Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵ ، ۱-۷

بیان فاکتور رونویسی دوپامینرژیکی Nurr1 در سلول‌های انسانی به‌وسیله لنتی ویروس‌های نوترکیب

موسی گردانه Ph.D. [1*]، عباس رحیمی شم آبادی M.Sc. [2] ، عمران اسماعیل زاده M.Sc. [3]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، واحد آیت اله آملی، گروه زیست شناسی، آمل، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی- مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
۳- کارشناس ارشد ژنتیک، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mossa65@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۲

چکیده

هدف: هدف این تحقیق تولید لنتی ویروس‌های حامل ژن Nurr1 و بیان در سلول‌های انسانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: قطعه ژنی IRES-EGFP با آنزیم‌های Bgl ll/Not1 از ناقل pIRES2-EGFP جدا و با Klenow کور (Blunt) گردید. ناقل لنتی ویروسی pNL-EGFP/CMV/WPREdU3 با آنزیم‌های Nhe1/ Xho1 برش و دو سر آن کور شد. قطعه ژنی ایزوله شده به این ناقل منتقل شد تا سازه لنتی ویروسی (I) به‌وجود آید. سپس ژن Nurr1 با آنزیم‌های Xho1 و BamH1 از ناقل PCMX-NOT بریده و درون پلاسمید (I) خطی شده باSal1 وBamH1 منتقل شد تا سازه نهایی لنتی ویروسی (II) تولید گردد. برای تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب، رده سلول انسانی HEK-293T را با این پلاسمید نهایی، به‌همراه پلاسمیدهای غشایی و بسته بندی لنتی ویروس ترانسفکت شد. محیط این سلول‌ها که مملو از ذرات ویروسی شده بود جمع آوری و از ستون آمیکون عبور داده شد تا ذخیره غلیظ ویروس به‌دست آید. این ذخیره برای آلوده سازی سلول‌های هدف استفاده شد. بیان EGFP در زیر میکروسکوپ به اثبات رسید و بیان ژن Nurr1 با RT-PCR سنجیده شد.

نتایج: درستی مراحل کلونینگ با آنزیم‌های مربوطه اثبات شد. با میکروسکوپ فلورسنس بیان Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) در هر دو مرحله ترانسفکشن و ترانسدوکشن ثابت گردید. تکنیک RT-PCR بیان Nurr1 را در هردو مرحله به اثبات رسانید.

نتیجه گیری: لنتی ویروس‌های ناقل ژن انسانی Nurr1 تولید شده و به‌دنبال آلوده سازی سلول‌های انسانی HEK-293T با ویروس‌های مزبور، سلولهای فوق ژن Nurr1 را به‌طور موفقیت آمیز بیان کردند.

واژگان کلیدی: Nurr1، فاکتور رونویسی دوپامینرژیکی، لنتی ویروس، سلول HEK-293T

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جایگزینی سلولی و حفاظت نورونی در زمره روش‌های نوین و موثر مقابله با وقوع و پیشرفت بیماری‌های زوال نورونی از جمله بیماری پارکینسون مطرح است (۱). افزایش بیان و عملکرد فاکتورهای رونویسی که در تکوین نورون‌های دوپامینرژیک از پیش سازان دوران جنینی نقش اساسی دارند می‌تواند راه‌گشای این روش‌های درمانی باشد.

فاکتور رونویسی Nurr1 از مهم‌ترین عوامل شکل گیری و بقای سلول‌های دوپامین ساز به‌شمار می‌آید، به‌طوری‌که بیان آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز به‌عنوان اولین و مهم‌ترین آنزیم دخیل در بیوسنتز دوپامین وابسته به حضور فاکتور Nurr1 می باشد (۲ و ۳). فاکتور رونویسی Nurr1 یکی از اعضای خانواده گیرنده‌های هسته‌ای می‌باشد که دارای نقشی حیاتی در تکوین نورون‌های دوپامینرژیک می‌باشد (۴ و۵). مطالعات مختلف نشان دهنده این است که این پروتئین از دیگر گیرنده‌های هسته‌ای متفاوت بوده و ممکن است جزء گیرنده‌هایی باشد که بدون اتصال لیگاند عمل می‌کنند (۶). در موش‌هایی که فاقد ژن Nurr1 بودند، نورون‌های دوپامینرژیک قادر به تمایز نبوده و مارکرهای مربوط به نورون‌های دوپامینرژیک در آن‌ها حضور نداشتند (۴، ۷ و ۸). اخیرا چندین مطالعه پیشنهاد کرده‌اند که تخریب عملکرد Nurr1 در نورون‌های دوپامینرژیک، در آسیب شناسی بیماری پارکینسون دارای نقش مهمی می‌باشد و برخی پلی مورفیسم‌های مشاهده شده در این فاکتور با بیماری پارکینسون در ارتباط می‌باشند (۹-۱۱). گزارش شده است که ژن Nurr1 در کنترل متابولیسم دوپامین نیز نقش ایفا می‌کند و بیان این ژن با افزایش سن به‌طور چشم‌گیری در سلول‌های جسم سیاه مغز کاهش می‌یابد که این امر منجر به کاهش میزان دوپامین می‌شود (۱۲). تمایز سلول‌های بنیادی به نورون‌های دوپامین‌ساز به‌عنوان ابزار مهمی در سلول درمانی پارکینسون با روش جایگزینی سلولی مطرح شده است. در این فرآیند تمایز اختصاصی، Nurr1 نقش برجسته‌ای بر عهده دارد. با بیان سطح بالای فاکتور Nurr1 دو گروه مستقل توانسته‌اند جمعیت غنی شده از سلول‌های عصبی مغز میانی را تولید نمایند که ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیکی و رفتاری مربوط به نورون‌های دوپامین ساز را از خود بروز می‌دهند (۱۳). در نهایت آن‌که افزون بر نقش تمایزی Nurr1، فعالیت حفاظت نورونی این فاکتور رونویسی بر ضدالتهاب عصبی نیز به اثبات رسیده است (۱۴).

برای آن‌که بتوان به مطالعات فیزیولوژیک Nurr1 پرداخت و آزمایش‌های نورون‌زایی و حفاظت نورونی آن را به‌سهولت استمرار بخشید، اغلب بایستی افزایش بیان Nurr1 را در پیش گرفت. در این مطالعه لنتی ویروس‌های نوترکیب ساخته شده است که با آن‌ها بتوان سلول‌های تقسیم پذیر و همچنین سلول‌های تمایز یافته به‌ویژه نورون‌ها را قادر به بیان افزایشی Nurr1 ساخت.

مواد و روش‌ها

تهیه پلاسمیدهای ویروسی: ناقل‌های ویروسی شامل ناقل بسته بندی، پوششی و ناقل انتقال (۱۵) با استفاده از کیت شرکت کیاژن خالص سازی شدند.

ساب کلونینگ در ناقل لنتی ویروسی: در مرحله اول قطعه IRES-EGFP 1.6Kb با استفاده از آنزیم‌های BglII/NotI از روی ناقلpIRES2-EGFP برش داده شد و با آنزیم Klenow دو سر آن Blunt شد. به‌طور هم‌زمان ناقل pNL-EGFP که یک ناقل بیانی لنتی ویروسی می‌باشد تحت تیمار آنزیم‌های NheI/XhoI قرار داده شد که با این تیمار آنزیمی یک قطعه‌ی 752 bp مربوطه به توالی GFP داخل ناقل از آن جدا شد. سپس با استفاده از آنزیم Klenow دو سر ناقل مزبور Blunt شد. پس از الکتروفورز محصولات حاصل از واکنش‌های هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز، قطعات 1.6 Kb از ژن مورد نظر و 9 Kb ناقل از روی ژل بریده شد و با استفاده از کیت استخراج از ژل از شرکت کیاژن تخلیص شد. واکنش اتصال (لیگاسیون) با نسبت ۱ به ۳ به ترتیب برای ناقل و قطعه هدف با آنزیم لیگازT4 در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال به حجم ۵۰ میکرولیتر از باکتری‌های مستعد Top10 افزوده شد و واکنش ترانسفورماسیون با روش شوک حرارتی در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. بعد از انتقال محصول بر روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین غربال کلون‌ها با استفاده از تست‌های آنزیمی انجام گرفت و کلون مثبت به‌نام سازه شماره I نام‌گذاری شد.

در مرحله دوم قطعه ۲/۲ کیلو بازی ژن Nurr1 با استفاده از آنزیم‌های XhoI و BamHI از روی ناقل PCMX-NOT بریده

www.SID.ir

Archive of SID

شد و هم‌زمان سازه شماره I که اینک IRES-EGFP به آن متصل شده بود نیز با استفاده از آنزیم‌های SalI و BamHI خطی شد. استخراج قطعات هدف از روی ژل و واکنش اتصال مانند مرحله قبل انجام شد. بعد از مرحله ترانسفورماسیون، کشت بر روی پلیت حاوی آمپی‌سیلین انجام گرفت. شناسایی و حصول اطمینان از کلون مثبت به‌نام سازه (II) به‌وسیله آنزیم‌های محدود کننده انجام شد. بعد از تایید کلون مثبت با برش‌های مختلف آنزیمی غلظت بالای سازه نهایی به‌نام CMV-Nurr1-IRES-EGFP با استفاده از کیت کیاژن آماده شد تا در نهایت برای تولید لنتی ویروس نوترکیب به‌کار گرفته شود.

کشت سلول‌های HEK-293T: سلول‌های HEK-293T به‌عنوان مولد ویروس در محیط DMEM+10% FBS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2، ۵ درصد کشت و پاساژ داده شدند. روز قبل از ترانسفکشن، دو میلیون سلول در پلیت‌های ۱۰ سانتی‌متری مخصوص کشت سلول کشت داده شدند تا در روز بعد ۵۰ تا ۶۰ درصد پتری دیش را پر کنند. برای مرحله ترانسدوکسیون یا آلوده سازی ویروسی نیز تعداد ۵۰ هزار سلول HEK-293T در پلیت ۲۴ خانه، ۲۴ ساعت قبل از آلوده سازی کشت داده شدند.

تولید ویروس‌های نوترکیب: بعد از این‌که سلول‌ها ۵۰ تا ۶۰ درصد پلیت را پر کردند مرحله ترانسفکشن سلول‌ها انجام گرفت. ترانسفکشن سلول‌ها با پلاسمیدهای ویروسی با روش رسوب DNA- فسفات کلسیم و به‌کمک محلول HEPES انجام شد (۱۶). در این مرحله سلول‌های HEK-293T با استفاده از ۳ ناقل ویروسی که شامل ناقل انتقال (CMV-Nurr1-IRES-EGFP)، ناقل بسته بندی و ناقل غشایی می‌باشند، به‌صورت هم‌زمان ترانسفکت شد و برای مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2، ۵ درصد قرار داده شد. دوازده ساعت بعد محیط سلول‌ها تعویض شد و چهل و هشت ساعت بعد از ترانسفکشن، محیط رویی (سوپرناتان) سلول‌ها که حاوی ویروس‌های نوترکیب می‌باشد جمع آوری و با فیلترهای سرنگی ۰/۴ میکرونی عبور داده شد. برای تهیه ذخیره غلیظی از ویروس که جهت ترانسدوکسیون موثر مورد نیاز بود، محیط رویی فیلتر شده به ستون‌های Amicon-100 (شرکت Millipore) منتقل شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. در این مرحله بخش اعظم محیط رویی از فیلتر ستون عبور کرده و بخش کوچکی از آن که حاوی ذرات ویروسی بود به‌عنوان ذخیره (استوک) تغلیظ شده ویروسی جمع آوری شد.

آلوده کردن سلول‌های هدف با ویروس نوترکیب: غلظت‌های مختلف ذخیره ویروسی مستقیما برای آلوده کردن سلول‌های هدف مورد استفاده قرار گرفت و ۷۲ ساعت بعد نیز از سلول‌های بیانگر EGFP در زیر میکروسکوپ فلورسنس عکس‌برداری شد.

RT PCR: برای انجام RT-PCR ابتدا cDNA سلولی تهیه شد. برای این‌کار سلول‌های ترانسفکت شده با تریپسین تیمار و جمع‌آوری شد. پس از سانتریفوژ، RNA سلول‌ها با محلول RNAX و طبق دستورالعمل مربوطه با استفاده از کیت شرکت کیاژن استخراج شد. بعد از تعیین غلظت RNA استخراج شده به‌ازای یک میکرولیتر از RNA استخراج شده یک میکرولیتر DNase به آن اضافه شد. سپس به‌کمک آنزیم Reverse Transcriptase و یک هگزامر تصادفی از آن cDNA ساخته شد. برای انجام PCR از یک جفت پرایمر اختصاصی Nurr1 استفاده شد تا بخشی از cDNA مربوط به این ژن تکثیر شد.

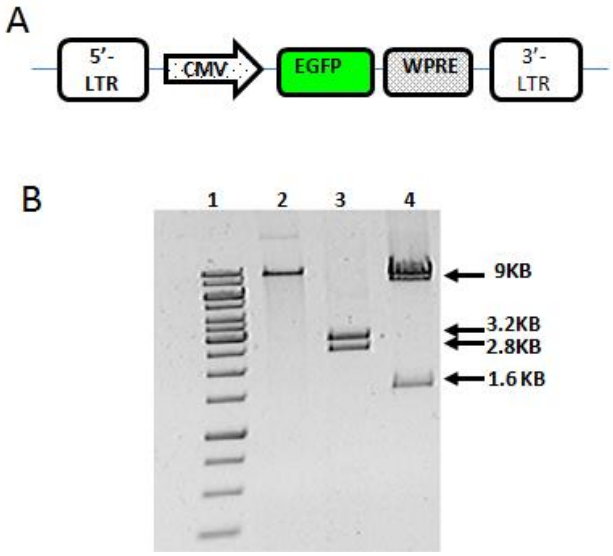
نتایج

تولید موفقیت آمیز سازه‌ها

برای آنکه ترانسفکشن و ترانسدوکشن در مراحل اولیه تست و از تولید موفقیت آمیز ویروس نوترکیب اطمینان حاصل شود، لازم است که ژن گزارشگر (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) نیز همراه با Nurr1 در سازه لنتی ویروسی شماره نهایی گنجانده شود. برای این‌کار، ابتدا IRES-EGFP در ناقل انتقال لنتی ویروسی وارد شد تا سازه شماره I به‌دست آید. صحت ساخت این سازه با برش آن به‌وسیله آنزیم‌های مختلف به اثبات رسید (شکل ۱).

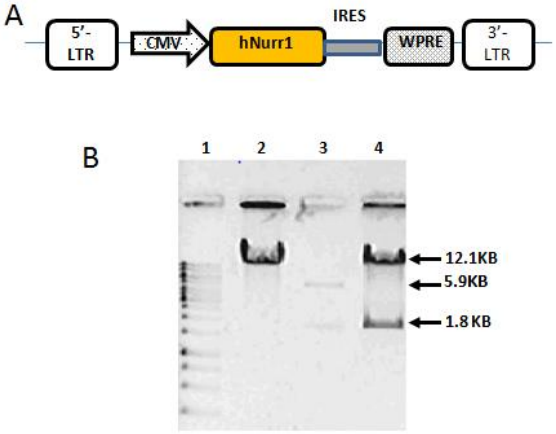
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: ساخت سازه لنتی ویروسی (I). A: شمای خطی از سازه لنتی ویروسی (I) که ناقل قطعه IRES-EGFP می باشد. B: تست درستی پلاسمید I با برش آنزیمی و ژل الکتروفورز. از چپ به راست: ۱- 1Kb DNA Ladder ، ۲- پلاسمید اولیه انتقال، ۳- پلاسمید حاوی قطعه IRES-EGFP ، ۴- سازه لنتی ویروسی (I). تمام نمونه‌ها با آنزیم‌های Sfi1/BamH 1 برش یافته اند. قطعات مورد انتظار برای پلاسمیدها شامل 9 KB برای پلاسمید اولیه انتقال، قطعات 3.2 KB و 2.8 KB برای پلاسمید حاوی قطعه IRES-EGFP ، و قطعات 1.6 KB . 8.8 KB برای پلاسمید (I).

پلاسمید بیانی (A) ناقل ژن Nurr1 به‌نام PCMX-NOT از آزمایشگاه Dr.T.Perlmann در سوئد تهیه و با آنزیم‌های XhoI و BamHI برش داده شد تا قطعه ۲/۲ کیلوبازی Nurr1 جدا شود. سازه شماره I نیز با آنزیم‌های SalI و BamHI برش داده شد تا پذیرای قطعه ۲/۲ کیلوبازی Nurr1 شود. بدین ترتیب سازه لنتی ویروسی (II) به‌عنوان سازه نهایی انتقال به‌وجود آمد که مجموعه CMV-Nurr1-IRES-EGFP را با خود حمل می‌کرد (شکل ۲-A). آنالیز نمونه کلون به‌دست آمده با چندین دسته برش آنزیمی و ژل الکتروفورز درستی آنرا به اثبات رساند و برای نمونه این آنالیز با یک ست آنزیم در شکل (۲-B) نشان داده شده است.

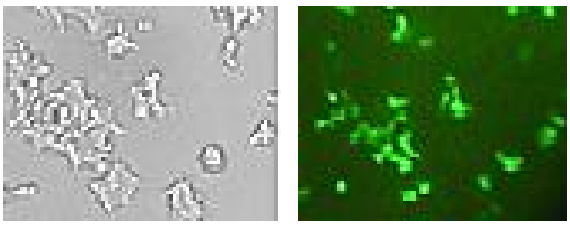


شکل ۲: ساخت سازه لنتی ویروسی (II) A: شمای خطی از سازه لنتی ویروسی (II) که ناقل ژن Nurr1 و ژن گزارشگر EGFP می‌باشد. B: تست صحت پلاسمید (II) با برش آنزیمی و ژل الکتروفورز. نمونه‌ها به‌ترتیب از چپ به راست:۱- 1KB DNA Ladder، ۲- سازه لنتی ویروسی (I)، ۳- پلاسمیدA حاوی ژن hNurr1 ، سازه لنتی ویروسی (II) به‌عنوان کلون مثبت. همگی این نمونه‌ها با آنزیم EcoR1 برش یافته‌اند. قطعات مورد انتظار برای پلاسمیدهای برش یافته به‌ترتیب عبارتند از: 1.8Kb و12.1Kb برای پلاسمید (II) و12Kb برای پلاسمید (I)، 1.8 و5.9Kb برای پلاسمید A .

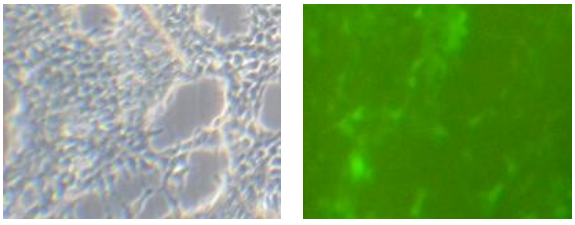
www.SID.ir

Archive of SID

موفقیت ترانسفکشن و ترانسدوکشن با بیان ژن گزارشگر EGFP برای تولید ویروس نوترکیب و بر طبق دستور العمل بخش روش‌ها، سلول‌های HEK-293T با سازه لنتی ویروسی (II) به‌همراه سازه‌های بسته بندی و غشایی ویروس ترانسفکت شدند. سلول‌های ترانسفکت شده ۲۴ ساعت بعد در زیر میکروسکوپ فلورسنس بررسی شده و تصویر آن‌ها تهیه شد. این بررسی بیان ژن EGFP را نشان داد (شکل ۳). برای ترانسدوکشن ویروسی، محیط رشد سلول‌های ترانسفکت شده که مملو از ذرات ویریونی بود جمع آوری وتغلیظ شد تا ذخیره ویروسی غلیظ به‌دست آید. سپس گروه جدیدی از سلول‌های HEK-293T برای ترانسدوکشن با این ذخیره غلیظ به‌کار برده شد. این سلول‌ها نیز ۴۸ ساعت پس از ترانسدوکشن در زیر میکروسکوپ مشاهده شد و این بررسی بیان EGFP را به اثبات رسانید (شکل ۴).



شکل ۳: بیان EGFP در ۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن در سلول‌های HEK-293T . سلول‌های مزبور با سازه لنتی ویروسی (II) به‌همراه سازه‌های بسته بندی و غشائی ویروس ترانسفکت شده‌اند.



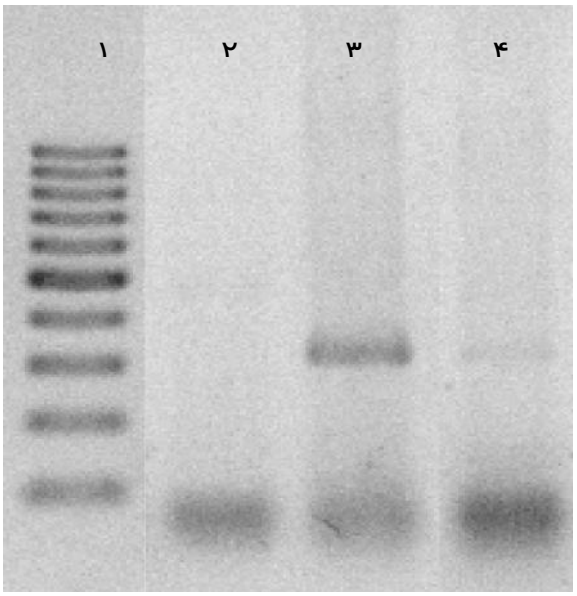
شکل ۴: بیان EGFP در ۴۸ ساعت بعد از ترانسدوکشن سلول‌های HEK-293T. سلول‌های مزبور با ذخیره تغلیظ شده لنتی ویروسی آلوده شده اند.

افزایش بیان ژن Nurr1

متعاقب بیان موفقیت آمیز ژن گزارشگر EGFP هم در مرحله ترانسفکشن و هم ترانسدوکشن، میزان بیان Nurr1 نیز به‌عنوان ترانسژن اصلی با روش RT-PCR سنجیده شد. پرایمرهای زیر برای تکثیر قطعه ۳۰۱ جفت بازی از ژن Nurr1 مورد استفاده قرار گرفت:

Fwd: 5’-5’-CGACATTTCTGCCTTCTCCT-3’
Rv: 5’-5’-GAAAGGTAAGGTGTCCAGGA-3’

نتیجه آزمایش‌های مزبور نشان داد که ژن Nurr1 به مقدار قابل توجهی در مرحله ترانسفکشن و تا حدود متوسط در مرحله ترانسدوکشن بیان شده است (شکل ۵). این نتایج موفقیت تولید ویروس‌های نوترکیب و بیان ژن Nurr1 را در سلول‌های انسانی به اثبات رسانید.



شکل۵: بیان ژن Nurr1 در سطح RNA در سلول‌های ترانسفکت شده و ترانسدوکت شده. (۱) مارکر 100 bp Ladder ، (۲) کنترل آب بدون سلول، (۳) سلول‌های ترانسفکت شده با pLV-hNurr1، (۴) سلول‌های ترانسفکت شده با pLV-hNurr1

بحث

ژن درمانی یک روش قدرتمند برای درمان بیماری‌های ژنتیکی به‌شمار می‌رود که در این راستا لنتی ویروس‌ها به‌دلیل توانایی بالای آن‌ها در القا و بیان طولانی مدت ژن هدف در ژنوم سلول، یکی از ابزارهای بسیار قوی برای ژن درمانی محسوب می‌شود.

در بیماری‌های زوال نورونی همچون پارکینسون حفاظت نورون‌ها در برابر تخریب مطرح می‌شود. تحقیقات نشان داده است که بیان فاکتورهای موثر مانند Nurr1 نقش موثری در حفاظت و بقاء نورون‌ها ایفا می‌کنند به‌طوری‌که Nurr1 به‌عنوان مهم‌ترین فاکتور شکل‌گیری و بقای سلول‌های دوپامین ساز در ناحیه جسم سیاه به‌شمار می‌آید (۱۷ و ۱۸). تقویت بیان این فاکتور در مغز و یا پیوند سلول‌های مناسب بیان کننده این فاکتور به بافت مغزی می‌تواند راه‌گشای حفاظت نورونی در بیماری‌های زوال نورونی باشد (۱۸ و ۱۹).

در این پژوهش فاکتور رونویسی Nurr1 تحت سیستم‌های بیان

www.SID.ir

Archive of SID

دو ژنی در ناقلین لنتی ویروسی کلون شد به‌طوری‌که بعد از ژن قطعه IRES-EGFP قرار گرفت تا بیان ژن‌ها را در سلول‌های هدف در زیر نور فلورسنت به‌طور مستقیم مشاهده کنیم. IRES در زمان نسخه برداری سبب می‌شود که tRNA بعد از رسیدن به کدون پایانی ژن اول، اتصال خود را به mRNA ادامه داده و ژن دوم را نیز نسخه برداری کند بنابراین بیان ژن EGFP نشان‌دهنده بیان ژن اول در سیستم های بیان دو ژنی می‌باشد.

در این مطالعه از ناقلین لنتی ویروسی برای انتقال ژن استفاده شد. لنتی ویروس‌ها به‌دلیل داشتن خصوصیات برجسته در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته اند .این ویروس‌ها متعلق به خانواده رترو ویریده بوده و همانند رترو ویروس‌ها قادرند پس از ورود به سلول میزبان ژنوم خود را به‌داخل ژنوم میزبان وارد سازند. رترو ویروس‌ها زمانی قادرند این کار را انجام دهند که سلول در حال تقسیم باشد ولی لنتی ویروس‌ها می‌توانند بدون نیاز به تقسیم سلولی وارد هسته سلول میزبان شده و ژنوم خود را به‌داخل ژنوم میزبان متصل کنند، از این رو نامزد مناسبی برای ژن درمانی سلول‌های غیر تقسیم شونده از قبیل سلول‌های عصبی به‌شمار می‌روند (۲۰). در این مطالعه ما توانستیم لنتی ویروس‌های نوترکیب ناقل ژن Nurr1 را با موفقیت تولید کنیم که می‌توانند در مطالعات بعدی به‌منظور بررسی افزایش بیان این ژن در مقابله با عوامل گوناگون از جمله رادیکال‌های آزاد و فاکتورهای متاثر کننده سلول‌های عصبی مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه گیری

در این پژوهش کاربرد موفقیت آمیز ناقلین لنتی ویروسی در انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی مشخص شد و نشان داده شد که این ناقلین می توانند در درمان بیماری های درگیر کننده سیستم عصبی از قبیل آلزایمر و پارکینسون مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل یک طرح پژوهشی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت اله آملی در آمل، مازندران می‌باشد و کلیه هزینه‌های آن توسط این دانشگاه تامین شد.

منابع

1-Mandel S, Grünblatt E, Riederer P, Gerlach M, et al. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease : an update on progress. CNS Drugs. 2003; 17(10): 729-62.

2-Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TD, Gage FH. Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. Development. 1999; 126: 4017–4026.

3-Kim KS, Kim CH, Hwang DY, et al. Orphan nuclear receptor Nurr1 directly transactivates the promoter activity of the tyrosine hydroxylase gene in a cell-specific manner. J. Neurochem. 2003; 85 (3): 622–34.

Le WD, Conneely OM, Zou L, He Y, et al. Selective agenesis of mesencephalic dopaminergic neurons in Nurr1-deficient mice. Exp. Neurol. 1999; 159: 451–458.

4-Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, et al. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. Science. 1997; 276: 248–250.

5-Wang Z, et al. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. Nature. 2003; 423(6939): 555–560.

6-Saucedo-Cardenas O, et al. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(7): 4013–4018.

6-Castillo SO, et al. Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. Mol Cell Neurosci. 1998; 11(1-2): 36–46.

7-Zheng K, Heydari B, Simon DK. A common NURR1 polymorphism associated with Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. Arch Neurol. 2003; 60(5): 722–725.

8- Grimes DA, et al. Translated mutation in the Nurr1 gene as a cause for Parkinson's disease. Mov Disord. 2006; 21(7): 906–909.

9- Le W, Conneely OM, He Y, Jankovic J, et al. Reduced Nurr1 expression increases the vulnerability of mesencephalic dopamine neurons to MPTP-induced injury. J Neurochem. 1999; 73(5): 2218–2221.

10- Zhang L, Le W, Xie W, et al. Age-related changes in dopamine signaling in Nurr1 deficient mice as a model of Parkinson's disease. Neurobiol Aging. 2012; 33(5): 1001.

11- Kitagawa H, Ray WJ, Glantschnig H, et al. A regulatory circuit mediating convergence between

www.SID.ir

Archive of SID

Nurr1 transcriptional regulation and Wnt signaling. Mol Cell Biol. 2007; 27(21): 7486-7496.

12- Saijo K, Winner B, Carson CT, et al. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death, Cell. 2009; 137(1): 47-59.

13- Esmaeilzadeh E, Gardaneh M, Vaziri HR. The Concomitant Effect of Shikonin and Glutathione Peroxidase-1 on Enhanced Survival of Dopaminergic Neurons against Parkinsonian Toxicity. J Cell Tissue. 2012; 3(2): 153-160.

14- Rahimi Shamabadi A, Gardaneh M, Alipanah M, Gharib E. Transfectability and transducibility of chicken liver cell line LMH compared to human cell line HEK-293T. J Cell Tissue (Arak). 2011; 1(2): 47-56.

15- Alavian KN, Scholz C, SimonHH. Transcriptional regulation of mesencephalic dopaminergic neurons: the full circle of life and death. Mov Disord. 2008; 23:319 –328.

16- Gardaneh M. Dopamine-synthesizing neurons: an overview of their development and function. Irn J Biotechno. 2010: l 8: 213-28. Review

17- Hermanson E, Joseph B, Castro D, Lindqvist E, et al. Nurr1 regulates dopamine synthesis and storage in MN9D dopamine cells. Exp Cell Res. 2003; 288: 324 –334.

18- Wong L-F, Goodhead L, Prat C, Mitrophanous KA, et al. Lentivirus-Mediated Gene Transfer to the Central Nervous System: Therapeutic and Research Applications. HUMAN GENE THERAPY. 2006; 17(1): 1–9.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Spring 2016; 7(1): 1-7

Expression of Dopaminergic Transcription Factor Nurr1 in Human Cells via Recombinant Lentiviruses

Gardaneh M, Ph.D.[1]*, Rahimi-Shamabadi A, M.Sc.[2], Esmaeilzadeh E, M.Sc.[3]

1. Department of Biology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
2. Postgraduate Student, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran.
3. Research Assistant, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran.

* Email corresponding author: mossa65@yahoo.com

Received: 6 Jul. 2015 Accepted: 24 Jul. 2015

Abstract

Aim: The aim of this study was to generate recombinant lentiviruses carrying Nurr1 to express it in human cells.

Material and methods: The IRES-EGFP fragment was isolated from the pIRES2-EGFP vector using restriction enzymes BglII/NotI and made blunt-ended using Klenow. The transfer vector PNL-EGFP/CMV/WPREdU3 was digested with NheI/XhoI and made blunt-ended. Finally, the isolated IRES-EGFP fragment was inserted into this lentivirus vector to generate lentivirus construct (I). The human Nurr1 gene was then isolated from the PCMX-NOT vector using BamHI and XhoI and inserted into construct (I) pre-digested with BamHI and SalI. At this step lentivirus construct (II) as our final transfer construct was generated. In order to generate recombinant lentiviruses, we then transfected the HEK-293T cell line with transfer vector plus packaging and envelope vectors. Cell medium full of virus particles was collected and passed through Amicon filters to produce a concentrated virus stock. The stock was ultimately used for transduction of fresh HEK-293T cells. EGFP expression was shown under fluorescent microscope and Nurr1 expression was analyzed using RT-PCR.

Results: Enzymatic tests confirmed the correct cloning of the hNurr1gene into the lentivirus backbone. Observation by fluorescent microscopy showed EGFP expression post-transfection and post-transduction. RT-PCR demonstrated Nurr1 expression at both stages.

Conclusion: In this study, lentiviruses carrying the human Nurr1 gene were produced and used for transduction of human cell line HEK-293T. The transduced cells successfully expressed the Nurr1 gene.

Keywords: Nurr1, Dopaminergic, Transcription factor, Lentivirus, HEK-293T

www.SID.ir