دوفصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال یازدهم، شماره ۲، صفحه ۱۰۷ - ۹۸ (اسفند ۱۳۸۷)

تأثیر توالی کوزاک در بیان موقت مینی‌ژنی از فاکتور ۹ انعقادی در سلول‌های پستاندار

علی اکبر حداد مشهدریزه [۱]، محمدرضا سام [۲]، صدیقه صفری [۳]، دکتر علیرضا زمردی پور [۴*]، دکترسیدجواد حسینی [۵]، دکتر فرزانه صابونی [۶]

[۱] کارشناس ارشد بیولوژی سلولی و ملکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و مرکز تحقیقات آسم و آلرژی، تهران
[۲] دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
[۳] کارشناس ارشد میکروبیولوژی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
[۴] دانشیار ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
[۵] استادیار زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج فارس دانشگاه خلیج فارس، بوشهر
[۶] استادیار بیوشیمی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

چکیده

زمینه: قابلیت توالی کوزاک در افزایش بیان ژن‌های یوکاریوتی مشخص شده است. با توجه به این موضوع می‌توان از این توانمندی در جهت افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب استفاده کرد.

مواد و روش‌ها: با هدف بالا بردن بیان ژن فاکتور IX انعقادی، سازه‌ای بیانی مجهز به پروموتر سایتومگالو ویروس انسانی (CMV) که بیان یک مینی ژن فاکتور IX را تحت کنترل داشت، به توالی کوزاک تجهیز شد. پس از تأیید صحت سازهٔ نوترکیب، این سازه به همراه یک سازه بیان کننده فاکتور IX فاقد کوزاک (به عنوان کنترل مثبت) و یک پلاسمید pcDNA3 (به عنوان کنترل منفی) برای ترانسفکشن سلول‌های تخمدان هامستر چینی (CHO) در سه آزمایش مستقل مورد استفاده قرار گرفتند. محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده به منظور آشکارسازی بیان فاکتور IX انسانی پس از ۲ و ۳ روز جمع‌آوری و مورد آزمون یک مرحله‌ای انعقاد قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده در مقایسه با کنترل منفی بیانگر بیان فاکتور IX فعال توسط دو گروه سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمیدهای نوترکیب بود. مقایسه ابتدایی میزان بیان دو گروه سلول‌های ترانسفکت شده با دو سازه نوترکیب، نشانگر افزایش بیان توسط سلول‌هایی است که حاوی توالی کوزاک هستند.

نتیجه‌گیری: علاوه بر تأیید نقش افزاینده کوزاک بر بیان فاکتور IX، در این طرح با ساخت پلاسمیدهای بیانی ابزار مناسبی برای مطالعه سیستماتیک بیان فاکتور IX انسانی فعال فراهم شد.

واژگان کلیدی: توالی کوزاک، ژن‌های یوکاریوتی، پروتئین نوترکیب، فاکتور IX

دریافت مقاله: ۸۶/۱۲/۲۵ - پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۴

* تهران، اتوبان تهران کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، ص. پ: ۶۳۴۳-۱۴۱۵۵
Email :zomorodi@nigeb.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

مقدمه

در راستای درمان بیماری‌های ژنتیکی، همواره دو راهکار عمده مورد توجه بوده است؛ یکی جایگزین درمانی با استفاده از پروتئین نوترکیب و دیگری ژن درمانی به صورت in vivo و ex vivo است (۱). با توجه به کلیدی بودن نقش سامانه بیان‌کننده پستانداران در هر یک از موارد فوق، افزایش کنترل شده بیان پروتئین نوترکیب در سلول‌های میزبان در هر یک از این راهکارها همواره از اهداف محققین بوده است. هموفیلی B یا بیماری کریسمس یکی از بیماری‌های مسیر انعقادی است که در نتیجهٔ اختلال و یا کمبود فاکتور ۹ حاصل می‌شود و به صورت مغلوب وابسته به کروموزوم X به ارث می‌رسد، میزان تواتر این بیماری ۱/۳۰۰۰۰ مرد در جهان است (۲). درمان این بیماری به وسیله تزریق فاکتور ۹ نوترکیب و یا استخراج شده از پلاسمای نرمال انسانی رایج است. افزایش تولید شکل نوترکیب این پروتئین به مانند سایر پروتئین‌های نوترکیب نیازمند استفاده از پلاسمیدهای بیانی مجهز به عناصر تنظیمی کارآمد با نقش افزاینده دارد (۳). به طور کلی عناصر تنظیمی در سلول‌های یوکاریوتی در نواحی غیر کدگذار داخل و خارج ژنی پراکنده شده‌اند (۶-۴). جهش‌هایی که در نواحی غیر کدگذار ژن‌ها موجب اختلال در بیان ژن شده و به بیماری منتهی می‌گردند از جمله شواهدی هستند که وجود عناصر تنظیمی در نواحی غیر کدگذار ژن را تأیید می‌کنند (۷). عناصر ژنتیکی شناخته شده یوکاریوتی که نقش کلیدی در تنظیم میزان بیان ژن‌ها دارند، به طور عمده شامل پروموترها، افزایش دهنده‌ها، توالی‌های خاتمه دهنده رونویسی و نیز توالی‌های مؤثر در فرآیند پلی‌آدنیلاسیون هستند (۱۰-۸). ما در کارهای قبلی خود به منظور افزایش بیان ژن فاکتور ۹ با هدف ژن درمانی و جایگزین درمانی از عناصر تنظیمی پروموتری کراتینوسیت‌ها و نیز اینترون‌های ژن بتاگلوبین استفاده کردیم (۱۱ و ۱۲). علاوه بر عناصر شناخته شدهٔ مذکور در نواحی غیر قابل ترجمه '۵ و '۳ دو انتهای اکثر ژن‌های یوکاریوتی عناصری قرار می‌گیرند که تنظیم بعد از نسخه‌برداری را به عهده دارند (۱۰-۸). تنظیم ترجمه در یوکاریوت‌های پرسلولی تحت تأثیر ویژگی ساختاری مولکول‌های mRNA قرار دارد (۱۳). کلاهک m7G (۱۴)، ساختار اولیه مولکول-های mRNA و یا به عبارتی توالی‌های اطراف کدون شروع (AUG) ترجمه (۱۵، ۱۶ و ۱۷)، جایگاه کدون شروع (۱۸)، طول توالی رهبر (۱۹ و ۲۰) و نیز ساختار ثانویهٔ توالی بالادستی و پایین دستی کدون شروع ترجمه (۱۷، ۲۱ و ۲۲) ویژگی-های از مولکول‌های mRNA یوکاریوت‌های پر سلولی هستند که ترجمه و به ویژه شروع ترجمه را تحت تأثیر قرار داده و آن را تنظیم می‌کنند. توالی کوزاک از جمله توالی‌های شناخته شدهٔ تنظیمی و از ویژگی‌های ساختاری مولکول‌های mRNA در اکثر یوکاریوت‌های پر سلولی است که در تنظیم شروع ترجمه مشارکت دارد (۱۶ و ۲۳). این توالی در انتهای '۵ اکثر ژن‌های کدگذار پروتئینی به صورت موتیف GCC(A/G)CC قبل از کدون شروع ترجمه (AUG) قرار می‌گیرد و به عنوان عامل شناسایی کدون شروع توسط ریبوزوم عمل می‌کند (۱۶ و ۲۳). گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که جهش‌های نقطه‌ای در توالی‌های مجاور کدون شروع بر کارایی ترجمه مؤثر است که این موضوع

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

اهمیت توالی کوزاک را نیز نشان می‌دهد (۲۴). مکانیزم عمل این توالی در بالا بردن کارآیی ترجمه نتیجهٔ بالا بردن صحت کدون انتخابی به عنوان کدون شروع ترجمه است (۲۴ و ۲۵). مطالعات مختلف نشان داده است که حضور توالی کوزاک موجب افزایش بیان پروتئین می‌شود (۲۶). با توجه به مطالب مذکور، توالی کوزاک قابلیت افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب را دارد. در این پژوهش، با هدف بالا بردن بیان ژن فاکتور ۹ انعقادی با قرار دادن توالی کوزاک قبل از کدون شروع ترجمه (ATG) در مینی ژنی از فاکتور ۹ که واجد اینترون ۱ ژن بتاگلوبین انسانی است (۱۱) بیان موقت فاکتور ۹ انسانی در سلول‌های تخمدان هامستر چینی CHO مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌کار

سوش باکتری، ردهٔ سلولی پستانداران، پلاسمیدها و پرایمرها:

سوش باکتری اشریشیاکلی (استراتژن- آمریکا) برای مراحل همسانه‌سازی استفاده شد. ردهٔ سلولی CHO خریداری شده از بانک سلولی ایران به عنوان میزبان سلولی پستاندار جهت بیان فاکتور ۹ مورد استفاده قرار گرفت. سازهٔ نوترکیب pET26-hFIX-I (۱۱) به عنوان الگو در جهت افزودن توالی کوزاک در فرآیند PCR استفاده شد. در این تحقیق پلاسمید pcDNA3 (اینویتروژن-آمریکا) به عنوان وکتور پایه برای طراحی سازهٔ بیانی فاکتور ۹ در سلول‌های پستانداران مورد استفاده قرار گرفت. سازه‌های بیانی ساخته شده واجد ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتیسین به عنوان شاخص انتخابی هستند. پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق به شرح زیر توسط شرکت آلمانی MWG ساخته شدند.

hFIX-K-E1-F	5GGATCCGCCACCATGCA GCGCGTGAACATGAT 3´
hFIXE4-R	5'CCT TGC AAC TGC CGCC ATTTA AAC 3'

محیط کشت، آنزیم‌ها، مواد شیمیایی و کیت‌ها:

محیط کشت LB[1] به عنوان محیط کشت باکتری استفاده شد. آمپی‌سیلین، کانامایسین، ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (IPTG) و Xgal (به ترتیب با غلظت ۱۰۰، ۳۰،۲۰ و ۲۰ میکروگرم در یک میلی‌لیتر محیط کشت) در صورت نیاز به وجود محیط کشت انتخابی استفاده شدند. آنزیم NotI، DraI، T4 DNA Ligase، جنیتیسین (G-418)، کیت‌های تخلیص محصول PCR و پلاسمید، عامل ترانسفکشن فیوجین ۶ از شرکت رش (آلمان) خریداری گردید. آنزیم BamHI و پلاسمید کلونینگ pTZ57RT از فرمنتاز خریداری شد. پلاسمای فاقد فاکتور ۹ انسانی از شرکت استگو (فرانسه) خریداری شد. پلاسمای طبیعی انسان با هدف رسم نمودار استاندارد تست انعقادی فاکتور ۹ به صورت اهدائی از سازمان انتقال خون ایران بدست آمد. محیط‌های کشت DMEM[2] و Hams-F12 از شرکت گیبکو (آمریکا) جهت رشد سلول‌های CHO استفاده شد.

دست ورزی‌های DNA:

دست ورزی‌های DNA بر اساس روش‌های استاندارد کلونینگ انجام شد (۲۷). سازهٔ نوترکیب pET26-hFIX-I به عنوان الگو در جهت تکثیر قطعهٔ نوترکیب K-E1-I1-E2-4 (این قطعه شامل اگزون‌های ۱ تا ۴ مولکول cDNA ژن فاکتور ۹

[1] Luria-Bertani
[2] Dulbecco's modified Eagle's medium

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

است که اینترون ۱ ژن بتاگلوبین در حد فاصل اگزون‌های ۱ و ۲ آن قرار دارد) استفاده شد. الحاق توالی کوزاک به ابتدای cDNA ژن فاکتور ۹ با قرار دادن این توالی در ابتدای پرایمر hFIX-K-E1-F امکان‌پذیر شد. به منظور انجام عمل همسانه‌سازی در انتهای ´۵ پرایمرهای hFIX-K-E1-F و hFIXE4-R به ترتیب جایگاه‌های آنزیمی BamHI و DraI طراحی شده است.

تعیین توالی:

صحت حضور توالی کوزاک همسانه‌سازی شده در سازهٔ نوترکیب pcDNA3-K-hFIX-I با استفاده از تعیین توالی با دستگاه ABI 373 (آلمان- MWG) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تأیید گردید.

کشت سلول و ترانسفکشن:

سلول‌های CHO در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، فشار اتمسفر ۵٪ CO2 و در محیط کشت Hams-F12 و DMEM با نسبت ۱/۱ که با ۱۰ درصد از سرم جنین گاوی، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین G و 100 µg/ml استرپتومایسن غنی شده بود رشد داده شد. ترانسفکشن با روش لیپوفکشن در پلیت‌های شش خانه‌ای صورت گرفت. برای این منظور سلول‌های CHO حدود ۲۴ ساعت قبل از واکنش ترانسفکشن در تراکم ۱۳۰/۰۰۰ – ۱۱۰/۰۰۰ سلول به ازای هر خانه کشت داده شدند. برای واکنش ترانسفکشن به روش لیپوفکشن ۳µl فیوجین-۶ با ۹۷µl محیط کشت پایه (فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد. به مخلوط فوق ۲µg پلاسمید نوترکیب اضافه و پس از مخلوط نمودن به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در دمای اطاق قرار داده شد. مخلوط نهایی سپس مستقیماً به سلول‌ها در ۲ ml محیط کشت پایه اضافه گردید. واکنش ترانسفکشن برای مدت حداقل ۶ ساعت ادامه یافت. سپس محیط کشت پایه جمع‌آوری و محیط کشت کامل به سلول‌ها اضافه گردید. روز دوم و سوم پس از ترانشفکشن محیط کشت برای بررسی جمع‌آوری و محیط تازه به سلول‌ها اضافه شد.

اندازه‌گیری فعالیت انعقادی فاکتور۹ انسانی:

فعالیت بیولوژیک فاکتور ۹ بیان شده با استفاده از پلاسمای انسانی فاقد فاکتور ۹ و PTT فعال‌شده[3] مطابق با دستورالعمل فراهم شده بوسیله شرکت تولید کننده تعیین گردید. برای تخمین میزان فعالیت فاکتور ۹ انسانی بیان شده از نمودار استانداردی استفاده شد که با استفاده از فعالیت انعقادی ۵ رقت مختلف از پلاسمای سیتراته شده طبیعی انسان (۱/۱۶۰، ۱/۸۰، ۱/۴۰، ۱/۱،۱۰/۲۰) روی کاغذ تمام لگاریتمی بر علیه زمان انعقاد ترسیم شده بود. برای انجام تست انعقادی ۱۰۰µl از هر نمونه با ۱۰۰ µl از پلاسمای فاقد فاکتور ۹ و ۱۰۰ µl از PTT فعال‌شده مخلوط و دقیقاً ۳ دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰۰ µl کلسیم کلراید ۲۵ mM از قبل گرم شده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آن اضافه و زمان انعقاد اندازه‌گیری شد و فعالیت انعقادی هر نمونه بر اساس نمودار استاندارد تعیین گردید.

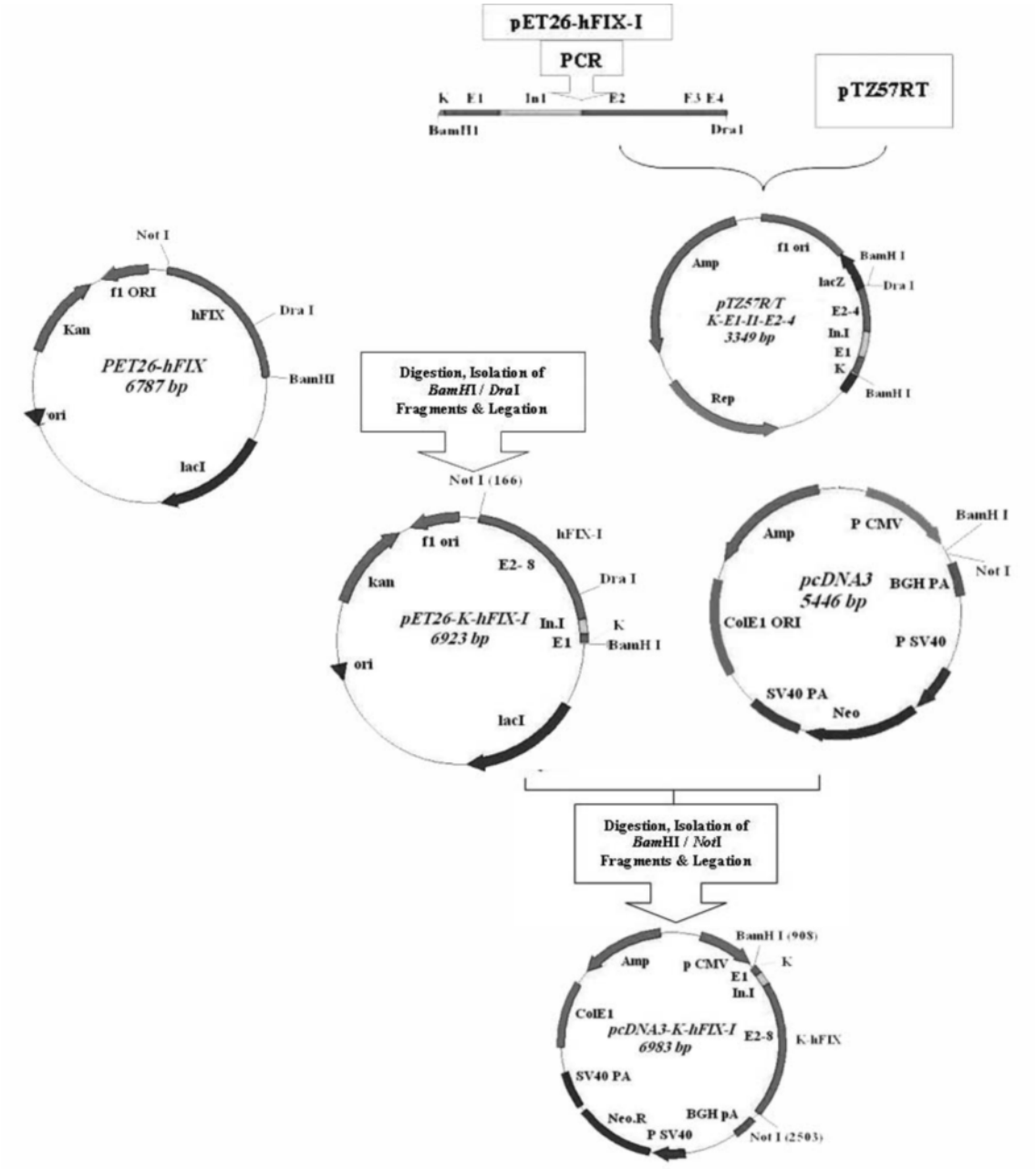
یافته‌ها

یک ساخت سازه‌های نوترکیب:

ساخت سازهٔ نوترکیب pcDNA3-K-hFIX-I، با هدف بالا بردن بیان فاکتور ۹ در ردهٔ سلولی CHO در ۴ مرحله صورت پذیرفت که به صورت شماتیک در شکل ۱ نمایش داده شده است.

[3] Activated Partial Thromboplastine

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

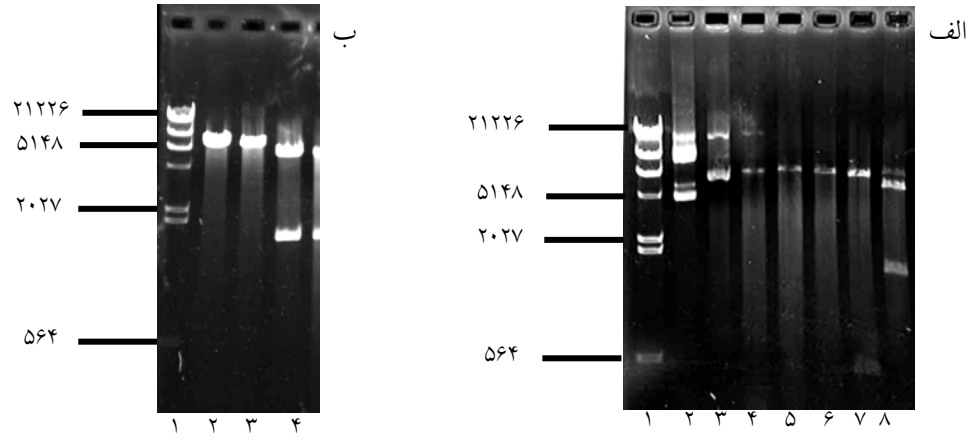


شکل۱: مراحل شماتیک ساخت سازه های نوترکیب حدواسط و بیانی

در مرحله اول یک قطعه به طول ۳۹۳ جفت باز که حاوی توالی کوزاک، اگزون ۱، اینترون ۱ بتا گلوبین، اگزون‌های ۲ تا ۴ ژن فاکتور (K-E1-I1-E2-4) که مجهز به جایگاه‌های برش آنزیمی BamHI/DraI در دو انتهای خود است با روش PCR و با استفاده از سازهٔ نوترکیب pET26-hFIX-I (۱۱) به عنوان الگو

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

تکثیر گردید. در مرحلهٔ بعد این قطعهٔ در پلاسمید pTZ57R/T همسانه‌سازی شد و سازهٔ نوترکیب pTZ57R/T- K-E1-I1-E2-4 بدست آمد. پیرو هضم سازه‌های نوترکیب pTZ57R/T- K-E1-I1-E2-4 و pET26-hFIX (۱۱) بوسیلهٔ آنزیم‌های BamHI/DraI، قطعهٔ نوترکیب K-E1-I1-E2-4 جایگزین قطعهٔ E1-E2-4 در سازهٔ نوترکیب pET26-hFIX گردید و سازهٔ نوترکیب pET26-K-hFIX-I به دست آمد. صحت ساختار سازهٔ نوترکیب مذکور با استفاده از آنالیز مولکولی تأیید گردید. اندازه ۶۹۲۳ جفت بازی شکل خطی سازهٔ نوترکیب pET26-K-hFIX-I بوسیله هضم جداگانه با آنزیم‌های BamHI ، XhoI و DraI که فقط دارای یک جایگاه برش در سازهٔ نوترکیب فوق هستند تأیید شد (شکل ۲-الف). در نتیجهٔ هضم توامان سازهٔ pET26-K-hFIX-I با آنزیم‌های DraI /BamHI و DraI /BamHI به ترتیب قطعاتی به طول ۴۷۱ ، ۴۵۲ و ۵۳۲۲، ۱۶۰۱ جفت بازی انتظار می‌رود که پس از هضم در ژل مشاهده شدند (شکل ۲-الف).



شکل۲:

شکل ۲: آنالیز مولکولی سازه های نوترکیب. الف: سازهٔ نوترکیب pET26-k-hFIX-Iردیف۱: مارکر Hind III . ردیف ۲ : پلاسمید pET26، ردیف ۳: سازهٔ نوترکیب pET26-K- hFIX-I ، ردیف ۴، ۵ و ۶: شکل های خطی شده pET26-K-hFIX-I به ترتیب با BamHI، NotI وDraI، ردیف۷: هضم توام K-hFIX-I-pET26 با دو آنزیم BamH I و DraI، ردیف ۸: هضم توام pET26-hFIX-I با BamHI و NotI. ب: سازهٔ نوترکیب pcDNA3-K-hFIX-I. ردیف۱: مارکر لامبدا Hind III ردیف۲: هضم سازهٔ نوترکیب pcDNA3-K-hFIX-I با BamHI ردیف۳: هضم سازهٔ نوترکیب pcDNA3-K-hFIX-I با NotI، ردیف ۴: هضم توام pcDNA3-K-hFIX-I با BamHI وNotI.

در مرحله آخر با هضم سازهٔ نوترکیب حدواسط pET26-K-hFIX-I و پلاسمید pcDNA3 با آنزیم‌های BamHI/NotI همسانه‌سازی cDNA نوترکیب ژن فاکتور ۹ که مجهز به توالی کوزک است در پلاسمید pcDNA3 انجام شد و سازهٔ نوترکیب بیانی pcDNA3-K-hFIX-I به دست آمد. صحت ساختار سازهٔ نوترکیب pcDNA3-K-hFIX-I با استفاده از آنالیز مولکولی (شکل ۲- ب) و تعیین توالی تأیید گردید.

ترانسفکشن سلول‌های CHO با سازه‌های نوترکیب:

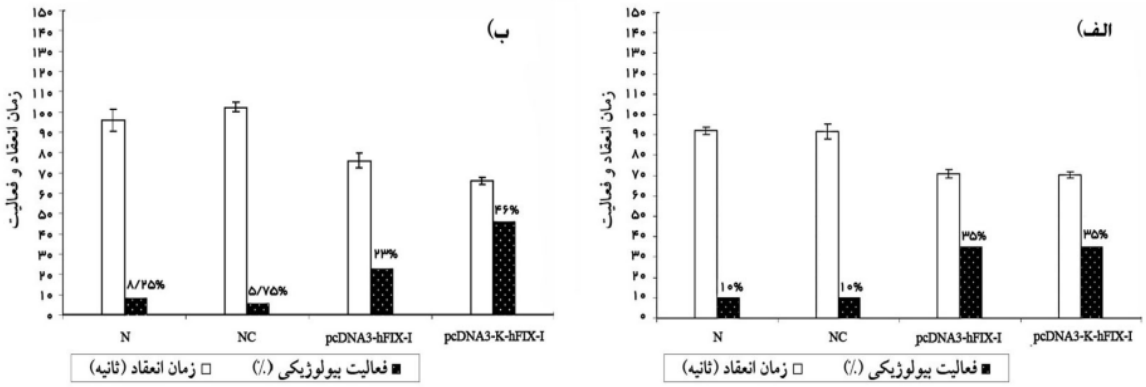
با هدف بررسی اثر توالی کوزاک بر بیان فاکتور ۹ انعقادی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

در سلول‌های CHO، سلول‌های کشت شده پس از ۲۴ ساعت و با تراکم ۵۰ تا ۷۰ درصد سطح ظرف برای ترانسفکشن با سازه‌های نوترکیب pcDNA3-hFIX-I (۱۱) و pcDNA3-K-hFIX-I با استفاده از روش لیپوفکشن مورد استفاده قرار گرفتند. ترانسفکشن پلاسمید پایه (pcDNA3) به عنوان کنترل منفی نیز صورت پذیرفت. با هدف بررسی بیان و تأثیر توالی کوزاک بر آن، محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده در روزهای دوم و سوم پس از واکنش ترانسفکشن جمع‌آوری شد. با توجه به اینکه سازه‌های نوترکیب ساخته شده واجد ژن مقاومت به جنتیسین هستند، سلول‌ها تحت محیط انتخابی با غلظت ۴۰۰ µg/ml از جنتسین قرار داده شدند تا به جداسازی و تکثیر سلول‌های واجد پلاسمید منجر گردد. نتایج موید مرگ سلول‌های ترانسفکت نشده چند روز پس از تیمار با جنتیسین بود. درحالی‌که در ظروف واجد سلول‌های ترانسفکت شده سلول‌هایی باقی‌مانده که این سلول‌ها ۴ تا ۵ هفته بعد، بیش از چندین کلنی از سلول‌های نوترکیب را تشکیل دادند.

بررسی بیان فاکتور۹ انسانی:

محیط‌های کشت جمع‌آوری شده از سلول‌های ترانسفکت شده در روزهای دوم و سوم پس از واکنش ترانسفکشن جهت بیان احتمالی فاکتور ۹ با استفاده از تست انعقادی یک مرحله‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. زمان انعقاد نمونه‌های متفاوت ترانسفکشن با نمونه‌های ترانسفکت شده با pcDNA3-hFIX-I به عنوان کنترل مثبت، pCDNA3 و سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی مقایسه شد که نشانگر کاهش معنی‌دار زمان انعقاد در مورد نمونه‌های ترانسفکت شده با پلاسمیدهای بیان کننده فاکتور IX در مقایسه با کنترل منفی است (شکل ۳).



شکل۳: بررسی فعالیت انعقادی محیط کشت بدست آمده از سلول‌های ترانسفکت شده با سازهٔ نوترکیب pcDNA3-K-hFIX-I در مقایسه با کنترل‌ها. نمودار الف: ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن. نمودار ب: ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن. محیط کشت از سلول‌های ترانسفکت نشده با N ومحیط کشت از سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3 با NC نشان داده شده‌اند.

این فعالیت انعقادی، ترشح فاکتور ۹ نوترکیب را توسط سلول‌های ترانسفکت شده به محیط کشت را نشان می‌دهد. کاهش زمان انعقاد محیط سلول‌های ترانسفکت شده با سازهٔ واجد توالی کوزاک در روز سوم در مقایسه با محیط سلول‌های ترانسفکت شده با کنترل مثبت تأثیر مثبت حضور توالی کوزاک در افزایش بیان فاکتور ۹ را

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

آشکار نمود. زمان انعقاد و فعالیت انعقادی محیط کشت بدست آمده از هر واکنش ترانسفکشن سازه‌های نوترکیب در مقایسه با هم و کنترل‌ها در شکل ۳ ارائه شده است. میزان فاکتور IX دریک میلی‌لیتر خون طبیعی انسان معادل ۵۰۰۰ نانوگرم یعنی معادل ۱۰۰ درصد فعالیت بیولوژیک (۵۰ نانوگرم به ازای ۱ درصد فعالیت بیولوژیک) در نظر گرفته می‌شود (۲۸). مقایسه میان وجود توالی کوزاک و عدم وجود آن در شکل ۳ ب نشان می‌دهد که وجود توالی مذکور سطح بیان فاکتور IX را از ۲۳ درصد به ۴۶ درصد (از ۱۱۵۰ نانوگرم به ۲۳۰۰ نانوگرم) در طی ۷۲ ساعت افزایش داده است.

بحث

هدف اصلی این تحقیق بررسی تأثیر توالی کوزاک در بیان ژن فاکتور ۹ انعقادی انسان بوده است. افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب نیازمند استفاده از سازه‌های بیانی مجهز به عناصر تنظیمی با نقش افزاینده است (۳). عوامل دخیل در تنظیم بیان ژن عمدتاً در نواحی غیر کدگذار ژنی قرار گرفته‌اند (۶-۴). امروزه مشخص شده است که ویژگی‌های ساختاری مولکول‌های mRNA یوکاریوت-های پر سلولی، تنظیم پس از رونویسی در سطح ترجمه را بر عهده دارند (۱۴، ۱۶، ۱۸ و ۱۹). ساختار اولیه مولکول‌های mRNA و یا به عبارتی توالی‌های اطراف کدون شروع (AUG) از ویژگی‌های ساختاری مولکول-های mRNA است که تنظیم ترجمه را برعهده دارند (۱۷-۱۵). توالی کوزاک یکی از ویژگی‌های ساختاری اولیه مولکول‌های mRNA است که در مجاورت کدون شروع و در سمت ´۵ آن در اکثر یوکاریوت‌های پر سلولی قرار گرفته است و در تنظیم شروع ترجمه مشارکت دارد (۱۶ و ۲۳). مکانیزم عمل این توالی بالا بردن صحت کدون انتخابی به عنوان کدون شروع ترجمه است (۲۴).

وجود توالی کوزاک قبل از کدون شروع باعث توقف کوتاه مدت زیر واحد ۴۰s ریبوزوم در مجاورت کدون شروع می‌شود، لذا صحت شناسائی کدون شروع افزایش یافته و کارایی ترجمه بالا می‌رود (۲۵). این توالی بصورت موتیف GCC(A/G)CC قبل از کدون شروع در اکثر مولکول‌های mRNA یوکاریوت‌های عالی قرار می‌گیرد، هر چند می‌تواند واجد توالی‌های دیگری نیز باشد (۱۶، ۲۳ و ۲۹). جهش‌های نقطه‌ای و جایگزینی که در آزمایش‌های مختلفی ارائه شده است اهمیت حفظ توالی مذکور در بیان پروتئین را نشان می‌دهد (۱۸ و ۳۲-۳۰). این آزمایش‌ها بیان می‌کند که تغییر توالی کوزاک بیان پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تحقیقات نشان می‌دهد که توالی کوزاک به صورت موتیف GCC(A/G)CC (توالی کوزاک پایه) در محدودی از مولکول‌های mRNA سلول‌های یوکاریوتی به طور کامل حفظ شده است (۱۳). در این توالی جایگاه ۳- نسبت به کدون شروع (GCC(A/G)CCAUG) نقش کلیدی داشته است. لذا این جایگاه شدیداً حفظ شده است به طوری‌که ۹۷ درصد مولکول‌های mRNA در یوکاریوت‌های عالی واجد باز آلی‌پورینی به ویژه آدنین (A) در این جایگاه هستند (۱۵). با توجه به مطالب مذکور و بسیاری از آزمایش‌های دیگر توالی کوزاک قابلیت افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب را دارد. لذا از این توالی می‌توان به عنوان ابزاری در جهت بالا بردن بیان پروتئین استفاده کرد (۳۳). بررسی‌ها نشان می‌دهد که در مجاور کدون شروع ژن فاکتور ۹ در حالت طبیعی توالی حفاظت شده که بسیار مشابه توالی کوزاک پایه است قرار دارد (۳۴). لذا از توالی پایه کوزاک می‌توان جهت بالا بردن بیان cDNA ژن فاکتور ۹ استفاده کرد. لازم به ذکر است که استفاده از چنین توالی به عنوان عاملی در جهت بالا بردن بیان cDNA ژن فاکتور ۹

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

انسانی گزارش نشده است. تأثیر این توالی در بیان ژن-هایی نظیر face که عامل کدگذار زیر واحد کوچک از تاژک باکتری اشریشیاکلی است گزارش شده است (۲۶). در آن تحقیقات نشان داده شد که حتی بیان ژن‌های پروکاریوتی در صورت استفاده از پروموترهای یوکاریوتی درحضور توالی کوزاک افزایش می‌یابد. بنابراین توالی کوزاک می‌تواند ابزاری کارآمد در جهت بالا بردن بیان انواع مختلف پروتئین‌های نوترکیب در سیستم‌های بیانی یوکاریوتی باشد. در این پژوهش ما بیان فاکتور ۹ انعقادی را تحت کنترل پروموتر CMV به طور مجزا و در حضور توالی کوزاک در ردهٔ سلولی CHO بررسی کردیم. با توجه به آن‌که در اکثر مولکول‌های mRNA سلول‌های یوکاریوتی جایگاه ۳- نسبت به کدون شروع باز آلی آدنین است ما از موتیف GCCACC که واجد این باز آلی در جایگاه ۳- است استفاده کردیم . به منظور بررسی اثر توالی کوزاک بر بیان فاکتور ۹ انعقادی در سلول‌های CHO محیط کشت جمع‌آوری شده در روزهای دوم و سوم پس از واکنش ترانسفکشن جهت بیان احتمالی فاکتور ۹ با استفاده از تست انعقادی یک مرحله‌ای مورد بررسی قرار گرفت. زمان‌ها و فعالیت‌های انعقادی بدست آمده از محیط‌های کشت جمع‌آوری شده از سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های نوترکیب فاقد توالی کوزاک و واجد این توالی به ترتیب از ۷۳/۳۳ تا ۷۶/۳۳ ثانیه معادل ۳۵ تا ۲۳ درصد و ۶۹ تا ۶۶ ثانیه معادل ۳۵ تا ۴۶ درصد فعالیت پلاسمای نرمال انسانی متغیر بودند. تفاوت زمان انعقاد و فعالیت انعقادی فاکتور ۹ با استفاده از محیط‌های جمع‌آوری شده از سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های نوترکیب نشان دهندهٔ تفاوت در بیان فاکتور ۹ درحضور وعدم حضور توالی کوزاک است. این تفاوت کارایی مثبت توالی کوزاک در افزایش بیان فاکتور ۹ را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از تحقیقات ما توانایی توالی کوزاک در افزایش تولید و ترشح فاکتور ۹ فعال به محیط کشت را تأیید می‌کند. از طرف دیگر این نتایج نشان می‌دهند که توالی کوزاک می‌تواند عاملی مناسب جهت بالا بردن بیان سایر ژن‌های انسانی باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از آقای دکتر ناصر امیری‌زاده جهت در اختیار گذاشتن پلاسمای طبیعی انسان صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

References:

1.Garlick JA, Fenjves ES. Keratinocyte gene transfer and gene therapy. Crit Rev Oral Biol Med 1996; 7:204-21.
2. White SJ, Page SM, Margaritis P, et al. Long-term expression of human clotting factor IX from retrovirally transduced primary human keratinocytes in vivo. Hum Gene Therapy 1998; 91187-95.
3. Makrides SC. Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. Protein Expr Purif 1999; 17:183-202.
4. Fong YW, Zhou Q. Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. Nature 2001; 414: 929-33.
5. Ismail SI, Kingsman SM, Kingsman, A J, et al. Split-Intron Retroviral Vectors: Enhanced Expression with Improved Safety. J Virol 2000; 74:2365-71.
6. Rohrer J, Conley ME. Transcriptional Regulatory Elements within the first intron of bruton's tyrosine kinase. Blood 1998; 91: 214-21.
7. Hirosawa S, Fahner J B, Salier JP, et al. Structural and functional basis of the developmental regulation of human coagulation factor IX gene: factor IX Leyden. Develop Biol 1990; 87: 4421–5.
8. Larizza A, Makalowski W, Pesole G, et al. Evolutionary dynamics of mammalian mRNA untranslated regions by comparative analysis of orthologous human, artiodactyl and rodent gene pairs. Comput Chem 2002; 26:479-90.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

9. Pesole G, Mignone F, Gissi C, et al. Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. Gene 2001; 276:73-81.
10. Spicher A, Guicherit OM, Duret L, etal. Highly conserved RNA sequences that are sensors of environmental stress. Mol Cell Biol 1998; 18:7371-73.
۱۱. حداد مشهد ریزه ع ا ،زمردی پور ع، حسینی س ج و همکاران. تاثیر اینترون ۱ ژن بتا گلوبین انسانی بر روی بیان موقت فاکتور ۹ انعقادی فعال انسان در رده ای از سلول های پستانداران. مجله خون،دوره ۵ ، شماره۴ ، ص ۲۳- ۲۰۹
۱۲. حسینی س ج، زمردی پور ع، جلال ر و همکاران. طراحی و ساخت وکتور بیانی اختصاصی کراتینوسیت های اپیدرم و بررسی بیان فاکتور IX انسانی به عنوان مدل. مجله خون، دوره ۳ ، شماره۱، ص ۲۷-۱۷.
13. Kozak M. An Analysis of Vertebrate mRNA Sequences: Intimations of Translational Control. J Cell Biol 1991; 115: 887-903.
14. Shatkin AJ. Capping of eucaryotic mRNAs. Cell 1976; 9 :645-53.
15. Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes . Cell 1986; 44 :283-92.
16. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. J Mol Biol 1987; 196: 947-50.
17. Kozak M. Context effects and (inefficient) initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. Mol Cell Biol 1989; 9 :5073-80.
18 . Kozak M. Translation of insulin-related polypeptides from messenger RNAs with tandemly reiterated copies of the ribosome binding site. Cell 1983; 34 :971-8.
19. Kozak M. A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes . Gene Expression. 1991; 1 :111-5.
20. Kozak M. Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes in vitro. Gene Expression 1991; 1: 117-25.
21. Kozak M. Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 2850-4.
22. Kozak M. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87 :8301-5.
23. Kozak M. Regulation of protein synthesis in virusinfected animal cells. Adv Virus Res 1986; 31:229-92.
24. Kozak M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position 4 but is not generally affected by the nucleotides in positions 5 and 6. EMBO J 1997; 16:2482-92.
25. Harkins S, Cornell CT, Whitton JL. Analysis of Translational Initiation in Coxsackievirus B3 Suggests an Alternative Explanation for the High Frequency of R+4 in the Eukaryotic Consensus Motif. J Virol 2005; 79: 987-96.
26. Michelon A , Michelon M, Simionatto S, et al. Effect of the kozak sequence on seroconversion of mice immunized with a DNA vaccine agenst swine colibacilosis. Braz J Microbiol 2003; 34: 85-7.
27. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. USA: Cold spring harbor laboratory press, 2001.
28-Miao CH, Ohashi K, Patijn GA, et al. Inclusion of the hepatic locus control region , an intron and untrranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro. Molecular Therapy 2000; 1:522-32.
29. Caveneer, Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in Drosophila and vertebrates. Nucleic Acids Res 1987, 15: 1353-61.
30.Johansen H, Schumperli D, Rosenberg M. Affecting gene expression by altering the length and sequence of the 5' leader. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:7698-702.
31. Kozak M. Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin invivo. Nature 1984; 308:241-6.
32. Kozak M. Selection of initiation sites by eukaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. Nucleic Acids Res 1984; 12:3873-93.
33. Christopher R, Erwin M A, Helmrath C E, et al. Intestinal overexpression of EGF in transgenic mice enhances adaptation after small bowel resection. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 1999; 277: 440-533
34. Pang CP, Crossley M, Kent G, et al. Comparative sequence analysis of mammalian factor IX promoters. Nucleic Acids Research 1990; 18:6722-31.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]