- Grossfeld GD, Carroll PR. Urothelial carcinoma: cancers of the bladder, ureter, and renal pelvis. In: Tanagho EA, McAnich JW, eds. *Smith's General Urology*. 16th ed. New York city; McGraw-Hill. 2004; PP: 324-345.
- Metts MC, Metts JC, Milito SJ, Thomas CR. Bladder cancer: a review of diagnosis and management. *J Natl Med Assoc* 2004; **92**:258-294.
- Duque JL, Loughlin KR. An overview of the treatment of superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2000; **27**: 125-135.
- Losa A, Hurel R, Lembo A. Low dose bacillus calmette-guerin for carcinoma in situ of the bladder: long-term results. *J Urol* 2000; **163**: 68-71.
- Ratliff TL, Gillen D, Catalona WJ. Requirement of a thymus dependent immune response for BCG mediated antitumor activity. *J Urol* 1987; **137**: 155-158.
- Ardlet P, Bohle A. Molecular aspects of bladder cancer IV: Gene therapy of bladder cancer. *Eur Uro* 2002; **41**: 372-381.
- Pan CX, Koeneman KS. Anovel tumor-specific gene therapy for bladder cancer. *Med Hypotheses* 1999; **53**: 130-135.
- Kievit E, Bershad E, Sethna P, Dev I, Lawrence TS, Rehemtulla A. Superiority of Yeast over Bacterial Cytosine Deaminase for Enzyme/Prodrug Gene Therapy in Colon Cancer Xenografts. *Cancer Res* 1999; **59**: 1417-1421.
- Yergatian S, Lee JB, Geisow MJ, Ireson JC. Cytosine deaminase: structural modifications studies. *Experientia* 1977; **33**:1570-1571.
- Merz VW, Marth D, Kraft R, Ackermann DK, Zingg EJ, Studer UE. Analysis of early failures after intravesical instillation therapy with bacille Calmette-Guerin for carcinoma in situ of the bladder. *Br J Urol* 1995; **75**:180-184.
- Catalona WJ, Hudson MA, Gillen DP, Andriole GL, Ratliff TL. Risks and benefits of repeated courses of intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer. *J Urol* 1987; **137**:220-224.
- Batoni G, Maisetta G, Florio W, Freer G, Campa M, Senesi S. Analysis of the Mycobacterium bovis hsp60 promoter activity in recombinant *Mycobacterium avium*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; **169**(1):117-24.
- Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Yamada T. Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular (alpha) antigen. *J Bacteriol* 1988; **170**:3847-3854.
- Warren R, deKock M, Engelke E. Safe *Mycobacterium tuberculosis* DNA Extraction method that does not compromise integrity. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 254-256.
- Guo B, Bi Y, Wang K, Neilan BA, Tillett D, Chen GJ. Cloning PCR Products. In: Chen BY, Janes HW. *PCR Cloning protocols*. 2nd ed. Totowa, New Jersey; Humana press. 2002; PP:111-140.
- O'Donnell MA, Aldovini A, Duda RB, Yang H, Szikvasi A, DeWolf WC. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG secreting functional interleukin-2 enhances gamma interferon production by splenocytes. *I & I* 1994; **62**(6): 2508-2514.
- Lee SH, Cheung M, Irani V, Carroll JD, Inamine JM, Howe WR, Maslow JN. Optimization of electroporation conditions for *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis* 2002; **82**: 167-174.
- Wards BJ, Collins DM. Electroporation at elevated temperatures substantially improves transformation efficiency of slow-growing mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1996; **145**: 101-105.
- Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; **411**: 380-384.
- Chabalgoity JA, Dougan G, Mastreoni P, Aspinall RJ. Live bacteria as the basis for

- immunotherapies against cancer. *Expert Rev Vaccines* 2002; **1(4)**: 495-505.
21. Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* 1999; **353**: 1689-1694.
 22. Morales A, Eiding D, Bruce AW. Intracavity BCG in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 1976; **116**: 180-183.
 23. Siemens DR, Crist S, Austin JC, Tartaglia J, Ratliff TL. Comparison of viral vectors: gene transfer efficiency and tissue specificity in a bladder cancer model. *J Urol* 2003; **170**: 979-984.
 24. Woo SL. Combination suicide and cytokine gene therapy for hepatic metastases of colon carcinoma: sustained antitumor immunity prolongs animal survival. *Cancer Res* 1996; **56**: 3758-3762.
 25. Riemensberger J, Bohle A, Branda S. IFN-gamma and IL-12 but not IL-10 are required for local tumour surveillance in a syngeneic model of orthotopic bladder cancer. *Clin Exp Immunol* 2002; **127**: 20-26.
 26. Handa K, Suzuki R, Matsui H, Shimizu Y, Kumagai K. Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL2) II. IL 2-induced interferon gamma production. *J Immunol* 1983; **130**: 988-992.
 27. Huber BE, Austin EA, Good SS, Knick VC, Tibbels S, Richards CA. *In vivo* antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Res* 1993; **53**: 4619-4626.
 28. Schilsky RL. Biochemical and clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Oncology* 1998; **12**: 13-18.
 29. Hwang KS, Cho WK, Yoo J, Yun HJ, Kim S, Im DS. Adenovirus-mediated interleukin-12 gene transfer combined with cytosine deaminase followed by 5-fluorocytosine treatment exerts potent antitumor activity in Renca tumor-bearing mice. *BMC Cancer* 2005; **5**: 51-62.
 30. Schenk-Braat AM, Bangma CH. Immunotherapy for superficial bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2005; **54**: 414-423.
 31. Theodore SL, Alnawaz R, Emily YN, Melinda W, James ET, Philip LS. Preferential cytotoxicity of cells transduced with cytosine deaminase compared to bystander cells after treatment with 5-Fluorocytosine. *Cancer Res* 1998; **58**: 2588-2593.