مقاله پژوهشی

بیان مینی ژن‌های فاکتور ۹ انعقادی انسانی در سلول‌های کلیه انسان

محمدرضا سام*[۱]، علیرضا زمردی پور[۲]، علی‌اکبر حداد مشهد ریزه[۳]، مهدی قربانی[۴]، غلامعلی کاردر[۵]

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۳/۰۷ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۵/۱۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: نقص در عملکرد فاکتور ۹ منجر به بیماری هموفیلی B می‌گردد. استفاده از فرآورده‌های پلاسمایی جهت جلوگیری از خونریزی، خطر انتقال عوامل عفونی را افزایش می‌دهد. بنابراین امروزه استفاده از فاکتور ۹ نوترکیب، به‌عنوان جایگزین مناسب نوع پلاسمایی آن مطرح شده است. به‌منظور بیان و تولید فاکتور ۹ نوترکیب، استفاده از یک وکتور بیانی با توالی‌های تنظیمی سیس مناسب ازجمله توالی‌های اینترونی لازم است.

مواد و روش کار: ۴ وکتور پلاسمیدی بیان‌کننده فاکتور ۹ که فاقد و واجد اینترون‌های ژن بتا گلوبین (در جایگاه معادل خود در cDNA فاکتور ۹) ساخته شدند و با روش لیپوفکشن به سلول‌های Hek-293T ترانسفکت شدند. سپس کارایی پلاسمیدها در بیان فاکتور ۹ با انجام آزمون الایزا بر محیط کشت سلول‌ها در ۳ روز متوالی پس از ترانسفکشن و نیز آزمون نیمه کمی RT-PCR انجام پذیرفت.

یافته‌ها: در روز سوم پس از ترانسفکشن، بالاترین بیان فاکتور ۹ از سازه ژنی بدون اینترون و سازه ژنی دارای اینترون ۱ بتا گلوبین به‌دست آمد. در بیان فاکتور ۹، اینترون ۱ بتا گلوبین مؤثرتر از اینترون ۲ آن بود. همچنین بر مبنای نتایج RT-PCR نیمه کمی، بالاترین میزان mRNA از سازه ژنی بدون اینترون به‌دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: سازه‌های ژنی بدون اینترون و دارای اینترون ۱ ژن بتا گلوبین، کاراترین سازه‌ها در بیان فاکتور ۹ بودند. استفاده از اینترون‌های بتا گلوبین در cDNA فاکتور ۹ بیان این پروتئین را در مقایسه با سازه ژنی بدون اینترون کاهش داد. این کاهش بیان را می‌توان با احتمال، به اسپلایسینگ نادرست اینترون‌های بتا گلوبین در cDNA فاکتور ۹ نسبت داد.

کلید واژه‌ها: هموفیلی B، فاکتور ۹ انعقادی، اینترون‌های ژن بتا گلوبین، وکتور پلاسمیدی، Hek-293T

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره هفتم، ص ۵۹۷-۵۸۹، مهر ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: ارومیه، خیابان شهید بهشتی، گروه زیست‌فناوری سلولی و مولکولی، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشگاه ارومیه، تلفن: ۰۴۴-۳۳۴۴۰۱۹۹

Email: m.sam@urmia.ac.ir

مقدمه

بیماری هموفیلی B، به‌صورت مغلوب وابسته به X به ارث می‌رسد و فراوانی آن در جمعیت مردان ۱/۳۰۰۰۰ می‌باشد. فقدان و یا نقص در عملکرد فاکتور ۹ انعقادی در پلاسما منجر به این بیماری می‌گردد (۱). زندگی بیماران هموفیل B در اثر خونریزی‌های مکرر دائماً تهدید می‌شود و علت مرگ اکثر آن‌ها خونریزی‌های شدید می‌باشد. جهت جلوگیری از این خونریزی‌ها از فاکتور ۹ پلاسمایی و یا نوع نوترکیب آن استفاده می‌شود. اگرچه استفاده از فرآورده‌های پلاسمایی کارایی بالایی را نشان می‌دهند، اما خطر ابتلا به بیماری‌های عفونی ازجمله هپاتیت A، B، C و ایدز را نیز افزایش می‌دهند (۲).

با پیشرفت بیوتکنولوژی، استفاده از فاکتور ۹ نوترکیب که در سلول‌های تخمدانی هامستر چینی بیان شده بود، به‌عنوان جایگزین مناسب و سالم فاکتور ۹ پلاسمایی موردتوجه قرار گرفت (۳). در این زمینه هزینه‌های بالای تولید پروتئین‌های نوترکیب و نیز بیان اندک فاکتور ۹ در رده‌های سلولی پستانداران منجر به قیمت بالای تمام

[۱] گروه بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)
[۲] گروه ژنتیک مولکولی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
[۳] گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[۴] گروه ژنتیک مولکولی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
[۵] گروه آسم و آلرژی، مرکز طبی کودکان دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2022-08-09]

شده این فرآورده دارویی جهت بیماران نیازمند در کشورهای درحال‌توسعه شده است و استفاده از این ترکیبات را در این کشورها ازجمله ایران محدود کرده است (۴). بنابراین استفاده از یک رده سلولی مناسب به‌عنوان یک بیوراکتور و یک سازه ژنی کارا در بیان بالای فاکتور ۹ می‌تواند در کاهش هزینه‌های تولید این پروتئین نوترکیب مؤثر واقع شود.

در موجودات عالی تنظیم بیان ژن‌ها به‌دقت در سطوح مختلف ازجمله رونویسی، پس از رونویسی، ترجمه و پس از ترجمه توسط مجموعه عوامل مختلف مولکولی با فعالیت‌های تنظیمی سیس و ترانس کنترل می‌شود (۵). اختلال در این عناصر منجر به برهم خوردن تنظیم بین یک ژن می‌گردد که نتیجه آن بروز بیماری خواهد بود. لذا با شناسایی این عناصر و استفاده از آن‌ها در موقعیت‌های مناسب در وکتورهای ویروسی یا غیر ویروسی می‌توان در جهت بهبود بیان ژن باهدف ژن‌درمانی و یا تولید پروتئین نوترکیب اقدام کرد. اینترون‌ها ازجمله توالی‌های تنظیمی می‌باشند که می‌توانند با روش‌های متنوعی بر سطوح تنظیمی بیان ژنی در مراحل مختلف مؤثر باشند. نشان داده شده است که در حضور اینترون یا بخشی از آن در حالت‌های همولوگ و یا هترولوگ در مجاورت ژن، بیان ژن تا ۵۰۰ برابر افزایش می‌یابد (۷، ۶) دراین‌ارتباط محققین با استفاده از اینترون‌های ژن β- گلوبین انسانی بیان بالاتری از فاکتور ۹ را به‌دست آوردند (۹، ۸). در اکثر مطالعات به‌منظور افزایش بیان یک ترانسژن، توالی‌های اینترونی در بالادست ترانسژن قرار داده می‌شوند. در این زمینه توجه اندکی به مطالعه اثرات توالی‌های اینترونی هترولوگ در جایگاه معادل خود در cDNA ترانسژن شده است. لذا قرار دادن توالی‌های اینترونی هترولوگ β- گلوبین در جایگاه معادل خود در cDNA فاکتور ۹ ممکن است اثرکرد بهتری در بیان فاکتور ۹ ایفا نماید. با این پیش‌فرض، در این پژوهش، به ۴ وکتور پلاسمیدی نوترکیب ساخته شده در مطالعه قبلی ما که دارای اینترون‌های ژن بتا گلوبین در cDNA فاکتور ۹ بودند (۹) توالی کوزاک (GCCACC) قبل از کدون شروع ترجمه به‌منظور بالا بردن کارایی ترجمه رونوشت ژن افزوده گردید و وکتورهای حاصله به رده سلولی Hek-293T که مدل مناسبی از سلول‌های پستاندار است، انتقال داده شدند تا اثر توالی‌های اینترونی β- گلوبین بر بیان فاکتور ۹ انسانی به‌صورت سیستماتیک و مقایسه‌ای موردمطالعه قرار گیرد.

مواد و روش کار

سوش باکتری، رده سلولی پستاندار، پلاسمیدها و پرایمر:

از باکتری اشریشیا کلی DH5α (استراتژن، آمریکا) جهت مراحل مختلف کلونینگ استفاده گردید. از پلاسمید بیانی pcDNA3 (اینویتروژن- آمریکا) به‌عنوان وکتور پایه برای طراحی سازه‌های بیانی فاکتور ۹ در رده سلولی Hek-293T استفاده گردید. رده سلولی Hek-293T (بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) به‌عنوان میزبان سلولی پستاندار جهت بیان فاکتور ۹ مورداستفاده قرار گرفت. وکتورهای نوترکیب pKhFIX (واجد فاکتور ۹)، pKhFIX-I (واجد اینترون ۱ از ژن بتا گلوبین)، pKhFIX-II (واجد اینترون ۲ از ژن بتاگلوبین) و pKhFIX-I,II (واجد اینترون ۱ و ۲ از ژن بتا گلوبین) که در مطالعه قبلی ما ساخته شده بودند (۹) به‌عنوان وکتور پایه جهت ساخت وکتورهای دارای توالی کوزاک استفاده گردیدند. پرایمرهای استفاده‌شده در این پژوهش توسط شرکت آلمانی MWG سنتز گردیدند. توالی‌های پرایمری و کاربردهای آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

محیط کشت، آنزیم‌ها، مواد شیمیائی و کیت‌ها:

محیط کشت LB به‌عنوان محیط کشت باکتری استفاده شد. آمپی‌سیلین، با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در صورت نیاز به محیط کشت انتخابی افزوده شد. آنزیم‌های *Not*1، *Dra*1، T4 DNA ligase، کیت‌های تخلیص محصول PCR، پلاسمید و عامل ترانسفکشن فیوجن ۶ از شرکت رش آلمان خریداری شدند. آنزیم *BamH*1 از شرکت فرمنتاس خریداری شد. محیط کشت سلولی RPMI-1640 و سرم جنین گاو (FBS) از شرکت گیبکو آمریکا خریداری شدند.

دستورزی‌های DNA:

دستورزی‌های DNA بر اساس روش‌های استاندارد کلونینگ انجام شد. جهت ساخت مینی ژن‌های دارای توالی کوزاک، سازه‌های نوترکیب pKhFIX، pKhFIX-I، phFIX-II و pKhFIX-I,II به‌عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفتند. الحاق توالی کوزاک به ابتدای cDNA ژن فاکتور ۹ با قرار دادن این توالی در ابتدای '۵ پرایمر hKozF9-F امکان‌پذیر شد. به‌منظور انجام عمل کلونینگ در انتهای '۵ پرایمرهای hKozF9-F و hFIXE4-R به‌ترتیب جایگاه‌های آنزیمی *BamH*1 و Dra1 قرار داده شد. درستی توالی‌های همسانه شده در وکتور بیانی pcDNA3، با استفاده از روش سنگر به‌صورت اتوماتیک و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط شرکت MWG آلمان معلوم گردید (شکل ۱).

کشت سلولی و ترانسفکشن:

رده سلولی کلیوی Hek-293T پس از تکثیر در فلاسک ۵۰ میلی‌لیتری و شستشو با بافر فسفات استریل (PBS) و تیمار با آنزیم تریپسین از کف فلاسک جدا شدند. پس از خنثی‌سازی آنزیم تریپسین توسط محیط کشت سرم دار، سلول‌ها شستشو داده شدند و به تعداد ۳×۱۰^{۵} به ازای هر خانه در پلیت‌های ۶ خانه‌ای توزیع شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت که ۵۰ درصد سطح حفره پلیت

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2022-08-09]

توسط سلول‌ها پر شده بود، ترانسفکشن با روش لیپوفکشن در پلیت‌های ۶ خانه‌ای به شرح ذیل انجام شد. ابتدا ۶ میکرولیتر فیوجین ۶ را با محیط کشت فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک به حجم نهائی ۱۰۰ میکرولیتر رسانده و پس از مخلوط کردن به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد. سپس به مجموعه ذکر شده ۲ میکروگرم DNA پلاسمیدی اضافه شد. نمونه مخلوط شده و به مدت ۴۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد. محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه حاوی ۱ درصد سرم جنین گاو و فاقد آنتی‌بیوتیک تعویض شد و مخلوط ترانسفکشن به‌صورت قطره‌ای به سلول‌ها اضافه شد و واکنش ترانسفکشن به مدت ۵ ساعت دیگر ادامه یافت. سپس این محیط با محیط تازه دارای ۱۰درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک به میزان لازم تعویض شد. پلیت موردنظر در انکوباتور ^{o}C ۳۷ و ۵درصد CO_2 قرار داده شد. سپس مایع روئی (سوپرناتانت) این سلول‌ها جهت بررسی پروتئین فاکتور ۹ در ۳ متوالی پس از ترانسفکشن جمع‌آوری گردید.

روش ساندویچ الایزا:

اندازه‌گیری میزان کمی فاکتور ۹ با روش ساندویچ الایزا انجام شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت رویی سلول‌ها که در روزهای مختلف جمع‌آوری گردیده بود به چاهک‌های پلیتی که از آنتی‌بادی پلی کلونال ضد فاکتور ۹ پوشیده شده بود افزوده شد. پس از پوشاندن سطح پلیت با یک پوشاننده پلاستیکی، پلیت به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید و در پایان مدت انکوباسیون پلیت ۵ بار با محلول شستشو، شسته شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه پلی کلونال خرگوشی که با آنزیم پراکسیداز نشان‌دار شده بود و به شاخص آنتی‌ژنی دیگری از فاکتور ۹ متصل می‌شد افزوده گشت. پلیت به مدت یک ساعت دیگر در دمای اتاق انکوبه شد؛ و در پایان این مدت ۵ بار با محلول شستشو شسته شد و به هر چاهک به میزان ۵۰ میکرو لیتر محلول کروموژن تترا متیل بنزیدین (TMB) به‌عنوان سوبسترا افزوده شد و در دمای اتاق و تاریکی به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، واکنش توسط ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده که اسیدسولفوریک ۰٫۵ نرمال بود متوقف شد و بلافاصله جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه خواننده الیزا در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. همچنین محیط کشت سلول‌های ترانسفکت نشده به‌عنوان کنترل منفی مورد آزمایش قرار گرفت. سپس با رسم نمودار استاندارد میزان فاکتور ۹ از نمودار تمام لگاریتمی بر مبنای ng/ml محاسبه گردید.

واکنش RT-PCR نیمه کمی:

در روز سوم پس از ترانسفکشن سلول‌های Hek-293T، RNA تام از سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های ژنی نوترکیب و سلول‌های ترانسفکت نشده با استفاده از کیت تخلیص RNA استخراج شد. سپس سنتز cDNA توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MulV با استفاده از RNA استخراج‌شده به‌عنوان الگو و پرایمرهای هگزامر انجام پذیرفت. پس از سنتز cDNA، ۳ میکرولیتر از واکنش فوق به‌عنوان الگوی تکثیری در واکنش PCR با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی hFIXE1-F و hFIX-R2 استفاده گردید. به‌عنوان کنترل داخلی و نرمالیزه کردن واکنش‌های RT-PCR انجام شده، از cDNA تکثیرشده بتا اکتین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی β actin-F و β actin-R استفاده شد.

محاسبات آماری

جهت مقایسه میانگین نتایج کمی در بررسی بیان پروتئین فاکتور ۹ از آزمون آنالیز واریانس توکی پست هاک استفاده گردید. در همه محاسبات فوق *P*-value کم‌تر از ۰٫۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی بیان فاکتور ۹ در سطح پروتئین:

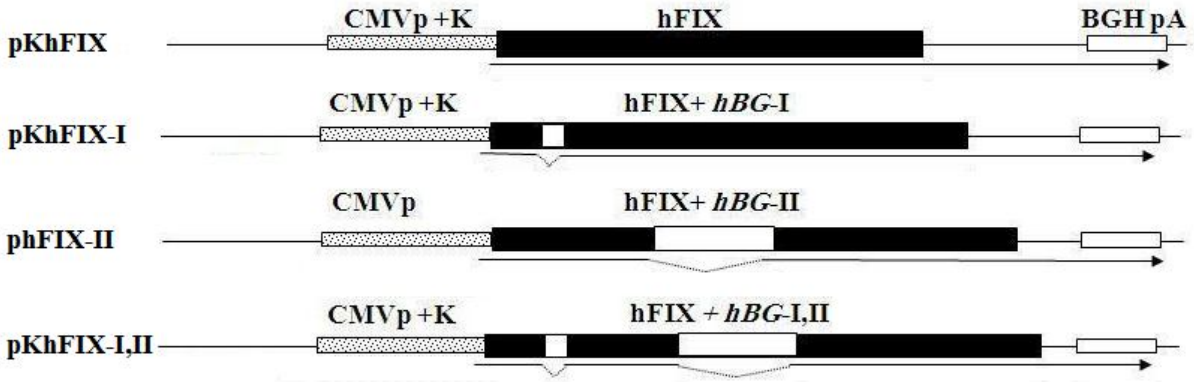
بر مبنای نتایج به‌دست آمده از آزمون الایزا، سطح بیان فاکتور ۹ در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با pKhFIX بیش از سلول‌های ترانسفکت شده با سایر سازه‌های ژنی بود. در روز سوم پس از ترانسفکشن، میزان فاکتور ۹ بر مبنای $۱۰^{۶}$ سلول در سازه‌های ژنی pKhFIX، pKhFIX-I، phFIX-II و pKhFIX-I,II به‌ترتیب ۴۳/۶، ۲۹/۳، ۱۶/۶ و ۱۳/۴ نانوگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. در سلول‌های ترانسفکت نشده (کنترل منفی) بیان فاکتور ۹ صفر ارزیابی شد. بر مبنای نتایج به‌دست آمده، سازه ژنی بدون اینترون و سازه ژنی دارای اینترون ۱ ژن بتا گلوبین کاراترین سازه‌ها در بیان و ترشح فاکتور ۹ به محیط کشت بودند. در این زمینه، مقایسه سازه‌های ژنی در بیان فاکتور ۹ در شکل ۲ و تفاوت‌های آماری آن‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

بررسی بیان فاکتور ۹ در سطح Mrna:

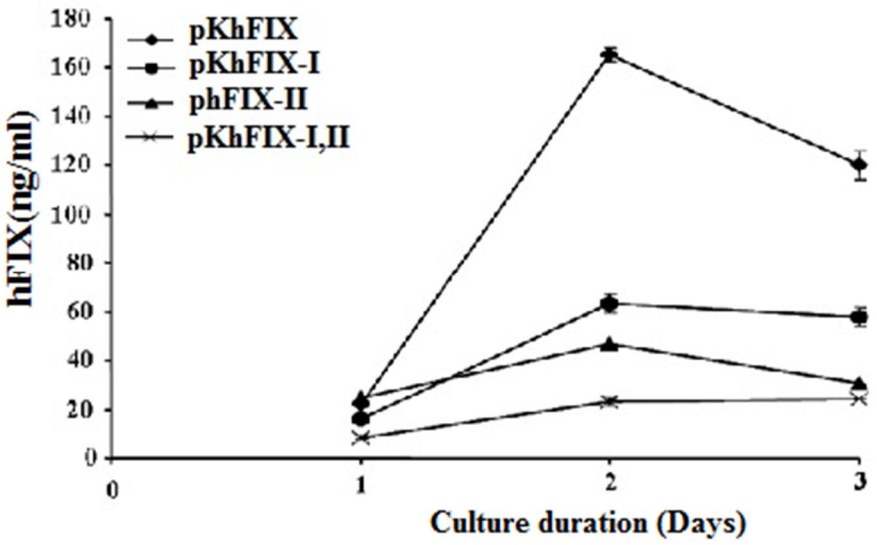
در این مطالعه، ساختارهای کایمریک مختلفی به طریقه دستورزی‌های ژنتیکی جهت ساخت سازه‌های ژنی بیان‌کننده فاکتور ۹ ساخته شدند که بیان‌های مختلفی از فاکتور ۹ از هرکدام از آن‌ها به‌دست آمد که می‌توان بیان‌های مختلف فاکتور ۹ را به سطوح مختلفی از mRNA بالغ ایجادشده توسط هرکدام از سازه‌های ژنی ساخته شده نسبت داد. لذا ایجاد mRNA بالغ از ساختارهای کایمریک فوق بر ترشح فاکتور ۹ به محیط کشت مؤثر است. با این هدف، بررسی نیمه کمی بیان در سطح mRNA و نیز بررسی اسپلایسینگ اینترون‌های ۱ و ۲ ژن بتاگلوبین در جایگاه معادل خود در cDNA ژن فاکتور ۹، به‌عنوان اینترون‌های هترولوگ، آزمون

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2022-08-09]

RT-PCR انجام شد. الگوی الکتروفورتیک محصولات RT- PCR در سازه‌های ژنی دارای اینترون‌های ا و ۲ ژن بتا گلوبین انسانی در مقایسه با سازه ژنی بدون اینترون به‌خوبی نشان می‌دهد که رویداد اسپلایسینگ در اینترون‌های ژن بتا گلوبین انسانی در جایگاه معادل خود در cDNA فاکتور ۹ به‌طور ناقص و نابجا انجام می‌پذیرد. این در حالی است که باند mRNA صحیح و بالغ ایجادشده در سازه‌های ژنی دارای اینترون‌های ۱ و ۲ ژن بتا گلوبین در مقایسه با سازه ژنی بدون اینترون از شدت کم‌تری برخوردار هستند (شکل ۳). ازآنجاکه بیان فاکتور ۹ در سازه ژنی بدون اینترون بالاتر از سایر سازه‌های ژنی دارای اینترون بوده است در این مرحله با توجه به نیمه کمی بودن آزمون RT-PCR نشان داده شد که در سازه ژنی بدون اینترون مقادیر mRNA بالغ بیشتری نسبت به سایر سازه‌های ژنی دارای اینترون حاصل شده است که درنتیجه ترجمه آن‌ها به پروتئین، بیان بالاتری از فاکتور ۹ را در خارج سلول‌ها فراهم کرده است.

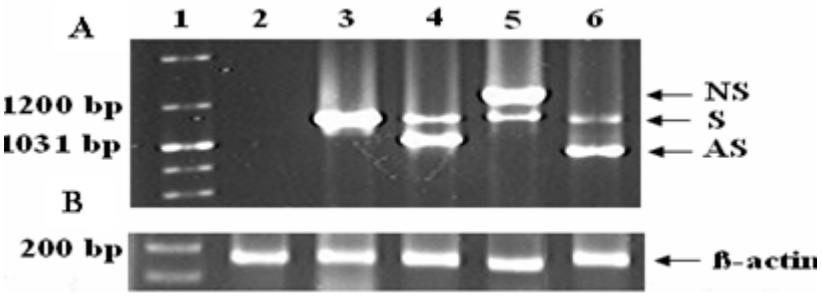


شکل (۱): ساختارهای بیانی فاکتور ۹ در وکتور pcDNA3. hBG-I: اینترون ۱ بتا گلوبین، hBG-II: اینترون ۲ بتا گلوبین، hBG-I,II: اینترون ۱ و ۲ بتا گلوبین. (اینترون‌های ژن بتا گلوبین در جایگاه‌های معادل خود در cDNA فاکتور ۹ قرار داده شدند و درستی سازه‌های ژنی ساخته شده با تعیین توالی مشخص شد. K: توالی کوزاک.: Bovine growth hormone polyadenylation signal sequence BGHpA



شکل (۲): تعیین میزان فاکتور ۹ با روش الایزا در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده Hek-293T در ۳ روز متوالی پس از ترانسفکشن گذرا. مقادیر نشان داده شده، میانگین بیان فاکتور ۹ ± انحراف معیار پس از دو بار تکرار آزمایش می‌باشد. تفاوت‌های آماری در بیان فاکتور ۹ در روز سوم پس از ترانسفکشن بین سازه‌های ژنی مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2022-08-09]



شکل (۳): الگوی الکتروفورزی محصولاتRT-PCR. پانل A: ردیف ۱. DNA سایز مارکر 1 kb، ردیف ۲. سلول‌های Hek-293T ترانسفکت نشده (کنترل منفی)، ردیف ۳، ۴، ۵ و ۶. به‌ترتیب سلول‌های Hek-293T ترانسفکت شده با وکتورهای نوترکیب pKhFIX، phFIX-II، phKFIX-I و pKhFIX-I, II. پانل B: cDNA تکثیرشده بتا اکتین مربوط به سلول‌های ترانسفکت نشده و ترانسفکت شده در هر ردیف.

NS: non-spliced product, S: spliced product, AS: aberrant spliced product

جدول (۱): پرایمرهای استفاده‌شده در این مطالعه.

کاربرد	توالی پرایمر (' ۵ به '۳)	پرایمر
تکثیر cDNA فاکتور ۹ از اگزون ۱ تا ۴	GGATCCGCCACCATGCAGCGCGTGAACATGAT	hKozF9-F
	CCTTGCAACTGCCGCCATTTAAAC	hFIXE4-R
بررسی اسپلایسینگ اینترون‌های بتا گلوبین از	GGATCCGTTATGCAGCGCGTGAACATGATC	hFIXE1-F
مولکول mRNA	GAAGCTTTCTCCCTTTGTGGAAGACTCTTCCC	hFIX-R2
تکثیر بخشی از cDNA بتا اکتین به‌منظور انجام	GAGACCTTCAACACCCCAGCC	β actin-F
آزمون نیمه کمی RT-PCR	AGACGCAGGATGGCATGGG	β actin-R

توالی کوزاک به‌صورت مورب (ایتالیک) در پرایمر hKozF9-F نشان داده شده است.

جدول (۲): مقایسه پلاسمیدهای نوترکیب در بیان فاکتور ۹ در روز سوم پس از ترانسفکشن گذرا

plasmids		Fold (hFIX expression level)	P-value
pKhFIX vs.	pKhFIX-I	1.5	0.002
	phFIX-II	2.6	0.000
	pKhFIX-I,II	3.3	0.000
pKhFIX-I vs.	phFIX-II	1.7	0.003
	pKhFIX-I,II	2.2	0.001
phFIX-II vs.	pKhFIX-I,II	1.2	0.2

بحث و نتیجه‌گیری

در موجودات عالی تنظیم بیان یک ژن به‌دقت در سطوح مختلف رونویسی، پس از رونویسی، ترجمه و پس از ترجمه روی می‌دهد (۵). تلفیقی از توالی‌های تنظیمی سیس که در سطوح مختلف رونویسی، پس از رونویسی، ترجمه و پس از ترجمه نقش دارند، ممکن است نتایج امیدوارکننده‌تری را در بیان یک ترانسژن فراهم کند. توالی‌های تنظیمی سیس مورد استفاده در این پروژه تحقیقاتی، پروموتر قدرتمند ویروسی CMV، اینترون‌های بتا گلوبین انسانی و

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2022-08-09]

توالی کوزاک بودند که هرکدام از آن‌ها در مرحله‌ای از تنظیم بیان یک ترانسژن نقش دارند. در این راستا در مطالعه اخیر باهدف بررسی مقایسه‌ای اثر توالی‌های مذکور به‌صورت انفرادی و یا تلفیق‌های مختلفی از آن‌ها بر بیان فاکتور ۹، ۴ سازه ژنی نوترکیب ساخته شدند و توسط روش لیپوفکشن به سلول‌های Hek-293T ترانسفکت گردیدند.

بر مبنای نتایج به‌دست آمده از آزمون الایزا، میزان ترشح فاکتور ۹ به محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های ژنی مختلف در رده سلولی استفاده‌شده متفاوت بود که احتمالاً بیانگر نقش توالی‌های مختلف تنظیمی سیس بکار رفته در هر وکتور بیانی است که موجب تفاوت در مراحل مختلف تنظیمی ازجمله رونویسی، پس از رونویسی، ترجمه و ترشح می‌گردند.

نشان داده شده است که با بکار بردن توالی‌های اینترونی با منشأ اتولوگ، هترولوگ و سنتتیک بیان ترانسژن در In-vitro و In-vivo افزایش می‌یابد (۱۲-۱۰، ۶). Kurachi و همکارانش با بکار بردن اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ در cDNA آن بیان آن را افزایش دادند (۷). در این زمینه، در موش ترانسژنیک استفاده از توالی کامل اینترون ۱ ژن فاکتور ۹ (۶/۲ kb) و یا بخشی از آن (۱/۴ kb) بیان فاکتور ۹ را به‌ترتیب ۴۰ و ۲۰۰ برابر کرد (۱۳). در همین راستا، اثرات مثبت توالی‌های اینترونی بتا گلوبین به‌عنوان اینترون‌های هترولوگ بر بیان ترانسژن‌های مختلف اثبات شده است (۱۴، ۸، ۶). Noe و همکارانش با قرار دادن اینترون ۱ ژن بتا گلوبین انسانی در جایگاه معادل خود در cDNA ژن دی هیدروفولات ردوکتاز، بیان این پروتئین را حتی بیش از اینترون ۱ خود این ژن در In-vitro افزایش دادند (۶). اخیراً Harding و همکارانش با قرار دادن اینترون ۲ ژن بتا گلوبین بین پروموتر اختصاصی کبدی و cDNA فاکتور ۹ بیان این پروتئین را تا ۸۵ برابر در In-vivo افزایش دادند.[۸] در مطالعه دیگری Palmiter و همکارانش با قرار دادن اینترون ۲ ژن بتا گلوبین، بین پروموتر متالوتیونین I و cDNA هورمون رشد، بیان آن را به‌طور چشمگیری در سطح mRNA در In-vivo بهبود بخشیدند (۱۰). در مطالعات مشابهی معرفی اینترون ۱ و ۲ ژن بتا گلوبین خرگوش به‌ترتیب در وکتورهای دارای cDNA فاکتور ۸ و سرولوپلاسمین بیان این پروتئین‌ها افزایش یافت (۱۵، ۱۴).

بااین‌وجود در اکثر مطالعات فوق‌الذکر توالی‌های اینترونی در بالادست cDNA ترانسژن قرار داده شده بودند و توجه اندکی به قرار دادن توالی‌های اینترونی بتا گلوبین در ناحیه معادل خود در cDNA ترانسژن شده بود. منطقی است که تصور کنیم اینترون‌ها در جایگاه معادل خود بهتر و مؤثرتر عمل نمایند. با این فرضیه، در مطالعه ما اینترون‌های ژن بتا گلوبین انسانی در جایگاه معادل خود در cDNA فاکتور ۹ قرار داده شدند و به سلول‌های Hek-293T ترانسفکت گردیدند. در این زمینه نتایج نشان داده شده است که بیان فاکتور ۹ در سلول‌های CHO از سازه‌های ژنی دارای اینترون ۲ و اینترون ۱ و ۲ با هم، به‌ترتیب ۵ و ۲۵ برابر در مقایسه با سازه ژنی بدون اینترون افزایش می‌یابد (۹).

برخلاف انتظار نتایج قبلی گروه و سایر محققینی که از اینترون‌های ژن بتا گلوبین به‌عنوان توالی‌های تنظیمی در سازه‌های ژنی خود جهت افزایش بیان فاکتور ۹ استفاده کرده بودند (در بالا به آن‌ها اشاره گردید)، در مطالعه ما، معرفی اینترون ۱ و ۲ ژن بتا گلوبین به‌طور جداگانه و به‌طور هم‌زمان در جایگاه‌های معادل خود در cDNA فاکتور ۹ به‌طور چشمگیری بیان فاکتور ۹ را در مقایسه با سازه ژنی بدون اینترون در سلول‌های Hek-293T کاهش داد. بر مبنای نتایج به‌دست آمده از آزمون RT-PCR توالی‌های رونویسی شده از سازه‌های ژنی دارای اینترون‌های ژن بتا گلوبین به‌طور مناسب پردازش نمی‌شوند که می‌توان بیان کاهش‌یافته فاکتور ۹ را به آن‌ها نسبت داد. با در نظر گرفتن این واقعیت که توالی‌ها و ساختارهای اطراف اینترون‌ها و نیز ماهیت اینترون‌ها جهت کارایی اسپلایسینگ مهم می‌باشند، ممکن است ساختار کایمریک ایجادشده با معرفی اینترون‌های ژن بتا گلوبین شرایط مناسبی را برای اسپلایسینگ درست این توالی‌ها فراهم نمی‌کند. غالباً اینترون‌های هترولوگ به‌مانند اینترون‌های طبیعی خود ژن به‌طور مؤثری بریده نمی‌شوند. در این رابطه نشان داده شده است که اینترون ۱ ژن-β گلوبین و اینترون ۳ ژن آدنین فسفو ریبوزیل ترانسفراز به‌عنوان اینترون‌های هترولوگ در cDNA ژن دی هیدروفولات ردوکتاز به‌طور مناسب بریده نمی‌شوند (۶). بنابراین وجود اسپلایسینگ نادرست در رونوشت‌های حاصل از سازه‌های ژنی دارای اینترون‌های بتا گلوبین می‌تواند موجب نقص در بیان پروتئین نوترکیب از سلول‌های Hek-293T گردد. در این مرحله می‌توان کاهش بیان فاکتور ۹ را به ترکیبی از ساختار کایمریک ایجادشده در سازه ژنی نوترکیب و نوع سلول میزبان بر عملکرد و سرنوشت اینترون‌های معرفی شده نسبت داد. البته نتایج به‌دست آمده در این پروژه تحقیقاتی که به‌صورت In vitro بوده است، ممکن است لزوماً با نتایج حاصله در شرایط In vivo مطابقت نداشته باشد. بنابراین در ادامه مطالعه فوق، بررسی کارایی سازه‌های ژنی نوترکیب ساخته شده در In vivo پیشنهاد می‌گردد. در این رابطه می‌توان به نتایج به‌دست آمده توسط Brinster و همکاران اشاره کرد که نشان دادند که اینترون‌ها، موجب افزایش بیان ژن‌ها در In vivo می‌گردند و در In vitro کارایی مناسبی ندارند (۱۶). عدم هم‌خوانی نتایج به‌دست آمده از بیان ژن‌ها با بکار بردن اینترون‌ها در In vitro و In vivo توسط محققین دیگری نیز گزارش شده است (۱۷).

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2022-08-09]

بر مبنای نتایج به‌دست آمده از آزمون الایزا و آزمون نیمه کمی RT-PCR در میان ۴ سازه ژنی نوترکیب ساخته شده، وکتورهای pKhFIX و pKhFIX-I کاراترین سازه‌های ژنی در بیان فاکتور ۹ در in-vitro می‌باشد. بااین‌وجود بررسی کارایی سازه‌های ژنی ساخته شده در in-vivo که اهمیت بسزایی دارد پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت دانشگاه ارومیه انجام شده است که بدین‌وسیله نویسندگان مقاله حاضر از مسئولین محترم تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

1. Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias from royal genes to gene therapy. N Engl J Med 2001; 344: 1773-79.
2. Roth DA, Kessler CM, Pasi KJ, Rup B, Courter SG, Tubridy KL. Recombinant Factor IX Study Group. Human recombinant factor IX: safety and efficacy studies in hemophilia B patients previously treated with plasma-derived factor IX concentrates. Blood 2001; 15: 3600-06.
3. Kaufman RJ, Wasley LC, Furie BC, Furie B, Shoemaker CB. Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem 1986; 261: 9622-28.
4. Saenko EL, Ananyeva NM, Shima M, Hauser CA, Pipe SW. The future of recombinant coagulation factors. J Thromb Haemost 2003; 1(5): 922-30.
5. Xu ZL, Mizuguchi H, Mayumi T, Hayakawa T. Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulation element enhances transgene expression from adenovirus vectors. Biochim Biophys Acta 2003; 1621: 266-71.
6. Noé V, MacKenzie S, Ciudad CJ. An intron is required for dihydrofolate reductase protein stability. J Biol Chem 2003; 278: 38292-300.
7. Kurachi S, Hitomi Y, Furukawa M, Kurachi K. Role of intron I in expression of the human factor IX gene. J Biol Chem 1995; 270: 5276-81.
8. Harding TC, Koprivnikar KE, Tu GH, Zayek N, Lew S, Subramanian A, et al. Intravenous administration of an AAV-2 vector for the expression of factor IX in mice and a dog model of hemophilia B. Gene Ther 2004; 11: 204-13.
9. Haddad-Mashadrizeh A, Zomorodipour A, Izadpanah M, Sam MR, Ataei F, Sabouni F, et al. A systematic study of the function of the human beta-globin introns on the expression of the human coagulation factor IX in cultured Chinese hamster ovary cells. J Gene Med 2009; 11: 941-50.
10. Palmiter RD, Sandgren EP, Avarbock MR, Allen DD, Brinster RL. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 478-82.
11. Nott A, Meislin SH, Moore MJ. A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. RNA 2003;9(5):607–17.
12. Lacy-Hulbert A, Thomas R, Li XP, Lilley CE, Coffin RS, Roes J. Interruption of coding sequences by heterologous introns can enhance the functional expression of recombinant genes. Gene Ther 2001;8(8):649–53.
13. Jallat S, Perraud F, Dalemans W, et al. Characterization of recombinant human factor IX expressed in transgenic mice and in derived trans-immortalized hepatic cell lines. EMBO J 1990; 9: 3295-301.
14. Ill CR, Yang CQ, Bidlingmaier SM, Gonzales JN, Burns DS, Bartholomew RM, Scuderi P. Optimization of the human factor VIII complementary DNA expression plasmid for gene therapy of hemophilia A. Blood Coagul Fibrinolysis 1997; 8: 23–30.
15. Rafiq M, Suen CK, Choudhury N, Joannou CL, White KN, Evans RW. Expression of recombinant

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2022-08-09]

efficiency in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 836-40.

17. Miao CH, Ye X, Thompson AR. High-level factor VIII gene expression in vivo achieved by nonviral liver-specific gene therapy vectors. Hum Gene Ther 2003; 14: 1297-305.

human ceruloplasmin: an absolute requirement for splicing signals in the expression cassette. FEBS Lett 1997; 407: 132-6.

16. Brinster RL, Allen JM, Behringer RR, Gelinas RE, Palmiter RD. Introns increase transcriptional

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2022-08-09]

Original Article

EXPRESSION OF THE HUMAN COAGULATION FACTOR IX MINIGENES IN CULTURED HUMAN KIDNEY CELLS

Mohammad Reza Sam[1], Alireza Zomorodipour[2], Alikabar Haddad-Mashadrizeh[3], Mahdi Ghorbani[4], Golam Ali Kardar [5]*

Received: 28 May, 2016; Accepted: 3 Aug, 2016

Abstract

Background & aims: Hemophilia B is caused by either functional deficiency or lack of the human coagulation factor IX (hFIX). The current protein-based therapy with plasma-derived proteins increases, the risk of blood-borne pathogens transmission. Therefore, replacement therapy with recombinant hFIX (rhFIX) is an attractive alternative to plasma derived hFIX concentrates. In order to express and produce rhFIX protein, an efficient expression vector with suitable *cis*-regulatory elements such as intronic sequences is required.

Materials & Methods: Four *hFIX*-expressing plasmids with or without human β-globin *(hBG)* introns (intron I and intron II) inside the *hFIX-cDNA* and the Kozak element were constructed and introduced into the Hek-293T cells using transfection method. Next, the efficacies of the plasmids were evaluated by performing ELISA on cultured media during 3 days of post-transfection as well as semi-quantitative RT-PCR.

Results: The highest hFIX expression levels were obtained from the intron-less and intron-I containing plasmids after 3 days of transfection. The first *hBG* intron was more effective than the second one. Furthermore, the highest mRNA level was obtained from the intron-less construct.

Conclusion: Intron-less and intron-I containing plasmids were more effective compared to other constructs for expression of hFIX. Application of the *hBG* intronic sequences reduced the hFIX expression levels, probably due to improper splicing of the *hBG* introns from the hFIX pre-mRNAs.

Keywords: Hemophilia B, Human coagulation factor IX, human β-globin (hBG) introns, Plasmid vectors, Hek-293T

Address: Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Shahid Beheshti Street, Urmia, Iran. P. O. Box: 165.
Tel: +98-4433440199
E-mail: m.sam@urmia.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2016: 27(7): 597 ISSN: 1027-3727

[1] Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)
[2] Department of Molecular Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
[3] Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[4] Department of Molecular Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
[5] Immunology Asthma and Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2022-08-09]