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 Ph.D.[1]، محمد رضا نوری دلویی Ph.D.[2]، کامران علی مقدم Ph.D.[3]، محمدعلی شکرگزار Ph.D.[4]
کیهان آزادمنش Ph.D.[5]، احمدرضا نیاورانی Ph.D.[3]، بهاره ربانی M.Sc.[1]، رضوان باقری M.Sc.[1]، میترا خلیلی M.Sc.[1]
فرشته مریمی M.D.[1]، سیروس زینلی Ph.D.[1*]

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

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: ۱۶۶۷-۱۳۱۸۵، انیستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی، گروه ژنتیک
پست الکترونیک: Email: 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 هدف‌گیری ژن بتاگلوبین

مواد و روش‌ها: قطعات مختلف سازه با روش PCR تکثیر و در وکتور pTZ57T/A کلون و سپس در pBGGT ساب کلون و پلاسمید نهایی ساخته شد. تمام کلون‌های بینابینی و پلاسمید نهایی با روش‌های 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: بتاتالاسمی، هدف گیری ژنی، نوترکیبی همسان

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

مقدمه

بیماری بتا تالاسمی یکی از شایع‌ترین اختلالات ژنتیکی در دنیا است. در این بیماری سنتزبتاگلوبین 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 بتاگلوبین 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 داشتن عوارضی مانند واکنش ایمونولوژیک 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 بتاتالاسمی 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 تیتر ویروس 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

Archive of SID
www.SID.ir

تصادفی صورت می‌گیرد و این مساله می‌تواند باعث خاموش شدن ژن‌های مفید و یا فعال شدن انکوژن‌ها و ایجاد مسایلی مانند بدخیمی شود (۱۳). احتمال ایجاد ویروس‌های نوترکیب یا وحشی در هنگام استفاده از وکتورهای ویروسی وجود دارد، هر چند این احتمال بسیار ناچیز است (۸، ۱۴). سلول‌های بنیادی خون‌ساز 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، کاملا ضروری است. در ژن درمانی با وکتورهای ویروسی تعداد نسخه‌های ژنی وارد شده در ژنوم قابل کنترل نیست و نسبت ژنی فوق به هم می‌خورد (۱۵، ۱۶). ولی در روش هدف‌گیری ژنی این نسبت طبیعی باقی می‌ماند. اخیرا به دلیل وجود معایب فوق به روش‌های هدف‌گیری ژنی (Gene Targeting) برای ژن درمانی توجه بیشتری شده است.

روش ایده‌آل برای ژن درمانی، اصلاح یک ژن جهش یافته به صورت مستقیم و بدون ایجاد تغییر درمحل‌های 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، هدف‌گیری ژنی نامیده می‌شود. میزان بروز Homologous Recombination حدود 10^{-5} تا 10^{-7} تخمین زده می‌شود (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 هدف‌گیری ژن بتاگلوبین طراحی و احتمال بروز نوترکیبی همسان در سلول‌های رده پستانداران با استفاده از این سازه مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

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 ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین استفاده شد. کلیه دستکاری‌های مولکولی از قبیل تخلیص پلاسمید و DNA، T/A کلونینگ و واکنش‌های آنزیمی بر اساس دستورالعمل شرکت‌های 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.

پرایمرها و واکنش زنجیرهای پلی مراز

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 ۱/۲درصد رنگ‌آمیزی 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 pTZ57T/A (فرمنتاس، لیتوانی) کلون شد. و پلاسمیدهای: pT-TK2، PT-TK1 pT-DSHBG، pT-USHBG، pT-HBG، pT-HYG، pT-NEO حاصل شد. 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 باند۱۳/۳ 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 میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۲میلی‌مولار گلوتامین و ۱۰درصد سرم جنین گوساله و در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دی اکسیدکربن و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد.

یک روز قبل از ترانسفکشن تعداد $1/6\times10^6$ سلول Cos-7 در

Archive of SID
www.SID.ir

پلیت ۱۰۰ میلی‌متری کشت داده شد. سلول‌ها انکوبه شدند تا تراکم سلول در سطح به ۷۰–۵۰ درصد برسد. قبل از ترانسفکشن، محیط کشت سلول‌ها با ۷میلی‌لیتر محیط تازه تعویض شد. سلول‌ها با ۴ میکروگرم DNA (سازه ژنی) و با استفاده از کیت پلی‌فکت (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 G۴۱۸ به ترتیب با غلظت‌های ۱۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۶۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر به محیط اضافه شد. محیط کشت هر ۳ روز یک‌بار تعویض شد. پس از گذشت ۹ روز از شروع ترانسفکشن داروی گان سیکلوویر با غلظت ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط کشت اضافه شد و درمان سه دارویی به مدت یک هفته ادامه یافت. کلونی‌های باقی‌مانده به پلیت‌های ۶۰ میلی‌متری 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.

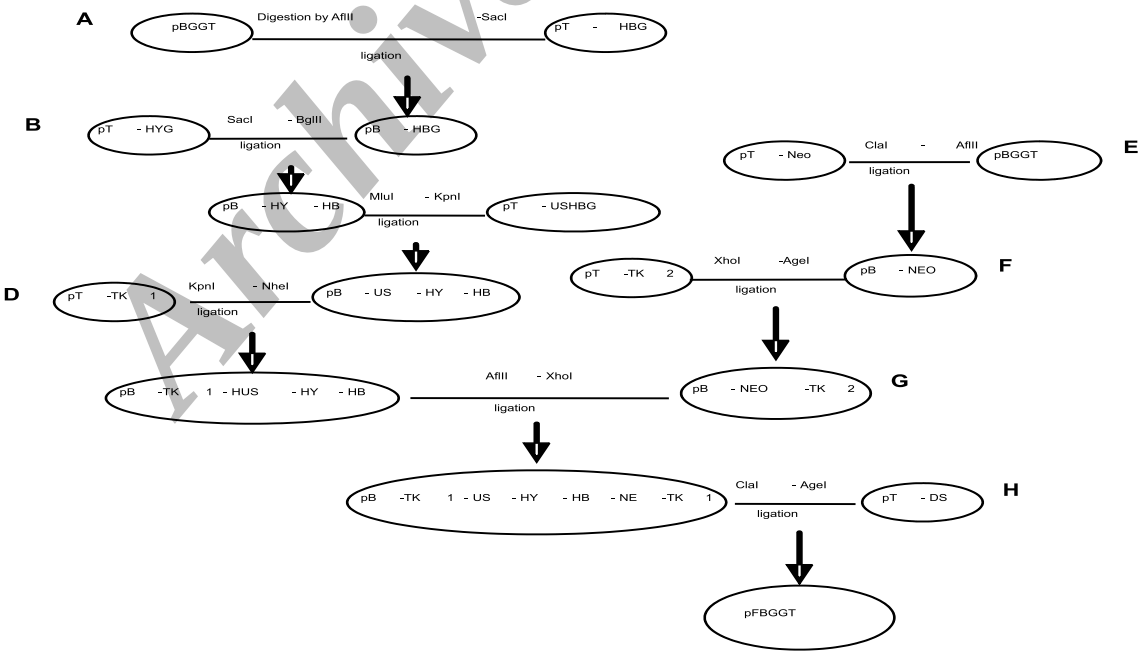
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) بر روی DNA سلول‌های انتخاب شده

PCR برای قطعات TK2، TK1 هیگرومایسین، نئومایسین و قطعه‌ای که متشکل از ۳۰۰ باز بالا دست قطعه USHBG روی ژنوم و خود USHBG به علاوه ۴۰۰ باز از انتهای '۵ هیگرومایسین است، گذاشته شد. PCR قطعه آخر با پرایمر جلوبر SUS-F 5' TGT-GTA-TCT-GCG-AGA-GAA-GTC-3' و معکوس HYGRO-R4 '5-TCA-GGC-TTT-TTC-ATC-ACG 3' گذاشته شد. محصولات PCR فوق در دو جهت تعیین توالی شد.

یافته‌ها

نتایج PCR و کلونینگ

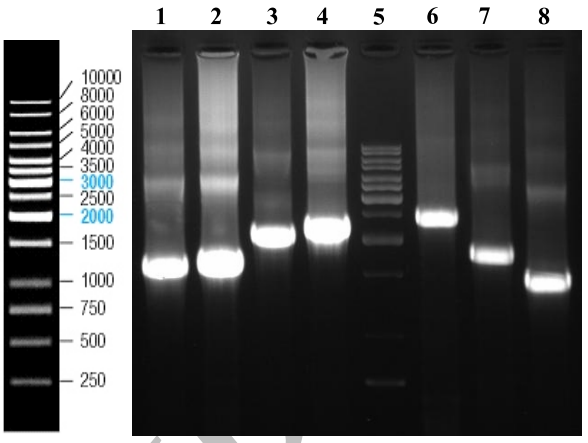
هفت قطعه DNA به روش PCR تکثیر شد. ژن کامل تیمیدین کیناز از روی ژنوم HSV-1 به دو فرم TK2 و TK1 تکثیر شد. ژن بتاگلوبولین و نواحی بالا دست و پایین دست آن از روی DNA ژنومی انسان به صورت سه قطعه HBG، USHBG، DSHBG تکثیر شد. ژن‌های مقاومت به نئومایسین و هیگرومایسین با پروموتورها و خاتمه دهنده‌های یوکاریوتی به ترتیب از روی pRc/CMV2 pCDNA3.1+/Hygro (Invitrogen، آمریکا) تکثیر یافتند (جدول۲). 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 و آنالیز آنزیمی تایید شد. در آخر نیز pFBGGT با PCR (شکل ۲) و هضم آنزیمی (شکل۳) تایید و در دو جهت تعیین توالی شد.



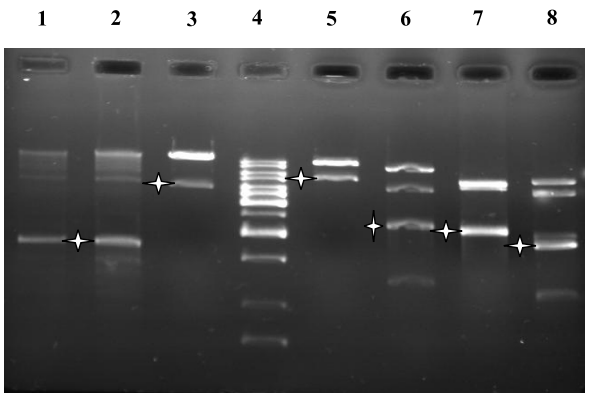
شکل ۱: مراحل ساخت PFBGGT: PT-HBG و pBGGT با آنزیم‌های *SacI-AflII* هضم و با اتصال قطعه HBG در pBGGT پلاسمید pB-HBG حاصل شد (A). pT-HYGRO و pB-HBG با آنزیم‌های *BglII-SacI* هضم و با اتصال قطعات با آنزیم *لیگاز pB-HYG-HBG* ساخته شد (B). pT-USHBG و pB-HY-HB با آنزیم‌های *KpnI-MluI* هضم و پس از اتصال قطعات 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، pB-TK1-US-HY-HB به دست آمد (D). pT-NEO و pBGGT با آنزیم‌های *ClaI-AflII* هضم و با اتصال قطعات، pB-NEO ساخته شد (E). pT-TK2 و pB-NEO با آنزیم‌های *AgeI-XhoI* هضم و پس از اتصال pB-NEO-TK2 ساخته شد (F). pB-NEO-TK2 و pB-TK1-US-HY-HB با آنزیم‌های *XhoI-AflII* هضم و پس از اتصال قطعات مربوطه pB-TK1-US-HY-HB-NEO-TK2 حاصل شد (G). این پلاسمید و pT-DSHBG با آنزیم‌های *AgeI-ClaI* 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

Archive of SID

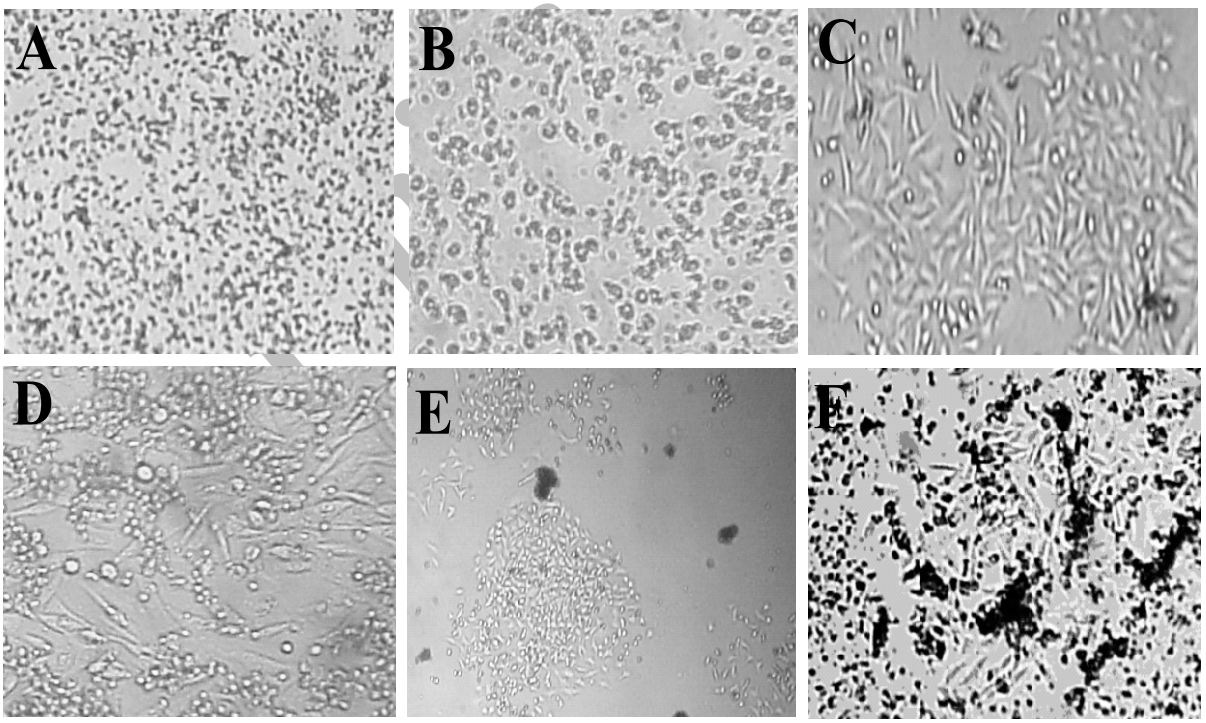
www.SID.ir



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



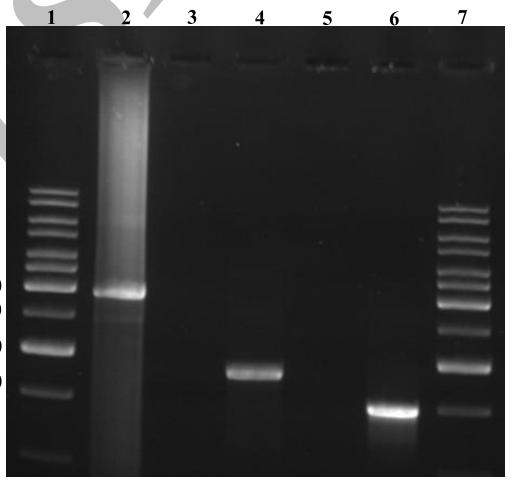
شکل ۴: ترانسفکشن سلول‌های Cos-7 با DNA برهنه: سلول‌های ترانسفکت نشده (کنترل) تحت درمان با هیگرومایسین (A)، G418 (B) و گا نسیکلووویر (C). در مورد A و B تمام سلول‌ها مردند ولی سلول‌های کنترل تحت درمان با گان سیکلووویر زنده ماندند. سلول‌های ترانسفکت شده تحت درمان با هیگرومایسین و G418 پس از ۳ روز (D) و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

www.SID.ir

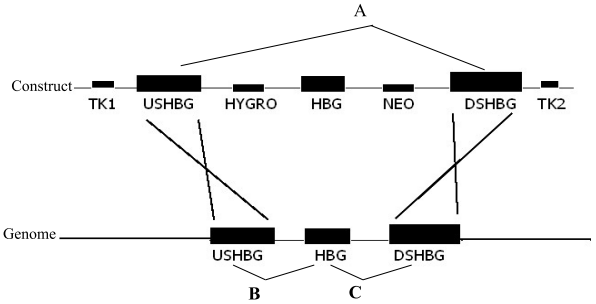
نتایج تعیین توالی، فقدان هر گونه جهش بیماریزا در ژن بتاگلوبین و دیگر قطعات pFBGGT را تایید کرد. مقدار موثر هیگرومایسین، G418 و گانسیکلوویر روی رده سلولی Cos-7 در این مطالعه مشخص شد. نتایج بررسی فعالیت بیولوژیک مارکرهای انتخابی مثبت و منفی (شامل هیگرومایسین، نئومایسین، TK2 و TK1 با ترانسفکشن سلول‌های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

نتایج ترانسفکشن سلول‌های Cos-7 باDNA 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 ۱کیلوباز 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 (۱۸۰۰bp)، ۵- TK2 تکثیر نشده، ۶- نئومایسین (۱۴۹۰bp).



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.

DNA این کلونی‌ها استخراج و با PCR آنالیز شد. نتایج PCR قطعات TK2 و TK1 منفی و هیگرومایسین، نئومایسین و قطعه متشکل از ۳۰۰جفت 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 بتاتالاسمی وجود دارد. برخی از استراتژی‌های متداول مورد استفاده در این زمینه شامل: استفاده از وکتورهای ویروسی (۷-۴)، وکتورهای هدف‌گیری ژن (gene targeting vectors) (۱۳، ۱۸، ۲۰)، نوترکیبی هم‌سان قطعات کوچک (۲۱)، الیگونوکلئوتیدهای 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 بتاگلوبولین است. هدف‌گیری ژنی با هدف Gene knock in, Gene knock out یا ایجاد موتاسیون‌های دقیق در ژن انجام می‌شود (۲۵). هدف‌گیری ژنی روشی مطلوب برای تصحیح نقایص ژنتیکی است، زیرا نواحی دیگر ژنوم را تحت تاثیر قرار نمی دهد. همچنین میزان طبیعی بیان ژن را نیز طی مراحل تمایز سلول‌ها تغییر نمی‌دهد (۲۶). تا به حال دو نوع وکتور هدف‌گیری ژنی مورد استفاده قرار گرفته است: وکتورهای Replacement و وکتورهای Insertion. وکتورهای Replacement برای ایجاد موتاسیون‌های دقیق (Subtle Mutation) ایده‌آل هستند (۲۷). سازه مورد استفاده در این تحقیق یک وکتور Replacement است و برای تصحیح موتاسیون‌های ژن بتاگلوبولین طراحی شده است. طبق استراتژی انتخاب مثبت- منفی (positive-negative selection: PNS) که اولین بار توسط منصور و همکاران (۲۸) پیشنهاد شده است وکتور هدف‌گیری ژن دارای دو پایه هموlوگ، 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 هموlوگ، 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 هموlوگ (USHBG or DSHBG) و ژن هموگلوبین (شکل B۶ و C۶) به جای پایه هموlوگ دیگر (شکل A۶) انجام شود سلول نوترکیب تنها شامل یک مارکر

Archive of SID

www.SID.ir

انتخاب مثبت می شود و در نتیجه این سلول‌ها در محیطی که دارای هیگرومایسین و G۴۱۸ است از بین می‌روند. از سوی دیگر، اگر سازه هدف، تصادفی داخل ژنوم وارد شود، انتهای کاست هدف جدا نمی‌شود و در نهایت شامل هر دو ویا حداقل یک نسخه از ژن تیمیدین کیناز می‌شود. این سلول‌ها هنگامی که با گانسیکلوویر تیمار می‌شوند، می‌میرند. با این وجود در عمل بعد از مراحل انتخاب مثبت و منفی، احتمال زنده ماندن سلول‌هایی 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 می‌یابد (۲۹) . بقا پس از مراحل انتخاب مثبت و منفی گواه خوبی برای وقوع نوترکیبی‌هم‌سان 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 کیلوباز DSHBG به عنوان پایه‌های همولوگ انتخاب شدند. تمام سازه‌های جایگزینی ژنی که تا کنون گزارش شده‌اند 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 هم‌سان تا مین می کند. در استراتژی‌های قبلی مثل Hit and Run (۳۱) یا Tag and Exchange (۲۶) ژن هدف طی دو مرحله نوترکیبی هم‌سان جایگزین ژن بیمار می‌شود.

قطعه HBG سازه، حاوی کاست بیانی کامل ژن شامل پروموتور اصلی آن، اگزون‌ها، اینترون‌ها ،خاتمه دهنده و enhancer'3 است (۳۲). به جای اینکه کلونینگ مستقیم قطعات تکثیر یافته در pBGGT انجام شود ابتدا، هر قطعه به طور جداگانه در وکتور pTZ57T/A کلون شد. مراحل اضافی کلونینگ این مزیت را به همراه دارد که می‌توان هر قطعه را جداگانه تعیین توالی کرد و مناسب‌ترین نسخه از ژن کلون شده را برای سازه نهایی انتخاب کرد. pBGGT به عنوان پلاسمید میزبان کاست هدف‌گیری ژن، برای این هدف طراحی شد و در نتیجه تمام مراحل ساب کلونینگ به طور جهت‌دار صورت گرفت و این فرآیند موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه پروژه شد.

عمده‌ترین ایراد استراتژی هدف‌گیری ژن، فراوانی بسیار پایین نوترکیبی هم‌سان (Homologous Recombination) در سلول‌های پستانداران است. این میزان بین 10^{-5}–10^{-7} است (۱۸).

برخی از روش‌ها برای بهبود و افزایش فراوانی HR به کار گرفته شده است. یکی از این روش‌ها تولید بیش از حد و گذرای ریکامبیناز فعال مثل Rec A یا RAD51 در سلول است که میزان HR را افزایش می‌دهد (۳۳، ۳۴). هم‌اکنون نوکلئازهای انگشت روی (Zinc Finger Nucleases) جهت القای شکست در DNA دو رشته‌ای در جایگاه‌های مورد نظر قابل طراحی‌اند (۳۵). به نظر می‌رسد که این روش در پیشبرد مطالعات هدف‌گیری ژنی کاربرد داشته باشد. ایجاد شکست‌های مصنوعی در DNA دو رشته‌ای در دو انتهای ناحیه هم‌سان در ژنوم و سازه می‌تواند موجب افزایش میزان HR شود (۳۰، ۳۶). همچنین هر نوع پیشرفت در سیستم‌های ارایه ژن به داخل سلول می‌تواند موجب افزایش تعداد سلول‌های نوترکیب در جمعیت سلولی شود. سازه مورد استفاده در این تحقیق به گونه‌ای طراحی شده که در نهایت ژن‌های بتاگلوبولین فعال را در سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک بیماران مبتلا به بتاتالا سمی، جایگزین ژن جهش یافته نماید. حساسیت و تعداد کم این سلول‌ها چالش‌هایی بر سر راه ژن درمانی هستند که باید بر آنها غلبه کرد. با قرار دادن توالی‌های مربوط به ریکامبینازها با جایگاه اختصاصی (Site Specific Recombinases) در انتهای مارکرهای انتخابی مثبت می‌توان این قطعات را بعد از مراحل انتخابی از ژنوم خارج کرد (۳۷).

References

1. 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

2. D Rund, E Rachmilewitz. New trends in the treatment of β-thalassaemia, Oncology hematology, 2000; 33: 105-118

3. 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

4. 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

5. 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

6. C May, S Rivella, A chadbum, M Sadelain. Successful treatment of murine β-thalassemia intermedia by transfer of the human β-globin gene, Blood, 2002; 99: 1902-1908

7. P Malik, PI Arumugam, JK Yee, G Puthenveetil. Successful correction of the human cooley's anemia (beta) thalassemia major phenotype using a lentiviral vector flanked by the chicken hypersensitive site 4 chromatin insulator. Ann N Y Acad Sci, 2005; 1054: 238-249

8. SN Templeton, DD Lasic. Gene and cell therapy:

Archive of SID
www.SID.ir

Therapeutic Mechanism and Strategies, second ed, Marcel Dekker, New York, 2003
9. Q Li, WD Emery, M Fernandez, H Han, G Stematoyannopoulos. 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. Virolo 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. Mainipulating 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 Sangiuolo, 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

Archive of SID

www.SID.ir

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

Archive of SID

www.SID.ir