

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

Mohammad Reza Asgharzadeh<sup>1</sup>, Seyed Mohammad Atyabi\*<sup>2</sup>, Hossein Khan Ahmad Sharza<sup>3</sup>, Somaye Asgharzadeh<sup>4</sup>, Akbar Jalili<sup>5</sup>, Reza Ahanghari Cohan<sup>6</sup>, Davod Nouri Inanlo<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetic, Science and Research Campus, School of Medicine, Islamic Azad University, Tehran, Iran      <sup>2</sup> Department of Biophysics, Research and Development Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Biotechnology, BCG Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran      <sup>4</sup> Department of Chemistry, School of Sciences , Zanjan University, Zanjan, Iran      <sup>5</sup> Department of Genetic, School of Medicine, Islamic Azad University, Ahar, Iran      <sup>6</sup> Department of Biotechnology, Research and Development Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran      <sup>7</sup>Department 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

## بهینه سازی آنتی ژن T برای طراحی و ساخت پلاسمید اپی زومال بر مبنای آنتی ژن T ویروس سیمین • ۶ موتانت

محمد رضا اصغرزاده<sup>۱</sup>، سید محمد اطیابی<sup>\*</sup><sup>۲</sup>، حسین خان احمد شهرضا<sup>۳</sup>، سمیه اصغرزاده<sup>۴</sup>، اکبر جلیلی<sup>۵</sup>، رضا آهنگری کهن<sup>۶</sup>، داود نوری اینانلو<sup>۷</sup>

<sup>۱</sup> گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران      <sup>۲</sup> گروه بیوفیزیک، بخش تحقیق و توسعه، انسیتو پاستور ایران، تهران، ایران      <sup>۳</sup> گروه بیوتکنولوژی، بخش ب ث.ر، انسیتو پاستور ایران، تهران، ایران  
<sup>۴</sup> گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران      <sup>۵</sup> گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران      <sup>۶</sup> گروه بیوتکنولوژی، بخش تحقیق و توسعه، انسیتو پاستور ایران، تهران، ایران      <sup>۷</sup> گروه ژنتیک، بخش تحقیق و توسعه، انسیتو پاستور ایران، تهران، ایران

\*نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱۶۹۵۳۳۱۱ - فاکس: ۰۹۸۱۲۲۰۶۱۵۶۵. 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 • ۶ جهت دستیابی به ناقلی اینم 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 پلیمراز ایجاد شد. و ژن جهش یافته آنتی ژن T درپلاسمید ESIR2-EGFP کلون شد. خط های سلولی کلیه جنین انسان ۲۹۳ و تخدمان هامستر چینی با سازه پلیمراز، هضم آنزیمی و تعیین توالی بررسی شدند. خط های سلولی کلیه جنین انسان ۲۹۳ و تخدمان هامستر چینی با سازه نهایی ترانسفکت و با میکروسکوپ فلورسانسی 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 پلیمرازهای 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 • ۶ 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 پلیمراز، هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید کننده صحبت انجام سازه بودند و ترانسفکشن سلولهای خط سلولی کلیه جنین انسان ۲۹۳ و تخدمان هامستر چینی نشانگر همانندسازی پلاسمید در سلولهای فوق بود.

**کلمات کلیدی:** آنتی ژن T، ویروس سیمین • ۶، 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 نقسان یا تجویز محصولات دارویی جبران کننده می‌باشد، که این روش نیاز به تولید پروتئین‌های نوتروکریپت دارد. ولی در بعضی بیماری‌های ژنتیکی تنها راه یا به عبارتی قطعی ترین 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].

از طرف دیگر راه حل دیگر برای درمان خیلی از بیماری‌ها تجویز پروتئین‌های نوتروکریپت است. نیاز کیفی و کمی برای پروتئین‌های نوتروکریپت بطور پیوسته در حال افزایش است. بیولوژیست‌های ملکولی پیوسته برای بیبود بخشیدن و ایده آل نمودن سیستم‌های بیانی فعلی و همچنین توسعه روش‌های جدید که لازمه تولید پروتئین‌های 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 نوتروکریپت هستند. این پروتئین‌ها اثبات کرده‌اند که در زمینه‌های زیادی سودمند هستند. از درمان هموفیلی تا درمان سرطان این ملکول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر کاربردهای درمانی پروتئین‌های نوتروکریپت، تولید یک پروتئین برای مطالعات متعددی به کار گرفته می‌شود. دو سیستم اصلی برای بیان

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 تحويل 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 دارد [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 بر انگیخته و

<sup>1</sup> Polycation

<sup>2</sup> Delivery gene mediated lipid

<sup>3</sup> Delivery gene mediated peptide

تنظیم کننده چرخه سلولی و ژن های مهار کننده توموری از قبیل رتینو بلاستوما<sup>۲</sup> و P53 سبب افزایش همانندسازی ژنوم ویروس می شود و از طرف دیگر با غیر فعال کردن این پروتئین ها باعث سرطان زایی سلول میزان 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<sup>۳</sup> ۲۹۳ و تخدمان هامستر چینی<sup>۴</sup> 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<sup>۵</sup> نسخه ۹۷۷ 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 عمدۀ 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<sup>۱</sup> برای همانندسازی ویروس سیمین ۴۰ ضروری است و با اتصال به پروتئین های**

<sup>2</sup> Retinoblastoma

<sup>3</sup> Human embryonic kidney 293 (HEK293)

<sup>4</sup> Chinese hamster ovary (CHO)

<sup>5</sup> Modeller

<sup>۱</sup> Large T antigen protein

پرایمرهای مورد نیاز جهت تکثیر ژن آنتی ژن T موتانت طراحی و سفارش ساخت به شرکت تک پنهانک دانمارک داده شد (جدول ۱).

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 پرایمرهای مورد نیاز جهت تکثیر ژن آنتی ژن T موتانت

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

قطعه آنتی ژن T موتانت به وسیله آنزیم pfu (ساخت شرکت فرمتاز-لیتوانی) از روی پلاسمیدهای IRES2-EGFP-LTagI استخراج شده از سلول های کلیه جنین انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز 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 درصد رنگ آمیزی شده با اندیوم برماید در کنار مارکر ۱ کیلو بازی (ساخت شرکت فرمتاز-لیتوانی) کلتروفورز شد.

#### طراحی پرایمرهای جهت ایجاد جهش در ژن آنتی ژن T موتانت به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز همپوشان<sup>۴</sup>

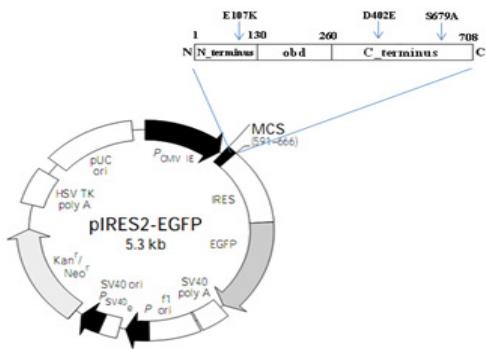
قطعه آنتی ژن T موتانت از روی ژل بریده شد و به وسیله کیت تخلیص DNA از ژل (ساخت شرکت فرمتاز- لیتوانی) تخلیص شد و سپس پرایمرهای مورد نیاز جهت ایجاد جهش در موقعیت کدون ۶۷۹ ژن آنتی ژن T موتانت به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز همپوشان<sup>۴</sup> با جایگاه برش آنزیمی مناسب در انتهای<sup>۵</sup> و<sup>۶</sup> آنها طراحی و جهت ساخت به شرکت تک پنهانک دانمارک سفارش داده شد.

برای ایجاد جهش در موقعیت کدون ۶۷۹ آنتی ژن T موتانت ابتدا یک پرایمر برای تایحه 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 اساستابع چگالی احتمالی<sup>۱</sup> 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 بازررسی اولیه<sup>۲</sup> و از نظر معیار بینه سازی گسسته انرژی پروتئینی<sup>۳</sup>، 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 [۱۰-۹].

**طراحی پرایمر و تکثیر ژن آنتی ژن T موتانت به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز**  
جهت تهیه آنتی ژن T موتانت از پلاسمید استفاده شد که قبلًا توسط IRES2-EGFP-LTagI این گروه محققین جهت عدم برهم کنش این پروتئین با مهار کننده های توموری طراحی شده بود[۵].

<sup>1</sup>Probability density function (PDF)<sup>2</sup> Procheck<sup>3</sup> Discrete optimized protein energy (DOPE)<sup>4</sup> 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 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

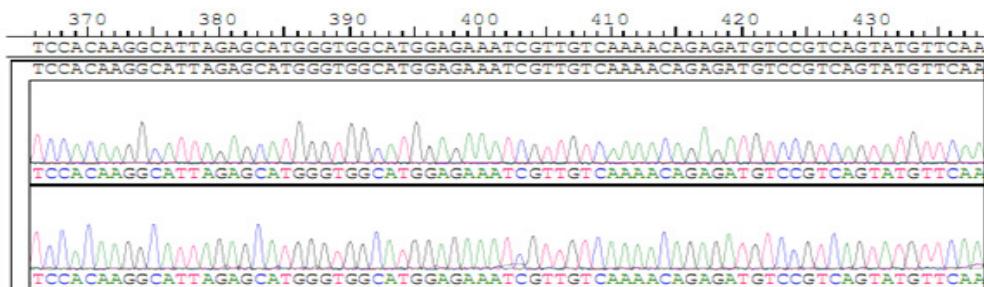
IRES2-EGFP-LTagI استخراج شده از پلاسمید طراحی شد که دارای سایت آنزیمی برای آنزیم محدود کننده NheI بود که توالی GCTAGC را شناسایی و برش می دهد سپس شش پرایمر همپوشان برای ناحیه پایین دست طراحی شد که پرایمر ششم دارای سایت آنزیمی برای آنزیم محدود کننده XhoI بود که توالی CTCGAG را شناسایی و برش می دهد. در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

#### کلونینگ

ژن آنتی ژن T موتاسیون یافته در موقعیت ۶۷۹ توسط دو آنزیم محدود اثر NheI و HhoI 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

پرایمرها	توالی پرایمرها
پرایمر بالا دست	FA1 GCTAGCATGGATAAAGTTAACAGAG
	RB1 TGATTATGACATGAACAGCCCTGTGAGGAC
	RB2 TAAAACCTCTACAAATGTGGATGGCTGATTATGATCATGAACAG
پرایمر های پایین دست	RB3 TTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGG
	RB4 GTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAA
	RB5 AGGGGGAGGTGTGGAGGTTTAAAGCAAGTAA
	RB6 CTCGAGTTATGTTCAGGTTCAGGGGAGGTGTGGAG



شکل ۲. تأیید صحت کلونینگ با تعیین توالی

ماکروژن - کره) تأیید شد (شکل ۲).

### ترانسفکشن سلول های کلیه جنینی انسان و

#### تخدمان هامستر چینی

سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ (بانک سلولی انسیتو پاستور ایران) و تخدمان هامستر چینی (بانک سلولی انسیتو پاستور ایران) در محیط کشت DMEM<sup>۱</sup> کشت داده شدند تا تراکم سلول در سطح ۷۰ تا ۸۰ درصد یعنی مقدار مناسب برای ترانسفکشن برسد. سلول ها با ۱ میکرو گرم DNA (سازه ژنی) و با استفاده از کیت توربو فکت (ساخت شرکت فرمنتاز- لیتوانی) بر اساس دستور العمل شرکت سازنده ترانسفکت شدند [۵].

بررسی دخول سازه های نهایی و ماندگاری آن درون سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و

#### تخدمان هامستر چینی

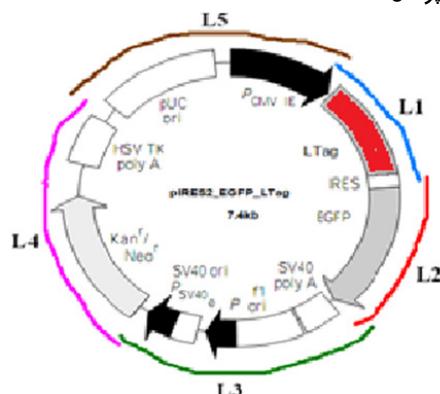
۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن محیط کشت تعویض شد و ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن سلول ها تحت تیمار آنتی بیوتیک G418 (۲۰۰ میکرو گرم آنتی بیوتیک G418 بر میلی لیتر) قرار گرفتند. سلول های پذیرنده پلاسمید تحت تیمار G418 زنده ماندند.

سلول ها به مدت ۴۰ روز برای بررسی بیان ژن پروتئین فلورسانست سبز توسط میکروسکوپ فلورسانست تحت بررسی قرار گرفتند و تراکم سلول های سبز رنگ حاصل از پروتئین فلورسانست سبز و پایداری رنگ سبز فلورسانست روزانه بررسی و محیط کشت سلول ها هر سه روز یک بار تعویض شدند. از سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخدمان هامستر چینی تراسفکت 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 ای روش لیز قلیایی که قبلًا 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 پلیمراز 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 پلیمراز ها به گونه ای طراحی شدند که محصولات آنها در دو انتهای <sup>۳</sup> و <sup>۵</sup> همپوشانی داشتند (شکل ۳ و جدول ۳).

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



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

#### یافته ها

#### نتایج مدل سازی همسان بنیان

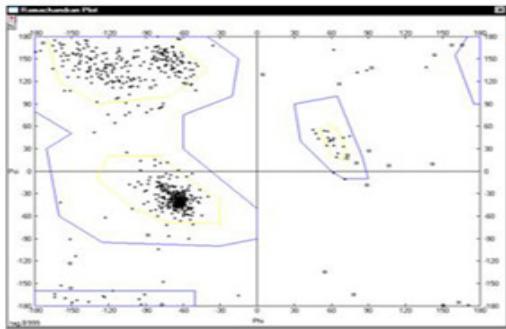
<sup>۱</sup>Dulbecco's modified eagle medium

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

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

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 زاویای فای و سای توسط پلات راماچاندران مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۵).

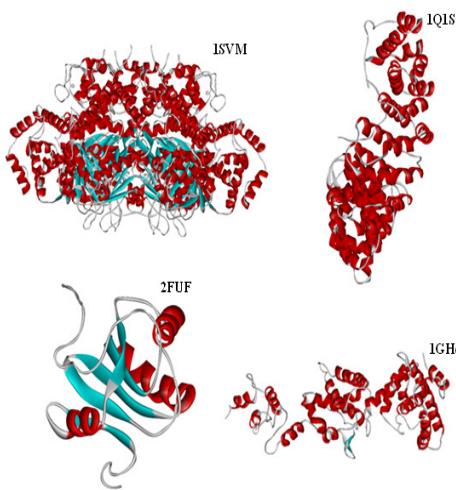
شکل ۵ نمودار راماچاندران مربوط به بهترین مدل ساخته شده پروتئین آنتی ژن T جهش یافته، اکثر اسید آمینه ها (>91%) در مدل انتخاب شده برای پروتئین جهش یافته در منطقه مجاز قرار گرفته اند.



از آنجاییکه میزان هومولوژی میان الگو و توالی ها بسیار زیاد بود، مدل های ساخته شده از نظر زاویای فای و 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 و 2FUF) با کمترین میزان E-Value و بالاترین وضوح، برای مدل سازی انتخاب شدند (شکل ۴).

شکل ۴. الگوهای 1Q1S, 1GH6 و 1SVM و 2FUF که در آن پروتئین آنتی ژن T بصورت چهار تکه جدا از هم نشان داده شده است.

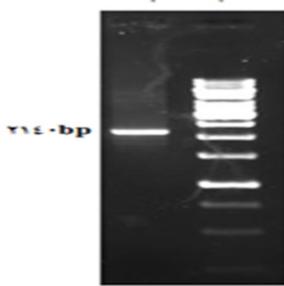


در مرحله بعد همتراز کردن توالی های چهار تکه الگوی انتخاب شده و پروتئین های آنتی ژن T جهش یافته انجام گرفت. پس از همترازی توالی، ۱۰۰۰۰ مدل برای هر یک از پروتئین های آنتی ژن T جهش

صورت جایگزینی اسید آمینه سرین با آلانین انتخاب شد.

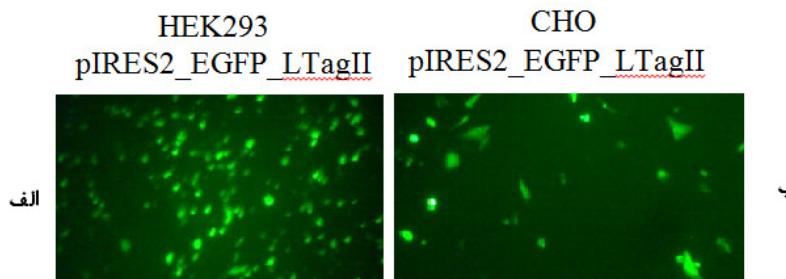
دوره سیزدهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۲

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



**ترانسفکشن سلول‌های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخدمان هامستر چینی در ترانسفکشن سلول‌های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخدمان هامستر چینی پس از ۴۸ ساعت حدود ۸۰**

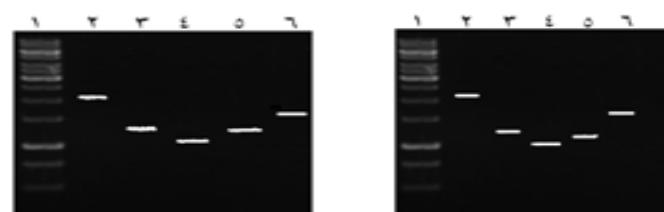
شکل ۷. ترانسفکشن pIRES2-EGFP-LTagII در سلول‌های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخدمان هامستر چینی



(الف) سلول‌های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ تراویخت شده از گذشت ۴۰ روز

(ب) سلول‌های تخدمان هامستر چینی تراویخت شده از گذشت ۴۰ روز

الف. سلول‌های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ تراویخت شده بعد از گذشت ۴۰ روز ب. سلول‌های تخدمان هامستر چینی تراویخت شده بعد از گذشت ۴۰ روز  
شکل ۸. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز‌های همپوشان که مجموعاً کل پلاسمید را تکثیر می‌کردند. در تمامی شکلها خط ۱ مارکر ۱kb، خط ۲ قطعه bp ۲۱۶، خط ۳ قطعه bp ۱۳۷۱، خط ۴ قطعه ۱۰۵۱ bp، خط ۵ قطعه ۱۱۸۲ و خط ۶ قطعه ۱۶۶۶ bp می‌باشد.



در صد سلول‌ها سبز شدنده که نشان دهندهٔ ورود پلاسمید به درون سلول‌ها بود.

جهت ایجاد موتاسیون در موقعیت ۶۷۹ طراحی و انجام شد. برای تایید طول قطعهٔ نهایی نمونه حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، الکتروفورز گذاشته شد (شکل ۶).

وجود نخواهد داشت. برای مثال سلول های ترانسفکت شده با وکتورهای رتروویروسی در ایده الترین 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 مهتر تعداد کم 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 درسلول های یوکاریوتی باشند. ولی از آنجایی که این پلاسمیدها برای همانندسازی خود نیازمند فاکتورهای ترانس ویروس هستند که باعث فعل سازی سیستم های ایمنی و تومورزاکی می شوند مفید واقع نشده اند [۱۵]. بنابراین یک استراتژی برای بینه سازی ای پلاسمیدها از بین بردن ویژگی های تحریک ایمنی و تومورزاکی 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 کمی 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 بینه سازی پروتئین آنتی ژن T ویروس سیمین ۴۰ تکنیک های بیوانفورماتیک را در کنار تکنیک های ملکولی به کار گرفتند [۵].

**تأیید دخول و ماندگاری سازه ی نهایی در ردۀ سلولی کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخدمان هامستر چینی**

ترانسفکشن pIRES2-EGFP-LTagII در سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخدمان هامستر چینی رنگ سبز فلورسانسیت به مدت بیش از ۴ 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 تخدمان هامستر چینی نوترکیب، تخلیص پلاسمید انجام شد. بر روی محصول تخلیص پلاسمید پنج واکنش زنجیره ای-پلیمراز 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 تخدمان هامستر چینی نوترکیب تخلیص DNA انجام شد و بر روی آنها پنج واکنش زنجیره ای پلیمراز همپوشان که اسکلت بندی EGFP-LTagII را شامل می شود گذاشته شد که تمامی آنها منفی بودند.

## بحث

یک روش برای ژن درمانی و تولید پروتئین های نوترکیب تولید وکتورهای بیانی است. برای مثال در ژن درمانی تولید وکتورهای بیانی که دارای توالی های آنتی سنس برای مهار بیان انکوژن ها و رسپتورهای 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

نوترکیب می‌باشد درون سلول های انسانی مورد بررسی قرار گیرد، از اینرو نیاز به ژن مقاومت به آنتی بیوتیک یوکاربیوتی جیت 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 ژن T جهش یافته جیت ترانسفکشن در سلول های کلیه جنینی انسان ۲۹۳ و تخمدان هامستر چینی انتخاب شد.

نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمرازهای همپوشان بر روی پلاسمید نوترکیب استخراج شده از سلول های میزبان ثابت بودند. این شواهد نشانگر حضور 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 پلیمراز 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 می‌توان 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 ۱۰۰-۲۵٪ کمی 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

پروتئین آنتی ژن T یک انکوپروتئین ویروسی است که عملکردهای بیولوژیکی مختلفی دارد. این عملکردهایش را بواسطه سه دومین مختلف (آ- دومین، دومین متصل شونده به مبدأ همانندسازی و دومین هلیکازی) انجام می دهد. آ- دومین که مسئول غیر فعال کردن پروتئین رتینوبلاستوما است فعالیتش را با همکاری موتفی LXCXE انجام می دهد. دومین متصل شونده به مبدأ همانندسازی که با اتصال به ناحیه های پتانوکلتوتیدی در مبدأ همانندسازی ویروس باعث شروع همانندسازی ویروس سیمین ۴۰ می شود و دومین هلیکازی نقش مهار پروتئین P<sub>53</sub> و هدایت چنگال همانندسازی را با فعالیت هلیکازی خود دارد. برای غیر فعال کردن موتفی LXCXE و آ- دومین اسید آمینه لیزین را در موقعیت ۱۰۷ جایگزین اسید آمینه اسید گلوتامیک و برای غیر فعال کردن دومین انتهایی کربوکسی پروتئین آنتی ژن T اسید آمینه اسید گلوتامیک را در موقعیت ۴۰۲ جایگزین اسید آمینه آسپارتاتیک کردد[۵]. ولی بررسی های بیوانفورماتیکی نشان داد که جهش در ناحیه ۶۷۹ که در آن اسید آمینه سرین باalanین 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 فلورسانس برای مدت بیش از ۴۰ روز پایدار بود. پروتئین سبز فلورسانس از جمله جدیترین پروتئین گزارشگر قابل مقایسه و اندازه گیری است که برای مشاهده بیان آن نیاز به سوبسترا یا کوفاکتور خاص نیست. این پروتئین در نور مأوراء بنفش، بدون آسیب رساندن به بافت، از خود رنگ سبز تولید می کنند [۵]. از طرف دیگر پلاسمید

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 انسستیتو پاستور ایران انجام شده است لذا نویسندها این مقاله از کلیه همکاران بخش تحقیق و توسعه انسستیتو پاستور ایران کمال قدردانی و تشکر را دارند.

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  $P_{53}$  می تواند باشد از طرفی

### 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. Methylotrophic Yeast Hansenula polymorpha as production organism for recombination pharmaceuticals. Arzneimittel Forschung. 1996 Sep; 46: 892-943.
- 9- Tabiot-Dameron F, Malassagne B, Viglietta C, Weill B, Houdebine LM. Association of the 5Hs<sub>4</sub> 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.