



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

آزاده سادات آزادبخش<sup>۱</sup>، محمدرضا سام<sup>۱\*</sup>، فرح فرخی<sup>۲</sup>، علیرضا زمردی پور<sup>۳</sup>،  
علی اکبر حداد مشهد ریزه<sup>۴</sup>، آرام مکاری زاده<sup>۵</sup>

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

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

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

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

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

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

### چکیده

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

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

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

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

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

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

## مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا استرومایی مغز استخوان که بخشی از جمعیت سلولی مغز استخوان را تشکیل می‌دهند در بقاء و تمایز سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک نقش مهمی بر عهده دارند (۱).

این سلول‌ها جمعیت ناهمگنی را تشکیل می‌دهند که قدرت تمایز به انواع مختلفی از رده‌های سلولی سوماتیک از جمله استئوسیت‌ها، کندروسیت‌ها، آدیپوسیت‌ها، سلول‌های سازنده تاندون و سلول‌های ماهیچه‌ای را دارند (۲ و ۳).

سلول‌های اشاره شده از بافت‌های مختلفی از جمله مغز استخوان، کبد، ریه، مغز، خون جنینی، بندناف، کلیه، بافت چربی، مایع آمنیون، ریه جنینی و فولیکول‌های مو قابل جداسازی هستند (۴-۷).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای مجموعه‌ای از ویژگی‌های بی‌همتای زیستی هستند که به همین دلیل کاربردهای درمانی گوناگونی یافته‌اند. این ویژگی‌ها شامل: آسانی جدا کردن، توانایی در تمایز به انواع سلول‌های مختلف از نوع مزانشیمی و غیر مزانشیمی، توانایی تکثیر بالا در محیط کشت بدون از دست دادن قدرت تمایز، توانایی تولید ترکیبات مهارکننده پاسخ ایمنی در شرایط پیوند و توانایی مهاجرت به بافت‌های آسیب دیده می‌باشد (۸ و ۹). سلول‌های مزانشیمی اتولوگ و آلورژیک در محل پیوند، سیستم ایمنی میزبان را فعال نمی‌کنند. بر اساس این توانایی، سلول‌های مزانشیمی حامل‌های ایده‌آلی در انتقال ژن به درون بافت مورد نظر جهت سلول درمانی بیماری‌های ژنتیکی هستند (۱۰). همچنین نشان داده شده است که بیان یک ترانسژن از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تولرانس یا تحمل ایمونولوژیک به ترانسژن را به همراه دارد که می‌تواند مشکل ایجاد

آنتی‌بادی‌های مهارکننده در پلاسمای خون بیماران را برطرف نماید. بنابراین سلول‌های بنیادی مزانشیمی هدف بسیار مناسبی جهت سلول درمانی بیماری‌های ژنتیکی می‌باشند. از جمله بیماری‌های ژنتیکی که سلول درمانی و ژن درمانی آن مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است، بیماری هموفیلی نوع B می‌باشد. این بیماری که در اثر نبود و یا نقص در عملکرد پروتئین فاکتور ۹ انعقادی ایجاد می‌گردد (۱۱) یکی از رایج‌ترین بیماری‌های ژنتیکی در مسیر انعقاد خون می‌باشد که به صورت مغلوب وابسته به X به ارث می‌رسد (۱۲). زندگی این بیماران در اثر خونریزی‌های مکرر دائماً تهدید می‌شود و شایع‌ترین علت مرگ در آن‌ها، خونریزی‌های مغزی است. در ۳ دهه گذشته از پلاسمای تازه منجمد شده و کنسانتره‌های فاکتور ۹ جهت درمان و جلوگیری از عود خونریزی‌ها در این بیماران استفاده شده است (۱۳).

با این وجود، هزینه بالای تولید فاکتور ۹ نوترکیب، تشکیل آنتی‌بادی‌های مهارکننده، واکنش‌های آلرژیک و ترومبوز در بیماران، توجه به سایر روش‌های درمانی از جمله سلول درمانی را باعث گردید (۱۴). در این پژوهش، با هدف بررسی توانایی سلول‌های مزانشیمی در بیان فاکتور ۹ انسانی، ۴ ناقل پلاسمیدی فاکتور ۹، که پیشتر در مطالعات قبلی ساخته شده بودند (۱۷-۱۵) به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش رت منتقل شدند و بیان فاکتور ۹ در سطح mRNA و پروتئین از سازه‌های ژنی در سلول‌های نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

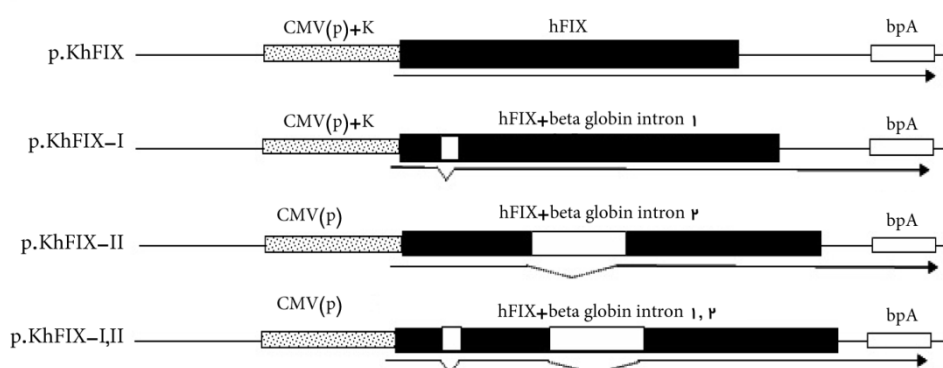
سوش باکتری، پلاسمیدهای بیانی ساخته شده و پرایمرها سوش DH5 $\alpha$  باکتری اشرشیا کلی برای انجام عمل

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

جدول ۱) طول قطعه‌سازهای بیانی فاکتور ۹

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

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



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

p.khFIX: سازه ژنی فاقد ایترون، p.khFIX-I: سازه ژنی دارای ایترون ۱ بتاگلوبین انسانی، p.hFIX-II: سازه ژنی دارای ایترون ۲ بتاگلوبین، p.hFIX-I,II:

سازه ژنی دارای ایترون ۱ و ۲ بتاگلوبین، K: توالی کوزاک (توالی ۶ نوکلئوتیدی: Ribosome binding site).

hFIX: Human factor IX, bpA: Bovine poly adenylation signal sequence; CMVp: CMV promoter

### همسانه‌سازی سازه‌های نو ترکیب و تخلیص

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

### جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی

#### مغز استخوان

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

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

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

سپس سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ و در یخچال با anti CD۹۰-PE، anti CD۴۴-FITC، anti CD۲۹-FITC، anti CD۴۵-FITC و anti CD۴۵-FITC انکوبه گردیدند. همچنین جهت کنترل منفی، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های anti IgG۲a κ-PE، anti IgG۱-κ-FITC انکوبه شدند و با دستگاه فلوسایتومتری (Partec GmbH, Germany) و نرم‌افزار Flow max آنالیز شدند.

#### ترانسفکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی

ترانسفکشن در پلیت‌های شش خانه‌ای و بر اساس پروتکل شرکت Roche صورت گرفت. برای این منظور حدود ۲۴ ساعت قبل از واکنش ترانسفکشن، سلول‌های مزانشیمی تریپسینه شدند و پس از شمارش در تراکم  $1.5 \times 10^5$  سلول به‌ازای هر خانه کشت داده شدند.

برای واکنش ترانسفکشن، ۲ میکروگرم از پلاسמיד نو ترکیب را با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت پایه (فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک) مخلوط کرده و به مخلوط فوق ۶ میکرولیتر از محلول ترانسفکشن را اضافه و مجموعه پس از مخلوط شدن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس مخلوط نهایی مستقیماً به صورت قطره‌ای به ۲ میلی‌لیتر محیط کشت سلول‌های مزانشیمی اضافه گردید. واکنش ترانسفکشن برای مدت حداقل ۶ ساعت ادامه یافت. سپس محیط رویی سلول‌ها جمع‌آوری شد و محیط کشت تازه و کامل همراه با ویتامین K به غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به سلول‌ها اضافه گردید. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، مایع رویی سلول‌ها برای بررسی پروتئین فاکتور ۹ جمع‌آوری گردید.

#### آزمون الایزا

فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت با استفاده از روش ساندویچ ELISA سنجیده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از

ران پا از بافت‌های نرم اطراف استخوان‌ها با اسکالپل و قیچی جدا شدند. آنگاه استخوان‌ها در محیط کشت DMEM حاوی پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در فالتون و روی یخ قرار گرفتند. باقی مراحل استخراج در زیر هود استریل انجام شد. ابتدا دوسر استخوان با قیچی استریل بریده شد و با استفاده از یک سرنگ، محیط کشت DMEM حاوی ۱۵٪ سرم گاوی، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به داخل کانال استخوانی با فشار پیستون هدایت گردید به گونه‌ای که با این عمل، مغز استخوان شستشو شده از سر دیگر استخوان خارج شد. سپس مغز استخوان به داخل لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری هدایت شد و در ۱۲۰۰ گرادیان به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. آنگاه محیط رویی تخلیه و رسوب سلولی پس از شمارش با تراکم  $10^5$  سلول در سانتی‌مترمربع در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌مترمربعی در محیط کشت تازه در شرایط کشت سلولی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد  $CO_2$  کشت داده شد. برای کشت سلول‌های مزانشیمی استحصال شده، تلفیقی از پروتکل مرسوم فردنشتاین و تعویض مداوم محیط کشت استفاده شد (۱۸). کشت اولیه سلول تا زمان پر شدن کف فلاسک ادامه یافت. سپس سلول‌ها توسط آنزیم تریپسین از کف فلاسک کشت جدا شده و در پاساژ سوم یا چهارم جهت فلوسایتومتری و انجام ترانسفکشن آماده گردیدند.

#### فلوسایتومتری

تعیین درصد خلوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی با روش فلوسایتومتری برای بررسی بیان مارکرهای سطحی سلول‌های مزانشیمی انجام شد.

پس از تریپسینه کردن سلول‌ها و شستشوی آنها با بافر PBS، تعداد  $2 \times 10^5$  سلول در میکروتیوب ریخته شد.

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

#### تحلیل داده‌ها

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

#### یافته‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تعیین خلوص آن‌ها سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر اساس خاصیت چسبندگی به فلاسک کشت از دیگر سلول‌های مغز استخوان جدا شدند (شکل ۲). بعد از پاساژ سوم که سلول‌ها از نظر مرفولوژیکی به صورت یکنواخت درآمد بودند. سلول‌ها جهت بررسی مارکرهای سطحی CD۹۰، CD۴۴، CD۲۹ و CD۴۵ با روش فلوسایتومتری آماده شدند (شکل ۳).

محیط کشتی که جمع‌آوری گردیده بود به چاهک‌های پلیتی که از آنتی‌بادی پلی کلونال ضد فاکتور ۹ پوشیده شده بود افزوده شد. پس از انکوباسیون در دمای اتاق و در محیط بدون نور به مدت یک ساعت، پلیت ۵ بار با محلول شستشو، شسته شد. در مرحله بعدی به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه که با آنزیم پراکسیداز نشاندار شده بود افزوده گشت. پس از انکوباسیون و شستشو، در نهایت به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول کروموژن تترامیل بنزیدین (TMB) به‌عنوان سوبسترا افزوده شد و پس از انکوباسیون در دمای اتاق و تاریکی، واکنش توسط اسید سولفوریک ۰/۵ نرمال متوقف شد. جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه اسپکت در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد از طریق رقت‌های سریالی تهیه شده از پلاسما طبیعی رسم شد و غلظت فاکتور ۹ در محیط کشت براساس منحنی استاندارد محاسبه گردید.

#### واکنش RT-PCR نیمه کمی

در روز دوم پس از ترانسفکشن، RNA تام از سلول‌های ترانسفکت شده با استفاده از کیت تخلیص RNA شرکت Roche استخراج شد و به‌عنوان الگو توسط آنزیم رونوشت‌بردار معکوس<sup>۱</sup> برای ساختن cDNA مورد استفاده قرار گرفت. از cDNA ساخته شده به‌عنوان الگو جهت تکثیر قطعه‌ای از cDNA فاکتور ۹ به طول ۳۲۲ جفت باز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی hKozF<sup>۹</sup>-F و hFIXE<sup>۴</sup>-R و واکنش PCR طبق پروتکل ذیل استفاده گردید (جدول ۲).

واسرشتی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. در ادامه، واسرشتی در همان دما

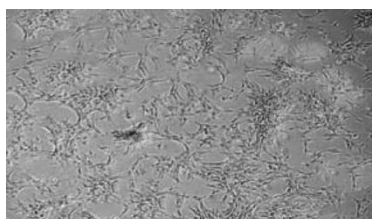
<sup>۲</sup>Annealing

<sup>۱</sup>M-Mulv

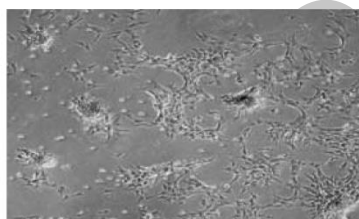
جدول (۲) توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	طول قطعه (bp)	T <sub>m</sub>
hKozF9-F	5' GGATCC GCCACCATGCAGCGGTGAACATGAT 3'	۳۲۲	۵۴C
hFIXE4-R	5' CCT TGC AAC TGC CGC CATTAAAC 3'		
GAPDH-F	5' CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG 3'		
GAPDH-R	5' GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG 3'	۲۹۶	۵۴C

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

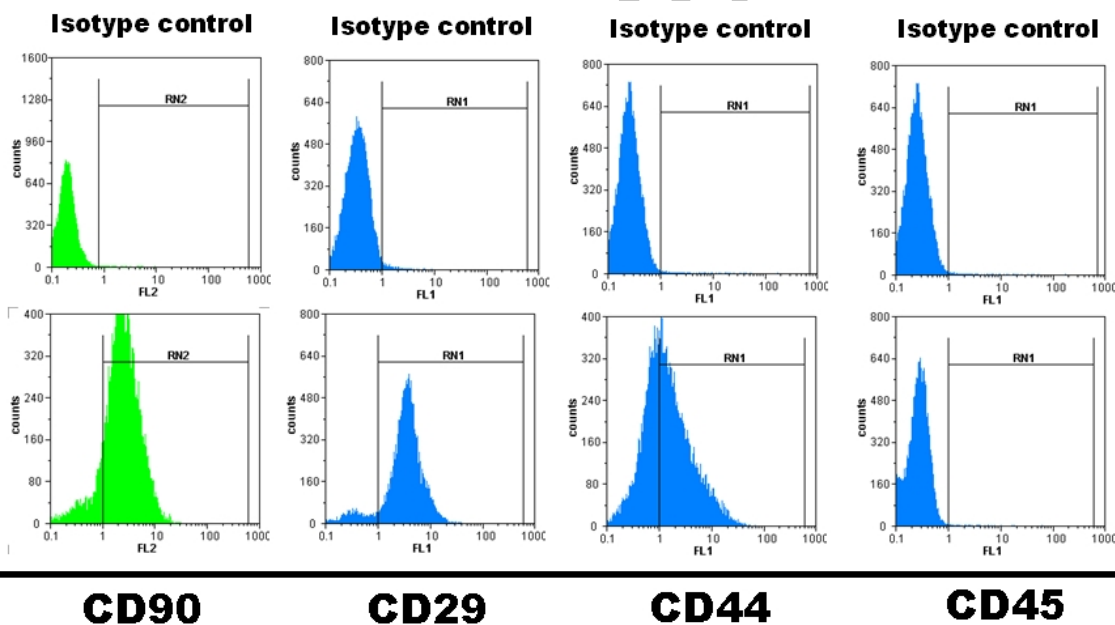


ب



الف

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



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

مارکر CD۹۰، ۸۶/۴ درصد برای مارکر CD۲۹، ۸۹/۵ درصد مثبت و برای مارکر هماتوپوئیتیک CD۴۵، ۰/۳

یافته‌های فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای مارکر CD۴۴، ۵۹/۲ درصد، برای

درصد مثبت بودند.

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

جدول ۳) مقایسه میزان بیان فاکتور ۹ از پلاسمیدهای نو ترکیب در محیط کشت سلولهای ترانسفکت شده مزانشیمی در ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن

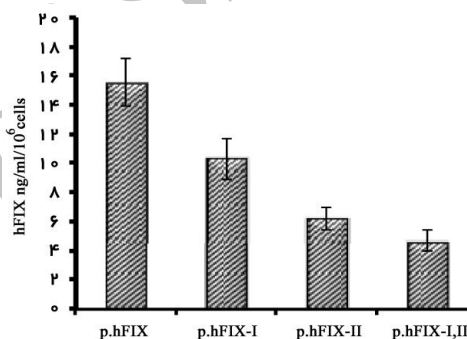
ارزش عددی P	افزایش بیان فاکتور ۹	پلاسمید
۰/۰۱	۱/۵۲	p.hFIX-I p.hFIX-vs.
۰/۰۰۱	۲/۵	p.hFIX-II
۰/۰۰۰	۳/۳	p.hFIX-I-II
۰/۰۱	۱/۶	p.hFIX-II p.hFIX-Ivs.
۰/۰۰۴	۲/۲	p.hFIX-I-II
۰/۰۰۳	۱/۳	p.hFIX-I,II p.hFIX-IIvs.

#### بررسی بیان فاکتور ۹ در سطح mRNA

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

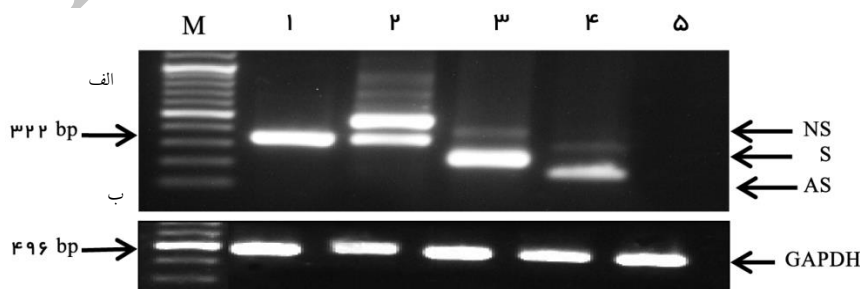
#### سنجش بیان فاکتور ۹ در سطح پروتئین

بر مبنای یافته های به دست آمده، سطح بیان فاکتور ۹ در محیط کشت سلولهای ترانسفکت شده با p.KhFIX، بیش از سلولهای ترانسفکت شده با سایر سازه های ژنی بود. در روز دوم پس از ترانسفکشن، میزان غلظت فاکتور ۹ بر مبنای ۱۰<sup>۶</sup> سلول در سازه های ژنی p.KhFIX، p.KhFIX-I، p.hFIX-II و p.hFIX-I-II به ترتیب ۱۵/۸، ۱۰/۴، ۷/۲ و ۴/۹ نانوگرم در میلی لیتر محاسبه گردید. در سلولهای کنترل منفی (ترانسفکت نشده) بیان فاکتور ۹ صفر ارزیابی شد (نمودار ۱).



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

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



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

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

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



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

در این مطالعه از پلاسمیدهای بیانی فاکتور ۹ که مجهز به تلفیق‌های مختلفی از توالی‌های تنظیمی سیس از جمله پروموتور CMV، توالی کوزاک و اینترون‌های ۱ و ۲ ژن بتاگلوبین انسانی بودند استفاده شد و بیان فاکتور ۹ از سلول‌های نو ترکیب مورد بررسی قرار گرفت.

بر مبنای نتایج به دست آمده از آزمون الایزا، سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی بیان مینی ژن‌های فاکتور ۹ را نشان دادند. در این مطالعه نشان داده شد که میزان ترشح فاکتور ۹ به محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های ژنی مختلف، متفاوت است که احتمالاً بیانگر نقش توالی‌های مختلف سیس به کار رفته در هر وکتور بیانی است که موجب تفاوت در مراحل مختلف تنظیمی بیان یک ژن از جمله رونویسی، پس از رونویسی، ترجمه و ترشح می‌گردد. برخلاف انتظار نتایج قبلی گروه مبنی بر افزایش بیان در اثر استفاده از اینترون‌های هترولوگ (۱۷-۱۵)، معرفی اینترون‌های ۱ و ۲ ژن بتاگلوبین هم به‌طور جداگانه و هم به‌طور همزمان در جایگاه معادل خود در cDNA فاکتور ۹ به‌طور چشمگیری بیان فاکتور ۹ را در مقایسه با سازه ژنی بدون اینترون در سلول‌های بنیادی مزانشیمی کاهش داد. بر مبنای نتایج به دست آمده از آزمون RT-PCR، توالی‌های رونویسی شده از سازه‌های ژنی دارای اینترون‌های ژن بتاگلوبین به‌طور مناسبی پردازش نمی‌گردند که می‌توان بیان کاهش یافته فاکتور ۹ را به آن نسبت داد. با در نظر گرفتن این واقعیت که توالی‌ها و ساختارهای اطراف اینترون و نیز ماهیت اینترون‌ها جهت کارایی پیرایش اینترون‌ها مهم می‌باشند، احتمالاً ساختار کایمیریک ایجاد شده با

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

## بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی امیدواری‌های بسیاری را در سلول درمانی و ژن درمانی بیماری‌های ژنتیکی و اکتسابی ایجاد کرده‌اند. توانایی بیان پایدار ترانسژن‌های مختلف در این سلول‌ها و عدم ایجاد پاسخ ایمنی در صورت پیوند به میزبان از مزیت‌های قابل توجه این سلول‌هاست (۱۹).

تاکنون ترانسژن‌های مختلفی از جمله فاکتور ۸ انسانی (۲۰ و ۲۱)، IL۳ (۲۲)، IL۴، BMP۲، IFN  $\beta$ ، IL۴، کلاژن نوع ۱ (۲۳ و ۲۴)، IL۷ (۲۵)، فاکتور رشد انسانی (۲۶)، اریتروپویتین انسانی (۲۷) در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان شده‌اند. در مطالعات مختلفی بیان فاکتور ۹ انسانی با ناقلین ویروسی در سلول‌های مزانشیمی نشان داده شده است (۲۸ و ۲۹). بیماری ژنتیکی هموفیلی B مدل مناسبی جهت بررسی‌های سلول درمانی و ژن درمانی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی محسوب می‌شود. در مطالعه کنونی، از ناقلین پلاسمیدی جهت ترانسفکشن سلول‌های مزانشیمی استفاده گردید که در درون هسته سلول‌های هدف به‌صورت اپیزومال قرار می‌گیرند و در مقایسه با ناقلین ویروسی که به‌صورت تصادفی در ژنوم سلول‌های هدف وارد می‌شوند از ایمنی بهتر و بالاتری برخوردارند. این ناقلین قابلیت ایجاد ذرات تکثیری که



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

### سپاس و قدردانی

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

معرفی اینترون‌های ژن بتاگلوبین شرایط را برای اسپلایسینگ مناسب این توالی‌ها فراهم نمی‌کند. در همین زمینه محققین نیز نشان داده‌اند که اینترون‌های هترولوگ به مانند اینترون‌های طبیعی خود ژن، به طور مؤثری بریده نمی‌شوند (۳۱). به استناد اطلاعات موجود در مقالات منتشر شده، بررسی اثرات توالی‌های تنظیمی سپس مختلف بر بیان فاکتور ۹ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای اولین بار است که در این مطالعه گزارش می‌گردد. نوع ساخت این سازه‌های ژنی به ما این امکان را می‌دهد که در ادامه پتانسیل بیان فاکتور ۹ از این وکتورها را در مدل حیوان آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار دهیم. یافته‌های بررسی پیش رو نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی بیان ژن فاکتور ۹ را دارند.

### References:

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

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

Original Article

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

AS.Azadbakhsh<sup>1,2</sup>, MR. Sam<sup>1,2\*</sup>, F. Farrokhi<sup>2</sup>,  
AR. Zomorodipour<sup>3</sup>, AK. Haddad Mashahrizeh<sup>4</sup> A. Mokarizadeh<sup>5</sup>

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

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

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

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

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

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

### Abstract

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

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

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

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

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

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