

ارائه یک روش نوین جهت جایگزینی ژن بتا گلوبین در یک مرحله با استفاده از استراتژی انتخاب مثبت و منفی دو گانه

حسین خان احمد^۱ Ph.D.، محمد رضا نوری دلویی^۲ Ph.D.، کامران علی مقدم^۳ Ph.D.، محمدعلی شکرگزار^۴ Ph.D.، کیهان آزادمنش^۵ Ph.D.، احمدرضا نیاورانی^۶ Ph.D.، بهاره ربانی^۷ M.Sc.، رضوان باقری^۸ M.Sc.، میترا خلیلی^۹ M.Sc.، فرشته مریمی^{۱۰} M.D.، سیروس زینلی^{۱۱} Ph.D.

۱. انیستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی
۲. دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، بخش ژنتیک، گروه ژنتیک پزشکی
۳. دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان شریعی، مرکز هیاتولوژی انکولوژی و پیوند مغز استخوان
۴. انیستیتو پاستور ایران، بخش بانک سلولی
۵. انیستیتو پاستور ایران، بخش هیاتیت و ایدز

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۶۶۷-۱۳۱۸۵، انیستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی، گروه ژنتیک

پست الکترونیک: [Email: sirouszeinali@yahoo.com](mailto:sirouszeinali@yahoo.com)

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۱۱/۲۶، پذیرش مقاله: ۸۵/۶/۱

هدف: هدف طراحی و ساخت یک سازه جدید با دو مارکر مثبت و دو مارکر منفی برای هدف گیری ژن بتا گلوبین **مواد و روش‌ها:** قطعات مختلف سازه با روش PCR تکثیر و در وکتور pTZ577/A کلون و سپس در pBGGT ساب کلون و پلاسمید نهایی ساخته شد. تمام کلون‌های بینابینی و پلاسمید نهایی با روش های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی بررسی شد. سلول‌های COS-7 با سازه ژنی، ترانسفکت و مراحل انتخاب مثبت و منفی با داروهای مربوطه انجام شد. سلول‌های باقی مانده با PCR بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از PCR و هضم آنزیمی و تعیین توالی همگی تایید کننده صحت انجام مراحل کار بود. نتیجه تعیین توالی محصول PCR انجام شده روی ژنوم سلول‌های باقیمانده تایید کننده وقوع نوترکیبی هم‌سان در این سلول‌ها بود.

نتیجه گیری: استراتژی استفاده از دو مارکر مثبت و دو مارکر منفی روشی نوین و مناسب برای جایگزینی ژن بتا گلوبین سالم با ژن جهش یافته است.

کلیدواژگان: بتا تالاسمی، هدف گیری ژنی، نوترکیبی همسان

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۲، تابستان ۸۵، صفحات ۹۸-۱۰۵

مقدمه

داشتن عوارضی مانند واکنش ایمنولوژیک سلول‌های پیوند بر علیه میزبان (Graft Versus Host Disease) در عمل با مشکلات زیادی روبرو است (۲، ۳). اصلاح نقص ژنتیک سلول‌های بنیادی خون‌ساز فرد بیمار با روش ژن درمانی و پیوند این سلول‌ها به بیمار، روش ایده‌آل برای درمان این بیماران است (۴، ۵). تا کنون روش‌های متعددی برای ژن درمانی بیماری بتا تالاسمی به کار گرفته شده است و در اغلب این پروژه‌ها از وکتورهای ویروسی استفاده می‌شود (۶، ۷). کارآیی این وکتورها برای ارایه ژن به سلول بسیار بالا است. ولی معایبی نیز دارند که کاربرد آنها را محدود کرده است (۸). ظرفیت پذیرش ژن آنها کم است و نمی‌توان توالی‌های تنظیمی یا توالی‌های اختصاصی بیان در بافت‌های خاص مانند ناحیه تنظیمی لوکوس بتا را در آنها جای داد (۹). قرار دادن نواحی کوچک تنظیمی لوکوس بتا (mini LCR) در داخل این وکتورها تا حدی سبب افزایش سطح بیان ژن بتا گلوبین شده است. ولی خاموش شدن ژن در سطح نسخه‌برداری، کاهش تیترو و پیوند دست‌کاری شده و ناپایداری ژن بتا از معایب این وکتورها است (۱۰، ۱۱، ۱۲). در اغلب این وکتورها جایگزین شدن ژن در ژنوم به صورت

بیماری بتا تالاسمی یکی از شایع‌ترین اختلالات ژنتیکی در دنیا است. در این بیماری سنتز بتا گلوبین کاهش یافته یا متوقف می‌شود. شدت بیماری ارتباط مستقیم با اختلال در تعادل بین سنتز زنجیره آلفا و بتا دارد (۱). بتا تالاسمی یک اختلال تک ژنی با وراثت اتوزومال مغلوب است. تا کنون حدود ۲۰۰ جهش در ژن بتا گلوبین شناسایی شده است (۲). جهش‌های فوق روی نسخه‌برداری، پردازش mRNA (mRNA Processing) بیان می‌شوند و بر پایداری زنجیره بتا پس از ترجمه تاثیر می‌گذارند و سبب توقف سنتز یا ناپایداری زنجیره ساخته شده می‌شوند (۱). بتا تالاسمی به طور شایع در منطقه مدیترانه، خاورمیانه، شبه قاره هند و شرق آسیا دیده می‌شود. بیماران بتا تالاسمی خون‌سازی غیرمفیدی دارند و مبتلا به کم‌خونی همولیتیک و کم‌خونی هیپوکروم میکروسیتیک و بزرگی کبد و طحال هستند. تزریق مکرر خون در این بیماران سبب تجمع آهن در بدن می‌شود که باید با دارو درمان شود (۱). پیوند مغز استخوان قطعی‌ترین روش درمانی برای این بیماران است. اما این روش به علت در دسترس نبودن اهداکنندگان مناسب و

پرایمرها و واکنش زنجیرهای پلی مرز

پرایمرهای مورد نیاز با قرار دادن جایگاه برش آنزیمی مناسب در انتهای ۵' آنها طراحی و سفارش ساخت داده شد (جدول ۱). هفت قطعه تشکیل دهنده سازه با استفاده از کیت High Fidelity Expand DNA Polymerase (روشه، آلمان) تکثیر شد. برنامه PCR به قرار زیر اجرا شد:

1- 94°C	2'	8-68C	1/kb
2- 94°C	20"		+20"/cycle
3- 60°C	30"	9- Go to 6 repeat 20	
4- 68°C	1/kb	10-68°C	10'
5- Go to 2	repeat 10	11- Hold at 4°C	
6- 94°C	20"	End	
7- 60°C	30"		

محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید و با استفاده از اشعه ماورا بنفش مشاهده شد. باندهای مورد نظر از روی ژل بریده و با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (آلمان، Qiagen) تخلیص شد. هفت قطعه تکثیر شده به طور جداگانه در وکتور کلونینگ pTZ577/A (فرمنتاس، لیتوانی) کلون شدند. و پلاسمیدهای: pT-TK2، pT-TK1، pT-DSHBG PT-NEO، pT-USHBG، pT-HBG، pT-HYG حاصل شدند. قطعات ژنی با هضم آنزیمی با آنزیمهای مربوطه از پلاسمیدهای فوق خارج و در pBGGT (ثبت شده در بانک ژن تحت شناسه DQ384617) ساب کلون شد (شکل ۱). برای تایید صحت پلاسمید نهایی PCR و واکنش هضم آنزیمی برای تمام قطعات روی این پلاسمید گذاشته شد. برای تعیین توالی سازه ژنی در دو جهت، پرایمر طراحی و همراه نمونه پلاسمید برای تعیین توالی ارسال شد (سینا ژن، ایران). پلاسمید نهایی pFBGGT نامیده شد. pFBGGT جهت استفاده در مراحل بعدی با کیت تخلیص پلاسمید عاری از اندوتوکسین تخلیص شد (آلمان Qiagen).

کشت سلولی و ترانسفکشن

فعالیت بیولوژیک مارکرهای انتخاب مثبت و منفی به وسیله ترانسفکشن سلولهای Cos-7 (بانک سلولی ایران، C143) با پلاسمید نهایی خطی شده توسط آنزیم XhoI بررسی شد. pFBGGT توسط آنزیمهای XhoI و NheI هضم و حاصل هضم آنزیمی روی ژل آگارز الکتروفورز شد و باندهای ۱۳/۳ کیلو بازی از روی ژل بریده و با کیت تخلیص DNA تخلیص شد. سلولهای COS-7 در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین، ۲ میلی مولار گلوتامین و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دی اکسید کربن و حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد.

یک روز قبل از ترانسفکشن تعداد $10^6 \times 1/6$ سلول Cos-7 در

تصادفی صورت می گیرد و این مساله می تواند باعث خاموش شدن ژنهای مفید و یا فعال شدن انکوژن ها و ایجاد مسایلی مانند بدخیمی شود (۱۳). احتمال ایجاد ویروس های نوترکیب یا وحشی در هنگام استفاده از وکتورهای ویروسی وجود دارد، هر چند این احتمال بسیار ناچیز است (۸، ۱۴). سلولهای بنیادی خون ساز نرمال دارای یک نسخه ژن بتا روی کروموزوم یازده و دو نسخه از ژن آلفا روی کروموزوم شانزده بوده و نسبت ژنی آنها در سلول چهار به دو است. رعایت این نسبت برای بیان طبیعی این دو ژن و متعاقب آن تشکیل هموگلوبین طبیعی، کاملاً ضروری است. در ژن درمانی با وکتورهای ویروسی تعداد نسخه های ژنی وارد شده در ژنوم قابل کنترل نیست و نسبت ژنی فوق به هم می خورد (۱۵، ۱۶). ولی در روش هدف گیری ژنی این نسبت طبیعی باقی می ماند. اخیراً به دلیل وجود معایب فوق به روش های هدف گیری ژنی (Gene Targeting) برای ژن درمانی توجه بیشتری شده است.

روش ایده آل برای ژن درمانی، اصلاح یک ژن جهش یافته به صورت مستقیم و بدون ایجاد تغییر در محل های دیگر است. این امر با پدیده Homologous Recombination انجام پذیر است (۱۷) و استفاده از این پدیده برای جایگزینی ژن سالم در محل ژن معیوب، هدف گیری ژنی نامیده می شود. میزان بروز Homologous Recombination حدود 10^{-5} تا 10^{-7} تخمین زده می شود (۱۸). لذا برای جداسازی و انتخاب سلولهای اصلاح شده باید از نشانگرهای انتخاب مثبت و منفی استفاده کرد. برای ژن درمانی با این روش به ساخت سازه ژنی حاوی ژن بتاگلوبین و بازوهای همسان (همولوگ) و نشانگرهای انتخاب مثبت و منفی نیاز است. در این مطالعه یک سازه جدید برای هدف گیری ژن بتاگلوبین طراحی و احتمال بروز نوترکیبی همسان در سلولهای رده پستانداران با استفاده از این سازه مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

پلاسمیدها و مواد واکنش

همه پلاسمیدها با روش ترانسفورمیشن در باکتری EColi سویه Top10F⁺ و بر اساس دستورالعمل استاندارد مربوطه تکثیر شدند (۱۹). در مواردی که نیاز به استفاده از آنزیمهای آندونوکلئاز با اثر محدود و حساس به متیلاسیون مانند ClaI بود، پلاسمید در باکتری EColi Dam⁻ JM110 ترانسفورم شد (Stratagen، آمریکا). برای رشد باکتریها از محیط LB-Broth (مرک، آلمان) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی سیلین استفاده شد. کلیه دستکاریهای مولکولی از قبیل تخلیص پلاسمید و DNA، T/A، کلونینگ و واکنش های آنزیمی بر اساس دستورالعمل شرکت های سازنده کیت انجام شد. DNA ژنومیک انسان از خون محیطی فرد سالم با استفاده از کیت مربوطه (روشه، آلمان) استخراج شد. همه آنزیمهای آندونوکلئاز با اثر محدود و T4 DNA لیگاز، و پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه از شرکت سینا ژن تهیه شد.

روی ژنوم و خود USHBG به علاوه ۴۰۰ باز از انتهای ۵' هیگرومایسین است، گذاشته شد. PCR قطعه آخر با پرایمر جلوبر HYGRO-R4 و معکوس SUS-F 5' TGT-GTA-TCT-GCG-AGA-GAA-GTC-3' 3' TCA-GGC-TTT-TTC-ATC-ACG 5' گذاشته شد. محصولات PCR فوق در دو جهت تعیین توالی شد.

یافته‌ها

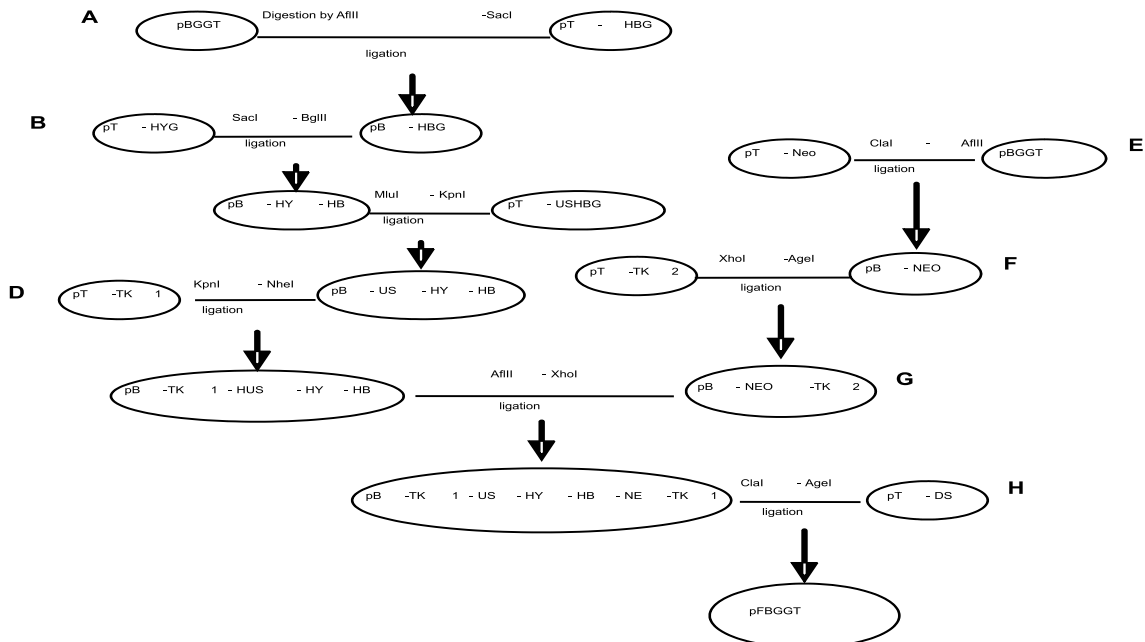
نتایج PCR و کلونینگ

هفت قطعه DNA به روش PCR تکثیر شد. ژن کامل تیمیدین کیناز از روی ژنوم HSV-1 به دو فرم TK1 و TK2 تکثیر شد. ژن بتاکلوپین و نواحی بالا دست و پایین دست آن از روی DNA ژنومی انسان به صورت سه قطعه HBG، USHBG، DSHBG تکثیر شد. ژن‌های مقاومت به نئومایسین و هیگرومایسین با پروموتورها و خاتمه دهنده‌های یوکاریوتی به ترتیب از روی pRc/CMV2 (جدول ۲). محصولات PCR در ناقل pTZ57T/A کلون و باهضم آنزیمی، PCR و تعیین توالی تایید شدند. تمام این هفت قطعه در کنار هم در pBGGT ساب کلون شدند و یک کاست جایگزینی با طول ۱۳/۳ کیلوباز در pBGGT ایجاد شد. صحت و درستی تمام مراحل کلونینگ و ساب کلونینگ با PCR (شکل ۲) و هضم آنزیمی (شکل ۳) تایید در دو جهت تعیین توالی شد.

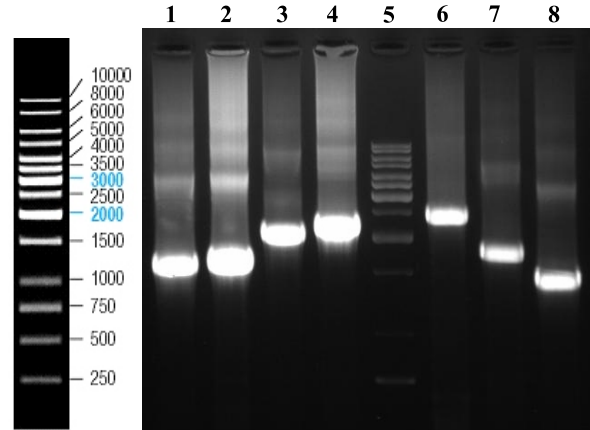
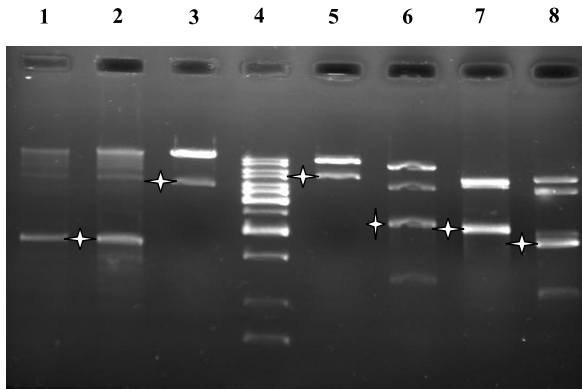
پلیت ۱۰۰ میلی متری کشت داده شد. سلول‌ها انکوبه شدند تا تراکم سلول در سطح به ۷۰-۵۰ درصد برسد. قبل از ترانسفکشن، محیط کشت سلول‌ها با ۷ میلی لیتر محیط تازه تعویض شد. سلول‌ها با ۴ میکروگرم DNA (سازه ژنی) و با استفاده از کیت پلی فکت (آلمان، Qiagen) و بر اساس دستورالعمل کیت ترانسفکت شدند. بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت تعویض شد و بعد از ۴۸ ساعت بعد از زمان ترانسفکشن، داروهای هیگرومایسین و G4۱۸ به ترتیب با غلظت‌های ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۶۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به محیط اضافه شد. محیط کشت هر ۳ روز یک بار تعویض شد. پس از گذشت ۹ روز از شروع ترانسفکشن داروی گان سیکلوویر با غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر به محیط کشت اضافه شد و درمان سه دارویی به مدت یک هفته ادامه یافت. کلونی‌های باقی مانده به پلیت‌های ۶۰ میلی متری منتقل شد و پس از یک هفته سلول‌های تکثیر شده به مدت ۵-۳ دقیقه تحت اثر تریپسین با غلظت ۰/۲۵ درصد قرار گرفت و به محض جدا شدن از پلیت با سرعت ۱۵۰۰ دور و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. DNA این سلول‌ها جهت بررسی‌های بعدی با PCR توسط کیت DNP (سینا ژن، ایران) استخراج شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) بر روی DNA سلول‌های انتخاب شده

PCR برای قطعات TK1، TK2، هیگرومایسین، نئومایسین و قطعه‌ای که متشکل از ۳۰۰ باز بالا دست قطعه USHBG

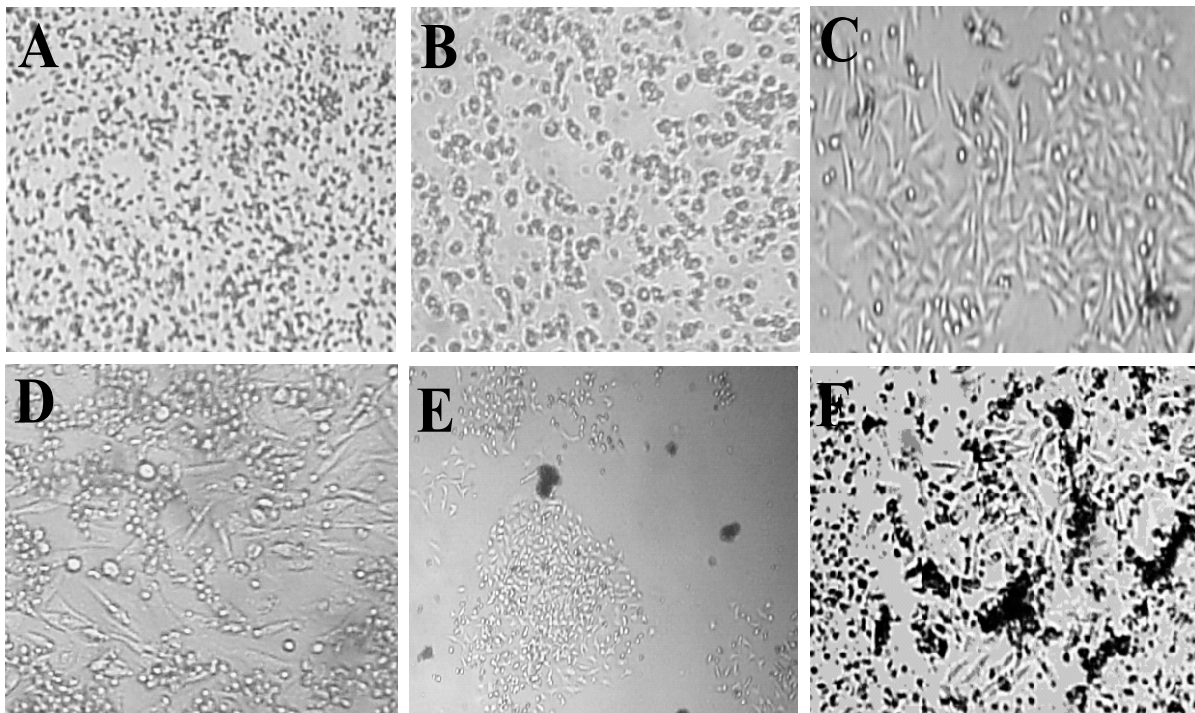


شکل ۱: مراحل ساخت pFBGGT: PT-HBG با آنزیم‌های *SacI-AflIII* هضم و با اتصال قطعه HBG در pBGGT پلاسمید pB-HBG حاصل شد (A). pB-HYGRO و pB-HBG با آنزیم‌های *BglIII-SacI* هضم و با اتصال قطعات با آنزیم *pB-HYG-HBG* ساخته شد (B). pB-HY-HB و pT-USHBG با آنزیم‌های *KpnI-MluI* هضم و پس از اتصال قطعات مربوطه با لیگاز *pB-US-HYG-HB* حاصل شد (C). pT-TK1 و pB-US-HY-HB با آنزیم‌های *NheI-KpnI* هضم و پس از اتصال قطعات، پلاسمید *pB-TK1-US-HY-HB* ساخته شد (D). pB-NEO و pT-NEO با آنزیم‌های *Clal-AflIII* هضم و با اتصال قطعات، پلاسمید *pB-NEO* ساخته شد (E). pB-NEO و pT-TK2 با آنزیم‌های *AgeI-XhoI* هضم و پس از اتصال قطعات مربوطه *pB-NEO-TK2* ساخته شد (F). pB-NEO-TK2 و pB-TK1-US-HY-HB با آنزیم‌های *XhoI-AflIII* هضم و پس از اتصال قطعات مربوطه *pB-TK1-US-HY-HB-NEO-TK2* حاصل شد (G). این پلاسمید و pT-DHSG با آنزیم‌های *AgeI-Clal* هضم و با اتصال قطعات، پلاسمید نهایی *pFBGGT* ساخته شد (H). ترتیب قرارگیری قطعات در *pFBGGT* به این صورت است: TK1-USHBG-HYG-HBG-NEO-DSHBG-TK2



شکل ۳: هضم pFBGGT با آنزیم‌های محدودالایثر: ۱- هضم با *KpnI* and *NheI* (TK1, 1630bp) - ۲ هضم با *XhoI* and *AgeI* (TK2, 1600bp) - ۳ هضم با *AflIII* and *AgeI* (NEO+DSHBG, 4050bp) - ۴ مارکر ۱ کیلو باز فرمنتاس، - ۵ *AflIII* and *XhoI*(NEO+DSHBG+TK2, 5650bp) - ۶ هضم با *KpnI* and *MluI*(USHBG, 2200bp) - ۷ هضم با *SacI* and *AflIII*(HBG, 2100bp) - ۸ هضم با *SacI* and *BglIII*(HYGRO, 1800bp). باندهای مورد نظر با ستاره مشخص شده‌اند.

شکل ۲: حاصل PCR هفت قطعه سازه روی پلاسمید نهایی (pFBGGT): ۱- TK2(1.6kb) - ۲ TK1(1.63kb) - ۳ HBG(2.1kb) - ۴ USHBG(2.2kb) - ۵ مارکر 1kb فرمنتاس، - ۶ DSHBG(2.55kb) - ۷ HYGRO(1.8kb) - ۸ NEO(1.5kb)



شکل ۴: ترانسفکشن سلول‌های Cos-7 با DNA برهنه: سلول‌های ترانسفکت نشده (کنترل) تحت درمان با هیگرومایسین (A)، G418 (B) و گانتسیکلوویر (C). در مورد A و B تمام سلول‌ها مردند ولی سلول‌های کنترل تحت درمان با گانتسیکلوویر زنده ماندند. سلول‌های ترانسفکت شده تحت درمان با هیگرومایسین و G418 پس از ۳ روز (D) و بعد از یک هفته (E). یک کلونی از ۳ کلونی باقی‌مانده پس از دو هفته درمان (F).

DNA این کلونی‌ها استخراج و با PCR آنالیز شد. نتایج PCR قطعات TK1 و TK2 منفی و هیگرومایسین، نئومایسین و قطعه متشکل از ۳۰۰ جفت باز بالا دست USHBG از ژنوم، USHBG و ۴۰۰ جفت باز از انتهای ۵' هیگرومایسین مثبت بودند (شکل ۵). آخرین محصول PCR تعیین توالی شد و نتایج تعیین توالی تایید کننده وقوع نوترکیبی همسان بین سازه ژنی و ژنوم سلول بود.

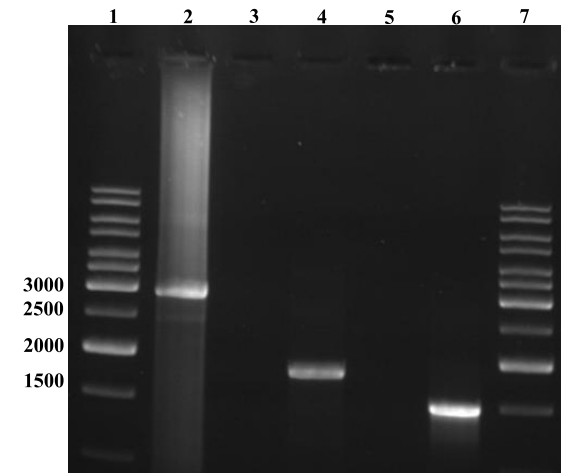
بحث

استراتژی‌های مختلفی برای ژن درمانی بتا تالاسمی وجود دارد. برخی از استراتژی‌های متداول مورد استفاده در این زمینه شامل: استفاده از وکتورهای ویروسی (۷-۴)، وکتورهای هدف گیری ژن (gene targeting vectors) (۱۳، ۱۸، ۲۰)، نوترکیبی هم‌سان قطعات کوچک (۲۱)، الیگونوکلوئوتیدهای تشکیل شونده سه تایی (Triplex forming oligonucleotide) (۲۲)، آنتی سنس snRNA (۲۳)، RNAi، و ریبوزایم است (۲۴). هدف از این مطالعه ساختن یک سازه جدید با دو مارکر مثبت و دو مارکر منفی برای هدف گیری ژن بتاگلوبین است. هدف گیری ژنی با هدف ساختن یک سازه جدید با دو مارکر مثبت و دو مارکر منفی برای هدف گیری ژن بتاگلوبین است. هدف گیری ژنی با هدف Gene knock in، Gene knock out یا ایجاد موتاسیون‌های دقیق در ژن انجام می‌شود (۲۵). هدف گیری ژنی روشی مطلوب برای تصحیح نقایص ژنتیکی است، زیرا نواحی دیگر ژنوم را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد. همچنین میزان طبیعی بیان ژن را نیز طی مراحل تمایز سلول‌ها تغییر نمی‌دهد (۲۶). تا به حال دو نوع وکتور هدف گیری ژنی مورد استفاده قرار گرفته است: وکتورهای Replacement و وکتورهای Insertion. وکتورهای Replacement برای ایجاد موتاسیون‌های دقیق (Subtle Mutation) ایده آل هستند (۲۷). سازه مورد استفاده در این تحقیق یک وکتور Replacement است و برای تصحیح موتاسیون‌های ژن بتاگلوبین طراحی شده است. طبق استراتژی انتخاب مثبت-منفی (positive-negative selection: PNS) که اولین بار توسط منصور و همکاران (۲۸) پیشنهاد شده است وکتور هدف گیری ژن دارای دو پایه همولوگ، مارکرهای انتخابی مثبت و منفی، و ژن هدف (در وسط کاست ژنی) است. نواحی بالا دست و پایین دست ژن بتا هموگلوبین به عنوان پایه‌های همولوگ، و ژن‌های مقاومت به نئومایسین و هیگرومایسین به عنوان مارکرهای انتخابی مثبت در نظر گرفته شدند. در دو انتهای سازه ژنی، ژن‌های تیمیدین کیناز ۱ و ۲ به عنوان مارکرهای منفی قرار گرفته است. مارکرهای منفی انتخاب سلول‌هایی که در آنها نوترکیبی هم‌سان رخ داده را از سلول‌هایی که سازه ژنی به طور تصادفی وارد ژنوم آنها شده میسر می‌سازد. برای اطمینان از وقوع نوترکیبی پایدار در سلول‌های ترانسفکت شده منتج از ورود سازه ژنی در ژنوم سلول، سلول‌ها را می‌توان با انتخاب مثبت با افزودن هیگرومایسین و G418 به محیط کشت شناسایی کرد. اگر نوترکیبی بین هر کدام از پایه‌های همولوگ (USHBG or DSHBG) (شکل ۶B و ۶C) به جای پایه همولوگ دیگر (شکل ۶A) انجام شود سلول نوترکیب تنها شامل یک مارکر

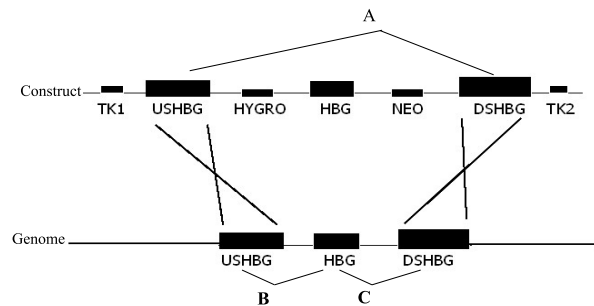
نتایج تعیین توالی، فقدان هر گونه جهش بیماریزا در ژن بتاگلوبین و دیگر قطعات pFBGGT را تایید کرد. مقدار موثر هیگرومایسین، G418 و گانسیکلوویر روی رده سلولی Cos-7 در این مطالعه مشخص شد. نتایج بررسی فعالیت بیولوژیک مارکرهای انتخابی مثبت و منفی (شامل هیگرومایسین، نئومایسین، TK1 و TK2 با ترانسفکشن سلول‌های Cos-7 با pFBGGT خطی شده، نشانگر فعال بودن مارکرهای یاد شده بود.

نتایج ترانسفکشن سلول‌های Cos-7 با DNA برهنه (سازه ژنی)

سلول‌های Cos-7 ترانسفکت شده به مدت هفت روز با هیگرومایسین و G418 تیمار شدند و تنها ۲۰ کلونی از آنها زنده ماند. سلول‌های باقی‌مانده به مدت یک هفته علاوه بر دو داروی قبلی تحت درمان با گانسیکلوویر قرار گرفتند که منجر به بقای ۳ کلونی شد. این کلونی‌ها به محیط کشت جدید منتقل شدند (شکل ۴).



شکل ۵: حاصل PCR روی ژنوم سلول‌های باقی‌مانده بعد از انتخاب مثبت و منفی: ۱- مارکر ۱ کیلوباز فرمنتاس، ۲- باند ۲۹۸۵ جفت بازی متشکل از ۳۰۰ باز بالای قطعه USHBG و خود USHBG و ۴۰۰ جفت باز از انتهای ۵' هیگرومایسین، ۳- TK1 که تکثیر نشده است، ۴- هیگرومایسین (۱۸۰۰ bp)، ۵- TK2 تکثیر نشده، ۶- نئومایسین (۱۴۹۰ bp).



شکل ۶: احتمالات ممکن برای وقوع نوترکیبی همسان: اگر نوترکیبی بین USHBG و HBG (حالت B) و یا DSHBG و HBG (حالت C) رخ دهد سلول‌های حاصل در مرحله انتخاب مثبت دوگانه می‌میرند، اما سلول‌هایی که نوترکیبی بین USHBG و DSHBG رخ می‌دهد (A) دارای ژن مقاومت به هر دو مارکر مثبت هستند و در مرحله انتخاب مثبت زنده می‌مانند.

نسخه از ژن کلون شده را برای سازه نهایی انتخاب کرد. pBGGT به عنوان پلاسمید میزبان کاست هدف گیری ژن، برای این هدف طراحی شد و در نتیجه تمام مراحل ساب کلونینگ به طور جهت دار صورت گرفت و این فرآیند موجب صرفه جویی در زمان و هزینه پروژه شد.

عمده ترین ایراد استراتژی هدف گیری ژن، فراوانی بسیار پایین نوترکیبی هم سان (Homologous Recombination) در سلول های پستانداران است. این میزان بین 10^5 - 10^7 است (۱۸).

برخی از روش ها برای بهبود و افزایش فراوانی HR به کار گرفته شده است. یکی از این روش ها تولید بیش از حد و گذرای ریکامیناز فعال مثل Rec A یا RAD51 در سلول است که میزان HR را افزایش می دهد (۳۳، ۳۴). هم اکسون نوکلئازهای انگشت روی (Zinc Finger Nucleases) جهت القای شکست در DNA دو رشته ای در جایگاه های مورد نظر قابل طراحی اند (۳۵). به نظر می رسد که این روش در پیشبرد مطالعات هدف گیری ژنی کاربرد داشته باشد. ایجاد شکست های مصنوعی در DNA دو رشته ای در دو انتهای ناحیه هم سان در ژنوم و سازه می تواند موجب افزایش میزان HR شود (۳۰، ۳۶). همچنین هر نوع پیشرفت در سیستم های ارایه ژن به داخل سلول می تواند موجب افزایش تعداد سلول های نوترکیب در جمعیت سلولی شود. سازه مورد استفاده در این تحقیق به گونه ای طراحی شده که در نهایت ژن های بتاگلوبولین فعال را در سلول های بنیادی هماتوپویتیک بیماران مبتلا به بتاتالا سمی، جایگزین ژن جهش یافته نماید. حساسیت و تعداد کم این سلول ها چالش هایی بر سر راه ژن درمانی هستند که باید بر آنها غلبه کرد. با قرار دادن توالی های مربوط به ریکامینازها با جایگاه اختصاصی (Site Specific Recombinases) در انتهای مارکرهای انتخابی مثبت می توان این قطعات را بعد از مراحل انتخابی از ژنوم خارج کرد (۳۷).

انتخاب مثبت می شود و در نتیجه این سلول ها در محیطی که دارای هیگرومایسین و G418 است از بین می روند. از سوی دیگر، اگر سازه هدف، تصادفی داخل ژنوم وارد شود، انتهای کاست هدف جدا نمی شود و در نهایت شامل هر دو ویا حداقل یک نسخه از ژن تیمیدین کیناز می شود. این سلول ها هنگامی که با گانسیکلوویر تیمار می شوند، می میرند. با این وجود در عمل بعد از مراحل انتخاب مثبت و منفی، احتمال زنده ماندن سلول هایی که سازه به طور تصادفی وارد ژنوم آنها شده است وجود دارد. این مساله به دلیل تخریب مارکرهای انتخاب منفی طی ترانسفکشن است. ولی با گذاشتن دو مارکر انتخابی در دو انتهای سازه این احتمال کاهش می یابد (۲۹). بقا پس از مراحل انتخاب مثبت و منفی گواه خوبی برای وقوع نوترکیبی هم سان است. طول مناسب برای پایه همولوگ بین ۲kb تا ۱۰kb است (۳۰). به علت محدودیت در گنجایش ژنی pBGGT، قطعه USHBG ۲/۲kb و ۲/۵ کیلو باز DSHBG به عنوان پایه های همولوگ انتخاب شدند. تمام سازه های جایگزینی ژنی که تا کنون گزارش شده اند دارای یک مارکر انتخابی مثبت بین دو پایه همولوگ هستند (۱۳، ۱۸، ۲۰، ۲۵، ۲۶). این مطالعه اولین گزارش استفاده از استراتژی دو مارکر مثبت است که جایگزینی کامل ژن هدف را در یک مرحله نو ترکیبی هم سان تا مین می کند. در استراتژی های قبلی مثل Hit and Run (۳۱) یا Tag and Exchange (۲۶) ژن هدف طی دو مرحله نو ترکیبی هم سان جایگزین ژن بیمار می شود.

قطعه HBG سازه، حاوی کاست بیانی کامل ژن شامل پروموتور اصلی آن، اگزون ها، اینترون ها، خاتمه دهنده و 3' enhancer است (۳۲). به جای اینکه کلونینگ مستقیم قطعات تکثیر یافته در pBGGT انجام شود ابتدا، هر قطعه به طور جداگانه در وکتور pTZ577/A کلون شد. مراحل اضافی کلونینگ این مزیت را به همراه دارد که می توان هر قطعه را جداگانه تعیین توالی کرد و مناسب ترین

References

- DJ Weatherall, Gibbons Higgs OR, Olivier NF, Wood WG. The thalassaemia syndromes. 4th ed, black well science ltd, italy, 2001; 287-296pp, 150-164pp, 206-238pp
- D Rund, E Rachmilewitz. New trends in the treatment of β -thalassaemia, *Oncology hematology*, 2000; 33: 105-118
- M Sadelain, S Rivella, L Lisowski, S Samakoglu, I Riviere. Globin gene transfer for treatment of the β -thalassemias and sickle cell disease, *Best practice and research clinical hematology*, 2004; 17(3): 517-534
- S Imren, EM Fabry, AK Westernman, R Pawliuk, P Tang, MP Rosten, LR Nagel, P Leboulch, JC Eaves, RK Humphries. High-Level β -globin expression and preferred intragenic integration after lentiviral transduction of human cord blood stem cells, *Clinical*

- investigation. 2004; 114(7): 953-962
- EF Nicolini, S Imren, II-H Oh, KR Humphries, P Leboulch, EM Fabry, LR Nagel, JC Eaves. Expression of a human β -globin transgene in erythroid cells derived from retrovirally transduced transplantable human fetal liver and cord blood cells, *Blood*, 2002; 100: 1257-1264
- C May, S Rivella, A chadburn, M Sadelain. Successful treatment of murine β -thalassemia intermedia by transfer of the human β -globin gene, *Blood*, 2002; 99: 1902-1908
- P Malik, PI Arumugam, JK Yee, G Puthenveetil. Successful correction of the human cooley's anemia (beta) thalassaemia major phenotype using a lentiviral vector flanked by the chicken hypersensitive site 4 chromatin insulator. *Ann N Y Acad Sci*, 2005; 1054: 238-249
- SN Templeton, DD Lasic. Gene and cell therapy:

Therapeutic Mechanism and Strategies, second ed, Marcel Dekker, New York, 2003

9. Q Li, WD Emery, M Fernandez, H Han, G Stamatoyannopoulos. Development of viral vectors for gene therapy of β -chain hemoglobinopathies: Optimization of a β -globin gene expression cassette, *Blood*. 1999; 93: 2208-2216

10. I Plavec, T Papayannopoulou, C Maury, F Meyer. A human β -globin gene fused to the human β -globin locus control region is expressed at high levels in erythroid cells of mice engrafted with retrovirus-transducer hematopoietic stem cells. *Blood*, 1993; 81: 1384-1392

11. S Rivella, M Sadelain. Genetic treatment of severe hemoglobinopathies: the combat against transgene variegation and transgene silencing. *Semin Hematol*, 1998; 35: 112-125

12. ZH Li, PD Liu, XW Yin, CZ Guo, CC Liagn. Targeted correction of the point mutations of β -thalassemia and targeted mutagenesis of the nucleotide associated with HPFH by RNA/DNA oligonucleotides: potential for β -thalassemia gene therapy, *Blood cells molecules and diseases*. 2001; 27: 530-538

13. HZ Lu, TJ Books, MR Kaufman, JT Ley. Long targeting arms does not increase the efficiency of homologous recombination in the β -globin locus of murine embryonic stem cells. *Blood*, 2003; 102: 1531-1533

14. HS Hahm, Y Yi, KD Lee, JM Noh, L Yun, S Hwang, HK Lee. Construction of retroviral vectors with enhanced efficiency of transgene expression. *Virology Metho*, 2004; 121: 2004) 127-136

15. W Walther, U Stein. Viral vectors for gene transfer, *Drugs*. 2000; 60: 249-271

16. S Imren, E Payen, AK Westerman, R Pawliuk, EM Fabry. Permanent and panerythroid correction of murine β thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells. *PNAS*, 2002; 99: 14380-14385

17. SB Primrose, RM Twyman, RW Old. Principles of gene manipulation, 6th ed, Black well science Ltd, London, 2001

18. MK Vasquez, K Marburger, Z Intody, HJ Wilson. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *PNAS*, 2001; 98: 8403-8410

19. J Sambrook, D Russell. Molecular cloning, Third ed, CSHL Press, New York, 2001

20. Smithies, RG Gregg, SS Boggs, MA Koralewski, RS Kucherlapati. Insertion of DNA sequences into the

human chromosomal β -globin locus by homologous recombination, *Nature*. 1985; 317; 230-234

21. CD Gruenert, B Emanuela, G Novelli, A Colosimo, B Dallapiccola, F Sanguolo, KK Goncz. Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragments, *Clinical investigation*. 2003; 112: 637-641

22. MM Seidman, PM Glazer, The potential for gene repair via triple helix formation, *Clinical investigation*. 2003; 112: 487-494

23. MM Vacek, H Ma, F Gemignani, G Lacerra, T Kafri, R Kole. High-level expression of hemoglobin A in human thalassemic erythroid progenitor cells following lentiviralvector delivery of an antisense snRNA, *Blood*. 2003; 101: 104-111

24. N Lan, PR Howrey, SW Lee, AC Smith, AB Sullenger. Ribozyme-mediated repair of sickle β -Globin mRNAs in Erythrocyte precursors, *Science*. 1998; 280: 1593-1596

25. AD Sorrell, FA Kolb. Targeted modification of mammalian genomes, *Biotechnology advances*. 2005; 23: 431-469

26. U Muller. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis, *Mechanisms of development*. 1999; 82: 3-21

27. LA Joyner. Gene targeting: A Practical Approach, 2nd ed., Oxford University press, New York, 2000

28. SL Mansour, KR Thomas, MR Capecchi. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells :a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes, *Nature*. 1988; 336-348

29. JM Sedivy, A Dutriaux. Gene targeting and somatic cell genetics-a rebirth or a coming of age?, *Trends Genet*. 1999; 15: 887-90

30. AV Lanzov. Minireview gene targeting for gene thrapy: prospects, *Molecular Genetics and metabolism*. 1999; 68: 276-282

31. V Valancius, O Smithies. Testing an "in-out" targeting procedure for making subtle genomic modifications in mouse embryonic stem cells, *Mol Cell Biol*. 1991; 11: 1402-1408

32. M Trudle, F Costantini. A 3' enhancer contributes to the stage-specific expression of the human beta-globin gene, *Gene Dev*. 1987; 1: 954-61

33. GO Shcherbakova, AV Lanzov, H Ogawa, VM Filatov. Over expression of bacterial RecA protein stimulates homologous recombination in somatic mammalian cells, *Mutation Research*. 2000; 459: 65-71

34. AA Volodin, ON Voloshin, RD Camerini-Otero. Homologous recombination and RecA protein: towards a new generation of tools for genome manipulations, Trends in Biotechnology. 2005; 23: 97-102
35. M Mani, K Kandavelou, JF Dy, S Duria, S Chandrasegaran. Design, engineering, and characterization of zinc finger nucleases, BBRC. 2005;

335: 447-457

36. A Dudas, M Chovanec. DNA double strand break repair by homologous recombination, Mut. Res. 2004; 566: 131-167
37. CS Branda, SM Dymecki. Talking about a revolution: the impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice, Dev Cell, 2004; 6: 7-28
-