

Optimizing of Large T Antigen for Designing and Constructing Episomal Plasmid Based on Mutated Large T Antigen Simian Virus 40

Mohammad Reza Asgharzadeh¹, Seyed Mohammad Atyabi*², Hossein Khan Ahmad Sharza³, Somaye Asgharzadeh⁴, Akbar Jalili⁵, Reza Ahanghari Cohan⁶, Davod Nouri Inanlo⁷

¹Department of Genetic, Science and Research Campus, School of Medicine, Islamic Azad University, Tehran, Iran ²Department of Biophysics, Research and Development Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
³Department of Biotechnology, BCG Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran ⁴Department of Chemistry, School of Sciences, Zanzan University, Zanzan, Iran ⁵Department of Genetic, School of Medicine, Islamic Azad University, Ahar, Iran ⁶Department of Biotechnology, Research and Development Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran ⁷Department of Genetic, Research and Development Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

* Corresponding Author. Tel: +989122061565 Fax: +982166953311 E-mail: mohammadatyabi@yahoo.com

Received: 5 June 2012 Accepted: 20 May 2013

ABSTRACT

Background & Objective: Gene therapy and administration of recombinant protein are common approach in treatment of genetic disorders. But many obstacles including frequent administration of desired gene, random integration into the host genome and low expression of protein encourage scientists to design an episome which remains in high copy number in eukaryotic cells and produces desired protein in suitable manner by viral proteins. The aim of this study is designing and construction of a plasmid containing mutated large T antigen of SV40 to develop a safe vector with high replication.

Methods: Suitable mutant for creating large T antigen was analyzed by MODELLER software and finally appropriate structures were selected. Target mutation was created in the nucleotide sequence of large T antigen by PCR method. Mutated large T antigen gene was cloned in to the IRES2-EGFP. All clones were analyzed by PCR, restriction analysis and sequencing. HEK293 and CHO cell lines were transfected by final construct and transfected cells were observed by fluorescent microscope for 40 days. Plasmid and genomic DNA were extracted from remained cells and overlap PCRs performed on them to confirm their circularity.

Result: This plasmid, containing a mutated large T antigen of SV40, can be replicated in eukaryotic cells and then can be used in gene therapy and recombinant protein production with high safety.

Conclusion: The results of PCR, restriction analysis and sequencing confirm the authenticity of construct. The transfection of HEK293 and CHO cell lines showed replication of constructed plasmid in them.

Keywords: Large T antigen, SV40, Eukaryotic cell

بهبود سازی آنتی ژن T برای طراحی و ساخت پلاسمید اپی زومال بر مبنای آنتی ژن T ویروس سیمین ۴۰ موتانت

محمد رضا اصغرزاده^۱، سید محمد اطمینانی^{۲*}، حسین خان احمد شهرضا^۳، سمیه اصغرزاده^۴، اکبر جلیلی^۵،
رضا آهنگری کهن^۶، داوود نوری اینانلو^۷

^۱ گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران ^۲ گروه بیوفیزیک، بخش تحقیق و توسعه، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران ^۳ گروه بیوتکنولوژی، بخش ب ث ژ، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران ^۴ گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران ^۵ گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران ^۶ گروه بیوتکنولوژی، بخش تحقیق و توسعه، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران ^۷ گروه ژنتیک، بخش تحقیق و توسعه، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

*نویسنده مسئول. تلفن: +۹۸۹۱۲۲۰۶۱۵۶۵ فاکس: ۰۲۱۶۶۹۵۳۳۱۱ پست الکترونیک: mohammadatyabi@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: ژن درمانی و تجویز پروتئین های نوترکیب از روش های معمول در درمان بیماری های ژنتیکی می باشد. اما موانع موجود در این دو روش مانند تجویز محدود پلاسمید حاوی ژن مورد نظر یا وارد شدن تصادفی ژن انتقالی در ژنوم در مورد ژن درمانی و میزان بیان کم پروتئین در مورد تولید پروتئین های نوترکیب محققین را بر آن داشته است. پلاسمید اپی زومالی طراحی کنند که بوسیله پروتئین های ویروسی در تعداد نسخه بالا در سلول های یوکاریوتی باقی مانده و پروتئین مورد نظر را به میزان مطلوبی بیان نمایند. هدف از این مطالعه طراحی و ساخت پلاسمیدی با ژن جهش یافته آنتی ژن T ویروس سیمین ۴۰ جهت دستیابی به ناقلی ایمن با همانندسازی بالا است.

روش کار: برای ایجاد جهش مناسب در آنتی ژن T موتانت از نرم افزار مودلر جهت بررسی استفاده شد و در نتیجه جهش مناسب انتخاب شد. جهش هدف در توالی نوکلئوتیدی ژن آنتی ژن T موتانت با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز ایجاد شد. و ژن جهش یافته آنتی ژن T در پلاسمید ESIR2-EGFP کلون شد. تمام کلونها با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز، هضم آنزیمی و تعیین توالی بررسی شدند. خط های سلولی کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی با سازه نهایی ترانسفکت و با میکروسکوپ فلورسانس به مدت چهل روز مشاهده شدند. و در نهایت از رده های سلولی فوق پلاسمید و DNA ژنومیک تخلیص گردید و بر روی آنها واکنش زنجیره ای پلیمرزهای همپوشان به منظور اثبات حلقوی بودن پلاسمیدها انجام شد.

یافته ها: این پلاسمید با جهش ایجاد شده در ژن جهش یافته آنتی ژن T ویروس سیمین ۴۰ توانست در سلولهای یوکاریوتی با توانایی بالا همانندسازی کند و می توان از آن در پروسه های ژن درمانی و تولید پروتئین های نوترکیب استفاده کرد.

نتیجه گیری: هر سه روش واکنش زنجیره ای پلیمرز، هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید کننده صحت انجام سازه بودند و ترانسفکشن سلولهای خط سلولی کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی نشانگر همانندسازی پلاسمید در سلولهای فوق بود.

کلمات کلیدی: آنتی ژن T، ویروس سیمین ۴۰، سلول یوکاریوتی

مقدمه

برخی بیماری‌ها دارای منشا ژنتیکی بوده که به علت تغییر در ژنوم ایجاد می‌شوند. برای درمان بیماری‌های ژنتیکی روش‌های متفاوتی وجود دارد از آن جمله جایگزینی پروتئین‌های دچار نقصان یا تجویز محصولات دارویی جبران‌کننده می‌باشد، که این روش نیاز به تولید پروتئین‌های نوترکیب دارد. ولی در بعضی بیماری‌های ژنتیکی تنها راه یا به عبارتی قطعی‌ترین راه درمان، ژن درمانی می‌باشد. در اصل نقص ژنتیکی سلول با روش‌های مهندسی ژنتیکی اصلاح گردیده و یا اینکه یک نسخه سالم از ژن مورد نظر به سلول ارائه می‌شود [۱].

انتقال ژن را میتوان در سلول‌های سوماتیک و سلول‌های جنسی انجام داد. این فرآیند در صورت اول ژن درمانی و در صورت دوم انتقال ژن نامیده می‌شود. ولی ابزاری که برای انجام آنها مورد استفاده قرار می‌گیرد با یکدیگر متفاوت است. یا به عبارت دیگر ژن درمانی می‌تواند بعنوان یک روش درمانی، دارویی و یا در نهایت جلوگیری از بیماری بوسیله جایگزین کردن ژن‌های معیوب، معرفی یک ژن جدید، یا تغییر در بیان ژن‌های شخص تعریف شود [۲].

در طول چند سال گذشته، تلاش‌های زیادی برای توسعه استراتژی‌های مؤثر در تحویل DNA به هسته سلول صورت گرفته است. اگر چه وکتورهای ویروسی بطور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته اند، ولی استفاده از آنها محدودیت‌هایی به دلیل مسایل ایمنی، ظرفیت بارگیری DNA و مشکلات راندمان تولید دارند [۳]. اما با توجه به اینکه ویروس‌ها از قابلیت طبیعی بالایی برای انتقال ژنوم خود به داخل سلول برخوردار هستند، محققین به فکر طراحی ناقل‌های ویروسی کارآمد و ایمن برای انتقال به سلول‌ها افتادند [۴].

از طرف دیگر ناقل‌های غیر ویروسی در مقایسه با ناقل‌های ویروسی پاسخ ایمنی کمتری را برانگیخته و

اغلب اوقات به صورت اپی زومال در سلول‌ها باقی می‌مانند. برای انتقال ناقل‌های غیر ویروسی به سلول از تکنیک‌های فیزیکی همانند الکتروپوریشن، تفنگ ژنی، امواج فراصوت، فشار هیدرودینامیک و غیره وجود دارند که به طور ایمن و ساده مفید واقع می‌شوند. همچنین این ناقلین قادر به انتقال ژن به بافت‌ها به صورت هدفمند نمی‌باشند. به کارگیری برخی روش‌های بیوشیمیایی نیز مانند پلی کاتیون‌ها^۱، حد واسط‌های لیپیدی^۲ و حد واسط‌های پیپیدی^۳ نیز قادر به ارتقای کارآیی و اختصاصیت ارائه ژن به سلول هدف از طریق این ناقلین شده اند [۵].

از طرف دیگر راه حل دیگر برای درمان خیلی از بیماری‌ها تجویز پروتئین‌های نوترکیب است. نیاز کیفی و کمی برای پروتئین‌های نوترکیب بطور پیوسته در حال افزایش است. بیولوژیست‌های ملکولی پیوسته برای بهبود بخشیدن و ایده آل نمودن سیستم‌های بیانی فعلی و همچنین توسعه روش‌های جدید که لازمه تولید پروتئین‌های پیچیده در آینده است در تلاش هستند. یکی از استراتژی‌های مورد استفاده بوسیله محققین این رشته به کارگیری عناصر ژنتیکی جدید در داخل سیستم‌های بیانی است که مبتنی بر آنالیز تنوع طبیعی سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی است. بطور فزاینده‌ای تعداد زیادی از محصولات بیولوژیکی مورد استفاده فعلی پروتئین‌های نوترکیب هستند. این پروتئین‌ها اثبات کرده اند که در زمینه‌های زیادی سودمند هستند. از درمان هموفیلی تا درمان سرطان این ملکول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر کاربردهای درمانی پروتئین‌های نوترکیب، تولید یک پروتئین برای مطالعات متعددی به کار گرفته می‌شود. دو سیستم اصلی برای بیان

¹ Polycation

² Delivery gene mediated lipid

³ Delivery gene mediated peptide

تنظیم کننده چرخه سلولی و ژن های مهار کننده توموری از قبیل رتینو بلاستوما^۲ و P53 سبب افزایش همانندسازی ژنوم ویروس می شود و از طرف دیگر با غیر فعال کردن این پروتئین ها باعث سرطان زایی سلول میزبان می شود [۵].

با توجه به مجموع مطالب عنوان شده، کلون کردن ژن آنتی ژن T جهش یافته در داخل پلاسمید IRES2-EGFP حاوی مبدأ همانندسازی ویروس سیمین ۴۰ به منظور ساخت یک ناقل ایمن غیر ویروسی کارآمد جهت همانندسازی بالا انجام گرفت که بتواند به صورت اپی زومال و تماماً توسط عنصرهای ترانس سلول های یوکاریوتی شناسایی و همانندسازی شود. سپس قابلیت همانندسازی این پلاسمید در رده های سلولی کلیه جنینی انسان^۳ ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی^۴ بررسی شد.

روش کار

تعیین موتاسیون مناسب در توالی نوکلئوتیدی ژن آنتی ژن T جهش یافته جهت همانندسازی بالا

برای این منظور از نرم افزار بیوانفورماتیکی مدل سازی همسان مقایسه ای استفاده شد. تمام مدل سازی ها، توسط نرم افزار مودلر^۵ نسخه 9v7 و تحت سیستم عامل ویندوز انجام گرفت. شکل سه بعدی پروتئین آنتی ژن T جهش یافته بر اساس مدل سازی همسان بنیان یا مقایسه ای ساخته شد. ابتدا الگوهای مناسب که بیشترین شباهت از لحاظ توالی، کمترین میزان E-Value و بالاترین وضوح را داشتند، انتخاب شدند. در مرحله بعد همتراز کردن توالی پروتئین آنتی ژن T طبیعی با الگوی انتخاب شده انجام گرفت. پس از همترازی توالی، ساختارهای سوم

پروتئین های نوترکیب وجود دارد که شامل سیستم های بیانی پروکاریوتی و یوکاریوتی هستند. سیستم های پروکاریوتی برای بیان پروتئین های نوترکیب مزایای متعددی دارند. این مزایا شامل سهولت کشت و رشد خیلی سریع سلول پروکاریوتی است. و از طرف دیگر خالص سازی در سیستم های بیانی پروکاریوتی کاملاً ساده است. مشکل عمده پروتئین های بیان شده در پروکاریوت ها نا محلول بودن آنهاست و بازیافت پروتئین های عملکردی در این سیستم ها خیلی دشوار است [۶].

سیستم های متنوعی بر مبنای یوکاریوت ها طراحی شده اند که شامل سیستم های بیانی مبتنی بر مخمرها، پستانداران، حشرات و گیاهان می باشند [۷]. مخمرها سلول های یوکاریوتی هستند که رشد بالایی دارند، مقادیر بسیار زیادی از پروتئین ها را ترشح می کنند و گلیکوزیلاسیون بر روی پروتئین ها را اعمال می کنند [۸]. سیستم های بیانی پستانداران با فراوانی بالایی برای تولید پروتئین های نوترکیب به کار گرفته می شوند. زیرا الگوی گلیکوزیلاسیون مناسب را بر روی پروتئین ها اعمال می کنند. آنها همچنین بعنوان سیستم بیانی مستعد برای پروتئین های بسیار پیچیده و پروتئین هایی با وزن ملکولی بالا از قبیل فاکتورهای انعقادی خون و یا آنتی بادی های مولتی مریک در نظر گرفته می شوند [۹].

ناقل ها برای آنکه بتوانند به صورت اپی زومال درون سلول باقی بمانند بایستی توانایی تکثیر خود را داشته باشند و برای این منظور نیاز به یک مبدأ همانندسازی دارند، و از آنجایی که قرار است فرآیند تولید پروتئین های نوترکیب و ژن درمانی بر روی سلول های انسانی اعمال شود، بنابراین مبدأ همانندسازی باید توسط ماشین همانندسازی سلول های انسانی شناسایی شود [۵].

پروتئین آنتی ژن T^۱ برای همانندسازی ویروس سیمین ۴۰ ضروری است و با اتصال به پروتئین های

² Retinoblastoma

³ Human embryonic kidney 293 (HEK293)

⁴ Chinese hamster ovary (CHO)

⁵ Modeller

¹ Large T antigen protein

هر یک از پروتئین های آنتی ژن T (هر کدام به تعداد ۱۰۰۰۰ مدل)، بر اساس قیدهای بدست آمده از ساختارهای همسان و قوانین شیمی- هندسی

جدول ۱. مشخصات پرایمر های مورد نیاز جهت تکثیر ژن آنتی ژن T موتانت

طول قطعه (bp)	توالی پرایمر برای تکثیر ژن آنتی ژن T	نام پرایمر
۲۱۲۴	GCTAGCATGGATAAAGTTTAAACAGAG	آنتی ژن PF-T
۲۱۲۴	CTCGAGTTATGTTTCAGGTTTCAG	آنتی ژن PR-T

قطعه آنتی ژن T موتانت به وسیله آنزیم pfu (ساخت شرکت فرمنتاز-لیتوانی) از روی پلاسمیدهای IRES2-EGFP-LTagI استخراج شده از سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز در دستگاه ترمو سایکلر (ساخت شرکت اپندورف- آلمان) تکثیر شد. قطعه آنتی ژن T موتانت پس از تکثیر بر روی ژل آگارز (ساخت شرکت سیناژن- ایران) ۱ در صد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برمایید در کنار مارکر ۱ کیلوبازی (ساخت شرکت فرمنتاز-لیتوانی) الکتروفورز شد.

طراحی پرایمر ها جهت ایجاد جهش در ژن آنتی ژن T موتانت به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز همپوشان^۴

قطعه آنتی ژن T موتانت از روی ژل بریده شد و به وسیله کیت تخلیص DNA از ژل (ساخت شرکت فرمنتاز- لیتوانی) تخلیص شد و سپس پرایمرهای مورد نیاز جهت ایجاد جهش در موقعیت کدون ۶۷۹ ژن آنتی ژن T موتانت به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز همپوشان^۴ با جایگاه برش آنزیمی مناسب در انتهای ۵' و ۳' آن ها طراحی و جهت ساخت به شرکت تک کپنهاک دانمارک سفارش داده شد.

برای ایجاد جهش در موقعیت کدون ۶۷۹ آنتی ژن T موتانت ابتدا یک پرایمر برای ناحیه بالادست سازه

پروتئین ها در جهتی که کمترین میزان انحراف از آنها را داشته باشد، بدست آمد. از بین ۱۰۰۰۰ مدل بدست آمده برای هر یک از پروتئین های آنتی ژن T، یک مدل بر اساس تابع چگالی احتمالی^۱ برای آن که کمترین میزان را داشت، انتخاب شد. سرانجام، صحت و اعتبار مدل های انتخاب شده از نظر زاویه های سای (ψ) و فای (φ) توسط نرم افزار بازرسی اولیه^۲ و از نظر معیار بهینه سازی گسسته انرژی پروتئینی^۳، توسط نرم افزار مودلر مورد بررسی قرار گرفت. اساس بررسی زاویه های دی هیدرال سای و فای بر این ویژگی شیمی- هندسی استوار است که دو اتم نمی توانند نسبت به یکدیگر در فاصله ای نزدیکتر از مجموع شعاع واندروالس شان قرار بگیرند. در ساختارهای پروتئینی، گاهی دیده شده که اتم ها در فواصلی نزدیکتر از حد تعیین شده قرار می گیرند که دلیل این امر نوسان اتم ها حول پیوندها می باشد [۱۰ و ۹].

طراحی پرایمر و تکثیر ژن آنتی ژن T موتانت به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز

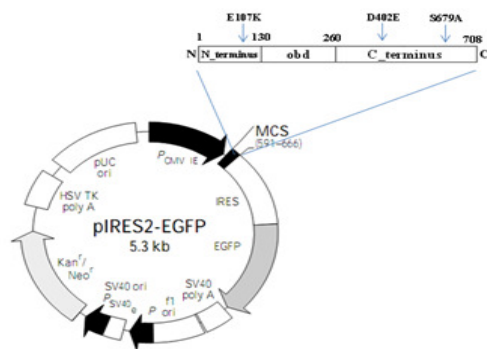
جهت تهیه آنتی ژن T موتانت از پلاسمید IRES2-EGFP-LTagI استفاده شد که قبلاً توسط این گروه محققین جهت عدم برهم کنش این پروتئین با مهارکننده های توموری طراحی شده بود [۵].

¹ Probabilty density function (PDF)

² Procheck

³ Discrete optimized protein energy (DOPE)

⁴ Overlap extension polymerase chain reaction



شکل ۱. کلون نمودن ژن آنتی ژن T موتاسیون یافته در موقعیت ۶۷۹ به pIRES2_EGFP

پلاسمید IRES2-EGEP-LTII با روش ترانسفورمیشن در باکتری سویه TOP10 F' و بر اساس دستورالعمل استاندارد مربوطه تکثیر شد [۱۲]. برای رشد باکتری ها از محیط (LB-Borth) ساخت شرکت مرک آلمان) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی سیلین استفاده شد.

تأیید کلون

کلونینگ از طریق کلونی، هضم آنزیمی و تعیین توالی به روش ختم زنجیره به صورت تجاری (شرکت

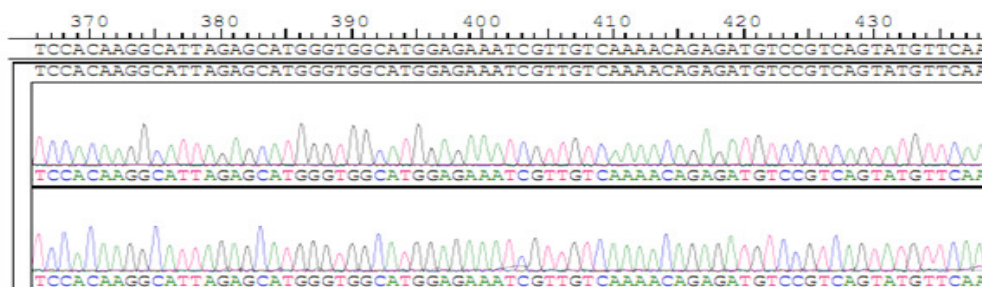
استخراج شده از پلاسمید IRES2-EGFP-LTagI طراحی شد که دارای سایت آنزیمی برای آنزیم محدود کننده NheI بود که توالی GCTAGC را شناسایی و برش می دهد سپس شش پرایمر همپوشان برای ناحیه پایین دست طراحی شد که پرایمر ششم دارای سایت آنزیمی برای آنزیم محدود کننده XhoI بود که توالی CTCGAG را شناسایی و برش می دهد. در این مرحله محصول هر واکنش زنجیره ای پلیمرز بعنوان نمونه برای واکنش زنجیره ای پلیمرز بعدی استفاده شد (جدول ۲) [۱۰].

کلونینگ

ژن آنتی ژن T موتاسیون یافته در موقعیت ۶۷۹ توسط دو آنزیم محدود الاثر NheI و XhoI هضم و در وکتور IRES-2EGFP کلون شد و پلاسمید IRES2-EGEP-LTII به دست آمد (شکل ۱).

جدول ۲. پرایمرهای طراحی شده برای ایجاد جهش S679A

توالی پرایمرها	پرایمرها	
	FA1	GCTAGCATGGATAAAAGTTTAAACAGAG
	RB1	TGATTATGACATGAACAGCCCTGTGAGGAC
	RB2	TAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCATGAACAG
	RB3	TTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGG
	RB4	GTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAA
	RB5	AGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAA
	RB6	CTCGAGTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAG
پرایمر های بالا دست		
پرایمر های پایین دست		



شکل ۲. تأیید صحت کلونینگ با تعیین توالی

ماکروژن - کره) تأیید شد (شکل ۲).

ترانسفکشن سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و

تخمندان هامستر چینی

سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ (بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) و تخمدان هامستر چینی (بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) در محیط کشت DMEM^۱ کشت داده شدند تا تراکم سلول در سطح ۷۰ تا ۸۰ درصد یعنی مقدار مناسب برای ترانسفکشن برسد. سلول ها با ۱ میکروگرم DNA (سازه ژنی) و با استفاده از کیت توربوفاکت (ساخت شرکت فرمنتاز - لیتوانی) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده ترانسفکت شدند [۵].

بررسی دخول سازه ی نهایی و ماندگاری آن درون سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی

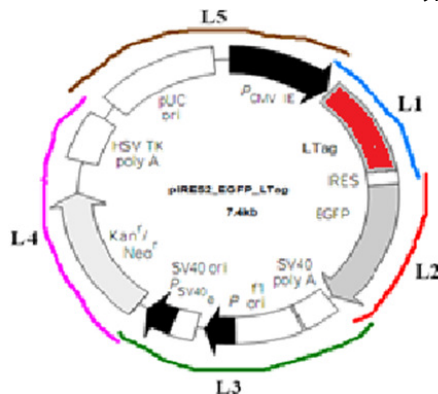
۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن محیط کشت تعویض شد و ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن سلول ها تحت تیمار آنتی بیوتیک G418 (۲۰۰ میکروگرم آنتی بیوتیک G418 بر میلی لیتر) قرار گرفتند. سلول های پذیرنده پلاسمید تحت تیمار G418 زنده ماندند.

سلول ها به مدت ۴۰ روز برای بررسی بیان ژن پروتئین فلورسانت سبز توسط میکروسکوپ فلورسانت تحت بررسی قرار گرفتند و تراکم سلول های سبز رنگ حاصل از پروتئین فلورسانت سبز و پایداری رنگ سبز فلورسانت روزانه بررسی و محیط کشت سلول ها هر سه روز یک بار تعویض شدند. از سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی ترانسفکت شده تخلیص پلاسمید انجام شد. روش اصولی برای تخلیص پلاسمید از سلول های پستانداران استفاده از شیب چگالی کلرید سزیوم است [۱۳]. اما به علت عدم امکان استفاده از این تکنیک، تخلیص پلاسمید بر پایه ی روش لیز قلیایی که قبلاً در آزمایشگاه بر روی سلول های کلیه جنینی

انسان ۲۹۳ که دارای ژن آنتی ژن T حاوی پلاسمید IRES2-EGFP-LTagI بهینه سازی شده بود انجام شد.

پنج واکنش زنجیره ای پلیمرز همپوشان بر روی پلاسمید نهایی IRES2-EGFP-LTII استخراج شده از سلول های باکتری اشرشیاکلی به عنوان کنترل مثبت انجام شده بود. پرایمرهای جهت این واکنش زنجیره ای پلیمرز ها به گونه ای طراحی شدند که محصولات آنها در دو انتهای ۳' و ۵' همپوشانی داشتند (شکل ۳ و جدول ۳).

شکل ۳. ترتیب قرارگیری قطعات بر روی پلاسمید نهایی IRES2-EGFP-LTII و قطعات حاصل از پنج واکنش زنجیره ای پلیمرز همپوشان.



مجموع واکنش زنجیره ای پلیمرز های انجام شده طول کل پلاسمید را تکثیر می کردند. سپس از سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی حاصل از ترانسفکشن DNA ژنومیک به وسیله ی کیت تخلیص (DNA از شرکت کیاژن-آلمان) تخلیص شد و بر روی آنها پنج واکنش زنجیره ای پلیمرز همپوشان گذاشته شد. همچنین پنج واکنش زنجیره ای پلیمرز همپوشان بر روی جسم کامل سلول های سبز باقی مانده پس از ۴۰ روز انتخاب به صورت کلونی واکنش زنجیره ای پلیمرز گذاشته شد [۵].

یافته ها

نتایج مدل سازی همسان بنیان

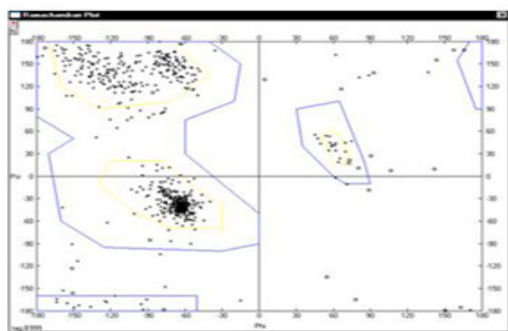
¹Dulbecco's modified eagle medium

جدول ۳. واکنش زنجیره ای پلیمرزهای همپوشان برای تأیید اپی زومال بودن سازه نهایی

نام قطعات	طول قطعه	میزان همپوشانی
L۱	۲۱۶۰ bp	این قطعه به اندازه ۱۲ نوکلئوتید از انتهای ۳ خود با انتهای ۵ قطعه L۲ و به اندازه ۶ جفت باز از انتهای ۵ خود با انتهای ۳ قطعه L۵ همپوشانی دارد.
L۲	۱۳۷۱ bp	این قطعه به اندازه ۱۱ نوکلئوتید از انتهای ۵ خود با انتهای ۳ قطعه L۱ و به اندازه ۱۰ جفت باز از انتهای ۳ خود با انتهای ۵ قطعه L۳ همپوشانی دارد
L۳	۱۰۵۱ bp	این قطعه به اندازه ۱۰ نوکلئوتید از انتهای ۵ خود با انتهای ۳ قطعه L۲ و به اندازه ۱۲ جفت باز از انتهای ۳ خود با انتهای ۵ قطعه L۴ همپوشانی دارد
L۴	۱۱۸۲ bp	این قطعه به اندازه ۱۲ نوکلئوتید از انتهای ۵ خود با انتهای ۳ قطعه L۳ و به اندازه ۱۲ جفت باز از انتهای ۳ خود با انتهای ۵ قطعه L۵ همپوشانی دارد
L۵	۱۶۶۶ bp	این قطعه به اندازه ۱۲ نوکلئوتید از انتهای ۵ خود با انتهای ۳ قطعه L۴ و به اندازه ۱۱ جفت باز از انتهای ۳ خود با انتهای ۵ قطعه L۱ همپوشانی دارد

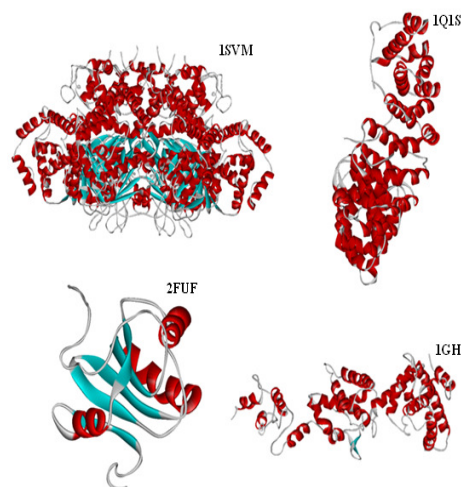
یافته، بدست آمد. از بین ۱۰۰۰۰ مدل بدست آمده برای هر یک از پروتئین های آنتی ژن T جهش یافته، یک مدل بر اساس کمترین انرژی تخصیص یافته برای آن، انتخاب شد. سرانجام، صحت و اعتبار مدل های انتخاب شده از نظر زاوایی فای و سای توسط پلات رامچاندرا مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۵).

شکل ۵. نمودار رامچاندرا مربوط به بهترین مدل ساخته شده پروتئین آنتی ژن T جهش یافته. اکثر اسید آمینه ها (>۹۱٪) در مدل انتخاب شده برای پروتئین جهش یافته در منطقه مجاز قرار گرفته اند.



از آنجائیکه میزان هومولوژی میان الگو و توالی ها بسیار زیاد بود، مدل های ساخته شده از نظر زاوایی فای و سای قابل قبول بودند. در نتیجه با استفاده از بیوانفورماتیک جهش مناسب در موقعیت ۶۷۹ به

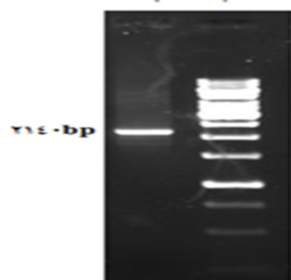
با توجه به اینکه الگوی کامل برای پروتئین آنتی ژن T وجود نداشت بنابراین چهار الگوی تکه شده پروتئین آنتی ژن T (1Q1S, 1GH6, 1SVM, 2FUF) با کمترین میزان E-Value و بالاترین وضوح، برای مدل سازی انتخاب شدند (شکل ۴).
شکل ۴. الگوهای 1Q1S, 1GH6, 1SVM و 2FUF که در آن پروتئین آنتی ژن T بصورت چهار تکه جدا از هم نشان داده شده است.



در مرحله بعد همتراز کردن توالی های چهار تکه الگوی انتخاب شده و پروتئین های آنتی ژن T جهش یافته انجام گرفت. پس از همترازی توالی، ۱۰۰۰۰ مدل برای هر یک از پروتئین های آنتی ژن T جهش

صورت جایگزینی اسید آمینه سرین با آلانین انتخاب شد.

شکل ۶. نتیجه ی PCR قطعه LTag با آنزیم Pfu جهت تایید سازه نهایی. خط ۱: مارکر ۱kb و خط ۲: باند ۲۱۴-bp مربوط به LTag موتانت.



نتایج واکنش زنجیره ای پلیمرز و کلونینگ

قطعه آنتی ژن T موتانت به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز تکثیر شد و جهش مناسب در توالی نوکلئوتیدی قطعه آنتی ژن T موتانت بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز همپوشان ایجاد شد. در ایمن مرحله قطعه آنتی ژن T جهش یافته در EGFP-pIRES2 کلون شد و با هضم آنزیمی، واکنش زنجیره ای پلیمرز و تعیین توالی تأیید شد.

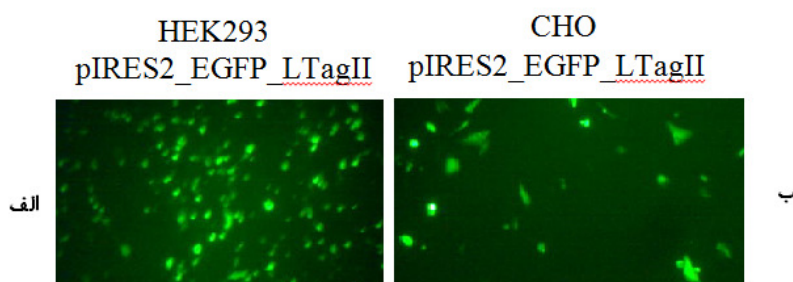
برای تکثیر، در ابتدا چندین واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای اشاره شده در جدول ۲

ترانسفکشن سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و

تخمندان هامستر چینی

در ترانسفکشن سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی پس از ۴۸ ساعت حدود ۸۰

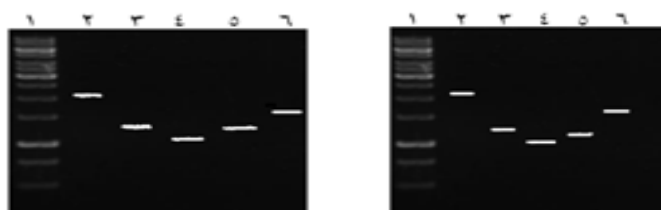
شکل ۷. ترانسفکشن pIRES2-EGFP-LTagII در سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی



الف) سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ تراریخت شده از گذشت ۴۰ روز

ب) سلول های تخمدان هامستر چینی تراریخت شده از گذشت ۴۰ روز

الف. سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ تراریخت شده بعد از گذشت ۴۰ روز ب. سلول های تخمدان هامستر چینی تراریخت شده بعد از گذشت ۴۰ روز
شکل ۸. نتایج واکنش زنجیره ای پلیمرزهای همپوشان که مجموعاً کل پلاسمید را تکثیر می کردند. در تمامی شکلها خط ۱ مارکر ۱kb، خط ۲ قطعه ۲bp، خط ۳ قطعه ۱۳۷۱bp، خط ۴ قطعه ۱۰۵۱bp، خط ۵ قطعه ۱۱۸۲bp و خط ۶ قطعه ۱۶۶۶bp می باشد.



درصد سلول ها سبز شدند که نشان دهنده ی ورود پلاسمید به درون سلول ها بود.

جهت ایجاد موتاسیون در موقعیت ۶۷۹ طراحی و انجام شد. برای تایید طول قطعه نهایی نمونه حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمرز، الکتروفورز گذاشته شد (شکل ۶).

تأیید دخول و ماندگاری سازه ی نهایی در رده ی سلولی کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی

ترانسفکشن pIRES2-EGFP-LTagII در سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی رنگ سبز فلورسانت به مدت بیش از ۴۰ روز پایدار بود (شکل ۷).

بنابراین برای تأیید این که آیا پلاسمید در سلول به صورت اپی زومال باقی مانده و در حال تکثیر است یا درون ژنوم سلول ها داخل شده است از سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی نو ترکیب، تخلیص پلاسمید انجام شد. بر روی محصول تخلیص پلاسمید پنج واکنش زنجیره ای پلیمرز همپوشان که اسکلت بندی EGFP-LTagII-pIRES2 بودند گذاشته شد که همه آنها مثبت بودند (شکل ۸).

از سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی نو ترکیب تخلیص DNA انجام شد و بر روی آنها پنج واکنش زنجیره ای پلیمرز همپوشان که اسکلت بندی pIRES2-EGFP-LTagII را شامل می شود گذاشته شد که تمامی آنها منفی بودند.

بحث

یک روش برای ژن درمانی و تولید پروتئین های نو ترکیب تولید وکتورهای بیانی است. برای مثال در ژن درمانی تولید وکتورهای بیانی که دارای توالی های آنتی سنس برای مهار بیان انکوژن ها و رستورهای فاکتور رشد هستند می تواند یک روش درمانی مناسب برای سلول های سرطانی باشد. برای این منظور بیان انکوژن ها با توالی آنتی سنس مهار می شوند وجود دارد. این مشکل تکنیکی محدود بودن تعداد پلاسمیدهای بیانی در سلول های ترانسفکت شده است که در نتیجه توالی های آنتی سنس لازم برای مهار انکوژن ها به میزان مناسب

وجود نخواهد داشت. برای مثال سلول های ترانسفکت شده با وکتورهای رتروویروسی در ایده آلترین شرایط تنها یک یا چند ترانسفکشن پایدار ایجاد کنند. برای غلبه بر این مشکل طراحی وکتورهای اپی زومال می تواند راه گشای مناسبی باشد. زیرا این وکتورها همانندسازی خارج کروموزومی دارند و در DNA ژنومی ادغام نمی شوند و از همه مهمتر تعداد کپی زیادی در سلول های ترانسفکت شده ایجاد می کنند، که می تواند با داشتن توالی های آنتی سنس بر بیان انکوژن ها غلبه کند [۱۴]. یکی از مشکلات وکتورهای اپی زومال عدم ماندگاری آنها درون سلول های انسانی است. اگر چه تا به امروز برخی محققین با به کارگیری مبدأ همانندسازی ویروس های پستانداران مانند ویروس سیمین ۴۰ و اپشتین بار ویروس در پلاسمیدها سعی کرده اند وکتور های اپی زومالی بسازند که قادر به تکثیر در سلول های یوکاریوتی باشند. ولی از آنجایی که این پلاسمیدها برای همانندسازی خود نیازمند فاکتورهای ترانس ویروس هستند که باعث فعال سازی سیستم های ایمنی و تومورزایی می شوند مفید واقع نشده اند [۱۵]. بنابراین یک استراتژی برای بهینه سازی ای پلاسمیدها از بین بردن ویژگی های تحریک ایمنی و تومورزایی فاکتور ترانس ویروسی و ایمن ساختن آن است. از طرف دیگر این پلاسمیدها نیاز به یک مبدأ همانندسازی دارند که تماماً توسط عناصر ترانس ماشین همانندسازی سلولهای یوکاریوتی شناسایی شوند و همچنین بتوانند بطور اپی زومال و مستقل از چرخه سلولی تکثیر یابند و تعداد کپی های متعددی را ایجاد نمایند. از اینرو مبدأ همانندسازی ویروس سیمین ۴۰ و پروتئین آنتی ژن T ویروس سیمین ۴۰ ایده آل ترین گزینه برای رسیدن به این هدف هستند. لذا برای بهینه سازی پروتئین آنتی ژن T ویروس سیمین ۴۰ تکنیک های بیوانفورماتیکی را در کنار تکنیک های ملکولی به کار گرفتند [۵].

پروتئین آنتی ژن T یک انکوپروتئین ویروسی است که عملکردهای بیولوژیکی مختلفی دارد. این عملکردهایش را بواسطه سه دومین مختلف (J- دومین، دومین متصل شونده به مبدأ همانندسازی و دومین هلیکازی) انجام می دهد. J- دومین که مسئول غیر فعال کردن پروتئین رتینوبلاستوما است فعالیتش را با همکاری موتیف LXCXE انجام می دهد. دومین متصل شونده به مبدأ همانندسازی که با اتصال به ناحیه های پنتانوکلئوتیدی در مبدأ همانندسازی ویروس باعث شروع همانندسازی ویروس سیمین ۴۰ می شود و دومین هلیکازی نقش مهار پروتئین P53 و هدایت چنگال همانندسازی را با فعالیت هلیکازی خود دارد. برای غیر فعال کردن موتیف LXCXE و J- دومین اسید آمینه لیزین را در موقعیت ۱۰۷ جایگزین اسید آمینه اسید گلوتامیک و برای غیر فعال کردن دومین انتهای کربوکسی پروتئین آنتی ژن T اسید آمینه اسید گلوتامیک را در موقعیت ۴۰۲ جایگزین اسید آمینه آسپاراتیک کردند [۵]. ولی بررسی های بیوانفورماتیکی نشان داد که جهش در ناحیه ۶۷۹ که در آن اسید آمینه سرین با آلانین جایگزین می شود علاوه بر اینکه با ساختار عملکردی پروتئین تداخل ندارد بلکه باعث افزایش میزان همانندسازی نیز می شود.

نتیجه گیری

بعد از ترانسفکشن سلول های CHO و HEK293 با پلاسمید IRES2-EGFP-LTagII نوترکیب رنگ سبز فلورسانت برای مدت بیش از ۴۰ روز پایدار بود. پروتئین سبز فلورسنت ازجمله جدیدترین پروتئین گزارشگر قابل مقایسه و اندازه گیری است که برای مشاهده بیان آن نیاز به سوپسترا یا کوفاکتور خاص نیست. این پروتئین در نور ماوراء بنفش، بدون آسیب رساندن به بافت، از خود رنگ سبز تولید می کنند [۵]. از طرف دیگر پلاسمید

نوترکیب می بایست درون سلول های انسانی مورد بررسی قرار گیرد، از اینرو نیاز به ژن مقاومت به آنتی بیوتیک یوکاریوتی جهت تیمار سلول های پذیرنده پلاسمید های نوترکیب بود. در نهایت از همه مهمتر ما نیاز به مبدأ همانندسازی ویروس سیمین ۴۰ در پلاسمید نوترکیب داشتیم. در نتیجه با توجه به اینکه پلاسمید IRES2-EGEP تمام ویژگی های بالا را داشت بعنوان پذیرنده پروتئین های آنتی ژن T جهش یافته جهت ترانسفکشن در سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی انتخاب شد.

نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمرزهای همپوشان بر روی پلاسمید نوترکیب استخراج شده از سلول های میزبان مثبت بودند. این شواهد نشانگرحضور پلاسمیدهای IRES2-EGFP-LTag نوترکیب بصورت حلقوی و اپی زومال در سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی سبز رنگ است. از طرف دیگر پنج واکنش زنجیره ای پلیمرز همپوشان انجام شده بر روی DNA ژنومی سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی سبز رنگ منفی بودند. این نتایج هم اثبات کننده حلقوی بودن پلاسمید نوترکیب بود. از مجموع نتایج حاصل شده به این مطلب می توان رسید که پلاسمید حاوی مبدأ همانندسازی ویروس سیمین ۴۰ و پروتئین آنتی ژن T جهش یافته ویروس سیمین ۴۰ توانسته درون سلول های انسانی همانندسازی کند.

جهش های ایجاد شده در ژن هدف به خوبی نشان دهنده همانند سازی پلاسمید فوق در رده های سلولی کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی بود و استخراج پلاسمید از رده های سلولی نشان داد که میزان همانند سازی این پلاسمید تقریباً ۲۵۰-۱۰۰ کپی در هر سلول است. میزان همانندسازی پلاسمید متناسب با سلول های مختلف متغیر بود بطوریکه در رده سلولی مربوط به روده بزرگ بیشترین مقدار و در رده سلولی Cos_7

کمترین مقدار را نشان می داد. مقایسه پلاسمید فوق از نظر همانندسازی با پلاسمید های مشابه که دارای ژن آنتی ژن T وحشی هست نشان داده است که میزان همانندسازی پلاسمید دارای ژن آنتی ژن T وحشی در برخی موارد به علت بالا بودن میزان همانندسازی باعث لیز شدن سلول میزبان می گردد که بطور منطقی می توان استنتاج کرد که عامل اصلی آن غیر فعال شدن پروتئین های مهار کننده توموری از قبیل رتینوبلاستوما و P₅₃ می تواند باشد از طرفی

همانندسازی کنترل شده پلاسمید فوق می تواند نشان دهنده عکس مطلب فوق باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از طرح پژوهشی است که در سال ۱۳۸۸ در بخش تحقیق و توسعه انستیتو پاستور ایران انجام شده است لذا نویسندگان این مقاله از کلیه همکاران بخش تحقیق و توسعه انستیتو پاستور ایران کمال قدردانی و تشکر را دارند.

References

- 1- Goessler UR, Riedel K, Hormann K, Riedel F. Perspectives of gene therapy in stem cell tissue engineering: Cell Tissues Organs. 2006 Dec; 183(4): 169-79.
- 2- Friedoman T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease?. Science. 1982 Mar; 175: 949-55.
- 3- Walter W, Stein U. Viral vectors for gene transfer a review of their use in the treatment of human disease: Drugs. 2000 Aug; 60: 249-71.
- 4- Ferber D. Gene therapy: safer and virus-free?. Science. 2001 Nov; 294: 1638-42.
- 5- Asgharzadeh MR, Atyabi SM, Khan Ahmad Shahrza H, Ahangari Chohan R, Nouri Inanlou D. Constructing a plasmid contain truncated T antigen and SV40 origin of replication and evaluation of its replication in HEK293 and CHO. Journal of Biological Sciences, Islamic Azad University. 2011 Spr; 13: 13-26. [Fulltext in Persian]
- 6- Snodoyer R. Expression systems for the production of recombinant Pharmaceuticals. Technology Review. 2004; 18(1): 51-62.
- 7- Studier FW and Moffat BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned gene. J Mol Biol. 1986 May; 189:30-113.
- 8- Gellissen G, Melber K. Methylophilic Yeast Hansenula polymorpha as production organism for recombination pharmaceuticals. Arzneimittelforschung. 1996 Sep; 46: 892-943.
- 9- Tabiot-Dameron F, Malassagne B, Viglietta C, Weill B, Houdebine LM. Association of the 5Hs₄ sequence of the chicken beta-globin locus control region with human EF1 Alpha gene promoter induce ubiquitous and high expression of human gene CD55 and CD59 cDNA in transgene rabbits. Transgenic Res. 1999 Jun; 8: 223-35.
- 10- Ramachnadran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. J Mol Biol. 1963 Jul; 7: 9-95.
- 11- Shen MY, Sali A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. protein Sci. 2006 Nov; 15(11): 2507-24.
- 12- Sambrook J, Russell D. Molecular cloning. 3d. New York: CSHL Press, 2001: 1534-99.
- 13- Hames SBD. Method to map origins of replication in eukaryotes. United States. Oxford University. 1999; 33.
- 14- Cooper MJ, Lippa M, Payne JM, Hatzyvassiliou G, Reifenberg E, Fayazi B, et al. Safty-modified episomal vector for human gene therapy. Proc Acad Sci. USA. 1977 Jun; 94: 6450-55.
- 15- EL-Sneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy review. J Controlled Release. 2004 Jan; 94(1): 1-14.