

## Original Article

# Transfection of Human Hematopoietic Stem Cells by a Gene Targeting Construct Containing the $\beta$ -Globin Gene

Mojhgan Shaikhpoor, M.Sc.<sup>1</sup>, Hossein Khanahmad, Ph.D.<sup>2</sup>, Mohamadali Shokrgozar, Ph.D.<sup>3</sup>,  
Masood Soleimani, Ph.D.<sup>4</sup>, Bahman Zainali, Ph.D.<sup>1</sup>, Esmat Kamali, M.Sc.<sup>5</sup>,  
Seyedeh Soghra Moosavi, M.Sc.<sup>6</sup>, Sirous Zeinali, Ph.D.<sup>5\*</sup>

1. Biology Department, Faculty of Science, Tehran University, Tehran, Iran
2. B.C.G Department, Pasteur Institute of Iran, Karaj Production Complex, Karaj, Iran
3. Cell Bank Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4. Hematology Department, Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5. Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
6. Faculty of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

\* Corresponding Address: Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran  
Email: zeinali@kawsar.ir

Received: 7/Jun/2009, Accepted: 21/Sep/2009

### Abstract

**Objective:** Replacment of CD133<sup>+</sup> cell's  $\beta$  globin gene by using a gene targeting construct containing the  $\beta$  globin gene and essential elements for homologous recombination.

**Materials and Methods:** pFBGGT was amplified, then digested using the NheI and XhoI restriction enzymes, and finally, a 13.3 kb band (naked DNA) was extracted from the agarose gel. Biological activity of positive and negative selection markers were checked by transfection of COS-7 cells with linear plasmid. Hematopoietic stem cells (HSCs) were separated and transfected with linear plasmids using lipofection followed by positive and negative selection. Polymerase chain reaction (PCR) were done on DNA from the selected cells and the products were sequenced.

**Results:** The results of biological activity assays showed that selection markers were active. PCRs for hygromycin, neomycin and joining segments were positive but PCRs for TK1 and TK2 genes were negative. Sequencing PCR product joining segment confirmed the formation of homologous recombination.

**Conclusion:** In this novel strategy gene replacement was achieved and biological activities of its components were observed.

**Keywords:** Beta Thalassemia, Gene Targeting, Homologous Recombination, Gene Therapy

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 199-206

## ترانسفکت کردن سلول‌های بنیادی خون‌ساز انسان به وسیله سازه هدف‌گیری ژنی حاوی ژن بتاگلوبین

مژگان شیخ‌پور <sup>۱</sup>، حسین خان‌احمد <sup>۲</sup>، محمدعلی شکرگزار <sup>۳</sup>، مسعود سلیمانی <sup>۴</sup>، بهمن زینلی <sup>۵</sup>،  
عصمت کمالی <sup>۶</sup>، سیده صغری موسوی <sup>۷</sup>، سیروس زینلی <sup>۸</sup>، <sup>\*</sup>Ph.D.

۱. دانشگاه تهران، پردیس علوم، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
۲. انستیتو پاستور ایران، بخش BCG، مجتمع تولیدی کرج، کرج، ایران
۳. انستیتو پاستور ایران، بخش بانک سلولی، تهران، ایران
۴. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی، تهران، ایران
۵. انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، تهران، ایران
۶. دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده داروسازی، زنجان، ایران

\* آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی  
پست الکترونیک: [zeinali@kawsar.ir](mailto:zeinali@kawsar.ir)

دریافت مقاله: ۸۸/۳/۱۷، پذیرش مقاله: ۸۹/۶/۳۰

### چکیده

\* **هدف:** جایگزینی ژن بتاگلوبین سلول‌های CD133<sup>+</sup> با استفاده از سازه هدف‌گیری ژنی حاوی ژن بتاگلوبین و اجزای مورد نیاز برای نوترکیبی همسان

\* **مواد و روش‌ها:** پلاسمید pFBGGT تکثیر و به وسیله آنزیم‌های XhoI و NheI هضم و باند ۱۳/۳ کیلوبازی مورد نظر از روی ژل آگارز استخراج شد. سلول‌های COS-7 جهت بررسی فعالیت بیولوژیک مارکرهای انتخاب مثبت و منفی، به وسیله پلاسمید خطی شده ترانسفکت شدند. سلول‌های بنیادی خون‌ساز از خون بند ناف جداسازی شده و به وسیله سازه ژنی با روش پلی‌فکشن ترانسفکت شدند و مراحل انتخاب مثبت و منفی انجام گردید. از سلول‌های باقی مانده در محیط انتخابی DNA استخراج و واکنش زنجیره ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction; PCR) برای تکثیر قطعات هیگرومایسین، نومایسین، تیمیدین کیناز و قطعه اتصال‌گذاشته شد.

\* **یافته‌ها:** نتایج آزمایشات، بررسی فعالیت بیولوژیک مارکرهای مثبت و منفی نشان دهنده فعالیت مارکرها بود. قطعات هیگرومایسین، نومایسین و قطعه اتصال‌گذاشته تکثیر شدند ولی قطعات تیمیدین کیناز ۱ و ۲ تکثیر نشدند. نتیجه تعیین توالی محصول PCR قطعه اتصال‌گذاشته، تایید کننده وقوع نوترکیبی همسان در این سلول‌ها بود.

\* **نتیجه‌گیری:** در این تحقیق با استفاده از استراتژی جدید انتخاب مثبت و منفی دو گانه، جایگزینی ژن با استفاده از یک سازه ژنی و در یک مرحله انجام شد.

\* **کلیدواژگان:** بتا‌تالاسمی، هدف‌گیری ژنی، نوترکیبی همسان، ژن درمانی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۲۰۶-۱۹۹

### مقدمه

بر روی نسخه برداری، پردازش mRNA و بیان و پایداری زنجیره بتا پس از ترجمه تاثیر می‌گذارند (۱).

از آنجا که این بیماری یک اختلال ژنتیکی است، تا کنون درمان قطعی برای آن گزارش نگردیده است اما برای حفظ بقای این بیماران روش‌های متعددی به کار گرفته می‌شوند. مهم‌ترین آنها عبارتند از:

۱. انتقال خون (Blood Transfusion)، ۲. درمان از طریق جذب آهن خون (Chelation Therapy) (۲)، ۳. القا سنتز هموگلوبین جنینی از طریق تحریک تولید مجدد گاماگلوبین با استفاده از داروهای متعدد اعم از هیدروکسی اوره، مشتقات بوتیرات و...، ۴. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجود در بیماران تالاسمی (۳)، ۵. پیوند مغز استخوان (Bone Marrow Transplanting) همه این روش‌ها، موقتی و پرهزینه می‌باشند. برخلاف اینکه پیوند مغز استخوان در حال حاضر قطعی‌ترین

بیماری بتا تالاسمی یکی از شایع‌ترین اختلالات ژنتیکی در دنیا می‌باشد (احتمال وقوع یک در ۶۲۴-۴۰۰ تولد). این بیماری در ایران شیوع چشم‌گیری دارد، به طوری که در حال حاضر بیش از پانزده هزار بیمار تالاسمی در کشور موجود است و برنامه کشوری مهار تالاسمی از سال ۱۳۷۶ در حال اجرا است. بتا تالاسمی، یک اختلال تک ژنی با وراثت اتوزومال مغلوب است. این بیماری به دلیل جهش در ناحیه ژنی بتاگلوبین صورت گرفته و در نتیجه سنتز زنجیره بتاگلوبین کاهش یافته و یا متوقف می‌گردد. علائم بیماری تالاسمی بعد از سن دو سالگی به صورت کم خونی شدید، کاهش رشد، زردی، بزرگی کبد و طحال و گسترش حجمی مغز استخوان (چهره تالاسمیک) بروز پیدا می‌کند. تا کنون بیش از ۲۰۰ نوع جهش عامل بتا تالاسمی در ناحیه ژنی بتاگلوبین شناسایی شده‌اند. جهش‌های فوق

هدفگیری ژنی به منظور ژن درمانی تالاسمی

## مواد و روش ها

این تحقیق بخشی از طرح ملی ژن درمانی بوده که در کمیته اخلاق شبکه پزشکی مولکولی کشور تصویب گردید و این مقاله نتایج حاصل از تحقیق در بخشی از طرح مذکور را در بر می گیرد. کلیه مراحل انجام تحقیق به صورت ذیل به طور مختصر ارائه می گردد.

۱. تکثیر، تخلیص و هضم آنزیمی پلاسمید pFBGGT: برای تهیه سازه ژنی مورد نیاز در مراحل ترانسفکشن، باکتری حاوی پلاسمید pFBGGT در محیط L.B Broth (Merck, Germany) حاوی آمپی سیلین و تتراسایکلین رشد داده شد. از باکتری فوق بر اساس پروتکل کیت تخلیص پلاسمید QIAGEN تخلیص گردید. (۱۴، ۱۵) سپس برای جداسازی سازه ژنی از Back Bone پلاسمید، پلاسمید pFBGGT با آنزیم XhoI و NheI هضم و حاصل هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۰.۸٪ درصد الکتروفورز گردیده و باند ۱۳/۳ کیلوبایت از روی ژل بریده شد (هضم آنزیمی بر اساس پروتکل شرکت سازنده آنزیم Fermentas می باشد).

۲. تخلیص DNA از روی ژل: باند ۱۳/۳ کیلوبایت بریده شده از روی ژل با استفاده از کیت QIAGEN DNA GELL EXTRACTION تخلیص و غلظت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید.

۳. تهیه خون بند ناف انسان و جداسازی سلول های CD133<sup>+</sup>: این اوامر پس از کسب مجوزهای لازم جهت خون گیری نمونه گیری از بند ناف در بیمارستان مریم تهران انجام شد. پس از هپارینه کردن خون و انتقال فوری نمونه های بندناف (Cord Blood) در مجاورت یخ، ابتدا سلول های تک هسته ای خون بند ناف با استفاده از فایکول (Lymphodex, Germany) جداسازی شده سپس سلول های CD133<sup>+</sup> با استفاده از کیت MACS (Miltenyi Biotec, Germany) جدا شد (۱۶، ۱۷). مکانیسم جداسازی سلول های CD133<sup>+</sup> با کیت MACS بر اساس آنتی بادی ضد CD133 متصل به نانو ذرات آهن و با استفاده از مگنت می باشد و برای به دست آوردن خلوص بالای ۹۰٪ در این مرحله دو بار انجام شد (۱۸) (سلول جدا شده در مرحله اول به طور مجدد از ستون رد شدند).

۴. فلوسایتومتری: اساس فلوسایتومتری توانایی بررسی خلوص ذرات منحصر به فرد است. در این دستگاه سلول های خونی در Flow Cell با سرعت زیاد به طور یکنواخت در حرکت هستند و از نور لیزر برای بررسی خواص سلولی استفاده می شود. در فلوسایتومترها، اندازه گیری فلورسانس بر اساس طول موج های متفاوتی در کانال های فلورسانس جداگانه و به وسیله فیلترهای گذر از بانندی بوده است که اطلاعات کمی و کیفی متعددی را در مورد نشانگرهای سطح سلولی نشان دار شده به وسیله فلوروکروم ها می دهند. در این مرحله به منظور سنجش خلوص سلولی حاصل، حجمی از محیط که شامل حدود ۴۰۰۰۰ سلول بود پیپتینگ شده، سانتریفیوژ گردید و رسوب سلولی حاصل طی دو مرحله در Phosphate Buffered Saline (PBS) حل شد. به منظور بلوکه کردن سایت های غیراختصاصی CD133 به سلول ها FCR Blocking ۱۰ میلی لیتر اضافه شد و به مدت ۱۶ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از سانتریفیوژ مجدد، بافر IgG1 (Control Group) ، MACS و PE (Test Group) طبق پروتکل موجود به سلول ها اضافه شد (۱۹). در نهایت سلول ها به صورت تماس غیرمستقیم با یخ برای آنالیز فلوسایتومتری حمل گردید و درجه خلوصی حدود ۹۳ درصد گزارش شد.

روش درمانی برای این بیماران محسوب می شود ولی به دلیل کمبود اهدا کننده مناسب و دلایل دیگر، قابل اجرا بودن روش پیوند مغز استخوان تنها برای کمتر از ۲۰ تا ۳۰ درصد از بیماران امکان پذیر است. در عمل تعداد بسیار اندکی (کمتر از ۱۵ درصد از بیماران) پیوند مغز استخوان شده اند (دکتر علی مقدم، مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی). در ضمن در روش پیوند مغز استخوان از غیر به غیر (Heterologous) احتمال عوارضی مانند رد پیوند و واکنش ایمنوژنیک سلول های پیوند علیه میزبان (Graft Versus Host Disease; GVHD)، زیادتر از روش خود به خود (Outologous) می باشد، در نتیجه رفع نقص ژنتیکی از طریق ژن درمانی به گونه ای که بین زنجیره های آلفا و بتا تعادل برقرار گردد، این امر می تواند تنها روش درمانی مؤثر برای این بیماران باشد (۴، ۵). با توجه به موارد ذکر شده، جداسازی سلول های بنیادی خون ساز از شخص بیمار و اصلاح نقایص ژنتیکی این سلول ها در خارج از بدن (ex vivo Ggene Therapy) و پیوند مجدد این سلول ها به شخص بیمار (Autologous HSC Transplantation) روش ایده آل و هدف نهایی برای درمان بیماران تالاسمی می باشد.

در حال حاضر در اغلب پروژه های ژن درمانی برای ارائه ژن به سلول از وکتورهای ویروسی استفاده می شود. کارایی این وکتورها برای ارائه ژن به سلول بسیار بالاست (۶) ولی ظرفیت پذیرش ژن آنها کم بوده و در مواردی که نیاز به تجویز مجدد وکتور باشد احتمال برانگیخته شدن پاسخ ایمنی علیه پروتئین های ویروس وجود دارد. در اغلب موارد بین وکتورها جایگزین شدن ژن در ژنوم به صورت تصادفی صورت می گیرد و این مساله می تواند باعث خاموش یا فعال شدن یک سری ژن ها و ایجاد مشکلاتی مانند بدخیمی شود (۷). از طرفی، بیان ژن بتاگلوبین تحت کنترل ناحیه تنظیمی که در بالادست ژن قرار گرفته است، می باشد و جایگزینی تصادفی ژن توسط وکتورهای ویروسی اثر تنظیمی فوق را از بین می برد (۸). برای تولید هموگلوبین طبیعی در سلول تعادل بین زنجیره  $\alpha$  و  $\beta$  بسیار ضروری است. تعداد نسخه های فعال ژن  $\alpha$  و  $\beta$  در یک سلول نکته اساسی برای حفظ این تعادل است و جایگزینی تصادفی و غیر قابل کنترل ژن  $\beta$  در ژنوم یک فرد می تواند تعداد نسخه های جایگزین شده ژن  $\beta$  در یک سلول را افزایش دهد و باعث اختلال در تعادل سنتز زنجیره  $\alpha$  و  $\beta$  گردد. بنابراین مشکل بیماران پس از ژن درمانی با وکتورهای ویروسی به قوت خود باقی می ماند، به همین دلیل این اواخر به علت وجود معایب فوق توجه بیشتری به روش های هدف گیری ژنی (Gene Targeting) برای ژن درمانی شده است (۹، ۱۰). این امر با پدیده نو ترکیبی همسان (Homologous Recombination) انجام پذیر است. استفاده از این پدیده برای جایگزینی ژن سالم در محل ژن معیوب، هدف گیری ژنی نامیده می شود (۱۱). در این مطالعه سلول های بنیادی خون ساز انسان (Human Hematopoietic Stem Cells; HHSC) جدا شده از خون بند ناف، به عنوان سلول های هدف برای ژن درمانی با روش هدف گیری ژنی انتخاب شدند. سازه ژنی مورد نیاز در داخل پلاسمید pFBGGT کلون شده و مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲).

در این مطالعه سلول های بنیادی خون ساز انسان (CD133<sup>+</sup>) از خون بند ناف جدا گردیده و توسط سازه ژنی ذکر شده ترانسفکت شده و سپس طی مراحل انتخاب مثبت و منفی، سلول های ترانسفکت شده جدا و برای تایید نهایی انجام نو ترکیبی همسان با روش PCR و تعیین توالی بررسی می گردند (۱۳).

جدول ۱: خصوصیات و اندازه هر کدام از قطعات سازه

Fragment	Specifications
TK1	1.63 kb containing promoter, gene and terminator region of HSV-1 thymidine kinase.
USHBG	2.2 kb upstream region of beta globin.
Hygro	1.8 kb, including SV40 promoter and terminator and Hygromycin resistance gene.
HBG	2.1 kb, promoter, coding and non coding regions of HBG and its native terminator.
Neo	1.5 kb Neomycin resistance expression cassette
DSHBG	2.5 kb downstream region of HBG.
TK2	1.6 kb including promoter, gene and terminator of HSV-1 thymidin kinase.

۷. ترانسفکشن (Transfection) سلول‌های CD133<sup>+</sup>: در این مرحله با استفاده از کیت Polyfect شرکت Qiagen بر طبق پروتکل با DNA (۱۳/۳ کیلو بایت DNA) اصل از هضم آنزیمی حاوی سازه ژنی تعداد ۱۰<sup>۶</sup> سلول ترانسفکت شدند.

۸. تعیین دوز دارو (Drug Dose Determination): سلول‌های CD133<sup>+</sup> در پلیت شش خانه‌ای به تعداد ۵۰۰-۱۰۰۰ سلول کشت داده و برای هر غلظت دارو سه خانه در نظر گرفته شد. سپس به هر سه خانه مربوط به یک غلظت (G418) یا غلظت‌های ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ اضافه شد. برای هیگرومایسین، از غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و برای گان سیکلوویراز غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ استفاده گردید. (میزان کلیه غلظت‌های استفاده شده در این قسمت میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد) (۱۲).

۹. انتخاب مثبت و منفی سلول‌های ترانسفکت شده: سلول‌های بنیادی خون‌ساز انسان ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن تحت درمان با داروهای هیگرومایسین و G418 (Gentacin) قرار گرفتند. لازم به ذکر است که از قبل غلظت این داروها از طریق Dose Determination بر روی سلول‌های مذکور بهینه گردید. درمان سلول‌ها با این دو دارو به مدت ۱۴ روز صورت گرفت و از روز هفتم به بعد برای انتخاب منفی علاوه بر دو داروی فوق به محیط داروی گان سیکلوویر نیز اضافه شد (۱۲).

۱۰. برداشت سلول‌های باقی‌مانده و تکثیر آنها: بعد از ۱۴ روز، کلون‌های سلولی تکثیر و DNA آنها جهت بررسی با PCR و تعیین توالی با استفاده از کیت DNP (سیناژن-ایران) تخلیص گردید.

۱۱. واکنش‌های PCR تاییدی برای نوترکیبی همسان: واکنش زنجیره پلیمرازی برای قطعات TK1، TK2، Neo، Hygro و USHBG که متشکل از حدود ۳۰۰ باز بالادست USHBG و خود USHBG و حدود ۴۰۰ باز از انتهای ۵' هیگرومایسین می‌باشد، انجام شد. برای انجام PCR قطعه بیان شده از پرایمر جلوبر

SUS-F5'-TGT GTA TCT GCG AGA GAA GTC-3'

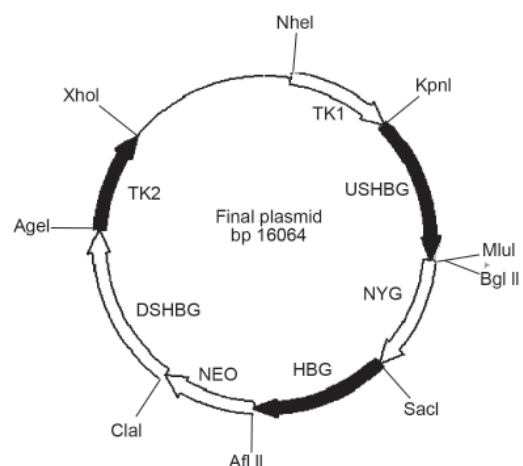
و پرایمر معکوس

Hygro-R4 5'-TCA GGC TTT TTC ATC ACG-3'

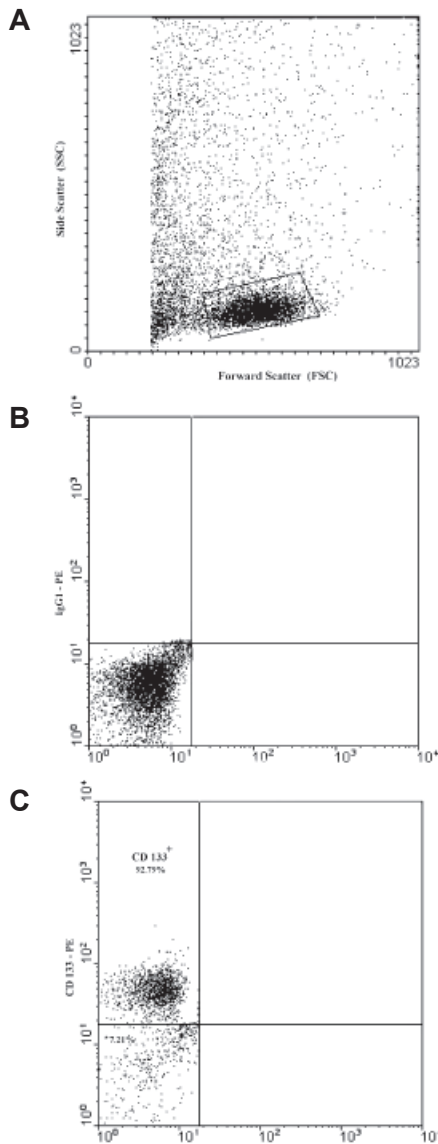
۵. کشت و تکثیر سلول‌های CD133<sup>+</sup>: سلول‌های جمع‌آوری شده پس از شمارش سلولی که در ابتدا ۳۰۰۰۰۰ سلول از هر بند ناف بود، در محیط Stem line حاوی ۲۰ درصد سرم و فاکتورهای رشد سلول بنیادی (Stem Cell Factor; SCF) با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و اینترلوکین ۶ (Trombopoietin Human; TPO) با غلظت ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و اینترلوکین ۶ (Interlukin 6; IL6) با غلظت ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به مدت دو هفته کشت داده شد (۲۰). تعویض محیط هر سه روز یک‌بار با استفاده از محیط کشت تازه حاوی کلیه فاکتورهای رشد فوق انجام گرفت. تعداد سلول‌های جداسازی شده مذکور پس از تکثیر در محیط آزمایشگاه به بیش از یک میلیون رسید. برای این سلول‌ها نیز تست فلوسایتومتری به طور مجدد انجام شده و به دلیل تمایز تعدادی از سلول‌ها در طی مرحله تکثیر درجه خلوصی حدود ۶۵ درصد به دست آمد. بنابر این حدود نهمصد هزار سلول، به طور مطمئن CD133<sup>+</sup> بودند. بنابر این با توجه به این امر که انجام عمل خلص سازی بر روی سلول‌های حاصل از تکثیر و استفاده مجدد از ستون تخلیص، از دست دادن تعدادی از سلول‌های CD133<sup>+</sup> را نیز در پی داشت، عمل ترانسفکت بر روی کلیه سلول‌های حاصل از تکثیر بدون خلص سازی انجام شد. تمام مواد مورد استفاده در این مرحله از شرکت Sigma کشور آلمان تهیه گردید.

۶. تهیه سازه ژنی: مراحل طراحی و ساخت سازه ژنی استفاده شده در این مطالعه بر اساس مطالعه قبلی همکاران بوده است (۱۲). این سازه شامل قطعات بدین شرح بود: دو پایه همولوگ شامل ۲/۲ کیلو بایت بالا دست و ۲/۵ کیلو بایت پایین دست ژن بتاگلوبین (USHBG, DSHBG) ۱/۲ کیلو بایت ژن بتاگلوبین به عنوان ژن هدف، ژن‌های مقاومت به هیگرومایسین و نومایسین به عنوان مارکرهای انتخاب مثبت و ژن مقاومت به تیمیدین کیناز به عنوان مارکر منفی بوده به طوری که ترتیب قطعات به شکل زیر می‌باشد.

TK1-USHBG-HYGROMYCIN-HBG-NEOMYCINE-DSHBG-TK2  
تمام قطعات به وسیله PCR تکثیر شد و مراحل کلونینگ pTZ57T/A و pBGGT انجام گردید و تمامی مراحل کلونینگ و ساب کلونینگ توسط PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید شدند. در نهایت پلاسمید نهایی pBGGT نام گذاری شد (۱۲) (شکل ۱) (جدول ۱).



شکل ۱: طرح کلی سازه ژنی مورد استفاده در این تحقیق و ترتیب قطعات سازه



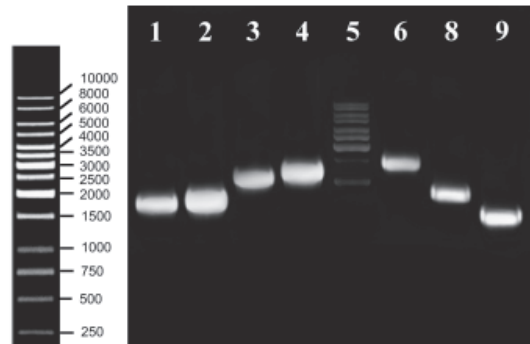
شکل ۴: آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های CD133<sup>+</sup> خلوصی برابر ۷۹/۹۲ را نشان می‌دهد. A. محدوده سلولی مشخص شده که مورد بررسی قرار گرفته شد. B. سلول‌های رنگ شده با آنتی‌بادی کنترل (IgG1). C. سلول‌های رنگ شده با آنتی‌بادی CD133<sup>+</sup> (PE) که تجمع ۹۲/۷۹ درصد از سلول‌ها در منطقه مربوط به CD133<sup>+</sup> نشان دهنده این مقدار خلوص می‌باشند.

جهت بررسی درصد، ترانسفکشن سلول‌های CD133 با پلاسمید pTRES-EGFP ترانسفکت شد و با مشاهده سلول‌های سبز و شمارش آنها در طی یک هفته و درصدگیری نسبت به کل سلول‌های ترانسفکت شده، درصد ترانسفکشن ۱۳-۱۱ درصد محاسبه گردید (یافته‌های مربوطه نشان داده نشد).

#### ترانسفکشن سلول‌های CD133

پس از ترانسفکشن و درمان دارویی سه هفته‌ای با داروهای انتخاب مثبت و منفی برای سلول‌های CD133 یک کلونی از هرآزمون باقی ماند (شکل ۵).

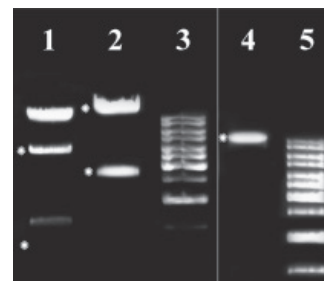
استفاده گردید (شکل ۲). محصول PCR برای تایید نهایی برای تعیین توالی ارسال گردید (۱۲).



شکل ۲: نتیجه PCR قطعات سازه از روی ژنوم‌های مربوطه: ۱. تیمیدین کیناز ۲ (۱۶۰۰ bp)، ۲. تیمیدین کیناز ۱ (۱۶۳۰ bp)، ۳. بتاگلوبین (۲۱۰۰ bp)، ۴. USHBG (۲۲۰۰ bp)، ۵. مارکر ۱ کیلوبایت فرمنتاس، ۶. DSHBG (۲۵۵۰ bp)، ۷. هیگرومایسین (۱۸۰۰ bp)، ۸. نئومایسین (۱۵۰۰ bp).

#### یافته‌ها

پس از طی مراحل تکثیر و آماده‌سازی باکتری و وارد نمودن پلاسمید در آن و سپس استخراج و تخلیص پلاسمید در نتیجه هضم، پلاسمید نهایی با دو آنزیم XhoI و NheI سازه ژنی به طول ۱۳/۳ کیلوبایت از پلاسمید (۲/۷ کیلوبایت) خارج شد. شکل ۳ نتیجه حاصل از الکتروفورز محصول این هضم آنزیمی پلاسمید نهایی را نشان می‌دهد.



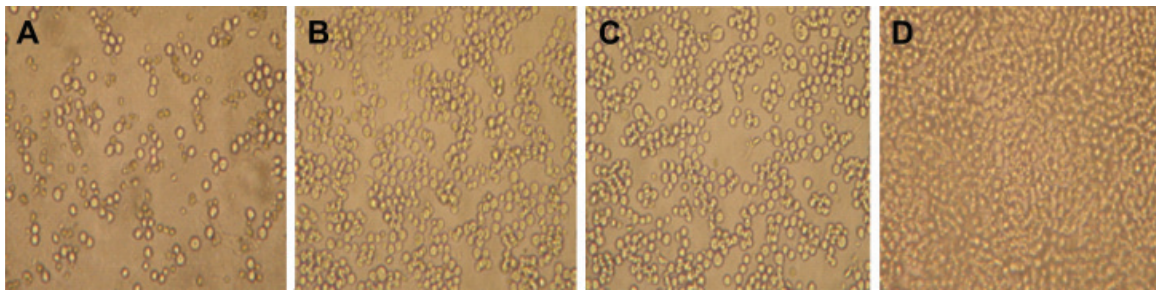
شکل ۳: ۱ و ۲. هضم pFBGGT با XhoI و NheI، (۱۳۳۶۰+۲۷۰۰)، ۳. مارکر ۱ کیلوبایت، ۴. Naked DNA، ۵. مارکر ۱۳۳۶۰ کیلوبایت.

#### تعیین غلظت موثر دارو

غلظت مناسب دارو برای هیگرومایسین ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای G418 ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در این غلظت‌ها کلیه سلول‌های ترانسفکت نشده با سازه ژنی مرده شده و سلول‌های ترانسفکت شده زنده ماندند. غلظت مناسب برای گان سیکلوویر ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. فعالیت زیستی مارکرهای مثبت و منفی موجود در سازه در مطالعات قبلی توسط دکتر خان احمد و همکاران بررسی شده است (۱۲).

جداسازی سلول‌های CD133: سلول‌های CD133 با ستون MACS طی دو بار عبورخون بند ناف از ستون جداسازی شدو حدود ۳۰۰۰۰۰ سلول به دست آمد. در بررسی سلول‌های فوق با روش فلوسایتومتری خلوص سلول‌ها حدود ۹۳ درصد بود (شکل ۴).





شکل ۵: A. سلول‌های CD133<sup>+</sup> جداسازی شده از خون بند ناف، B. سلول‌های CD133<sup>+</sup> تکثیر شده و آماده برای ترانسفکشن، C. سلول‌های CD133<sup>+</sup> ترانسفکت شده و به جای مانده پس از سه هفته درمان دارویی به وسیله هیگرومایسین، نئومایسین و گان‌سیکلوویر، D. سلول‌های CD133<sup>+</sup> ترانسفکت نشده پس از سه هفته درمان دارویی.

پستانداران و همچنین انسان است. با توجه به این امر یکی از عوامل موثر در افزایش احتمال نو ترکیبی همسان نوع و کتور مورد استفاده می‌باشد. در این تحقیق برای هدف‌گیری ژن بتا از وکتور pFBGGT استفاده شده. این حامل ژنی یک نوع وکتور جایگزینی (Replacement) می‌باشد که طرح کلی آن در شکل ۱ نشان داده شده است. در این سازه ژنی قطعات USHBG و DSHBG به عنوان بازوهای همولوگ بوده و به ترتیب حاوی ۲/۲ و ۲/۵ کیلوباز از بالادست و پایین دست ژن بتاگلوبین هستند. اندازه این قطعات به گونه‌ای انتخاب شده تا هم از نظر فراوانی انجام GT و هم از نظر محدودیت در ظرفیت پذیرش پلاسمید مشکلی وجود نداشته باشد. از طرفی قطعه USHBG کوچک‌تر طراحی شده تا در مرحله PCR تاییدی، مشکل بزرگی طول محصول نیز مرتفع گردد. علاوه بر این در این وکتور دو مارکر مثبت در دو طرف ژن بتاگلوبین قرار دارد و در یک مرحله نو ترکیبی همسان ژن معیوب خارج و ژن سالم جایگزین می‌شود.

### نتیجه‌گیری

گرچه تا کنون با استفاده از وکتورهای ویروسی تحقیقات متعددی برای ژن درمانی بیماری بتاتالاسمی انجام شده است (۲۳)، ولی بیشتر، سلول‌های هدف رده‌های سلولی پستانداران مثل MLE و یا در نهایت HSC موش بوده است. تحقیقات انگشت شماری نیز در زمینه اصلاح نقص ژنتیکی ژن بتاگلوبین با استفاده از روش نو ترکیبی همسان انجام شده که این تحقیقات نیز بیشتر روی سلول‌های غیر از HSC انسانی بوده است (۲۵). با این وجود اصلاح نقص ژنتیکی سلول‌های بنیادی خون‌ساز انسان با روش هدف‌گیری ژنی کاری جدید بوده است. از طرفی در این تحقیق، سلول بنیادی خون‌ساز جدا شده از بند ناف (CD133<sup>+</sup>) یک سلول کاملاً جدید است و در تمامی مراحل اعم از نمونه‌گیری، جداسازی سلول و تکثیر و ترانسفکت و... شرایط برای نتیجه‌گیری مطلوب‌تر بهینه گردیده است. علاوه بر این موارد، سازه ژنی مورد استفاده در این تحقیق نیز سازه‌ای جدید است زیرا سازه‌های استفاده شده در تحقیقات دیگر دارای یک مارکر انتخاب مثبت‌اند و عمل جایگزینی ژن مورد نظر در دو مرحله نو ترکیبی همسان انجام می‌شود ولی این سازه دارای دو مارکر انتخاب مثبت بوده و عمل جایگزینی ژن مورد نظر در یک مرحله انجام می‌شود (۲۶). همان‌طور که در قبل ذکر گردید، در حال حاضر با وجود بیش از پانزده هزار بیمار تالاسمی در کشور و صرف هزینه‌های هنگفت جهت درمان و بقای این بیماران، به منظور کاهش درد و رنج آنان، تصحیح نقایص ژنی به روش نو ترکیبی همسان

نتیجه PCR روی سلول‌های تکثیر شده با مثناء کلونی باقی مانده در شرایط درمان با سه داروی هیگرومایسین، نئومایسین و گانسیکلوویر برای قطعات Hygromycin و Neomycin و قطعه ۳۰۰bp بالادست US-US و ۴۰۰bp از انتهای ۵' هیگرومایسین به طول ۲۹۸۵bp مثبت و برای TK1 و TK2 منفی بود (شکل ۶).



شکل ۶: ۱ و ۷. مارکر، ۲. قطعه تایید کننده نو ترکیبی همسان (حاوی بالادست USHBG و USHBG و قطعه‌ای از انتهای ۵' هیگرومایسین، ۳ و ۵. TK1 و TK2 که هر دو تکثیر نشده‌اند، ۴. نئومایسین، ۵. هیگرومایسین، ۶. گانسیکلوویر.

### بحث

در حال حاضر استراتژی‌های متعددی برای ژن درمانی بتاتالاسمی مطرح است که شایع‌ترین آنها عبارتند از: استفاده از وکتورهای ویروسی به خصوص رتروویروس‌ها و لنتی ویروس‌ها، روش هدف‌گیری ژن، نو ترکیبی همسان با استفاده از قطعات کوتاه ژن (SFHR)، Triplex RNAi، Forming Oligonucleotides و استفاده از ریویزیم‌ها. برای اولین بار توسط مای و همکارانش با استفاده از نو ترکیبی همسان ژن بتاگلوبین انسان را هدف‌گیری نمودند و آخرین مطالعه گزارش شده نیز در این مورد توسط چاو و همکارانش بر روی سلول‌های بنیادی جنینی مبتلا به بتاتالاسمی صورت گرفت. آنها با استفاده از ژن درمانی توانستند ژن سالم بتاگلوبین را جایگزین ژن معیوب نمایند. با توجه به مشکلات ژن درمانی با وکتورهای ویروسی - که به طور مختصر در مقدمه ذکر گردید - در طی سال‌های اخیر توجه محققین مجدداً به روش هدف‌گیری ژنی (Gene Targeting; GT) با استفاده از پدیده نو ترکیبی همسان جلب شده است به طوری که از این روش می‌توان برای جایگزینی یک ژن در محل مشخص Gene Knock in، خارج نمودن قطعه ژنی حاصل از محل معینی از ژنوم Gene Knock out و یا اصلاح و تغییرات جزئی در ناحیه مشخصی از ژنوم Subtle Mutation استفاده نمود (۲۱، ۲۲). اصلی‌ترین مشکل هدف‌گیری ژنی، تعداد پایین وقوع نو ترکیبی همسان در سلول‌های

آوردن ملزومات این تحقیق و تامین هزینه‌های مالی مساعدت‌های لازم را مبذول داشتند، قدردانی نماییم. از کلیه مسئولین، پزشکان، پرسنل و بیماران محترم بخش زایمان بیمارستان مریم که با رضایت کامل و محبت بی‌دریغشان ما را در مرحله تهیه خون بندناف، صمیمانه یاری کردند کمال تشکر را داریم. همچنین از خانم دکتر حقیقی (بخش بانک سلولی انستیتو پاستور ایران)، آقای دکتر آتشی (گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس)، آقای جان زمین (بخش خون بند ناف موسسه رویان) و سرکار خانم فاطمه وحید دستجردی (دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران) که در زمینه عکس‌برداری، جداسازی و فلوسایتمتری از هر گونه همکاری دریغ نکردند نیز سپاسگزاریم.

## References

1. Daar S, Gravell D, Hussein HM, Pathare AV, Wali Y, Krishnamoorthy R. Haematological and clinical features of  $\beta$ -thalassaemia associated with Hb Dhofar. *Euro J Haemato*. 2008; 80(1): 67-70.
2. Lee JW. Iron chelation therapy in the myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: a review of experience in South Korea. *Int J Hematol*. 2008; 88(1):16-23.
3. Bashyam MD, Bashyam L, Savithri GR, Gopikrishna M, Sangal V, Devi AR. Molecular genetic analyses of beta-thalassemia in South India reveals rare mutations in the beta-globin gene. *J Hum Genet*. 2004; 49(8): 408-413.
4. Pfeifer A, Verma IM. Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2001; 2: 177-211.
5. Walters MC. Stem cell therapy for sickle cell disease: transplantation and gene therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005: 66-73.
6. Greiner J, Wiehe J, Wiesneth M, Zwaka TP, Prill T, Schwarz K, et al. Transient genetic labeling of human CD34-positive hematopoietic stem cells using nucleofection. *Transfus Med Hemother*. 2004; 31: 136-141.
7. Vlachaki E, Ioannidou-Papagiannaki E, Tziomalos K, Haralambidou-Vranitsa S, Perifanis V, Klonizakis I, et al. Peripheral blood haematopoietic progenitor cells in patients with beta thalassaemia major receiving desferrioxamine or deferiprone as chelation therapy. *Eur J Haematol*. 2007; 78(1): 48-51.
8. Li ZH, Liu DP, Yin WX, Guo ZC, Liang CC. Targeted correction of the point mutations of beta-thalassemia and targeted mutagenesis of the nucleotide associated with HPFH by RNA/DNA oligonucleotides: potential for beta-thalassemia gene therapy. *Blood Cells Mol Dis*. 2001; 27(2): 530-538.
9. Li W, Xie S, Guo X, Gong X, Wang S, Lin D, et al. A novel transgenic mouse model produced from lentiviral germline integration for the study of beta-thalassemia gene therapy. *Haematologica*. 2008 ;93 (3): 356-362.
10. Biet E, Larue L, Dutreix M. Homologous recombination and gene targeting. *C R Biol*. 2003; 326(1): 51-64.
11. Johzuka-Hisatomi Y, Terada R, Iida S. Efficient transfer of base changes from a vector to the rice genome by homologous recombination: involvement of heteroduplex formation and mismatch correction. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36(14): 4727-4735.
12. Khanahmad H, Noori Dalooi MR, Shokrgozar MA, Azadmanesh K, Niavarani AR, Karimi M, Rabani B,

(Homologous Recombination)، یکی از روش‌های موثر می‌باشد و از آنجایی که سلول‌های بنیادی خون‌ساز قابلیت تبدیل به پیش‌سازهای رده‌های مختلف سلول‌های خونی را دارند، شاید با تصحیح ژن معیوب در *in vitro* و پیوند اتولوگ این سلول‌ها به بیمار، شاید بتوان به درمان موثر این بیماری دست یافت (۲۷).

## تقدیر و تشکر

بر خود واجب می‌دانیم از مسئولین محترم مربوطه در شبکه پزشکی مولکولی کشور، بخش‌های بیوتکنولوژی و بانک سلولی انستیتو پاستور ایران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات که در فراهم

- Bageri R, Khalili M, Maryami F, Zeinali S. A novel single step double positive double negative selection strategy for  $\beta$ -globin gene replacement. *Yakhteh* 2006; 2: 98-105.
13. Tura O, Barclay GR, Roddie H, Davies J, Turner ML. Optimal ex vivo expansion of neutrophils from PBSC CD34+ cells by a combination of SCF, Flt3-L and G-CSF and its inhibition by further addition of TPO. *J Transl Med*. 2007; 5: 53-64.
  14. Stamatoyannopoulos G. Prospects for developing a molecular cure for thalassemia. *Hematology*. 2005; 10 Suppl 1: 255-257.
  15. Gruenert DC, Bruscia E, Novelli G, Colosimo A, Dalapicola B, Sangiuolo F, et al. Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragments. *J Clin Invest*. 2003; 112(5): 637-641.
  16. Sangiuolo F, Novelli G. Sequence-specific modification of mouse genomic DNA mediated by gene targeting techniques. *Cytogenet Genome Res*. 2004; 105(2-4): 435-441.
  17. Mandal AK, Bisht S, Bhat VS, Krishnaswamy PR, Balam P. Electrospray mass spectrometric characterization of hemoglobin Q (Hb Q-India) and a double mutant hemoglobin S/D in clinical samples. *Clin Biochem*. 2008; 41(1-2): 75-81.
  18. Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhning HJ, Niethammer D, Kuci S. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 996: 141-151.
  19. Kekarainen T, Mannelin S, Laine J, Jaatinen T. Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. *BMC Cell Biol*. 2006 1; 7: 30-37.
  20. Ołdak T, Kruszewski M, Machaj EK, Gajkowska A, Pojda Z. Optimisation of transfection conditions of CD34+ hematopoietic cells derived from human umbilical cord blood. *Acta Biochim Pol*. 2002; 49(3): 625-632.
  21. May C, Rivella S, Chadburn A, Sadelain M. Successful treatment of murine beta-thalassemia intermedia by transfer of the human beta-globin gene. *Blood*. 2002; 99(6): 1902-1908.
  22. Gao G, McMahon C, Chen J, Rong YS. A powerful method combining homologous recombination and site-specific recombination for targeted mutagenesis in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(37): 13999-14004.
  23. Hanawa H, Hargrove PW, Kepes S, Srivastava DK, Nienhuis AW, Persons DA. Extended beta-globin locus control region elements promote consistent therapeutic

expression of a gamma-globin lentiviral vector in murine beta-thalassemia. *Blood*. 2004; 104(8): 2281-2290.

24. Qiu C, Olivier EN, Velho M, Bouhassira EE. Globin switches in yolk sac-like primitive and fetal-like definitive red blood cells produced from human embryonic stem cells. *Blood*. 2008; 111(4): 2400-2408.

25. Garrick D, De Gobbi M, Samara V, Rugless M, Holland M, Ayyub H, et al. The role of the polycomb complex in silencing alpha-globin gene expression in noneryth-

roid cells. *Blood*. 2008; 112(9): 3889-3899.

26. Moldenhauer A, Genter G, Lun A, Bal G, Kiesewetter H, Salama A. Hematopoietic progenitor cells and interleukin-stimulated endothelium: expansion and differentiation of myeloid precursors. *BMC Immunol*. 2008; 9: 56-68.

27. Rodgers GP, Sauntharajah Y. Advances in experimental treatment of beta-thalassaemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001; 10(5): 925-934.

---