



## بررسی بیان مینی ژن‌های فاکتور ۹ انسانی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

آزاده سادات آزادبخش<sup>۱\*</sup>، محمدرضا سام<sup>۲\*</sup>، فرح فرخی<sup>۳</sup>، علیرضا زمردی‌پور<sup>۴</sup>،  
علی‌اکبر حداد مشهد ریزه<sup>۵</sup>، آرام مکاری‌زاده<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست فناوری سلولی و مولکولی، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه ارومیه

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

<sup>۳</sup> گروه ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

<sup>۴</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>۵</sup> گروه ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

(دریافت مقاله: ۹۱/۹/۳۰ - پذیرش مقاله: ۹۱/۱۱/۱۶)

### چکیده

زمینه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی هدف مناسبی جهت سلول درمانی و ژن درمانی بیماران هموفیلی B محسوب می‌شوند. این سلول‌ها دارای ویژگی‌های بینظیر از جمله تمایز به طیف وسیعی از سلول‌های مختلف و اینمی‌زایی اندک در شرایط پیوند می‌باشند که آن‌ها را برای سلول درمانی و ژن درمانی مناسب کرده است. بیان اندک ترانس ژن از مشکلات ژن درمانی است. با شناسایی توالی‌های تنظیمی و استفاده از آن‌ها در موقعیت‌های مناسب در ناقلين می‌توان در جهت بهبود بیان ژن با هدف ژن درمانی اقدام نمود. در این بررسی، ۴ ناقل پلاسمیدی فاکتور ۹ فاقد و واحد ایترون‌های ژن بتاگلوبین به درون سلول‌های مزانشیمی ترانسفکت گردیدند. هدف این پژوهش بررسی توانایی این سلول‌ها در بیان فاکتور ۹ بود.

مواد و روش‌ها: پس از جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از استخوان تیبیا و فمور موش رت، فنوتیپ این سلول‌ها با روش فلورسایتومتری تعیین شد. ناقلين پلاسمیدی فاکتور ۹ با استفاده از عامل ترانسفکشن به درون سلول‌های مزانشیمی وارد شدند. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، توانایی سلول‌های بنیادی در بیان مینی ژن‌های مختلف فاکتور ۹ از طریق انجام آزمون ساندویچ الایزا بر روی محیط کشت و آزمون RT-PCR ارزیابی شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۸ استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) انجام شد.

یافته‌ها: بالاترین سطح بیان فاکتور ۹ از سازه ژنی بدون ایترون و سازه ژنی دارای ایترون ۱ ژن بتاگلوبین به دست آمد. بالاترین میزان فعالیت زیستی از فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت از سازه ژنی دارای ایترون ۱ و ۲ بتاگلوبین به دست آمد.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانائی بیان فاکتور ۹ و اسپلایسینگ ایترون ۱ ژن بتاگلوبین را نشان دادند. توالی‌های ایترونی بتاگلوبین سطح بیان فاکتور ۹ را کاهش دادند که این کاهش بیان را می‌توان با احتمال به اسپلایسینگ نادرست ایترون‌ها نسبت داد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، هموفیلی B، فاکتور ۹، ناقل پلاسمیدی، ایترون‌های ژن بتاگلوبین

\*ارومیه، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده زیست فناوری، گروه زیست فناوری سلولی و مولکولی

آنـتـیـبـادـیـهـایـ مـهـارـکـنـنـدـهـ درـ پـلاـسـمـایـ خـونـ بـیـمـارـانـ رـاـ برـطـرفـ نـمـایـدـ.ـ بـنـابـرـایـ سـلـولـهـایـ بـنـیـادـیـ مـزاـنـشـیـمـیـ هـدـفـ بـسـیـارـ منـاسـبـیـ جـهـتـ سـلـولـهـایـ درـمـانـیـ بـیـمـارـیـهـایـ ژـنـتـیـکـیـ مـیـ باـشـنـدـ.ـ اـزـ جـمـلـهـ بـیـمـارـیـهـایـ ژـنـتـیـکـیـ کـهـ سـلـولـهـایـ درـمـانـیـ وـ ژـنـ درـمـانـیـ آـنـ مـوـرـدـ تـوـجـهـ دـانـشـمـدـانـ قـرـارـ گـرـفـتـهـ استـ،ـ بـیـمـارـیـ هـمـوـفـیـلـیـ نوعـ Bـ مـیـ باـشـدـ.ـ اـيـنـ بـیـمـارـیـ کـهـ درـ اـثـرـ نـبـودـ وـ یـاـ نـقـصـ درـ عـمـلـکـرـدـ پـرـوـتـئـینـ فـاـكـتـورـ ۹ـ انـعـقـادـیـ اـيـجادـ مـیـ گـرـددـ (۱۱)ـ يـکـیـ اـزـ رـايـجـ تـرـينـ بـیـمـارـیـهـایـ ژـنـتـیـکـیـ درـ مـسـیرـ انـعـقـادـ خـونـ مـیـ باـشـدـ کـهـ بـهـ صـورـتـ مـغـلـوبـ وـ اـبـسـتـهـ بـهـ Xـ بـهـ اـرـثـ مـیـ رـسـدـ (۱۲)ـ.ـ زـنـدـگـیـ اـيـنـ بـیـمـارـانـ درـ اـثـرـ خـونـرـیـزـیـهـایـ مـکـرـرـ دـائـمـاـ تـهـدـیدـ مـیـ شـوـدـ وـ شـایـعـ تـرـینـ عـلـتـ مـرـگـ درـ آـنـهـاـ،ـ خـونـرـیـزـیـهـایـ مـغـزـیـ استـ.ـ درـ ۳ـ دـهـ گـذـشـتـهـ اـزـ پـلاـسـمـایـ تـازـهـ مـنـجـمـدـ شـدـهـ وـ كـنـسـانـتـرـهـایـ فـاـكـتـورـ ۹ـ جـهـتـ درـمـانـ وـ جـلـوـگـیرـیـ اـزـ عـودـ خـونـرـیـزـیـهـاـ درـ اـيـنـ بـیـمـارـانـ اـسـتـفـادـهـ شـدـهـ استـ (۱۳)ـ.

باـ اـيـنـ وـجـودـ،ـ هـزـينـهـ بـالـايـ تـولـيدـ فـاـكـتـورـ ۹ـ نـوـترـكـيبـ،ـ تـشـكـيلـ آـنـتـیـبـادـیـهـایـ مـهـارـکـنـنـدـهـ،ـ واـكـشـهـایـ آلـرـثـیـکـ وـ تـرـومـبـوزـ درـ بـیـمـارـانـ،ـ تـوـجـهـ بـهـ سـایـرـ روـشـهـایـ درـمـانـیـ اـزـ جـمـلـهـ سـلـولـهـایـ درـمـانـیـ رـاـ باـعـثـ گـرـدـیدـ (۱۴)ـ.ـ درـ اـيـنـ پـزـوهـشـ،ـ باـ هـدـفـ بـرـرسـیـ توـانـاـبـیـ سـلـولـهـایـ مـزاـنـشـیـمـیـ درـ بـیـانـ فـاـكـتـورـ ۹ـ اـنـسـانـیـ،ـ ۴ـ نـاقـلـ پـلاـسـمـیدـیـ فـاـكـتـورـ ۹ـ،ـ کـهـ بـیـشـتـرـ درـ مـطـالـعـاتـ قـبـلـیـ سـاخـتـهـ شـدـهـ بـودـندـ (۱۵ـ۱۷ـ)ـ بـهـ سـلـولـهـایـ بـنـیـادـیـ مـزاـنـشـیـمـیـ مـغـزـ استـخـوانـ موـشـ رـتـ مـتـقـلـ شـدـنـ وـ بـیـانـ فـاـكـتـورـ ۹ـ درـ سـطـحـ mRNAـ وـ پـرـوـتـئـینـ اـزـ سـازـهـهـایـ ژـنـیـ درـ سـلـولـهـایـ نـوـترـكـيبـ مـوـرـدـ بـرـرسـیـ قـرـارـگـرفـتـ.

## مواد و روش‌ها

سوـشـ باـكـترـىـ،ـ پـلاـسـمـیدـهـایـ بـیـانـیـ سـاخـتـهـ شـدـهـ وـ پـرـایـمـرـهـاـ سـوـشـ DH5 $\alpha$ ـ باـكـترـىـ اـشـرـشـیـاـ کـلـیـ بـرـایـ اـنـجـامـ عـملـ

## مقدمه

سلـولـهـایـ بـنـیـادـیـ مـزاـنـشـیـمـیـ ياـ استـرـوـمـایـ مـغـزـ استـخـوانـ کـهـ بـخـشـیـ اـزـ جـمـعـیـتـ سـلـولـیـ مـغـزـ استـخـوانـ رـاـ تـشـكـیـلـ مـیـ دـهـنـدـ درـ بـقاءـ وـ تـماـیـزـ سـلـولـهـایـ بـنـیـادـیـ هـمـاـتـوـپـوـبـیـتـیـکـ نقـشـ مـهـمـیـ بـرـ عـهـدـهـ دـارـنـدـ (۱)ـ.

اـيـنـ سـلـولـهـایـ جـمـعـیـتـ نـاـهـمـگـنـیـ رـاـ تـشـكـیـلـ مـیـ دـهـنـدـ کـهـ قـدرـتـ تـماـیـزـ بـهـ اـنوـاعـ مـخـتـلـفـیـ اـزـ رـدـهـهـایـ سـلـولـیـ سـوـمـاتـیـکـ اـزـ جـمـلـهـ اـسـتـئـوـسـیـتـهـاـ،ـ کـنـدـرـوـسـیـتـهـاـ،ـ آـدـیـپـوـسـیـتـهـاـ،ـ سـلـولـهـایـ سـازـنـدـهـ تـانـدـونـ وـ سـلـولـهـایـ مـاهـیـچـهـایـ رـاـ دـارـنـدـ (۲ـ وـ ۳ـ).

سلـولـهـایـ اـشـارـهـ شـدـهـ اـزـ باـفـتـهـایـ مـخـتـلـفـیـ اـزـ جـمـلـهـ مـغـزـ استـخـوانـ،ـ کـبدـ،ـ رـیـهـ،ـ مـغـزـ،ـ خـونـ جـنـینـیـ،ـ بـنـدـنـافـ،ـ کـلـیـهـ،ـ باـفـتـ چـرـبـیـ،ـ مـایـعـ آـمـنـیـوـنـ،ـ رـیـهـ جـنـینـیـ وـ فـوـلـیـکـولـهـایـ موـ قـابـلـ جـدـاـسـازـیـ هـسـتـنـدـ (۴ـ۷ـ).

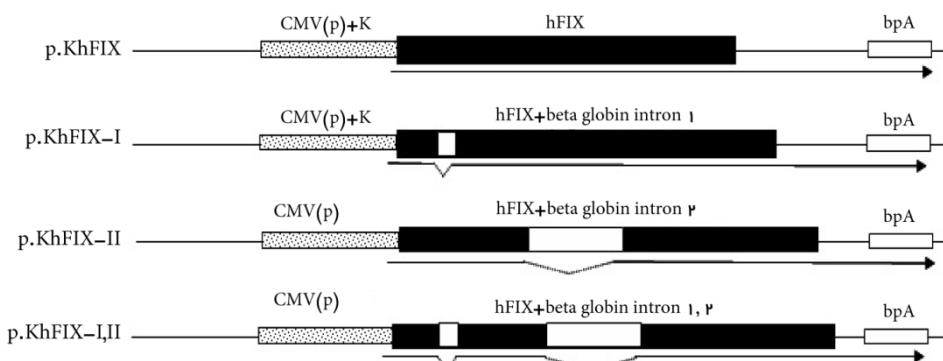
سلـولـهـایـ بـنـیـادـیـ مـزاـنـشـیـمـیـ دـارـایـ مـجمـوعـهـایـ اـزـ وـیـژـگـیـهـایـ بـیـ هـمـتـایـ زـیـسـتـیـ هـسـتـنـدـ کـهـ بـهـ هـمـینـ دـلـیـلـ کـارـبـرـدـهـایـ درـمـانـیـ گـوـنـاـگـونـیـ یـافتـهـانـدـ.ـ اـيـنـ وـیـژـگـیـهـاـ شـاملـ:ـ آـسـانـیـ جـداـ کـرـدنـ،ـ تـوـانـاـبـیـ درـ تـماـیـزـ بـهـ اـنوـاعـ سـلـولـهـایـ مـخـتـلـفـیـ اـزـ نـوـعـ مـزاـنـشـیـمـیـ وـ غـیرـ مـزاـنـشـیـمـیـ،ـ تـوـانـاـبـیـ تـکـثـیرـ بـالـاـ درـ مـحـیـطـ کـشتـ بـلـوـنـ اـزـ دـستـ دـادـنـ قـدرـتـ تـماـیـزـ،ـ تـوـانـاـبـیـ تـولـیدـ تـرـكـيـبـاتـ مـهـارـکـنـنـدـهـ پـاسـخـ اـيـمـنـیـ درـ شـرـايـطـ پـیـونـدـ وـ تـوـانـاـبـیـ مـهـاجـرـتـ بـهـ باـفـتـهـایـ آـسـیـبـ دـیدـهـ مـیـ باـشـدـ (۸ـ وـ ۹ـ).ـ سـلـولـهـایـ مـزاـنـشـیـمـیـ اـتـولـوـگـ وـ آلـوـژـنـیـکـ درـ مـحـلـ پـیـونـدـ،ـ سـیـسـتـمـ اـيـمـنـیـ مـیـزـبـانـ رـاـ فـعالـ نـمـیـ کـنـنـدـ.ـ بـرـ اـسـاسـ اـيـنـ تـوـانـاـبـیـ،ـ سـلـولـهـایـ مـزاـنـشـیـمـیـ حـامـلـهـایـ اـیدـهـآلـیـ درـ اـنـتـقالـ ژـنـ بـهـ درـوـنـ باـفـتـ مـوـرـدـ نـظرـ جـهـتـ سـلـولـهـایـ درـمـانـیـ بـیـمـارـیـهـایـ ژـنـتـیـکـیـ هـسـتـنـدـ (۱۰ـ).ـ هـمـچـنـینـ نـشـانـ دـادـهـ شـدـهـ اـسـتـ کـهـ بـیـانـ یـکـ تـرـانـسـٹـرـنـ اـزـ سـلـولـهـایـ بـنـیـادـیـ مـزاـنـشـیـمـیـ،ـ تـولـرانـسـ یـاـ تـحـمـلـ اـیـمـونـولـوـژـیـکـ بـهـ تـرـانـسـٹـرـنـ رـاـ بـهـ هـمـراـهـ دـارـدـ کـهـ مـیـ تـوـانـدـ مشـکـلـ اـیـجادـ

می‌باشند. طول مینی ژن‌های فاکتور ۹ در جدول ۱ بیان شده است.

جدول ۱) طول قطعه‌سازه‌های بیانی فاکتور ۹

طول قطعه	سازه پلاسمیدی
۶۸۰۰	pcDNA3-hFIX
۶۸۰۰+۱۵۰	pcDNA3-hFIX-I
۶۸۰۰+۸۵۰	pcDNA3-hFIX-II
۶۸۰۰+۱۵۰+۸۵۰	pcDNA3-hFIX-I-II

ترانسفورماسیون و مراحل مختلف همسانه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. در این بررسی ۴ سازه ژنی، p.hFIX-I-II، p.hFIX-II، p.KhFIX-I، p.KhFIX (شکل ۱) به ترتیب شامل cDNA فاکتور ۹ انسانی، ایترون ۱ ژن بتاگلوبین انسانی بین آگزون‌های ۱ و ۲، cDNA فاکتور ۹، ایترون ۲ ژن بتاگلوبین در موقعیت مشابه خود در cDNA فاکتور ۹ و ایترون ۱ و همراه با هم در موقعیت‌های مشابه خود در cDNA فاکتور ۹



شکل شماتیک ۱) سازه‌های بیانی فاکتور ۹ انسانی که در پلاسمید pcDNA3 کلون گردیده‌اند.

p: سازه ژنی فاکتور ۹ ایترون ۱ بتاگلوبین انسانی، p.KhFIX: سازه ژنی دارای ایترون ۲ بتاگلوبین، K: نوکلوتیدی (توالی ۶ نوکلوتیدی)، bpA: Bovine poly adenylation signal sequence; CMVp: CMV promoter.

### همسانه‌سازی سازه‌های نوترکیب و تخلیص

سازه‌های پلاسمیدی ساخته شده به باکتری اشرشیاکلی متقل و همسانه‌سازی شدند. تخلیص پلاسمیدها با استفاده از دستورالعمل کیت شرکت Roche آلمان انجام شد. غلاظت پلاسمیدهای به دست آمده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر سنجیده شد. پلاسمیدهای مذکور، تا زمان مورد استفاده در فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

### جدازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

در این مطالعه از موش رت نژاد ویستار (Wistar) با سن تقریبی ۶ تا ۸ هفته استفاده شد. استخوان‌های درشت نبی

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

از محیط کشت LB به عنوان محیط کشت باکتری استفاده شد و آمپیسیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در صورت نیاز به محیط کشت اختیاری افزوده شد. کیت‌های تخلیص پلاسمید، RNA و عامل ترانسفکشن X-tremeGENE HP از شرکت Roche آلمان و کیت ساخت cDNA RT-PCR نیز از شرکت Fermentas آلمان خریداری شدند. محیط کشت DMEM از شرکت Gibco آمریکا جهت کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی و مونوکلونال آنتی‌بادی‌ها جهت انجام فلوسایتوometری از شرکت eBioscience و abcam تهیه شدند.

سپس سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه بر روی بخ و در یخچال با PE-CD90 anti FITC anti CD44 و anti CD45 anti CDFITC-۲۹ anti CD45 anti FITC منفی، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های κ-PE IgG2a κ-PE IgG1 κ-FITC آنکوبه شدند و با دستگاه فلوسایتومتری (Partec GmbH, Germany) و نرم‌افزار Flow max آنالیز شدند.

#### ترانسفکشن سلول‌های بنیادی مزانشيمى

ترانسفکشن در پلیت‌های شش خانه‌ای و بر اساس پروتکل شرکت Roche صورت گرفت. برای این منظور حدود ۲۴ ساعت قبل از واکنش ترانسفکشن، سلول‌های مزانشيمى تريپسينه شدند و پس از شمارش در تراکم  $10^5 \times 10^5$  سلول به‌ازاي هر خانه کشت داده شدند.

برای واکنش ترانسفکشن، ۲ ميكروگرم از پلاسميد نوترکيب را با  $100 \mu\text{g}$  ميكروليتر از محيط کشت پايه (فاقد سرم و آنتي‌بيوتيك) مخلوط کرده و به مخلوط فوق ۶ ميكروليتر از محلول ترانسفکشن را اضافه و مجموعه پس از مخلوط شدن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس مخلوط نهايی مستقيماً به صورت قطره‌ای به ۲ ميلی‌لتر محيط کشت سلول‌های مزانشيمى اضافه گردید. واکنش ترانسفکشن برای مدت حداقل ۶ ساعت ادامه یافت. سپس محيط روبي سلول‌ها جمع‌آوري شد و محيط کشت تازه و كامل همراه با ويتامين K به غلظت  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  بر ميلی‌لتر به سلول‌ها اضافه گردید. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، مابع روبي سلول‌ها برای بررسی پروتئين فاكتور ۹ جمع‌آوري گردید.

#### آزمون الایزا

فاكتور ۹ ترشح شده به محيط کشت با استفاده از روش ساندوچي ELISA سنجیده شد.  $100 \mu\text{l}$  ميكروليتر از

و ران پا از بافت‌های نرم اطراف استخوان‌ها با اسکالپل و قیچي جدا شدند. آنگاه استخوان‌ها در محيط کشت DMEM حاوي پنی‌سيلين ۱۰۰ واحد بين‌الملى بر ميلی‌لتر و استريپتومايسين ۱۰۰ ميكروگرم بر ميلی‌لتر در فالكون و روی بخ قرار گرفتند. باقی مراحل استخراج در زير هود استريل انجام شد. ابتدا دوسرا استخوان با قیچي استريل بريده شد و با استفاده از يك سرنگ، محيط کشت DMEM حاوي  $15\%$  سرم گاوی، پنی‌سيلين ۱۰۰ واحد بين‌الملى بر ميلی‌لتر و استريپتومايسين ۱۰۰ ميكروگرم بر ميلی‌لتر به داخل کانال استخوانی با فشار پيشتون هدایت گردید به گونه‌ای که با اين عمل، معز استخوان شستشو شده از سر ديجر استخوان خارج شد. سپس معز استخوان به داخل لوله‌های  $15 \mu\text{l}$  ميلی‌لتری هدایت شد و در  $1200 \times g$  رادييان به مدت ۵ دقیقه سانتريفيوژ گردید. آنگاه محيط روبي تخلیه و رسوب سلولی پس از شمارش با تراكم  $10^5$  سلول در سانتي‌متريمع در فلاسك‌های  $25 \times 25 \times 25 \text{ mm}^3$  در محيط کشت تازه در شرایط کشت سلولی  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتي‌گراد و فشار ۵ درصد  $\text{CO}_2$  کشت داده شد. برای کشت سلول‌های مزانشيمى استحصال شده، تلفيقی از پروتکل مرسوم فردنشتاین و تعويض مداوم محيط کشت استفاده شد (۱۸). کشت اوليه سلول تا زمان پرشدن کف فلاسك ادامه یافت. سپس سلول‌ها توسط آنزيم تريپسين از کف فلاسك کشت جدا شده و در پاساز سوم یا چهارم جهت فلوسایتومتری و انجام ترانسفکشن آماده گردیدند.

#### فلوسایتومتری

تعين درصد خلوص سلول‌های بنیادی مزانشيمى با روش فلوسایتومتری برای بررسی بيان مارکرهای سطحي سلول‌های مزانشيمى انجام شد. پس از تريپسينه کردن سلول‌ها و شستشوی آنها با بافر PBS، تعداد  $2 \times 10^5$  سلول در ميكروليوب ریخته شد.

به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. اتصال پرایمر<sup>۲</sup> در ۵۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. سپس مرحله ساخت رشته مکمل هدف از روی رشته اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. در مرحله آخر جهت تکمیل رشته های تکثیر شده ناکامل واکنش پلیمرازی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت. این چرخه ۳۵ بار تکرار شد. برای کنترل داخلی و نرمالایز کردن واکنش های RT-PCR انجام شده، از تکثیر cDNA زن GAPDH با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی آن استفاده شد.

#### تحلیل داده ها

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS (USA, Il.Chicago,SPSS Inc) ویرایش ۱۸ استفاده شد. مقایسه میانگین داده ها با کمک آزمون Duncan و روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) انجام شد. در همه محاسبات، ارزش عددی P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

#### یافته ها

کشت سلول های بنیادی مزانشیمی و تعیین خلوص آنها سلول های بنیادی مزانشیمی بر اساس خاصیت چسبندگی به فلاسک کشت از دیگر سلول های مغز استخوان جدا شدند (شکل ۲). بعد از پاساز سوم که سلول ها از نظر مرغولوژیکی به صورت یکنواخت درآمده بودند. سلول ها جهت بررسی مارکرهای سطحی CD۹۰، CD۴۴، CD۲۹ و CD۴۵ با روش فلوسایتو متری آماده شدند (شکل ۳).

محیط کشتی که جمع آوری گردیده بود به چاهک های پلیتی که از آنتی بادی پلی کلونال ضد فاکتور<sup>۹</sup> پوشیده شده بود افروده شد. پس از انکوباسیون در دمای اتاق و در محیط بدون نور به مدت یک ساعت، پلیت ۵ بار با محلول شستشو، شسته شد. در مرحله بعدی به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی ثانویه که با آنزیم پراکسیداز نشاندار شده بود افروده گشت. پس از انکوباسیون و شستشو، در نهایت به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول کروموزن تترامتیل بنزیدین (TMB) به عنوان سوبسترا افروده شد و پس از انکوباسیون در دمای اتاق و تاریکی، واکنش توسط اسید سولفوریک ۰/۵ نرمال متوقف شد. جذب نوری چاهک ها توسط دستگاه اسپیکت در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد از طریق رقت های سربالی تهیه شده از پلاسمای طبیعی رسم شد و غلظت فاکتور ۹ در محیط کشت بر اساس منحنی استاندارد محاسبه گردید.

#### واکنش RT-PCR نیمه کمی

در روز دوم پس از ترانسفکشن، RNA تام از سلول های ترانسفکت شده با استفاده از کیت تخلیص RNA شرکت Roche استخراج شد و به عنوان الگو توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس<sup>۱</sup> برای ساختن cDNA مورد استفاده قرار گرفت. از cDNA ساخته شده به عنوان الگو جهت تکثیر قطعه ای از cDNA فاکتور ۹ به طول ۳۲۲ جفت باز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی R-hKozF9-F و hFIXE4-R و واکنش PCR طبق پروفایل ذیل استفاده گردید (جدول ۲).

واسرنشتی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. در ادامه، واسرنشتی در همان دما

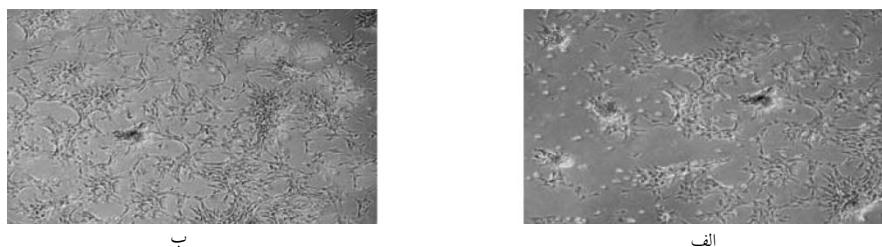
<sup>2</sup>Annealing

<sup>1</sup>M-Mulv

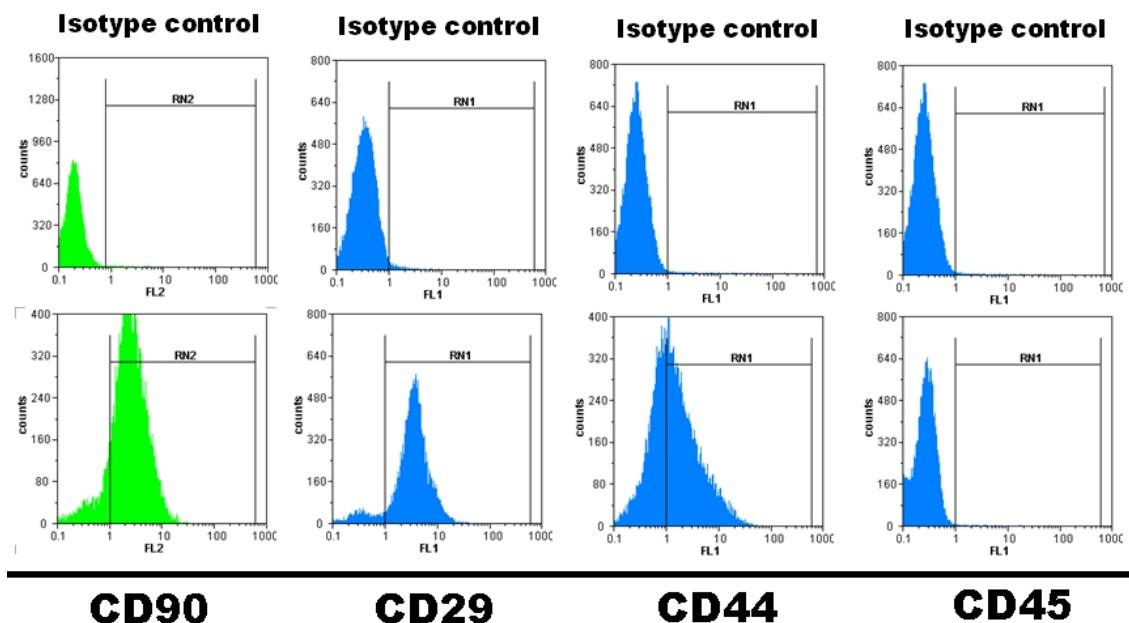
جدول(۲) توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

$T_m$	طول قطمه (bp)	توالی نوکلئوتیدی	نام پرایمر
۵۴C	۲۲۲	۵' GGATCC GCCACCATGCAGCGCGTGAACATGAT 3'	hKozF9-F
		5' CCT TGC AAC TGC CGC CATTAAAC 3'	hFIXE4-R
		5' CAAGGTCAATCCATGACAACTTG 3'	GAPDH-F
۵۴C	۴۹۶	5' GTCCACCACCCCTGTGCTGTAG 3'	GAPDH-R

توالی کوزاک GCCACC قبل از کدون شروع ترجمه در پرایمر hKozF9-F به صورت ایتالیک نشان داده شده است.



شکل (۲) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش رت  
(الف) در روز هفتم (ب) در روز چهاردهم



شکل (۳) پلاٹ فلوسایتوومتری مربوط به بیان CD۹۰، CD۴۵، CD۴۴، CD۲۹ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش رت نژاد ویستار

مارکر CD۹۰ ۸۶٪، CD۴۴ ۸۹٪، CD۲۹ ۵۹٪ درصد برای مارکر مارکر CD۴۵ ۰٪، CD۴۴ ۵۹٪ درصد مثبت و برای مارکر هماتوپویتیک

یافته‌های فلوسایتوومتری نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای مارکر CD۴۴ ۵۹٪ درصد، برای

۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن در جدول ۳ نشان داده است.

جدول ۳ مقایسه میزان بیان فاکتور ۹ از پلاسمیدهای نوترکیب در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده مزانشیمی در ۴۸ ساعت

پس از ترانسفکشن			
P	ارزش عددی	افراش بیان	پلاسمید
		فاکتور ۹	
۰/۰۱	۱/۵۲	p.hFIX-I	p.hFIXvs.
۰/۰۰۱	۲/۵	p.hFIX-II	
۰/۰۰	۲/۳	p.hFIX-I-II	
۰/۰۱	۱/۶	p.hFIX-II	p.hFIX-Ivs.
۰/۰۰۴	۲/۲	p.hFIX-I-II	
۰/۰۳	۱/۳	p.hFIX-I,II	p.hFIX-IIvs.

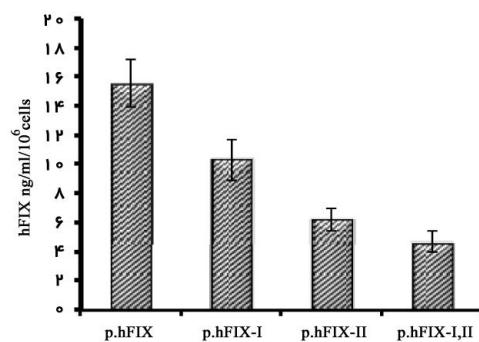
#### بررسی بیان فاکتور ۹ در سطح mRNA

با هدف بررسی نیمه کمی بیان در سطح mRNA و mRNA بررسی اسپلایسینگ ایترون‌های ۱ و ۲ ژن بتاگلوبین از cDNA ژن فاکتور ۹، آزمون RT-PCR انجام شد. با توجه به الگوی الکتروفورزی محصولات RT-PCR به خوبی نشان داده می‌شود که رویداد اسپلایسینگ در ایترون‌های ژن بتاگلوبین در جایگاه معادل خود در cDNA فاکتور ۹ به طور ناقص و نابجا انجام می‌پذیرد. پس از نرمالایز کردن بر مبنای ژن GAPDH باند mRNA صحیح و بالغ ایجاد شده در سازه ژنی بدون ایترون از شدت بیشتری نسبت به سایر سازه‌ها برخوردار بود (شکل ۴).

در صد مثبت بودند.

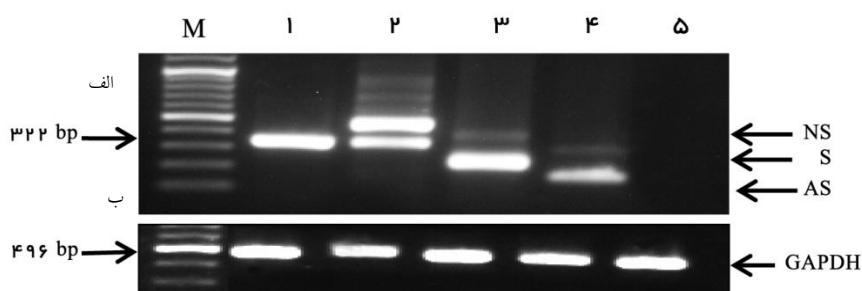
#### سنجهش بیان فاکتور ۹ در سطح پروتئین

بر مبنای یافته‌های به دست آمده، سطح بیان فاکتور ۹ در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با p.KhFIX بیش از سلول‌های ترانسفکت شده با سایر سازه‌های ژنی بود. در روز دوم پس از ترانسفکشن، میزان غلظت فاکتور ۹ بر مبنای  $10^6$  سلول در سازه‌های ژنی p.KhFIX، p.KhFIX-I-II و p.KhFIX-I به ترتیب  $10/4$ ،  $7/2$  و  $4/9$  نانوگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. در سلول‌های کنترل منفی (ترانسفکت نشده) بیان فاکتور ۹ صفر ارزیابی شد (نمودار ۱).



نمودار ۱) میزان بیان فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت سلول‌های بیاندی مزانشیمی در سلول‌های کنترل منفی (ترانسفکت نشده) بیان فاکتور ۹ صفر ارزیابی شد که نشان داده نشده است. مقادیر نشان داده شده میانگین بیان  $\pm$  انحراف معیار، پس از دو بار تکرار آزمایش می‌باشد.

مقایسه میزان بیان فاکتور ۹ از پلاسمیدهای نوترکیب در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده مزانشیمی در



شکل (الف) سلول‌های ترانسفکت شده با (۱) p.hFIX-I,II (۲)p.hFIX-I (۳)p.hFIX-II (۴)p.hFIX-I,II (۵) سلول‌های ترانسفکت نشده

AS: aberrant spliced product .S: spliced product .NS: non- spliced product .M: Marker

شکل (ب) cDNA GAPDH تکثیر شده مربوط به سلول‌های ترانسفکت شده در هر ردیف

ممکن است در ناقلین ویروسی روی دهد را ندارند. به علاوه تهیه این ناقلین در مقیاس بالا، کم هزینه و با کیفیت یکسانی صورت می‌گیرد.<sup>(۳۰)</sup>

در این مطالعه از پلاسمیدهای بیانی فاكتور ۹ که مجهر به تلفیق‌های مختلفی از توالی‌های تنظیمی سیس از جمله پروموتور CMV، توالی کوزاک و ایترنون‌های ۲و ۲۱ ژن بتاگلوبین انسانی بودند استفاده شد و بیان فاكتور ۹ از سلول‌های نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت.

بر مبنای نتایج به دست آمده از آزمون الیزا، سلول‌های بنیادی مزانشيمی توانایی بیان مبنی ژن‌های فاكتور ۹ را نشان دادند. در این مطالعه نشان داده شد که میزان ترشح فاكتور ۹ به محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های ژنی مختلف، متفاوت است که احتمالاً بیانگر نقش توالی‌های مختلف سیس به‌کار رفته در هر وکتور بیانی است که موجب تفاوت در مراحل مختلف تنظیمی بیان یک ژن از جمله رونویسی، پس از رونویسی، ترجمه و ترشح می‌گردد. برخلاف انتظار نتایج قبلی گروه مبنی بر افزایش بیان در اثر استفاده از ایترنون‌های هترولوگ (۱۵-۱۷)، معرفی ایترنون‌های ۲و ۲۱ بتاگلوبین هم به‌طور جداگانه و هم به‌طور همزمان در جایگاه معادل خود در cDNA فاكتور ۹ به‌طور چشمگیری بیان فاكتور ۹ را در مقایسه با سازه ژنی بدون ایترنون در سلول‌های بنیادی مزانشيمی کاهش داد. بر مبنای نتایج به دست آمده از آزمون RT-PCR، توالی‌های رونویسی شده از سازه‌های ژنی دارای ایترنون‌های ژن بتاگلوبین به‌طور مناسبی پردازش نمی‌گردند که می‌توان بیان کاهش یافته فاكتور ۹ را به آن نسبت داد. با در نظر گرفتن این واقعیت که توالی‌ها و ساختارهای اطراف ایترنون و نیز ماهیت ایترنون‌ها جهت کارایی پیرایش ایترنون‌ها مهم می‌باشند، احتمالاً ساختار کایمیریک ایجاد شده با

از آنجا که بیان فاكتور ۹ در سازه ژنی بدون ایترنون بالاتر از سایر سازه‌های ژنی دارای ایترنون بوده در این مرحله با توجه به نیمه کمی بودن آزمون نشان داده mRNA می‌شود که در سازه ژنی بدون ایترنون مقادیر ایترنون حاصل می‌گردد که در نتیجه ترجمه آن‌ها به پروتئین، بیان بالاتری از فاكتور ۹ را در خارج سلول‌ها فراهم می‌نماید.

## بحث

سلول‌های بنیادی مزانشيمی اميدواری‌های بسياری را در سلول درمانی و ژن درمانی بيماري‌های ژنتيکي و اكتسابي ايجاد كرده‌اند. توانايي بيان پايدار ترانسفنون‌های مختلف در اين سلول‌ها و عدم ايجاد پاسخ ايمني در صورت پيوند به ميزبان از مزيت‌های قابل توجه اين سلول‌هاست.<sup>(۱۹)</sup>

تاكونون ترانسفنون‌های مختلفی از جمله فاكتور ۸ انساني (۲۰ و ۲۱)، IL3 (۲۲)، BMP2، IFN  $\beta$ ، IL4، کلاژن نوع ۲۳ و ۲۴، IL7 (۲۵)، فاكتور رشد انساني (۲۶)، اريتروپويتين انساني (۲۷) در سلول‌های بنیادی مزانشيمی بیان شده‌اند. در مطالعات مختلفی بیان فاكتور ۹ انسانی با ناقلین ویروسی در سلول‌های مزانشيمی نشان داده شده است (۲۸ و ۲۹). بيماري ژنتيکي هموفيلي B مدل مناسبی جهت بررسی‌های سلول درمانی و ژن درمانی توسيط سلول‌های بنیادی مزانشيمی محسوب می‌شود. در مطالعه کونونی، از ناقلین پلاسمیدي جهت ترانسفکشن سلول‌های مزانشيمی استفاده گردید که در درون هسته سلول‌های مزانشيمی هدف به صورت اپيزومال قرار می‌گيرند و در مقایسه با ناقلین ویروسی که به صورت تصادفي در ژنوم سلول‌های هدف وارد می‌شوند از ايمني بهتر و بالاتری برخوردارند. اين ناقلین قabilت ايجاد ذرات تكثيری که

بالاترین سطح بیان فاکتور ۹ از سازه ژنی بدون ایتررون و سازه ژنی دارای ایتررون ۱ بتا گلوبین به دست آمد. از سایر سازه‌های ژنی، بیان کمتری حاصل شد که احتمالاً ناشی از اسپلایسینگ نادرست ایتررون‌های به کار رفته در آن‌ها می‌باشد. با این وجود بررسی کارایی سازه‌های ژنی ساخته شده در *in vivo* که اهمیت بسزایی دارد پیشنهاد می‌گردد.

### سپاس و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری و دانشگاه ارومیه انجام شده است. نویسندهای مقاله از سرکار خانم کبری رضازاده به واسطه همکاری مستمر ایشان قدردانی می‌نمایند.

معرفی ایتررون‌های ژن بتاگلوبین شرایط را برای اسپلایسینگ مناسب این توالی‌ها فراهم نمی‌کند.

در همین زمینه محققین نیز نشان داده‌اند که ایتررون‌های هتروЛОگ به مانند ایتررون‌های طبیعی خود ژن، به‌طور مؤثری بریده نمی‌شوند (۳۱). به استناد اطلاعات موجود در مقالات منتشر شده، بررسی اثرات توالی‌های تنظیمی سیس مختلف بر بیان فاکتور ۹ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای اولین بار است که در این مطالعه گزارش می‌گردد. نوع ساخت این سازه‌های ژنی به ما این امکان را می‌دهد که در ادامه پتانسیل بیان فاکتور ۹ از این وکتورها را در مدل حیوان آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار دهیم.

یافته‌های بررسی پیش رو نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی بیان ژن فاکتور ۹ را دارند.

### References:

- Stewart MC, Stewart AA. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011; 27: 243-61.
- Deng ZL, Sharff KA, Tang N, et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci* 2008; 13: 2001-21.
- Luu HH, Song WX, Luo X, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2007; 25: 665-77.
- Almeida-Porada G, Shabrawy D, Porada C, et al. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 1454-62.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211-28.
- Amoh Y, Li L, Campillo R, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 17734-8.
- Ling L, Ni Y, Wang Q, et al. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells derived from human fetal lung to hepatocyte-like cells. *Cell Biol Int* 2008; 32: 1091-8.
- Madeira C, Mendes RD, Ribeiro SC, et al. Nonviral Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells Using Cationic Liposomes for Gene and Cell Therapy. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 735349.
- Porada CD, Almeida-Porada G. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62: 1156-66.
- Baksh D, Song L, Tuan RL. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 301-16.
- Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 2002; 55: 127-44.
- VandenDriessche T, Collen D, Chuah MK. Viral vector-mediated gene therapy for hemophilia. *Curr Gene Ther* 2001; 1: 301-15.
- Saenko EL, Ananyeva NM, Shima M, et al. The future of recombinant coagulation factors. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 922-30.
- Ragni MV. Hemophilia gene transfer: comparison with conventional protein replacement therapy. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 239-47.
- Haddad-Mashadrizeh A, Zomorodipour A, Izadpanah M, et al. A systematic study of the

- function of the human beta-globin introns on the expression of the human coagulation factor IX in cultured Chinese hamster ovary cells. *J Gene Med* 2009; 11:941-50.
- 16.Sam MR, Zomorodipour A, Shokrgozar MA, et al. Enhancement of the human factor IX expression, mediated by an intron derived fragment from the rat aldolase B gene in cultured hepatoma cells. *Biotechnol Lett* 2010; 32:1385-92.
- 17.Mashhadrieh AA, Sam MR, Safari S, et al. Effect of the Kozak sequence on transient expression of human coagulation factor IX (FIX) minigene in mammalian cells. *ISMJ* 2008; 11:98-107.
- 18.Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc* 2009; 4: 103-6.
- 19.Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, et al. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5: 1571-84.
- 20.Chuah MK, Van Damme A, Zwinnen H, et al. Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with Factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human Factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice. *Hum Gene Ther* 2000;11:729-38.
- 21.Chiang GG, Rubin HL, Cherington V, et al. Bone marrow stromal cell-mediated gene therapy for hemophilia A: in vitro expression of human Factor VIII with high biologicalactivity requires the inclusion of the proteolytic site at amino acid 1648. *Hum Gene Ther* 1999; 10:61-76.
- 22.Allay JA, Dennis JE, Haynesworth SE, et al. LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors. *Hum Gene Ther* 1997; 8:1417-27.
- 23.van Damme A, Vanden Diessche T, Collen D, et al. Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2002; 2: 195-209.
- 24.Gheisari Y, Soleimani M, Azadmanesh K, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells: optimization and comparison of five cationic polymer-based gene delivery methods. *Cytotherapy* 2008; 10: 815-23.
- 25.Bolotin E, Smogorzewska M, Smith S, et al. Enhancement of thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7. *Blood* 1996; 88: 1887-94.
- 26.Hurwitz DR, Kirchgesserr M, Merrill W, et al. Systemic delivery of human growth hormone or human Factor IX in dogs by reintroduced genetically modified autologous bone marrow stromal cells. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 137-56.
- 27.Bartholomew A, Patil S, Mackay A. Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin in vivo. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 1527-41.
- 28.Krebsbach PH, Zhang K, Malik AK. Bone marrow stromal cells as a genetic platform for systemic delivery of therapeutic proteins in vivo: human factor IX model. *J Gene Med* 2003; 5:11-7.
- 29.Coutu DL, Cuerquis J, El Ayoubi R, et al. Hierarchical scaffold design for mesenchymal stem cell-based gene therapy of hemophilia B. *Biomaterials* 2011; 32: 295-305.
- 30.Miao CH, Thompson AR, Loeb K, et al. Long-term and therapeutic-level hepatic gene expression of human factor IX after naked plasmid transfer in vivo. *Mol Ther* 2001; 3:947-57.
- 31.Noé V, MacKenzie S, Ciudad CJ. An intron is required for dihydrofolate reductase protein stability. *J Biol Chem* 2003; 278: 38292-300.

***Original Article***

# **Expression of the human coagulation factor IX in the bone marrow mesenchymal stem cells**

**A.S.Azadbakhsh<sup>1,2</sup>, MR. Sam<sup>1,2\*</sup>, F. Farrokhi<sup>2</sup>,**

**AR. Zomorodipour<sup>3</sup>, AK. Haddad Mashahrizeh<sup>4</sup> A. Mokarizadeh<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, IRAN

<sup>2</sup>Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, IRAN

<sup>3</sup>Department of Molecular Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, IRAN

<sup>4</sup>Department of Biology, School of Science, Ferdowsi University of Mashad, Mashad, IRAN

<sup>5</sup>Department of Immunology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, IRAN

(Received 20 Dec, 2012      Accepted 4 Feb, 2013)

***Abstract***

**Background:** Mesenchymal stem cells (MSCs) are appropriate target for gene and cell-based therapy of hemophilia B patients. MSCs possess several unique properties such as capability of differentiating into multiple lineages and lower immunogenicity in transplant procedure that make them attractive candidates for cell and gene therapy. One of the challenges in the gene therapy is the low expression level of transgene. To improve expression, strong regulatory elements in the context of vectors could contribute to improve efficacy of gene therapy strategies. In this study four human factor IX (hFIX)-expressing plasmids equipped with various combination of human β-globin (*hBG*) introns and Kozak sequence were transfected into the MSCs and expression of the hFIX was evaluated in vitro.

**Material and Methods:** MSCs were obtained from tibias and the femora of rats and phenotypic characterization of the MSCs was determined by flow cytometry. Four hFIX-expressing plasmids were introduced into the culture-expanded MSCs using transfection agent. 48 hours after transfection, ability of the MSCs for expression of the hFIX and efficacies of the plasmids were evaluated by performing sandwich ELISA on cultured media as well as semi-quantitative RT-PCR. All analyses were performed with One-way ANOVA using SPSS software.

**Results:** The highest expression level of the hFIX was obtained from intron-less and *hBG* intron-I containing construct. The highest biological activity was obtained from *hBG* intron-I,II containing construct.

**Conclusion:** Successful expression of the hFIX was obtained from recombinant MSCs. MSCs were able to splice heterologous *hBG* intron-I from the hFIX-cDNA. Application of the *hBG* introns reduced the hFIX expression levels, probably due to improper splicing of the *hBG* introns.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, hemophilia B, human factor IX, plasmid, human β-globin introns

\*Address for correspondence: Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, IRAN; E-mail: m.sam@urmia.ac.ir

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>