

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

سید جواد حسینی^۱، دکتر علیرضا زمردی پور^۲، دکتر راضیه جلال^۳، دکتر فرزانه صابونی^۴

چکیده

سابقه و هدف

کراتینوسیت یک مدل مناسب برای بیان ژن به صورت *ex vivo* برای رها سازی سیستمیک پروتئین است. با توجه به این نکته عناصر کنترلی اختصاصی کراتینوسیت ها، گزینه های مناسبی برای بیان ژن با واسطه کراتینوسیت ها هستند. در پژوهش حاضر یک وکتور برای بیان اختصاصی پروتئین های نوترکیب در کراتینوسیت های اپیدرم با استفاده از پروموتور ژن کراتین-۱۴ انسانی طراحی گردید. توانایی پلاسمید ساخته شده به وسیله بیان cDNA فاکتور انعقادی IX انسانی در کراتینوسیت های اولیه انسانی نشان داده شد.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. با قرار گرفتن یک قطعه حاوی پروموتور ژن کراتین-۱۴ انسانی به جای پروموتور سیتومگالوویروس (CMV) در پلاسمید pcDNA3، پلاسمید بیانی pHK14H 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 کراتینوسیت ها مورد استفاده قرار گرفت. کراتینوسیت های انسانی از پوست ختنه نوزادان جدا و با استفاده از محیط کشت عاری از سرم مخصوص کراتینوسیت ها کشت داده شدند. سلول های 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 سلول های ترانسفکت شده برای بررسی بیان فاکتور IX جمع آوری و سلول ها به محیط کشت انتخابی حاوی جنیتیسین منتقل شدند. ادامه کشت سلول های 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 مرحله ای بر روی محیط های کشت و هم چنین انجام RT-PCR بر روی سلول های کراتینوسیت ترانسفکت مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها

زمان های انعقاد به دست آمده از محیط های کشت سری های مختلف ترانسفکشن با کنترل های منفی مقایسه شد. فعالیت انعقادی فاکتور IX نوترکیب در محیط کشت کراتینوسیت های ترانسفکت شده قبل از تیمار جنیتیسین و پس از انتخاب کلنی ها با جنیتیسین نشان داده شد. بیان cDNA فاکتور IX در سلول های ترانسفکت شده هم چنین با انجام RT-PCR تایید شد.

نتیجه گیری

نتایج اولیه ما نظریه ای که کراتینوسیت های انسانی قادر به تولید فاکتور IX فعال تحت کنترل پروموتور کراتین-۱۴ هستند را تایید می کند. علاوه بر این پلاسمید ساخته شده حاصل از این تحقیق ابزار مناسبی برای بررسی بیان پروتئین هایی که از اهمیت درمانی برخوردارند را در کراتینوسیت ها برای مطالعات مختلف بیوشیمیایی و سلولی فراهم ساخته است.

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

تاریخ دریافت: ۱۴/۱/۴

تاریخ پذیرش: ۱۵/۱/۲۶

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

مقدمه

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 اپیدرم می‌توانند به‌عنوان یک راکتور زیستی برای تولید پروتئین‌ها با هدف ورود به گردش خون مورد استفاده قرار گیرند (۵). این توانایی کراتینوسیت‌ها با ترشح انواع پروتئین‌های نو ترکیب به جریان خون محیطی نشان داده شده است (۷، ۶، ۳، ۲). 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 راهنما، 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 نو ترکیب ترشح شده به وسیله کراتینوسیت‌ها از نظر بیولوژیکی تقریباً ۱۰۰٪ فعال است (۹). بیان cDNA فاکتور IX در کراتینوسیت‌های کشت شده انسانی تحت کنترل توالی‌های پروموتری ویروسی و رتروویروسی قبلاً گزارش شده است (۱۰، ۳). همچنین بیان فاکتور IX تحت کنترل توالی‌های پروموتری سیتومگالوویروس به شکل هیبرید با عناصر کنترلی ژن‌های کراتین - ۵ و یا کراتین - ۱۴ گزارش شده است (۱۱، ۱۲). 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 را در 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، ۱۳). بنابراین پروموتراهای این دو ژن، گزینه‌های مناسبی برای ژن درمانی با واسطه کراتینوسیت‌ها با هدف بیان ژن

هستند. بررسی‌های قبلی نشان داده‌اند که قطعه‌ای با طول ۲۲۰۰ جفت باز از توالی بالادست ژن کراتین ۱۴ انسانی، قادر به بیان ژن در کراتینوسیت اپیدرم ترانسژن است (۴). در مطالعه حاضر با طراحی و ساخت یک وکتور اختصاصی بیان کننده در کراتینوسیت‌ها، توانایی‌های پروموتری ژن کراتین - ۱۴ 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. سوش DH5 α باکتری *E. coli* (استراتژن - آمریکا) برای مراحل کلونینگ استفاده شد. کتابخانه cDNA کبدی برای جداسازی cDNA انسانی از شرکت MRC (انگلستان) خریداری گردید. پلاسمید pcDNA3 (اینویترژن - 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 (۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$) محیط کشت) در صورت نیاز به وجود محیط کشت انتخابی استفاده شد. آنزیم‌های *BamHI*، *Hind III*، *BglIII* و *NotI*، کیت مخصوص تکثیر قطعات بزرگ، T4 DNA 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 *BamHI* 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

طراحی شدند. پس از برش، محصول PCR حاوی پروموتور کراتین ۱۴- و پلاسمید pcDNA3 با آنزیم‌های *HindIII* و *BglIII* و قطعه PHK14 به جای پروموتور سیستم‌گالوویروس (CMV) در پلاسمید pcDNA3 قرار گرفت و پلاسمید بیانی pHK14H ساخته شد. محصول PCR حاوی cDNA فاکتور IX، پس از کلون سازی در وکتور مخصوص محصولات PCR (PTZ57RT) با آنزیم‌های *NotI/BamHI* بریده و در پلاسمید pHK14H وارد گردید. پلاسمید نو ترکیب اخیر که در آن cDNA فاکتور IX در پایین دست پروموتور ژن کراتین - ۱۴ انسانی قرار دارد، pK14hFIX نامیده شد.

تعیین توالی

قطعات کلون شده در پلاسمید نو ترکیب pK14hFIX (شامل پروموتور 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 کراتینوسیت‌های انسانی

کراتینوسیت‌های طبیعی اپیدرم انسانی (HNEK Human Normal Epidermal Keratinocyte) از پوست ختنه نوزادان جدا و مطابق با دستورالعمل فراهم شده در محیط کشت فاقد سرم مخصوص کراتینوسیت (K-SFM) رشد داده شد. به صورت خلاصه، پیرو انتقال پوست ختنه به آزمایشگاه و شستشو در PBS، فاقد کلسیم و منیزیم و حاوی $20 \mu\text{g/ml}$ جتتامایسین، به قطعات کوچکتر تقسیم و به مدت ۱۸ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد در بافر هنکس حاوی 25 U/ml آنزیم دیسپاز قرار داده شد. سپس لایه اپیدرمی از پریدرم جدا و با هدف جداسازی کراتینوسیت‌ها با محلول حاوی $0/25$ درصد تریپسین و امیلی مول EDTA به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد همراه با حداقل دو بار پیپتینگ تیمار گردید. تریپسین با FBS ۱۰ درصد در محلول نهایی خنثی 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 اینوبیروژن (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 ₁	۵'-GGAAGATCTGCTAGGGTCTGGTGTGGTGGG-۳'
hk14-R ₁	۵'-CGTCCAAGCTTGAGGAGGGAGGTGAGCGAG-۳'
hIX-f ₁	۵'-GGATCCGTTATGCAGCGCGTGAACATGA-۳'
hIX-R ₁	۵'-GCGGCCGAGTGATTAGTTAGTGAGAGGCC-۳'
hFIX-F ₂	۵'-GCCATGGCCCCCTTGGATTGAAGGAAAGAACT-۳'
hFIX-R ₂	۵'-GAAGCTTCTCCCTTTGTGGAAGACTCTTCCC-۳'

دست ورزی‌های DNA

همه مراحل دست کاری DNA بر اساس روش‌های استاندارد کلونینگ انجام شد (۱۵). DNA کروموزومی استخراج شده از خون و کتابخانه cDNA کبدی انسانی به ترتیب به عنوان الگو برای تکثیر پروموتور کراتین - 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 نو ترکیب را پیرو واکنش ترانسفکشن می‌دهد.

پرایمرهای hk14-R₁ و hk14-F₁ که به ترتیب دارای جایگاه‌های برشی آنزیم‌های *HindIII* و *BglIII* بودند، بر اساس توالی پروموتوری 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 *BamHI* 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 استاندارد استفاده شد که با استفاده از فعالیت انعقادی، ۵ رقت مختلف از پلاسمای ستیرانه شده طبیعی انسان ($\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{20}$ ، $\frac{1}{40}$ ، $\frac{1}{80}$ ، $\frac{1}{160}$) روی کاغذ تمام لگاریتمی بر علیه زمان انعقاد ترسیم شده بود. برای انجام آزمون انعقادی، $100 \mu\text{l}$ از هر نمونه با رقت $\frac{1}{10}$ با $100 \mu\text{l}$ 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

RNA تام از سلول‌های ترانسفکت شده (کلنی F3-C2 به عنوان منبع سلولی) با استفاده از کیت تخلیص RNA استخراج شد و با DNAase عاری از RNAase تیمار شد و توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس (ریورس ترانس کریپتاز M-Mulv) به عنوان الگو برای ساختن cDNA مورد استفاده قرار گرفت. از cDNA ساخته شده به عنوان الگو جهت تکثیر قطعه‌ای از cDNA 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 نو ترکیب

ساخت پلاسمید pK14hFIX به طول ۸۲۲۳ جفت باز برای بیان اختصاصی cDNA فاکتور IX انعقادی در کراتینوسیت‌های 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 سانتی‌گراد رسوب داده شدند. رسوب سلولی در K-SFM (حاوی EGF: Epidermal Growth Factor $0.1-0.2 \text{ ng/ml}$ و BPE: Bovin Pituitary Extract $25-30 \mu\text{g/ml}$) معلق گردید. کراتینوسیت‌های 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 سانتی‌گراد و با ۵ درصد CO_2 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 منیزیم شستشو و پاساژ داده شدند.

ترانسفکشن

کراتینوسیت‌ها با استفاده از فیوجین-۶ مطابق دستور شرکت تولید کننده در پلیت‌های شش خانه‌ای ترانسفکت شدند. برای این منظور کراتینوسیت‌ها حدود ۲۴ ساعت قبل از واکنش ترانسفکشن در تراکم ۱۵۰ تا ۱۸۰ سلول به ازای هر خانه کشت داده شدند. برای واکنش ترانسفکشن، $3 \mu\text{l}$ فیوجین-۶ با $97 \mu\text{l}$ K-SFM پایه (فاقد EGF و BPE) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد.

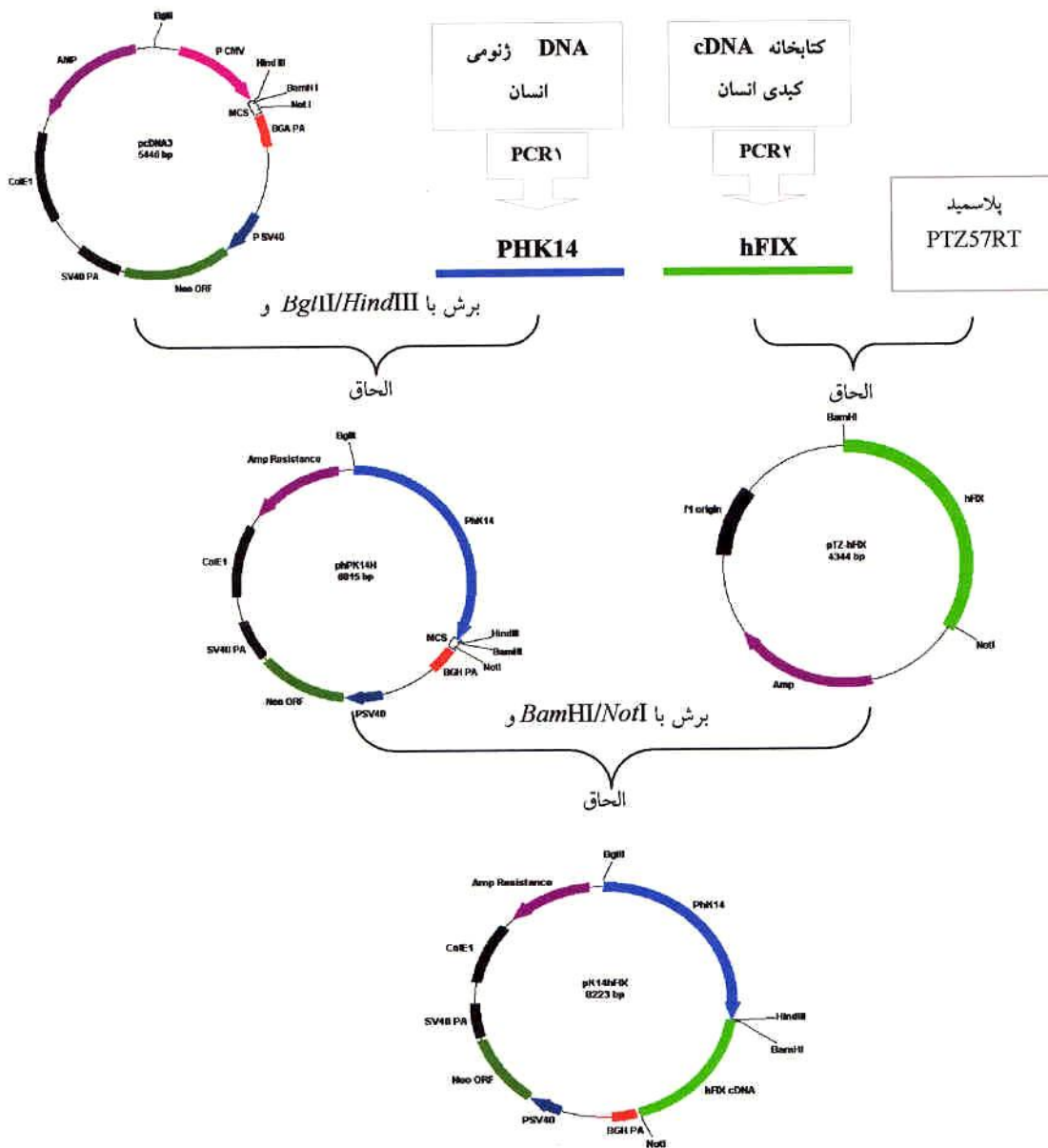
به مخلوط فوق $2 \mu\text{g}$ پلاسمید نو ترکیب (pK14hFIX یا pK14hFIX) اضافه و پس از مخلوط نمودن به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. مخلوط نهایی سپس مستقیماً به سلول‌ها در ۲ میلی لیتر محیط کشت پایه اضافه گردید. واکنش ترانسفکشن برای مدت حداقل ۶ ساعت ادامه یافت. سپس K-SFM پایه جمع آوری و K-SFM 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. کلنی‌های نو ترکیب در محیط کشت حاوی ۲۵۰-۳۰۰ میکروگرم جنتیسین به ازای هر میلی لیتر محیط کشت انتخاب و به صورت انفرادی تکثیر شدند (۱۷). این کلنی‌ها سپس با محیط حاوی $600 - 500 \mu\text{g/ml}$ جنتیسین تیمار شدند.

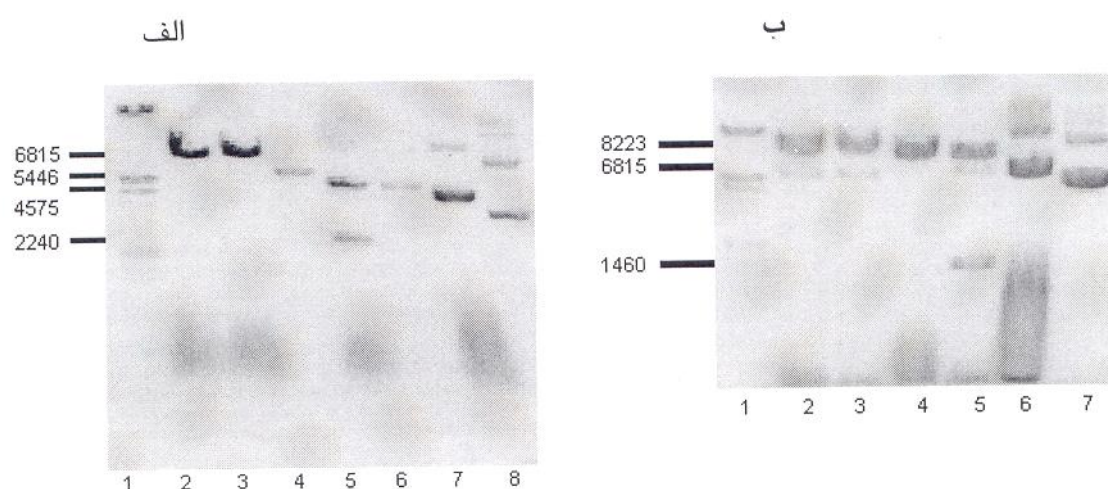
آنزیمی تایید گردید (شکل ۲- الف). اندازه مورد انتظار ۶۸۱۵ جفت بازی شکل خطی پلاسمید phPK14H به وسیله هضم جداگانه با آنزیم *HindIII* و *BglIII* که فقط دارای یک جایگاه برش در پلاسمید فوق بودند مشاهده و تایید شد. به کارگیری توام آنزیم‌های *HindIII* و *BglIII* برای برش پلاسمید مزبور، دو قطعه ۲۲۴۰ و ۴۵۷۵ جفت 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 *BglIII* و *HindIII* در دو انتهای خود است، با استفاده از PCR (PCR۱) محصول تکثیر گردید.

پیرو هضم محصول PCR۱ و پلاسمید pcDNA3 به وسیله آنزیم‌های *BglIII/HindIII*، پرموتور ژن کراتین-۱۴ جانشین پرموتر CMV در پلاسمید مذکور گردید. به این ترتیب پلاسمید نو ترکیب ساخته شده phPK14H نامیده شد. ساختار پلاسمید phPK14H با استفاده از روش‌های برش



شکل ۱: مراحل ساخت پلاسمیدهای نو ترکیب



شکل ۲: تایید مولکولی ساختار پلاسمیدهای نو ترکیب با روش برش آنزیمی

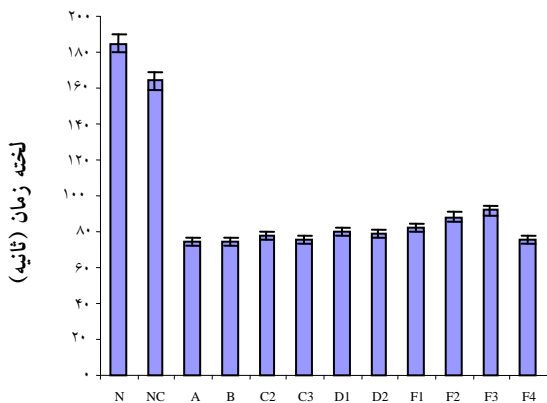
الف: پلاسمید phPK14H : ردیف ۱؛ مارکر استاندارد اندازه مولکولی DNA. ردیف‌های ۲ و ۳؛ الگوی‌های خطی شده phPK14H به ترتیب با *BglIII* و *HindIII*. ردیف ۴؛ الگوی خطی شده pcDNA3 با *HindIII*. ردیف ۵؛ الگوی برش خورده phPK14H با *BglIII* و *HindIII* به‌طور هم‌زمان. ردیف ۶؛ الگوی برش خورده pcDNA3 با *BglIII* و *HindIII* به‌طور هم‌زمان. ردیف ۷؛ الگوی سوپرکویل pK14hFIX. ردیف ۸؛ الگوی سوپرکویل pcDNA3.

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

بررسی بیان فاکتور IX انسانی

با هدف بیان فاکتور انعقادی IX در کراتینوسیت‌های 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 جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون انعقادی یک مرحله‌ای مورد بررسی قرار گرفت. زمان انعقاد نمونه‌های به‌دست 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 (PCR^۲) و کلون‌سازی اولیه در پلاسمید PTZ57RT، با بهره‌گیری از جایگاه‌های برشی *BamHI* و *NotI* به پلاسمید phPK14H وارد شد. برش پلاسمید pK14hFIX با آنزیم‌های *BamHI* و *NotI* به‌طور هم‌زمان منجر به ایجاد دو قطعه ۶۸۱۵ و ۱۴۵۹ جفت‌بازی شد که به ترتیب با اندازه پلاسمید phPK14H و cDNA فاکتور IX مطابقت می‌نماید. هم‌چنین برش‌های پلاسمید pK14hFIX با هر یک از آنزیم‌های *BamHI* یا *NotI* یک قطعه به‌طول ۸۲۲۳ جفت‌بازی ایجاد نمود که با اندازه پلاسمید نو ترکیب بیان‌کننده 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 ترانسفکشن (قبل از اضافه نمودن جنیتیسین (G418)).

روز سوم پس از واکنش ترانسفکشن (حدود ۷۲ ساعت پس از واکنش ترانسفکشن)، سلول‌های ترانسفکت شده به محیط کشت انتخابی حاوی جنیتیسین منتقل شدند و تا زمان پدیدار شدن کلنی‌ها این وضعیت ادامه داشت. از ترانسفکشن سری F1، F2 و F3 مجموعاً ۹ کلنی جدا و به صورت جداگانه رشد داده شدند. کلنی‌های F1-C1، F1-C2، F1-C3 و F1-C4 از سری F1 و کلنی‌های F2-C3 و F2-C4 از سری F2 و کلنی‌های F3-C1، F3-C2، F3-C3 از سری F3 جداسازی و به محیط کشت حاوی $500-600 \mu\text{g/ml}$ جنیتیسین منتقل شدند. بیان فاکتور IX نوترکیب در محیط‌های کشت جمع آوری شده از هر کلنی قبل از آن‌که سطح پلیت کاملاً پر شود (۸۰-۷۵ 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 مترشحه به محیط کشت در میان کلنی‌های مختلف از تنوع قابل توجهی برخوردار است. در بین کلنی‌های جداشده، کلنی F3-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 حداکثر و حداقل بیان فاکتور IX به محیط کشت را داشتند (جدول ۳ و شکل ۴). اختلاف زمان انعقادی محیط‌های کشت جمع‌آوری شده از کلنی‌های به دست آمده در مقایسه با نمونه‌های کنترل منفی نشانگر تداوم بیان و ترشح فاکتور IX نوترکیب توسط سلول‌های حاوی pK14hFIX به محیط کشت بود.

کاهش معنی‌دار زمان انعقادی محیط‌های کشت جمع‌آوری شده از سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسמיד pK14hFIX در مقایسه با نمونه‌های کنترل 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 هر آزمایش ترانسفکشن در مقایسه با کنترل‌های منفی در جدول ۲ و شکل ۳ ارائه شده است.

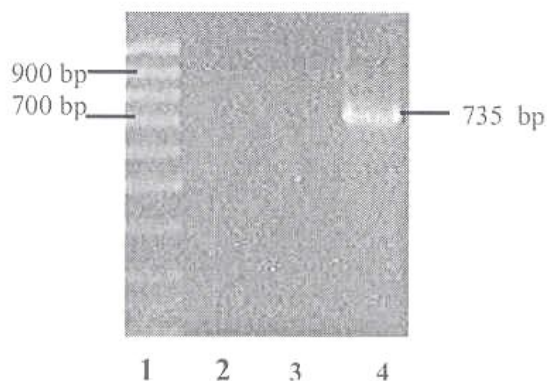
جدول ۲: زمان انعقاد و فعالیت انعقادی فاکتور IX انسانی در محیط کشت کراتینوسیت‌های ترانسفکت شده، قبل از تیمار با جنیتیسین (روز سوم پس از ترانسفکشن)

نمونه‌های مورد آزمایش که از ترانسفکشن‌های مختلف به دست آمده بودند با حروف A، B، C2، C3، D1، D2، F1، F2، F3 و F4 نشان داده شده‌اند. محیط کشت از سلول‌های ترانسفکت نشده با N و محیط کشت از سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسמיד phRK14H با NC نشان داده شده‌است.

نمونه‌ها	زمان انعقاد (ثانیه)			متوسط فعالیت (%)hFIX
N	۱۷۷	۱۷۸	۱۸۰	۲/۰۷
NC	۱۶۴	۱۶۷	۱۶۵	۲/۴۳
A	۷۳	۷۱	۷۰	۳۹/۶۷
B	۷۳	۷۲	۷۰	۳۹
C2	۷۷	۷۵	۷۶	۳۱/۶۷
C3	۷۳	۷۲	۷۵	۳۶
D1	۸۰	۷۸	۸۰	۲۷/۶۷
D2	۸۱	۸۰	۷۸	۲۷/۵
F1	۸۲	۸۱	۸۴	۲۴/۸۳
F2	۹۱	۹۰	۸۸	۱۸/۶۷
F3	۹۵	۹۴	۹۳	۱۶
F4	۷۴	۷۲	۷۵	۳۵/۳۳

بر اساس نتایج به دست آمده، کراتینوسیت‌های حاصل از ترانسفکشن‌های 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 ترانسفکشن 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 کراتینوسیت های ترانسفکت شده، شاهد دیگری دال بر صحت بیان فاکتور IX انسانی در کراتینوسیت ها فراهم شد (شکل ۵).



شکل ۵: آزمایش RT-PCR

تکثیر قطعه ۳۵ جفت بازی cDNA فاکتور IX انسانی با استفاده از cDNA ساخته شده از RNA به دست آمده از کلنی F3-C2 به عنوان الگو. ۱- مارکر ۵۰ جفت بازی ۲-RNA تیمار شده با DNAase عاری از RNAase به عنوان الگو ۳- کنترل منفی ۴- cDNA ساخته شده به عنوان الگو

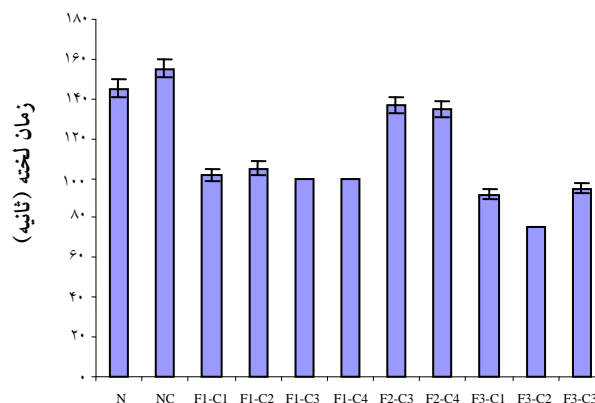
بحث

کراتینوسیت های اپیدرم 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 کراتینوسیت های پوست می توانند به عنوان یک راکتور زیستی در جهت تولید پروتئین های نو ترکیب برای درمان بیماری های ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند (۱، ۲، ۱۸). بسیاری از بیماری های پوستی مونوژنیک و سیستمیک، گزینه های درمان با استفاده از کراتینوسیت ها هستند (۲۰، ۱۹). توانایی فوق العاده تکثیر در محیط کشت، امکان تولید پوست مصنوعی در شرایط آزمایشگاهی، توانایی ترشح پروتئین های نو ترکیب 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 جنتیسین (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 پلاسמיד phPK14H با NC نشان داده شده است.

متوسط فعالیت فاکتور IX انسانی بیان شده (%)	زمان انعقاد (ثانیه)			نمونه ها
۳/۵	۱۴۹	۱۴۸	۱۴۶	N
۳/۰۳	۱۵۵	۱۵۳	۱۵۲	NC
۱۲/۷۳	۱۰۳	۱۰۱	۱۰۰	F1-C1
۱۲/۵۳	۱۰۴	۱۰۲	۱۰۰	F1-C2
-	-	-	۱۰۰	F1-C3
-	-	-	۱۰۰	F1-C4
۴/۹۳	۱۳۶	۱۳۴	۱۳۳	F2-C3
۴/۹	۱۳۴	۱۳۲	۱۳۵	F2-C4
۱۹/۵	۹۱	۸۹	۸۷	F3-C1
۳۹	۷۳	۷۲	۷۰	F3-C2
۱۵/۶۷	۹۶	۹۵	۹۳	F3-C3

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 مزبور منتج به تولید قطعه مورد انتظار ۷۳۵ جفت بازی از cDNA فاکتور IX انسانی گردید.



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

کلنی های به دست آمده با حروف F1-C1, F1-C2, F1-C3, F1-C4, F2-C3, F2-C4, F3-C1, F3-C2, F3-C3 نشان داده شده اند. محیط کشت از سلول های ترانسفکت نشده با N و محیط کشت از سلول های ترانسفکت شده با phPK14H با NC نشان داده شده اند.

در بر گیرنده عنصر کنترل ژن کراتین-۱۴ انسانی است را در کراتینوسیت‌های کشت شده انسانی بررسی کردیم. بر این اساس محیط‌های کشت جمع‌آوری شده از سری‌های مختلف ترانسفکشن قبل از تیمار جنیتیسین از حدود ۱۶ تا ۴۰ درصد پلاسما‌ی نرمال انسانی فعالیت‌های 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 جمع‌آوری شده از یکی از کلنی‌ها (F3-C2) بود قابل آشکار سازی بود. در حالی که میزان فعالیت انعقادی در برخی دیگر از کلنی‌های نوترکیب (F2-C3 و F2-C4) بسیار پایین و در حدود ۵ درصد استاندارد بود. تفاوت در بیان فاکتور IX توسط کلنی‌های مذکور احتمالاً به دلیل درجه متفاوت تمایز سلول‌های کراتینوسیت است. به صورت خلاصه نتایج ما توانایی کراتینوسیت‌های انسانی در تولید و ترشح فاکتور IX فعال را تایید می‌کند. بنابراین به نظر می‌رسد که وکتور طراحی شده حاصل از این پژوهش توانایی بیان دیگر پروتئین‌ها در کراتینوسیت‌ها با هدف مطالعات بیوشیمیایی و سلولی را دارا باشد. با توجه به ضعیف بودن قدرت پروموتور کراتین-۱۴ مرحله بعدی، ارتقاء سیستم بیان کننده با استفاده از راه‌کارهای مولکولی خواهد بود. کراتینوسیت‌های به‌کار گرفته شده در این پژوهش از نوع پایه هستند، بنابراین دست‌یابی به ردیف (line) سلولی بیان‌کننده پایدار در این پژوهش میسر نبوده است. لذا از دیگر اهداف ما در ادامه طرح، دست‌یابی به ردیف سلولی پایدار خواهد بود.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش توانایی کراتینوسیت‌های انسانی در تولید و ترشح فاکتور IX فعال را تایید می‌کند. به نظر می‌رسد که وکتور طراحی شده حاصل از این پژوهش توانایی بیان دیگر پروتئین‌ها در کراتینوسیت‌ها با هدف مطالعات بیوشیمیایی و سلولی را دارا باشد. با توجه به ضعیف بودن قدرت پروموتور کراتین-۱۴ مرحله بعدی، ارتقاء سیستم بیان‌کننده با استفاده از راه‌کارهای مولکولی

هدف در اپیدرمیس با استعمال موضعی القا کننده‌ها شواهدی هستند که کراتینوسیت‌ها 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 کراتینوسیت‌های کشت شده انسانی با استفاده از پروموتورهای ویروسی و رتروویروسی تاکنون گزارش شده است (۱۵، ۷، ۳، ۲).

غیر فعال شدن پروموتورهای ویروسی در *in vivo*، استفاده از این عناصر کنترلی را با محدودیت مواجه ساخته است (۴، ۶). بنابراین طراحی وکتوری که به صورت اختصاصی بیان پروتئین‌های نوترکیب در کراتینوسیت‌ها را هدایت نماید ضروری به نظر می‌رسد. کراتین-۵ و کراتین-۱۴ از عمده‌ترین پروتئین‌های بیان شده به‌وسیله کراتینوسیت‌هایی با فعالیت میتوزی هستند و در سطح فراوانی توسط کراتینوسیت‌های کشت شده بیان می‌گردند. به این ترتیب عناصر کنترلی ژن‌های کراتین-۵ و کراتین-۱۴ به عنوان گزینه‌های مناسبی با هدف ژن درمانی توسط کراتینوسیت‌ها مطرح هستند (۲۱، ۱۸). در این پژوهش به دو دلیل عنصر کنترلی ژن کراتین-۱۴ برای طراحی وکتور مورد استفاده قرار گرفت؛ یکی به دلیل کوتاه تر بودن آن در مقایسه با عنصر کنترلی ژن کراتین-۵، دستورزی آن را آسان‌تر می‌نماید و دلیل دیگر اینکه حوزه فعالیت پروموتور ژن کراتین-۱۴ در مقایسه با پروموتور ژن کراتین-۵ بیشتر است (۲۳، ۱۳). پروموتور ژن کراتین-۵ فقط در کراتینوسیت‌های بازال فعال است در صورتی که فعالیت پروموتور ژن کراتین-۱۴ در سایر سلول‌های اپیتلیال گزارش شده است (۲۴).

تا پیش از این بخشی از عناصر کنترلی پروموتور ژن کراتین-۱۴ که ناحیه ۳۰- تا ۲۷۱- را در برمی‌گیرد به شکل هیبرید با پروموتور سیتومگالوویروس برای بیان فاکتور IX مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲، ۱۱). لیکن استفاده از پروموتور کراتین-۱۴ در سلول‌های کشت شده کراتینوسیت انسانی با هدف بیان فاکتور انعقادی IX انسانی گزارش نشده است. در این پژوهش ما بیان فاکتور IX انعقادی تحت کنترل قطعه‌ای به طول ۲۲۴۰ جفت باز که

تشکر و قدردانی

نویسندگان 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.

خواهد بود. کراتینوسیت‌های به‌کار گرفته‌شده در این پژوهش از نوع پایه هستند، بنابراین دست‌یابی به ردیف سلولی بیان‌کننده پایدار در این پژوهش میسر نبوده‌است. لذا از دیگر اهداف ما در ادامه طرح دست‌یابی به ردیف سلولی پایدار خواهد بود.

References :

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Garlick JA, Fenjves ES. Keratinocyte gene transfer and gene therapy. Crit Rev Oral Biol Med 1996; 7(3):204-21.
- Cao T, Wang XJ, Roop DR. Regulated cutaneous gene delivery: the skin as a bioreactor. Hum Gene Ther 2000; 11(16):2297-300.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Page SM, Brownlee GG. Differentiation-specific enhancer activity in transduced keratinocytes: a model for epidermal gene therapy. Gene Ther 1998; 5(3):394-402.
- Page SM, Brownlee GG. An ex vivo keratinocyte model for gene therapy of hemophilia B. J Invest Dermatol 1997; 109(2):139-45.
- 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.
- 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.
- Sambrook J. and Russell D. W.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2001 epidermal keratin genes. J Invest Dermatol 1991; 96(2):162-7.
- 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 1997; 25:3389-3402.
- Otter-Nilson M, Nilson T. Protein expression in mammalian cells. In Higgins SY, Hames BD editors. Protein expression a practical approach. 1999; 1-27.
- Aneskievich 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.
- Jensen TG. Gene transfer into human epidermis as an experimental model for somatic gene therapy. Dan Med Bull 2004; 51(2):155-66.
- Vogel JC. Keratinocyte gene therapy. Arch.Dermatol 1993; 129(11):1478-83.
- 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.
- Watt FM. Epidermal stem cells as targets for gene transfer. Hum Gene Ther 2000; 11:2261-66.
- 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.
- 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.^{1,2}(MS), Zomorodipour A.R.¹(PhD), Jalal R.³(PhD), Sabooni F.¹(PhD)

¹ National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology

² Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah

³ 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 (pPK14 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 geneticin. 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 geneticin 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