

کلونینگ و بیان موقت ژن محافظت کننده سلولی، HO-1، در سلول‌های بنیادی مزانشیمال از طریق سیستم بیانی آدنووایروس بر مبنای تکنولوژی Gateway

پژمان حامدی اصل^۱، راحله حلیان^۲، محمد محمدزاده^۳، مهشید محمدی پور^۴، زهرا بخشنده^۱، داریوش حامدی اصل^۵،
علی اصغر کیانی^۶، دکتر محمدعلی جلیلی^۷، دکتر ناصر امیری زاده^۸، دکتر مهیار حبیبی رودکنار^۹

چکیده

سابقه و هدف

HO-1 (هم اکسیژناز-۱) یکی از عوامل قدرتمند محافظت کننده سلولی می باشد. هدف از این مطالعه، کلونینگ و بیان موقت ژن HO-1 انسانی در سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSCها) با استفاده از سیستم بیانی آدنووایروسی بر مبنای تکنولوژی Gateway بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، به منظور القای HO-1، رده سلولی A549 به مدت ۱ ساعت با اشعه UV مواجه گردید. cDNA توتال HO-1 جداسازی شد و از طریق واکنش کلونینگ TOPO به وکتور pENTR TOPO/D کلون گردید. برای ایجاد کلون بیانی، واکنش نوترکیبی LR بین کلون اولیه و وکتور مقصد (pAd/CMV/V5-DEST) به انجام رسید. ویروس نوترکیب در رده سلولی یوکاریوتی مناسب تشکیل شد. MSCها به وسیله ویروس نوترکیب بیان کننده HO-1 آلوده سازی شدند.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که HO-1 انسانی نوترکیب با موفقیت کلون شده و صحت و قرار گرفتن ژن در قالب صحیح درون وکتور به وسیله تعیین توالی DNA تایید شد. بیان HO-1 در MSCها به وسیله آنالیز RT-PCR و سترن بلات تایید گردید. این نتایج حاکی از این بود که بیان HO-1 موقت است.

نتیجه گیری

بیان موقت ژن HO-1 انسانی در MSCها با استفاده از سیستم بیانی آدنووایروسی، ممکن است یک استراتژی انتقال ژنی کارآمد در راستای ارتقای سلول درمانی فراهم نماید.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمال، هم اکسیژناز-۱، مهندسی ژنتیک، آدنووایروس‌ها

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۴

تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۳۰

- ۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۲- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی - دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران
- ۳- دانشجوی دکتری خون‌شناسی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۴- دانشجوی دکتری ژنتیک - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۵- کارشناس ارشد میکروبیولوژی بالینی - انستیتو تحقیقاتی سرم و واکسن سازی رازی کرج - ایران
- ۶- دانشجوی دکتری خون‌شناسی - مریی دانشگاه علوم پزشکی لرستان - خرم‌آباد - ایران
- ۷- PhD شیمی دارویی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۸- PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۹- مؤلف مسئول: PhD بیوتکنولوژی پزشکی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

مقدمه

استفاده از سلول‌های بنیادی، روشی نوین در درمان بسیاری از بیماری‌های بدخیم مانند انواع سرطان و بیماری‌های ژنتیکی و مادرزادی است، به طوری که امروزه پیوند سلول‌های بنیادی، بهترین گزینه برای درمان قطعی بسیاری از بیماری‌های کشنده محسوب می‌گردد (۱، ۲). تکنولوژی‌های انتقال ژن، اساساً بر مبنای وکتورهای ویروسی می‌باشند و به تازگی در زمینه پیوند سلولی در تعدادی از مطالعه‌های بالینی بر روی انسان با موفقیت چشمگیری همراه بوده‌اند (۳-۵).

سلول‌های بنیادی مزانشیمال (Mesenchymal Stem Cells) از گروه سلول‌های استرومایی غیر خون‌ساز مغز استخوان بوده که توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی همانند سلول‌های استخوانی، چربی، غضروف و سلول‌های عضلانی قلب را در آزمایشگاه و محیط بدن دارا می‌باشند (۶، ۷). ویژگی‌هایی از قبیل جداسازی و تکثیر آسان در *in vitro* و قابلیت تعدیل سیستم ایمنی و نیز نقش حمایتی در خونسازی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به عنوان یک منبع سلولی ایده‌آل در زمینه سلول درمانی و ژن درمانی معرفی نموده است (۸-۱۰).

استفاده بالینی از MSCها، نیازمند دسترسی به تعداد زیادی از سلول‌های صلاحیت‌دار از نظر عملکرد با فتوتیپ و ژنوتیپ پایدار می‌باشد، اما متأسفانه در روند جداسازی، پردازش و کشت سلولی، آسیب‌های فراوانی به این سلول‌ها وارد می‌آید که به موجب آن میزان بقا و عملکرد MSCها را پس از پیوند، بسیار پایین‌تر از حد انتظار می‌کشاند (۱۱). به طوری که کمتر از یک درصد سلول‌های پیوندی در طی ۴ روز پس از پیوند به عضله قلبی انسان و مدل‌های حیوانی، دارای بقای مطلوب بوده‌اند (۱۲-۱۴). از این رو، اگر روشی به کار گرفته شود که محافظت سلول‌ها را در همان روزهای ابتدایی پس از پیوند موجب گردد، می‌توان انتظار داشت که درصد موفقیت پیوند تا حد مطلوبی افزایش یابد. یکی از روش‌های مؤثر و کاربردی در افزایش بقا و نیز مقاومت سلول‌های بنیادی، دست‌ورزی ژنتیکی این سلول‌ها با عوامل محافظت‌کننده سلولی می‌باشد (۱۵، ۱۴).

هم اکسیژناز-۱ (HO-1)، یک آنزیم القایی در شرایط استرس سلولی می‌باشد. این آنزیم مولکول اکسیدکننده "هم" (Heme) را تجزیه نموده و محصولات جانبی هم چون منواکسید کربن (CO)، بیلی وردین و Fe^{2+} را تولید می‌نماید. این محصولات می‌توانند به همراه HO-1 دارای عملکردهای محافظت سلولی باشند (۱۸-۱۶).

از مهم‌ترین عملکردهای سیستم HO-1 می‌توان به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان، آنتی‌آپوپتوتیک و ضد التهابی اشاره نمود، به گونه‌ای که در بسیاری از مطالعه‌ها، افزایش بیان HO-1 از طریق مهندسی ژنتیک یا عوامل دارویی، حفظ ساختار و عملکرد و طولانی شدن بقای بافت پیوندی را در پی داشته است (۲۰-۱۸). سیستم بیانی آدنوویروس مزایای فراوانی دارد که از آن جمله می‌توان به مواردی همانند بیان موقت و بالای ژن هدف، انتقال کارا و مؤثر ژن هدف در آزمایشگاه و محیط بدن، آلوده‌سازی آسان سلول‌های میزبان، تطبیق پذیری بالا با قطعات DNA خارجی، الحاق نیافتن به ژنوم میزبان، ایمنی زیستی بالا در نتیجه تولید آدنوویروس‌های فاقد صلاحیت تکثیری و تولید استوک‌های آدنوویروسی با تیترا بالا و نیز در زمان نسبتاً کوتاه اشاره نمود (۲۳-۲۱). با توجه به این که بیان دایم ژن هدف در سلول‌های میزبان ممکن است عوارض نامطلوبی از قبیل امکان جهش‌زایی و ایجاد تومور به واسطه الحاق ژنوم ویروس به ژنوم میزبان را در پی داشته باشد، از این روی برای درمان کوتاه مدت (درمان بیماری در یک مدت زمان مشخص) یا ژن درمانی مبتنی بر نوع بیماری (Diagnostic Therapy)، ایمنی زیستی بالاتری تصور می‌شود (۲۴). هدف از انجام این پژوهش، بیان موقت HO-1 انسانی در MSCهای جداسازی شده از مغز استخوان انسان با استفاده از سیستم بیانی آدنوویروس بر اساس تکنولوژی Gateway بوده و در راستای بهبود کیفیت و کارایی سلول درمانی صورت پذیرفته است.

مواد و روش‌ها

پلاسمید و سویه باکتری:

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پلاسمید

گرفتند و مارکرهای سطحی سلول‌ها توسط فلوسیتومتری (بر طبق دستورالعمل قبلی) تعیین گردید (۲۵).

جداسازی و کلونینگ HO-1 به وکتور اولیه:

رده سلولی A549 جهت القای بیان HO-1 به مدت ۱ ساعت در معرض اشعه UV قرار گرفت. سپس RNA سلول‌های اشعه دیده بر طبق دستورالعمل استخراج گردید و به وسیله دستگاه نانودراپ و الکتروفورز بر روی ژل ۱٪ آگارز، کمیت و کیفیت RNA استخراج شده مورد تایید قرار گرفت. پس از آن cDNA توتال با استفاده از RNA (۱۲۵۰ ng/μL)، آغازگرهای راندوم و آنزیم ترانس کریپتاز III (اینویترورژن، cDNA synthesis kit) ساخته شد. در مرحله بعد، آغازگرهای اختصاصی ژن‌های HO-1 و بتا-اکتین طراحی شدند، و ژن HO-1 انسانی به وسیله PCR و با استفاده از آنزیم pfu DNA پلیمرز (رُوش، آلمان) جداسازی و تکثیر گردید (جدول ۱). به منظور نرمال‌سازی بیان ژن‌ها، ژن بتا-اکتین به عنوان ژن استاندارد انتخاب شد. محصولات PCR در ژل ۲٪ آگارز الکتروفورز و سپس ارزیابی شدند.

جدول ۱: آغازگرهای ۱ و ۲ جهت ایجاد قطعه ۸۶۸ جفت بازی از ژن هم اکسیژناز و آغازگرهای ۳ و ۴ بتا اکتین جهت ایجاد قطعه ۱۱۵ جفت بازی از ژن بتا اکتین

ردیف	نام آغازگر	توالی
۱	Forward HO-1	5'-CAC CAT GGA GCG TCC GCA ACC CGA C-3'
۲	Reverse HO-1	5'-CAT GGC ATA AAG CCC TAC AGC AAC TG-3'
۳	Forward β-actin	5'-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG G-3'
۴	Reverse β-actin	5'-GTG TTG AAG GTC TCA AAC ATG AT-3'

به منظور ایجاد انتهای چسبنده در ژن HO-1 جهت انجام واکنش کلونینگ TOPO، توالی نوکلئوتیدی CACC (توالی کوزاک) در ابتدای آغازگر مستقیم (Forward) لحاظ گردید. محصول PCR به وسیله واکنش کلونینگ TOPO بر طبق دستورالعمل (اینویترورژن) به وکتور اولیه pENTR

به عنوان وکتور اولیه و برای کلونینگ ابتدایی و پلاسمید pAd/CMV/V5-DEST به عنوان وکتور مقصد یا بیانی برای کلونینگ نهایی و بیان موقت ژن HO-1 در MSCها انتخاب شدند. هر دو وکتور محصول آمریکا (اینویترورژن) بودند و سویه باکتری *E. coli* TOP10 (اینویترورژن) به عنوان میزبان پروکاریوتی در مراحل مختلف کلونینگ در نظر گرفته شد. وکتور pENTR TOPO/D دارای ژن مقاومت به کانامایسین می‌باشد که برای غربالگری کلون‌های ترانسفورم شده در میزبان پروکاریوتی استفاده می‌گردد. وکتور pAd / CMV / V5-DEST دارای پروموتور قوی سایتومگالوویروس (CMV) می‌باشد که بیان بالایی از ژن هدف را موجب می‌شود و نیز دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد که به منظور غربالگری کلون‌های ترانسفورم شده در میزبان پروکاریوتی می‌توان از آن استفاده نمود.

کشت سلولی:

رده سلولی سرطان ریه انسان (A549) (بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) و رده سلولی کلیه جنین انسان (۲۹۳A) (اینویترورژن) به ترتیب در محیط کشت سلولی RPMI-1640 (آلمان، آگن‌اشتین و جیبکو) و محیط کشت سلولی DMEM-High Glucose (اینویترورژن) هر دو با ۱۰٪ FBS، ۱٪ پنی سیلین و ۱٪ استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ کشت داده شدند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمال از نمونه آسپیراسیون مغز استخوان سه داوطلب سالم (با کسب رضایت) بر طبق دستورالعمل قبلی جداسازی شدند (۲۵).

سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان با استفاده از فایکول (۱/۰۷۷ g/mL؛ آمریکا، آمرشام) و به وسیله سانتریفیوژ شیب غلظت جداسازی و به محیط کشت سلولی اختصاصی DMEM-Low Glucose با ۱۰٪ FBS انتقال داده شدند. تعویض محیط کشت سلولی با فاصله زمانی ۳ روز، موجب حذف سلول‌های غیر چسبنده شد. در نهایت MSCها از پاساژ چهارم برای آزمایش‌های نهایی فراهم شدند. جهت تایید هویت سلولی، MSCهای تکثیر یافته در *in vitro*، از نظر مورفولوژی مورد بررسی قرار

گردید. ذرات آدنوویروسی نوترکیب در سلول‌های A ۲۹۳ (اینویتروزن) ایجاد و پس از ۱۳ روز، لیزات ویروسی اولیه در طی دو مرحله انجماد و ذوب به دست آمد. به منظور افزایش تیتراستوک ویروس، سلول‌های A ۲۹۳ توسط لیزات اولیه ویروسی آلوده‌سازی مجدد شدند و این روند ۳ مرتبه تکرار گشته و در نهایت استوک ۴ ویروسی حاصل گردید. سپس MSCها با رقت‌های سریال تهیه شده از استوک ۴ آدنوویروسی آلوده‌سازی و سایتوتوکسیسیته ویروس با آزمایش MTT assay (آمریکا، سیگما) بررسی شد. غلظت غیرکشنده از استوک ویروسی برای آزمایش‌های نهایی تعیین شد.

آنالیز بیان HO-1 به وسیله RT-PCR و وسترن بلات:

جهت ارزیابی بیان ژن HO-1 انسانی، RNA توتال (۵۰۰ ng/μL) از MSCهای آلوده شده با آدنوویروس نوترکیب در روزهای مختلف استخراج گردید، cDNA توتال ساخته شد و به عنوان الگو برای PCR استفاده شد. برای بررسی میزان بیان ژن HO-1 در روزهای مختلف، PCR انجام شد و به منظور نرمال‌سازی بیان ژن‌ها، ژن بتا-اکتین به عنوان ژن استاندارد انتخاب شد. در پایان ۷ μL از محصولات PCR به وسیله الکتروفورز در ژل ۲٪ آگارز بررسی گردید. آزمایش وسترن بلات به منظور بررسی میزان بیان HO-1 در سطح پروتئین بود. در این راستا، پروتئین توتال به وسیله معرف Lysis M (آلمان، رُوش) بر طبق دستورالعمل از MSCهای آلوده شده با آدنوویروس نوترکیب در روزهای مختلف استخراج گردید و با استفاده از روش SDS-PAGE، نمونه استخراجی پس از طی مراحل لازم بر روی ژل پلی آکریلامید الکتروفورز شد و از طریق روش وسترن بلات به غشای PVDF (آلمان، رُوش) انتقال یافت. در پایان با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال HO-1 انسانی (کانادا، Stressgen)، بیان پروتئین HO-1 در روزهای مختلف آنالیز گردید.

یافته‌ها

جداسازی HO-1 انسانی و ایجاد کلون اولیه حاوی ژن (pENTR TOPO/D-HO-1):

به منظور القای بیان HO-1، سلول‌های A ۵۴۹ به مدت

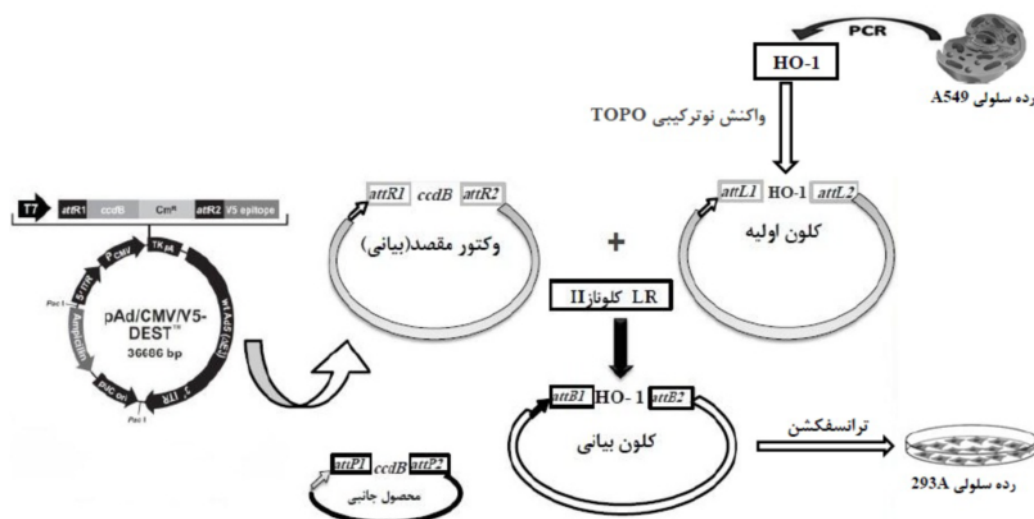
TOPO/D کلون شد. مخلوط واکنش (پلاسمید pENTR E.coli TOP10) به میزبان پروکاریوتی (TOPO/D-HO-1 ترانسفورم شد و باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط کشت آگار LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. به منظور گزینش و بررسی کلونی‌های مثبت، در مرحله بعد به طور تصادفی از ۴ کلونی برطبق دستورالعمل، استخراج پلاسمید (رُوش، High pure plasmid isolation Kit) به عمل آمد و با انجام PCR در حضور آغازگرهای اختصاصی، وجود ژن HO-1 بررسی شد. سرانجام، با ارسال نمونه جهت توالی‌یابی DNA، صحت ژن HO-1 و قرار گرفتن آن در قالب صحیح درون ساختار وکتور اولیه مورد تایید قرار گرفت.

ایجاد وکتور آدنوویروسی نوترکیب حاوی HO-1 انسانی:

واکنش نوترکیبی LR جهت انتقال ژن HO-1 انسانی از وکتور اولیه (pENTR TOPO/D-HO-1) به وکتور مقصد (pAd/CMV/V5-DEST) با استفاده از آنزیم LR کلوناز II صورت گرفت. مخلوط واکنش به میزبان پروکاریوتی E.coli TOP10 ترانسفورم گردید. در پایان به طور تصادفی از ۶ کلونی رشد کرده در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، استخراج پلاسمید به عمل آمد و به وسیله PCR در حضور آغازگرهای اختصاصی، وجود ژن HO-1 مورد بررسی قرار گرفت. پس از تایید نتایج، کلون مثبت جهت تعیین توالی DNA ارسال گردید.

تولید استوک‌های ویروسی و آلوده‌سازی MSCها:

کلون بیانی حاوی ژن HO-1 انسانی (pAd/CMV/V5-HO-1) پس از استخراج پلاسمید به وسیله آنزیم محدودکننده PacI (آمریکا، New England Biolabs) برش داده شده و به صورت خطی درآمد. این ژنوم خطی شده، می‌بایست به رده سلولی سازنده ذره کامل آدنوویروس A Cells ۲۹۳ ترانسفکت گردد. به منظور تهیه نسبت بهینه شده، ۳ μL از معرف فیوژن -۶ به ۲ μg از DNA وکتور طی شده (نسبت ۳:۲) اضافه شد و به رده سلولی A Cells ۲۹۳ بر طبق دستورالعمل (آلمان، رُوش) ترانسفکت



شکل ۱: نمای کلی از آزمایش‌های کلونینگ بر اساس تکنولوژی Gateway. رده سلولی A549 به عنوان منبعی برای جداسازی ژن HO-1 انسانی استفاده شد. محصول PCR با انتهای چسبیده از طریق واکنش کلونینگ TOPO به وکتور اولیه pENTR TOPO/D کلون گردید. این ساختار کلون اولیه نامیده می‌شود. سپس جهت ایجاد کلون بیانی، واکنش نوترکیبی LR بین کلون اولیه pENTR TOPO/D-HO-1 و وکتور مقصد pAd/CMV/V5-DEST صورت پذیرفت. در نتیجه کلون بیانی pAd/CMV/V5-HO-1 ایجاد شد. کلون بیانی حاوی ژن HO-1 به وسیله آنزیم محدود کننده *PacI* خطی گردید و به رده سلولی 293A جهت ساخت و افزایش تیتراژ ذرات آدنوویروسی نوترکیب ترانسفکت شد.

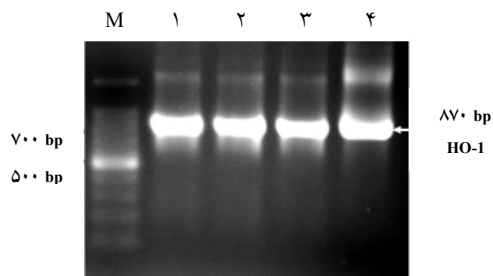
تایید حضور ژن HO-1 در وکتور بیانی با PCR: پس از انجام واکنش نوترکیبی LR بین وکتور اولیه حاوی ژن HO-1 و وکتور بیانی، به منظور تایید حضور ژن HO-1 در ساختار وکتور آدنوویروسی، به طور تصادفی از ۶ کلون بیانی رشد کرده در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین استخراج پلاسمید صورت گرفت که به عنوان الگو برای PCR استفاده شدند. نتایج PCR با آغازگرهای اختصاصی HO-1 حضور باند ۸۶۸ bp را در کلون‌های ۲، ۵ و ۶ نشان داد. در کلون‌های ۱، ۳ و ۴ واکنش نوترکیبی LR به طور صحیح انجام نشده بود.

در پایان، کلون بیانی حاوی ژن HO-1 (pAd/CMV/V5-HO-1) تعیین توالی شد، در نتیجه حضور و صحت توالی و قرار گرفتن ژن HO-1 در قالب صحیح درون ساختار وکتور آدنوویروسی تایید شد (Gen Bank accession number JF323038). کلون بیانی تایید شده برای مراحل بعدی آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۴).

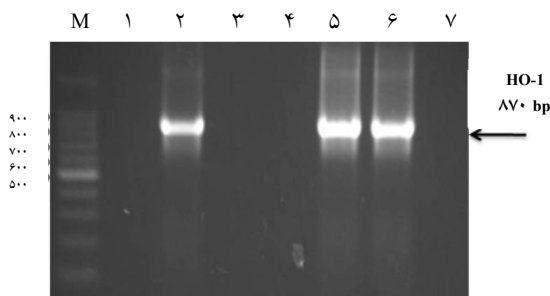
یک ساعت با اشعه UV مواجه شدند. برای جداسازی ژن HO-1، cDNA توتال به وسیله RT-PCR ساخته شد و از طریق آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، HO-1 جداسازی و تکثیر گردید (شکل ۱). جهت کاهش خطاهای احتمالی ناشی از همانندسازی در طی PCR، از DNA پلیمرز با صحت بالا (DNA polymerase pfu) با قابلیت ویرایشی استفاده شد. با الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز، حضور ژن HO-1 انسانی به وسیله مشاهده باند ۸۶۸ bp مطابق با طول قطعه ژنی موجود در بانک ژنی (NCBI) تایید شد (شکل ۲).

برای تایید کلون شدن ژن HO-1 به وکتور اولیه pENTR TOPO/D، به طور تصادفی از ۴ کلونی، استخراج پلاسمید به عمل آمد و به وسیله PCR با آغازگرهای اختصاصی HO-1 بررسی شدند (شکل ۳). برای تایید نهایی، وکتور نوترکیب اولیه تعیین توالی شد که نتیجه آن حضور ژن HO-1 در پلاسمید نوترکیب و قرار گرفتن آن در قالب صحیح را تایید کرد. در نتیجه وکتور اولیه برای واکنش نوترکیبی LR مهیا گردید.

ذره کامل ویروس و افزایش تیترا ویروس نوترکیب، مستلزم ورود آن به رده سلولی اختصاصی سازنده آدنوویروس (293A) که دارای قطعه ژنی E1 است، می‌باشد. از سوی دیگر توالی‌های ITRs ویروسی می‌بایست جهت رونویسی و ترجمه پروتئین‌های ویروسی از طریق برش آنزیمی با PacI رونمایی گردد. در این راستا، ساختار و کنتور آدنوویروسی نوترکیب به وسیله آنزیم محدود کننده PacI برش داده شده و خطی گردید.



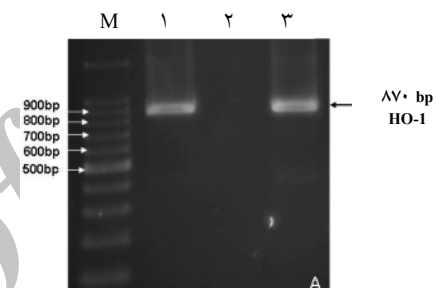
شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR کلون‌های نوترکیب حاوی ژن HO-1 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰ bp (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک ۱ تا ۴ محصول PCR از کلون‌های حاوی وکتور نوترکیب رشد کرده در محیط اختصاصی کاناماسین. ۴ کلونی دارای باند ۸۶۸ bp بوده که نشان دهنده حضور ژن HO-1 در کلونی‌ها می‌باشد.



شکل ۴: الکتروفورز محصول PCR کلون‌های pAD/CMV/V5 نوترکیب حاوی ژن HO-1 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰ bp (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک ۱ تا ۶ محصول PCR از کلون‌های حاوی وکتور نوترکیب رشد کرده در محیط اختصاصی آمپی‌سیلین. ۳ کلونی دارای باند ۸۶۸ bp بوده که نشان‌دهنده حضور ژن HO-1 در کلونی‌ها می‌باشد. چاهک ۷ کنترل منفی PCR است.

تعیین مارکرهای سطح سلولی اختصاصی MSCها به وسیله فلوسایتومتری:

پس از مشاهده‌های میکروسکوپی، جهت تایید هویت MSCهای مشتق شده از مغزاستخوان انسان، مارکرهای سطح سلولی به وسیله فلوسایتومتری آنالیز شد. بیان مارکرهای سطحی CD73، CD90 و CD105 و عدم بیان مارکرهای CD34، CD14 و CD45 فنوتیپ سطحی MSCها را که اخیراً گزارش شده است به درستی تایید می‌کند (۲۵).

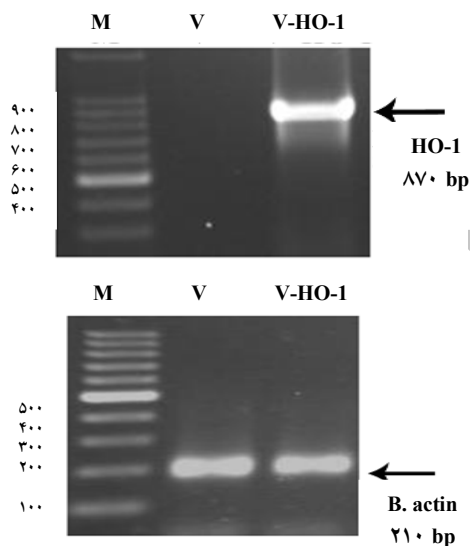


شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی HO-1. A: نتایج RT-PCR ژن هم اکسیژناز-۱: چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰ bp (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک ۱ و چاهک ۳ (باند ۸۶۸ bp HO-1) مربوط به رده سلولی A549 مواجه شده با UV می‌باشد. چاهک ۲ رده سلولی کنترل را نشان می‌دهد. B: نتایج RT-PCR ژن بتا‌اکتین: چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰ bp (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و چاهک ۲ شامل باند ۱۱۵ bp ژن بتا‌اکتین کنترل و چاهک‌های ۱ و ۳ شامل نمونه‌های القا شده با UV می‌باشد. نتایج نشان داد که تغییری در میزان بیان این ژن در بین نمونه‌ها وجود ندارد.

ترانسفکشن سلول‌های ۲۹۳A و تولید استوک ویروسی: وکتور نوترکیب آدنوویروسی به دلیل نداشتن قطعه ژنی E1، فاقد صلاحیت تکثیر است، در نتیجه ایجاد

HO-1 در سلول‌های آلوده شده، نیازمند تعیین میزان غلظتی از ویروس است که باعث سایتوتوکسیسیتی بر روی سلول‌ها نشود و نیز بیان ژن HO-1 درون سلول‌ها را موجب شود.

بدین منظور، پیش از آلوده نمودن (Infection) سلول‌ها برای انجام آزمایش‌های نهایی، غلظت‌های مختلفی از استوک ۴ آدنوویروس (10^6 / 10^4 μ L) بر روی MSCها اضافه شد و با استفاده از MTT assay، نتایج بررسی شد. در این آزمایش، غلظت‌های 10^6 / 10^5 μ L به بالا، غلظت‌هایی بودند که منجر به مرگ سلول‌ها می‌شدند (جدول ۲).

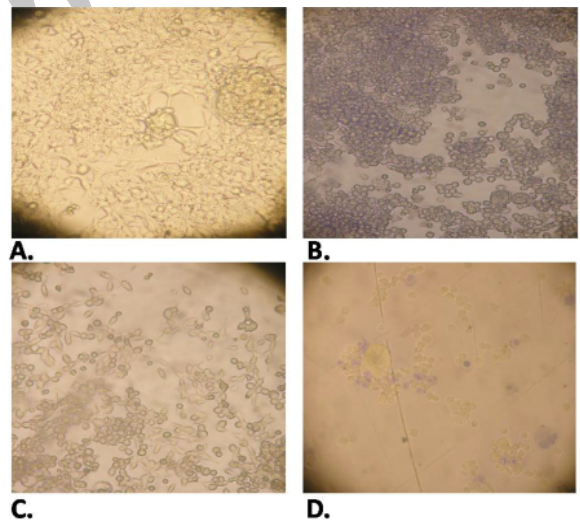


شکل ۶: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل ۲٪ آگارز. شکل بالا، (M) مارکر ۱۰۰ bp (50 ng/ μ L)، (ستون ۱) نتیجه RT-PCR حاصل از MSCها آلوده شده با وکتور خالی (کنترل) پس از گذشت ۴ روز، (ستون ۲) محصول RT-PCR حاصل از MSCها آلوده شده با وکتور آدنوویروسی حاوی ژن HO-1 پس از گذشت ۴ روز را نشان می‌دهد. شکل پایین به ترتیب بتا اکتین MSCها آلوده شده با وکتور خالی و وکتور حاوی ژن HO-1 نو ترکیب پس از گذشت ۴ روز می‌باشد.

پس از تعیین غلظت مطلوب استوک ویروسی (10^6 / 10^5 μ L)، به منظور ارزیابی میزان بیان HO-1 در

ترانسفکت در رده سلولی A، با مقادیر مختلفی از DNA وکتور خطی شده و معرف ترانسفکشن فیوژن-۶ انجام شد.

در راستای افزایش بازدهی، سلول‌های A 293 با تراکم $70-60$ درصد در محیط کشت سلولی بدون FBS در نسبت بهینه شده $3:2$ (2 μ g) از DNA وکتور خطی شده و 3 μ L (فیوژن-۶) در طی ۶ ساعت انکوباسیون، ترانسفکت گردیدند. سپس نتایج مربوط به ساخت و افزایش تیتراژات آدنوویروسی نو ترکیب در طی ۱۳ روز به وسیله میکروسکوپ اینورت بررسی شد (شکل ۵). در پایان لیزات ویروسی اولیه تهیه شد و از آن برای آلوده‌سازی سلول‌های A 293 به منظور افزایش تیتراژ آدنوویروس‌های نو ترکیب استفاده شد. در طی ۳ مرحله آلوده‌سازی متوالی، استوک ۴ ویروسی جهت آزمایش‌های نهایی فراهم شد.



شکل ۵: مراحل ترانسفکشن و تولید لیزات ویروسی اولیه. A: نشان‌دهنده یک روز بعد از ترانسفکشن سلول‌های A 293 با وکتور ویروسی p AD/CMV/V5-HO-1. B: سلول‌های A 293 شش روز پس از ترانسفکشن، آغاز مشاهده اثرات سایتوپاتیک ویروسی. C: سلول‌های A 293 هشت روز پس از ترانسفکشن. D: سلول‌های A 293 سیزده روز پس از ترانسفکشن، حدود ۹۰٪ سلول‌ها لیز شده‌اند.

بیان موقت HO-1 در MSCهای آلوده شده با وکتور آدنوویروسی نو ترکیب: آلوده‌سازی سلول‌ها توسط ویروس و بیان مناسب ژن

جدول ۲: آلوده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال با غلظت‌های متفاوت ویروسی. در غلظت‌های $15 \mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ - $1 \mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ میزان زنده بودن سلول‌ها بیش از ۹۰٪ بود و از غلظت $15 \mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ به بالا، اثرات سایتوتوکسیستی بر روی سلول‌ها مشاهده شد.

غلظت (μL)	۴۰	۳۵	۳۰	۲۵	۲۰	۱۵	۱۰	۵	۱
میانگین بقای سلول‌ها (درصد)									
V-HO-1 (وکتور)	$2/1 \pm 0/99$	$7/3 \pm 1/2$	12 ± 2	$32 \pm 2/4$	$65/1 \pm 3/1$	$87 \pm 3/8$	$90 \pm 7/3$	$91/2 \pm 4/1$	$96 \pm 6/3$
V (وکتور)	$2/01 \pm 0/93$	$7/01 \pm 1/01$	$11/8 \pm 2$	$31 \pm 2/2$	$62/3 \pm 3$	$85/01 \pm 7/4$	$89/1 \pm 9/3$	$91/5 \pm 5/94$	$95 \pm 6/4$

بیان موقت HO-1 در سطح پروتئین به وسیله آنالیز وسترن بلات تایید شد، به طوری که بیان اولیه پروتئین HO-1 در روز ۲ مشاهده شد و در روز ۴ به حداکثر رسید و سپس از روز ۶ به بعد، کاهش بیان پروتئین HO-1 مشاهده گردید (شکل ۷). این نتایج حاکی از این است که افزایش بیان HO-1 در MSC‌های دست‌ورزی شده، به صورت موقت بوده است.

بحث

در این پژوهش برای اولین بار افزایش بیان HO-1 انسانی به صورت موقت در MSC‌ها از طریق سیستم بیانی آدنوویروسی بر اساس تکنولوژی Gateway گزارش شد. تکنولوژی Gateway یک روش کلونینگ جهانی بر مبنای ویژگی نو ترکیبی جایگاه اختصاصی (Site-specific recombination) باکتریوفاژ لامبدا می‌باشد، که مسیری سریع و با کارایی بالا جهت کلون کردن توالی‌های DNA به سیستم‌های وکتوری مختلف فراهم می‌آورد (۲۳). در این تکنولوژی، از دو نوع وکتور اولیه و وکتور مقصد یا بیانی استفاده می‌شود که بر طبق آن دو نوع کلون، یعنی کلون اولیه و کلون بیانی وجود دارد. در این مطالعه، pENTR TOPO/D و pAd/CMV/V5-DEST به ترتیب وکتور اولیه و وکتور بیانی بودند.

حلییان و همکاران در سال ۲۰۰۹ از تکنولوژی Gateway با وکتور بیانی pDEST26 جهت بیان و تخلیص فاکتور انعقادی هفت نو ترکیب استفاده کردند (۲۶). هم چنین در مطالعه‌ای مشابه، مسروری و همکاران در سال

سطح رونویسی و پروتئین در MSC‌ها دست‌ورزی شده، به ترتیب RT-PCR و وسترن بلات بر روی نمونه‌های سلولی در روزهای مختلف (روز ۱، روز ۲، روز ۴، روز ۶، روز ۸ و روز ۱۰) بعد از آلوده‌سازی اجرا گردید. در سطح رونویسی، بیان اولیه HO-1 پس از آلوده‌سازی MSC‌ها با وکتور آدنوویروسی حاوی ژن HO-1 در روز دوم مشاهده شد و سپس در روز چهارم شاهد بیشترین میزان بیان بودیم (شکل ۶).



شکل ۷: بررسی بیان پروتئین HO-1 سلول‌های بنیادی مزانشیمال آلوده شده با $15 \mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ استوک ویروسی با آزمایش وسترن بلات. شکل بالا: چاهک ۱: نمونه کنترل منفی. چاهک ۲: سلول‌ها یک روز پس از آلودگی با استوک ویروسی pAD/CMV/V5-HO-1. چاهک ۳: سلول‌ها دو روز پس از آلودگی با استوک ویروسی pAD/CMV/V5-HO-1. چاهک ۴: سلول‌ها چهار روز پس از آلودگی با استوک ویروسی pAD/CMV/V5-HO-1. چاهک ۵: سلول‌ها شش روز پس از آلودگی با استوک ویروسی pAD/CMV/V5-HO-1. چاهک ۶: سلول‌ها چهار روز پس از آلودگی ویروسی بیشترین میزان بیان پروتئین HO-1 مشاهده شد. شکل پایین: بتا اکتین MSC‌ها آلوده شده با وکتور آدنوویروسی نو ترکیب.

بهترین نسبت DNA و کتور خطی شده به معرف فیوژن-۶ به صورت ۳:۲ (یعنی ۳ μ L، فیوژن-۶ به ۲ μ g DNA، و کتور خطی شده) حاصل شد (۳۱، ۳۲). هم چنین از محیط کشت DMEM بدون FBS در مراحل ترانسفکشن استفاده شد، زیرا سرم حاوی پروتئین‌هایی با بار الکتریکی منفی و لیپید با بار الکتریکی مثبت بوده، که می‌تواند قابلیت ارتباطی لیپوزوم با DNA را جهت تشکیل کمپلکس کاهش دهد. در مطالعه مشابهی، توشیناری تسوبوکاوا و همکاران در سال ۲۰۱۰ از روش لیپوزوم با معرف لیپوفکتامین ۲۰۰۰ جهت ترانسفکشن DNA و کتور پلاسמידی حاوی ژن HO-1 به MSCها استفاده کردند، که در آن پس از گذشت ۲ روز، بیشترین بیان HO-1 مشاهده شد و سپس از روز ۴، بیان HO-1 کاهش یافت (۳۳).

با وجود عملکردهای محافظت سلولی HO-1، مطالعه‌ها نشان داده‌اند که بیان پایدار HO-1 ممکن است اثرات نامطلوبی بر روی سلول‌ها داشته باشد (۳۴، ۳۵). در تایید این مطلب، یائو لیانگ تانگ و همکاران (۲۰۰۵) به منظور بیان موقت HO-1 در MSCها از وکتر پلاسמידی با حسگر بیولوژی حساس به اکسیژن (OST) جهت القای بیان HO-1 در شرایط هایپوکسی ریز محیط پیوندی مدل‌های حیوانی استفاده کردند (۳۶). در نتیجه، با توجه به این که اکثریت MSCها، در همان روزهای ابتدایی پس از پیوند دچار مرگ سلولی می‌شوند، بنابراین بیان موقت HO-1 در MSCها با استفاده از سیستم بیانی آدنوویروسی می‌تواند منطقی باشد. همچنین در مطالعه‌های مشابهی، عبدالمجید و همکاران (۲۰۰۹) جهت بیان موقت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز خارج سلولی (EC-SOD) در MSCها و وانگ و همکاران (۲۰۰۹) جهت بیان موقت پروتئین شوک حرارتی-۲۰ (Hsp-20) در MSCها هر دو از وکتر آدنوویروسی استفاده کردند (۳۷، ۳۸). در راستای شواهد ارایه شده، در این مطالعه از وکتر آدنوویروسی حاوی ژن HO-1 جهت آلوده‌سازی MSCها استفاده شد، در این خصوص نتایج آنالیز RT-PCR و وسترن بلات، افزایش بیان موقت HO-1 را در MSCها تایید می‌کند، به طوری که بیان HO-1 دو روز پس از آلوده‌سازی شروع شد و در روز چهارم بیشترین میزان بیان مشاهده گردید و

۲۰۱۰ از طریق سیستم بیانی باکولوویروس بر اساس تکنولوژی Gateway به بیان بالایی از فاکتور انعقادی هفت نوترکیب در رده سلولی حشره (Sf9) دست یافتند (۲۷). در هر دو پژوهش، از وکتر اولیه pENTR TOPO/D استفاده شده بود.

در مطالعه حاضر، برای جداسازی و تکثیر ژن HO-1 در طی PCR و به منظور مرتفع ساختن خطاهای احتمالی ناشی از همانندسازی، از DNA پلیمراز pfu استفاده شد. این آنزیم قابلیت ویرایشی داشته و اشتباهات همانندسازی را تصحیح می‌نماید، در نتیجه توالی نوکلئوتیدی و عملکرد ژن مورد نظر حفظ می‌گردد. جهت ایجاد کلون اولیه، HO-1 cDNA مستقیماً از طریق واکنش کلونینگ TOPO به وکتر pENTR TOPO/D در مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق با بازده نزدیک به ۱۰۰٪ و بدون نیاز به روش‌های برش آنزیمی و الحاقی و نیز پردازش‌های پس از PCR کلون گردید.

در طی واکنش نوترکیبی LR بین pENTR TOPO/D- HO-1 و pAd/CMV/V5-DEST، ژن HO-1 به وکتر بیانی انتقال یافت و در نتیجه آن pAD/CMV/V5-HO-1 ایجاد شد. رده سلولی ۲۹۳ A جهت ایجاد و افزایش تیتراژ ذرات آدنوویروسی نوترکیب استفاده گردید. در این راستا از روش لیپوزوم با معرف ترانسفکشن فیوژن-۶ برای انتقال DNA و کتور خطی شده به سلول‌های ۲۹۳ A استفاده شد. از مزایای این معرف می‌توان به دستورالعمل اجرایی آسان، سهولت در بهینه‌سازی شرایط ترانسفکشن، سایتوتوکسیسیتهی پایین، محافظت از ساختار DNA و کتور از تجزیه شدن در برابر آنزیم نوکلئیناز (Nucleinase) و عدم محدودیت نسبت به اندازه مولکولی و کتور اشاره نمود (۲۸). برطبق این شواهد، در این مطالعه فیوژن-۶ جهت ترانسفکشن ساختار DNA و کتور خطی شده به سلول‌های ۲۹۳ A انتخاب شد. بازده ترانسفکشن به روش لیپوزوم تحت تاثیر پارامترهایی از قبیل نسبت مخلوط معرف ترانسفکشن به DNA و کتور، زمان انکوباسیون و غلظت سرم خون در محیط کشت سلولی قرار دارد (۳۰، ۲۹). در راستای بهینه‌سازی شرایط ترانسفکشن، با بررسی مقاله‌ها و آنالیز نسبت‌های مختلف در آزمایش‌های اولیه،

آینده ارایه دهد.

نتیجه‌گیری

پایه‌گذاری سیستم‌های انتقال ژنی با کارایی بالا به همراه دسترسی به بیان بالایی از ژن‌هایی با قابلیت درمانی در MSCها، می‌تواند نیازمندی به کشت‌های طولانی مدت را که موجب پیری و کاهش کیفیت و عملکرد سلولی می‌شوند، مرتفع ساخته و امکان دستیابی به اثرات درمانی قابل انتظار با تعداد سلول‌های پیوندی کمتر را فراهم نماید.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون وابسته به سازمان انتقال خون ایران می‌باشد و با حمایت مالی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام پذیرفته است.

در ادامه در روز ششم، بیان HO-1 کاهش یافت. انتقال کارا و موثر ژن هدف به وسیله وکتور آدنوویروسی در پیوستگی با بهره‌مندی از تکنولوژی Gateway می‌تواند از دیگر برتری‌های این پژوهش در مقایسه با سایر مطالعه‌های مشابه باشد، به طوری که تکنولوژی Gateway از طریق مکانیسم نوترکیبی همولوگ، موجب ایجاد ساختارهای آدنوویروسی با درجه بالایی از صحت و کارایی می‌شود و در نتیجه دستکاری‌های ژنی ناشی از روش‌های برش آنزیمی و الحاقی صورت گرفته در وکتورهای متداول را مرتفع ساخته و سیستم را برای استفاده در کاربردهایی با ظرفیت بالا و نیز در پروسه‌های انتقال بسیار توانمند می‌سازد.

پژوهش حاضر می‌تواند راه‌کار جدیدی برای افزایش مقاومت و بهبود عملکرد MSCها در شرایط نامطلوب قبل از پیوند و بعد از پیوند به وسیله فراهم ساختن سیستم انتقال ژنی با درجه بالایی از صحت و کارآمدی در راستای ارتقای اثرات درمانی و کیفیت سلول درمانی در

References:

- 1- Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Cliff RA, Fefer A, Flournoy N, *et al.* One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1977; 49(4): 511-33.
- 2- Futagawa Y, Terasaki PI. An analysis of the OPTN/UNOS Liver Transplant Registry. *Clin Transpl* 2004; 315-29.
- 3- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nussbaum P, *et al.* Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288(5466): 669-72.
- 4- Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, *et al.* Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 2002; 296(5577): 2410-3.
- 5- Takahashi Y, Geller DA, Gambotto A, Watkins SC, Fung JJ, Murase N. Adenovirus-mediated gene therapy to liver grafts: successful gene transfer by donor pretreatment. *Surgery* 2000; 128(2): 345-52.
- 6- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276(5309): 71-4.
- 7- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
- 8- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98(9): 2615-25.
- 9- Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, *et al.* Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood* 2006; 107(5): 1878-87.
- 10- Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31(10): 890-6.
- 11- Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999; 107(2): 275-81.
- 12- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105(1): 93-8.
- 13- Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, *et al.* Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002; 73(6): 1919-25.
- 14- Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. Systems approaches to preventing transplanted cell

- death in cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45(4): 567-81.
- 15- Haider HKh, Ashraf M. Strategies to promote donor cell survival: combining preconditioning approach with stem cell transplantation. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45(4): 554-66.
 - 16- Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15(1): 9-19.
 - 17- Katori M, Buelow R, Ke B, Ma J, Coito AJ, Iyer S, *et al.* Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation* 2002; 73(2): 287-92.
 - 18- Ke B, Buelow R, Shen XD, Melinek J, Amersi F, Gao F, *et al.* Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway. *Hum Gene Ther* 2002; 13(10): 1189-99.
 - 19- Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, *et al.* Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* 1998; 4(9): 1073-7.
 - 20- DeBruyne LA, Magee JC, Buelow R, Bromberg JS. Gene transfer of immunomodulatory peptides correlates with heme oxygenase-1 induction and enhanced allograft survival. *Transplantation* 2000; 69(1): 120-8.
 - 21- Russell WC. Update on Adenovirus and its Vectors. *J Gen Virol* 2000; 81(pt 11): 2573-2604.
 - 22- Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(19): 8802-6.
 - 23- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res* 2000; 10(11): 1788-95.
 - 24- Fehse B, Roeder I. Insertional mutagenesis and clonal dominance: biological and statistical considerations. *Gene Ther* 2008; 15(2): 143-53.
 - 25- Halabian R, Mohammadi MH, Salimi M, Amani M, Roushandeh AM, Aghaipour M, *et al.* Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Stably Expressing Green Fluorescent Protein. *IJBMS* 2010; 13(2): 24-30.
 - 26- Halabian R, Fathabad ME, Masroori N, Roushandeh AM, Saki S, Amirizadeh N, *et al.* Expression and purification of recombinant human coagulation factor VII fused to a histidine tag using Gateway technology. *Blood Transfus* 2009; 7(4): 305-12.
 - 27- Masroori N, Halabian R, Mohammadipour M, Roushandeh AM, Rouhbakhsh M, Najafabadi AJ, *et al.* High-level expression of functional recombinant human coagulation factor VII in insect cells. *Biotechnol Lett* 2010; 32(6): 803-9.
 - 28- Zhang P, Zhang H, Hu SS, Chen LG, Wei YJ. [Plasmid transfection of rat bone marrow mesenchymal stem cells by cationic lipid for gene-modified cell transplantation therapy]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2005; 27(4): 504-8.
 - 29- Eastman SJ, Tousignant JD, Lukason MJ, Murray H, Siegel CS, Constantino P, *et al.* Optimization of formulations and conditions for the aerosol delivery of functional cationic lipid: DNA complexes. *Hum Gene Ther* 1997; 8(3): 313-22.
 - 30- Felgner PL. Improvements in cationic liposomes for *in vivo* gene transfer. *Hum Gene Ther* 1996; 7(15): 1791-3.
 - 31- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16(9): 4606-13.
 - 32- Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* 1996; 94(7): 1647-54.
 - 33- Tsubokawa T, Yagi K, Nakanishi C, Zuka M, Nohara A, Ino H, *et al.* Impact of anti-apoptotic and anti-oxidative effects of bone marrow mesenchymal stem cells with transient overexpression of heme oxygenase-1 on myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298(5): H1320-9.
 - 34- Deramandt TB, da Silva JL, Remy P, Kappas A, Abraham NG. Negative Regulation of Human Heme Oxygenase in Microvessel Endothelial Cells by Dexamethasone. *Proc Soc for Exp Biol Med* 1999; 222(2): 185-93.
 - 35- Suttner DM, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J* 1999; 13(13): 1800-9.
 - 36- Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(7): 1339-50.
 - 37- Abdel-Mageed AS, Senagore AJ, Pietryga DW, Connors RH, Giambardi TA, Hay RV, *et al.* Intravenous administration of mesenchymal stem cells genetically modified with extracellular superoxide dismutase improves survival in irradiated mice. *Blood* 2009; 113(5): 1201-3.
 - 38- Wang X, Zhao T, Huang W, Wang T, Qian J, Xu M, *et al.* Hsp20-engineered mesenchymal stem cells are resistant to oxidative stress via enhanced activation of Akt and increased secretion of growth factors. *Stem Cells* 2009; 27(12): 3021-31.

Original Article

Cloning and transient expression of cytoprotective factor, HO-1, in mesenchymal stem cells using the adenoviral expression system through Gateway technology

**Hamed Asl P.¹, Halabian R.², Mohamadzadeh M.¹, Mohammadipour M.¹, Bakhshandeh Z.¹,
Hamed Asl D.³, Kiani AA.⁴, Jalili M.¹, Amirizadeh N.¹, Habibi Roudkenar M.¹**

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

⁴Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

Abstract

Background and Objectives

Heme oxygenase1 (HO-1) is one of the potent cytoprotective factors. The goal of this study was to perform cloning and transient over expression of the human HO-1 gene in mesenchymal stem cells (MSCs) using the adenoviral expression system based on the gateway technology.

Materials and Methods

In order to induce expression of HO-1, A549 cell lines were exposed to UV for 1 hour. The full length cDNA of HO-1 was isolated and cloned into pENTR TOPO/D vector by TOPO cloning reaction. To construct the expression clone, a LR recombination reaction was carried out between the entry clone and destination vector, pAd/CMV/V5-DEST. The recombinant virus was produced in the appropriate mammalian cell line. MSCs were infected by the recombinant virus expressing HO-1.

Results

The results showed that human recombinant HO-1 was successfully cloned and the accuracy of the gene and its frame in the vector were confirmed by DNA sequencing. Expression of HO-1 in MSCs was confirmed by RT-PCR and western blot analysis. The results indicated that the expression of HO-1 is transient.

Conclusions

Transient expression of human HO-1 gene in MSCs by using adenovirus expression system may be considered as an efficient gene transfer strategy into MSCs in order to promote stem cell therapy.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, Heme Oxygenase-1, Genetic Engineering, Adenoviruses

Received: 25 May 2011

Accepted: 22 Oct 2011

Correspondence: Habibi Roudkenar M., PhD of Biotechnology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine. P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601599; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: roudkenar@ibto.ir