مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۷۹/هفته اول اردیبهشت ماه ۱۳۹۱
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۲۸

بهینه‌سازی میزان تولید پروتئین‌های شوک حرارتی HSP-70 و gp96 در رده‌های سلولی پروستات و اریترولوکمی، به منظور به کارگیری در تهیه‌ی واکسن سرطان

نوروز دلیرژ[۱]، پوریا ملک خطابی[۲]، قاسم اکبری[۲]

چکیده

مقدمه: پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat shock proteins یا HSP) از قبیل HSP70 و gp96 در هدایت و عرضه‌ی آنتی‌ژن‌ها از طریق MHC کلاس I (Major histocompatibility complex) و القای پاسخ سلول‌های $TCD8^+$ نقش مهمی دارند. امروزه این نقش HSPها به عنوان پایه‌ای برای آزمون‌های کلنیکی به منظور تهیه‌ی واکسن‌های ضد سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه به منظور یافتن درجه‌ی حرارت بهینه‌ای که موجب القای حداکثری HSPها می‌گردد، از رده‌های سلولی اریترولوکمی (K562) و پروستات (LNcap) استفاده گردید.

روش‌ها: هر رده‌ی سلولی به مدت ۱ ساعت در درجه حرارت‌های ۴۱، ۴۲ یا ۴۳ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس سلول‌های حرارت دیده در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳، ۶ یا ۱۲ ساعت انکوبه گردید. بعد از این مرحله، میزان HSP70 با استفاده از کیت ELISA و میزان gp96 با استفاده از روش فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بهترین درجه‌ی حرارت و مدت زمان انکوباسیون به منظور القای حداکثری Hsp70 و gp96 در رده‌ی سلولی K562، ۴۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و انکوباسیون به مدت ۳ ساعت و در مورد رده‌ی سلولی LNcap، ۴۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت بود.

نتیجه‌گیری: این نتایج خاطر نشان می‌نماید که قبل از طراحی واکسن‌های ضد توموری بر اساس HSP بهتر است که در مورد هر رده‌ی توموری اقدام به یافتن درجه‌ی حرارت بهینه و زمان مناسب انکوباسیون نمود.

واژگان کلیدی: HSP70، gp96، سرطان، LNcap، K562

مقدمه

پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat shock proteins یا HSP)، وسیله‌ی طبیعی حفاظت سلول‌ها ضد استرس‌های محیطی و فیزیولوژیک می‌باشند (۱). استرس شامل هر گونه تغییر ناگهانی در محیط سلول است؛ به صورتی که سلول آمادگی پاسخ به آن را نداشته باشد. سلول‌هایی که تحت استرس قرار می‌گیرند به کمک القای HSPها یا بر استرس وارد شده غلبه می‌کنند و زنده می‌مانند و یا تسلیم می‌شوند و دچار مرگ می‌گردند. این توانایی در طی فرایند تکامل همچنان حفظ شده است (۲). HSPها به علت نقش Chaperokine خود، ابتدا در جریان انواع استرس‌های محیطی، عوامل پاتولوژیک و یا استرس‌های فیزیولوژیک شناسایی شدند (۳).

HSPها از جمله فراوان‌ترین پروتئین‌های سلولی هستند، ولی در شرایط فیزیولوژیک در قیاس با شرایط استرس در سطح بسیار پایین‌تری وجود دارند (۴). از آن جایی که استرس‌های وارد شده به سلول منجر به القای HSP می‌گردند به پروتئین‌ها، پروتئین‌های استرس (Stress protein) هم اطلاق می‌گردد (۵).

[۱] گروه بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده‌ی بیوتکنولوژی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
[۲] گروه میکروبیولوژی دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دلیرژ نوروز
Email: n.delirezh@urmia.ac.ir

www.mui.ac.ir

برای این پروتئین‌ها عملکردهای متعددی را ذکر نموده‌اند به عنوان مثال:

الف) عملکردهای هموستاتیک شامل ۱- ممانعت از تجمع (Aggregation) پروتئین‌ها، ۲- برگرداندن وضعیت محلول بودن به پروتئین‌هایی که به سستی مجتمع شده‌اند، ۳- کمک به چین‌خوردگی زنجیره‌های پلی‌پپتیدی تازه ساخته شده و یا چین‌خوردگی دوباره‌ی پروتئین‌های بد تاخورده و آسیب دیده، ۴- هدف‌گیری پروتئین‌های به شدت تخریب شده به سمت ماشین تخریب سلولی، ۵- مجزا نمودن پروتئین‌های آسیب‌دیده به مجتمع‌های بزرگ‌تر در موارد آسیب گسترده‌ی سلولی (۶)، ۶- فرایندهای نقل و انتقال پروتئین‌ها در بین بخش‌های مختلف سلول (۷) و ۷- تغییرات پس از ترجمه‌ی پروتئین‌های ناقل پیام (۸).

ب) عملکردهای مؤثر بر دستگاه ایمنی بدن: ۱- القای بلوغ در سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن (۱۰-۹، ۳)، ۲- تأثیرگذاری بر مسیرهای عرضه‌ی آنتی‌ژن بر روی مولکول‌های (MHC) Major histocompatibility complex کلاس I و القای پاسخ‌های سلول‌های $TCD8^{+}$ (۶، ۴)، ۳- فعال‌سازی سلول‌های NK (Natural killer) (۷، ۳).

ج) اثرگذاری بر سیر بیماری‌زایی بیماری‌هایی از قبیل سرطان (۹، ۷)، دیابت (۴)، اختلالات نورو دژنراتیو، ایسکمی، ترمیم زخم و برخی بیماری‌های دیگر (۶).

در عین حال، مولکول‌های HSP، نقش‌های کلیدی و مهمی را در ایمنی‌زایی بر ضد تومورها به واسطه‌ی دخالت در عملکرد سلول‌های حرفه‌ای عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن (Antigen-presenting cells یا APC)، لنفوسیت‌های T و سلول‌های NK بازی می‌نمایند (۷).

در بسیاری از منابع به نقش عملکردی HSPها در عرضه‌ی آنتی‌ژن‌های اختصاصی تومور اشاره شده است.HSP های مشتق از تومور با محدوده‌ی وزن مولکولی حدود ۷۰ کیلودالتون (HSP70، HSC70) و GP96 (۹۶ کیلو دالتون) موجب تسهیل ورود پپتیدهای آنتی‌ژنیک به داخل مولکول‌های MHC کلاس I می‌گردند (۱۱-۹، ۷، ۳).

در کنار این مسأله دیده شده است که اتصال HSP70 و gp96 به گیرنده‌های اختصاصی خود، بر بلوغ فنوتایپی و عملکردی APCها تأثیر می‌گذارد (۱۳-۱۲، ۳). به دنبال چنین اتصالی، شاهد افزایش بیان مولکول‌های MHC کلاس II، مولکول‌های کمک تحریکی CD86 و CD83 در کنار ترشح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند IL-12 (Interlukin) و TNFα (Tumor necrotizing factor-α) خواهیم بود (۹، ۳). علاوه بر این، مطالعات دیگر نشان داده‌اند که مجموعه‌ی HSP- پپتید می‌تواند هم در in vitro (۸) و هم در in vivo (۶) از طریق APCهای انسانی موجب عرضه‌ی متقاطع پپتید همراه شود و CTLها (Cytotoxic T lymphocyte) را فعال نماید.

نکته‌ی بسیار مهم این است که نشان داده شده است در عرضه‌ی پپتید آنتی‌ژنیک به همراه HSP70 سازگاری بین رده‌ی سلولی که HSP70 از آن مشتق شده است و سلول‌های T پاسخ دهنده ضروری نمی‌باشد (۱۴). حتی در غیاب پپتیدهای مشتق از تومور، HSP70 دارای ظرفیت تحریک ترشح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند IL-1β، IL-6 و TNF-α توسط APCها به واسطه‌ی تحریک گیرنده‌های TLR2,4 می‌باشد. این فرایند به مولکول CD14 (Cell differentiation) نیز وابسته است (۱۵).

www.mui.ac.ir

به این عملکرد اعضای خارج سلولی خانواده‌ی HSP70 از قبیل شکل خارج سلولی HSP72 (eHSP72) در تحریک غیر اختصاصی ایمنی ذاتی، عملکرد Chaperokine اطلاق می‌گردد (۴، ۲). اثر دیگر HSP70 که با حضور پپتیدهای همراه ارتباط ندارد، تحریک فعالیت سلول‌های NK می‌باشد (۷، ۳). با استفاده از روش فلوسایتومتری نشان داده شده است که فرم غشایی HSP70 در سطح سلول‌های توموری و نه سلول‌های سالم حضور دارد. این مسأله موجب شناسایی اختصاصی سلول‌های توموری و نه سلول‌های سالم توسط سلول‌های NK خواهد شد. میزان حساسیت سلول‌های توموری به لیز با واسطه‌ی این سلول‌ها، متناسب با میزان حضور مولکول‌های HSP70 در سطح سلول‌های توموری می‌باشد (۷، ۳).

مولکول‌های HSP موجب برانگیخته شدن هر دو بازوی پاسخ‌های ایمنی یعنی ایمنی ذاتی (فعال‌سازی و بلوغ سلول‌های دندرتیک و فعال‌سازی سلول‌های NK) و ایمنی اکتسابی (عرضه‌ی متقاطع آنتی‌ژن و فعال‌سازی سلول‌های $TCD8^+$) می‌گردند (۱۶).

با توجه به آن چه که در مورد نقش HSPها در عرضه‌ی آنتی‌ژن‌های توموری گفته شد، امروزه قبل از استفاده از عصاره‌ی سلول‌های توموری به عنوان آنتی‌ژن در تهیه‌ی واکسن، با القای این پروتئین‌ها سعی می‌کنند کارایی عرضه‌ی آنتی‌ژن توسط سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن را افزایش دهند؛ ولی از آن جایی که رده‌های سلولی مختلف تحت تأثیر درجه حرارت‌های متفاوت و زمان‌های مختلف انکوباسیون بعد از آن مقادیر متفاوتی از پروتئین‌های شوک حراتی را بیان می‌کنند، از این رو در این مطالعه بر آن شدیم تا مقدار بهینه‌ی حرارت و انکوباسیون بعد از دمادهی را در مورد رده‌های سلولی پروستات و اریترولوکمی تعیین نماییم تا نتایج آن را در مراحل بعدی تولید واکسن‌های سلولی سرطان مورد استفاده قرار دهیم.

روش‌ها

سلول‌های K562 و LNcap از بانک سلول ایران تهیه گردید (NCBI code: C122, C439). محیط کشت مورد استفاده برای سلول‌های K562 و LNcap، RPMI 1640 (شرکت سیگما، آمریکا) به اضافه‌ی FBS (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد (شرکت Gibco، آلمان) بود. برای تعیین میزان تولید HSP70 از کیت ELISA (شرکت StressXpress، آمریکا) و برای تعیین میزان بیان gp96 از آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی آن (شرکت Thermo scientific، آمریکا) و روش فلوسایتومتری استفاده شد.

سلول‌های K562 و LNcap در محیط کشت RPMI 1640 به اضافه‌ی FBS ۱۰ درصد در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد کشت داده شدند تا تعداد سلول‌های K562 به اندازه‌ی مورد نیاز و سلول‌های LNcap به اندازه‌ای برسد که ۸۰ درصد سطح فلاسک را بپوشاند. سپس فلاسک‌های هر دو سلول به چهار گروه تقسیم گردید. سه گروه در بن‌ماری آب گرم به ترتیب با دمای ۴۱، ۴۲ و ۴۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت حرارت داده شد. گروه چهارم نیز به عنوان شاهد استفاده گردید. همه‌ی فلاسک‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد به مدت ۳، ۶ و ۱۲ ساعت کشت داده شدند. این آزمایش برای هر نمونه، سه بار تکرار و نتایج به دست آمده به صورت انحراف معیار ± میانگین گزارش گردید.

www.mui.ac.ir

میزان تولید HSP70 توسط سلول‌ها از طریق سنجش آن در مایع رویی نمونه‌های کشت داده شده با استفاده از کیت تجارتی به روش زیر انجام گرفت:

۱- از نمونه‌های مورد آزمایش به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر خانه‌ی پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید. برای هر نمونه دو خانه در نظر گرفته شد. دو خانه به عنوان شاهد Blank و هفت جفت خانه نیز برای نمونه‌ی استاندارد در نظر گرفته شد.

۲ـ سطح پلیت، به مدت یک شب در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید.

۳ـ با استفاده از دستگاه Washer، پلیت سه بار با Wash buffer شسته و با دستمال کاغذی، آب اضافی پلیت گرفته شد.

۴ـ به هر خانه ۲۰۰ میکرولیتر Assay diluent اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید.

۵ـ شستشو همانند مرحله‌ی ۳ انجام شد.

۶ـ رقت‌های مختلف استاندارد در Assay diluent تهیه و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به خانه‌های مربوط اضافه شد. به خانه‌ی مربوط به Blank و نمونه نیز به ترتیب Assay diluent و نمونه مورد آزمایش اضافه شد.

۷ـ سطح پلیت پوشانده و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید.

۸ـ شستشو همانند مرحله‌ی ۳ انجام گرفت با این تفاوت که در این مرحله پلیت ۵ بار شستشو داده شد.

۹ـ به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر Working detection شامل Detection Ab (۱:۲۵۰) و معرف Avidin-HRP (۱:۲۵۰) اضافه شد. سطح پلیت پوشانده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید.

۱۰ـ این بار ۷ بار شستشو همانند مرحله‌ی ۳ انجام شد.

۱۱- محلول سوبسترا به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر خانه اضافه گردید. سطح پلیت پوشانده شد و تا زمانی که خانه‌های Blank شروع به رنگ گرفتن کنند در تاریکی انکوبه گردید. در این زمان به هر خانه ۵۰ میکرولیتر Stop solution اضافه و واکنش متوقف شد.

۱۲- پلیت با استفاده از دستگاه ELISA نگار و با طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

۱۳- متوسط OD (Optical density) به دست آمده محاسبه شد و منحنی استاندارد بر روی کاغذ لگاریتمی رسم گردید. سپس با توجه به منحنی استاندارد مقدار HSP70 موجود در نمونه تعیین و به صورت نانوگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید.

برای سنجش میزان بیان gp96 از روش فلوسایتومتری استفاده شد. بعد از حرارت دادن و طی مدت انکوباسیون مورد نظر، سلول‌ها یک بار با بافر FACS (Fluorescent activated cell sorting) شستشو داده شد و در همین بافر که حاوی ۲ درصد سرم موش بود، به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید.

در پایان زمان انکوباسیون، سلول‌ها دوباره با بافر FACS شسته شد. بعد از رساندن حجم آن‌ها به ۱۰۰ میکرولیتر، مقدار ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد gp96 و با کنترل ایزوتیپ اضافه به مدت ۴۵ دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، انکوبه گردید.

بعد از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌ها یک بار با بافر FACS شسته شد و بلافاصله با دستگاه فلوسایتومتری DAKO (شرکت Partech، آلمان) مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصل با نرم‌افزار FlowMax آنالیز گردید.

www.mui.ac.ir

یافته‌ها

القای حداکثری مولکول‌های HSP70 و gp96 در رده‌ی سلولی اریترولوکمی:

درجه حرارت‌های استفاده شده برای القای پروتئین‌های شوک حرارتی HSP70 و gp96 موجب تولید مقادیر متفاوتی از این پروتئین‌ها در سلول‌های K562 می‌گردد (نمودارهای ۱ و ۲).

با مقایسه‌ی این دو نمودار مشخص می‌گردد که بیان حداکثری HSP70 و gp96 در ۴۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و انکوباسیون به مدت ۳ ساعت رخ داد.

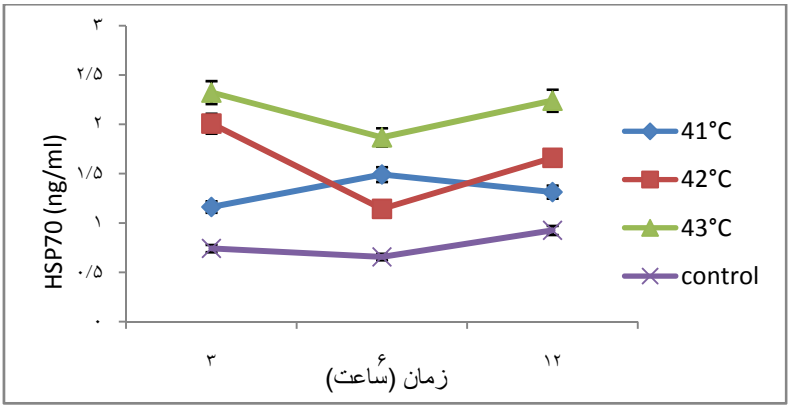
القای حداکثری مولکول‌های HSP70 و gp96 در رده‌ی سلولی سرطان پروستات:

در نمودارهای ۳ و ۴ الگوی بیان دو مولکول HSP70 و gp96 در رده‌ی سلولی سرطان پروستات (LNcap) نشان داده شده است.

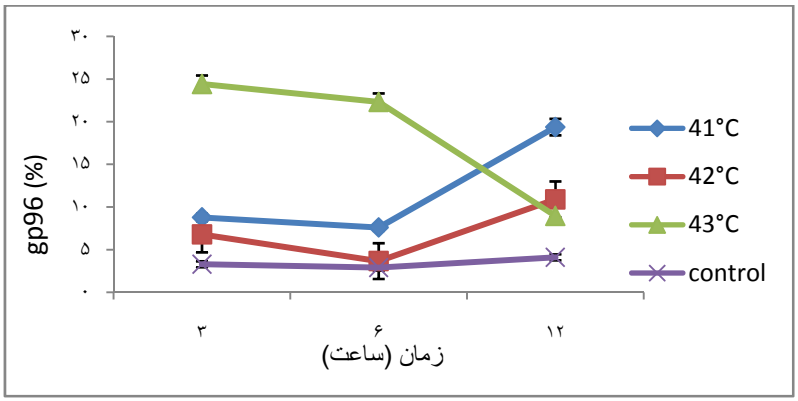
با مقایسه‌ی این دو نمودار مشخص می‌گردد که بیان حداکثری HSP70 و gp96 در ۴۳ درجه‌ی سانتی‌گراد و انکوباسیون به مدت ۱۲ ساعت رخ داد.

بحث

ارتباط بین HSP و ایمنی در برابر تومورها در سال ۱۹۸۰ برای اولین بار نشان داده شد. بدین ترتیب که محققین دریافتند چنانچه مولکول‌های HSP از سلول‌های توموری جداسازی گردند، قادر به القای پاسخ‌های لنفوسیت‌های $TCD8^{+}$ در برابر سلول‌های توموری خواهند بود. در حالی که این امر با استفاده از

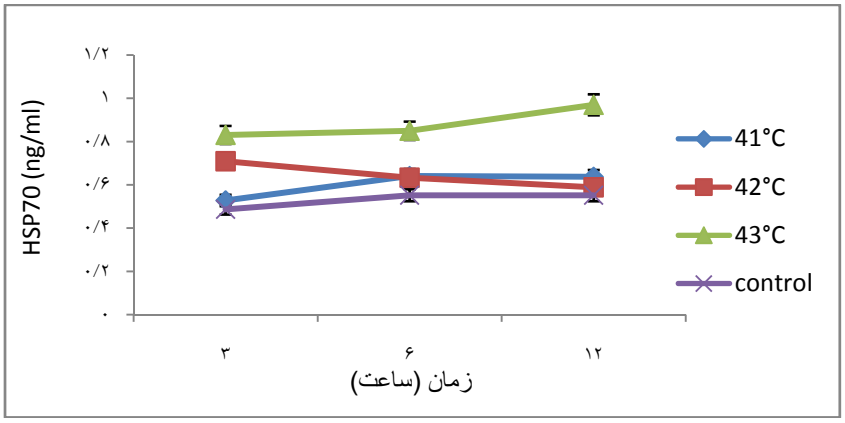


نمودار ۱. الگوی بیان مولکول HSP70 در رده‌ی سلولی K562

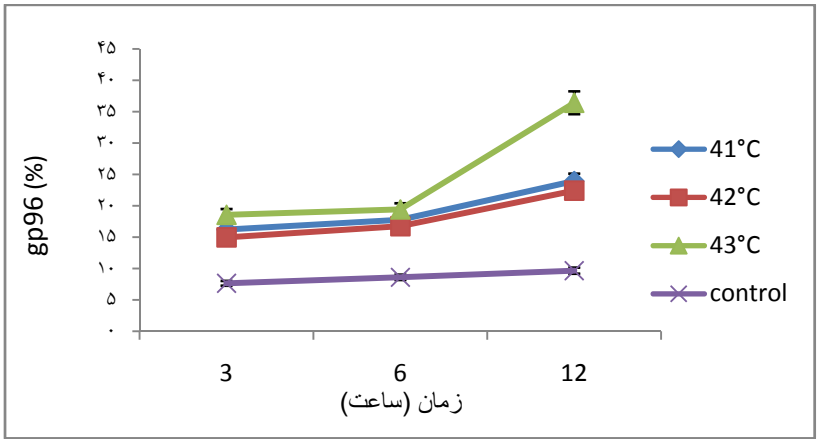


نمودار ۲. الگوی بیان مولکول gp96 در رده‌ی سلولی K562

www.mui.ac.ir



نمودار ۳. الگوی بیان مولکول **HSP70** در رده‌ی سلولی **LNcap**



نمودار ۴. الگوی بیان مولکول **gp96** در رده‌ی سلولی **LNcap**

HSP خالص شده از بافت سالم مشابه بافت خاستگاه تومور صورت نمی‌پذیرد (۱۶، ۵). از طرف دیگر، هدف قرار دادن HSPها از جمله HSP90، باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی نظیر میلوم متعدد می‌گردد (۱۷). مطالعات اولیه در مورد کمپلکس‌های gp96- پپتید صورت گرفت و مطالعات بعدی نیز که با استفاده از HSP70، HSP90، کالرتیکولین، HSP110 و grp170 صورت گرفت، نتایج به دست آمده را تأیید نمود (۱۶).

اعضای هموسوگ خانواده‌ی HSP در همه‌ی بخش‌های سلول شامل سیتوزول، هسته، میتوکندری، اندوزوم، لیزوزوم، شبکه‌ی اندوپلاسمیک، غشاهای درون سلولی و غشای پلاسمایی یافت می‌گردند (۷)، بنابراین HSPهایی که از سلول‌های توموری جدا می‌گردند، به طور بالقوه سرشار از پادگن‌های توموری می‌باشند (۱۸، ۱). با توجه به نقش کمپلکس‌های HSP-پپتید در فعال‌سازی و بلوغ APCها، این مجموعه قادر به فعال‌سازی پاسخ پلی‌کلونال لنفوسیت‌های T بر علیه آنتی‌ژن‌های توموری خواهد بود. در این شرایط حتی اگر تومور تحت فشار انتخابی دستگاه ایمنی برخی از پادگن‌های خود را از دست بدهد، باز کلون‌های متعدد سلول‌های T جهت نابودی سلول‌های توموری در دسترس خواهند بود (۹).

بر مبنای نظریه‌ی خطر (Danger theory) فعال‌سازی سیستم ایمنی منوط به شناسایی مولکول‌های خطر آزاد شده از سلول‌های دچار استرس

www.mui.ac.ir

و آسیب دیده و یا مولکول‌های خطر مشتق از عامل بیماری‌زا توسط سیستم ایمنی ذاتی می‌باشد (۱۹). هر دو فرم غشایی و محلول HSP موجب به صدا درآمدن زنگ‌های خطر برای سیتم ایمنی خواهند شد (۷). القای بلوغ در سلول‌های دندریتیک در کنار عرضه‌ی متقابل پادگن مانع آنرژی و بی‌پاسخی ایمنی خواهد شد (۹). استفاده از این شیوه ما را از شناسایی تک تک آنتی‌ژن‌های اختصاصی تومور بی‌نیاز خواهد ساخت (۱۶). استخراج مجموعه‌های HSP-پپتید از تومور خود فرد، تضمین کننده‌ی حضور حداکثری پادگن‌های اختصاصی و منحصر به فرد تومور آن شخص خواهد بود (۲۰، ۱۶، ۹).

استرس حرارتی مهم‌ترین شیوه‌ی به کار رفته در القای HSP در سلول‌ها می‌باشد. به طور معمول جهت القای HSP در محیط کشت سلول از حرارت‌دهی غیر کشنده در دماهای بالای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت استفاده می‌گردد (۱).

در این مطالعه به منظور یافتن استرس حرارتی بهینه، که موجب القای حداکثری HSPها می‌گردد، از رده‌ی سلول سرطانی K562 و LNcap استفاده شد. هر رده‌ی سلولی به مدت ۱ ساعت در درجه حرارت‌های ۴۱، ۴۲ و یا ۴۳ درجه‌ی سانتی‌گراد در بن ماری قرار گرفت. از آن جایی که پس از شوک حرارتی مدت زمانی لازم است تا مولکول‌های جدید HSP در سلول سنتز گردد، سلول‌های حرارت دیده به مدت ۳، ۶ و ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید.

HSP70 و gp96 از جمله مهم‌ترین HSPهای مشتق از تومور است که موجب تسهیل ورود پپتیدهای آنتی‌ژنیک به داخل مولکول‌های MHC I می‌گردد (۱۱-۹، ۷، ۳). البته توزیع مولکول‌های HSP در داخل سلول متفاوت است. به طور معمول مولکول‌های gp96 در شبکه‌ی اندوپلاسمیک و HSP70 در سیتوزول حضور دارد (۷، ۳). بدین ترتیب به نظر می‌رسد که جهت به دست آوردن پتانسیل حداکثری آنتی‌ژن‌های توموری همراه با HSPها لازم است شرایط بهینه‌ای که موجب القای حداکثری هر دو مولکول به طور هم‌زمان گردد، مورد ارزیابی قرار گیرد.

بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه بهترین درجه‌ی حرارت و مدت زمان انکوباسیون به منظور القای حداکثری Hsp70 و gp96 در رده‌ی سلولی K562، ۴۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و انکوباسیون به مدت ۳ ساعت و در مورد LNcap، ۴۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت بود.

در گذشته مطالعات زیادی در مورد تعیین بهترین دما و زمان انکوباسیون برای القای HSP انجام نگرفته است، با این حال در یک مطالعه که در مورد کارسینومای سلول‌های کبدی صورت گرفت، بهترین شرایط جهت بیان مولکول‌های HSP دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت نیم تا یک ساعت و به دنبال آن ۵ تا ۱۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین گردید (۲۱، ۱۶).

این نتایج خاطر نشان می‌نماید که قبل از طراحی واکسن‌های ضد توموری بر اساس HSP بهتر است که در مورد هر رده‌ی توموری اقدام به یافتن درجه‌ی حرارت بهینه و زمان مناسب انکوباسیون گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از پژوهشکده‌ی زیست فناوری دانشگاه ارومیه به عنوان تأمین کننده‌ی مالی طرح و از همکاری و مساعدت

www.mui.ac.ir

همکاران گرامی آقایان مجید عزیزی و ساسان مشکی از پژوهشکده‌ی زیست فناوری دانشگاه ارومیه و آقایان یوسف حیدرثانی و اصغر علیاری از آزمایشگاه ایمونولوژی و آقای فرهاد فرهنگ پژوه از آزمایشگاه مرکزی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Nicchitta CV, Carrick DM, Baker-Lepain JC. The messenger and the message: gp96 (GRP94)-peptide interactions in cellular immunity. Cell Stress Chaperones 2004; 9(4): 325-31.
2. Kim HJ, Lee KJ. Heat shock and ceramide have different apoptotic pathways in radiation induced fibrosarcoma (RIF) cells. Mol Cell Biochem 2002; 229(1-2): 139-51.
3. Asea A. Mechanisms of HSP72 release. J Biosci 2007; 32(3): 579-84.
4. Atalay M, Oksala N, Lappalainen J, Laaksonen DE, Sen CK, Roy S. Heat shock proteins in diabetes and wound healing. Curr Protein Pept Sci 2009; 10(1): 85-95.
5. Wang XY, Sun X, Chen X, Facciponte J, Repasky EA, Kane J, et al. Superior antitumor response induced by large stress protein chaperoned protein antigen compared with peptide antigen. J Immunol 2010; 184(11): 6309-19.
6. Singh-Jasuja H, Hilf N, Scherer HU, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, et al. The heat shock protein gp96: a receptor-targeted cross-priming carrier and activator of dendritic cells. Cell Stress Chaperones 2000; 5(5): 462-70.
7. Qu P, Ma JH, Zhang XM, Huang XJ, Yang XW, Yan-Fang S. A novel DNA vaccine constructed by heat shock protein 70 and melanoma antigen-encoding gene 3 against tumorigenesis. Indian J Exp Biol 2010; 48(5): 436-43.
8. Liu B, DeFilippo AM, Li Z. Overcoming immune tolerance to cancer by heat shock protein vaccines. Mol Cancer Ther 2002; 1(12): 1147-51.
9. Serwold T, Gaw S, Shastri N. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. Nat Immunol 2001; 2(7): 644-51.
10. Song EJ, Yim SH, Kim E, Kim NS, Lee KJ. Human Fas-associated factor 1, interacting with ubiquitinated proteins and valosin-containing protein, is involved in the ubiquitin-proteasome pathway. Mol Cell Biol 2005; 25(6): 2511-24.
11. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. J Biol Chem 2002; 277(17): 15107-12.
12. Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. Nat Rev Immunol 2002; 2(3): 185-94.
13. Ueda G, Tamura Y, Hirai I, Kamiguchi K, Ichimiya S, Torigoe T, et al. Tumor-derived heat shock protein 70-pulsed dendritic cells elicit tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and tumor immunity. Cancer Sci 2004; 95(3): 248-53.
14. Todryk SM, Eaton J, Birchall L, Greenhalgh R, Soars D, Dalgleish AG, et al. Heated tumour cells of autologous and allogeneic origin elicit anti-tumour immunity. Cancer Immunol Immunother 2004; 53(4): 323-30.
15. Arnold-Schild D, Hanau D, Spehner D, Schmid C, Rammensee HG, de la Salle H, et al. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. J Immunol 1999; 162(7): 3757-60.
16. Linderoth NA, Popowicz A, Sastry S. Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94). J Biol Chem 2000; 275(8): 5472-7.
17. Khong T, Spencer A. Targeting HSP 90 induces apoptosis and inhibits critical survival and proliferation pathways in multiple myeloma. Mol Cancer Ther 2011; 10(10): 1909-17.
18. Randazzo M, Terness P, Opelz G, Kleist C. Active-specific immunotherapy of human cancers with the heat shock protein Gp96-revisited. Int J Cancer 2012; 130(10): 2219-31.
19. Massa C, Guiducci C, Arioli I, Parenza M, Colombo MP, Melani C. Enhanced efficacy of tumor cell vaccines transfected with secretable hsp70. Cancer Res 2004; 64(4): 1502-8.
20. Tutar Y. Hsp70 in oncology. Recent Pat DNA Gene Seq 2011; 5(3): 214-8.
21. Schueller G, Stift A, Friedl J, Dubsky P, Bachleitner-Hofmann T, Benkoe T, et al. Hyperthermia improves cellular immune response to human hepatocellular carcinoma subsequent to co-culture with tumor lysate pulsed dendritic cells. Int J Oncol 2003; 22(6): 1397-402.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 30, No 179, 1st week, May 2012 Received: 2.8.2011 Accepted: 17.2.2012

Optimization of HSP-70 and Gp96 Production by Prostate and Erythroleukemia Cell Lines: Implication for Cancer Vaccine Preparation

Nowruz Delirezh[1], Pouria Malekkhatabi[2], Ghasem Akbari[2]

Abstract

Background: Heat shock proteins (HSPs) are a large family of proteins with different molecular weights and different intracellular localizations. These proteins such as Hsp70 and gp96 have a critical role in presentation of major histocompatibility complex class I (MHC-I)-restricted antigens and induction of CD8+ T cells ($TCD8^+$) responses. These surprising immunological characteristics of HSPs are now the basis for a number of clinical trials for cancer vaccination. We studied two tumor cell lines, i.e. erythroleukemia (K562) and human prostatic carcinoma (LNcap), in order to determine the best temperature that induces the optimized HSP induction.

Methods: Each cell line was heated at 3 different temperatures (41, 42, and 43ºC) for 1 hour and then incubated at 37ºC for 3, 6, and 12 hours. HSP70 production and gp96 expression were determined through flow cytometry using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit and monoclonal anti gp96, respectively.

Findings: Our results showed that the optimum temperature and incubation time for HSP70 and gp96 induction in K562 and LNcap were 43ºC for 3 hours and 43ºC for 12 hours, respectively.

Conclusion: Our results revealed that the temperature and post-heating incubation period need to be optimized for each tumor cell line before using in HSP-based tumor vaccine.

Keywords: Heat shock protein 70, Gp96, Cancer, Prostate, Erythroleukemia

[1] Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Department of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Corresponding Author: Nowruz Delirezh, Email: n.delirezh@urmia.ac.ir