مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۱ و ۲: از ۱۵-۱۹
بهار و تابستان ۱۳۸۷

مقاله کوتاه

کارایی دو سیستم انتقالی با استفاده از پلی‌اتیلن‌ایمین برای ترانسفکشن DNA پلاسمید حاوی ژن *E7* ویروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ به داخل سلول‌های COS-7

اعظم بوالحسنی[۱]، محمد تقی‌خانی[۲*]، ناهید قاسمی[۳]، حوریه سلیمانجاهی[۴]، سیما رأفتی[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 ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵- استاد، بخش ایمنولوژی مولکولی و تحقیقات واکسن، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۷/۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۷/۸/۸

چکیده

هدف: واکسن‌های DNAیی برای ایجاد ایمنی در مقابل عوامل بیماری‌زای مختلف اعم از انگل‌ها و ویروس‌ها به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته‌اند. توانایی DNA واکسن برای القای پاسخ ایمنی قوی بستگی به میزان بیان پروتئین کد شده در سلول‌های یوکاریوتی دارد. بنابراین بهینه‌سازی روش انتقال DNA پلاسمیدی به‌عنوان یکی از مراحل مهم در افزایش بیان پروتئین مورد نظر برای پیشبرد واکسیناسیون DNAیی مهم است. اخیراً ناقلین غیرویروسی از قبیل پلیمرها و پپتیدهای کاتیونی به‌عنوان سیستم‌های انتقال مؤثر ژن به داخل سلول‌های یوکاریوتی شناخته شده‌اند. در این بررسی، کارایی ترانسفکشن ژن *E7* ویروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ توسط دو ناقل غیرویروسی در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: ساختار DNAیی کدکننده ژن *E7* ویروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ (pEGFP-E7) در مقیاس زیاد با خلوص بالا تهیه شد. سپس از دو سیستم انتقالی شامل پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین با وزن ملکولی ۲۵ کیلودالتون و هیبرید پلیمر- پپتید به‌صورت 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 پلی‌اتیلن‌ایمین ۲۵ کیلودالتونی و PEI600-Tat انجام می‌شود. مقایسه میزان سلول‌های COS-7 ترانسفکت شده توسط این دو سیستم انتقالی نشان داد که کارایی پلی‌اتیلن‌ایمین به‌صورت مجزا بیشتر از فرم کونژوگه آن با پپتید Tat است.

نتیجه‌گیری: در این بررسی نشان داده شد که کارایی ترانسفکشن ژن *E7* با سیستم انتقالی پلی‌اتیلن‌ایمین در مقابل سیستم PEI-Tat در شرایط آزمایشگاهی بیشتر است اما باید در نظر داشت که سمیت پلی‌اتیلن‌ایمین مانع استفاده از آن در شرایط زنده می‌شود. 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، پلی‌اتیلن‌ایمین، پپتید Tat، *E7*.

* **نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵.
Email: taghi_mo@modares.ac.ir

۱- مقدمه

ژن‌درمانی، یک روش مهم در درمان امراض گوناگون به‌شمار می‌رود. موفقیت ژن‌درمانی 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 ژن‌درمانی 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 لیزوزومی 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 ژن‌درمانی مؤثر استفاده کرد [٤، ٥]. پپتیدهای نفوذکننده سلولی (Cell penetrating peptides: CPPs) دسته جدیدی از عوامل جابجایی 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 RKKRRQRRR، یک افزایش‌دهنده ترانسفکشن است [٦، ٧].

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 کونژوگه‌های 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.

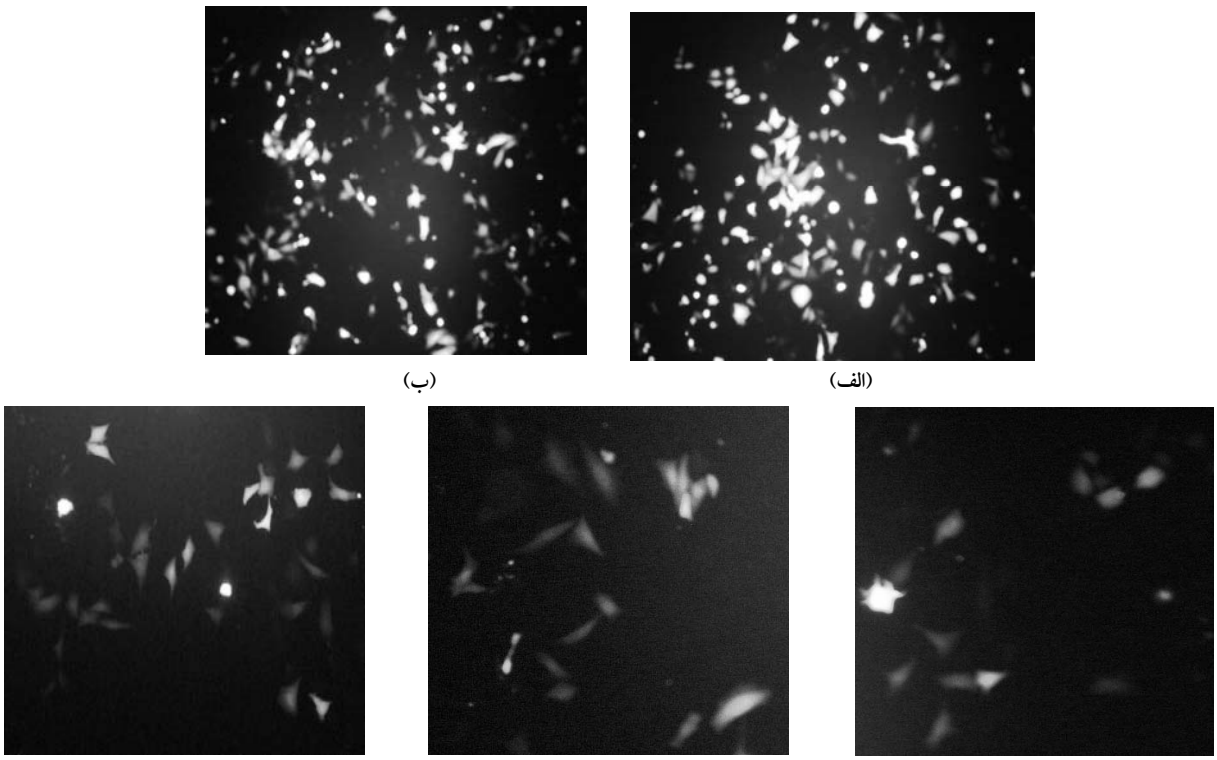
۲- مواد و روش‌ها

با استفاده از ژن *E7* ویروس پاپیلومای انسانی نوع ١٦ (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 کونژوگه PEI600-Tat در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. پیش از انجام مراحل ترانسفکشن، کلونینگ ژن *E7* در پلاسمید حامل ژن کد کننده GFP (pEGFP-N1، ٤/٧ کیلو باز، Clontech) انجام شد. برای تولید پلاسمید بیان کننده ژن *E7*، هضم آنزیمی پلاسمید pcDNA-E7 با آنزیم‌های محدودالاثر *Bam*HI/*Hind*III صورت گرفت. پس از استخراج ژن *E7* از

روی ژل آگارز، در مکان کلونینگ *Bgl*II/*Hind*III از ناقل بیانی pEGFP-N1 کلون شد. سپس پلاسمید pEGFP-E7 به داخل باکتری مستعد اشرشیاکلی گونه DH5α ترانسفورم شد. DNA پلاسمید حاوی ژن *E7* از کلونی‌های نوترکیب 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 (NrE 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 به‌ترتیب در بافرهای HBS (HEPES-buffered saline، pH=٤/٧) و PBS (Phosphate Buffered Saline) مخلوط و برای چند ثانیه ورتکس (Vortex) شدند. مخلوط برای مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. سپس این مخلوط به ظرف‌های کوچک ٤ خانه‌ای حاوی $۱۰^{۵}$ × ۰/۵ سلول COS-7 در هر چاهک انتقال داده شد و انکوباسیون به‌مدت ٢٤ و ٤٨ 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 آمینی ناقل pEGFP کلون شد. بنابراین در صورت بیان شدن ژن *E7*، ژن *GFP* نیز بیان و فلورسانس ایجاد شده نمایانگر بیان ژن *E7* است.



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 ۵ =NrE؛ (ب) انتقال پلاسمید pEGFP-E7 با استفاده از سیستم انتقالی PEI ۲۵ کیلودالتونی با نسبت ۵ =NrE؛ (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.

سلول‌های یوکاریوتی COS-7 ترانسفکت شده با ساختارهای pEGFP-E7 و pEGFP 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= ۵ بالاتر بود.

شکل ۱ (الف و ب) کارایی ترانسفکشن pEGFP و pEGFP-E7 را با استفاده از PEI با نسبت NrE= ۵ در سلول‌های COS-7 نشان می‌دهد.

همچنین بیان *GFP* توسط انکوبه کردن سلول‌های COS-7 با DNA پلاسمید کد کننده GFP یا E7-GFP به‌صورت 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 ۲٤ و ٤۸ 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 کونژوگه 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.

٤- 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.

٦- 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.