

طراحی و ساخت پلاسمید حاوی مبداء همانندسازی میتوکندری و ارزیابی تکثیر آن در رده ی سلولی انسان

سپیده امین زاده گوهری^۱ - حسین خان احمدی^۲ - مرتضی کریمی پور^۳ - پریچهر یغمایی^۴
سکینه کریمی زارع^۵ - فاطمه جمشیدی^۶

چکیده

زمینه و هدف: هدف از این پژوهش ساخت پلاسمید با مبداء همانندسازی ژنوم میتوکندری انسان به منظور دستیابی به ناقلی ایمن است که قادر باشد به صورت اپی زومال و به وسیله عناصر ترانس سلول انسان شناسایی و همانندسازی شود. مزیت این ناقل نسبت به ناقلین آدنو ویروسی ماندگاری و نسبت به ناقلین رترو ولنتی ویروس عدم ورود در ژنوم سلول میزبان می باشد.

روش تحقیق: سه قطعه شامل مبداء های همانندسازی رشته ی سبک و سنگین ژنوم میتوکندری و ژن gfp با روش PCR تکثیر و در وکتور pTZ57T/A کلون شدند. قطعه ژن hygro از پلاسمید pFBGGT با هضم آنزیمی جداسازی شد. سپس هر چهار قطعه در پلاسمید pBGGT ساب کلون گردیدند. تمام کلون های بینابینی و پلاسمید نهایی با روش PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی بررسی شدند. سلول های HEK293 و CHO با سازه نهایی ترانسفکت شدند. سلول های ترانسفکت شده با میکروسکوپی فلورسنت به مدت چهل روز به صورت روزانه مشاهده شدند. از سلول های باقی مانده، پلاسمید و DNA ژنومیک تخلیص گردید و بر روی آن ها PCR های همپوشان به منظور اثبات حلقوی بودن پلاسمید انجام شد.

یافته ها: نتایج حاصل از PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی همگی تأیید کننده ی صحت انجام ساخت سازه بود. نتایج حاصل از ترانسفکشن سلول های HEK293 و CHO نشانگر عدم همانندسازی پلاسمید در سلول های فوق بود.

نتیجه گیری: با توجه به این که پلاسمید واجد دو مبداء همانندسازی میتوکندری نتوانست درون سلول های انسانی تکثیر شود، به نظر می رسد مجبور به فراهم آوری شرایط مشابه همانندسازی ژنوم میتوکندری به منظور همانندسازی ناقل نامبرده در تحقیقات آتی باشیم.

کلید واژه ها: ژن درمانی؛ ناقل غیر ویروسی؛ مبداء همانندسازی میتوکندری

افق دانش؛ فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد (دوره ۱۵؛ شماره ۳؛ پاییز سال ۱۳۸۸)

دریافت: ۱۳۸۸/۳/۲۰ اصلاح نهایی: ۱۳۸۸/۷/۲۳ پذیرش: ۱۳۸۸/۸/۱۹

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران

۲- نویسنده مسؤول؛ Ph.D فراورده های بیولوژیک، انستیتو پاستور ایران، بخش ب ث ژ

آدرس: تهران- خیابان پاستور- پلاک ۶۹- انستیتو پاستور ایران - بخش پزشکی مولکولی

تلفن: ۰۹۱۳۱۲۱۴۰۳۱ -نمبر: ۰۲۱-۸۸۷۱۸۵۵۷ -پست الکترونیکی: hossein_khanahmad@yahoo.com

۳- Ph.D فراورده های بیولوژیک، بخش پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران

۴- Ph.D فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران

۵- کارشناس ارشد زیست شناسی ژنتیک، انستیتو پاستور ایران، بخش ب ث ژ

۶- کارشناس ارشد زیست شناسی فیزیولوژی جانوری، بخش پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران

مقدمه

با پیشرفت در علم ژنتیک، بیولوژی و پاتوبیولوژی مولکولی به تدریج علت بسیاری از بیماری‌ها در سطح مولکولی شناخته شد. در گام بعد، محققین به فکر ابداع روش‌های ژن درمانی^۱ و بهینه سازی آن به منظور درمان بیماری‌های ژنتیکی افتادند. در ژن درمانی تلاش می‌شود با ارایه ی ماده ژنتیکی حاوی ژن درمانگر^۲ به سلول‌های واجد نقص ژنتیک، نقایص آن‌ها برطرف گردد (۱). برای ژن درمانی دو نوع ناقل DNA یکی بر پایه ویروس‌ها و دیگری بر پایه پلاسمیدهای نوترکیب استفاده می‌شوند که هر کدام از آن‌ها دارای مزایا و معایب ذاتی خود می‌باشند (۲). موفقیت ژن درمانی تا حدود بسیار زیادی وابسته به پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه ی ناقل‌های ارائه دهنده ژن به سلول‌ها است (۳).

با توجه به کارایی بالای ویروس‌ها برای ارایه ی ژن به سلول، محققین به فکر طراحی ناقل‌های ویروسی کارآمد و ایمن برای انتقال ژن به سلول افتادند. در این راستا ناقل‌های ویروسی بر اساس آدنووایروس، آدنواسویتیدوویروس، رتروویروس، لنتی ویروس و هرپس ویروس‌ها طراحی و مهندسی شدند و در طی نسل‌های مختلف تکامل یافتند. از معایب ناقل‌های ویروسی می‌توان به پاسخ‌های ناخواسته ایمنی، خصوصاً در کاربرد آدنووایروس‌ها و دخول تصادفی ژنوم ویروس در ژنوم سلول در مورد رترو و لنتی ویروس‌ها اشاره نمود. این دخول تصادفی می‌تواند منجر به اختلال در ژن‌های مفید از قبیل مهارکننده های توموری^۳ و یا فعال سازی انکوژن‌ها^۴ گردد (۴). از طرفی ظرفیت پذیرش ژن درمانگر در ناقل‌های ویروسی محدود می‌باشد. ناقل‌های غیر ویروسی در مقایسه با ناقلین ویروسی پاسخ ایمنی کمتری را برانگیخته و اغلب اوقات به صورت اپی زومال در سلول‌ها باقی می‌مانند. لذا خطرات فعال کردن انکوژن‌ها یا غیر فعال کردن ژن‌های مهار کننده ی توموری را ندارند. هم‌چنین تهیه و تولید ناقلین غیر ویروسی در مقادیر زیاد نسبت به ناقلین ویروسی آسان تر و مقرون به صرفه تر می‌باشد (۱،۴).

در مواردی که ناقل به صورت اپی زومال داخل سلول می‌ماند در طی تقسیمات سلولی به تدریج از بین می‌رود و نیازمند تکرار مجدد روند ژن درمانی برای حصول سطح درمانی مطلوب هستیم. ناقل برای آن که بتواند به طور اپی زومال درون سلول ماندگار بماند بایستی قادر به تکثیر خود باشد. با به کارگیری مبداء‌های همانندسازی (ORI) ویروس‌هایی چون EBV^۵، SV40^۶ و هرپس سیمپلکس ویروس پلاسمید‌های نوترکیبی ساخته شده که دارای قابلیت تکثیر در رده‌های سلولی واجد عناصر ترانس لازم از جمله T آنتی ژن، EBNA1^۷ و Lana برای همانندسازی این ویروس‌ها می‌باشند (۵). بنابراین پلاسمیدهای واجد این مبداء‌های همانندسازی ویروسی در سلول‌های کشت اولیه پستانداران به علت عدم حضور عناصر ترانس قادر به تکثیر نمی‌باشند. از طرفی عناصر ترانس فوق‌الذکر اکثراً باعث ایجاد پاسخ‌های ایمنی و ترانفورمیشن سلول پذیرنده می‌شوند (۶). لذا از این استراتژی برای ژن درمانی نمی‌توان استفاده کرد. پس به منظور تکثیر ناقل درون سلول‌های کشت اولیه انسانی بایستی به دنبال مبداء همانندسازی بود که بتواند به طور اپی زومال و به وسیله عناصر ترانس سلول انسان شناسایی و همانندسازی شوند. ژنوم میتوکندری تنها عنصر ژنتیکی سلول انسان است که به طور اپی زومال در سلول همانندسازی و مانند پلاسمیدهای باکتریایی به طور مستقل از ژنوم هسته تکثیر می‌شوند و نسخه‌های متعدد حلقوی به وجود می‌آورد. میتوکندری انسان واجد دو مبداء همانندسازی رشته سبک (OL) و سنگین (OH) است. OH در منطقه تنظیمی D-LOOP قرار گرفته است. این منطقه ی کنترلی واجد عناصر تنظیمی دیگری مانند پروموتورهای رشته نگین HSP₁^۸، HSP₂ و پروموتور رشته سبک LSP^۹ نیز است (۷،۸).

با توجه به مجموع مطالب عنوان شده، این تحقیق درصدد ساخت پلاسمید حاوی مبداء همانندسازی میتوکندری انسان و بررسی قابلیت همانندسازی آن در رده ی سلولی HEK 293^۱ و CHO^۲ می‌باشد.

5- Epstein-Barr Virus

6- Simian Virus 40

7- Epstein-Barr Nuclear Antigen

8- Heavy Strand Promoter

9- Light Strand Promoter

1- Gene Therapy

2- Gene Therapeutic

3- Tumor Suppressor Genes

4- Oncogene

روش تحقیق

طراحی پلاسمید: در طراحی اولیه پلاسمید (pBGGT (DQ384617.1) به علت آن که واجد جایگاه‌های برش آنزیمی^۳ مناسب بود، به عنوان ناقل پایه به منظور دخول چهار قطعه ژنی شامل O_L، D-loop، کاست بیانی پروتئین سبز فلورسنت (gfp)^۴ به عنوان ژن گزارشگر و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک یوکاریوتی هیگرومایسین (hygro) به عنوان شاخص انتخاب گر انتخاب شد.

وضعیت قطعات فوق از نظر آنزیم های برش دهنده و غیر برش دهنده با نرم افزار Gene runner بررسی شدند.

طراحی پرایمر و تکثیر قطعات به وسیله PCR: DNA ژنومیک انسان با کیت تخلیص (ساخت شرکت Qiagen DNA) از گلوبول های سفید خون محیطی انسان تخلیص شد. پرایمرهای مورد نیاز با جایگاه برش آنزیمی مناسب در انتهای^۵ آن ها طراحی و سفارش ساخت به شرکت تک کپنهاک دانمارک داده شد (جدول ۱).

دو قطعه O_L، D-loop به وسیله آنزیم PFU (ساخت شرکت Fermentas - لیتوانی) از روی DNA ژنومیک انسان و قطعه GFP توسط آنزیم PFU از روی پلاسمید

pEGFP-N1 با روش PCR در دستگاه ترموسایکلر (ساخت شرکت Eppendorf - آلمان) تکثیر شدند. سه قطعه O_L، D-loop و GFP پس از تکثیر بر روی ژل آگارز (ساخت شرکت Cinnagene - ایران) به ترتیب ۱/۲، ۱ و ۱ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برآید به ترتیب در کنار مارکرهای ۱۰۰ bp، ۱ kb و ۱ kb (ساخت شرکت Fermentas لیتوانی) الکتروفورز شدند.

کلونینگ: قطعات مد نظر از روی ژل بریده شد و به وسیله کیت تخلیص DNA از ژل (ساخت شرکت Fermentas - لیتوانی) تخلیص شدند و سپس در وکتور pTZ57T/A (لیتوانی) کلون شده و پلاسمیدهای pT-Dloop، pT-oriL و pT-Gfp به دست آمد. قطعات ژنی به ترتیب با هضم آنزیمی توسط آنزیم های محدودالایثر BglIII و MluI برای GFP و NheI و MluI برای D-loop و AflIII برای O_L از پلاسمیدهای فوق جداسازی و در پلاسمید pBGGT ساب کلون شدند. ژن مقاومت به هیگرومایسین نیز توسط هضم آنزیمی دو آنزیم محدود الاثر BglIII و MluI از پلاسمید pBGGT جداسازی شد (۱۴) و در pBGGT ساب کلون گردید (شکل ۱).

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد نیاز

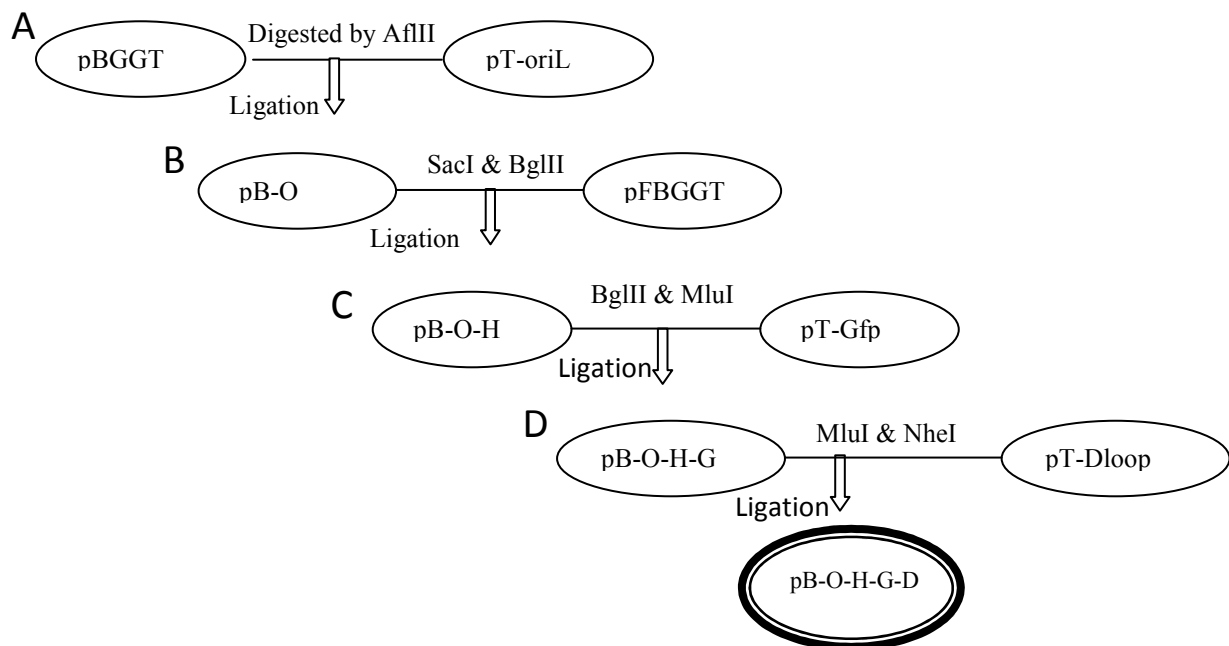
نام پرایمر	توالی	طول قطعه	سایت آنزیمی در انتهای ۵'
pF - Dloop	5' GCTAGCACTATTCTCTGTTCTTTCATGGG 3'	۱۱۸۰bp	NheI
pR - Dloop	5' ACGCGTCAGTGTATTGCTTTGAGGAGG 3'		MluI
pF - O _L	5' CTTAAGCCCACAAACTTAGTTAACAG 3'	۱۸۰ bp	AflIII
pR - O _L	5' CTTAAGCAGCTCCGAGGTGATTTTC 3'		AflIII
pF - Gfp	5' ACGCGTTCTGTGGATAACCGTATTACC 3'	۱۶۸۰bp	MluI
pR - Gfp	5' AGATCTTAAGATACATTGATGAGTTTGGAC 3'		BglIII

1- Human Embryonic kidney 293

2- Chinese Hamster Ovary

3- Multiple Cloning Sites

4- Green Fluorescent Protein



شکل ۱: (A) مراحل ساخت pT-oriL: pBGGT با آنزیم AflIII هضم و با اتصال قطعه oriL در pBGGT، پلاسمید pB-O حاصل شد. (B) pB-O و pFBGGT با آنزیم های SacI و BglIII هضم و با اتصال قطعه Hygro در pB-O، پلاسمید pB-O-H حاصل شد. (C) pB-O-H و pT-Gfp با آنزیم های BglIII و MluI هضم و با اتصال قطعه Gfp در pB-O-H، پلاسمید pB-O-H-G حاصل شد. (D) pB-O-H-G و pT-Dloop با آنزیم های MluI و BglIII هضم و با اتصال قطعه D-loop در pB-O-H-G، پلاسمید نهایی pB-O-H-G-D ساخته شد.

ترانسفکشن سلول های HEK 293T و CHO: سلول های HEK 293 (بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) و CHO (بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) در محیط RPMI 1640 حاوی سرم جنین گوساله ۱۰٪، گلوتامین ۲۰ میلی مولار در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دی اکسید کربن و حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. یک روز قبل از ترانسفکشن تعداد 2×10^6 سلول HEK 293 و CHO در پلیت ۱۰۰ میلی متری کشت داده شدند. سلول ها انکوبه شدند تا تراکم سلول در سطح به ۷۰ تا ۸۰ درصد یعنی مقدار مناسب برای ترانسفکشن برسد. قبل از ترانسفکشن محیط کشت سلول ها با ۷ میلی لیتر محیط کشت تازه تعویض شد. سلول ها با ۴ میکروگرم DNA (سازه ژنی) و با استفاده از کیت پلی فکت (ساخت شرکت Qiagen - آلمان) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده ترانسفکت شدند. بررسی دخول سازه ی نهایی و ماندگاری آن درون سلول های HEK 293 و CHO: ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن

همه ی پلاسمیدها با روش ترانسفورمیشن در باکتری E.coli سویه Top 10 و بر اساس دستورالعمل استاندارد مربوطه تکثیر شدند (۱۵). برای رشد باکتری ها از محیط (LB-Borth ساخت شرکت Merck آلمان) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی سیلین استفاده شد. **تأیید ساب کلون ها:** هر مرحله ی ساب کلونینگ از طریق کلونی PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی به روش ختم زنجیره به صورت تجاری (شرکت ماکروژن - کره) با پرایمرهای M13 universal و یا پرایمرهای قطعات کلون شده، تأیید شدند.

تأیید صحت قرارگیری دو قطعه D-loop و O_L نسبت به یکدیگر: بعد از کلون نمودن قطعه O_L درون پلاسمید و تأیید دخول O_L درون آن به وسیله کلونی PCR و هضم آنزیمی به منظور بررسی قرار گیری O_L بر روی رشته آنتی سنس، پلاسمید با آغاز گر FM13 تعیین توالی شد (شکل ۷).

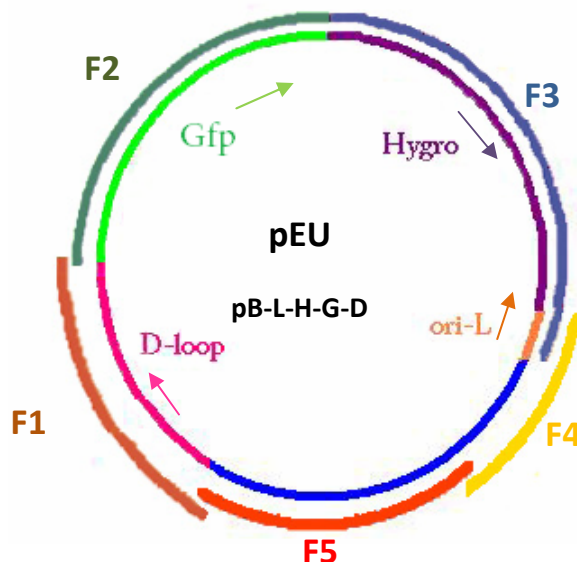
اصولی برای تخلیص پلاسمید از سلول های پستانداران، استفاده از شیب چگالی کلرید سزیوم است (۲۴). اما به علت عدم امکان استفاده از این تکنیک، تخلیص پلاسمید بر پایه ی روش لیز قلیایی که قبلاً در آزمایشگاه بر روی سلول های T293 حاوی پلاسمید pcDNA3.1Hygro بهینه سازی شده بود، انجام شد. بر روی محصول استخراج پلاسمید پنج PCR گذاشته شد. پنج PCR همپوشان بر روی پلاسمید نهایی pEU استخراج شده از سلول های باکتریایی E.coli به عنوان کنترل مثبت انجام شده بود. پرایمر های جهت این PCR ها به گونه ای طراحی شدند که محصولات آن ها در دو انتهای ۳' و ۵' همپوشانی داشتند (جدول ۲، شکل ۲).

محیط کشت تعویض شد و ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن سلول ها تحت تیمار آنتی بیوتیک هیگرومایسین (۱۵۰ میکروگرم آنتی بیوتیک هیگرومایسین بر میلی لیتر) قرار گرفتند. سلول های پذیرنده پلاسمید تحت تیمار هیگرومایسین زنده ماندند.

سلول ها به مدت ۴۰ روز برای بررسی بیان ژن گزارشگر gfp توسط میکروسکوپ فلورسنت تحت بررسی قرار گرفتند و تراکم سلول های سبز رنگ حاصل از پروتئین GFP و پایداری رنگ سبز فلورسنت روزانه بررسی و محیط کشت سلول ها هر سه روز یک بار تعویض شدند. از سلول های اولین ترانسفکشن سلول های HEK 293 تخلیص پلاسمید انجام شد. روش

جدول ۲: PCR های همپوشان بر روی پلاسمید نهایی

نام قطعات	طول قطعه	میزان همپوشانی
F1	۱۱۸۰ bp	این قطعه به اندازه ی ۶ نوکلئوتید از انتهای ۳' خود با انتهای ۵' قطعه F2 و به اندازه ی ۲۲ جفت باز از انتهای ۵' خود با انتهای ۳' قطعه F5 همپوشانی دارد.
F2	۱۷۶۳ bp	این قطعه به اندازه ی ۶ نوکلئوتید از انتهای ۵' خود با انتهای ۳' قطعه F1 و به اندازه ی ۶ نوکلئوتید از انتهای ۳' خود با انتهای ۵' قطعه F3 همپوشانی دارد.
F3	۱۹۳۲ bp	شامل دو قطعه ی O _L و hygro است. قطعه ی F3 بدون هیچ فاصله ای پشت سر قطعه ی F2 قرار گرفته است.
F4	۱۳۹۸ bp	این قطعه شامل قطعه ی O _L و ۱۲۲۹ جفت نوکلئوتید از پلاسمید پایه است. در انتهای ۳' خود با ۸ جفت باز انتهای ۵' قطعه F5 همپوشانی دارد.
F5	۱۴۹۸ bp	این قطعه در انتهای ۵' خود با ۸ جفت باز انتهای ۳' قطعه ی F4 و در انتهای ۳' خود با ۲۲ جفت باز انتهای ۵' قطعه F1 همپوشانی دارد.



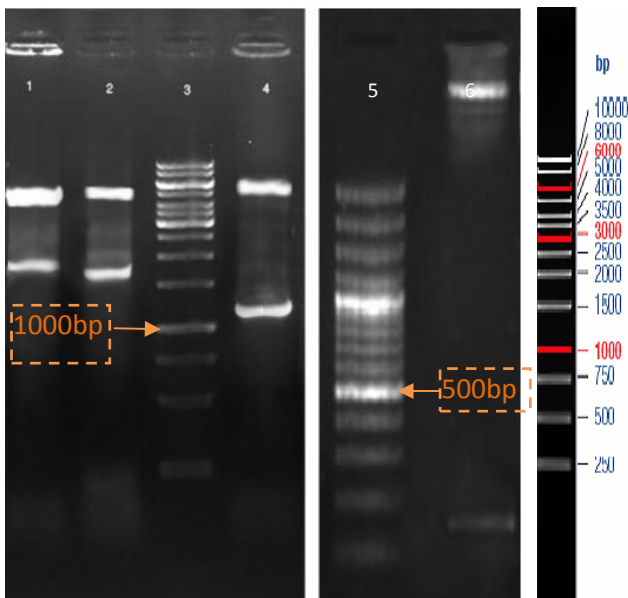
شکل ۲: ترتیب قرارگیری قطعات بر روی پلاسمید نهایی pEU و قطعات حاصل از پنج PCR همپوشان: Dloop-Gfp-Hygro بر روی رشته سنس پلاسمید و قطعه oriL بر روی رشته آنتی سنس قرار گرفته اند.

D-loop در رشته ی مقابل واقع شد (شکل ۲). نتایج PCR و کلونینگ: سه قطعه O_L، D-loop و کاست بیانی *gfp* به وسیله PCR تکثیر شدند. هر سه قطعه در وکتور کلونینگ pTZ57T/A کلون شدند و با هضم آنزیمی، PCR و تعیین توالی تأیید شدند. قطعه *hygro* با پروموتور و توالی خاتمه دهنده یوکاریوتی به وسیله هضم آنزیمی *Bgl*III و *Sac*I از پلاسمید pFBGGT جداسازی شد. هر چهار قطعه در پلاسمید pBGGT در کنار هم ساب کلون شدند. صحت و درستی تمام مراحل ساب کلونینگ با هضم آنزیمی، PCR و تعیین توالی تأیید شدند. در آخر نیز سازه نهایی pEU (شکل ۳) و هضم آنزیمی (شکل ۴) تأیید شد و در دو جهت تعیین توالی گردید.

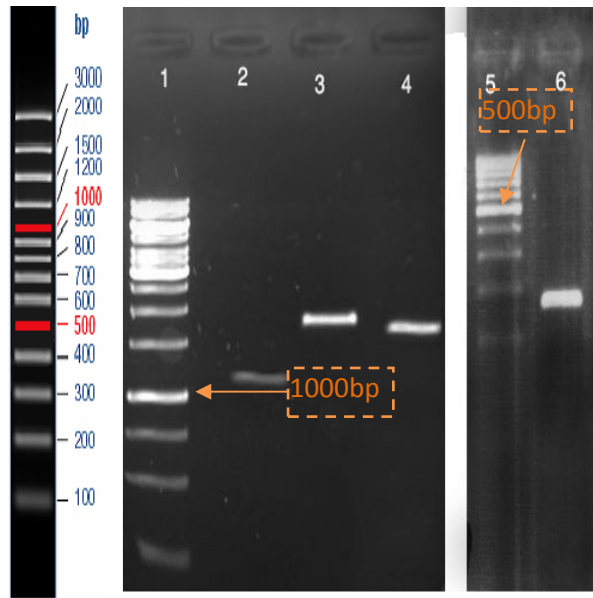
مجموع PCR های انجام شده طول کل پلاسمید را تکثیر می کردند. سپس از سلول های HEK 293 حاصل از اولین ترانسفکشن DNA ژنومیک به وسیله ی کیت تخلیص (DNA از شرکت Qiagen - آلمان) تخلیص شد و بر روی آن پنج PCR همپوشان گذاشته شد. هم چنین پنج PCR همپوشان بر روی جسم کامل سلول های سبز باقی مانده پس از ۴۰ روز انتخاب به صورت کلونی PCR گذاشته شد.

یافته ها

نتایج طراحی: پلاسمید به گونه ای طراحی شد که ۳ قطعه D-loop، *gfp* و *hygro* بر روی رشته سنس پلاسمید قرار گرفتند و قطعه O_L در فاصله ی دو سوم قطعه



شکل ۴: هضم آنزیمی pEU با آنزیم های محدودالایتر: ۱- هضم با ۲ آنزیم *Sac*I و *Bgl*III - قطعه *hygro* (1750 bp) ۲- هضم با دو آنزیم *Mlu*I و *Bgl*III - قطعه *gfp* (1680 bp) ۳- مارکر ۱ kb ۴- هضم با دو آنزیم *Mlu*I و *Nhe*I - قطعه D-loop (1180 bp) ۵- مارکر 100 bp ۶- هضم با آنزیم *Afl*III - قطعه *ori*L (180 bp)



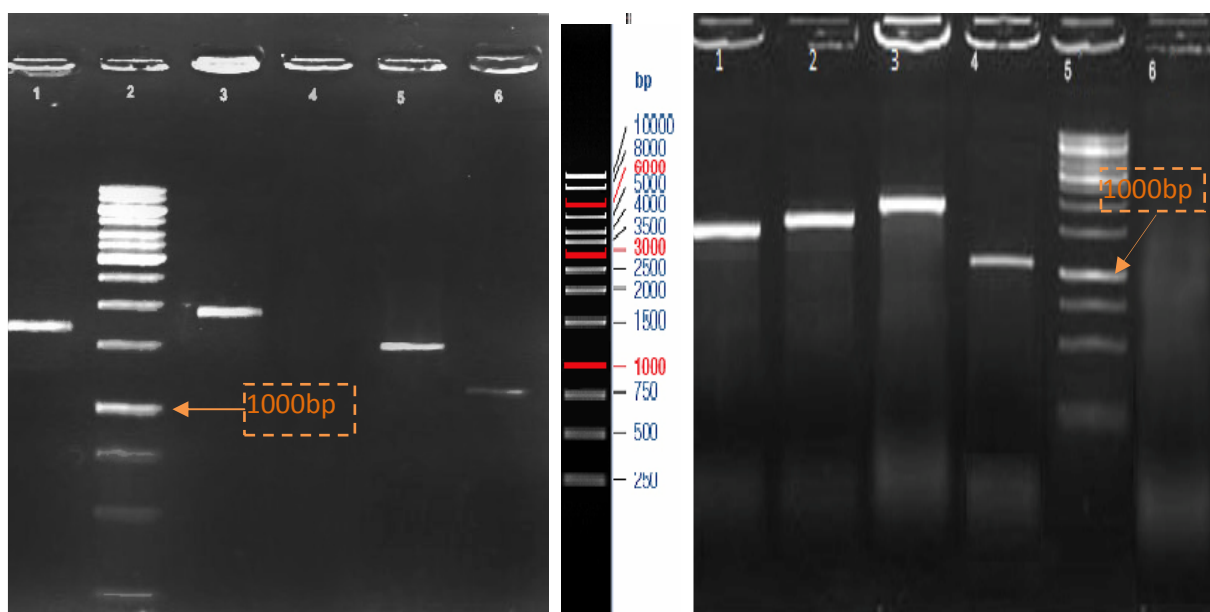
شکل ۳: کلونی PCR بر روی pEU: ۱- مارکر 1kb ۲- قطعه D-loop (1180 bp) ۳- قطعه *gfp* (1680 bp) ۴- *hygro* (1750 bp) ۵- مارکر 100 bp ۶- قطعه *ori*L (180 bp)

بر روی ژل آگارز ۱ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بر مایند الکتروفورز شد که در مقابل اشعه ی ماورای بنفش تنها اسمیر کم رنگ مشاهده شد. بر روی محصول تخلیص پلاسمید پنج PCR همپوشان گذاشته شد که هیچ کدام از آن ها محصولی نداشتند. اما پنج PCR همپوشان که بر روی پلاسمید نهایی pEU استخراج شده از سلول های باکتریایی E.coli انجام شده بود تمامی مثبت بود. از سلول های HEK 293 نو ترکیب تخلیص DNA انجام شد و بر روی آن ها پنج PCR همپوشان گذاشته شد. تمامی قطعات به جز قطعه F4 که قسمتی از اسکلت بندی pEU می باشد، تکثیر شدند (شکل ۵).

هم چنین پنج PCR همپوشان بر روی جمعیت کوچکی از سلول های HEK 293 نو ترکیب به صورت کلونی PCR گذاشته شد. مجدداً تمامی قطعات به جز قطعه F4 تکثیر شدند (شکل ۵).

تأیید صحت قرارگیری دو قطعه ی **D-loop** و **O_L** نسبت به یکدیگر: نتیجه تعیین توالی توسط آغازگر FM13 نشان داد قطعه ی **O_L** بر روی رشته آنتی سنس قرار گرفته است. ترانسفکشن سلول های **HEK 293** و **CHO**: در ترانسفکشن سلول های **HEK** و **CHO** پس از ۴۸ ساعت حدود ۸۰ درصد سلول ها سبز شدند که نشان دهنده ی ورود پلاسمید به درون سلول ها بود.

تأیید دخول و ماندگاری سازه ی نهایی در رده ی سلولی **HEK 293** و **CHO**: در اولین ترانسفکشن pEU در سلول های **HEK 293** رنگ سبز فلورسنت به مدت بیش از ۱ ماه پایدار بود. 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 **HEK 293** نو ترکیب، تخلیص پلاسمید انجام شد. حاصل تخلیص



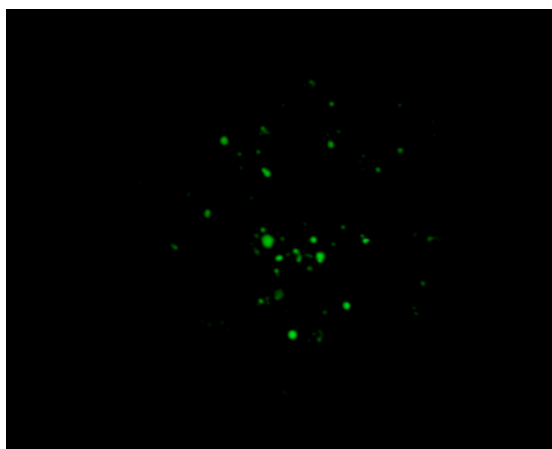
شکل ۵: PCR های همپوشان که مجموعاً کل طول پلاسمید سنتز شده را تکثیر می کردند.

الف) PCR های همپوشان بر روی DNA استخراج شده از سلول های HEK 293 اولین ترانسفکشن و عدم تکثیر قطعه F4
 ب) کلونی PCR های همپوشان بر روی جمعیتی از سلول های HEK 293 اولین ترانسفکشن و عدم تکثیر قطعه F4

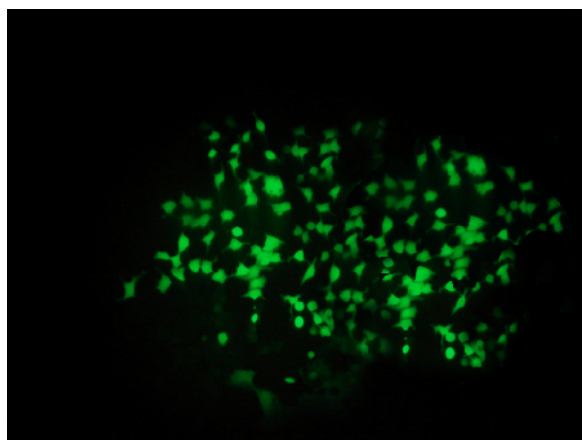
۱- قطعه F5 (1498 bp) ۲- قطعه F2 (1763 bp) ۳- قطعه F3 (1900 bp)
 ۴- قطعه F4 (1398 bp) (عدم تکثیر و عدم مشاهده باند) ۵- قطعه F5 (1180 bp) ۶- قطعه F1 (1498 bp) ۷- قطعه F2 (1763 bp) ۸- قطعه F3 (1900 bp) ۹- قطعه F4 (1398 bp) (عدم تکثیر و عدم مشاهده باند) ۱۰- قطعه F5 (1180 bp) ۱۱- قطعه F1 (1498 bp) ۱۲- قطعه F2 (1763 bp) ۱۳- قطعه F3 (1900 bp) ۱۴- قطعه F4 (1398 bp) (عدم تکثیر و عدم مشاهده باند) ۱۵- قطعه F5 (1180 bp)

دو بار دیگر pEU در سلول های HEK 293 ترانسفکت شد. در هر دو بار تعداد سلول های سبز رنگ پس از گذشت

۲۰ روز به شدت کاهش یافت (شکل ۶).



ب) سلول های تراریخت شده پس از گذشت ۲۰ روز



الف) سلول های HEK 293 تراریخت شده در هفته نخست

شکل ۶: ترانسفکشن پلاسمید برای سری دوم در سلول های HEK 293

بودند (۹) و یا در سال ۱۹۹۳ فراکازوسکا قطعه کوچکی از ژنوم میتوکندری *Papaver somniferum* را در پلاسمید کلون نمود. این پلاسمید می تواند در سلول های مخمر و قارچ هایی مانند *Kluyveromyces lactis* به طور مستقل همانندسازی نماید (۱۳).

در طراحی سازه، موقعیت قرارگیری قطعات O_L و $D-loop$ به گونه ای طراحی شد که مشابه موقعیت قرارگیری شان درون ژنوم میتوکندری باشد. در ژنوم میتوکندری منطقه کنترلی $D-loop$ بر روی رشته ی سنگین میتوکندری قرار گرفته و O_L در رشته ی مقابل به فاصله ی دو سوم اندازه طول ژنوم میتوکندری دورتر واقع شده است (۹,۱۰). با توجه به این که قطعه ی O_L در هر دو انتهای ۳' و ۵' دارای سایت آنزیمی برای *AflIII* بود، می توانست در هر دو رشته سنس و آنتی سنس قرار گیرد. بنابراین ابتدا O_L در پلاسمید pBGGT ساب کلون شد و پلاسمید $pBGGT-O_L$ تعیین توالی گردید تا مشخص شود O_L بر روی رشته آنتی سنس قرار گرفته باشد. سپس سه قطعه دیگر در مراحل بعدی در پلاسمید $pBGGT-O_L$ که قطعه O_L در آن روی رشته آنتی سنس قرار گرفته است، ساب کلون شدند.

در طراحی سازه، کل منطقه ی تنظیمی $D-loop$ که واجد O_H است انتخاب شد. زیرا این منطقه واجد پروموتور

بحث

یکی از مهم ترین عوامل موفقیت ژن درمانی معطوف به پیشرفت های انجام شده در زمینه ی ناقل ها و کفایت آن ها در تحویل ژن به درون سلول با حداقل سمیت و اثرات جانبی روی ژنوم است. اگرچه ناقلین ویروسی کارایی خوبی در انتقال ژن به درون سلول دارند اما نگرانی های مربوط به ایمنی استفاده از آن ها برای انسان، باعث می شود مقوله ارایه ی ژن از طریق سیستم های انتقال ناقلین غیر ویروسی حایز اهمیت شود (۱۶). یکی از مشکلات ناقلین غیر ویروسی عدم ماندگاری آن ها درون سلول های انسان است (۵). هدف از این مطالعه ساخت سازه ای جدید و کارآمد با دو مبداء همانندسازی ژنوم میتوکندری انسان به منظور توانایی تکثیر و ماندگاری ناقل درون سلول های انسانی می باشد. شایان ذکر است برخی تحقیقات که از سال ۱۹۸۱ آغاز شدند به بررسی توانایی همانندسازی و ماندگاری پلاسمیدهای واجد مبداء های همانندسازی میتوکندری موجوداتی هم چون گزنپوس، مخمر و قارچ در یوکاریوت های پستی مانند مخمر و قارچ ها پرداخته اند (۹-۱۳). برای مثال در سال ۱۹۸۱ زاکیان و همکاران، با کلون نمودن مبداء های همانندسازی میتوکندری گزنوپوس در پلاسمید، ناقلی را ساختند که قادر به تکثیر و پایداری به مقدار زیاد درون سلول های مخمر

به منظور اطمینان، آزمایش های ترانسفکشن سلول HEK 293 با پلاسمید pEU دو بار دیگر تکرار شد که در هر دو بار رنگ سبز فلورسنت پس از ۲۰ روز به علت عدم تکثیر پلاسمید pEU دارای ژن *gfp* شدیداً کاهش یافت. از مجموع نتایج حاصل شده به این مطلب می توان رسید که پلاسمید حاوی دو مبداء همانندسازی رشته ی سبک و سنگین میتوکندری نتوانسته درون سلول های انسانی همانندسازی شود. از آنجایی که بقای سلول های سبز رنگ منوط به تکثیر پلاسمید pEU است، پس برای این منظور باید به دنبال فراهم آوری شرایط و عناصر ترانس مورد نیاز برای تکثیر پلاسمید بود.

اگرچه تحقیقات صورت گرفته بر روی پلاسمیدهای واجد مبداء های همانندسازی ژنوم میتوکندری موجوداتی مانند مخمر، گزنوپوس و یا قارچ به ترتیب برای دو مورد اول در سلول مخمر و مورد سوم در سلول قارچ موفقیت آمیز بوده، اما شاید علت موفقیت تحقیقات فوق الذکر را بتوان به علت شباهت ساختار ORI ژنوم مخمر و قارچ با ژنوم میتوکندری دانست. مبداء های همانندسازی ژنوم یوکاریوت های پست هم چون مخمرها و پروتوزوآها، ژنوم میتوکندری و کلروپلاست، پلاسمیدها، ژنوم باکتریوفاژها و ویروس حیوانات در دسته ی مبداء های همانندسازی ساده با ساختار و توالی مشخص جای دارند. در حالی که مبداء همانندسازی ژنوم سلول های انسان در دسته مبداء های همانندسازی پیچیده قرار دارد که برخلاف مبداء های همانندسازی ساده دارای ساختار و توالی مشخص نیستند (۱۷).

آغاز همانندسازی از مبداء های همانندسازی نیازمند برهمکنش توالی های ORI و عناصر ترانس است. لذا احتمالاً به علت تفاوت ساختاری مبداء های همانندسازی ژنوم انسان با مبداء همانندسازی ژنوم میتوکندری انسانی عناصر ترانس هسته نتوانسته اند O_H و O_L را شناسایی کنند. حال این سؤال مطرح می شود که از بین فاکتورهای ترانس میتوکندریایی کدام یک برای آغاز همانندسازی پلاسمید از O_H و O_L ضروری هستند؟ فاکتورهای دخیل در همانندسازی ژنوم میتوکندری توسط ژنوم هسته کد می شوند. این عناصر شامل DNA پلیمراز، هلیکازهای

رشته سبک نیز است که پرایمر برای آغاز همانندسازی از O_H از آنجا رونویسی می شود.

با علم به این که متفاوت بودن مبداء های همانندسازی میتوکندری انسان با CHO احتمالاً سبب عدم همانندسازی pEU در سلول های CHO می گردد، سلول های CHO به عنوان کنترل از نظر ماندگاری موقت pEU در آن ها ترانسفکت شدند. رنگ سبز فلورسنت در این سلول ها صرفاً نتیجه ی بیان موقت *gfp* است که پس از گذشت ۲۰ روز رنگ سبز به شدت کاهش یافت.

اگرچه بعد از اولین ترانسفکشن سلول های HEK 293 رنگ سبز فلورسنت برای مدت بیش از یک ماه پایدار بود اما این شک را ایجاد نمود که شاید علت پایدارای بیان *gfp* شکست پلاسمید و دخول پلاسمید شکسته شده درون ژنوم سلول میزبان باشد. بنابراین با تخلیص پلاسمید و انجام PCR های همپوشان بر روی محصول تخلیص پلاسمید و DNA ژنومیک و هم چنین کلونی PCR بر روی سلول های کامل باقی مانده، حلقوی بودن پلاسمید بررسی شد. علت گذاشتن PCR های همپوشان اثبات حلقوی بودن پلاسمید در صورت وجود می باشد. برای این کار می توان از Long PCR و یا Long Inverse PCR استفاده نمود ولی به علت بهینه نبودن شرایط برای Long PCR و Long Inverse PCR ترجیح داده شد اثبات حلقوی بودن با قطعات PCR همپوشان که تمامی طول پلاسمید را در صورت حلقوی بودن تکثیر می نماید استفاده شود. علت انجام پنج PCR بر روی پلاسمید های حلقوی pEU استخراج شده از سلول- های *E.coli* جهت کنترل عملکرد صحیح پنج PCR همپوشان بود. با توجه به این که بعد از اولین ترانسفکشن سلول های HEK 293 پلاسمیدی تخلیص نشد در نتیجه تمامی PCR های همپوشان بر روی محصول تخلیص پلاسمید فوق نیز منفی بود. و از طرفی پنج PCR همپوشان بر روی DNA ژنومیک و جسم کامل سلول های HEK 293 نو ترکیب همگی به غیر از قطعه F4 مثبت بودند (شکل ۵). بنابراین می توان به این نتیجه رسید که پلاسمید در جایی در قطعه F4 شکسته و پلاسمید شکسته شده وارد ژنوم سلول میزبان گردیده است که در نتیجه ژن *gfp* به طور طولانی مدت و پایدار بیان می شود.

هلیکازی است (۱۷). بنابراین شاید هلیکاز میتوکندریایی فاکتور ترانس لازم برای همانندسازی پلاسمید باشد. اگرچه برای فاکتور ترانس EBNA1 که برای همانندسازی پلاسمید حاوی مبداء همانندسازی ویروس EBV لازم است؛ فعالیت هلیکازی مشاهده نشده است (۱۷).

نتیجه گیری

مهم ترین مطالبی که می تواند جهت گیری ما را در مشخص نمودن فاکتورهای ترانس برای همانندسازی این پلاسمید نو ترکیب واجد O_H و O_L راهبر باشد تحقیقاتی است که در سال های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۸ در آزمایشگاه فالکنبرگ انجام شده است. محققان این گروه در پی بررسی مکانیسم و فاکتورهای دخیل در همانندسازی میتوکندری هستند. در آخرین یافته های آن ها مشخص شده است که یک مینی رپلیزوم حاوی مبداء همانندسازی میتوکندریایی قادر است با چهار فاکتور DNA پلیمرز، SSBP، هلیکاز و RNA پلیمرز میتوکندریایی در شرایط *in vitro* همانندسازی نماید (۲۰،۲۳). با توجه به یافته ها پیشنهاد می گردد با کلون نمودن ابتدا هلیکاز میتوکندریایی، امکان همانندسازی پلاسمید بررسی گردد و در صورت منفی بودن جواب با کلون نمودن سه فاکتور دیگر آزمایش ها تکرار شود.

تشکر و قدردانی

این طرح در بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران انجام شده است لذا نویسندگان این مقاله از کلیه همکاران بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران کمال قدردانی و تشکر را دارند.

میتوکندریایی، پروتئین SSB میتوکندریایی، آنزیم RNA پلیمرز میتوکندریایی، DNA لیگاز، RNase MRP، ریبونوکلاز H، توپوایزومرازهای I و II، اندونوکلاز G، mtTFA، دو فاکتور رونویسی mtTFB1 و mtTFB2 هستند. عنصر ترانس شناسایی کننده مبداء همانندسازی میتوکندری پروتئین RNase MRP است که به منطقه ی شناسایی مبداء همانندسازی ORE متصل می شود (۱۷، ۱۰). پروتئین RNase MRP مسؤول پیرایش پرایمر RNA ای شکل گرفته در محل D-loop ژنوم میتوکندری و یک ریبونوکلوپروتئین است (۷). با توجه به این که RNase MRP در هستک نیز یافت می شود و در بالغ شدن ۵/۸ S rRNA نقش دارد (۷، ۱۸) و عناصر ریبونوکلاز H، توپوایزومرازهای I و II، DNA لیگاز میتوکندریایی مشابه همتاهای هسته ای شان هستند (۱۹). بنابراین به نظر می رسد حضور این فاکتور برای همانندسازی پلاسمید واجد O_H و O_L ضروری نباشد.

از طرف دیگر با توجه به این که ساختار مبداء های همانندسازی ژنوم میتوکندری مشابه ژنوم ویروس ها است (۱۷) شاید نگاهی به پلاسمید های حاوی ORI های ژنوم ویروس های EBV، SV40 و هرپس سیمپلکس نیز بتواند راهگشا باشد. پلاسمید حاوی SV40 نیازمند فاکتور ترانس T آنتی ژن ویروسی است تا بتواند توسط ماشین همانندسازی در هسته ی سلول انسان همانندسازی شود (۳).

T آنتی ژن یک هلیکاز هگزامری است که دو رشته ی DNA را در محل مبداء همانندسازی SV40 باز می کند (۲۱، ۲۲). آغاز همانندسازی از مبداء همانندسازی هرپس سیمپلکس ویروس oriS نیز نیازمند حضور پروتئین UL9 است. این پروتئین نیز همانند T آنتی ژن دارای فعالیت

References:

- 1- Emery David W. Gene therapy for genetic diseases: On the horizon Clinical and Applied Immunology Reviews 2001; 4: 411-422.
- 2- Soubrier F, Cameron B, Manse B, Somarriba S, Dubertret C, Jaslin G, Jung G, Le Caer G, Dang D, Mouvault JM, Scherman D, Mayaux JF, Crouzet J. A new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy. Gene Therapy 1999; 6: 1482-1488.

- 3- Niidome T, Huang L. Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral vectors Gene Therapy 2002; 9: 1647-1652.
- 4- Ulrich Reinhart Goessler, Katrin Riedel, Karl Qrmann, Frank Riedel. Perspectives of gene therapy in stem cell tissue engineering. Cells Tissues Organs 2006; 183: 169-179.
- 5- Lippsa HJ, Jenkea A.C.W, Nehlsenb K, Scinteiea M.F, Stehlea I.M, Bode J. Chromosome-based vectors for gene therapy. Gene 2003; 304: 23-33.
- 6- Abdollah B, Sachs L, Demeneix BA. Non-viral gene transfer: applications in developmental biology and gene therapy. Biol Cell 1995; 85: 1-7.
- 7- Fernández-Silva Patricio, Enriquez José A. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. Exp Physiol, 2003; 88: 41-56.
- 8- Maria Falkenberg, Nils-Göran Larsson, Claes M. Gustafsson. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. Annu. Rev. Biochem 2007; 76: 679-99.
- 9- Virginia A. Zakian. Origin of replication from *Xenopus laevis* mitochondrial DNA promotes high-frequency transformation of yeas. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78(5): 3128-3132.
- 10- Tikhomirova, Kryukov, Strizhov, Bayev. mtDNA sequences of *Candida utilis* capable of supporting autonomous replication of plasmids in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and General Genetics MGG 1982; 189: 479- 484.
- 11- Blanc H. Two modules from the hypersuppressive rho- mitochondrial DNA are required for plasmid replication in yeast. Gene 1984; 30(1-3): 47-61.
- 12- Delouya and Nobrega. Mapping of the ARS-like activity and transcription initiation sites in non-canonical yeast mitochondrial ori 6 regions. Yeast (Chichester, England), 1991; 7(1): 51-60.
- 13- Farkasovská J. Sequence analysis of a *Papaver somniferum* L. mitochondrial DNA fragment promoting autonomous plasmid replication in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. Current Genetic 1993; 24(4): 366-7.
- 14- Khanahmad H, Noori Dalooi MR, Shokrgozar MA, Azadmanesh K, Niavarani AR, Karimi M, Rabbani B, Khalili M, Bagheri R, Maryami F, Zeinali S. A novel single step double positive double negative selection strategy for beta-globin gene replacement. Biochem Biophys Res commun 2006; 23: 345(1).
- 15- Sambrook D, Russell. Molecular cloning. New York: CSHL Press, 2001.
- 16- S Li and L, Huang. Nonviral gene therapy: promises and challenges. Gene Therapy 2000; 7: 31-34.
- 17- Melvin L. DePamphilis. Origins of DNA replication in metazoan chromosomes. The journal of biochemistry Issue of January 1993; 268 (1): 1-4.
- 18- Falkenberg Maria, Oran L, Nils-G, Gustafsson Claes M. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. Annu. Rev. Biochem 2007; 76: 679-99.
- 19- Lecrenier Nicolas, Foury Françoise. New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. Gene 2000; 246: 37-48.
- 20- Sjoerd Wanrooij, Javier Miralles Fuste, Geraldine Farge, Yonghong Shi, Claes M. Gustafsson, Falkenberg M. Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro. PNAS 2008; 105 (32).

- 21- Gomez-Lorenzo M.G. Valle M. Donate L. E. Gruss C. Bárcena M. Sorzano C. O. S. Radermacher M. Frank J. Carazo J. M. Structural studies of SV40 larg t-antigen on the origin of replication. CAM Grant 2000; 8(1).
- 22- Sumitra Ded, Sahnli tsui, Andrew Koff, Angel Ol, Delucia, Ramon Parsons, Tegtmeyer T. The T-antigen-binding domain of the simian virus 40 core origin of replication. Journal of Virology 1987; 2143-2149.
- 23- Jenny A, Korhonen, Xuan Hoi Pham, Pellegrini M, Falkenberg M. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. The EMBO Journal 2004; 23: 2423-2429.
- 24- Hames S B. D. Methods to map origins of replication in eukaryotes. Hames B.D. Eukaryotic DNA Replication. United States. Oxford University Press 1999: 33.

Designing and Constructing a Plasmid with Mitochondrial Origin of Replication and Evaluating Its Replication in Human Cell Lines

Sepideh Aminzadeh Gohari¹, Hossein Khanahmad², Morteza Karimipour³,
Parichehr Yaghmaei⁴, Sakineh Karimi Zare⁵, and Fatemeh Jamshidi⁶

Abstract

Background and Aim: In order to achieve a safe vector with ability to replicate autonomously in human cells by human transactors, a recombinant plasmid with human mitochondrial origins of replication was constructed. In contrast to lentiviral and adenoviral vectors, this plasmid does not integrate into the host genome and replicates stably.

Materials and Methods: Both human mitochondrial origins of replication and gfp fragments were amplified by PCR, cloned into pTZ57T/A. Hygromycin resistance gene was digested from pFBGGT. Then, four DNA fragments were subcloned into pBGGT plasmid. All steps of cloning were checked by PCR, restricted analysis and sequencing. HEK293 and CHO cell lines were transfected by final plasmid (pEU). Transfected cells were checked by Fluorescence Microscope daily during 40 days. pEU and genomic DNA were extracted from transfected HEK293 treated with hygromycin. Five overlap PCRs were performed on these products to check presence of circular plasmid in transfected HEK293.

Results: All steps of cloning were confirmed. Data showed that pEU did not replicate in transfected cells.

Conclusion: As recombinant plasmids with both mitochondrial origins of replication did not replicate in transfected cell lines, it seems that we need to provide similar conditions of mitochondrial DNA replication in order to replicate the above vector in future experiments.

Keywords: Gene therapy, non-viral vector, mitochondrial origin of replication

Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal. 2009; Vol. 15, No. 4

1- MSc. in Cell and Molecular Biology, Islamic Azad University, Science and Research Campus of Tehran

2- **Corresponding Author:** PhD, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Tel: +98- 913 12 1431 **Fax:** +98- 21-88718557 **Email:** hossein_khanahmad@yahoo.com

3- PhD in Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

4- PhD in Physiology, Islamic Azad University, Science and Research Campus of Tehran, Iran

5- MSc. in Gene Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

6- MSc. in Biology (Animal Physiology), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran