Original Article

Transfection of Human Hematopoietic Stem Cells by a Gene Targeting Construct Containing the β-Globin Gene

Mojhgan Shaikhpoor, M.Sc.[1], Hossein Khanahmad, Ph.D.[2], Mohamadali Shokrgozar, Ph.D.[3], Masood Soleimani, Ph.D.[4], Bahman Zainali, Ph.D.[1], Esmat Kamali, M.Sc.[5], Seyedeh Soghra Moosavi, M.Sc.[6], Sirous Zeinali, Ph.D.[5]*

1. Biology Department, Faculty of Science, Tehran University, Tehran, Iran
2. B.C.G Department, Pasteur Institute of Iran, Karaj Production Complex, Karaj, Iran
3. Cell Bank Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4. Hematology Department, Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5. Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
6. Faculty of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

**** Corresponding Address: Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran***
Email: zeinali@kawsar.ir

Received: 7/Jun/2009, Accepted: 21/Sep/2009

Abstract

Objective: Replacment of $CD133^+$ cell's β globin gene by using a gene targeting construct containing the β globin gene and essential elements for homologous recombination.
Materials and Methods: pFBGGT was amplified, then digested using the NheI and XhoI restriction enzymes, and finally, a 13.3 kb band (naked DNA) was extracted from the agarose gel. Biological activity of positive and negative selection markers were checked by transfection of COS-7 cells with linear plasmid. Hematopoietic stem cells (HSCs) were separated and transfected with linear plasmids using lipofection followed by positive and negative selection. Polymerase chain reaction (PCR) were done on DNA from the selected cells and the products were sequenced.
Results: The results of biological activity assays showed that selection markers were active. PCRs for hygromycin, neomycin and joining segments were positive but PCRs for TK1 and TK2 genes were negative. Sequencing PCR product joining segment confirmed the formation of homologous recombination.
Conclusion: In this novel strategy gene replacement was achieved and biological activities of its components were observed.

Keywords: Beta Thalassemia, Gene Targeting, Homologous Recombination, Gene Therapy

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 199-206

ترانسفکت کردن سلول‌های بنیادی خون‌ساز انسان به وسیله سازه هدف‌گیری ژنی حاوی ژن بتاگلوبین

مژگان شیخ‌پور .M.Sc[۱]، حسین خان‌احمد .Ph.D[۲]، محمدعلی شکرگزار .Ph.D[۳]، مسعود سلیمانی .Ph.D[۴]، بهمن زینلی .Ph.D[۱]، عصمت کمالی .M.Sc[۵]، سیده صغری موسوی .M.Sc[۶]، سیروس زینلی .Ph.D[۵*]

۱. دانشگاه تهران، پردیس علوم، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
۲. انستیتو پاستور ایران، بخش BCG، مجتمع تولیدی کرج، کرج، ایران
۳. انستیتو پاستور ایران، بخش بانک سلولی، تهران، ایران
۴. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی، تهران، ایران
۵. انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، تهرا، ایران
۶. دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده داروسازی، زنجان، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی
پست الکترونیک: **Email: zeinali@kawsar.ir**

دریافت مقاله: ۸۸/۳/۱۷، پذیرش مقاله: ۸۹/۶/۳۰

چکیده

* **هدف:** جایگزینی ژن بتاگلوبین سلول‌های $CD133^+$ با استفاده از سازه هدف‌گیری ژنی حاوی ژن بتاگلوبین و اجزای مورد نیاز برای نوترکیبی همسان

* **مواد و روش‌ها:** پلاسمید pFBGGT تکثیر و به وسیله آنزیم‌های NheI و XhoI هضم و باند ۱۳/۳ کیلوبازی مورد نظر از روی ژل آگارز استخراج شد. سلول‌های COS-7 جهت بررسی فعالیت بیولوژیک مارکرهای انتخاب مثبت ومنفی، به وسیله پلاسمید خطی شده ترانسفکت شدند. سلول‌های بنیادی خون‌ساز از خون بند ناف جداسازی شده و به وسیله سازه ژنی با روش پلی‌فکشن ترانسفکت شدند ومراحل انتخاب مثبت ومنفی انجام گردید. از سلول‌های باقی مانده در محیط انتخابی DNA استخراج و واکنش زنجیره ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction; PCR) برای تکثیر قطعات هیگرومایسین، نئومایسین، تیمیدین کیناز و قطعه اتصالی گذاشته شد.

* **یافته‌ها:** نتایج آزمایشات، بررسی فعالیت بیولوژیک مارکرهای مثبت و منفی نشان دهنده فعالیت مارکرها بود. قطعات هیگرومایسین، نئومایسین و قطعه اتصالی تکثیر شدند ولی قطعات تیمیدین کیناز ۱ و ۲ تکثیر نشدند. نتیجه تعیین توالی محصول PCR قطعه اتصالی، تایید کننده وقوع نوترکیبی همسان در این سلول‌ها بود.

* **نتیجه‌گیری:** در این تحقیق با استفاده از استراتژی جدید انتخاب مثبت و منفی دو گانه، جایگزینی ژن با استفاده از یک سازه ژنی و در یک مرحله انجام شد.

* **کلیدواژگان:** بتاتالاسمی، هدف‌گیری ژنی، نوترکیبی همسان، ژن درمانی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۲۰۶-۱۹۹

مقدمه

بیماری بتا تالاسمی یکی از شایع‌ترین اختلالات ژنتیکی در دنیا می‌باشد (احتمال وقوع یک در ۶۲۴-۴۰۰ تولد). این بیماری در ایران شیوع چشم‌گیری دارد، به طوری‌که در حال حاضر بیش از پانزده هزار بیمار تالاسمی در کشور موجود است و برنامه کشوری مهار تالاسمی از سال ۱۳۷۶ در حال اجرا است. بتا تالاسمی، یک اختلال تک ژنی با وراثت اتوزومال مغلوب است. این بیماری به دلیل جهش در ناحیه ژنی بتاگلوبین صورت گرفته و در نتیجه سنتز زنجیره بتاگلوبین کاهش یافته و یا متوقف می‌گردد. علایم بیماری تالاسمی بعد از سن دو سالگی به صورت کم خونی شدید، کاهش رشد، زردی، بزرگی کبد و طحال و گسترش حجمی مغز استخوان (چهره تالاسمیک) بروز پیدا می‌کند. تا کنون بیش از ۲۰۰ نوع جهش عامل بتاتالاسمی در ناحیه ژنی بتاگلوبین شناسایی شده‌اند. جهش‌های فوق بر روی نسخه‌برداری، پردازش mRNA و بیان و پایداری زنجیره بتا پس از ترجمه تاثیر می‌گذارند (۱).

از آنجا که این بیماری یک اختلال ژنتیکی است، تا کنون درمان قطعی برای آن گزارش نگردیده است اما برای حفظ بقای این بیماران روش‌های متعددی به کار گرفته می‌شوند. مهم‌ترین آنها عبارتند از:

۱. انتقال خون (Blood Transfusion)، ۲. درمان از طریق جذب آهن خون (Chelation Therapy) (۲)، ۳. القا سنتز هموگلوبین جنینی از طریق تحریک تولید مجدد گاماگلوبین با استفاده از داروهای متعدد اعم از هیدروکسی اوره،مشتقات بوتیرات و...، ۴. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجود در بیماران تالاسمی (۳)، ۵. پیوند مغز استخوان (Bone Marrow Transplanting) همه این روش‌ها، موقتی و پرهزینه می‌باشند. برخلاف اینکه پیوند مغز استخوان در حال حاضر قطعی‌ترین

روش درمانی برای این بیماران محسوب می‌شود ولی به دلیل کمبود اهدا کننده مناسب و دلایل دیگر، قابل اجرا بودن روش پیوند مغز استخوان تنها برای کمتر از ۲۰ تا ۳۰ درصد از بیماران امکان‌پذیر است. در عمل تعداد بسیار اندکی (کمتر از ۱۵ درصد از بیماران) پیوند مغز استخوان شده‌اند (دکتر علی مقدم، مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی). در ضمن در روش پیوند مغز استخوان از غیر به غیر (Heterologous) احتمال عوارضی مانند رد پیوند و واکنش ایمونوژیک سلول‌های پیوند علیه میزبان (Graft Versus Host Disease; GVHD)، زیادتر از روش خود به خود (Outologous) می‌باشد، در نتیجه رفع نقص ژنتیکی از طریق ژن درمانی به گونه‌ای که بین زنجیره‌های آلفا و بتا تعادل برقرار گردد، این امر می‌تواند تنها روش درمانی مؤثر برای این بیماران باشد (۴، ۵).

با توجه به موارد ذکر شده ، جداسازی سلول‌های بنیادی خون‌ساز از شخص بیمار و اصلاح نقایص ژنتیکی این سلول‌ها در خارج از بدن (*ex vivo* Ggene Therapy) و پیوند مجدداین سلول‌ها به شخص بیمار (Autologous HSC Transplantation) روش ایده‌آل و هدف نهایی برای درمان بیماران تالاسمی می‌باشد.

در حال حاضر در اغلب پروژه های ژن درمانی برای ارایه ژن به سلول از وکتورهای ویروسی استفاده می‌شود. کارایی این وگتورها برای ارایه ژن به سلول بسیار بالاست (۶) ولی ظرفیت پذیرش ژن آنها کم بوده و در مواردی که نیاز به تجویز مجدد وکتور باشد احتمال برانگیخته شدن پاسخ ایمنی علیه پروتئین‌های ویروس وجود دارد. در اغلب موارد بین وکتورها جایگزین شدن ژن در ژنوم به صورت تصادفی صورت می‌گیرد و این مساله می‌تواند باعث خاموش یا فعال شدن یک‌سری ژن‌ها و ایجاد مشکلاتی مانند بدخیمی شود (۷). از طرفی، بیان ژن بتاگلوبین تحت کنترل ناحیه تنظیمی که در بالادست ژن قرار گرفته است، می‌باشد و جایگزینی تصادفی ژن توسط وکتورهای ویروسی اثر تنظیمی فوق را از بین می‌برد (۸). برای تولید هموگلوبین طبیعی در سلول تعادل بین زنجیره α و β بسیار ضروری است. تعداد نسخه‌های فعال ژن α و β در یک سلول نکته اساسی برای حفظ این تعادل است و جایگزینی تصادفی و غیر قابل کنترل ژن β در ژنوم یک فرد می‌تواند تعداد نسخه‌های جایگزین شده ژن β در یک سلول را افزایش دهد و باعث اختلال در تعادل سنتز زنجیره α وβ گردد. بنابراین مشکل بیماران پس از ژن درمانی با وکتورهای ویروسی به قوت خود باقی می‌ماند، به همین دلیل این اواخر به علت وجود معایب فوق توجه بیشتری به روش‌های هدف‌گیری ژنی (Gene Targeting) برای ژن درمانی شده است (۹، ۱۰). این امر با پدیده نوترکیبی همسان (Homologous Recombination) انجام‌پذیر است. استفاده از این پدیده برای جایگزینی ژن سالم در محل ژن معیوب، هدف‌گیری ژنی نامیده می‌شود (۱۱). در این مطالعه سلول‌های بنیادی خون‌ساز انسان (Human Hematopoietic Stem Cells; HHSC) جدا شده از خون بند ناف، به عنوان سلول‌های هدف برای ژن درمانی با روش هدف‌گیری ژنی انتخاب شدند. سازه ژنی مورد نیاز در داخل پلاسمید pFBGGT کلون شده و مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲) .

در این مطالعه سلول‌های بنیادی خون‌ساز انسان ($CD133^+$) از خون بند ناف جدا گردیده و توسط سازه ژنی ذکر شده ترانسفکت شده و سپس طی مراحل انتخاب مثبت و منفی، سلول‌های ترانسفکت شده جدا و برای تایید نهایی انجام نوترکیبی هم‌سان با روش PCR و تعیین توالی بررسی می گردند (۱۳).

مواد و روش ها

این تحقیق بخشی از طرح ملی ژن درمانی بوده که در کمیته اخلاق شبکه پزشکی مولکولی کشور تصویب گردید و این مقاله نتایج حاصل از تحقیق در بخشی از طرح مذکور را در بر می گیرد.

کلیه مراحل انجام تحقیق به صورت ذیل به طور مختصر ارایه می گردد.

۱. تکثیر، تخلیص و هضم آنزیمی پلاسمید pFBGGT: برای تهیه سازه ژنی مورد نیاز در مراحل ترانسفکشن، باکتری حاوی پلاسمید pFBGGT در محیط L.B Broth (Merck, Germany) حاوی آمپی‌سیلین و تتراسایکلین رشد داده شد. از باکتری فوق بر اساس پروتکل کیت تخلیص پلاسمید QIAGENE پلاسمید تخلیص گردید. (۱۴، ۱۵) سپس برای جداسازی سازه ژنی از Back Bone پلاسمید، پلاسمید pFBGGT با آنزیم XhoI و NheI. هضم و حاصل هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۸/. درصد الکتروفورز گردیده و باند ۱۳/۳ کیلوبایت از روی ژل بریده شد (هضم آنزیمی بر اساس پروتکل شرکت سازنده آنزیم Fermentas می‌باشد).

۲. تخلیص DNA از روی ژل: باند ۱۳/۳ کیلوبایت بریده شده از روی ژل با استفاده از کیت QIAGEN DNA GELL EXTRACTION تخلیص و غلظت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید.

۳. تهیه خون بند ناف انسان و جداسازی سلول‌های $CD133^+$: این اوامر پس ازکسب مجوزهای لازم جهت خون‌گیری نمونه‌گیری از بند ناف در بیمارستان مریم تهران انجام شد. پس از هپارینه کردن خون و انتقال فوری نمونه‌های بندناف (Cord Blood) در مجاورت یخ، ابتدا سلول‌های تک هسته ای خون بند ناف با استفاده از فایکول (Lymphodex, Germany) جداسازی شده سپس سلول‌های $CD133^+$ با استفاده از کیت MACS (Miltenyi Biotec,Germany) جدا شد (۱۶، ۱۷). مکانیسم جداسازی سلول‌های $CD133^+$ با کیت MACS بر اساس آنتی‌بادی ضد CD133 متصل به نانو ذرات آهن و با استفاده از مگنت می‌باشد و برای به دست آوردن خلوص بالای ۹۰درصد این مرحله دو بار انجام شد (۱۸) (سلول جدا شده در مرحله اول به طور مجدد از ستون رد شدند).

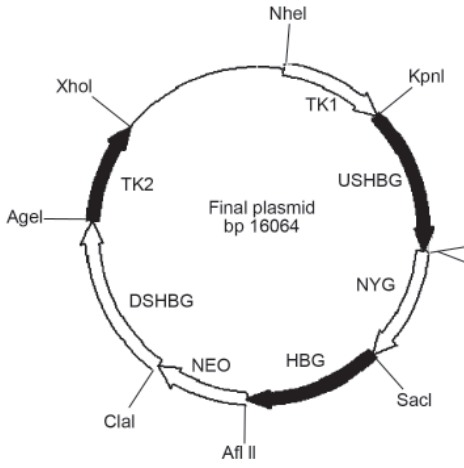
۴. فلوسایتومتری: اساس فلوسایتومتری توانایی بررسی خلوص ذرات منحصر به فرد است. در این دستگاه سلول‌های خونی د ر Flow Cell با سرعت زیاد به طور یکنواخت در حرکت هستند و از نور لیزر برای بررسی خواص سلولی استفاده می‌شود. در فلوسایتومترها، اندازه‌گیری فلورسانس بر اساس طول موج‌های متفاوتی در کانال‌های فلورسانس جداگانه و به وسیله فیلترهای گذر از باندی بوده است که اطلاعات کمی و کیفی متعددی را در مورد نشانگرهای سطح سلولی نشان‌دار شده به وسیله فلوروکروم ها می‌دهند. در این مرحله به منظور سنجش خلوص سلولی حاصل، حجمی از محیط که شامل حدود ۴۰۰۰۰ سلول بود پیپتینگ شده، سانتریفیوژ گردید و رسوب سلولی حاصل طی دو مرحله در Phosphate Buffered Saline (PBS) حل شد. به منظور بلوکه کردن سایت‌های غیراختصاصی CD133 به سلول‌ها FCR Blocking ۱۰ میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت۱۶ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از سانتریفیوژ مجدد، بافر (Control Group) IgG1 ، MACS و PE (Test Group) طبق پروتکل موجود به سلول‌ها اضافه شد (۱۹). در نهایت سلول‌ها به صورت تماس غیرمستقیم با یخ برای آنالیز فلوسایتومتری حمل گردید و درجه خلوصی حدود ۹۳ درصدگزارش شد.

۵. کشت و تکثیر سلول‌های $CD133^+$: سلول‌های جمع‌آوری شده پس از شمارش سلولی که در ابتدا ۳۰۰۰۰۰ سلول از هر بند ناف بود، در محیط Stem line حاوی ۲۰درصد سرم و فاکتورهای رشد سلول بنیادی (Stem Cell Factor; SCF) با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر (Trombopoietin Human; TPO) با غلظت ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و اینترلوکین 6 (Interlukin 6; IL6) با غلظت ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به مدت دو هفته کشت داده شد (۲۰). تعویض محیط هر سه روز یک‌بار با استفاده از محیط کشت تازه حاوی کلیه فاکتورهای رشد فوق انجام گرفت. تعداد سلول‌های جداسازی شده مذکور پس از تکثیر در محیط آزمایشگاه به بیش از یک میلیون رسید. برای این سلول‌ها نیز تست فلوسایتومتری به طور مجدد انجام شده و به دلیل تمایز تعدادی از سلول‌ها در طی مرحله تکثیر درجه خلوصی حدود ۶۵ درصد به دست آمد. بنابر این حدود نهصد هزار سلول، به طور مطمئن $CD133^+$ بودند. بنابراین با توجه به این امر که انجام عمل خالص‌سازی بر روی سلول‌های حاصل از تکثیر و استفاده مجدد از ستون تخلیص، از دست دادن تعدادی از سلول‌های $CD133^+$ را نیز در پی داشت، عمل ترانسفکت بر روی کلیه سلول‌های حاصل از تکثیر بدون خالص‌سازی انجام شد. تمام مواد مورد استفاده در این مرحله از شرکت Sigma کشور آلمان تهیه گردید.

۶. تهیه سازه ژنی: مراحل طراحی و ساخت سازه ژنی استفاده شده در این مطالعه بر اساس مطالعه قبلی همکاران بوده است (۱۲). این سازه شامل قطعات بدین شرح بود: دو پایه همولوگ شامل ۲/۲ کیلوبایت بالا دست و ۲/۵ کیلوبایت پایین دست ژن بتاگلوبین (USHBG, DSHBG) ۱/۲ کیلوبایت ژن بتاگلوبین به عنوان ژن هدف، ژن‌های مقاومت به هیگرومایسین و نئومایسین به عنوان مارکرهای انتخاب مثبت و ژن مقاومت به تیمیدین کیناز به عنوان مارکر منفی بوده به طوری که ترتیب قطعات به شکل زیر می‌باشد.

TK1-USHBG-HYGROMYCIN-HBG-NEOMYCINE-DSHBG-TK2

تمام قطعات به وسیله PCR تکثیر شد و مراحل کلونینگ pTZ57T/A و pBGGT انجام گردید و تمامی مراحل کلونینگ و ساب کلونینگ توسط PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید شدند. در نهایت پلاسمید نهایی pFBGGT نام‌گذاری شد (۱۲) (شکل۱)(جدول ۱).



شکل۱: طرح کلی سازه ژنی مورد استفاده در این تحقیق و ترتیب قطعات سازه

جدول ۱: خصوصیات و اندازه هر کدام از قطعات سازه

Fragment	Specifications
TK1	1.63 kb containing promoter, gene and terminator region of HSV-1 thymidine kinase.
USHBG	2.2 kb upstream region of beta globin.
Hygro	1.8 kb, including SV40 promoter and terminator and Hygromycin resistance gene.
HBG	2.1 kb, promoter,coding and non coding regions of HBG and its native terminator.
Neo	1.5 kb Neomycin resistance expression cassette
DSHBG	2.5 kb downstream region of HBG.
TK2	1.6 kb including promoter,gene and terminator of HSV-1 thymidin kinase.

۷. ترانسفکشن (Transfection) سلول‌های $CD133^+$: در این مرحله با استفاده از کیت Polyfect شرکت Qiagen بر طبق پروتکل با DNA (۱۳/۳ کیلوبایت DNA) اصل از هضم آنزیمی حاوی سازه ژنی تعداد 10^6 سلول ترانسفکت شدند.

۸. تعیین دوز دارو (Drug Dose Determination): سلول‌های $CD133^+$ در پلیت شش خانه‌ای به تعداد ۱۰۰۰-۵۰۰ سلول کشت داده و برای هر غلظت دارو سه خانه در نظر گرفته شد. سپس به هر سه خانه مربوط به یک غلظت G418 (Genticin) با غلظت‌های ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ اضافه شد. برای هیگرومایسین، از غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و برای گان سیکلوویراز غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ استفاده گردید. (میزان کلیه غلظت‌ها ی استفاده شده در این قسمت میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد) (۱۲) .

۹. انتخاب مثبت و منفی سلول‌های ترانسفکت شده: سلول‌های بنیادی خون‌ساز انسان ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن تحت درمان با داروهای هیگرومایسین و G418 (Genticin) قرار گرفتند. لازم به ذکر است که از قبل غلظت این داروها از طریق Dose Determination بر روی سلول‌های مذکور بهینه گردید. درمان سلول‌ها با این دو دارو به مدت ۱۴ روز صورت گرفت و از روز هفتم به بعدبرای انتخاب منفی علاوه بر دو داروی فوق به محیط داروی گان سیکلوویر نیز اضافه شد (۱۲) .

۱۰. برداشت سلول‌های باقی‌مانده و تکثیرآنها: بعد از ۱۴ روز، کلون‌های سلولی تکثیر و DNA آنها جهت بررسی با PCR و تعیین توالی با استفاده از کیت DNP (سیناژن-ایران) تخلیص گردید.

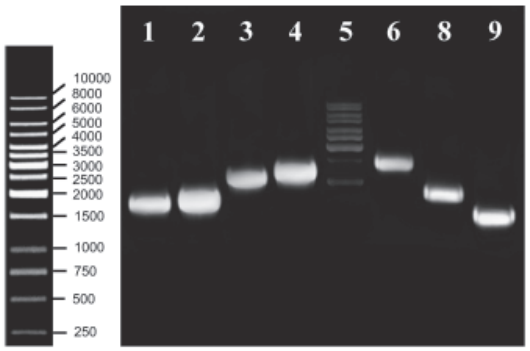
۱۱. واکنش‌های PCR تاییدی برای نوترکیبی همسان: واکنش زنجیره پلیمرازی برای قطعات Hygro، Neo، TK2، TK1 و قطعه‌ای که متشکل از حدود ۳۰۰ باز بالادست USHBG و خود USHBG و حدود ۴۰۰ باز از انتهای ´۵ هیگرومایسین می‌باشد، انجام شد. برای انجام PCR قطعه بیان شده از پرایمر جلوبر

SUS-F5´-TGT GTA TCT GCG AGA GAA GTC-3´

و پرایمر معکوس

Hygro-R4 5´-TCA GGC TTT TTC ATC ACG-3´

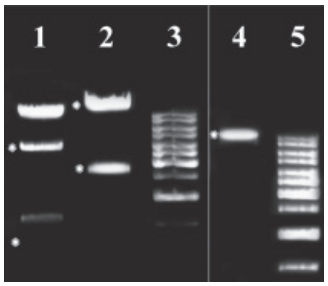
استفاده گردید (شکل ۲) . محصول PCR برای تایید نهایی برای تعیین توالی ارسال گردید (۱۲).



شکل ۲: نتیجه PCR قطعات سازه از روی ژنوم‌های مربوطه: ۱. تیمیدین کیناز ۲ (۱۶۰۰bp)، ۲. تیمیدین کیناز ۱ (۱۶۳۰bp)، ۳. بتاگلوبین (۲۱۰۰bp)، ۴. USHBG (۲۲۰۰bp)، ۵. مارکر ۱ کیلوبایت فرمنتاس، ۶. DSHBG (۲۵۵۰bp)، ۷. هیگرومایسین (۱۸۰۰bp)، ۸. نئومایسین (۱۵۰۰bp).

یافته ها

پس از طی مراحل تکثیر و آماده‌سازی باکتری و وارد نمودن پلاسمید در آن و سپس استخراج و تخلیص پلاسمید در نتیجه هضم، پلاسمید نهایی با دو آنزیم XhoI و NheI سازه ژنی به طول ۱۳/۳ کیلوبایت از پلاسمید (۲/۷ کیلوبایت) خارج شد. شکل۳ نتیجه حاصل از الکتروفورز محصول این هضم آنزیمی پلاسمید نهایی را نشان می‌دهد.

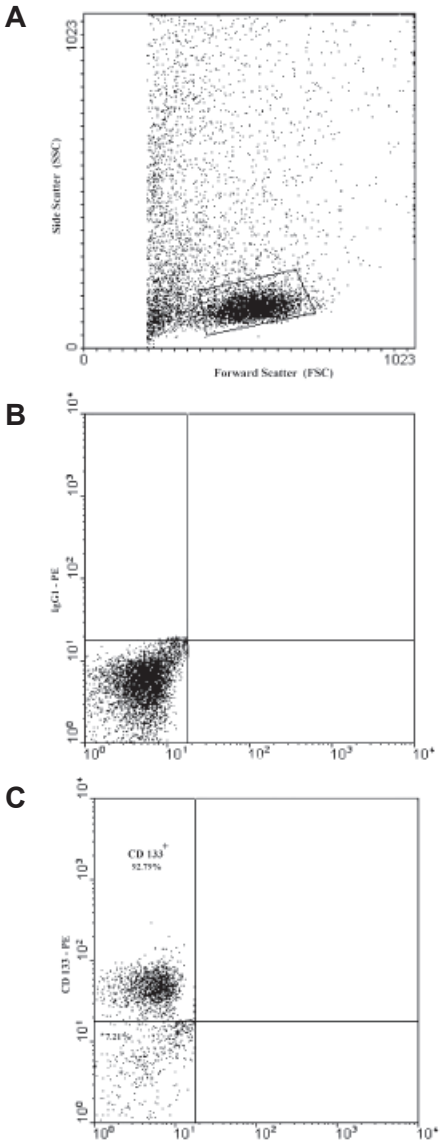


شکل ۳: ۱ و ۲. هضم pFBGGT با Xho1 و Nhe1، (۲۷۰۰+۱۳۳۶۰)، ۳. مارکر ۱ کیلوبایت، ۴. Naked DNA، ۱۳۳۶۰ کیلوبایت، ۵. مارکر

تعیین غلظت موثر دارو

غلظت مناسب دارو برای هیگرومایسین ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای G418 ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در این غلظت‌ها کلیه سلول‌های ترانسفکت نشده با سازه ژنی مرده شده و سلول‌های ترانسفکت شده زنده ماندند. غلظت مناسب برای گان سیکلووبر ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. فعالیت زیستی مارکرهای مثبت و منفی موجود در سازه در مطالعات قبلی توسط دکتر خان احمد و همکاران بررسی شده است (۱۲).

جداسازی سلول های CD133: سلول های CD133 با ستون MACS طی دو بار عبورخون بند ناف از ستون جداسازی شدو حدود ۳۰۰۰۰۰ سلول به دست آمد. در بررسی سلول‌های فوق با روش فلوسایتومتری خلوص سلول ها حدود ۹۳درصد بود (شکل۴).

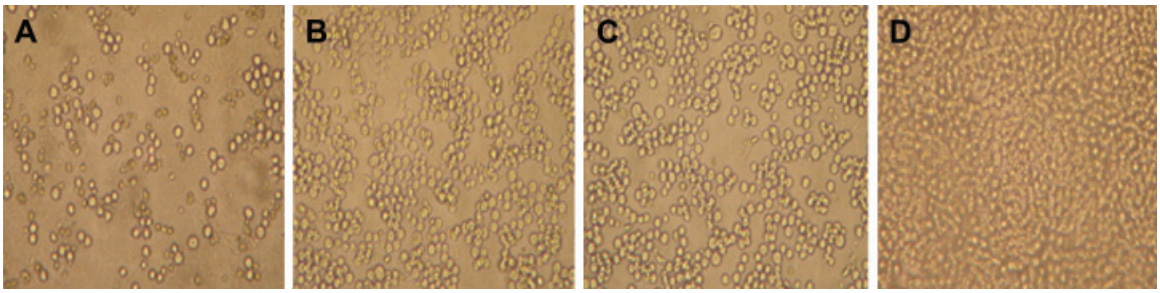


شکل ۴ : آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های $CD133^+$ خلوصی برابر۷۹/۹۲ را نشان می‌دهد.
A. محدوده سلولی مشخص شده که مورد بررسی قرار گرفته شد.
B. سلول‌های رنگ شده با آنتی‌بادی کنترل (IgG1)
C. سلول‌های رنگ شده با آنتی‌بادی $CD133^+$ (PE) که تجمع ۹۲/۷۹ درصد از سلول‌ها در منطقه مربوط به $CD133^+$ نشان دهنده این مقدار خلوص می‌باشد.

جهت بررسی درصد، ترانسفکشن سلول‌های CD133 با پلاسمید pTRES-EGFP ترانسفکت شد و با مشاهده سلول‌های سبز و شمارش آنها در طی یک هفته و درصدگیری نسبت به کل سلول‌های ترانسفکت شده، درصد ترانسفکشن ۱۳-۱۱ درصد محاسبه گردید (یافته‌های مربوطه نشان داده نشد.)

ترانسفکشن سلول های CD133

پس از ترانسفکشن و درمان دارویی سه هفته‌ای با داروهای انتخاب مثبت و منفی برای سلول‌های CD133 یک کلونی از هرآزمون باقی ماند (شکل ۵).



شکل ۵: A. سلول‌های $CD133^+$ جداسازی شده از خون بند ناف، B. سلول‌های $CD133^+$ تکثیر شده و آماده برای ترانسفکشن، C. سلول‌های $CD133^+$ ترانسفکت شده و به جای مانده پس از سه هفته درمان دارویی به وسیله هیگرومایسین، نئومایسین و گان سیکلوویر، D. سلول‌های $CD133^+$ ترانسفکت نشده پس از سه هفته درمان دارویی.

نتیجه PCR روی سلول‌های تکثیر شده با منشاء کلونی باقی‌مانده در شرایط درمان با سه داروی هیگرومایسین، نئومایسین و گانسیکلوویر برای قطعات Hygromycin و Neomycin و قطعه ۳۰۰bp بالادست US-US و ۴۰۰bp از انتهای ۵' هیگرومایسین به طول ۲۹۸۵bp مثبت و برای TK1 و TK2 منفی بود (شکل۶).

شکل ۶: ۱ و ۷. مارکر، ۲. قطعه تایید کننده نوترکیبی همسان (حاوی بالادست USHBG و USHBG و قطعه‌ای از انتهای ۵' هیگرومایسین، ۳ و ۵. TK1 و TK2 که هر دو تکثیر نشده‌اند، ۴. نئومایسین، ۵. هیگرومایسین، ۶. گانسیکلوویر.

بحث

در حال حاضر استراتژی‌های متعددی برای ژن درمانی بتاتالاسمی مطرح است که شایع ترین آنها عبارتند از: استفاده از وکتورهای ویروسی به خصوص رتروویروس‌ها و لنتی ویروس‌ها، روش هدف‌گیری ژن، نوترکیبی همسان با استفاده از قطعات کوتاه ژن (SFHR)، Triplex RNAi، Forming Oligonucleotides و استفاده از ریبوزیم‌ها. برای اولین بار توسط مای و همکارانش با استفاده از نوترکیبی همسان ژن بتاگلوبین انسان را هدف‌گیری نمودند و آخرین مطالعه گزارش شده نیز در این مورد توسط چااو همکارانش بر روی سلول‌های بنیادی جنینی مبتلا به بتاتالاسمی صورت گرفت. آنها با استفاده از ژن درمانی توانستند ژن سالم بتاگلوبین را جایگزین ژن معیوب نمایند. با توجه به مشکلات ژن درمانی با وکتورهای ویروسی – که به طور مختصر در مقدمه ذکر گردید – در طی سال‌های اخیر توجه محققین مجددا به روش هدف‌گیری ژنی (Gene Trageting; GT) با استفاده از پدیده نوترکیبی همسان جلب شده است به طوری که از این روش می‌توان برای جایگزینی یک ژن در محل مشخص Gene Knock in، خارج نمودن قطعه ژنی حاصل از محل معینی از ژنوم Gene Knock out و یا اصلاح و تغییرات جزیی در ناحیه مشخصی از ژنوم Subtle Mutation استفاده نمود (۲۱، ۲۲). اصلی‌ترین مشکل هدف‌گیری ژنی، تعداد پایین وقوع نوترکیبی همسان در سلول‌های پستانداران و همچنین انسان است. با توجه به این امر یکی از عوامل موثر در افزایش احتمال نوترکیبی همسان نوع وکتور مورد استفاده می‌باشد. در این تحقیق برای هدف‌گیری ژن بتا از وکتور pFBGGT استفاده شده. این حامل ژنی یک نوع وکتور جایگزینی (Replacement) می‌باشد که طرح کلی آن در شکل ۱ نشان داده شده است. در این سازه ژنی قطعات USHBG و DSHBG به عنوان بازوهای همولوگ بوده و به ترتیب حاوی ۲/۲ و ۲/۵ کیلوباز از بالادست و پایین دست ژن بتاگلوبین هستند. اندازه این قطعات به گونه‌ای انتخاب شده تا هم از نظر فراوانی انجام GT و هم از نظر محدودیت در ظرفیت پذیرش پلاسمید مشکلی وجود نداشته باشد.از طرفی قطعه USHBG کوچک‌تر طراحی شده تا در مرحله PCR تاییدی، مشکل بزرگی طول محصول نیز مرتفع گردد. علاوه بر این در این وکتور دو مارکر مثبت در دو طرف ژن بتاگلوبین قرار دارد و در یک مرحله نوترکیبی همسان ژن معیوب خارج و ژن سالم جایگزین می‌شود.

نتیجه‌گیری

گرچه تا کنون با استفاده از وکتورهای ویروسی تحقیقات متعددی برای ژن درمانی بیماری بتاتالاسمی انجام شده است (۲۳، ۲۴) ولی بیشتر، سلول‌های هدف رده‌های سلولی پستانداران مثل MLE و یا در نهایت HSC موش بوده است. تحقیقات انگشت شماری نیز در زمینه اصلاح نقص ژنتیکی ژن بتاگلوبین با استفاده از روش نوترکیبی همسان انجام شده که این تحقیقات نیز بیشتر روی سلول‌های غیر از HSC انسانی بوده است (۲۵). با این وجود اصلاح نقص ژنتیکی سلول‌های بنیادی خون‌ساز انسان با روش هدف‌گیری ژنی کاری جدید بوده است. از طرفی در این تحقیق، سلول بنیادی خون‌ساز جدا شده از بند ناف ($CD133^+$) یک سلول کاملا جدید است و در تمامی مراحل اعم از نمونه‌گیری، جداسازی سلول و تکثیر و ترانسفکت و... شرایط برای نتیجه‌گیری مطلوب‌تر بهینه گردیده است. علاوه بر این موارد، سازه ژنی مورد استفاده در این تحقیق نیز سازه‌ای جدید است زیرا سازه‌های استفاده شده در تحقیقات دیگر دارای یک مارکر انتخاب مثبت‌اند و عمل جایگزینی ژن مورد نظر در دو مرحله نوترکیبی همسان انجام می‌شود ولی این سازه دارای دو مارکر انتخاب مثبت بوده و عمل جایگزینی ژن مورد نظر در یک مرحله انجام می‌شود (۲۶) . همان طور که در قبل ذکر گردید، در حال حاضر با وجود بیش ازپانزده هزار بیمار تالاسمی در کشور و صرف هزینه‌های هنگفت جهت درمان و بقای این بیماران ، به منظور کاهش درد و رنج آنان، تصحیح نقایص ژنی به روش نوترکیبی همسان

(Homologous Recombination)، یکی از روش‌های موثر می‌باشد و از آنجایی که سلول‌های بنیادی خون‌ساز قابلیت تبدیل به پیش‌سازهای رده‌های مختلف سلول‌های خونی را دارند، شاید با تصحیح ژن معیوب در *in vitro* و پیوند اتولوگ این سلول‌ها به بیمار، شاید بتوان به درمان موثر این بیماری دست یافت (۲۷).

تقدیر و تشکر

بر خود واجب می‌دانیم از مسئولین محترم مربوطه در شبکه پزشکی مولکولی کشور، بخش‌های بیوتکنولوژی و بانک سلولی انستیتو پاستور ایران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات که در فراهم آوردن ملزومات این تحقیق و تامین هزینه‌های مالی مساعدت‌های لازم را مبذول داشتند، قدردانی نماییم. از کلیه مسؤولین، پزشکان، پرسنل و بیماران محترم بخش زایمان بیمارستان مریم که با رضایت کامل و محبت بی‌دریغشان ما را در مرحله تهیه خون بندناف، صمیمانه یاری کردند کمال تشکر را داریم. همچنین ازخانم دکتر حقیقی (بخش بانک سلولی انستیتو پاستور ایران)، آقای دکتر آتشی (گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس)، آقای جان زمین (بخش خون بند ناف موسسه رویان) و سرکار خانم فاطمه وحید دستجردی (دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران) که در زمینه عکس‌برداری، جداسازی و فلوسایتومتری از هر گونه همکاری دریغ نکردند نیز سپاسگزاریم.

References

1. Daar S, Gravell D, Hussein HM, Pathare AV, Wali Y, Krishnamoorthy R. Haematological and clinical features of β-thalassaemia associated with Hb Dhofar. Euro J Haemato. 2008; 80(1): 67-70.
2. Lee JW. Iron chelation therapy in the myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: a review of experience in South Korea. Int J Hematol. 2008; 88(1):16-23.
3. Bashyam MD, Bashyam L, Savithri GR, Gopikrishna M, Sangal V, Devi AR. Molecular genetic analyses of beta-thalassemia in South India reveals rare mutations in the beta-globin gene. J Hum Genet. 2004; 49(8): 408-413.
4. Pfeifer A, Verma IM. Gene therapy: promises and problems. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2001; 2: 177-211.
5. Walters MC. Stem cell therapy for sickle cell disease: transplantation and gene therapy. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005: 66-73.
6. Greiner J, Wiehe J, Wiesneth M, Zwaka TP, Prill T, Schwarz K, et al.Transient genetic labeling of human CD34-positive hematopoietic stem cells using nucleofection. Transfus Med Hemother. 2004; 31: 136-141.
7. Vlachaki E, Ioannidou-Papagiannaki E, Tziomalos K, Haralambidou-Vranitsa S, Perifanis V, Klonizakis I, et al. Peripheral blood haematopoietic progenitor cells in patients with beta thalassaemia major receiving desferrioxamine or deferiprone as chelation therapy. Eur J Haematol. 2007; 78(1): 48-51.
8. Li ZH, Liu DP, Yin WX, Guo ZC, Liang CC.Targeted correction of the point mutations of beta-thalassemia and targeted mutagenesis of the nucleotide associated with HPFH by RNA/DNA oligonucleotides: potential for beta-thalassemia gene therapy. Blood Cells Mol Dis. 2001; 27(2): 530-538.
9. Li W, Xie S, Guo X, Gong X, Wang S, Lin D, et al. A novel transgenic mouse model produced from lentiviral germline integration for the study of beta-thalassemia gene therapy. Haematologica. 2008 ;93 (3): 356-362.
10. Biet E, Larue L, Dutreix M. Homologous recombination and gene targeting. C R Biol. 2003; 326(1): 51-64.
11. Johzuka-Hisatomi Y, Terada R, Iida S. Efficient transfer of base changes from a vector to the rice genome by homologous recombination: involvement of heteroduplex formation and mismatch correction. Nucleic Acids Res. 2008; 36(14): 4727-4735.
12. Khanahmad H, Noori Daloii MR, Shokrgozar MA, Azadmanesh K, Niavarani AR, Karimi M, Rabani B, Bageri R, Khalili M, Maryami F, Zeinali S. A novel single step double positive double negative selection strategy for β-globin gene replacement.Yakhteh 2006; 2: 98-105.
13. Tura O, Barclay GR, Roddie H, Davies J, Turner ML. Optimal ex vivo expansion of neutrophils from PBSC CD34+ cells by a combination of SCF, Flt3-L and G-CSF and its inhibition by further addition of TPO. J Transl Med. 2007; 5: 53-64.
14. Stamatoyannopoulos G.Prospects for developing a molecular cure for thalassemia. Hematology. 2005;10 Suppl 1: 255-257.
15. Gruenert DC, Bruscia E, Novelli G, Colosimo A, Dallapiccola B, Sangiuolo F, et al. Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragments. J Clin Invest. 2003; 112(5): 637-641.
16. Sangiuolo F, Novelli G. Sequence-specific modification of mouse genomic DNA mediated by gene targeting techniques. Cytogenet Genome Res. 2004;105(2-4): 435-441.
17. Mandal AK, Bisht S, Bhat VS, Krishnaswamy PR, Balaram P. Electrospray mass spectrometric characterization of hemoglobin Q (Hb Q-India) and a double mutant hemoglobin S/D in clinical samples. Clin Biochem. 2008; 41(1-2): 75-81.
18. Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, Kuci S.Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. Ann N Y Acad Sci. 2003; 996: 141-151.
19. Kekarainen T, Mannelin S, Laine J, Jaatinen T.Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. BMC Cell Biol. 2006 1; 7: 30-37.
20. Ołdak T, Kruszewski M, Machaj EK, Gajkowska A, Pojda Z. Optimisation of transfection conditions of CD34+ hematopoietic cells derived from human umbilical cord blood. Acta Biochim Pol. 2002; 49(3): 625-632.
21. May C, Rivella S, Chadburn A, Sadelain M.Successful treatment of murine beta-thalassemia intermedia by transfer of the human beta-globin gene. Blood. 2002; 99(6): 1902-1908.
22. Gao G, McMahon C, Chen J, Rong YS. A powerful method combining homologous recombination and site-specific recombination for targeted mutagenesis in Drosophila. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105(37): 13999-14004.
23. Hanawa H, Hargrove PW, Kepes S, Srivastava DK, Nienhuis AW, Persons DA. Extended beta-globin locus control region elements promote consistent therapeutic

expression of a gamma-globin lentiviral vector in murine beta-thalassemia. Blood. 2004; 104(8): 2281-2290.
24.Qiu C, Olivier EN, Velho M, Bouhassira EE.Globin switches in yolk sac-like primitive and fetal-like definitive red blood cells produced from human embryonic stem cells. Blood. 2008; 111(4): 2400-2408.
25. Garrick D, De Gobbi M, Samara V, Rugless M, Holland M, Ayyub H, et al.The role of the polycomb complex in silencing alpha-globin gene expression in noneryth-
roid cells. Blood. 2008; 112(9): 3889-3899.
26. Moldenhauer A, Genter G, Lun A, Bal G, Kiesewetter H, Salama A. Hematopoietic progenitor cells and interleukin-stimulated endothelium: expansion and differentiation of myeloid precursors. BMC Immunol. 2008; 9: 56-68.
27. Rodgers GP, Saunthararajah Y.Advances in experimental treatment of beta-thalassaemia. Expert Opin Investig Drugs. 2001; 10(5): 925-934.