

عدم کارایی shRNA اختصاصی بر علیه ژن *E1A* در کاهش بیان پایدار در سلول‌های HEK 293

هاله وثقی^۱، مهرداد بهمنش^{۲*}، مجید صادقی‌زاده^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۶/۱۳

دریافت مقاله: ۸۷/۲/۲۳

چکیده

هدف: انکوپروتئین *E1A* در آدنوویروس تیپ ۵ یک فاکتور تنظیمی است که موجب کنترل فرایند رونویسی ژن‌های آدنوویروس می‌شود. این پروتئین با تغییر در عملکرد پروتئین‌های مهم سلولی از جمله p21 و pRb سبب ایجاد شرایط مساعد برای همانندسازی ژنوم ویروس و ترانسفورم شدن سلول‌های میزبان می‌شود. هدف از تحقیق حاضر مهار پایدار بیان ژن *E1A* در سلول‌های HEK 293 با استفاده از روش RNAi بوده تا آثار این مهار روی سلول‌های فوق بررسی شود.

مواد و روش‌ها: ناحیه پروموتور U6 و shRNA از دو پلاسمید اهدایی کنترل و پلاسمید کدکننده siRNA اختصاصی علیه ژن *E1A* به نام‌های pSP81-E1A و pSP-81 در پلاسمید pcDNA3.1 ساب‌کلون شد. سپس سازه‌های ساخته شده با روش لیپوفکشن به سلول‌های سرطانی HEK 293 ترانسفکت و کلونی‌های سلول‌های ترانسفورم شده بر اساس مقاومت به آنتی‌بیوتیک نئومایسین انتخاب شدند. تغییرات حاصل از این عمل روی بیان ژن *E1A* با استفاده از روش RT-PCR بررسی شد.

نتایج: بررسی‌ها نشان‌گر عدم تفاوت در میزان بیان ژن *E1A* در پی ترانسفکشن سلول‌ها با پلاسمیدهای مورد نظر در دو گروه مهار و کنترل بود. برای بررسی احتمال تأثیر روند کلونینگ بر عملکرد پروموتور U6، سلول‌ها با پلاسمیدهای اهدایی نیز ترانسفکت شدند که مجدداً عدم مهار بیان ژن *E1A* مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که با وجود تکرار آزمایش هر مهار قابل توجهی صورت نگرفت. برای کسب اطمینان از صحت توالی ژن *E1A*، قطعه تکثیر شده در فرایند PCR، که شامل ناحیه ۱۳۵ این ژن است، توالی‌یابی شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی با وجود جهش در یک نوکلئوتید در ناحیه‌ای بود که به عنوان هدف برای siRNA انتخاب شده بود. بنابراین می‌توان علت عدم مهار را به وجود این جهش در ترادف ژن *E1A* در سلول‌های استفاده شده در این مطالعه مربوط دانست.

کلیدواژگان: *E1A*، HEK 293، آدنوویروس تیپ ۵، RNAi، shRNA.

۱- مقدمه

DNA آدنوویروس تیپ ۵ به سلول‌های سرطانی تبدیل شده‌اند [۱]. پروتئین‌های *E1A* و *E1B* دو فاکتور کلیدی در کنترل تکثیر آدنوویروس در این سلول‌ها هستند. در پی

رده سلولی HEK 293 (Human Embryonic Kidney) از سلول‌های اپیتلیالی مشتق شده از بافت جنینی کلیه انسان هستند که از طریق ترانسفورم (Transformation) شدن با

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک، صندوق پستی ۱۷۵-۱۴۱۱۵

Email: behmanesh@modares.ac.ir

کاهش این بیان از روش RT-PCR نیمه کمی استفاده شد.

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- کشت سلول‌های HEK 293

رده سلولی HEK 293 از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI-1640 با غلظت ۱۰ درصد و FBS (Fetal Bovine Serum) در انکوباتور با هوای مرطوب و غلظت CO₂ ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

۲-۲- طراحی siRNA

طراحی siRNA در نواحی مشترک بین دو رونوشت E1A ۱۳s و ۱۲s بر اساس قواعد حاکم بر این کار و با استفاده از نرم‌افزارهای متنوعی که به صورت آنلاین (Online) شبکه اینترنت وجود دارد از جمله سایت و نرم‌افزار معتبر Ambion انجام گرفت و با توجه به نتایج حاصل دو ناحیه که بین mRNAهای ۱۳s و ۱۲s مشترک بود به عنوان بهترین محل برای ساخت و سفارش الیگو انتخاب شد. در کنار این و به دنبال بررسی مقالات چاپ شده در این زمینه، مقاله هکر (Hacker) و همکاران که با استفاده از یک پلاسمید کدکننده shRNA با کمک پروموتور U6 snRNA (small nucleolar RNA)، موفق به مهار موقت ژن E1A به میزان ۷۵ درصد شده بودند مورد توجه قرار گرفت [۵]. با توجه به این که مناسب‌ترین الیگوی طراحی شده ما تنها در دو نوکلئوتید با آنچه که هکر و همکاران استفاده کرده بودند، تفاوت داشت و از آنجا که کارایی shRNA آن‌ها با توجه به مقاله چاپ شده تأیید شده بود، از پلاسمیدهای اهدایی pSP81 و pSP81-E1A برای انجام این تحقیق استفاده شد.

۲-۳- تعیین توالی قطعات پروموتور U6 snRNA و shRNA

به منظور تعیین صحت توالی‌های پروموتور U6 snRNA و shRNA از پلاسمیدهای اهدایی pSP81 و pSP81-E1A قطعات مزبور در پلاسمید pBluescriptII(-) ساب‌کلون شدند. بدین منظور ۳ میکروگرم از هر یک از پلاسمیدهای pSP81 و pSP81-E1A توسط آنزیم‌های محدودکننده

عفونت توسط آدنوویروس‌ها، E1A اولین ژنی است که بلافاصله پس از آلوده شدن سلول‌ها بیان می‌شود. همچنین E1A به عنوان فاکتور تنظیم‌کننده رونویسی برای تولید mRNA ژن‌های دیگر از جمله E1B لازم و ضروری است. پروتئین‌های حاصل از ژن E1A با دخالت در تنظیم متابولیسم سلول میزبان سبب ایجاد شرایط مساعد برای همانندسازی DNA ویروسی می‌شود [۲]. دو محصول اصلی این ژن که در طی فاز زودرس (Early) آلودگی بیان می‌شوند به ترتیب ۲۸۹ و ۲۴۳ اسیدآمینه طول دارند که تنها تفاوت این دو پروتئین وجود ۴۶ اسیدآمینه اضافه در ایزوفریم بزرگ‌تر است که ناشی از پیرایش متناوب (Alternative Splicing) انجام شده روی رونوشت اولیه E1A است. این پروتئین‌ها براساس ضریب رسوب سویدبرگ (Swedberg) به ترتیب ۱۳s و ۱۲s نامیده می‌شوند. پروتئین‌های E1A باعث تغییر در فعالیت چندین مسیر داخل سلولی می‌شوند. به عنوان مثال E1A با اتصال به پروتئین رتینوبلاستوما (pRb) منجر به اختلال در اتصال بین این پروتئین با فاکتور رونویسی E2F شده و در نتیجه باعث پیشرفت چرخه سلولی و ادامه تقسیم سلول می‌شود. از دیگر پروتئین‌هایی که تحت تأثیر E1A قرار می‌گیرد پروتئین p21 است که دارای نقش‌های کلیدی و متعددی در تنظیم چرخه سلولی بوده و به همین دلیل یک پروتئین هدف مهم برای انکوپروتئین‌های ویروسی از جمله E1A محسوب می‌شود. E1A قادر است به پروتئین p21 متصل شود که این اتصال منجر به اختلال در عملکرد p21 و کاهش تعداد سلول‌های متوقف شده در مرحله G1 می‌شود و بدین ترتیب E1A سبب گذر سلول‌های واقع در مرحله G1/S از مرحله کنترل G1/S و ادامه فرایند چرخه تکثیر سلولی می‌شود [۴،۳].

با توجه به اهمیت این انکوپروتئین ویروسی و نقش آن در تومورزایی سلول‌ها هدف از این تحقیق مهار پایدار بیان ژن E1A آدنوویروس تیپ ۵ در سلول‌های سرطانی HEK 293 از طریق ترانسفکشن (Transfection) سلول‌ها با پلاسمید کدکننده shRNA (short hairpin RNA) اختصاصی آن ژن به صورت پایدار بود.

بررسی مقالات قبلی نشان داد که یک گروه موفق به مهار موقت ژن E1A در سلول‌های HEK 293 با استفاده از پلاسمید کدکننده shRNA شده بودند. بنابراین در این تحقیق از آن توالی به منظور مهار پایدار بیان ژن E1A و برای ارزیابی میزان

۲-۶- ترانسفکشن پلاسمیدها با روش لیپوفکشن (Lipofection)

ترانسفکشن پلاسمیدها به داخل سلول‌های HEK 293 با استفاده از لیپوفکتامین (Lipofectamin) (Invitrogen) و براساس روش پیشنهادی شرکت سازنده انجام گرفت. بدین منظور تعداد 4×10^5 سلول به ازای هر چاهک در ظرف ۶- خانه به همراه ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سرم و فاقد آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. در روز بعد محیط سلول‌ها تخلیه و با PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شدند. سپس ۲ میکروگرم از هر یک از پلاسمیدهای مورد استفاده در تحقیق به ۱۰۰ میکرولیتر Opti-MEM (Invitrogen) اضافه شد. در لوله‌های جداگانه مقادیر ۲ میکرولیتر از لیپوفکتامین تا رسیدن به حجم ۱۰۰ میکرولیتر از Opti-MEM به ازای هر چاهک با یکدیگر مخلوط شدند. آنگاه این محلول‌ها با همدیگر مخلوط و سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق به صورت ثابت نگهداری شد. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر Opti-MEM به سوسپانسیون فوق افزوده شد. در نهایت ۴۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون نهایی به هر چاهک که حاوی ۴۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI-1640 بدون سرم و آنتی‌بیوتیک بوده افزوده شد. پس از گذشت ۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۲۰ درصد سرم به هر چاهک اضافه شد. سپس سلول‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۷- انتخاب سلول‌های ترانسفکت شده (Transfected cells)

پس از گذشت ۷۲ ساعت از انجام ترانسفکشن به منظور انتخاب سلول‌های ترانسفکت شده با کمک آنتی‌بیوتیک G418، سلول‌های هر چاهک به نسبت ۱:۱۰ رقیق شده و مجدداً کشت داده شدند. روز بعد سلول‌ها با آنتی‌بیوتیک G418 و با غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تیمار داده شده و به دنبال آن محیط کشت سلول‌ها هر سه روز یکبار با محیط کامل همراه با آنتی‌بیوتیک به مدت دو هفته تعویض شد. پس از ظاهر شدن کلونی‌های سلولی مقاوم به G418، سلول‌ها ترپسینه شده و هر کدام به یک فلاسک T25 منتقل شدند.

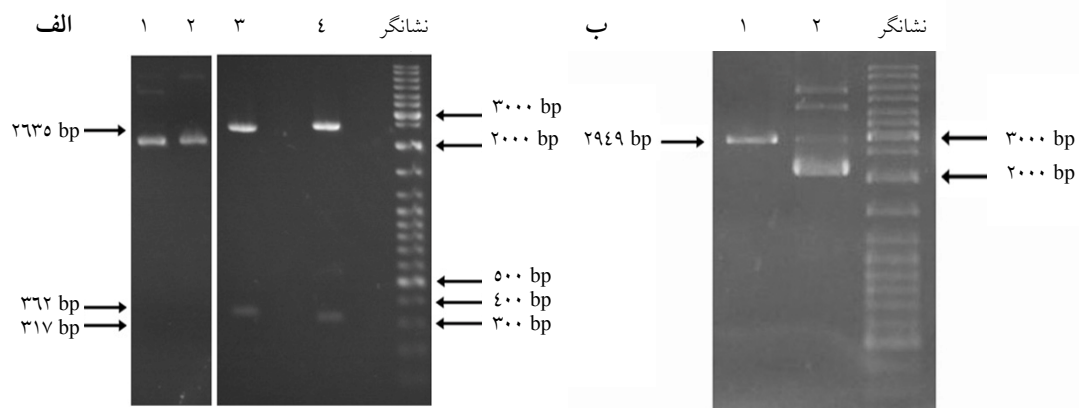
HindIII و EcoRI (Fermentas) هضم شد. سپس قطعات حاصل پس از جداسازی از ژل در محل‌های مشابه در پلاسمید pBluescriptII(-) ساب‌کلون شدند. واکنش الحاق توسط آنزیم T4DNA (Fermentas) لیگاز و بر اساس روش پیشنهادی شرکت سازنده انجام گرفت. در نهایت پلاسمیدهای ساخته شده با استفاده از آغازگر (Primer) عمومی ترادفیابی و ترادف حاصل با استفاده از نرم‌افزار Generunner بررسی شد.

۲-۸- تهیه سازه‌های pcDNA-U6SnRNAp-shRNA و pcDNA-U6SnRNAp

برای برش قطعه حاوی پروموتور U6 و توالی shRNA از پلاسمید pSP81-E1A و قطعه حاوی پروموتور U6 از پلاسمید pSP81، از دو آنزیم HindIII و BamHI (Fermentas) استفاده و پس از جداسازی قطعات مورد نظر در محل‌های HindIII و BglII روی پلاسمید pcDNA3.1 کلون شدند. برای تأیید ساختمان سازه‌های ساخته شده از روش کلونی PCR (Colony PCR) و هضم آنزیمی استفاده شد. سازه‌های نهایی تحت عنوان pcDNA-U6SnRNAp-shRNA و pcDNA-U6SnRNAp نام‌گذاری شدند.

۲-۵- تعیین دوز کشنده G418 برای سلول‌های HEK 293

برای تعیین حداقل دوز کشنده آنتی‌بیوتیک G418 (Sigma) در سلول‌های HEK 293 ابتدا تعداد 4×10^5 سلول به ازای هر چاهک در ظرف ۶- خانه (6-well plate) در حضور ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت کامل کشت داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت مقادیر ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک G418 به هر چاهک ظرف افزوده شد و یک چاهک نیز به عنوان کنترل بدون آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته شد. سپس محیط کشت سلول‌ها در هر سه روز با محیط کامل همراه با مقادیر مشخص شده از آنتی‌بیوتیک به مدت دو هفته تعویض شد. در پایان این مدت و براساس نتایج به دست آمده، غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان دوز کشنده سلول‌های HEK 293 تعیین شد.



شکل ۱ الکتروفورز ژل آگارز محصولات حاصل از هضم دوآنزیمی پلاسمیدهای pSP81-E1A، pSP81 و pBluescript II(-) توسط آنزیم‌های محدودکننده *EcoR I* و *Hind III*. (الف) ستون‌های ۱ و ۲: نماینده پلاسمیدهای هضم نشده (به عنوان کنترل) هستند؛ ستون‌های ۳ و ۴: نمایانگر وجود قطعات ۲۶۳۵ جفت بازی و ۳۶۲ جفت بازی در نتیجه هضم پلاسمید pSP81-E1A و قطعات ۲۶۳۵ جفت بازی و ۳۱۷ جفت بازی در نتیجه هضم پلاسمید pSP81 است؛ (ب) ستون ۱: نمایانگر قطعات ۲۹۴۹ جفت بازی و ۱۲ جفت بازی در نتیجه هضم دوآنزیمی پلاسمید pBluescriptII؛ ستون ۲: پلاسمید هضم نشده که به عنوان کنترل است.

: CACTCTTCCAGCCTTCCTTC

: AGTCCGCCTAGAAGCATTTG

از میزان بیان ژن بتا-اکتین (β -actin) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد جداسازی و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) عکس برداری شدند.

۳- نتایج

۳-۱- ساخت سازه‌های pcDNA-U6SnRNAp-shRNA

و pcDNA-U6SnRNAp

به منظور حصول اطمینان از ماهیت پلاسمیدهای اهدایی دکتر هکر و نیز جداسازی قطعات shRNA و پروموتور برای کلون کردن در پلاسمید pBluescriptII Sk(-) از هضم آنزیمی با کمک آنزیم‌های محدودکننده *EcoRI* و *HindIII* استفاده شد. بررسی الکتروفورز ژل آگارز نشان داد که اندازه قطعات حاصل از هضم آنزیمی مطابق با اندازه‌های پیش‌بینی شده بودند (شکل ۱). پس از انجام ساب کلونینگ، پلاسمیدهای حاصل در ناحیه مورد نظر تعیین توالی شدند. نتیجه توالی‌یابی نشان داد که ترادف قطعه پروموتور + shRNA دقیقاً مطابق با ترادف مورد انتظار بود (شکل ۲).

سپس به مدت ۱ هفته سلول‌ها در حضور آنتی‌بیوتیک G418 کشت داده شدند تا سلول‌ها از نظر تعداد افزایش یابند.

۲-۸- استخراج RNA تام سلولی و RT-PCR

RNA تام سلولی پس از انجام روند انتخاب، با کمک کیت RNX plusTM (Cinnagen) از سلول‌های ترانسفکت شده استخراج شد. برای ساخت cDNA از ۳ میکروگرم RNA تام در حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر با کمک الیگومر تیمیدین (oligo-dT) و آنزیم RevertAidTM-MuLV (Fermentas) و بر اساس برنامه ارایه شده توسط شرکت استفاده شد.

پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، به منظور تکثیر قطعه مورد نظر واکنش PCR با استفاده از ۲ میکرولیتر از cDNA تهیه شده به همراه ۱ واحد آنزیم *rTaq* (Recombinant Taq) (Fermentas) و $MgCl_2$ ۱/۵ میلی‌مولار، ۲۰۰ dNTPs میلی‌مولار، ۵ پیکومول از هر آغازگر و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت.

ترادف آغازگرهای به کار رفته در این تحقیق به شرح زیر بود:

E1A (AAN-08102)

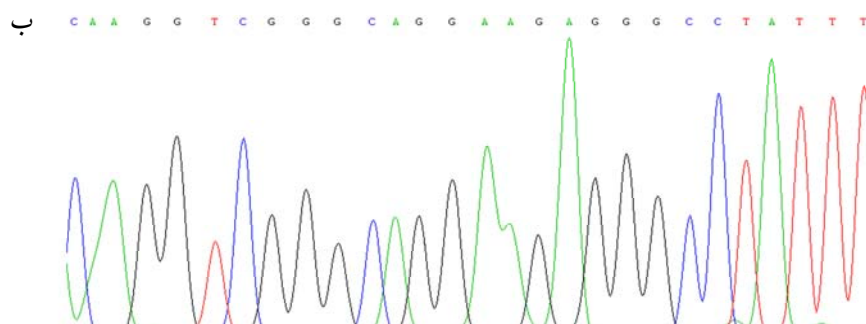
: GATAATCTTCCACCTCCTAGCC

: CTCTCACGGCAACTGGTTTAATGG

(NM-001101) بتا-اکتین

الف

5' CAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATA
 |||||
 CAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATA
 CAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACA
 |||||
 CAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACA
 AAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTAAAAATTATGTTT
 |||||
 AAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTAAAAATTATGTTT 3'

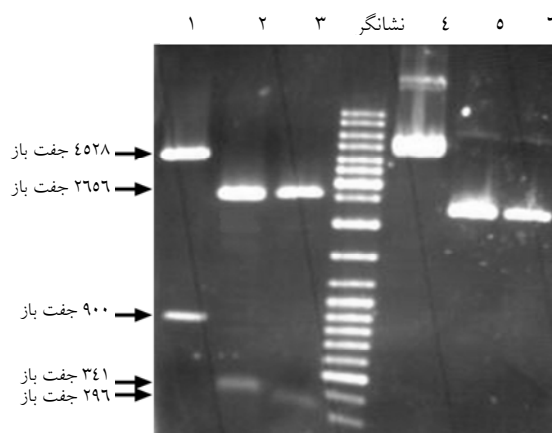


شکل ۲ مقایسه قسمتی از توالی قطعه کلون شده در پلاسمید pBluescriptII U6snRNAp-shRNA (رنگ آبی) با ترادف اصلی پروموتور U6 snRNA (رنگ سیاه) (الف) و بخشی از گراف حاصل از توالی‌یابی پروموتور snRNA U6 (ب) را نشان می‌دهد.

پلاسمیدهای pSP81-E1A و pcDNA3.1 در پلاسمید ساب کلون شدند. صحت ساختار سازه‌های ساخته شده با کمک کلونی PCR و هضم آنزیمی تأیید شد (شکل ۳).

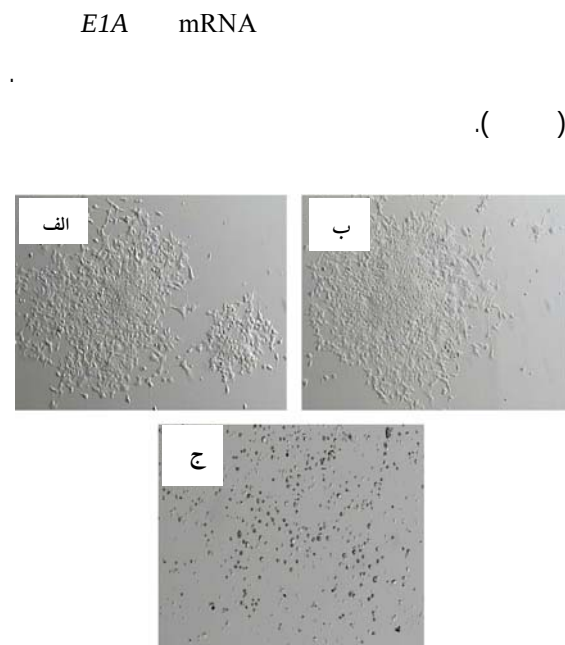
۳-۲- بررسی کارایی ترانسفکشن سلول‌های HEK 293 با استفاده از لیپوفکتامین

به منظور حصول اطمینان از کارایی روش لیپوفکشن، ترانسفکشن مقدار یکسان از پلاسمید کدکننده GFP به نام pcDEBAΔ-GFP، با سه مقدار ۲، ۵ و ۷ میکرولیتر از لیپوفکتامین در سلول‌های HEK 293 انجام گرفته و سه روز پس از انجام ترانسفکشن با کمک میکروسکوپ معکوس فلورسانس کارایی ترانسفکشن ارزیابی شد. بررسی انجام شده نشانگر وجود تعداد قابل قبولی از سلول‌ها بود که پلاسمید حاوی ژن گزارشگر را حمل می‌کردند. از آنجا که تفاوت قابل توجهی در بین مقادیر ۵ و ۷ میکرولیتر مشاهده نشد، بنابراین مقدار ۵ میکرولیتر به عنوان مقدار مناسب از لیپوفکتامین برای انجام ترانسفکشن پلاسمیدهای اصلی انتخاب شد (شکل ۴).



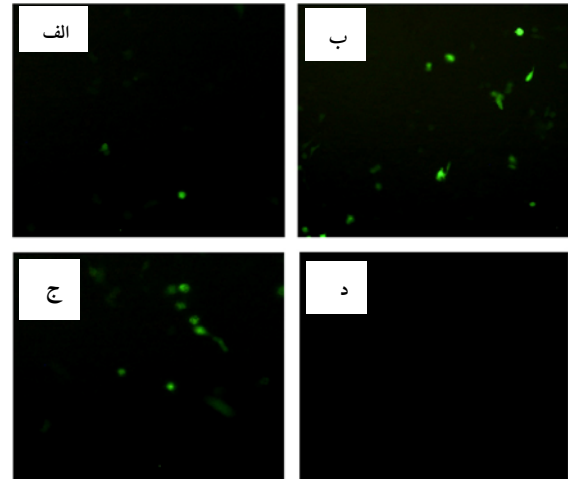
شکل ۳ الکتروفورز ژل آگارز محصولات حاصل از هضم آنزیمی پلاسمیدهای pSP81-E1A و pcDNA3.1 توسط آنزیم‌های محدودکننده Hind III و BamH I. ستون ۱: نشان‌دهنده قطعات ۴۵۲۸ جفت بازی و ۹۰۰ جفت بازی حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید pcDNA3.1 توسط دو آنزیم Hind III و BamH I. ستون‌های ۲ و ۳: نمایانگر قطعات ۲۶۵۶ و ۳۴۱ جفت بازی حاصل از هضم دو آنزیمی پلاسمیدهای pSP81-E1A و pSP81 با دو آنزیم BamH I و Hind III. ستون‌های ۴، ۵ و ۶: نماینده پلاسمیدهای هضم نشده pSP81-E1A و pSP81 (به عنوان کنترل) هستند.

از آنجا که پلاسمیدهای اهدایی، فاقد ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در سلول‌های یوکاریوتی برای انجام انتخاب و بیان پایدار بودند، قطعات پروموتور U6snRNA و shRNA از



شکل ۵ عکس میکروسکوپی از کلونی‌های ایجاد شده از سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید حاوی ژن انتخاب‌گر مقاومت به نئومایسین (الف) سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA-U6snRNAp- (ب) سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید-shRNA (ج) در گروه کنترل فاقد پلاسمید، کلیه سلول‌های گروه ج پس از طی دوره تیمار از بین رفته‌اند.

shRNA		shRNA
HEK 293		
RNA	pSP81-E1A	pSP81
RT-PCR	E1A	
E1A		
shRNA		
()		



شکل ۴ ترانسفکشن سلول‌های HEK 293 به روش لیپوفکشن با استفاده از پلاسمید گزارشگر حاوی GFP که نور تابیده شده از سلول‌ها نشانگر موفقیت ترانسفکشن است. (الف) نمایانگر مقدار ۲ میکرولیتر، (ب) ۵ میکرولیتر و (ج) ۷ میکرولیتر از لیپوفکتامین است. با توجه به مشابهت میزان ترانسفکشن در دو مقدار ۵ و ۷ میکرولیتر، مقدار ۵ میکرولیتر به عنوان مقدار مناسب انتخاب شد. (د) گروه کنترل فاقد پلاسمید را نشان می‌دهد.

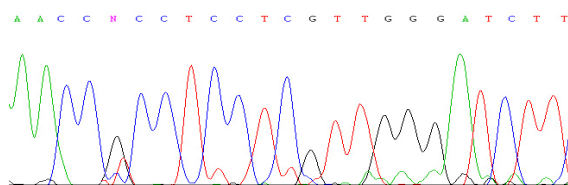
۳-۳- ترانسفکشن پلاسمیدهای pcDNA-U6SnRNAp و U6SnRNAp-shRNA

به دنبال تعیین میزان حساسیت سلول‌های HEK 293 نسبت به آنتی‌بیوتیک G418، سلول‌ها با پلاسمید pcDNA-U6snRNAp-shRNA به منظور مهار ژن E1A و پلاسمید pcDNA-U6snRNAp به عنوان پلاسمید کنترل، با روش لیپوفکشن ترانسفکت شدند. بعد از دو هفته کلونی‌های مقاوم ظاهر و تغییرات احتمالی بیان ژن هدف در این سلول‌ها با روش RT-PCR نیمه کمی (Semi-quantitative RT-PCR) ارزیابی شد (شکل ۵).

۳-۴- بررسی بیان ژن E1A در سلول‌های ترانسفورم شده

siRNA
RNA E1A mRNA
RT-PCR نیمه کمی

نوکلئوتید جهش مشاهده شد (شکل ۸).



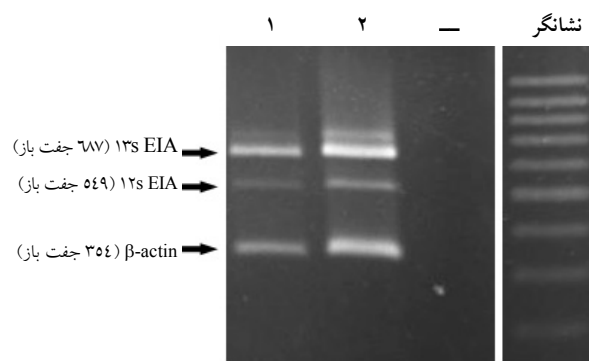
شکل ۸ قسمتی از گراف حاصل از توالی‌یابی ژن *E1A* که نشان‌دهنده وجود یک جهش در ناحیه هدف برای توالی shRNA است.

۴- بحث

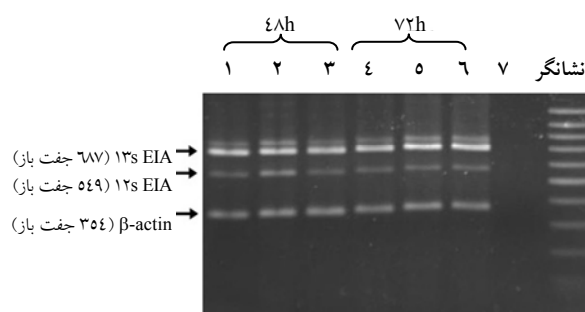
RNAi (RNA interference) امروزه با توجه به کاربردهای فراوانی که در شناسایی عملکرد انواع ژن‌ها در مسیرهای مختلف سلولی دارد، بسیار مورد توجه است. مولکول‌های دو رشته‌ای siRNA می‌توانند بسته به هدف نهایی به دو صورت ناپایدار یا پایدار به کار گرفته شوند. از مزایای بیان ناپایدار از طریق الیگوهای پیش ساخته siRNA سرعت بالای مهار و آسانی روش انجام از نظر زمانی است. اما الیگوهای پیش ساخته siRNA دارای طول عمر نسبتاً کوتاه بوده و امکان ارزیابی سلول‌های ترانسفکت شده و میزان آن‌ها نسبت به سلول‌های ترانسفکت نشده وجود ندارد. به همین علت توانایی آن‌ها در مهار بیان ژن مورد نظر محدود است. [۶، ۷]

به منظور غلبه بر نارسایی‌های روش بیان ناپایدار الیگوهای siRNA از سیستم‌های بیان پایدار siRNA به واسطه پلاسمید یا ناقل‌های ویروسی استفاده می‌شود. بیان shRNA به واسطه ناقل (پلاسمید یا ویروس) نه تنها سبب بیان پایدار و بلندمدت الیگوها می‌شود، سایر معایب استفاده از الیگوهای آماده را نیز ندارد [۹۸]. در این تحقیق از پلاسمید pcDNA3.1 برای ساخت ناقلی مناسب برای کد کردن ترادف shRNA اختصاصی بر علیه mRNA ژن *E1A* استفاده شد [۹].

بررسی عملکرد پروتئین *E1A* آدنوویروس تیپ ۵ به عنوان یک انکوپروتئین ویروسی عامل بروز سرطان در انسان از طریق روش RNAi تنها توسط گروه هکر و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام شده است. در تحقیق مورد اشاره سعی شده بود تا با مهار فعالیت ژن *E1A* در سلول‌های سرطانی HEK 293 موجبات افزایش بیان پروتئین‌های نو ترکیب فراهم شود. به این منظور با



شکل ۶ مقایسه نیمه کمی بیان mRNA ژن *E1A* در سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمیدهای pcDNA-U6snRNAp (ستون ۱) و pcDNA-U6snRNAp-shRNA (ستون ۲). سطح بیان mRNA ژن بتا-اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. (-) کنترل منفی برای انجام روش RT-PCR.



شکل ۷ آنالیز RT-PCR بیان mRNA ژن *E1A* در سلول‌های ترانسفکت شده در ساعات ۴۸ با پلاسمید pSP81-E1A (ستون ۱)، پلاسمید pSP81 (ستون ۲) و گروه کنترل فاقد پلاسمید (ستون ۳)، در ساعات ۷۲ با پلاسمید pSP81-E1A (ستون ۴)، پلاسمید pSP81 (ستون ۵) و گروه کنترل فاقد پلاسمید (ستون ۶). کنترل منفی RT-PCR (ستون ۷). سطح بیان mRNA ژن بتا-اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

۳-۵- توالی‌یابی ژن *E1A*

پس از اینکه سلول‌ها با پلاسمیدهای گروه هکر ترانسفکت شد و مجدداً عدم مهار بیان ژن *E1A* مشاهده شد، توالی ژن *E1A* در سلول‌های HEK 293 مورد بررسی قرار گرفت. این کار به منظور اطمینان از صحت عملکرد آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن *E1A* در آزمایش RT-PCR و همچنین برای بررسی توالی ناحیه هدف توالی shRNA بود. بدین منظور، محصول PCR قطعه ۱۳s این ژن برای توالی‌یابی ارسال شد. نتایج به دست آمده از توالی‌یابی بیانگر ترادف قابل انتظار در تکثیر cDNA ژن *E1A* بود. ولی در ناحیه‌ای که به عنوان هدف برای siRNA انتخاب شده بود در یک

استفاده از یک پلاسمید کدکننده ترادف siRNA اختصاصی علیه ژن E1A تحت کنترل پروموتور U6 snRNA، به طور ناپایدار و با استفاده از روش کلسیم فسفات موفق به مهار ژن E1A به میزان حدود ۷۵ درصد پس از ۷۲ ساعت شده بودند [۵].

هدف از تحقیق حاضر مهار پایدار بیان ژن E1A در مرحله پس از رونویسی و مطالعه اثر آن بر میزان تکثیر سلولی و نیز بررسی بیان ژن های درگیر با عملکرد این پروتئین همانند pRb و p21 در سلول های HEK 293 به منظور بررسی امکان استفاده از آن برای کاربردهای درمانی احتمالی بود. برای حصول این هدف با بررسی توالی ژن E1A و واریانت های اصلی آن سعی شد که در نواحی مشترک این دو واریانت، مناسب ترین ترادف برای طراحی siRNA اختصاصی به جهت مهار این ژن طراحی شود.

پس از یافتن ناحیه مناسب و با مقایسه با مقاله منتشر شده توسط گروه هکر و شباهت نزدیک (۹۹ درصد) بین الیگوی طراحی شده تحقیق حاضر و آن گروه و با توجه به این واقعیت که نتایج ارایه شده به وسیله آن گروه بیانگر کارایی بسیار مناسب shRNA مورد استفاده آنان داشت، تصمیم به استفاده از ترادف انتخابی آن ها گرفته شد. از آنجا که این پلاسمیدها با نام های pSP81-E1A و pSP81 فاقد نقشه و توالی بودند، برای تعیین هویت و اطمینان یافتن از صحت ساختار آن ها، قطعات shRNA به همراه پروموتور U6 snRNA در ناقل pBluescriptII(-) کلون و سپس توالی یابی شد. پس از تأیید توالی های مورد نظر، قطعات شامل پروموتور و shRNA به پلاسمید pCDNA3.1 برای بهره گیری از ژن مقاومت به آنتی بیوتیک در سلول های یوکاریوتی، منتقل شدند. سازه های نهایی با استفاده از روش لیپوفکشن به سلول های HEK 293 ترانسفکت شدند و پس از انجام فرایند انتخاب کلونی های سلولی پایدار، جداسازی شدند. همچنین کارایی روند استفاده از لیپوفکتامین در این مطالعه با کمک پلاسمیدهای کدکننده پروتئین GFP به عنوان پلاسمید گزارشگر نیز به اثبات رسید.

بررسی تأثیر بیان shRNA بر بیان ژن E1A در چند تکرار متوالی و در آزمایش های مهار جداگانه نشانگر عدم تفاوت در میزان بیان ژن هدف در سلول های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA-U6snRNAp-shRNA در مقایسه با

حالت کنترل بود.

با توجه به نتایج حاصل از این مرحله و برای بازسازی آزمایش مقاله هکر، سلول های HEK 293 با پلاسمیدهای استفاده شده توسط گروه هکر ترانسفکت شدند. آنالیز نتایج RT-PCR در ۴۸ و ۷۲ ساعت [۵] پس از ترانسفکشن بیانگر عدم مهار بیان ژن E1A توسط پلاسمید کدکننده shRNA، در هر دو زمان نسبت به حالت کنترل بود.

نظر به این که حتی در سلول های ترانسفکت شده با پلاسمیدهای گروه هکر نیز شاهد عدم تغییر در بیان ژن E1A بودیم این احتمال در نظر گرفته شد که ممکن است جهش یا جهش هایی در توالی ژن E1A سلول های HEK 293 مورد استفاده به وقوع پیوسته باشد. به منظور بررسی این احتمال محصول PCR ژن E1A توالی یابی شد.

نتایج حاصل از آن نشان دهنده صحت ترادف بود ولی در ناحیه ای که به عنوان هدف برای siRNA انتخاب شده بود شاهد یک جهش بودیم. بنابراین از آنجا که وجود هر گونه جهش در ترادف mRNA ژن هدف مولکول siRNA موجب عدم اختلال موفقیت آمیز در بیان آن ژن توسط روش RNAi خواهد شد و در این راستا گزارش شده است که حتی یک تغییر تک نوکلئوتیدی در ترادف نیز قادر به ایجاد نقصان کامل در فرایند شود، می توان علت عدم مهار در این مطالعه را وجود این جهش عنوان کرد. هر چند احتمالات دیگری مانند نقص در فرایندهای بلوغ و عملکرد مولکول siRNA در سلول های HEK 293 استفاده شده در این تحقیق را نیز نمی توان به طور کلی نادیده گرفت.

به طور خلاصه نتایج به دست آمده به دنبال ترانسفکشن پلاسمیدهای کدکننده shRNA بر علیه ژن E1A که توسط هکر و همکاران استفاده شده بود و عدم مشاهده کاهش بیان ژن E1A در سلول های HEK 293 و مشاهده جهش در توالی این ژن نشان داد که ایجاد جهش در توالی mRNA ژن هدف در روش RNAi می تواند موجب اختلال در مرحله اتصال siRNA به ناحیه هدف و به دنبال آن عدم تجزیه mRNA مورد نظر و در نهایت اختلال در فرایند RNAi شود. علاوه بر این صحت عملکرد مکانیسم عمل آوری توالی های بازدارنده RNA در سلول ها می تواند جز عوامل تأثیرگذار بر کاهش بیان ژن توسط روش RNAi شود.

۵- منابع

- [1] Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36(1): 59-74.
- [2] Gallimore PH, Turnell AS. Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience. *Oncogene* 2001; 20(54): 7824-35.
- [3] Keblusek P, Dorsman JC, Teunisse AF, Teunissen H, van der Eb AJ, Zantema A. The adenoviral E1A oncoproteins interfere with the growth-inhibiting effect of the cdk-inhibitor p21(CIP1/WAF1). *J Gen Virol* 1999; 80: 381-90.
- [4] Chattopadhyay D, Ghosh MK, Mal A, Harter ML. Inactivation of p21 by E1A leads to the induction of apoptosis in DNA-damaged cells. *J Virol* 2001; 75(20): 9844-56.
- [5] Hacker DL, Bertschinger M, Baldi L, Wurm FM. Reduction of adenovirus E1A mRNA by RNAi results in enhanced recombinant protein expression in transiently transfected HEK293 cells. *Gene* 2004; 341: 227-34.
- [6] Cheng JC, Moore TB, Sakamoto KM. RNA interference and human disease. *Mol Genet Metab* 2003; 80(1-2): 121-8.
- [7] Kim VN. RNA interference in functional genomics and medicine. *J Korean Med Sci* 2003; 18(3): 309-18.
- [8] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296(5567): 550-3.
- [9] Milhavet O, Gary DS, Mattson MP. RNA interference in biology and medicine. *Pharmacol Rev* 2003; 55(4): 629-48.