جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال شانزدهم، شماره ۵، پی در پی ۸۳، صفحات ۲۳۴ تا ۲۴۰
آذر و دی ۱۳۹۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۴/۱۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱۱/۱

بررسی مهار بیان ژن رپرسور گاماگلوبین با روش RNAi در رده سلولی اریتروئیدی K۵۶۲ با هدف ژن درمانی بتاتالاسمی

دکتر علی‌محمد اصغریان[۱]، دکتر مهدی بنان[۲]، دکتر حسین نجم‌آبادی[۳]*

۱. مربی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
۲. استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
۳. استاد، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

چکیده

سابقه و هدف: بتاتالاسمی از بیماریهای ژنتیکی است که سبب کم‌خونی حاد در افراد مبتلا می‌شود. یکی از روشهای درمان بتاتالاسمی، القای ژن گاماگلوبین جنینی است. کمپلکس پروتئینی DRED از رپرسورهای گاماگلوبین است که از دو زیر واحد متصل شونده به DNA، به نام TR۲ و TR۴ تشکیل شده است. یک روش جالب جهت افزایش بیان گاماگلوبین، مهار بیان TR۴ توسط مولکول‌های siRNA می‌باشد. هدف از این تحقیق، راه‌اندازی سیستم RNAi به منظور مهار بیان ژن TR۴ سلول‌های اریتروئیدی K۵۶۲ و بررسی میزان بیان گاماگلوبین می‌باشد.

مواد و روشها: از لیپید ۲۰۰۰ lipofectamine™ جهت ترانسفکشن و از پلاسمید گزارشگر pSV-β-Galactosidase جهت بررسی راندمان استفاده شد. بعد از ترانسفکشن TR۴ siRNA، میزان بیان ژن TR۴ و گاماگلوبین با روش Real-time PCR در سلول‌های K۵۶۲ تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد با ترکیب Lipofectamine™ ۲۰۰۰، ۴۰٪ از سلول‌های K۵۶۲ ترانسفکت شدند. بیان TR۴ توسط siRNA TR۴ حدود ۴۴٪ کاهش داشت اگرچه القای ژن گاماگلوبین ۱/۱۸ برابر بود.

نتیجه‌گیری: گرچه بیان TR۴ تا ۴۴٪ مهار شد ولی القای قابل ملاحظه ژن گاماگلوبین مشاهده نشد. برای عدم القای گاماگلوبین دو مورد قابل بحث است. اول اینکه میزان ترانسفکشن در سلول‌های K۵۶۲ ، مهار بیان ژن TR۴ را محدود می‌سازد. دوم اینکه شاید مهار TR۴ و TR۲ بطور همزمان در سلول K۵۶۲ سبب القای گاماگلوبین شود. در مجموع با سیستم RNAi در سلول K۵۶۲، مهار ژن TR۴ رخ داد ولی مهار بیان این ژن با روش RNAi به تنهایی نمی‌تواند سبب القای ژن گاماگلوبین شده و در ژن درمانی استفاده شود.

واژگان کلیدی: بتاتالاسمی، TR۴ siRNA، مهار TR۴، گاماگلوبین، سلول‌های K ۵۶۲

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Asgharian AM, Banan M, Najmabadi H. Evaluation of knocking down of the RNAi mediated gamma globin repressor into K562 cells, for gene therapy of beta-thalassemia. Pejouhandeh 2011;16(5):234-40.

مقدمه

هموگلوبین مولکولی است که از دو زنجیره شبه α و دو زنجیره شبه β گلوبین همراه با چهار مولکول هم (Heme) متصل به آهن تشکیل شده است و در انتقال اکسیژن و دی اکسید کربن نقش مهمی را ایفا می‌کند. در دوران جنینی، هموگلوبین از نوع جنینی یا $\alpha_2\gamma_2$ می‌باشد در حالی که هموگلوبین اصلی در دوران بلوغ هموگلوبین نوع $\alpha_2\beta_2$ است (۴-۱). در فرآیند تمایز سلول‌های گلبول قرمز، غیر فعال شدن ژن گاماگلوبین و فعال شدن بتاگلوبین یک رخداد مهم محسوب می‌گردد و اگر در این فرآیند تغییر بیان ژن، اختلالی ایجاد شود می‌تواند منجر به ایجاد بیماریهایی از قبیل کم‌خونی ناشی از سلول‌های داسی شکل و بتاتالاسمی شود (۵). شایان ذکر است که شمار مبتلایان به بتاتلاسمی در آسیا و خصوصاً در ایران قابل توجه است. بیماران مبتلا به آنمی داسی شکل دچار انسداد عروقی بوده و به مراقبتهای طولانی

* **نویسنده مسؤول مکاتبات:** دکتر علی‌محمد اصغریان؛ مازندران، تنکابن، ولی آباد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن؛ تلفن: ۲۹۵۸۶۴۴-۹۱۲-۹۸+؛ **پست الکترونیک:** mehranasgharian@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مدت نیاز داشته و طول عمر آنها نیز کوتاه می‌باشد (۳). از اینرو درمان بی‌نظمی‌های هموگلوبین همواره مورد توجه می‌باشد.

از روشهای جدید مورد توجه برای درمان بی‌نظمی‌های ناشی از هموگلوبین، ژن درمانی و تغییر الگوی بیان ژن گاماگلوبین و دوباره فعال‌سازی این ژن در سلول‌های اریتروئیدی بالغ می‌باشد (۲). این تئوری از شواهد طبیعی، که به عنوان فنوتیپ HPFH (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin) نامیده می‌شود، نشأت گرفته است. در بیماران مبتلا به HPFH، گاماگلوبین برخلاف انتظار در سلول‌های اریتروئیدی بالغ بیان می‌شود و علائم بیماری نیز در آنها تا حد زیادی کاهش داشته و بیماران طول عمر بیشتری دارند. دوباره فعال‌سازی گاماگلوبین کمبود بتاگلوبین را در سلول‌های اریتروئیدی بالغ جبران می‌نماید. در نتیجه بیان گاماگلوبین در سلول‌های اریتروئیدی بالغ می‌تواند در تخفیف حدت کم‌خونی در بیماران بتاتالاسمی و بیماران کم‌خونی داسی شکل مفید باشد (۸-۶).

در این زمینه مشخص شده که مجموعه پروتئینی DRED (Direct repeat erythroid-definitive) به عنوان فاکتور ترانس اکتینگ مهارکننده در تنظیم رونویسی بیان گاماگلوبین دخالت دارد. این مجموعه حاوی دو زیرواحد متصل شونده به DNA به نام TR۲ (Testicular Receptor) و TR۴ است که با میل اتصالی زیاد به توالی DR (Direct Repeat)که در پروموتر گاما و اپسیلون گلوبین قرار دارد وصل می‌شوند، در حالیکه ژن‌های بتاگلوبین انسانی مکانهای DR نداشته و به DRED پاسخ نمی‌دهند (۹).

مهار بیان ژن گاماگلوبین به واسطه مجموعه پروتئینی DRED و توسط آزمایشات Omeri و همکارانش با آزمایشات موتاسیون‌زایی تأیید شده است. آنها نشان دادند که با مهار اتصال DRED در توالی DR پروموتری، بیان هموگلوبین جنینی افزایش می‌یابد (۹ و ۱۰). در نتیجه این تئوری مطرح شد که در سلول‌های بالغ اریتروئیدی مهار گاماگلوبین ممکن است به دلیل عملکرد DRED باشد. از طرفی نتایج موشهای تراریخت نشان داده که میزان افزایش بیان ژن گاماگلوبین در جنینهای موتانت با فنوتیپ $TR2^{-/+}TR4^{-/-}$ نسبت به موتانت با فنوتیپ $TR2^{-/-}$ $TR4^{-/+}$ بیشتر است. بنابراین نقش TR۴ نسبت به TR۲در القای گاماگلوبین بیشتر است (۱۱).

شایان ذکر است که در سلول‌های انسانی و سلول‌های مغز استخوان، $CD34^{+}$ و $CD34^{-}$ بالغ، بیان و تجمع TR۲ mRNA و TR۴ mRNA وجود دارد. بنابراین می‌توان از نتایج سیستم مهار ژنی RNAi در سلول‌های K۵۶۲ در سلول‌های بنیادی خونی نیز استفاده نمود (۹ و ۱۱). در سالهای اخیر روش جدیدی در ژن درمانی بیماریهای ژنتیکی (از قبیل بی‌نظمی‌های هموگلوبین) مطرح شده است که در آن با استفاده از مولکول‌های siRNA می‌توان در مرحله بعد از رونویسی بیان ژن‌ها را کنترل نمود. هدف اصلی این مطالعه نیز استفاده از سیستم RNAi به منظور ژن درمانی بی‌نظمی هموگلوبین بود (۱۲). در این تحقیق اثرات مهار بیان ژن TR۴ توسط siRNA TR۴ بررسی و اثرات آن در افزایش بیان گاماگلوبین در سلول‌های مدل اریتروئیدی K۵۶۲ بررسی شده است. این مطالعه مشخص می‌کند که آیا با مهار بیان TR۴ (که ناحیه متصل شونده اصلی رپرسور DRED است) توسط سیستم RNAi، می‌توان القای گاماگلوبین را در سلول‌های اریتروئیدی بالغ K652 دوباره فعال نمود یا خیر.

مواد و روشها

کشت سلول‌های K۵۶۲: استفاده از سلول‌های K۵۶۲ که از رده سلول‌های مدل اریتروئیدی با منشأ انسانی است در مطالعات تنظیم بیان ژن هموگلوبین رایج می‌باشد. محیط کشت مناسب برای این رده سلولی محیط RPMI۱۶۴۰ (شرکت Biosera) همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (شرکت Biosera) و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (شرکت Biosera) بود. این سلول‌ها در ظروف کشت ۶ چاهکی و انکوباتور با CO_2 ۵٪ و ۹۵٪ رطوبت کشت داده شدند.

ترانسفکشن پلاسمید pSV-β-Galactosidase در سلول‌های K۵۶۲ با استفاده از ترکیب Lipofectamine ™۲۰۰۰: این آزمایش به این منظور انجام شد تا قبل از ترانسفکشن مولکول‌های siRNA میزان مناسب از ترکیب لیپیدی Lipofectamine ™۲۰۰۰ (از شرکت Invitrogene) تعیین شود. جهت بررسی راندمان ترانسفکشن (انتقال ژن) نیاز به وکتور pSV-β-Galactosidase می‌باشد. این وکتور، از شرکت Promega تهیه شد که دارای ژن گزارشگر بتا گالاکتوزیدار تحت کنترل پروموتر سایتومگالوویروس است و براحتی در رده‌های سلولی پستانداران قابل بررسی و بیان است. سلول‌های پستانداران که این پلاسمید را دریافت کنند در مشاهدات میکروسکوپی آبی رنگ می‌شوند.

سلول‌های K۵۶۲ در محیط RPMI۱۶۴۰ و در شرایط ذکر شده گرما دهی شدند تا تعداد سلول‌ها بعد از یک شبانه روز به 10^5 سلول در هر میلی‌لیتر برسد. سپس برای هر چاهک کشت مقدار ۱ میکروگرم از DNA پلاسمید pSV-β-Galactosidase انتخاب و با ۲۰۰ میکرولیتر محیط RPMI۱۶۴۰ بدون سرم مخلوط شد و

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا کمپلکس DNA- ™۲۰۰۰ Lipofectamine ایجاد شود. سپس مقدار ۶۰۰ میکرولیتر محیط بدون سرم RPMI۱۶۴۰ به سلول‌های هر چاهک اضافه شد و در ادامه کمپلکس DNA- ™۲۰۰۰ Lipofectamine به آرامی روی سلول‌ها ریخته و پلیت چند بار به عقب و جلو تکان داده شد تا کمپلکس DNA- ™۲۰۰۰ Lipofectamine در سطح پلیت کاملا پخش گردد. پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C گرمادهی شد و بعد از ۴ ساعت، ۲ میلی‌لیتر محیط RPMI۱۶۴۰ کامل همراه با سرم جنینی گاوی به سلول‌ها اضافه گردید. سپس سلول‌ها ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷°C با CO۲ ۵٪ و ۹۵٪ رطوبت قرار داده شدند. جهت بررسی حضور فعالیت بتاگالاکتوزیداز از کیت رنگ‌آمیزی بتاگالاکتوزیداز (از شرکت Roche) استفاده شد. برای این منظور ابتدا سلول‌های K۵۶۲ ترانسفکت شده در دور g ۱۰۰۰ سانتریوفوژ و سپس با محلول تثبیت کننده و رنگ‌آمیزی مطابق با روش مندرج در کیت رنگ آمیزی شدند.

طراحی و سنتز مولکول‌های TR۴ siRNA و Negative siRNA: مولکول‌های siRNA مورد آزمایش شامل siRNA TR۴ (بصورت Validated TR۴ siRNA) و Negative siRNA (ساخت شرکت MWG) بود. توالی TR۴ siRNA در سایت Ambion و مطابق با معیارهای Reynold طراحی شده بود. توالی Negative siRNA نیز توسط شرکت MWG سنتز شده بود و شامل توالی بود که با هیچ کدام از mRNA سلول در موش انسان و رت مکمل نبوده و بعنوان کنترل منفی آزمایشات در نظرگرفته می‌شد. سپس با حل کردن نمونه‌های TR4 siRNA و Negative siRNA در آب استریل بدون RNase، محلولهای با غلظت ۲۰ نانومول از آنها تهیه شد. توالی TR۴ siRNA و Negative siRNA در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- توالی TR۴ siRNA و Negative siRNA

TR۴ siRNA	GGAGGAAGTGATCCGAAAA
Negative siRNA	AGGUAGUGUAAUCGCCUUG

ترانسفکشن TR۴ siRNA و Negative siRNA در سلول‌های K۵۶۲ توسط ™۲۰۰۰ Lipofectamine: پس از تعیین بهترین مقدار ترکیب ™۲۰۰۰ Lipofectamine (که مراحل آن در بالا ذکر شد)، ۲ میکرولیتر از ترکیب ™۲۰۰۰ Lipofectamine به ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI۱۶۴۰ بدون سرم اضافه و پی‌پت گردید. این مخلوط ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI۱۶۴۰ بدون سرم در لوله ۱/۵ میلی‌لیتر اضافه و پی‌پت گردید. نمونه‌های TR۴ siRNA و Negative siRNA به اندازه‌ای برداشته شد (۴ میکرولیتر) که در نهایت غلظت آنها در هر چاهک آزمایش به ۱۰۰ نانومول برسد. بعد از ۵ دقیقه، نمونه‌های ™۲۰۰۰ Lipofectamine و siRNA رقیق شده در RPMI۱۶۴۰ با یکدیگر مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا کمپلکس siRNA- ™۲۰۰۰ Lipofectamine ایجاد گردد. بعد از ۲۰ دقیقه، کمپلکس‌های siRNA- ™۲۰۰۰ Lipofectamine به میزان ۴۰۰ میکرولیتر به سلول‌های K۵۶۲ اضافه گردید. سپس پلیت چند بار به عقب و جلو حرکت داده شد تا کمپلکس siRNA- ™۲۰۰۰ Lipofectamine در تمام سطح محیط پخش شود. پلیت به انکوباتور ۳۷°C با رطوبت ۹۰٪ و CO۲ ۵٪ انتقال داده شد. بعد از ۴ ساعت ۲ میلی‌لیتر محیط RPMI۱۶۴۰ کامل به سلول‌ها اضافه گردید. مجدداً پلیت به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا میزان کاهش بیان ژن بعد از این مدت بررسی گردد.

لازم به توضیح است که در کلیه آزمایشات ترانسفکشن از کنترل مثبت استفاده شد که در آن پلاسمید pSV-β-Galactosidase، در همان شرایطی که برای مولکول‌های siRNA اعمال شد، در سلول‌های K562 ترانسفکت گردید.

مرحله استخراج RNA و سنتز cDNA: بعد از ۷۲ ساعت RNA سلول‌های K۵۶۲ که با مولکول‌های TR۴ siRNA و Negative siRNA ترانسفکت شده بودند استخراج گردید (مطابق با روش کیت RNX-PLUS سیناژن). با استفاده از پی‌پت، سلول از چاهکهای کشت برداشته و سپس در دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریوفوژ شدند. پس از آن، مایع رویی برداشته و رسوب سلولی انتخاب گشت و مراحل تخلیص RNA بصورت زیر انجام گردید: به هر کدام از رسوبهای حاصل، یک میلی‌لیتر از محلول RNX-Plus (از شرکت سیناژن) اضافه و به مدت ۵-۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به هر نمونه ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (Merck) افزوده شده و بعد از ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰rpm بمدت ۱۵ دقیقه سانتریوفوژ گردید. پس از آن، فاز رویی انتخاب و هم حجم آن ایزوپروپانل (Merck) اضافه و کاملاً مخلوط گردید و سپس در دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریوفوژ شد. به رسوبهای حاصل، ۱ سی‌سی اتانل (Merck) سرد اضافه و سپس در ۷۰۰۰rpm سانتریوفوژ گردید. در انتها، رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اتوکلاو شده حل

شد. کیفیت RNA استخراج شده با اندازه‌گیری جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و بررسی در ژل RNA دارای ۱٪ آگاروز، با شناسایی باندهای ۱۸sRNA و ۲۸sRNA ارزیابی شد. سپس با نمونه‌های RNA استخراج شده، با استفاده از کیت OminiScript (از شرکت Qiagen) و با روش مندرج در کیت cDNA سنتز شد.

آزمایشات Real-time PCR جهت بررسی میزان مهار بیان ژن رپرسور TR۴ و القای ژن گاماگلوبین: برای این منظور از کیت Quanifast SYBR GREEN (از شرکت Qiagen) و دستگاه Real-time PCR (مدل ABI-7500) استفاده شد. در این مطالعه از روش کمی-نسبی (Relative-quantification) استفاده شد که در آن بیان یک ژن هدف نسبت به بیان یک ژن خانه‌دار (Housekeeping gene) به نام GAPDH (Glyceraldehyde 3- phoshpodehydrogenase) انجام می‌شود. مراحل واکنش مطابق با روشی که در کیت قید شده بود انجام گرفت. شرایط واکنش PCR بصورت زیر بود: دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، اتصال در دمای ۹۵ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۱۰ و ۳۰ ثانیه با تعداد چرخه‌های ۴۰ بار. در این روش رنگ سایبرگرین به مولکول DNA دو رشته‌ای متصل و فلورسانس ساطع می‌کند. سپس با استفاده از معیار CT (یا سطح آستانه) و با فرمول زیر میزان بیان ژن TR۴ نسبت به ژن GAPDH ارزیابی می‌شود (۱۳). توالی پرایمرهای مورد نیاز جهت Real time PCR طراحی شده از سایت primer Bank در جدول ۲ آمده است.

$$۲^{\Delta\Delta CT} = 2^{(\Delta TR4-\Delta GAPDH)}$$

جدول۲: توالی‌های پرایمری TR۴ ، γ گلوبین و GAPDH برای واکنش Real time PCR

پرایمر	توالی
γ-globin forward primer	5' GGGAAGGCTCCTGGTTGTCTA 3'
γ-globin Reverse primer	5' TCTTGCCATGTGCCTTGACTT 3'
TR۴ Forward primer	5' TCCCCACGCATCCAGATAATC 3'
TR۴Reverse primer	5' GATGTGAAAACACTCAATGGGC 3'
GAPDH forward primer	5' GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA 3'
GAPDH reverse primer	5' GCTGCATTGGTCATGGTTAATGT 3

یافته‌ها

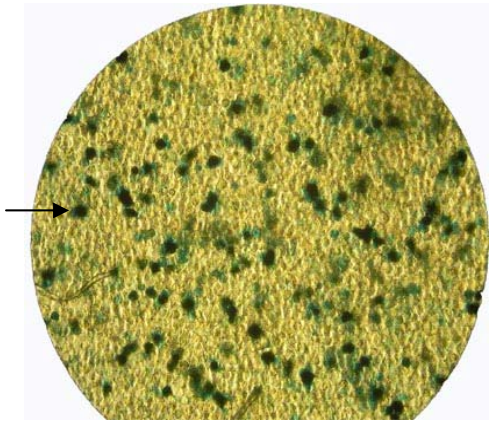
نتیجه ترانسفکشن پلاسمید pSV-β-Galactosidase در سلول‌های K۵۶۲ با ترکیب Lipofectamine ™۲۰۰۰: سلول‌هایی که آبی‌رنگ شده‌اند، ژن گزارشگر بتاگالاکتوزیداز را دریافت کرده‌اند که با رنگ‌آمیزی بتاگالاکتوزیداز مشخص شده‌اند (شکل۱). در این آزمایش ۴۰٪ از سلول‌های K۵۶۲ پلاسمید گزارشگر را دریافت داشتند. تعدادی از سلول‌ها کمرنگ بودند که به دلیل بیان کم ژن گزارشگر در آنهاست. در مجموع راندمان ترانسفکشن با توجه به اینکه سلول‌های K۵۶۲ از دسته سلول‌های معلق هستند قابل قبول بود. لازم به توضیح است که در چاهکهای دیگر مولکول‌های TR۴ siRNA و Negative siRNA ترانسفکت شدند و می‌توان انتظار داشت که حداقل ۴۰٪ از سلول‌های K۵۶۲ مولکول‌های siRNA را دریافت داشتند.

نتیجه استخراج RNA از سلول‌های K۵۶۲ ترانسفکت شده با مولکول‌های TR۴ siRNA و Negative siRNA: در کلیه مراحل تحقیق RNAای جهت سنتز cDNA استفاده می‌شد که کیفیت و کمیت آن بالا بود. باندهای مربوط به ۱۸ sRNA و ۲۸ sRNA کاملاً مشخص و متمایز است (شکل ۲). مقدار RNA استخراج شده حاصل از سلول‌های K562 ترانسفکت شده با siRNA TR4 و siRNA Negative، به ترتیب ۱۲۱۱ و ۱۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. همچنین در کلیه موارد، جذب نوری RNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ بیشتر از ۱/۸ بود که نشاندهنده کیفیت بالای RNA است.

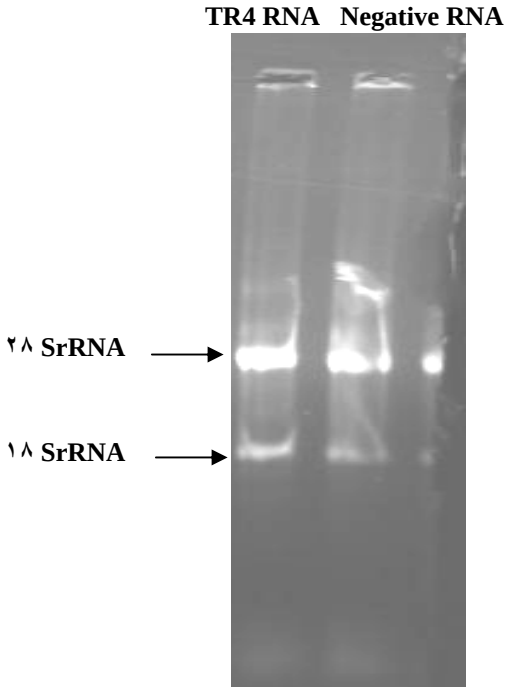
تعیین میزان کاهش ژن TR۴ در سلول‌های K۵۶۲ ترانسفکت شده با مولکول‌های TR۴siRNA و Negative siRNA: منحنی‌های تکثیر آزمایشات Real-time PCR مربوط به سلول‌های K۵۶۲ ترانسفکت شده با مولکول‌های siRNA TR۴ در شکل ۳ آمده است. آزمایشات تعیین مهار بیان ژن TR۴ توسط TR۴ siRNA در سه آزمایش مستقل تکرار شد که بطور متوسط به میزان ۴۴٪ کاهش داشت.

میزان القای ژن گاماگلوبین در سلول‌های K۵۶۲ ترانسفکت شده با TR۴ siRNA: شکل ۴ منحنی‌های تکثیر مربوط به ژن گاماگلوبین نسبت به ژن GAPDH را در سلول‌های K562 بعد از مهار بیان ژن TR4 نشان می‌دهد. البته لازم به

توضیح است که این آزمایش نیز سه بار به صورت مستقل تکرار شده است که میانگین القای ژن گاماگلوبین ۱/۱۸ برابر بود.



شکل۱: تصویری از سلول‌های K۵۶۲ ترنسفکت شده با پلاسمید pSV-β-Galactosidase. سلول‌های آبی رنگ، با شدت رنگهای مختلف بسته به میزان بیان ژن، ترانسفکت شده‌اند و سلول‌های بی‌رنگ ترانسفکت نشده‌اند.



شکل ۲: کیفیت RNA استخراج شده از سلول‌های K۵۶۲ ترانسفکت شده با مولکول‌های TR4 siRNA و Negative siRNA.

بحث

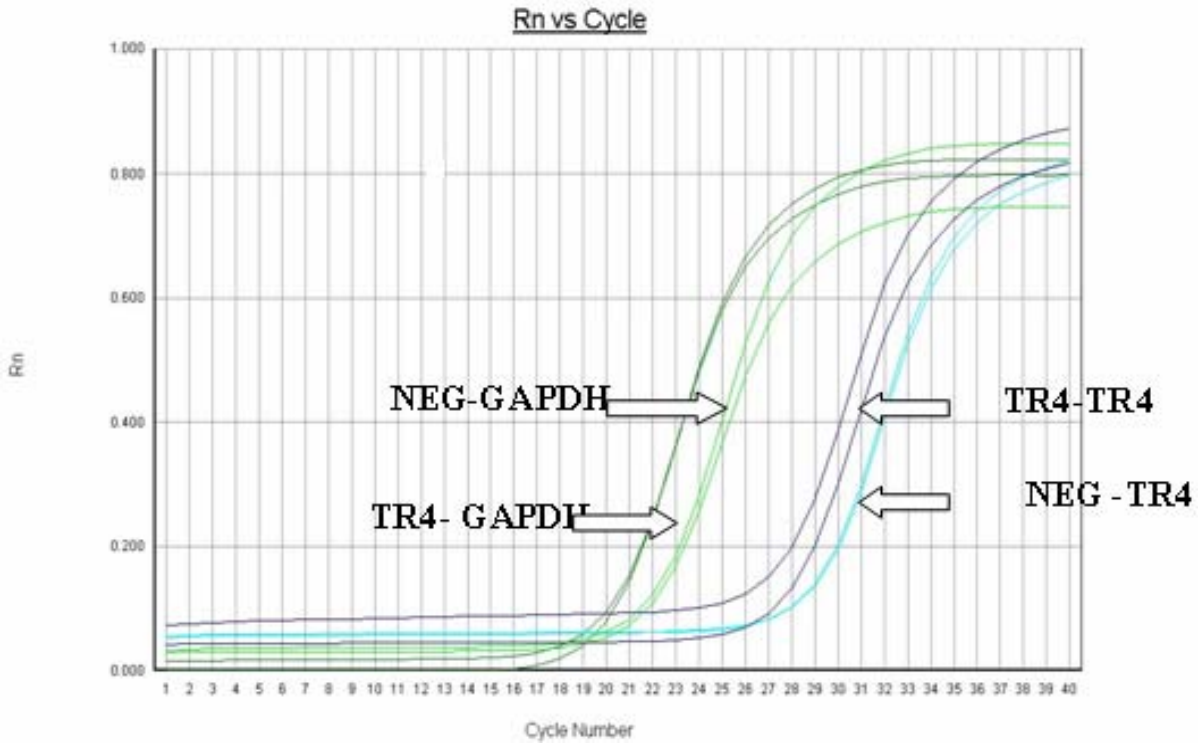
در سالهای اخیر شواهد جالبی از پتانسیل درمانی siRNA بدست آمده است. مولکول‌های siRNA بیان ژن را از طریق فرآیند وابسته به آنزیم در مرحله بعد از رونویسی مهار می‌کنند. این مولکول‌ها می‌توانند از آلودگی سلول‌های پستانداران به ویروس از قبیل HIV، هپاتیت و آنفولانزا جلوگیری کنند. در این روش مولکول‌های siRNA باعث خاموش سازی بیان ژن‌های بیماریزا می‌شوند (۱۲). پتانسیل بالای سیستم RNAi باعث شده تا این مولکول‌ها در ژن درمانی بیماریهای ناشی از بی‌نظمی‌های هموگلوبین نیز مورد توجه قرار گیرند. در این تحقیق پتانسیل مهار کنندگی siRNA در سلول‌های K۵۶۲ به منظور مهار ژن TR۴ بررسی شده است و نتایج تحقیق در سلول‌های بنیادی خونی قابل اجرا است.

سلول‌های K۵۶۲ از جمله سلول‌هایی هستند که مشخصات یک سلول اریتروئیدی را نشان می‌دهد. آنها گلیکوفورین‌ها و گلیکوپروتئین‌های سطحی سلول‌های اریتروئیدی را تولید می‌کنند. دو ترکیب همین (Hemin) و سدیم بوتیرات سبب تجمع هموگلوبین جنین و پیشرفت روند تمایزی در آنها می‌گردد. K۵۶۲ خصوصیات سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی جنینی را نشان می‌دهد بطوری که ژن اپسیلون و گاماگلوبین در آنها بیان می‌گردد ولی بتاگلوبین بیان ندارد (۱۴). از این رو سلول‌های K۵۶۲ در مطالعاتی که با هدف بررسی تغییر بیان ژن گلوبین، خصوصاً با هدف افزایش بیان ژن γگلوبین انجام می‌گیرد مدل سلولی مناسبی می‌باشند (۱۴). از طرفی طبق گزارشات omeri ژن TR۴ در سلول‌های K۵۶۲ بیان بالایی دارد (۱۰) و از اینرو اثرات مهار ژن TR4 و افزایش بیان ژن گاماگلوبین در این سلول‌ها قابل بررسی است.

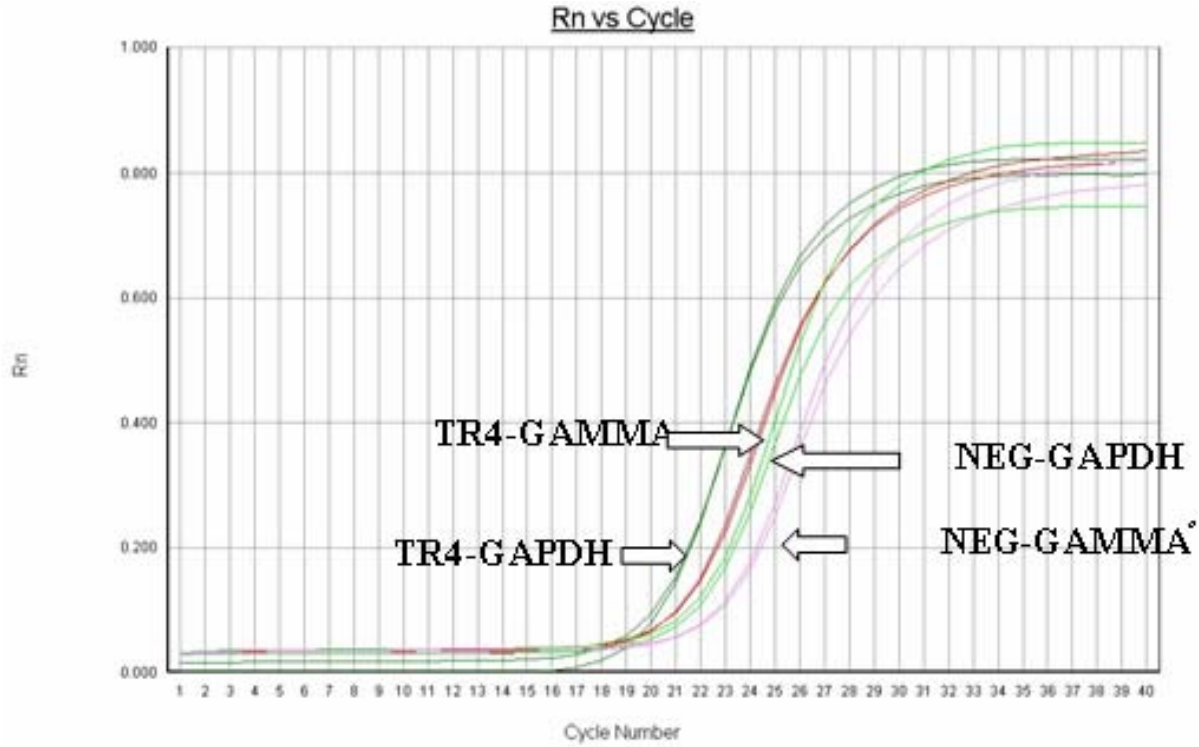
نتایج حاصل از آزمایشات Real-time PCR در تحقیق حاضر حاکی از آن است که مولکول‌های TR۴ siRNA توانستند بیان ژن TR۴ را به میزان ۴۴٪ در سلول‌های مدل K۵۶۳ کاهش دهند که در آزمایشات بر پایه ترانسفکشن موقتی قابل توجه بود. این نتایج با مطالعات قره‌سوران و همکاران نیز قابل مقایسه است که توانستند توسط MBD۲ siRNA میزان بیان ژن ۲ MBD را در سلول‌های اریتروئیدی تا ۳۵٪ کاهش دهند (۱۵).

توجه به این نکته ضروری است که از مهمترین مراحل مطالعات تنظیم بیان ژن توسط RNAi، انتقال مولکول‌های siRNA به داخل سلول‌ها می باشد. مطالعات مختلفی نشان داده که ترانسفکشن سلول‌های سوسپانسیون از قبیل K۵۶۲ و سلول‌های با منشأ خونی به سادگی سلول‌های چسبنده نیست و با روشهای انتقال ژن چون الکتروپوریشن و کلسیم فسفات به سادگی ترانسفکت نمی‌شوند (۱۸-۱۶). با توجه به مطالب فوق، در این تحقیق میزان ترانسفکشن موقتی K۵۶۲ با ترکیب کاتیونیک Lipofectamine ™۲۰۰۰ در حد مطلوب ۴۰٪ بود که به تبع آن میزان ۴۴٪ مهار ژن TR۴ را داشتیم.

در مجموع جهت حصول به میزان بیشتر از انتقال مولکول‌های siRNA، باید از روشهای ترانسفکشن دائمی بر پایه لنتی‌ویروس یا موتانت‌های تراریخت بهره گرفت که در این صورت میزان مهار ژن نیز بیشتر خواهد بود (۱۹).



شکل۳ : نمونه‌ای از منحنی‌های تکثیر مربوط به TR۴ و GAPDH از سلول‌های K۵۶۲ ترانسفکت شده با مولکول‌های TR۴ siRNA وNegative siRNA. محور افقی تعداد چرخه‌های PCR و محور عمودی مربوط به میزان افزایش فلورسانس سایبرگرین است. CT مربوط به سلول‌های K562 ترانسفکت شده با negative siRNA برای ژن TR۴، ۳۰/۶۷۹ و CT برای ژن GAPDH، ۲۳/۶۴۳ بود. همچنین CT مربوط به سلول‌های K562 ترانسفکت شده با siRNA TR۴ برای ژن TR۴، ۲۹/۴۳۳ و CT برای ژن GAPDH، ۲۱/۶۷۵ بود. مقادیر بدست آمده در فرمول $۲^{\Delta\Delta CT}$ گنجانده شد.



شکل ۴: نمونه‌ای از منحنی‌های تکثیر مربوط به γ گلوبین و GAPDH از سلول‌های K۵۶۲ ترانسفکت شده با مولکول‌های TR۴ siRNA و Negative siRNA. محور افقی تعداد چرخه‌های PCR و محور عمودی مربوط به میزان افزایش فلورسانس سایبرگرین است. CT مربوط به سلول‌های K۵۶۲ ترانسفکت شده با negative siRNA برای ژن گاماگلوبین ۲۴/۷۵۸ و CT برای ژن GAPDH، ۲۳/۶۴۳ می‌باشد. همچنین CT مربوط به سلول‌های K۵۶۲ ترانسفکت شده با TR۴ siRNA برای ژن گاماگلوبین ۲۳/۰۴۲ و CT برای ژن GAPDH، ۲۱/۶۷۵ بود. مقادیر بدست آمده در فرمول $۲^{\Delta\Delta CT}$ گنجانده شد.

نتایج القای بیان ژن گاماگلوبین نشان داد که با توجه به اینکه مهار ژن TR۴ به میزان ۴۴٪ کاهش داشت ولی افزایش قابل ملاحظه‌ای در بیان ژن گاماگلوبین مشاهده نشد (حدود ۱/۱۸ برابر). چندین عامل را می‌توان در این زمینه در نظر داشت. اول اینکه میزان ترانسفکشن یک عامل محدودکننده است در نتیجه می‌توان گفت این فاکتور راندمان مهار بیان TR۴ توسط TR۴ siRNA را محدود می‌سازد. با توجه به میزان ترانسفکشن pSV-β-Galactosidase در سلول‌های K۵۶۲ می‌توان پی برد که در سیستم راه‌اندازی شده در این تحقیق و نیز در تمام سیستم‌های ترانسفکشن موقتی، تمام جمعیت سلولی K۵۶۲ مولکول‌های TR۴ siRNA را به طور یکسان و به یک اندازه دریافت نمی‌کنند و این می‌تواند در میزان بیان ژن هدف TR۴ و به تبع آن در القای ژن گاماگلوبین اثر مستقیم داشته باشد. البته شاید با راه‌اندازی سیستم ویروسی و ایجاد رده‌های سلولی پایدار میزان مهار بیان TR۴ افزایش یابد و سبب افزایش بیان گاماگلوبین شود. بعلاوه گزارشات Tanabe و همکاران نشان داد که در موشهای تراریختی که برای ژن‌های TR۲و TR۴ همزمان دابل موتانت بودند، بیان گاماگلوبین حدود ۲ الی ۳ برابر بیشتر شده بود که کمتر از حد انتظار است (۱۱).

با مقایسه نتایج می‌توان پیشنهاد کرد که بیان دو ژن TR۴ و TR۲ بطور همزمان توسط روش RNAi مهار شوند و سپس القای بیان گاماگلوبین بررسی شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه سیستم RNAi در سلول‌های K۵۶۲ دارای عملکرد بود و توانست بیان ژن TR۴ را در سلول‌های K۵۶۲ به میزان ۴۴٪ کاهش دهد؛ ولی باید توجه داشت که مهار بیان ژن TR۴ به روش RNAi در سلول K۵۶۲ نمی‌تواند به تنهایی بیان ژن گاماگلوبین را در حد قابل ملاحظه‌ای افزایش دهد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای پروفسور فرانک گوسولد (Frank Grosveld) از دانشگاه اراسموس هلند سپاسگزاری می‌شود. همچنین از کلیه اساتید و همکاران در مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه بهزیستی و توانبخشی کمال تشکر را داریم.

REFERENCES

1. Harju S, Mcqueen KJ, Peterson KR. Chromatin structure and Control of β-Like Globin Gene Switching. Exp Biol Med (Maywood) 2002;227(9):683-700.
2. Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. Blood 2006;107(2):435-43.
3. Bank A. Understanding globin regulation in β-thalassemia: it's as simple as alpha, beta, gamma, delta. J Clin Invest 2005;115(6):1470-3.
4. Brown KE, Amoils S, Horn JM, Buckle VJ, Higgs DR, Merkenschlager M, et al. Expression of alpha- and beta-globin genes occurs within different nuclear domains in haemopoietic cells. Nat Cell Biol. 2001 Jun;3(6):602-6.
5. Bank A. The thalassemia syndromes. Blood 1978;51(3):369-84.
6. Rodgers GP, Sauntharajah Y. Advances in experimental treatment of beta-thalassaemia. Expert Opin Investig Drugs 2001;10(5):925-34.
7. Perrine SP, Miller BA, Faller DV, Cohen RA, Vichinsky EP, Hurst D, et al. Sodium butyrate enhances fetal globin gene expression in erythroid progenitors of patients with HbSS and beta thalassemia. Blood 1989;74(1):454-9.
8. Atweh GF, Schechter AN. Pharmacologic induction of fetal hemoglobin: raising the therapeutic bar in sickle cell disease. Curr Opin Hematol 2001;8(2):123-30.
9. Tanabe O, Katsuoka F, Campbell AD, Song W, Yamamoto M, Tanimoto K, et al. An embryonic/fetal beta-type globin gene repressor contains a nuclear receptor TR2/TR4 heterodimer. EMBO J 2002;21(13):3434-42.
10. Omori A, Tanabe O, Engel JD, Fukamizu A, Tanimoto K. Adult stage gamma-globin silencing is mediated by a promoter direct repeat element. Mol Cell Biol 2005;25(9):3443-51.
11. Tanabe O, McPhee D, Kobayashi S, Shen Y, Brandt W, Jiang X, et al. Embryonic and fetal beta-globin gene repression by the orphan nuclear receptors, TR2 and TR4. EMBO J 2007;26(9):2295-306.
12. Banan M, Puri N. The ins and outs of RNAi in mammalian cells. Curr Pharm Biotechnol 2004;5(5):441-50.
13. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med 2006; 27(2-3):95-125.
14. Benz EJ Jr, Murnane MJ, Tonkonow BL, Berman BW, Mazur EM, Cavallesco C, et al. Embryonic-fetal erythroid characteristics of a human leukemic cell line. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980;77(6):3509-13.
15. Gharesouran J. Role of MBD2 in 5-Azacytidine mediated Induction of γ-Globin in K562 cells (Dissertation). Tehran: University of Welfare and Rehabilitation; 2008. (Text in Persian)
16. Elnitski L, Hardison R. Efficient and reliable transfection of mouse erythroleukemia cells using cationic lipids. Blood Cells Mol Dis 1999;25(5-6):299-304.
17. Schakowski F, Buttgereit P, Mazur M, Märten A, Schöttker B, Gorschlüter M, et al. Novel non-viral method for transfection of primary leukemia cells and cell lines Genet Vaccines Ther 2004;2(1):1.
18. Isakari Y, Harada Y, Ishikawa D, Matsumura-Takeda K, Sogo S, Ishida T, et al. Efficient gene expression in megakaryocytic cell line using nucleofection. Int J Pharm 2007;338(1-2):157-64.
19. Delenda C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. J Gene Med 2004; 6 suppl 1: S125-38.