

# خون

فصلنامه پژوهشی

دوره ۳ شماره ۱ بهار ۸۵ (۲۷-۱۷)

## طراحی و ساخت وکتور بیانی اختصاصی کراتینوستیت های اپیدرم و بررسی بیان فاکتور IX انسانی به عنوان مدل

سید جواد حسینی<sup>۱</sup>، دکتر علیرضا زمردی پور<sup>۲</sup>، دکتر راضیه جلال<sup>۳</sup>، دکتر فرزانه صابوئی<sup>۴</sup>

### چکیده سابقه و هدف

کراتینوستیت یک مدل مناسب برای بیان ژن به صورت *ex vivo* برای رهاسازی سیستمیک پرتوئین است. با توجه به این نکته عناصر کنترلی اختصاصی کراتینوستیت‌ها، گزینه‌های مناسبی برای بیان ژن با واسطه کراتینوستیت‌ها هستند. در پژوهش حاضر یک وکتور برای بیان اختصاصی پرتوئین‌های نوترکیب در کراتینوستیت‌های اپیدرم با استفاده از پروموتور ژن کراتین-۱۴ انسانی طراحی گردید. توانایی پلاسمید ساخته شده به وسیله بیان cDNA فاکتور انعقادی IX انسانی در کراتینوستیت‌های اولیه انسانی نشان داده شد.

### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. با قرار گرفتن یک قطعه حاوی پروموتور ژن کراتین-۱۴ انسانی به جای پروموتور سیتو-مگالوویروس (CMV) در پلاسمید pcDNA3، پلاسمید بیانی phPK14H ساخته شد. در مرحله بعد cDNA فاکتور IX انسانی که از کتابخانه cDNA کبدی جدا شده بود، وارد پلاسمید بیانی شد و پلاسمید pK14hFIX ساخته شد و برای ترانسفکشن کراتینوستیت‌ها مورد استفاده قرار گرفت. کراتینوستیت‌های انسانی از پوست خته نوزادان جدا و با استفاده از محیط کشت عاری از سرم مخصوص کراتینوستیت‌ها کشت داده شدند. سلول‌های مزبور با پلاسمید نوترکیب جدید ساخته شده (pK14hFIX) با استفاده از فیوجین-۶ ترانسفکت شدند. حدود ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، محیط کشت به دست آمده از سلول‌های ترانسفکت شده برای بررسی بیان فاکتور IX جمع آوری و سلول‌ها به محیط کشت انتخابی حاوی جنتیسین منتقل شدند. ادامه کشت سلول‌های مزبور در محیط انتخابی منجر به پدیدار شدن ۹ کلنی شد که در ادامه هر یک به صورت جداگانه کشت داده شده و مورد مطالعه قرار گرفتند. بیان cDNA فاکتور IX با استفاده از آزمون انعقادی یک مرحله‌ای بر روی محیط‌های کشت و هم‌چنین انجام RT-PCR بر روی سلول‌های کراتینوستیت ترانسفکت مورد مطالعه قرار گرفت.

### یافته‌ها

زمان‌های انعقاد به دست آمده از محیط‌های کشت سری‌های مختلف ترانسفکشن با کنترل‌های منفی مقایسه شد. فعالیت انعقادی فاکتور IX نوترکیب در محیط کشت کراتینوستیت‌های ترانسفکت شده قبل از تیمار جنتیسین و پس از انتخاب کلنی‌ها با جنتیسین نشان داده شد. بیان cDNA فاکتور IX در سلول‌های ترانسفکت شده هم‌چنین با انجام RT-PCR تایید شد.

### نتیجه‌گیری

نتایج اولیه ما نظریه‌ای که کراتینوستیت‌های انسانی قادر به تولید فاکتور IX فعال تحت کنترل پروموتور کراتین-۱۴ استند را تایید می‌کند. علاوه بر این پلاسمید ساخته شده حاصل از این تحقیق ابزار مناسبی برای بررسی بیان پرتوئین‌هایی که از اهمیت درمانی برخوردارند را در کراتینوستیت‌ها برای مطالعات مختلف بیوشیمیابی و سلولی فراهم ساخته است.

**کلمات کلیدی:** فاکتور IX، کراتینوستیت، کراتین-۱۴، ژن درمانی سوماتیک

تاریخ دریافت: ۱۴/۸/۴

تاریخ پذیرش: ۱۵/۱۲/۶

۱- دانشجوی دکترای علوم سلولی و مولکولی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه  
۲- مؤلف مسؤول: PhD بیولوژی مولکولی - استادیار گروه ژنتیک مولکولی پژوهشگاه ملی مهندس ژنتیک و زیست فناوری - صندوق پستی ۱۴۱۵۵-۶۳۴۳  
۳- PhD بیوشیمی - استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری  
۴- PhD بیوشیمی - استادیار دانشکده علوم دانشگاه مشهد

هستند. بررسی‌های قبلی نشان داده اند که قطعه‌ای با طول ۲۲۰ جفت باز از توالی بالادست ژن کراتین ۱۴ انسانی، قادر به بیان ژن در کراتینوسیت اپiderم ترانسشن است (۴). در مطالعه حاضر با طراحی و ساخت یک وکتور اختصاصی بیان کننده در کراتینوسیت‌ها، توانایی‌های پروموتور ژن کراتین ۱۴-۱۶ انسانی برای بیان فاکتور IX انسانی در کراتینوسیت‌های کشت شده، مورد بررسی قرار گرفته است.

### مواد و روش‌ها

سوش باکتری، پلاسمیدها و منبع کراتینوسیت‌های انسانی مطالعه انجام شده از نوع تجربی (experimental) بود. سوш DH5 $\alpha$  باکتری *E.coli* (استرالیا - آمریکا) برای مراحل کلونینگ استفاده شد. کتابخانه cDNA کبدی برای جداسازی cDNA انسانی از شرکت MRC (انگلستان) خریداری گردید. پلاسمید pcDNA3 (اینوسیتروژن - آمریکا) به عنوان وکتور پایه برای طراحی پلاسمیدهای ساخته شده در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. پوست ختنه نوزادان به عنوان منبع کراتینوسیت‌های انسانی توسط دکتر منوچهر محمدزاده تهیه و در اختیار این پژوهش قرار گرفت.

### محیط کشت، آنزیم‌ها، مواد شیمیایی و کیت‌ها

محیط کشت LB (Luria-Bertani) به عنوان محیط کشت باکتری استفاده شد و آمپی سیلین (100 µg/ml) محیط کشت) در صورت نیاز به وجود محیط کشت انتخابی استفاده شد. آنزیم‌های *Bgl*III، *Hind* III، *Bam*HI و *T4* DNA *NoI*A، کیت مخصوص تکثیر قطعات بزرگ، PCR، Ligase، جنیتیسین (G-418)، کیت‌های تخلیص محصول PCR، پلاسمید و RNA، عامل ترانسفکشن فیوجین - ۶ و آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MuLV از شرکت روش (آلمان) خریداری گردید. بافر هنکس از شرکت بهارافشان (ایران) تهیه شد. آنزیم *Bam*HI و پلاسمید PTZ57RT از فرمتاز خریداری شد. پلاسمای فاقد فاکتور IX انسانی از شرکت دیاگنوستیکا (فرانسه) فراهم شد. پلاسمای طبیعی انسان با هدف رسم نمودار استاندارد

ژن درمانی به روش *ex vivo* نیازمند یک راکتور زیستی مطلوب برای تولید و انتقال محصول ژن به درون بافت‌های هدف است (۱-۴). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که کراتینوسیت‌های اپiderم می‌توانند به عنوان یک راکتور زیستی برای تولید پروتئین‌ها با هدف ورود به گردش خون مورد استفاده قرار گیرند (۵). این توانایی کراتینوسیت‌ها با ترشح انواع پروتئین‌های نوترکیب به جریان خون محیطی نشان داده شده است (۲، ۳، ۶، ۷). هموفیلی B یک بیماری مغلوب وابسته به کروموزوم X است که مرتبط با عدم وجود یا عدم فعالیت فاکتور IX انعقادی می‌باشد. این فاکتور به شکل بالغ، گلیکو پروتئینی با ۴۱۵ اسید آمینه و وزن مولکولی ۵۷ کیلو دالتون است که ۱۷٪ آن را ترکیبات قندی تشکیل می‌دهد. فاکتور IX متحمل تغییرات مهمی پس از ترجمه می‌گردد که برای فعالیت بیولوژیکی آن لازم و ضروری است. این تغییرات شامل حذف توالی‌های راهنمای، گاما کربوکسیلاسیون ۱۲ گلوتامیک اسید در انتهای آمینی و تبدیل آسپارتیک اسید شماره ۶۴ به بتا هیدروکسی آسپارتیک اسید و اضافه شدن واحدهای قندی با اتصال از نوع N و O است (۸). مطالعات پیشین نشان داده است که فاکتور IX نوترکیب ترشح شده به وسیله کراتینوسیت‌ها از نظر بیولوژیکی تقریباً ۱۰٪ فعال است (۹). بیان cDNA فاکتور IX در کراتینوسیت‌های کشت شده انسانی تحت کنترل توالی‌های پروموتري ویروسی و رتروویروسی قبلاً گزارش شده است (۱۰، ۱۱). همچنین بیان فاکتور IX تحت کنترل توالی‌های پروموتري سیتومگالوویروس به شکل هیبرید با عناصر کنترلی ژن‌های کراتین ۵ و یا کراتین ۱۴ گزارش شده است (۱۲، ۱۳). اما استفاده از عناصر کنترلی کراتینوسیت‌ها با هدف بیان فاکتور IX در کراتینوسیت‌های کشت شده انسانی گزارش نشده است. کراتینوسیت‌های لایه بازال، پروتئین‌های کراتین ۵ و کراتین ۱۴ و رادر سطح زیادی بیان می‌کنند. در حقیقت این دو پروتئین ۲۵ تا ۳۰ درصد از سطح کلی پروتئین‌ها و حدود ۱۰ درصد سطح کل رونوشت‌های سلولی را تشکیل می‌دهند (۱۴، ۱۵). بنابراین پروموترهای این دو ژن، گزینه‌های مناسبی برای ژن درمانی با واسطه کراتینوسیت‌ها با هدف بیان ژن

طراحی شدند. پس از برش، محصول PCR حاوی پرموترکراتین ۱۴ و پلاسمید pcDNA3 با آنزیم‌های *Bgl*II و *Hind*III و قطعه PHK14 به جای پرموتر سیتومگالوویروس (CMV) در پلاسمید pcDNA3 (CMV) ساخته شد. محصول گرفت و پلاسمید بیانی phPK14H ساخته شد. PCR حاوی cDNA فاکتور IX، pK14hFIX نامیده شد.

#### تعیین توالی

pK14hFIX قطعات کلون شده در پلاسمید نوترکیب (شامل پرموتر ژن کراتین ۱۴ - انسانی و hFIX-cDNA) از هر دو رشته کاملاً تعیین توالی شدند. توالی‌های مذکور با استفاده از دستگاه ABI 373 (آلمان-MWG) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تعیین گردیدند و مقایسه توالی‌های حاصله با استفاده از برنامه BLAST بر علیه بانک ژنی انجام شد (۱۶).

#### کشت اولیه کراتینوسيت‌های انسانی

کراتینوسيت‌های طبیعی اپiderم انسانی (HNEK) از Human Normal Epidermal Keratinocyte ختنه نوزادان جدا و مطابق با دستورالعمل فراهم شده در محیط کشت فاقد سرم مخصوص کراتینوسيت (K-SFM) رشد داده شد. به صورت خلاصه، پیرو انتقال پوست ختنه به آزمایشگاه و شستشو در PBS، فاقد کلسیم و منزیم و حاوی ۲۰ µg/ml جنتامایسین، به قطعات کوچکتر تقسیم و به مدت ۱۸ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد در بافره‌نکس حاوی ۲۵ U/ml آنزیم دیسپاز قرار داده شد. سپس لایه اپiderمی از پریدرم جدا و با هدف جداسازی کراتینوسيت‌ها با محلول حاوی ۰/۲۵ درصد تریپسین و ۱ میلی مول EDTA به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد همراه با حداقل دو بار پیپینگ تیمار گردید. تریپسین با ۱۰ درصد در محلول نهایی خشی و

تست انعقادی فاکتور IX به صورت اهدایی از سازمان انتقال خون ایران به دست آمد. محیط کشت K-SFM (Keratinocyte Serum-Free Medium) از اینسویتروژن (آمریکا) خریداری گردید. پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق توسط شرکت آلمانی MWG ساخته شدند (جدول ۱).

جدول ۱: توالی‌های پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش

hk14-f <sub>1</sub>	5'-GGAAGATCTGCTAGGGTTCTGGTGTGG TGGG- <sup>3'</sup>
hk14-R <sub>1</sub>	5'-CGTCCAAGCTTGAGGAGGGAGGTGAGC GAGCGAG- <sup>3'</sup>
hIX-f <sub>1</sub>	5'-GGATCCGTTATGCAGCGCGTGAACATGA - <sup>3'</sup>
hIX-R <sub>1</sub>	5'- GCGGCCGCAGTGATTAGTTAGTGAGAG GCCC- <sup>3'</sup>
hFIX-F <sub>2</sub>	5'-GCCATGGCCCCCTTGGATTGAAGGAA AGAACT- <sup>3'</sup>
hFIX-R <sub>2</sub>	5'-GAAGCTTCTCCCTTGTGGAAGACTCTT CCC- <sup>3'</sup>

#### دست ورزی‌های DNA

همه مراحل دست کاری DNA بر اساس روش‌های استاندارد کلوبیننگ انجام شد (۱۵). DNA کروموزومی استخراج شده از خون و کتابخانه cDNA کبدی انسانی به ترتیب به عنوان الگو برای تکثیر پرموترکراتین ۱۴ انسانی و cDNA فاکتور IX مورد استفاده قرار گرفتند. پلاسمیدهای ساخته شده در این تحقیق از pcDNA3 مشتق شده‌اند، که یک وکتور بیانی پستانداران است، حاوی عامل مقاومت به جنتیسین می‌باشد و اجازه انتخاب سلول‌های نوترکیب را پیرو واکنش ترانسفکشن می‌دهد.

پرایمرهای hK14-F1 و hK14-R1 که به ترتیب دارای جایگاه‌های برشی آنزیم‌های *Bgl*III و *Hind*III بودند، بر اساس توالی پرموتر ژن کراتین ۱۴ انسانی طراحی گردیدند.

برای تکثیر cDNA فاکتور IX دو پرایمر hIX-F1 و hIX-R1 که به ترتیب دارای جایگاه‌های برشی برای آنزیم‌های *NotI* و *Bam*HI بودند، بر اساس توالی mRNA

اندازه گیری فعالیت انعقادی فاکتور IX انسانی  
فعالیت بیولوژیک فاکتور IX بیان شده با استفاده از پلاسمای انسانی فاقد فاکتور IX و PTT فعال شده مطابق با دستورالعمل فراهم شده به وسیله شرکت تولید کننده تعیین گردید.

برای تخمین میزان فعالیت فاکتور IX انسانی بیان شده از نمودار استانداردی استفاده شد که با استفاده از فعالیت انعقادی، ۵ رقت مختلف از پلاسمای ستیرانه شده طبیعی انسان ( $\frac{1}{160}$ ,  $\frac{1}{80}$ ,  $\frac{1}{40}$ ,  $\frac{1}{20}$ ,  $\frac{1}{10}$ ) روی کاغذ تمام لگاریتمی بر علیه زمان انعقاد ترسیم شده بود. برای انجام آزمون انعقادی،  $100\mu\text{l}$  از هر نمونه با رقت  $\frac{1}{100}$  با  $1\mu\text{l}$  از پلاسمای فاقد فاکتور IX و  $100\mu\text{l}$  از PTT فعال شده مخلوط و دقیقاً ۳ دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس  $100\mu\text{l}$  کلسیم کلرید ۲۵ میلی مول از قبل گرم شده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آن اضافه و زمان انعقاد اندازه گیری شد و فعالیت انعقادی هر نمونه بر اساس نمودار استاندارد تعیین گردید.

### واکنش RT-PCR

F3-C2 RNA تام از سلول‌های ترانسفکت شده (کلندی RNA به عنوان منبع سلولی) با استفاده از کیت تخلیص استخراج شد و با DNAase عاری از RNAase تیمار شد و توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس (ریورس ترانس‌کریپتار M-Mulv) به عنوان الگو برای ساختن cDNA مورد استفاده قرار گرفت. از cDNA ساخته شده به عنوان الگو جهت تکثیر قطعه‌ای از فاکتور IX به طول ۷۳۵ جفت باز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی hFIX-F2 و hFIX-R2 در واکنش PCR استفاده گردید.

### یافته‌ها

#### ساخت پلاسمیدهای نوترکیب

ساخت پلاسمید pK14hFIX به طول ۸۲۲۳ جفت باز برای بیان اختصاصی cDNA فاکتور IX انعقادی در کراتینوستیت‌های اپیدرم طی ۲ مرحله انجام گرفت (شکل ۱). در مرحله اول یک قطعه ۲۲۴۰ جفت بازی حاوی پروموتور

سلول‌ها با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد رسوب داده شدند. رسوب EGF: Epidermal Growth Factor K-SFM (حاوی BPE: Bovin Pituitary Factor ۰/۱-۰/۲ ng/ml و ۲۵-۳۰ µg/ml Extract) معلق گردید. کراتینوستیت‌های اولیه در محیط کشت کامل K-SFM با تعداد ۲۰۰۰۰ تا ۴۰۰۰۰ سلول به ازای هر سانتی‌متر مربع فلاسک کشت داده شدند. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و با ۵ درصد CO<sub>2</sub> رشد داده شدند. محیط کشت هر ۲-۳ روز یک بار تعویض شد. پس از رشد سلول‌ها تا حدود ۶۰-۷۵ درصد فلاسک، محیط کشت برداشته شده و سلول‌ها با PBS فاقد کلسیم و منزیم شستشو و پاساژ داده شدند.

### ترانسفکشن

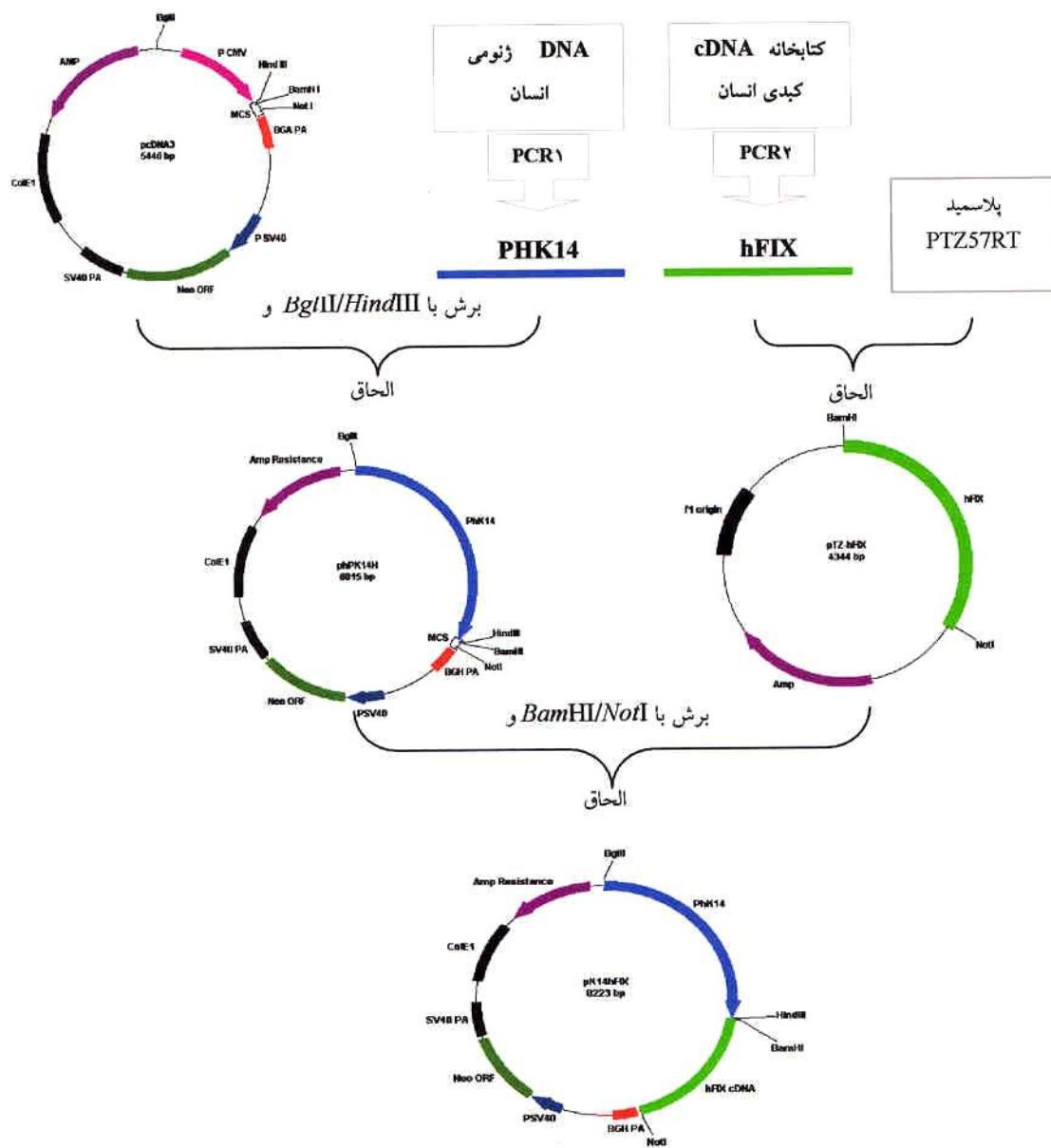
کراتینوستیت‌ها با استفاده از فیوجین-۶ مطابق دستورالعمل تولید کننده در پلیت‌های شش خانه‌ای ترانسفکت شدند. برای این منظور کراتینوستیت‌ها حدود ۲۴ ساعت قبل از واکنش ترانسفکشن در تراکم ۱۵۰ تا ۱۸۰ سلول به ازای هر خانه کشت داده شدند. برای واکنش ترانسفکشن، ۳ µl فیوجین-۶ با ۹۷ µl K-SFM پایه (فاقد BPE و EGF) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت اتفاق قرار داده شد.

به مخلوط فوق  $2\mu\text{g}$  پلاسمید نوترکیب (pK14H يا pHPK14H) اضافه و پس از مخلوط نمودن به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در دمای اتفاق قرار داده شد. مخلوط نهایی سپس مستقیماً به سلول‌ها در ۲ میلی لیتر محیط کشت پایه اضافه گردید. واکنش ترانسفکشن برای مدت حداقل ۶ ساعت ادامه یافت. سپس K-SFM پایه جمع آوری و SFM کامل به سلول‌ها اضافه گردید.

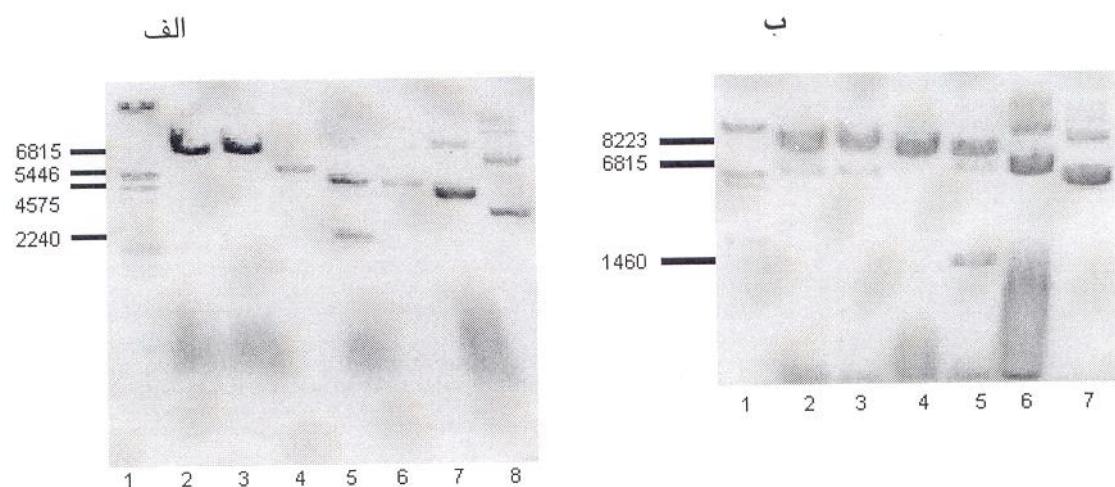
روز سوم (حدود ۷۲ ساعت) پس از ترانسفکشن، محیط کشت برای بررسی جمع آوری و محیط تازه به سلول‌ها اضافه شد. کلندی‌های نوترکیب در محیط کشت حاوی ۲۵۰-۳۰۰ میکروگرم جنتیسین به ازای هر میلی لیتر محیط کشت انتخاب و به صورت انفرادی تکثیر شدند (۱۷). این کلندی‌ها سپس با محیط حاوی  $600\mu\text{g}/\text{ml}$  جنتیسین تیمار شدند.

آنزیمی تایید گردید (شکل ۲-الف). اندازه مورد انتظار ۶۸۱۵ جفت بازی شکل خطی پلاسمید به phPK14H به وسیله هضم جدگانه با آنزیم *HindIII* و *BglII* که فقط دارای یک جایگاه برش در پلاسمید فوق بودند مشاهده و تایید شد. به کارگیری توام آنزیم‌های *BglII* و *HindIII* برای برش پلاسمید مزبور، دو قطعه ۲۲۴۰ و ۴۵۷۵ جفت بازی ایجاد کرد که به ترتیب با اندازه پرموتور ژن کراتین ۱۴-انسانی و قطعه pcDNA3 مطابقت می‌نمایند.

ژن کراتین ۱۴-انسانی (PCR1) که واجد جایگاه‌های برش آنزیمی *BglII* و *HindIII* در دو انتهای خود است، با استفاده از PCR (PCR1) محصول تکثیر گردید. پیرو هضم محصول PCR1 و پلاسمید pcDNA3 به وسیله آنزیم‌های *BglII/HindIII*، پرموتور ژن کراتین ۱۴-جانشین پرموتور CMV در پلاسمید مذکور گردید. به این ترتیب پلاسمید نوترکیب ساخته شده phPK14H نامیده شد. ساختار پلاسمید phPK14H با استفاده از روش‌های برش



شکل ۱: مراحل ساخت پلاسمیدهای نوترکیب



شکل ۲: تایید مولکولی ساختار پلاسمیدهای نوترکیب با روش برش آنزیمی

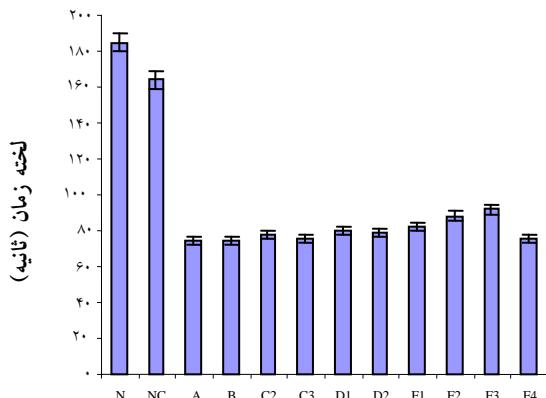
**الف:** پلاسمید **phPK14H** : ردیف ۱؛ مارکر استاندارد اندازه مولکولی DNA. ردیف‌های ۲ و ۳؛ الگوی‌های خطی شده *phPK14H* به ترتیب *HindIII* و *BglII*. ردیف ۴؛ الگوی خطی شده *pcDNA3* با *HindIII* و *BglII* به طور همزمان. ردیف ۵؛ الگوی برش خورده *phPK14H* با *BglII* و *HindIII* به طور همزمان. ردیف ۶؛ الگوی برش خورده *pcDNA3* با *BglII* و *HindIII* به طور همزمان. ردیف ۷؛ الگوی سوپرکویل *phPK14H* .pcDNA3. ردیف ۸؛ الگوی سوپرکویل .pcDNA3.

**ب:** پلاسمید **pK14hFIX** : ردیف ۱؛ مارکر استاندارد اندازه مولکولی DNA. ردیف‌های ۲ و ۳؛ الگوی‌های خطی شده *pK14hFIX* به ترتیب *BamHI* و *NotI*. ردیف ۴؛ الگوی خطی شده *hPK14H* با *BamHI* و *NotI* به طور همزمان. ردیف ۵؛ الگوی برش خورده *pK14hFIX* با *BamHI* و *NotI* به طور همزمان. ردیف ۶؛ الگوی سوپرکویل *pK14hFIX*.

### بررسی بیان فاکتور IX انسانی

با هدف بیان فاکتور انعقادی IX در کراتینوستیت‌های انسانی، کشت اولیه این سلول‌ها برای ترانسفکشن با پلاسمید *pK14hFIX* مورد استفاده قرار گرفتند. چند سری واکنش ترانسفکشن با استفاده از فیوجین-۶ انجام شد. در روز سوم پس از واکنش ترانسفکشن، سلول‌ها سطح فلاسک را پر کرده بودند. بیان احتمالی فاکتور IX در محیط کشت جمع آوری شده با استفاده از آزمون انعقادی یک مرحله‌ای مورد بررسی قرار گرفت. زمان انعقاد نمونه‌های به دست آمده از ترانسفکشن‌های مختلف در مقایسه با نمونه‌های کنترل منفی (نمونه‌های ترانسفکت شده با *phPK14H* و سلول‌های ترانسفکت نشده) محاسبه شد.

در مرحله دوم cDNA فاکتور IX پس از تکثیر (PCR2) و کلون سازی اولیه در پلاسمید *PTZ57RT* با بهره‌گیری از جایگاه‌های برشی *NotI* و *BamHI* به پلاسمید *phPK14H* وارد شد. برش پلاسمید *pK14hFIX* با آنزیم‌های *NotI* و *BamHI* به طور همزمان منجر به ایجاد دو قطعه ۶۸۱۵ و ۱۴۵۹ جفت بازی شد که به ترتیب با اندازه پلاسمید *phPK14H* و *cDNA* مطابقت می‌نماید. همچنین برش‌های پلاسمید *pK14hFIX* با هر یک از آنزیم‌های *BamHI* و *NotI* یک قطعه به طول ۸۲۲۳ جفت بازی ایجاد نمود که با اندازه پلاسمید نوترکیب بیان کننده فاکتور IX انسانی مطابقت دارد (شکل ۲-ب). ساختار مولکولی پلاسمید *pK14hFIX* همچنین با تعیین توالی نوکلئوتید تایید شد.



شکل ۳: بررسی فعالیت انعقادی محیط کشت به دست آمده ۷۲ ساعت بعد از ترانسفسکشن (قبل از اضافه نمودن جنتیسین (G418).

روز سوم پس از واکنش ترانسفسکشن (حدود ۷۲ ساعت پس از واکنش ترانسفسکشن)، سلول‌های ترانسفسکت شده به محیط کشت انتخابی حاوی جنتیسین منتقل شدند و تا زمان پدیدار شدن کلنی‌ها این وضعیت ادامه داشت. از ترانسفسکشن سری F1 ، F2 و F3 مجموعاً ۹ کلنی جدا و به صورت جداگانه رشد داده شدند. کلنی‌های F1- F1-C1 و F2-C3 و F1-C4 از سری F1 و کلنی‌های F2-C3 و F3-C3 از سری F2 و کلنی‌های F1-C3 و F3-C2 از سری F3 جداسازی و به محیط کشت حاوی ۵۰۰-۶۰۰ µg/ml جنتیسین منتقل شدند. بیان فاکتور IX نوترکیب در محیط‌های کشت جمع آوری شده از هر کلنی قبل از آن‌که سطح پلیت کاملاً پر شود (درصد از سطح پلیت) با استفاده از آزمون انعقادی مورد بررسی قرار گرفت(جدول ۳ و شکل ۴). نتایج نشان می‌دهد که فعالیت انعقادی فاکتور IX متوجه سطح به محیط کشت در میان کلنی‌های مختلف از تنوع قابل توجهی برخوردار است. در بین کلنی‌های جدید شده، کلنی C2 با حدود ۷۰ ثانیه زمان انعقاد و فعالیت انعقادی ۳۹ تا ۴۰ درصد و کلنی‌های F2-C3 و F2-C4 با حدود ۱۳۴ ثانیه زمان انعقاد و ۵ درصد فعالیت انعقادی به ترتیب حداقل و حداقل بیان فاکتور IX به محیط کشت را داشتند (جدول ۳ و شکل ۴). اختلاف زمان انعقادی محیط‌های کشت جمع آوری شده از کلنی‌های به دست آمده در مقایسه با نمونه‌های کترل منفی نشانگر تداوم بیان و ترشح فاکتور IX نوترکیب توسط سلول‌های حاوی pK14hFIX به محیط کشت بود.

کاهش معنی‌دار زمان انعقادی محیط‌های کشت جمع آوری شده از سلول‌های ترانسفسکت شده با پلاسمید pK14hFIX در مقایسه با نمونه‌های کترل منفی، نشانگر ترشح فاکتور IX نوترکیب توسط سلول‌های حاوی pK14hFIX به محیط کشت بود.

زمان انعقاد و فعالیت انعقادی محیط کشت به دست آمده از هرآزمایش ترانسفسکشن در مقایسه با کترل‌های منفی در جدول ۲ و شکل ۳ ارایه شده است.

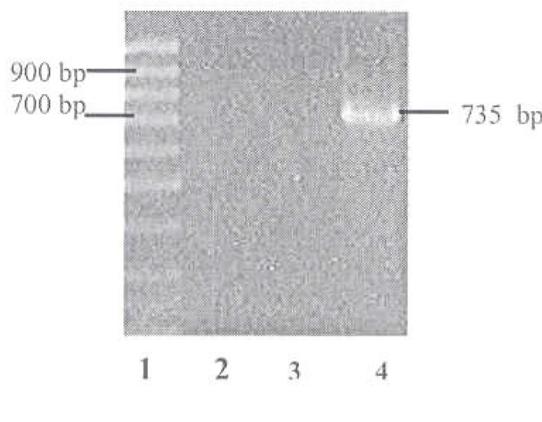
جدول ۲: زمان انعقاد و فعالیت انعقادی فاکتور IX انسانی در محیط کشت کراتینوسیت‌های ترانسفسکت شده، قبل از تیمار با جنتیسین (روز سوم پس از ترانسفسکشن)

نمونه‌های مورد آزمایش که از ترانسفسکشن های مختلف به دست آمده بودند با حروف A ، B ، C2 ، D1 ، F1 ، F2 ، D2 ، F3 ، F4 و NC نشان داده شده اند. محیط کشت از سلول‌های ترانسفسکت نشده با N و محیط کشت از سلول‌های ترانسفسکت شده با پلاسمید pRK14H با NC نشان داده شده است.

نمونه‌ها	زمان انعقاد (ثانیه)	متوسط فعالیت (%)hFIX
N	۱۷۸	۲۰۷
NC	۱۶۵	۲۴۳
A	۷۰	۳۹/۶۷
B	۷۰	۳۹
C2	۷۶	۳۱/۶۷
C3	۷۵	۳۶
D1	۸۰	۲۷/۶۷
D2	۷۸	۲۷/۵
F1	۸۴	۲۴/۸۳
F2	۸۸	۱۸/۶۷
F3	۹۳	۱۶
F4	۷۵	۳۵/۳۳
	۷۲	۷۴

بر اساس نتایج به دست آمده، کراتینوسیت‌های حاصل از ترانسفسکشن‌های سری A و B با حدود ۷۰ ثانیه زمان انعقاد و فعالیت انعقادی ۳۹ تا ۴۰ درصد پلاسمای استاندارد انسانی، دارای بالاترین سطح بیان فاکتور IX و سلول‌های حاصل از ترانسفسکشن سری F3 با ۹۳ ثانیه زمان انعقاد و فعالیت انعقادی برابر با ۱۶ درصد پلاسمای استاندارد انسانی، دارای پایین‌ترین سطح بیان فاکتور IX بود.

به این ترتیب با تایید نسخه برداری از cDNA فاکتور IX در کراتینوسيت های ترانسفکت شده، شاهد دیگری دال بر صحبت بیان فاکتور IX انسانی در کراتینوسيت ها فراهم شد (شکل ۵).



شکل ۵: آزمایش RT-PCR

تکثیر قطعه ۷۳۵ جفت بازی cDNA فاکتور IX انسانی با استفاده از cDNA ساخته شده از RNA بدست آمده از کلنی F3-C2 به عنوان الگو ۱- مارکر ۵۰ جفت بازی RNA-۲ RNA تیمار شده با DNAase از RNAase به عنوان الگو ۳- کنترل منفی ۴- cDNA ساخته شده به عنوان الگو

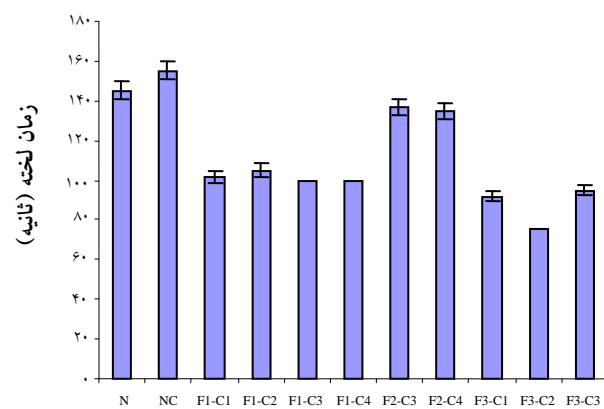
#### بحث

کراتینوسيت های اپiderم به عنوان یک هدف جذاب برای ژن درمانی سوماتیک مطرح هستند (۱۸). پژوهش های متعددی که تاکنون انجام شده است نشانگر این امر هستند که کراتینوسيت های پوست می توانند به عنوان یک راکتور زیستی در جهت تولید پروتئین های نوترکیب برای درمان بیماری های ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند (۱۸، ۱). بسیاری از بیماری های پوستی مونوژنیک و سیستمیک، گزینه های درمان با استفاده از کراتینوسيت ها هستند (۲۰، ۱۹). توانایی فوق العاده تکثیر در محیط کشت، امکان تولید پوست مصنوعی در شرایط آزمایشگاهی، توانایی ترشح پروتئین های نوترکیب به جریان خون محیطی پیرو پیوند بافت پوستی به موش فاقد تیموس، امکان برداشتن سلول های پوستی تغییر یافته ژنتیکی در صورت عدم نیاز به پیوند و یا ایجاد اختلال ناشی از پیوند و امکان به کارگیری سیستم های کنترل کننده ژن برای القای بیان ژن

جدول ۳: زمان انعقاد و فعالیت انعقادی فاکتور IX انسانی در محیط کشت کلنی ها، بعد از جدا سازی در حضور جنیتیسین (G418) انواع کلنی ها به وسیله اسامی اختصاصی نشان داده شده است. محیط کشت از سلول های ترانسفکت نشده با N و محیط کشت از سلول های ترانسفکت شده با پلاسمید pHPK14H با NC نشان داده شده است.

نمونه ها	زمان انعقاد (ثانیه)	متوسط فعالیت فاکتور IX انسانی بیان شده (%)
N	۱۴۶	۳/۵
NC	۱۵۲	۳/۰۳
F1-C1	۱۰۰	۱۲/۷۳
F1-C2	۱۰۰	۱۲/۵۳
F1-C3	۱۰۰	-
F1-C4	۱۰۰	-
F2-C3	۱۳۳	۴/۹۳
F2-C4	۱۳۵	۴/۹
F3-C1	۸۷	۱۹/۵
F3-C2	۷۰	۳/۹
F3-C3	۹۳	۱۵/۶۷
	۱۴۸	
	۱۵۳	
	۱۰۱	
	۱۰۲	
	۱۰۰	
	۱۳۴	
	۱۳۲	
	۸۹	
	۷۲	
	۹۵	

بیان فاکتور IX در سلول های به دست آمده از کلنی F3-C2 با آزمایش RT-PCR نیز مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به فاصله دو پرایمر اختصاصی hFIX-F2 و hFIX-R2 در cDNA فاکتور IX انسانی، همان طور که انتظار می رفت آزمایش مذبور متجه به تولید قطعه مورد انتظار ۷۳۵ جفت بازی از cDNA فاکتور IX انسانی گردید.



شکل ۴: بررسی فعالیت انعقادی محیط کشت کراتینوسيت ها بعد از جدا سازی کلنی ها در حضور جنیتیسین (G418).

کلنی های به دست آمده با حروف F2-, F1-C4, F1-C3, F1-C2, F1-C1, F3-C2, F3-C1, F2-C4, C3 و F3-C3 نشان داده شده اند. محیط کشت از سلول های ترانسفکت شده با N و محیط کشت از سلول های ترانسفکت شده با pHPK14H با NC نشان داده شده اند.

در بر گیرنده عنصر کترلی ژن کراتین-۱۴ انسانی است را در کراتینوپوتیت های کشت شده انسانی برسی کردیم. بر این اساس محیط های کشت جمع آوری شده از سری های مختلف ترانسفکشن قبل از تیمار جنتیسین از حدود ۱۶ تا ۴۰ درصد پلاسمای نرمال انسانی فعالیت های انعقادی نشان دادند.

ما موفق به جداسازی ۹ کلنی نوترکیب شدیم که میزان بیان فاکتور IX توسط آنها متفاوت بود. به طوری که فعالیت انعقادی تا حدود ۴۰ درصد که متعلق به محیط کشت جمع آوری شده از یکی از کلنی ها (F3-C2) بود قابل آشکار سازی بود. در حالی که میزان فعالیت انعقادی در برخی دیگر از کلنی های نوترکیب (F2-C3 و F2-C4) بسیار پایین و در حدود ۵ درصد استاندارد بود. تفاوت در بیان فاکتور IX توسط کلنی های مذکور احتمالاً به دلیل درجه متفاوت تمایز سلول های کراتینوپوتیت است. به صورت خلاصه نتایج ما توانایی کراتینوپوتیت های انسانی در تولید و ترشح فاکتور IX فعال را تایید می کنند. بنابراین به نظر می رسد که وکتور طراحی شده حاصل از این پژوهش توانایی بیان دیگر پروتئین ها در کراتینوپوتیت ها با هدف مطالعات بیوشیمیایی و سلولی را دارا باشد. با توجه به ضعیف بودن قدرت پروموموتر کراتین-۱۴ مرحله بعدی، ارتقاء سیستم بیان کننده با استفاده راه کارهای مولکولی خواهد بود. کراتینوپوتیت های به کار گرفته شده در این پژوهش از نوع پایه هستند، بنابراین دست یابی به ردیف (line) سلولی بیان کننده پایدار در این پژوهش میسر نبوده است. لذا از دیگر اهداف ما در ادامه طرح، دست یابی به ردیف سلولی پایدار خواهد بود.

## نتیجه گیری

نتایج این پژوهش توانایی کراتینوپوتیت های انسانی در تولید و ترشح فاکتور IX فعال را تایید می کنند. به نظر می رسد که وکتور طراحی شده حاصل از این پژوهش توانایی بیان دیگر پروتئین ها در کراتینوپوتیت ها با هدف مطالعات بیوشیمیایی و سلولی را دارا باشد. با توجه به ضعیف بودن قدرت پروموموتر کراتین-۱۴ مرحله بعدی، ارتقاء سیستم بیان کننده با استفاده از راه کارهای مولکولی

هدف در اپیذرمیس با استعمال موضعی القا کننده ها شواهدی هستند که کراتینوپوتیت ها را به عنوان یک راکتور زیستی مناسب مطرح نموده اند (۲۳، ۲۱، ۱۰، ۷، ۶، ۴، ۲). بر این اساس بیان چندین پروتئین نوترکیب از قبیل هورمون رشد انسانی، فاکتور انعقادی IX انسانی و آپولیپوپروتئین E انسانی در کراتینوپوتیت های کشت شده انسانی با استفاده از پرموموترهای ویروسی و رتروویروسی تاکنون گزارش شده است (۱۵، ۷، ۳، ۲).

غیر فعال شدن پرموموترهای ویروسی در *in vivo*، استفاده از این عناصر کترلی را با محدودیت مواجه ساخته است (۴). بنابراین طراحی وکتوری که به صورت اختصاصی بیان پروتئین های نوترکیب در کراتینوپوتیت ها را هدایت نماید ضروری به نظر می رسد. کراتین-۵ و کراتین-۱۴ از عمدۀ ترین پروتئین های بیان شده به وسیله کراتینوپوتیت هایی با فعالیت میتووزی هستند و در سطح فراوانی توسط کراتینوپوتیت های کشت شده بیان می گردند. به این ترتیب عناصر کترلی ژن های کراتین-۵ و کراتین-۱۴ به عنوان گزینه های مناسبی با هدف ژن درمانی توسط کراتینوپوتیت ها مطرح هستند (۲۱، ۲۳). در این پژوهش به دو دلیل عنصر کترلی ژن کراتین-۱۴ برای طراحی وکتور مورد استفاده قرار گرفت؛ یکی به دلیل کوتاه تر بودن طول آن در مقایسه با عنصر کترلی ژن کراتین-۵، دستورزی آن را آسان تر می نماید و دلیل دیگر اینکه حوزه فعالیت پرموموتر ژن کراتین-۱۴ در مقایسه با پرموموتر ژن کراتین-۵ بیشتر است (۱۳، ۲۲). پرموموتر ژن کراتین-۵ فقط در کراتینوپوتیت های بازالت فعال است در صورتی که فعالیت پرموموتر ژن کراتین-۱۴ در سایر سلول های اپیتلیال گزارش شده است (۲۴).

تا پیش از این بخشی از عناصر کترلی پرموموتر ژن کراتین-۱۴ که ناحیه ۳۰-۲۷۱ را در برمی گیرد به شکل هیبرید با پرموموتر سیتوگالوبیروس برای بیان فاکتور IX مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱، ۱۲). لیکن استفاده از پرموموتر کراتین-۱۴ در سلول های کشت شده کراتینوپوتیت انسانی با هدف بیان فاکتور انعقادی IX انسانی گزارش نشده است. در این پژوهش ما بیان فاکتور IX انعقادی تحت کنترل قطعه ای به طول ۲۲۴۰ جفت باز که

### تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان این مقاله از همکاری دکتر منوچهر محمدزاده برای فراهم سازی نمونه‌های پوست تازه انسان تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از دکتر ناصر امیری‌زاده برای پیشنهادات ارزشمند، صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

خواهدبود. کراتینوسيت های به کار گرفته شده در اين پژوهش از نوع پایه هستند، بنابراین دستیابی به ردیف سلولی بیان کننده پایدار در این پژوهش میسر نبوده است. لذا از دیگر اهداف ما در ادامه طرح دستیابی به ردیف سلولی پایدار خواهدبود.

### References :

- 1- Cao T, Tsai SY, O'Malley BW, Wang XJ, Roop DR. The epidermis as a bioreactor: topically regulated cutaneous delivery into the circulation Hum Gene Ther. 2002;13(9):1075-80.
- 2- Fenjves ES, Smith J, Zaradic S, Taichman LB. Systemic delivery of secreted protein by grafts of epidermal keratinocytes: prospects for keratinocyte gene therapy. Hum Gene Ther 1994; 5(10):1241-8.
- 3- Gerrard AJ, Hudson DL, Brownlee GG, Watt FM. Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes. Nat Genet 1993; 3(2):180-3.
- 4- Wang XJ, Liefer KM, Tsai S, O'Malley BW, Roop DR. Development of gene-switch transgenic mice that inducibly express transforming growth factor beta1 in the epidermis. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(15): 8483-8488.
- 5- Garlick JA, Fenjves ES. Keratinocyte gene transfer and gene therapy.Crit Rev Oral Biol Med 1996; 7(3):204-21.
- 6- Cao T, Wang XJ, Roop DR. Regulated cutaneous gene delivery: the skin as a bioreactor. Hum Gene Ther 2000; 11(16):2297-300.
- 7- Morgan JR, Barrandon Y, Green H, Molligan RC. Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. Science 1987; 237(4821): 1476-9.
- 8- Lin SW, Dunn JJ, Studier FW, Stafford DW. Expression of human factor IX and its subfragments in Escherichia coli and generation of antibodies to the subfragments. Biochemistry 1987; 26(17):5267-74.
- 9- Gerrard AJ, Austen DE, Brownlee GG. Recombinant factor IX secreted by transduced human keratinocytes is biologically active. Br J Haematol 1996; 95(3):561-3.
- 10- White SJ, Page SM, Margaritis P, Brownlee GG. Long-term expression of human human clotting factor IX from retrovirally transduced primary human keratinocyte in vivo. Hum Gene Ther 1998; 9(8):1187-95.
- 11- Page SM, Brownlee GG. Differentiation-specific enhancer activity in transduced keratinocytes: a model for epidermal gene therapy. Gene Ther 1998; 5(3):394-402.
- 12- Page SM, Brownlee GG. An ex vivo keratinocyte model for gene therapy of hemophilia B. J Invest Dermatol 1997; 109(2):139-45.
- 13- Sugihara TM, Kudryavtseva EI, Kumar V, Horridge JJ, Andersen B. The POU domain factor Skin-1a represses the keratin 14 promoter independent of DNA binding. A possible role for interactions between Skn-1a and CREB-binding protein/p300. J Biol Chem 2001; 276(35): 3036-44.
- 14- Kaufman CK , Sinha S , Bolotin D , Fan J , Fuchs E Dissection of a complex enhancer element: maintenance of keratinocyte specificity but loss of differentiation specificity . Mol Cell Biol 2002 ; 22(12): 4293-308.
- 15- Sambrook. J. and Russell D. W.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2001 epidermal keratin genes. J Invest Dermatol 1991: 96(2):162-7.
- 16- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acid Res 1977; 25:3389-3402.
- 17- Otter-Nilson M, Nilson T. Protein expression in mammalian cells. In Higgins SY, Hames BD editors. Protein expression a practical approach. 1999; 1-27.
- 18- Aneskiewich BJ, Letai AG, Fuchs E. Epidermal keratinocytes: Opportunities and application in somatic cell gene therapy. In Patricia L, Chang Cao T, Tsai SY, O'Malley BW, Wang XJ, Roop DR editors. The epidermis as a bioreactor: topically regulated cutaneous delivery into the circulation Hum Gene Ther. 2002,13(9):1075-80.
- 19- Jensen TG. Gene transfer into human epidermis as an experimental model for somatic gene therapy. Dan Med Bull 2004; 51(2):155-66.
- 20- Vogel JC. Keratinocyte gene therapy. Arch.Dermatol 1993; 129(11):1478-83.
- 21- Wang X, Zinkel S, Polonsky K, Fuchs E. Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: Prospect for gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 219-26.
- 22- Watt FM. Epidermal stem cells as targets for gene transfer. Hum Gene Ther 2000; 11:2261-66.
- 23- Jensen UB, Jensen TG, Jensen PK, Rygaard BS, Fogh J, Kolvraa S, Bolund L. Gene transfer into cultured human epidermis and its transplantation onto immunodeficient mice: an experimental model for somatic gene therapy. J Invest Dermatol 1994; 103(3):391-4.
- 24- Jiang CK, Epstein SH,Tomic M, Freedberg IM,Blumenberg M. Functional comparison of the upstream regulatory DNA sequences of four human.

## Design and construction of an epidermal keratinocyte-specific expression vector and study of the expression of human factor IX as a model

Hosseini S.J.<sup>1,2</sup>(MS), Zomorodipour A.R.<sup>1</sup>(PhD), Jalal R.<sup>3</sup>(PhD), Sabooni F.<sup>1</sup>(PhD)

<sup>1</sup> National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Mashad University, Mashad

### Abstract

#### Background and Objectives

Keratinocyte is a suitable model for *ex vivo* gene expression strategies for systemic release of a protein. In this regard, keratinocyte-specific regulatory elements are especially attractive candidates for keratinocyte-mediated gene expression. In the present study, a vector was designed for specific expression of recombinant protein in human epidermal keratinocytes using human keratin 14 gene promoter. The potential of the constructed plasmid was shown by the expression of human FIX-cDNA in human primary keratinocytes.

#### Materials and Methods

A fragment containing human keratin14 gene promoter was inserted in the pcDNA3 plasmid. The human FIX cDNA isolated from a human liver cDNA library was inserted into the recombinant plasmid (phPK 14 H). Human epidermal keratinocytes isolated from neonatal foreskin were cultivated in keratinocyte serum-free medium and transfected with the newly made recombinant plasmid (pK14hFIX) using fugene-6. About 72 hours after transfection, cultured media were collected for expression analysis, and the cells were transferred into selective media containing genitcin. Incubation continued until the appearance of 9 colonies. The expression of human FIX-cDNA was examined by performing one-stage clotting assay as well as RT-PCR.

#### Results

The clotting times obtained from the cultured media of different transfection lines were compared to of the negative controls. Indeed the coagulation activity of the expressed rhFIX in the cultured media was detectable both before and after genitcin selection of the transfected keratinocytes. The expression of hFIX-cDNA in the transfected cells was also confirmed by performing RT-PCR.

#### Conclusion

Our preliminary results support the idea that human keratinocyte has potential for the production and secretion of biologically active FIX. The expression plasmid constructed in this study, has provided useful means for the expression of different proteins of medical importance in keratinocyte for further biochemical and cellular studies.

**Key words:** Factor IX, Keratinocyte, Keratin-14, Somatic gene therapy

SJIBTO 2006;3(1): 17-27

Received: 26 Oct 2005

Accepted: 15 Apr 2006

Correspondence: Zomorodipour A., PhD of Cellular and Molecular Science, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology

P.O.Box: 14155-6343, Tel.: (+9821)44580348, Fax.: (+9821)44580399

Email: zomorodi@nrcgeb.ac.ir