

کارایی دو سیستم انتقالی با استفاده از پلی اتیلن ایمین برای ترانسفکشن DNA پلاسمید حاوی ژن E7 ویروس پاپیلوما ی انسانی نوع ۱۶ به داخل سلول های COS-7

اعظم بوالحسنی^۱، محمد تقی خانی^{۲*}، ناهید قاسمی^۳، حوریه سلیمانجاهی^۴، سیما رافتی^۵

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- استاد، بخش ایمنولوژی مولکولی و تحقیقات واکسن، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۸/۸/۸۷

تاریخ دریافت: ۲۲/۴/۸۷

چکیده

هدف: واکسن های DNA برای ایجاد ایمنی در مقابل عوامل بیماری زای مختلف اعم از انگل ها و ویروس ها به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته اند. توانایی DNA واکسن برای القای پاسخ ایمنی قوی بستگی به میزان بیان پروتئین کد شده در سلول های یوکاریوتی دارد. بنابراین بهینه سازی روش انتقال DNA پلاسمیدی به عنوان یکی از مراحل مهم در افزایش بیان پروتئین مورد نظر برای پیشبرد واکسیناسیون DNA مهم است. اخیراً ناقلین غیرویروسی از قبیل پلیمرها و پپتیدهای کاتیونی به عنوان سیستم های انتقال مؤثر ژن به داخل سلول های یوکاریوتی شناخته شده اند. در این بررسی، کارایی ترانسفکشن ژن E7 ویروس پاپیلوما ی انسانی نوع ۱۶ توسط دو ناقل غیرویروسی در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد.

مواد و روش ها: ساختار DNA کدکننده ژن E7 ویروس پاپیلوما ی انسانی نوع ۱۶ (pEGFP-E7) در مقیاس زیاد با خلوص بالا تهیه شد. سپس از دو سیستم انتقالی شامل پلیمر پلی اتیلن ایمین با وزن ملکولی ۲۵ کیلودالتون و هیبرید پلیمر- پپتید به صورت کونژوگه PEI600-Tat برای ترانسفکشن DNA پلاسمید حاوی ژن E7 در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد.

نتایج: در این تحقیق مشخص شد ترانسفکشن ژن E7 که توسط هر دو سیستم انتقالی پلی اتیلن ایمین ۲۵ کیلودالتونی و PEI600-Tat انجام می شود. مقایسه میزان سلول های COS-7 ترانسفکت شده توسط این دو سیستم انتقالی نشان داد که کارایی پلی اتیلن ایمین به صورت مجزا بیشتر از فرم کونژوگه آن با پپتید Tat است. **نتیجه گیری:** در این بررسی نشان داده شد که کارایی ترانسفکشن ژن E7 با سیستم انتقالی پلی اتیلن ایمین در مقابل سیستم PEI-Tat در شرایط آزمایشگاهی بیشتر است اما باید در نظر داشت که سمیت پلی اتیلن ایمین مانع استفاده از آن در شرایط زنده می شود. بنابراین با توجه به سمیت کمتر سیستم انتقالی PEI600-Tat و انتقال مؤثر DNA پلاسمید توسط آن، بررسی کارایی این سیستم جدید در شرایط زنده دارای اهمیت زیادی است.

کلیدواژگان: ترانسفکشن، ناقل غیرویروسی، پلی اتیلن ایمین، پپتید Tat، E7.

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵.

۱- مقدمه

ژن درمانی، یک روش مهم در درمان امراض گوناگون به شمار می‌رود. موفقیت ژن درمانی انسان وابسته به توسعه ابزاری است که بتواند به‌طور انتخابی ژن‌های درمانی را به سلول‌های هدف به‌صورت کارا و ایمن انتقال دهد. به‌منظور رسیدن به انتقال ژن به‌طور موفق، تغلیظ و فشرده شدن DNA، حفاظت آن از تجزیه توسط نوکلئازها و انتقال آن در سیتوزول و در نهایت انتقال DNA به داخل هسته سلول ضروری است [۱]. تحقیقات گسترده‌ای روی ناقلین ژنی غیرویروسی برای توسعه سیستم‌های انتقال مؤثر ژن وجود دارد که می‌تواند با ناقلین ویروسی رقابت کند. توانایی بررسی ژن‌های بزرگ یا استفاده از چندین ژن درمانی مختلف به‌طور همزمان، آسانی تهیه در مقادیر زیاد با قابلیت تولید بالا و هزینه پایین، پایداری نسبی طی ذخیره و آسانی تجویز به بیماران، از ویژگی‌های مهم این سیستم‌های انتقالی هستند [۲].

توانایی واکسن‌های اسید نوکلئیکی برای القای پاسخ ایمنی کارا با میزان بیان پروتئین کد شده در سلول‌های یوکاریوتی ارتباط تنگاتنگ دارد. برداشت DNA برهنه به داخل سلول در فقدان یک عامل انتقال کارا بسیار اندک است. در حال حاضر ناقلین غیرویروسی به‌عنوان یک راه ایمن برای انتقال اسید نوکلئیک به داخل سلول‌ها تحت بررسی هستند. برخی از متداول‌ترین ناقلین غیرویروسی شامل پلی‌اتیلن‌ایمین (Polyethylenimine: PEI)، دندریمرها (Dendrimers)، کیتوزان (Chitosan)، پلی‌لیزین و تعدادی از انواع پپتیدها می‌شوند که ماهیت کاتیونی دارند و قادرند با DNA برهنه از طریق میان‌کنش‌های الکتروستاتیک، کمپلکس تشکیل دهند [۳].

PEI‌ها با وزن ملکولی ۲۵ کیلودالتون یا بیشتر، کارایی ترانسفکشن (Transfection) بالایی را برای انتقال DNA در هر دو محیط آزمایشگاهی (in vitro) و بدن (in vivo) از خود نشان داده‌اند. گروه‌های آمین PEI می‌توانند در محیط اسیدی اندوزوم پروتونه شوند و DNA اندوسیتوز شده را از

تجزیه توسط نوکلئازهای لیروزومی حفاظت کنند. افزایش کارایی ترانسفکشن توسط ناقل PEI در محیط بدن بایستی به همراه حداقل سمیت (Toxicity) در نظر گرفته شود تا بتوان از این ناقل برای ژن درمانی مؤثر استفاده کرد [۴، ۵]. پپتیدهای نفوذکننده سلولی (Cell penetrating peptides: CPPs) دسته جدیدی از عوامل جایجایی غشاء هستند. یکی از بهترین CPP‌ها، بخش بازی پروتئین Tat ویروس نقص سیستم ایمنی انسان نوع ۱ (Human Immunodeficiency Virus Type 1: HIV-1) است که می‌تواند برای انتقال DNA پلاسمید به داخل سلول‌ها بدون آشفتگی در پایداری غشای سلولی و با آثار سمی کمتر استفاده شود. نانو پپتید سنتزی پلی کاتیونی پروتئین HIV-Tat به‌صورت RKKRRRQRRR یک افزایش‌دهنده ترانسفکشن است [۶، ۷].

در حال حاضر، طراحی جدید ناقل‌های ژن غیرویروسی به‌صورت هیبرید پلیمر- پپتید نظیر اتصال کووالان PEI‌ها با وزن ملکولی پایین (کمتر از ۲۰۰۰ دالتون) به Tat پپتیدها برای تشکیل کونژوگ‌های ملکولی کاتیونی صورت گرفته است [۲، ۸]. در این بررسی، نگاه مقایسه‌ای به کارایی ترانسفکشن DNA پلاسمید توسط دو سیستم انتقالی PEI ۲۵ کیلودالتونی و PEI600-Tat تحت شرایط آزمایشگاهی ارائه شده است.

۲- مواد و روش‌ها

با استفاده از ژن E7 ویروس پاپیلوما‌ی انسانی نوع ۱۶ (Human papillomavirus Type 16: HPV-16) به‌عنوان آنتی‌ژن مدل، انتقال پلاسمید pEGFP-E7 با استفاده از ساختار گزارشگر GFP (Green Fluorescent Protein) و ابزار ترانسفکشن غیرویروسی از قبیل PEI ۲۵ کیلودالتونی و کونژوگ PEI600-Tat در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. پیش از انجام مراحل ترانسفکشن، کلونینگ ژن E7 در پلاسمید حامل ژن کد کننده GFP (pEGFP-N1) ۴/۷ کیلو باز، (Clontech) انجام شد. برای تولید پلاسمید بیان کننده ژن E7، هضم آنزیمی پلاسمید pcDNA-E7 با آنزیم‌های محدودالتر BamHI/HindIII صورت گرفت. پس از استخراج ژن E7 از

برای چند ثانیه ورتکس (Vortex) شدند. مخلوط برای مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. سپس این مخلوط به ظرف‌های کوچک ۴ خانه‌ای حاوی $10^6 \times 0/5$ سلول COS-7 در هر چاهک انتقال داده شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۸۵ درصد صورت گرفت. کارایی ترانسفکشن پلاسمید کنترل (pEGFP) و پلاسمید حاوی ژن E7 توسط میکروسکوپ فلورسانس و با مشاهده تلؤلؤ درخشان سبز رنگ ارزیابی شد.

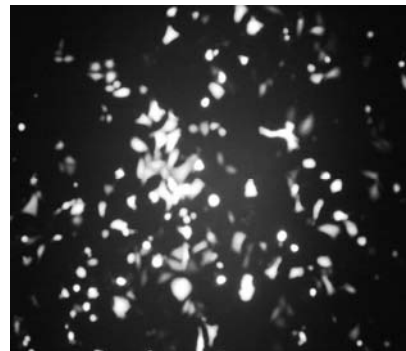
۳- نتایج

ژن E7 HPV-16 در انتهای آمینسی ناقل pEGFP کلون شد. بنابراین در صورت بیان شدن ژن E7، ژن GFP نیز بیان و فلورسانس ایجاد شده نمایانگر بیان ژن E7 است.

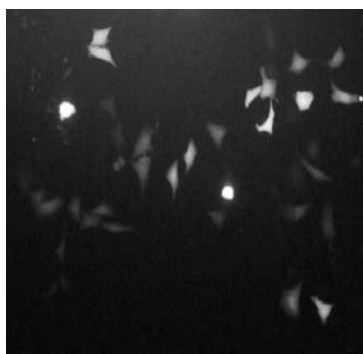
روی ژل آگارز، در مکان کلونینگ BglIII/HindIII از ناقل بیانی pEGFP-N1 کلون شد. سپس پلاسمید pEGFP-E7 به داخل باکتری مستعد اشرشیاکلی گونه DH5 α ترانسفورم شد. DNA پلاسمید حاوی ژن E7 از کلونی‌های نو ترکیب توسط روش لیز قلیایی با استفاده از Midi-kit شرکت Qiagen تخلیص و توسط PCR و با استفاده از آغازگرهای (Primers) اختصاصی تأیید شد. سپس ۱۰ میکروگرم از ساختار ژنی مورد نظر (pEGFP-E7) و پلاسمید کنترل (pEGFP) با PEI ۱۰ میکرومولار با NrE (Nitrogen resorption efficiency) ۵، ۷، ۱۰ شامل تعداد مول‌های نیتروژن در PEI هم‌ارز با مول‌های فسفات در نمونه DNA است که بستگی به pH محلول دارد) و نیز کونژوگه PEI600-Tat با مقادیر ۲، ۵، ۸۰ و ۱۵۰ میکروگرم به‌عنوان عوامل مورد استفاده در ترانسفکشن به ترتیب در بافرهای HBS (HEPES-buffered saline) و (pH=۴/۷) PBS (Phosphate Buffered Saline) مخلوط و



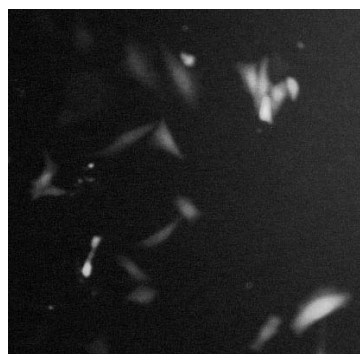
(ب)



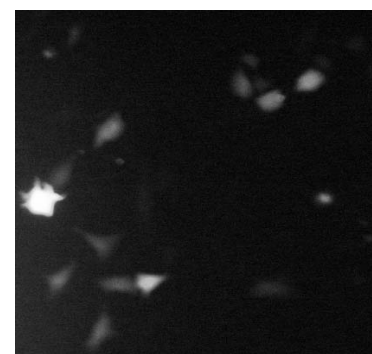
(الف)



(ه)



(د)



(ج)

شکل ۱ نمای سلول‌های COS-7 ترانسفکت شده با pEGFP و pEGFP-E7 توسط میکروسکوپ فلورسانس (الف) انتقال پلاسمید pEGFP با استفاده از سیستم انتقالی PEI ۲۵ کیلودالتونی با نسبت NrE= ۵؛ (ب) انتقال پلاسمید pEGFP-E7 با استفاده از سیستم انتقالی PEI ۲۵ کیلودالتونی با نسبت NrE= ۵؛ (ج) انتقال پلاسمید pEGFP با استفاده از دوز ۸۰ میکروگرم سیستم انتقالی PEI600-Tat؛ (د) انتقال پلاسمید pEGFP-E7 با استفاده از دوز ۵ میکروگرم سیستم انتقالی PEI600-Tat و (ه) دوز ۱۵۰ میکروگرم سیستم انتقالی PEI600-Tat.

۴- بحث

اخیراً استفاده از سیستم‌های انتقالی غیرویروسی مختلف به‌ویژه پلیمرها و پپتیدهای کاتیونی به‌منظور افزایش توانایی DNA برای ورود به داخل سیستم‌های سلولی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. شرایط تشکیل کمپلکس‌های DNA / سیستم انتقالی نظیر PEI600-Tat/DNA یا PEI/DNA ۲۵ کیلودالتونی و نسبت آن‌ها اثر مهمی روی سطح بیان ژن و درجه حفاظت DNA از حمله نوکلئازها دارد [۱، ۲].

در مطالعه حاضر، فلورسانس GFP مشاهده شده با میکروسکوپ فلورسانس نشانگر کارایی انتقال و بیان ژن‌ها در سلول‌های COS-7 بود. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، هر دو سیستم انتقالی کارایی بالایی را برای انتقال DNA پلاسمید تحت شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهند اما کارایی PEI ۲۵ کیلودالتونی بیشتر است هر چند این سیستم برای استفاده در شرایط زنده به علت سمی بودن مناسب نیست. این نتیجه برخلاف برخی گزارش‌هاست که ترانسفکشن DNA پلاسمید را در شرایط آزمایشگاهی توسط سیستم جدید انتقالی PEI600-Tat مشابه PEI ۲۵ کیلودالتونی می‌دانند [۲، ۸]. در این تحقیق مشاهده شد که برای انتقال پلاسمید pEGFP فاقد ژن نسبت به انتقال pEGFP-E7، مقادیر بالاتری از سیستم انتقالی PEI600-Tat مورد نیاز است. این یافته نشان‌دهنده آن است که نوع ژن و نسبت بارهای مثبت به منفی از اهمیت ویژه‌ای برای انجام ترانسفکشن مؤثر برخوردار است. بنابراین برای انتقال ژن مورد نظر با استفاده از PEI600-Tat در هر دو شرایط آزمایشگاهی و بدن نسبت‌های مختلف ناقل به DNA بایستی در نظر گرفته شود تا بهترین شرایط در کمترین میزان سمیت حاصل آید.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان این پروژه از کمک‌ها و حمایت‌های مالی صندوق پژوهشگران کشور وابسته به ریاست جمهوری کمال تشکر را دارند.

سلول‌های یوکاریوتی COS-7 ترانسفکت شده با ساختارهای pEGFP و pEGFP-E7 به میزان نسبتاً زیاد فلورسانس GFP را با استفاده از سیستم انتقالی PEI ۲۵ کیلودالتونی نشان دادند که نمایانگر بیان این ژن‌ها در سلول تحت شرایط آزمایشگاهی است. کارایی ترانسفکشن با استفاده از نسبت‌های مختلف PEI تقریباً مشابه بود اما در نسبت $NrE=5$ بالاتر بود.

شکل ۱ (الف و ب) کارایی ترانسفکشن pEGFP و pEGFP-E7 را با استفاده از PEI با نسبت $NrE=5$ در سلول‌های COS-7 نشان می‌دهد.

همچنین بیان GFP توسط انکوبه کردن سلول‌های COS-7 با DNA پلاسمید کد کننده GFP یا E7-GFP به صورت DNA پلاسمید برهنه یا ترکیب شده با مقادیر افزایش یافته PEI600-Tat (۲، ۵، ۸۰ و ۱۵۰ میکروگرم) در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد. انکوبه کردن با DNA پلاسمید برهنه به‌عنوان کنترل، هیچ فلورسانسی را پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکت کردن سلول‌های COS-7 نشان نداد.

در این آزمایش، سلول‌های یوکاریوتی COS-7 ترانسفکت شده با pEGFP-E7 سطح افزایش یافته فلورسانس GFP در دوزهای بالاتر کونژوگ PEI-Tat را به خود اختصاص دادند. بنابراین کارایی ترانسفکشن PEI600-Tat/DNA با افزایش مقدار کونژوگه بهبود می‌یابد و بهترین دوز ۱۵۰ میکروگرم PEI600-Tat است.

سلول‌های بیان کننده GFP فاقد ژن در دوز ۸۰ میکروگرم از PEI600-Tat فلورسانس نشان دادند (شکل ۱ ج). در مقابل، فلورسانس pEGFP-E7 در دوز ۵ میکروگرم از PEI600-Tat آغاز شد و حداکثر فلورسانس را در ۱۵۰ میکروگرم PEI600-Tat نشان داد. بنابراین کمپلکس‌های PEI600-Tat/DNA در مقادیر مشخص، برداشت DNA را توسط سلول‌هایی که به بیان پروتئین مورد نظر منجر می‌شود، تسهیل می‌کنند. نتایج ما نشان داد که کمپلکس‌های PEI600-Tat/DNA برای ترانسفکت کردن سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی کارا بودند.

کارایی ترانسفکشن ژن E7 با استفاده از PEI600-Tat (۵ و ۱۵۰ میکروگرم) در شکل ۱ (د، ه) نشان داده شده است.

۶- منابع

- [1] Hellgren I, Gorman J, Sylven C. Factors controlling the efficiency of Tat-mediated plasmid DNA transfer. *J Drug Target* 2004; 12(1): 39-47.
- [2] Alexis F, Lo SL, Wang S. Covalent attachment of low molecular weight poly (ethyleneimine) improves Tat peptide mediated gene delivery. *Adv Mater* 2006; 18: 2174-8.
- [3] Martin ME, Rice KG. Peptide-guided gene delivery. *AAPS J* 2007; 9(1): E18-29.
- [4] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(16): 7297-301.
- [5] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Poly (ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release* 1999; 60(2-3): 149-60.
- [6] Brooks H, Lebleu B, Vives E. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(4): 559-77.
- [7] Jarver P, Langel U. The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation. *Drug Discov Today* 2004; 9(9): 395-402.
- [8] Wang S. Tat peptide conjugates of low molecular weight polyethylenimine as effective non-viral gene delivery vectors. *Mol Ther* 2006; 13: 76.