پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۴، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹، صفحات ۲۰ تا ۲۵

مقاله اصلی
(Original Article)

کلونینگ cDNA فاکتور VII انعقادی حاصل از رده سلولی هپاتوما

پریسا شعبانی[۱]، مژگان بنده پور[۲]، سلاله امامقلی پور[۱]، لیلا ماغن[۲]، نگار سید[۲]، بهرام یغمایی[۱]، بهرام کاظمی[۲،۳*]

[۱] گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۳] گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *فاکتور هفت، پروتئاز انعقادی مسئول شروع آبشار واکنش‌های پروتئولیتیک است که به تولید ترومبین و در نتیجه تشکیل لخته می‌انجامد. به دلیل به کارگیری موفق آن در کنترل هموفیلی و نقش احتمالی آن در فرآیندهای مختلف سلولی، فاکتور هفت به عنوان هدف ژن درمانی و سایر مشکلات بالینی مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه، رده سلولی HepG2 برای کلون فاکتور VII مورد استفاده قرار گرفت.*

روش بررسی: *این تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. RNA کل رده سلولی هپاتوما (HepG2) استخراج شد و مورد رونویسی معکوس قرار گرفت و cDNA فاکتور هفت با واکنش PCR تکثیر شد. محصول PCR به وکتور pTZ57R/T منتقل شد ودر باکتری Ecoli ترانسفرم گردید.*

یافته‌ها: *پس از واکنش PCR، باند DNA مربوط به ژن فاکتورهفت مشاهده شد و بدنبال کلونینگ، پلاسمید نوترکیب بوسیله آنزیمهای محدودگر تایید شد.*

نتیجه‌گیری: *در این مطالعه، کلونینگ cDNA فاکتور هفت حاصل از لاین سلولی HepG2 گزارش شد که امکان استفاده از آن و دستکاری‌های بعدی آن فراهم شده است.*

واژگان کلیدی: *فاکتور هفت، هموفیلی، HepG2.*

مقدمه

فاکتور هفت، یک گلیکوپروتئین وابسته به ویتامین k است که دارای ۴۰۶ آمینواسید و وزن مولکولی ۵۰ کیلو دالتون می‌باشد. فاکتور هفت به دو شکل در پلاسما گردش می‌کند. بخش اعظم آن بصورت زیموژن غیرفعال تک زنجیره‌ای و درصد کمی به شکل فعال دو زنجیره‌ای دارای زنجیره‌های سنگین و سبک است. تبدیل فاکتور هفت به شکل فعال (FVIIa) با شکستن پیوند پپتیدی بین اسید آمینه‌های Ile شماره ۱۵۳ و Arg شماره۱۵۲ صورت می‌گیرد (۱).

فاکتور هفت نقش محوری در شروع انعقاد دارد. بطور خلاصه، بدنبال آسیب عروق، فاکتور هفت به کوفاکتور خود، فاکتور بافتی (TF)، در سطح سلول‌های آسیب دیده متصل شده و فعال می‌شود. کمپلکس TF/ FVIIa مقدار کمی فاکتورهای X و IX را فعال می‌کند. فاکتور X فعال (FXa) ترکیب شده با FVa مقدار محدودی پروترومبین را به ترومبین تبدیل می‌کند. ترومبین پلاکت‌ها، FV و FVIII را فعال می‌کند.

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، بهرام کاظمی (**e-mail:** bahram_14@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۲/۲۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۷/۱۹

مرحله نهایی که برروی پلاکت‌ها اتفاق می‌افتد، کمپلکسی شامل FIX فعال، FVIII فعال، کلسیم و فسفولیپیدهای اسیدی مقدار بیشتری FX را به FXa تبدیل می‌کند. FVa/FXa تولید انفجاری ترومبین را موجب می‌شود که منجر به تشکیل لخته می‌شود (۳،۲).

پیشنهاد شده است که فاکتور هفت می‌تواند بدون TF با میل ترکیبی پایین به پلاکت‌ها متصل شود و فعال گردد. در نتیجه دوز بالای فاکتور هفت قادر است مستقل از TF هموستاز را فراهم کند (۴). در آزمایشی که غلظت‌های پلاسمایی زیموژنهای فاکتورهای نه، هشت، پروترومبین، پنج، هشت و مهارکننده های پروتئاز فراهم شده بود، فاکتور هفت متصل به پلاکت فعال بوده و FX را به FX فعال تبدیل کرد. این تجربه می‌تواند دلیل افزایش هموستاز را در بیماران هموفیلی درمان شده با دوز بالای FVII فعال توضیح دهد (۲).

هموفیلی عارضه‌ای حاصل ازنقص انعقادی است که به دلیل جهش در ژن‌های کد کننده فاکتور VIII (هموفیلی A) یا فاکتور IX (هموفیلی B) ایجاد می‌شود. در بررسی که روی ۶۴۲۷ نفر افراد مبتلا به نقص انعقادی وراثتی در ایران انجام شد، ۱۸۰۳ نفر در تهران زندگی می‌کردند که ازاین تعداد، ۱۰۷۷ نفر به هموفیلی A و ۲۱۱ نفر به هموفیلی B مبتلا بودند (۵). برای اطلاع بیشتر از روش‌های درمان هموفیلی با فاکتور هفت می توان به مقاله Hoots مراجعه نمود (۶). مشکل عمده این روش درمانی تولید آنتی‌بادی خنثی کننده بر علیه پروتئین تزریق شده است که در ۳ درصد بیماران هموفیلی B و ۲۰ درصد بیماران هموفیلی A بصورت شدید اتفاق می‌افتد (۷).

فاکتور هفت فعال که امروزه بصورت فاکتور هفت نوترکیب (rFVII) استفاده می‌شود، می‌تواند روند انعقادی وابسته به فاکتورهای VIII و IX را دور بزند، بنابراین یک انتخاب ایده‌آل در درمان بیماران تولید کننده آنتی‌بادی و سایر بیماران هموفیلی محسوب می‌شود که هم بدون عارضه ترومبولیتیک است و هم از نظر هموستاتیک موثر است (۸). هم‌چنین درمان با فاکتور هفت نوترکیب روش درمانی انتخابی بیماران هموفیلی اکتسابی می‌باشد (۹). اگرچه همه بیماران هموفیلی می‌توانند از این روش استفاده کنند، اما نیمه عمر کوتاه و هزینه بالای آن، استفاده از این روش درمانی را محدود کرده است (۸). انتقال ژن FVII، یک روش جایگزین در کنترل خونریزی هموفیلی است که خطر ایجاد آنتی‌بادی مهار کننده را برطرف کرده و مشکلات حاصل از نیمه عمر کوتاه فاکتور هفت نوترکیب را از بین می‌برد (۱۰).

باتوجه به مطالب فوق، کلونینگ ژن فاکتور VII به منظور استفاده در ژن درمانی هموفیلی و سایر مشکلات انعقادی حائز اهمیت است. با توجه به اینکه منبع اصلی تولید فاکتور VII در شرایط طبیعی سلول‌های کبدی می باشند و برای تهیه RNA فاکتور VII نیاز به بیوپسی از بافت کبد می‌باشد، در این مطالعه از RNA استخراج شده از سلول HepG2 برای تهیه cDNA فاکتورVII و کلونینگ آن استفاده شد تا مشکلات اخلاقی حاصل از بیوپسی کبد را در پی نداشته باشد. مطالعات قبلی مبین این است که بیان فاکتور VII توسط تعدادی دیگر از رده‌های سلولی (سلول‌های تخمدانی، پروستات، ریه، معده و تیروئید) هم انجام می‌گیرد، ولی رده‌های سلولی کبدی (HepG2, HUH-6, HUH-7) نسبت به سایر سلول‌ها بیان بالاتری را نشان می‌دهند (۱۱). در نتیجه رده سلولی HepG2 برای کلون فاکتور VII مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که برای انجام کارهای دیگر مانند ژن درمانی و تولید فاکتور هفت نوترکیب در کشور انجام این‌کار ضروری بود.

مواد و روشها

این مطالعه بصورت تجربی انجام گرفت. RPMI، FBS، تریپسین-EDTA و پنی‌سیلین-استرپتومایسین از Biosera تهیه شدند. رده سلولی هپاتوما (HepG2) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. کیت RNeasy mini از شرکت Qiagen، و کیت کلونینگ و آنزیم ترنسکریپتاز معکوس MMLUV از شرکت Fermentas تهیه شدند. رده سلولی HepG2 در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS و پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و انکوباتور ۵ CO_2 درصد کشت داده شد (۱۲).

RNA کل رده سلولی HepG2 با استفاده ازکیت RNeasy mini طبق پروتکل شرکت سازنده استخراج شد و به وسیله واکنش رونویسی معکوس با استفاده از پرایمر الیگو dT وآنزیم ترنسکریپتاز معکوس (MMLUV) cDNA فاکتور هفت تهیه شد (۱۳). واکنش PCR با استفاده از آنزیم DNA پلیمراز Taq و پرایمرهای طراحی شده برای توالی cDNA فاکتور VII انجام شد.

FVII F 5`-GGA TCC ATG GTC TCC CAG GCC CTC AG -3`

FVII R 5`- GGT ACC CTA GGG AAA TGG GGC TCG CAG-3`

برای سهولت و همچنین صحت کلونینگ ژن در پلاسمید بیانی، سمت `5 پرایمر فوروارد جایگاه شناسایی آنزیم BamHI و سمت `5 پرایمر ریورس جایگاه شناسایی آنزیم

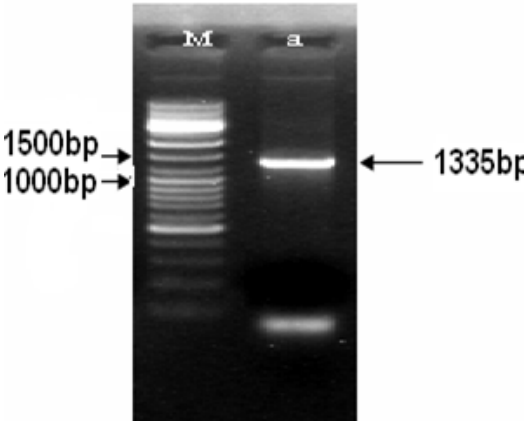
KpnI قرار داده شد. محلول واکنش PCR حاوی ۰/۵ میکروگرم cDNA، ۲۰ پیکومول از هر یک از پرایمرهای Forward وReverse ، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، بافر PCR، ۱/۲۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر بود. برنامه PCR بدین صورت بود: مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و مدت ۵ دقیقه و بدنبال آن ۳۰ سیکل: دناتوراسیون (denaturation) در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها (annealing) در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن (extension) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله طویل شدن انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مدت ۵ دقیقه (۱۴).

آنزیم DNA پلیمراز Taq دارای فعالیت ترمینال ترانسفرازی است و در انتهای `3 محصول PCR چند نوکلئوتید dATP قرار می‌دهد که می‌تواند با وکتور pTZ57R/T جفت شود (۱۵). ابتدا محصول PCR از ژل خالص‌سازی شد (۱۶) و به عنوان insert در واکنش اتصال (Ligation) مورد استفاده قرار گرفت. واکنش اتصال با مولاریته مناسب وکتور و insert صورت گرفت (۱۷). مخلوط واکنش در باکتری اشرشیاکولی سویه JM107 ترانسفرم شد (۱۸). واکنش ترانسفرماسیون روی پلیت آگار حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین، ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر X-Gal، یک میلی‌مولار IPTG، پخش شد. کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب از نظر فعالیت β- گالاکتوزیداز بررسی شدند. کلنی‌هایی که β- گالاکتوزیداز را بیان نمی‌کردند (کلنی‌های سفید) انتخاب شدند (۱۹). یک کلنی سفید در ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت شبانه داده شد و با روش Alkaline minipreparation پلاسمید آن استخراج شد (۲۰).

کلونینگ به وسیله روش هضم آنزیمی و هم‌چنین PCR با استفاده از پرایمرهای universal (T_3/T_4) پلاسمید که برای تکثیر مالتیپل کلونینگ سایت طراحی‌شده‌اند، مورد تایید قرار گرفت.

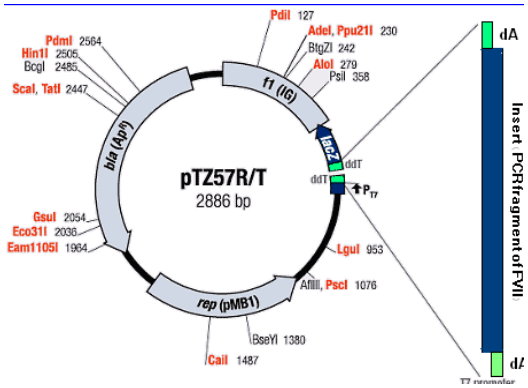
یافته‌ها

ترادف کامل cDNA فاکتور VII با استفاده از پرایمر الیگو dT از رده سلولی HepG2 سنتز شد و با پرایمرهای طراحی شده برای ژن مذکور با روش PCR تکثیر گردید. شکل ۱ محصول PCR ژن فاکتور هفت را با ۱۳۳۵ نوکلئوتید نشان می‌دهد.

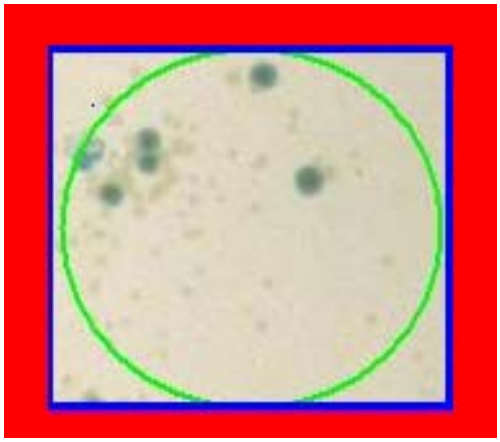


شکل ۱- محصول PCR فاکتور VII. ستون a محصول PCR و ستون M مارکر وزنی DNA است.

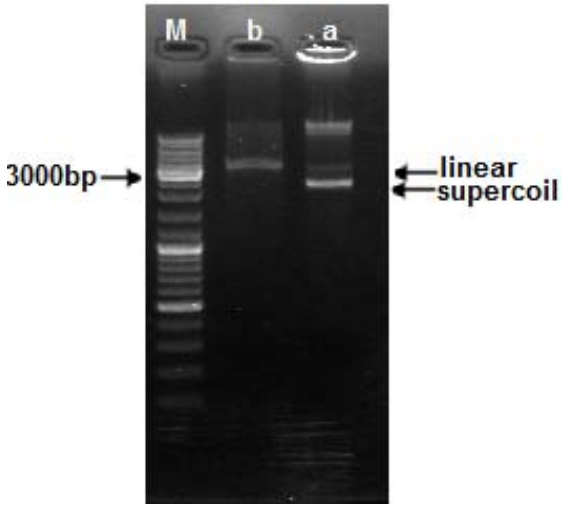
محصول PCR که در سمت `3 آن چند dATP داشت، طی واکنش آنزیم T4 DNA ligase به وکتور pTZ57R/T متصل گردید (شکل ۲).



شکل ۲- نقشه ژنتیکی وکتور pTZ57R/T و جایگاه قرارگیری محصول PCR فاکتور VII.

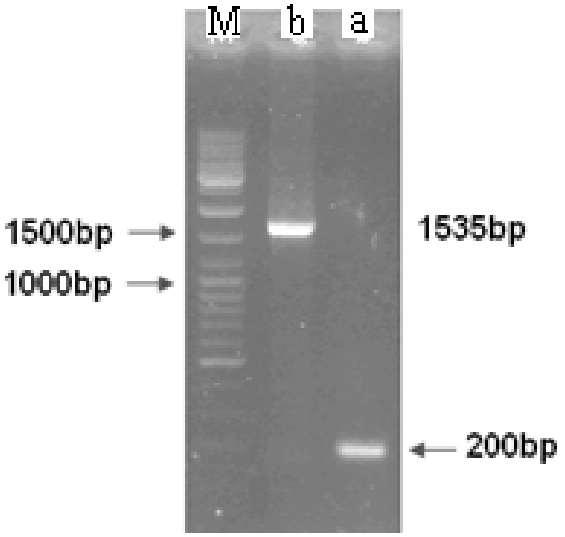


شکل ۳- کلنی‌های سفید و آبی روی آگار پلیت حاوی IPTG و X-gal



شکل ۴- آنالیز هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ57R حاوی ژن FVII بوسیله آنزیم SmaI در مقایسه با پلاسمید pTZ57R. ستون a پلاسمید نوترکیب pTZ57R حاوی ژن FVII (حالت حلقوی)، ستون b پلاسمید نوترکیب خطی شده pTZ57R حاوی ژن FVII (با آنزیم SmaI هضم شده است) و ستون M مارکر وزنی DNA را نشان می‌دهد.

محصول واکنش فوق به سلول باکتری منتقل شد وروی آگار پلیت حاوی IPTG و X-gal پخش گردید. کلنی‌های سفید (شکل ۳) انتخاب شدند و از آنها کشت انبوه تهیه گردید، پلاسمید استخراج شد و کلونینگ ژن با هضم آنزیمی پلاسمید و هم‌چنین واکنش PCR با پرایمرهای universal (T_3/T_4) پلاسمید تایید گردید (شکل‌های ۴ و ۵).



شکل ۵- انجام واکنش PCR از پلاسمید نوترکیب pTZ57R حاوی ژن فاکتورهفت بوسیله پرایمرهای universal (درمقایسه با پلاسمید pTZ57R). ستون a واکنش PCR از پلاسمید pTZ57R ، ستون b واکنش PCR از پلاسمید نوترکیبpTZ57R حاوی ژن فاکتور هفت و ستون M مارکر وزنی DNA را نشان می‌دهد.

بحث

درمان بیماران هموفیلی با یا بدون آنتی‌بادی مهار کننده با فاکتور هفت نوترکیب موثر و مطمئن می‌باشد (۲۳-۲۱). Hedner و همکارانش، کارایی ۹۰ درصدی فاکتور هفت را در درمان بیماران مبتلا به هموفیلی تولید کننده آنتی‌بادی مهار کننده گزارش کردند (۲۴). Sumner و همکارانش شواهدی دال بر اثربخشی و اطمینان فاکتور هفت نوترکیب به عنوان اولین روش درمانی بیماران هموفیلی اکتسابی ارائه نمودند (۲۵). هزینه بالای این دارو استفاده از آن را محدود کرده است، دوز موثر آن (۹۰ میکروگرم بر کیلوگرم) حدود ۱۰۰۰۰ دلار در هر روز برای هر بیمار هموفیلی هزینه دارد (۲۵). برای حل مشکل قیمت بالای این فاکتور، انتقال ژن به عنوان یک روش جایگزین در کنترل خونریزی بیماران هموفیلی پیشنهاد شده است. Margaritis و همکارانش تصحیح فنوتیپیکی و بیان طولانی‌مدت موش‌های هموفیلی B به دنبال استفاده از ترانس ژن FVII موشی را گزارش کردند. انتقال ژن در عین جلوگیری از تشکیل آنتی‌بادی FVIII و FIX، امکان بیان طولانی‌مدت را فراهم می‌کند (۱۰).

در این روند، ابتدا باید cDNA ژن کدکننده فاکتور هفت را کلون کرد تا امکان استفاده در ژن‌درمانی و هم‌چنین دستکاری‌های بعدی فراهم شود. Seetharam و همکارانش به منظور کلون کردن FVII رت، به جای استفاده از سلول و استخراج RNA برای تهیه cDNA، از کتابخانه ژنی cDNA کبد رت استفاده کردند (۲۶). Ruize و همکارانش، cDNA کدکننده فاکتور هفت خرگوش را از کتابخانه ژنی موجود در فاژ لامبادا gt11 تکثیر کردند (۲۷).

در این مطالعه، پس از استخراج RNA از سلول HepG2، cDNA فاکتور VII انسانی تهیه شد و محصول PCR حاصل از تکثیر cDNA فاکتور VII به وکتور pTZ57R/T متصل شد. Seetharam و همکارانش ازآنزیم‌های محدودالاثر NheI و BamHI برای وارد کردن قطعه درون وکتور بیان pIRES2-Neo استفاده کردند (۲۶).

Ruize و همکارانش cDNA فاکتور VII خرگوشی را با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر HindIII و SalI در وکتور بیان pCMVS کلون نمودند (۲۷). در این مطالعه نیز برای صحت کلونینگ ژن در وکتور بیانی جایگاه شناسایی آنزیم‌های BamHI و KpnI روی پرایمرها قرار داده شد.

با وجود روش درمانی موثر در درمان بیماران هموفیلی تولید کننده آنتی‌بادی، قیمت بالای فاکتور VII نوترکیب هزینه

بسیار بالایی را به دولت تحمیل می‌کند. لذا ارائه روش‌های جایگزین مانند انتقال ژن فاکتور VII روشی کارآمد برای حل این مشکل است و کلون ژن کد کننده فاکتور VII که در این مطالعه صورت گرفت، نخستین گام در راستای رسیدن به هدف مذکور می‌باشد.

قدردانی و تشکر

این مطالعه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی انجام شده است. بدین‌وسیله نویسندگان از مسئولین فوق صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

REFERENCES

1. Perry DJ. Factor VII deficiency. Br J Hematol 2002; 118: 689-700.
2. Lau HK. The interaction between platelets and factor VII/VIIa. Transfus Apher Sci 2003; 28: 279-83.
3. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 21: 41-48.
4. Hoffman M, Monroe DM. The action of high-dose factor VIIa (FVIIa) in a cell-based model of hemostasis. Dis Mon 2003; 49: 14-21.
5. Mehdizadeh M, Kardoost M, Zamani G, Baghaeepour MR, Sadeghian K, Pourhoseingholi MA. Occurrence of haemophilia in Iran. Haemophilia 2009; 15: 348-51.
6. Hoots WK. Challanges in the tharapeutic use of a so-called universal hemostatic agent: recombinant factor VIIa. Hematology Am Soc Hematol Educ Progam 2006: 426-31.
7. Josephson CD, Abshire TC. Clinical uses of plasma and plasma fractions: plasma-derived products for hemophilias A and B, and for von Willebrand disease. Best Pract Res Haemotol 2005; 19: 35-49.
8. Hedner U, Ingerslev J. Clinical use of recombinant FVII (rFVIIa). Transfus Sci 1998; 19: 163-76.
9. Buczma A, Windyga J. Acquired hemophilia. Pol Arch Med Wean 2007; 117: 241-45.
10. Margaritis P, Arruda VR, Aljamali M,Camire RM, Schlachterman A, High KA. Novel threapeutic approach for hemophilia using gene delivery of an engineered secreted activated factor VII. J Clin Invest 2004; 113: 1025-31.
11. Koizume S, Jin M, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Piao J, et al. Activation of cancer cell migration and ectopic synthesis of coagulation factor VII. Cancer Res 2006; 66: 9453-60.
12. Langdon P. Basic principles of cancer cell culture. Methods Mol Med 2004; 88: 3-15.
13. Tabor S. RNA-dependent DNA polymerases. Curr Protoc Mol Biol 2001; Chapter 3: Unit 3.7.
14. Mcpherson MJ, Moller SG. PCR (The Basics). First ed. Philadelphia: BIOS Scientific Publishers Ltd; 2000.
15. Lail-Trecker M. Cloning PCR products utilizing the T/A overhang and a kit. Methods Mol Biol 1997; 67: 79-87.
16. Gaastar W, Jorgensen PL. The extraction and isolation of DNA from gels. In:Walker JM, ed. methods in molecular biology. London: Springer: 1984. p.67-76.
17. Gaastra W, Hansen K. Ligation of DNA with T4 DNA ligase. In:Walker JM, ed. methods in molecular biology. London: Springer: 1984. p.225–30.
18. Hanahan D. Studies on transformation on E. coli with plasmids. J Mol Biol 1983; 98: 503-17.
19. Bothwell AL, Yancopoulos GD, Alt FW. Methods for cloning and analysis of eukaryotic genes. New York: Jones and Bartlett Publisher; 1990. p.111.
20. Feliciello I, Chinali G. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. Anal Biochem 1993; 212: 394-401.
21. Hay CR, Brown S, Collins, PW, Keeling DM, Liesner R. The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: a guideline from the United Kingdom heamophilia centre doctors organization. Br J Heamatol 2006; 133: 591-605.
22. Berntorp E, Shapiro A, Astermark J, Blanchette VS, Collins PW, Dimichele D, et al. Inhibitor treatment in heamophilias A and B: summery statement for the 2006 international consensus conference. Haemophilia 2006; 12: 1-7.
23. Goldstein B, Geldziler B, Bjerre J, Seremetis S. Evience-based use of recombinant FVIIa for the treatment of hemophilia with inhibitors in children and adolescents. Transfus Apheres Sci 2008; 38: 25-32.

24. Hedner U, Ginsburg D, Lusher JM, High KA. Congenital hemorrhagic disorders: new insights into the pathophysiology and treatment of hemophilia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2000:241-265.

25. Sumner MJ, Geldziler BD, Pedersen M, Seremetis S. Treatment of acquired hemophilia with recombinant activated FVII: a critical appraisal. Hemophilia 2007; 13: 451-61.

26. Seetharam S, Murphy K, Atkins C, Feuerstein G. Cloning and expression of rat coagulation factor VII. Thromb Res 2003; 109: 225-31.

27. Ruize SM, Sridhara S, Blajchman MA, Clarke BJ. Expression and purification of recombinant Rabbit Factor VII. Thromb Res 2000; 98: 203-11.