

Original Article

Site Directed Mutagenesis in *Ifn β* Gene in Order to Increasing Its mRNA Stability and Translation Level Using Megaprimer PCR Method

Maryam Heidari, Zohreh Hojati*, Maryam Kay

Division of Genetics, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: 16 Jan, 2014 Accepted: 20 Apr, 2014

Abstract

Background and Objectives: Beta interferon (IFN β) protein is produced as a recombinant drug and used in treatment of some diseases like Multiple Sclerosis. In eukaryotic cells, IFN β mRNA is rapidly degraded and its half-life is too short. One of the contributing factors to this short half-life is presence of the AU rich element (ARE) in 3'UTR of this mRNA. This region has an inhibitory effect on translation too. Our aim in this research was to delete ARE from IFN β gene in order to increase its mRNA stability and translational level.

Materials and Methods: In order to delete an 18 nucleotide sequence from ARE, the Megaprimer PCR technique was used. The PCR product was digested with EcoRI and BglII enzymes. The vector was partially digested with the same enzymes. The digested PCR product was purified and cloned into the vector. Then, the recombinant vectors were transfected into CHO cell line.

Results: The first PCR reaction product contained a deletion mutation and was used as megaprimer in the second reaction. Partial digestion of the vector yielded a variety of fragments with different weights. The sufficient fragment was purified from the gel and used as a cloning vector. Final product of PCR was cloned into the vector. The accuracy of the cloning reaction was confirmed and the recombinant vector was transfected into CHO cell line.

Conclusion: An 18 nucleotide region of IFN β mRNA was deleted. The influence of this microdeletion on mRNA stability and translational efficiency needs to be surveyed in future.

Keywords: Beta Interferon (Ifn β), AU Rich Element, Megaprimer PCR

*Corresponding author:

Email: z.hojati@sci.ui.ac.ir

مقاله پژوهشی

ایجاد جهش هدفدار در ژن *IFNβ* به منظور افزایش پایداری mRNA و سطح ترجمه آن با روش Megaprimer PCR

مریم حیدری، زهره حجتی*، مریم کی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

دریافت: ۹۲/۱۰/۲۶ پذیرش: ۹۳/۱/۳۱

چکیده

زمینه و اهداف: پروتئین ایتترفرون بتا (*IFNβ*) به عنوان یک داروی نو ترکیب تولید شده و در درمان برخی بیماری‌ها مثل مالتیپل اسکلروزیس استفاده می‌شود. در سلول‌های یوکاریوتی *IFNβ mRNA* به سرعت تجزیه می‌شود و نیمه عمر آن بسیار کوتاه است. یکی از عواملی که باعث این امر می‌شود وجود توالی غنی از *ARE* (AU) در *3'UTR* این mRNA می‌باشد. این ناحیه اثر مهاری بر ترجمه نیز دارد. هدف این تحقیق حذف *ARE* از ژن ایتترفرون بتا جهت افزایش پایداری mRNA و سطح ترجمه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: به منظور حذف یک توالی ۱۸ نوکلئوتید از *ARE* از روش Megaprimer PCR استفاده شد. محصول PCR با آنزیم‌های *EcoRI* و *BglII* برش داده شد. وکتور نیز توسط همین آنزیم‌ها اما به صورت نسبی برش داده شد. محصول برش یافته PCR خالص‌سازی شد و داخل وکتور کلون شد. در ادامه وکتور نو ترکیب حاصل به رده سلولی CHO ترانسفکت شدند.

یافته‌ها: محصول مرحله اول واکنش PCR حاوی جهش حذفی بود و به عنوان مگاپرایمر در واکنش دوم استفاده شد. هضم نسبی وکتور، قطعاتی با وزن‌های مختلف ایجاد کرد. قطعه مورد نظر ما از ژل استخراج و به عنوان وکتور کلونینگ استفاده شد. محصول نهایی PCR داخل وکتور کلون شد. صحت واکنش کلونینگ تایید شد و وکتور نو ترکیب حاصل، به رده سلولی CHO ترانسفکت شد.

نتیجه‌گیری: منطقه‌ای ۱۸ نوکلئوتیدی از *IFNβ mRNA* حذف شد. اثر این میکرو حذف بر پایداری mRNA و بازدهی ترجمه در آینده بررسی خواهد شد.

کلید واژه‌ها: ایتترفرون بتا، توالی غنی از آدنین-یوراسیل، Megaprimer PCR

*ایمیل نویسنده رابط: Email: z.hojati@sci.ui.ac.ir

مقدمه

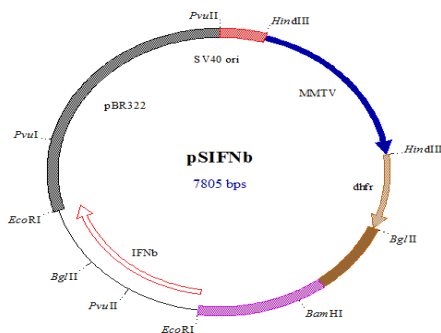
می‌باشد (۳). *IFNβ* نخستین عامل درمانی می‌باشد که نقش آن در به تاخیر انداختن پیشرفت بیماری مولتیپل اسکلروزیس (MS)، نشان داده شده است. این دارو باعث کاهش تعداد حملات و کاهش سرعت تشدید بیماری و ایجاد ناتوانی می‌شود (۴). به علاوه *IFNβ* احتمالاً می‌تواند در درمان استئوسارکوما، دیسپلازی سرویکس، گلیوما و برخی عفونت‌های ویروسی مثل عفونت ویروس پاپیلوما، هرپس، آنسفالیت و نیز هپاتیت B و C هم مورد استفاده قرار گیرد (۵). امروزه سلول‌های *E. coli* و رده سلولی CHO، به عنوان سیستم‌های بیانی شایع جهت تولید *IFNβ* برای

ایتترفرون بتا (*IFNβ*) از اعضای گروه یک ایتترفرون‌ها گلیکوپروتئینی تنظیمی است که توسط بیشتر سلول‌های بدن، به ویژه فیبروبلاست‌ها، در پاسخ به عفونت ویروسی یا مواجهه با دیگر بیولوژیک‌ها، تولید می‌گردد و از این رو تحت عنوان ایتترفرون فیبروبلاستی نیز شناخته می‌شود (۱و۲). پروتئین ایتترفرون بتا از طریق اتصال به گیرنده خود در سطح سلول‌ها، منجر به فعال‌سازی ژن‌های متعدد شده و در نتیجه اثرات ضد ویروسی، ضد تکثیر و فعالیت‌های زیستی دیگر را در سلول‌های هدف القا می‌کند و بدین جهت از نظر درمانی مورد توجه ویژه

بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که ناحیه ۳'UTR *IFNβ* mRNA اثر مهاری بر روی ترجمه دارد (۱۶). هدف از طرح حاضر، تغییر ژن *IFNβ* می‌باشد به گونه‌ای که بازده ترجمه و هم‌چنین پایداری mRNA آن افزایش یابد. برای رسیدن به این هدف با توجه به نقش ARE در کاهش پایداری mRNA *IFNβ* و کارایی ترجمه، توالی هجده نوکلئوتیدی از این منطقه، با روش Megaprimer PCR حذف شد.

مواد و روش‌ها

وکتوری که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت وکتور pS-IFN Kozak بود. منشا اصلی این وکتور، پلاسمید pSVM dhfr بوده که یک وکتور قابل تکثیر در سلول‌های CHO dhfr⁻ می‌باشد. این وکتور حاوی قطعه‌ای از پلاسمید pBR322 است که ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و مبدا همانندسازی را دارا می‌باشد. وکتور pS-IFN Kozak با وارد کردن ژن *IFNβ* حاوی جهش نقطه‌ای در منطقه کزاک، در جایگاه *EcoRI* وکتور pSVM dhfr به دست آمد و در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق از سویه باکتریایی استاندارد *E. coli* XL1-Blue استفاده شد که نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین مقاوم می‌باشد. باکتری موردنظر از شرکت سینازن تهیه شد. برای کشت باکتری *E. coli*، از محیط LB استفاده شد که از شرکت Merck تهیه شد.



شکل ۱: وکتور pS-IFN Kozak

به منظور القای جهش هدفمند در ژن ایترفرون بتا، پرایمرهای ویژه با استفاده از نرم‌افزار Oligo (Version ۵) طراحی گردید و در واکنش Megaprimer PCR مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده به صورت زیر می‌باشد:

پرایمر F۱ با توالی ۳' TCA TTA ACA GAC TTA CAG GTT ACC TCC ۵'،

پرایمر R۱ با توالی ۳' CAA AAA TAA TTT ATT TTC CAA AAA AAT AAC TCA TAA ۵'.

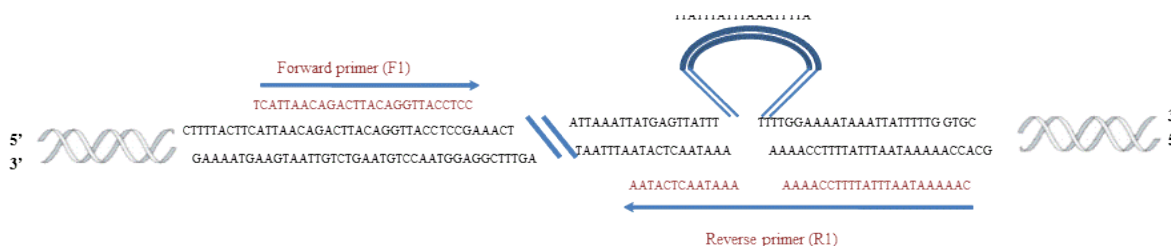
پرایمر R۲ با توالی ۳' AGC TGA ATT CTA ACT TTA TGA TGA GAG ۵'.

مصارف درمانی و در مقیاس تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. Extavia و Betaseron تحت نام کلی *IFNβ1b* در سلول‌های *E. coli* و Avonex و Rebif و همچنین Cinnovex (در ایران) تحت نام کلی *IFNβ1a* در رده سلولی CHO به تولید می‌رسد (۷۶). مشابه هر پروتئین درمانی دیگر، به دست آوردن مقادیر بالای *IFNβ* برای اهداف تجاری مهم می‌باشد.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که *IFNβ* mRNA ناپایدار است و به سرعت تجزیه می‌شود. پایداری بعد از رونویسی *IFNβ* mRNA متأثر از توالی غنی از آدنین و یوراسیل (ARE, Adenine uracil Rich Element) می‌باشد (۸). AREها، یک سری از عناصر توالی هستند که توانایی کنترل نیمه عمر یک mRNA را از طریق تحریک یا مهار تجزیه آن دارا می‌باشند (۹). این عناصر در نواحی ترجمه‌نشده انتهای ۳' (۳'UTR)، از شناخته شده‌ترین شاخص‌های ناپایداری mRNA می‌باشند. AREها هم‌چنین در کنترل ترجمه mRNA های خاص، شامل mRNA های پروتئین‌های مرتبط با رشد توموری و پروتئین‌های پیش‌التهابی نقش دارند و به عنوان توالی‌های مسئول مهار ترجمه هم معرفی می‌گردند (۱۰). AREها، توالی‌هایی با طول حدود ۱۵۰-۵۰ نوکلئوتید (۹) و متشکل از تعداد متغیری کپی از پتایمر AUUUA و نونامر یا UUAUUUAUU می‌باشند (۸) که بر اساس تعداد و انتشار پتایمر AUUUA، به سه گروه تقسیم می‌شوند (۱۱ و ۱۲).

تنوع توالی AREها، به آن‌ها این امکان را می‌دهد مجموعه‌ای از فاکتورهای ترانس را در اختیار بگیرند که تصور می‌شود در تنظیم پایداری mRNA و ترجمه، نقش دارند. تصور می‌شود که پروتئین‌های اتصال به ARE، قادر به برهمکنش با ماشین ترجمه می‌باشند و از این طریق ترجمه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۱ و ۱۰). هم‌چنین پروتئین‌های متصل شونده به ARE قادر به برهمکنش با کمپلکس چند پروتئینی به نام آگزوزوم بوده که قادر به تجزیه mRNA در جهت ۳' به ۵' می‌باشد (۱۳).

مشابه دیگر mRNA های با بیان موقت، *IFNβ* mRNA هم حاوی یک موتیف غنی از AU در ۳'UTR خود می‌باشد که مربوط به گروه IIAREها می‌باشد و در منطقه +۷۸۰ تا +۸۰۷ از ۳'UTR *IFNβ* mRNA قرار گرفته است. این توالی یکی از شاخص‌های ناپایداری *IFNβ* mRNA معرفی شد. بررسی توالی‌های دخیل در ناپایداری *IFNβ* mRNA، مشخص کرد که علاوه بر ناحیه ترجمه‌نشده انتهای ۳'، شاخص ناپایداری دیگری در ۵' کدون خاتمه ترجمه نیز وجود دارد. جز ناپایدارکننده دوم، تحت عنوان شاخص ناپایداری ناحیه کدکننده (CRID, Coding Region Instability Determinant) نامیده می‌شود و بین نوکلئوتیدهای ۵۲۵-۵۱۳ ناحیه کدکننده قرار گرفته است (۱۴ و ۱۵). حذف مستقل ARE یا CRID به تنهایی، منجر به پایداری ملایمی در mRNA می‌شود و جایگزینی هر دو عنصر با توالی‌های کنترل، به میزان زیادی نیمه عمر *IFNβ* mRNA را افزایش می‌دهد (۱۰). توالی AU حاضر در ۳'UTR *IFNβ* mRNA، نه تنها بر روی پایداری mRNA، بلکه بر روی قابلیت ترجمه آن نیز اثر دارد (۸).



شکل ۲: نحوه‌ی اتصال پرایمر حاوی جهش به منطقه مورد نظر در ژن *IFNβ*

میکرولیتر، DNA الگو (پلاسمید pS-IFN Kozak حاوی ژن جهش یافته *IFNβ* در منطقه کزاک و با غلظت ۱۵ng/μl) به حجم ۳ میکرولیتر، پرایمر R۲ به میزان ۲ میکرولیتر و مگا پرایمر با غلظت حدود ۸۹ پیکو مولار به حجم ۰/۵ میکرولیتر، مخلوط انواع dNTP ۱ میکرولیتر، MgSO₄ به حجم ۵ میکرولیتر، آنزیم پلیمرز Pfu به مقدار ۰/۲۵ میکرولیتر و آب مقطر به میزان ۱۰/۷۵ میکرولیتر می-باشد. با ترکیب مواد، واکنش PCR با برنامه تقلیب اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۰°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای طولی سازی ۷۲°C به مدت یک دقیقه، انجام شد و در پایان تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

محصول نهایی PCR حاوی جهش حذفی، در دو انتها حاوی جایگاه برش آنزیم‌های *EcoRI* و *BgIII* بود. لذا از روش هضم آنزیمی دوگانه برای برش دو انتهای این قطعه استفاده شد. از طرفی پلاسمید pS-IFN Kozak که وکتور کلونینگ این قطعه بود دارای دو جایگاه برش برای هر کدام از آنزیم‌های فوق بود (شکل ۱)، و بنابراین برای نادیده گرفته شدن یکی از جایگاه‌های برش هر کدام از آنزیم‌ها، از روش هضم دوگانه نسبی استفاده شد. آنزیم محدود کننده *EcoRI* و بافر همراه آن از شرکت MBI fermentas و آنزیم *BgIII* به همراه بافر از شرکت Metabion خریداری شد.

برای انجام هضم آنزیمی دوگانه بافر TangoTM مربوط به شرکت Fermentas MBI بعد از بررسی، به عنوان بافر مشترک انتخاب شد و از آنجایی که دمای عملکرد هر دو آنزیم مشابه بود، هضم آنزیمی دوگانه همزمان انجام شد. مدت انجام واکنش ۳ ساعت بود و مواد به نسبت زیر مورد استفاده قرار گرفتند: بافر ۲X TangoTM به مقدار ۲ میکرولیتر، آنزیم‌های محدود کننده *EcoRI* و *BgIII* با غلظت ۱۰ u/μl به میزان ۱ میکرولیتر، نمونه DNA (محصول PCR یا پلاسمید) ۰/۵ تا ۱ میکروگرم و آب تا حجم ۲۰ میکرولیتر.

همان طور که ذکر شد هضم آنزیمی پلاسمید باید به صورت نسبی انجام می‌گرفت تا فقط یکی از جایگاه‌های برش هر کدام از آنزیم‌ها برش پیدا کند. بدین منظور علاوه بر کاهش زمان انکوباسیون، از غلظت کاهش یافته آنزیم نیز استفاده شد. ترکیب این عوامل شرایطی را فراهم کرد که دسترسی آنزیم‌ها به هر دو جایگاه برش محدود شد. در نتیجه عملکرد متفاوت هر آنزیم بر روی پلاسمیدهای موجود در محلول واکنش، انواع قطعات با

این واکنش نیازمند ۳ پرایمر است که طی دو مرحله واکنش PCR مورد استفاده قرار می‌گیرند. محصول نهایی که دارای یک حذف ۱۸ نوکلئوتیدی می‌باشد باید جایگزین همین قطعه فاقد حذف در وکتور شود که در دو انتها دارای جایگاه‌های برش *EcoRI* و *BgIII* است. پرایمر F۱ بالادست جایگاه برش *EcoRI* و پرایمر R۱، که حاوی جهش بود در دو طرف منطقه مورد نظر برای حذف، طراحی شد. محصول مرحله اول به طول ۲۰۶ نوکلئوتید به عنوان Megaprimer به همراه پرایمر R۲ برای مرحله دوم PCR مورد استفاده قرار گرفت. در طراحی پرایمر R۲ با ایجاد یک تغییر نوکلئوتیدی جایگاه برش *EcoRI* ایجاد شد.

تکنیک تکنیک PCR Megaprimer یکی از روش‌های ایجاد جهش هدفدار (Site directed mutagenesis) می‌باشد که نخستین بار توسط Sarkar و Sommer توصیف و استفاده شد. این تکنیک جهش‌زایی با استفاده از سه پرایمر و در طی دو مرحله PCR صورت می‌گیرد (۱۷). در این روش یکی از پرایمرها حاوی جهش می‌باشد. نخستین واکنش PCR با استفاده از پرایمر حاوی جهش و یکی از پرایمرهای بیرونی صورت می‌گیرد. محصول دورشته‌ای خالص‌سازی شده و به عنوان پرایمر (مگا پرایمر) در PCR دوم به همراه پرایمر بیرونی دیگر استفاده می‌شود (۱۸ و ۱۹).

در این تحقیق، مرحله اول واکنش PCR Megaprimer برای به دست آوردن قطعه ابتدایی ژن حاوی حذف ۱۸ نوکلئوتیدی، با استفاده از پرایمر R۱ و F۱ و با ترکیب مواد شامل بافر PCR فاقد MgSO₄ به حجم ۲/۵ میکرولیتر، DNA الگو (پلاسمید pS-IFN Kozak، حاوی ژن جهش یافته *IFNβ* در منطقه کزاک و با غلظت ۱۵ng/μl) به حجم ۳ میکرولیتر، پرایمرهای R۱ و F۱ (با غلظت ۲۰ پیکومولار) هر کدام به حجم ۱/۵ میکرولیتر، مخلوط انواع dNTP ۰/۷۵ میکرولیتر، MgSO₄ به حجم ۴ میکرولیتر، آنزیم پلیمرز Pfu به مقدار ۰/۲۵ میکرولیتر و آب مقطر به میزان ۱۰/۵ میکرولیتر و طبق برنامه زیر صورت گرفت:

تقلیب اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۷ دقیقه، و سپس ۱۵ سیکل با دمای تقلیب ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای طولی سازی ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه.

مرحله دوم واکنش، نیاز به محصول PCR مرحله اول به عنوان مگا پرایمر داشت که بعد از استخراج از ژل و تعیین غلظت مورد استفاده قرار گرفت. طول مگا پرایمر ۲۰۶ نوکلئوتید بود. مواد مورد استفاده در این مرحله شامل بافر PCR فاقد MgSO₄ به حجم ۲/۵

صورتی که به رشد معادل ۸۰-۵۰٪ رسیده باشند می‌توان ترانسفکشن را انجام داد به این منظور، به ازای هر خانه از پلیت ۱۰۰ محیط فاقد سرم برداشته (برای ترانسفکشن ۱۲ خانه از پلیت به ۱۲۰۰ μl محیط فاقد سرم نیاز است) و ۵۰۰ ng از DNA پلاسمیدی به ازای هر خانه از پلیت افزوده شد. سپس ۱۲ μl از بافر PLUSTM Reagent (۱ μl به ازای هر خانه) به مخلوط DNA پلاسمیدی+محیط فاقد سرم اضافه شد. مخلوط DNA پلاسمیدی+ محیط فاقد سرم+ بافر PLUSTM Reagent به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داد شد. در این مرحله، به مخلوط فوق ۳۰ μl از Lipofectamine® LTX (۲/۵ μl به ازای هر خانه) اضافه شد و مخلوط نهایی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در مرحله آخر، ۱۰۰ μl از مخلوط نهایی به هر خانه از پلیت اضافه شد. با چند بار عقب و جلو کردن پلیت مخلوط حاصل در هر خانه از پلیت مخلوط گردید. پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ و رطوبت ۹۵٪ نگهداری شد.

یافته‌ها

اولین مرحله از واکنش Megaprimer PCR با استفاده از پرایمرهای F1 و R1 صورت گرفت. قطعه حاصل به طول ۲۰۶ نوکلئوتید در منطقه ۳'UTR ARE حاوی حذف ۱۸ نوکلئوتیدی بود. محصول این مرحله بعد از استخراج از ژل، به عنوان پرایمر به همراه R2 برای تکثیر قطعه‌های ۵۵۰ جفت بازی از انتهای ژن *IFNβ* مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۳).

پلاسمید pS-IFN Kozak بعد از هضم نسبی بر روی ژل ۵٪ برده شد. با توجه به اندازه قطعات، قطعه پلاسمید مورد نظر با انتخاب و با استفاده از کیت از ژل استخراج شد.

محصول واکنش Megaprimer PCR بعد از هضم آنزیمی دوگانه برای الحاق به قطعه حاصل از هضم آنزیمی دوگانه نسبی وکتور pS-IFN Kozak مورد استفاده قرار گرفت. محصول این مرحله وکتور حاوی ژن *IFNβ* بود که در نقطه کزاک حاوی دو جهش نقطه‌ای و در منطقه ۳'UTR ARE حاوی یک جهش حذفی ۱۸ نوکلئوتیدی بود. وکتور حاصل pS-IFNΔARE نام گرفت. سلول‌های مستعد *E. coli* به روش گفته شده آماده شدند. وکتور نو ترکیب حاصل از مرحله الحاق برای ترانسفورماسیون به داخل سلول‌های مستعد *E. coli* مورد استفاده قرار گرفت. باکتری‌ها بعد از اتمام فرایند ترانسفورماسیون بر روی محیط انتخابی LBA حاوی آمپی‌سیلین و تتراسایکلین کشت داده شدند. تنها باکتری‌های ترانسفورم شده که حامل وکتور بودند قادر به رشد بر روی این محیط بودند. پلیت حاوی باکتری‌ها به مدت ۱ شبانه روز در دمای ۳۷ °C انکوبه شد تا باکتری‌های ترانسفورم شده رشد کنند.

اندازه‌های مختلف به دست آمد که جداسازی قطعه مورد نظر از با استفاده از کیت استخراج از ژل Qiagen استفاده شد. مواد لازم برای انجام هضم آنزیمی دوگانه نسبی مانند واکنش قبل بود، با این تفاوت که از آنزیم‌ها به مقدار ۰/۲ میکرولیتر استفاده شد و واکنش در زمان ۱۰ دقیقه صورت گرفت.

برای انجام تکنیک الحاق از آنزیم T4 DNA Ligase استفاده شد که به همراه بافر مربوطه از شرکت MBI Fermentas خریداری شد. به همراه ویال در حدود ۲۰۰-۱۰۰ نانوگرم از وکتور، مقدار ۸۰ نانوگرم از قطعه ورودی، ۲ μl بافر ۱۰X و ۱ μl آنزیم لیگاز اضافه شد و حجم نهایی محلول با اضافه کردن آب مقطر دوبار استریل به ۲۰ μl رسانده شد. سپس ویال‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴°C قرار داده شد تا عمل الحاق وکتور و قطعه ورودی توسط آنزیم لیگاز کامل شود.

جهت تهیه سلول‌های مستعد *E. coli* برای انجام ترانسفورماسیون از روش کلرید کلسیم استفاده شد و سپس با روش شوک حرارتی ترانسفورماسیون انجام گرفت.

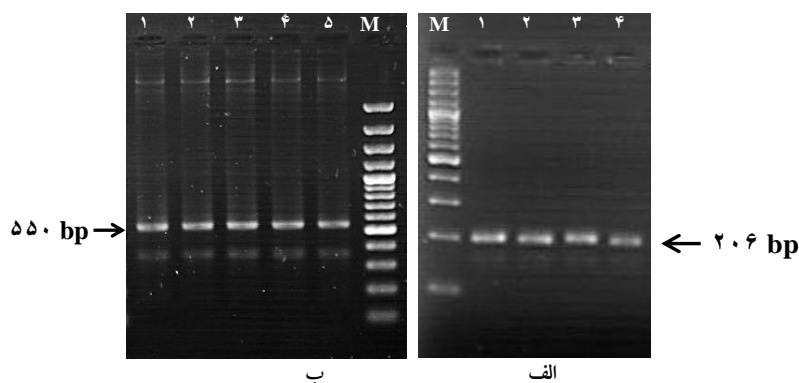
استخراج پلاسمید: استخراج DNA پلاسمیدی از باکتری‌های ترانسفورم شده *E. coli* با روش جوشاندن هلمز-کویجلی صورت گرفت.

برای ترانسفکت کردن پلاسمیدها به رده سلولی CHO *dhfr* استخراج پلاسمید با استفاده از کیت فرمتاز صورت گرفت. پلاسمیدهای استخراج گردیده با استفاده از کیت فرمتاز که فاقد هر گونه آلودگی احتمالی به RNA و پروتئین می‌باشند به منظور ترانسفکت نمودن به رده سلولی CHO مورد استفاده قرار گرفت.

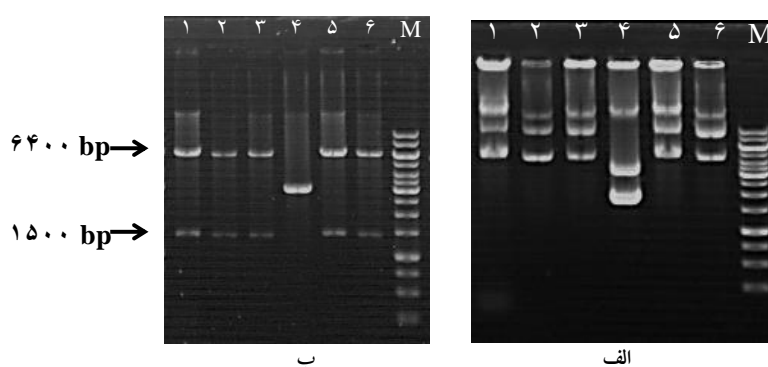
رده سلولی (CHO *dhfr* NCBI Code: C590) تهیه شده از انستیتو پاستور مورد استفاده قرار گرفت. این رده سلولی فاقد ژن دی‌هیدروفولات ردوکتاز می‌باشد. به منظور کشت سلول‌های CHO *dhfr* از محیط DMEM, High Glucose, GlutaMAX شرکت Gibco استفاده شد. با توجه به فقدان ژن دی‌هیدروفولات ردوکتاز در رده سلولی مورد استفاده ترکیبات تکمیلی شامل هیپوگزانتین، تیمیدین و متوتروکسات خریداری شده از شرکت Gibco به محیط DMEM اضافه گردید. با توجه به پروتکل پیشنهادی انستیتو پاستور مقادیر مناسب از مواد، ترکیب شد تا محیط کامل و غنی ساخته شود. ترکیب مواد به شرح زیر است.

DMEM, High Glucose, GlutaMAX + ۰/۱ mM
hypoxanthine, ۰/۰۱۶ mM thymidine
۰/۰۰۲ mM Methotrexate+۱۰% FBS+P/S ۱%

به منظور ترانسفکت نمودن پلاسمید نو ترکیب کیت لیپوفکتامین خریداری شده از شرکت Invitrogen حاوی دو ترکیب Lipofectamine® LTX و PLUSTM Reagent مورد استفاده قرار گرفت. در این مرحله، محیط کشت فاقد سرم و پلاسمید نو ترکیب استخراج شده با استفاده از کیت شرکت فرمتاز نیاز است. پس از مشاهده سلول‌ها و بررسی میزان رشد آن‌ها، در



شکل ۳: الف: ستون ۱ تا ۴ محصول مرحله اول واکنش Megaprimer PCR به طول ۲۰۶ نوکلئوتید. M: مارکر DNAbp ۱۰۰. ب: ستون ۱ تا ۵ محصول مرحله دوم واکنش با طول ۵۵۰ نوکلئوتید. M: مارکر DNAbp ۱.



شکل ۴: الف: وکتورهای نوترکیب استخراج شده از باکتری *E. coli*، اندازه متفاوت وکتورهای نوترکیب در عکس ژل مشخص است. ب: هضم آنزیمی وکتورهای نوترکیب با آنزیم *EcoRI* طبق انتظار دو قطعه ۱۵۰۰ و ۶۴۰۰ جفت بازی حاصل شد. ستون ۴ محصول مورد نظر ما نیست و حذف شد M: مارکر DNAbp ۱.

حضور باندهایی با اندازه‌های مورد نظر بر روی ژل ۱٪ سبب تأیید پلاسمیدها به منظور ترانسفکشن گردید. سلول‌های *CHO dhfr⁻* مورد استفاده قرار گرفت. این سلول‌ها به صورت دوکی شکل و چسبنده بوده و در شرایط مناسب کشت داده شده و پاساژهای متعدد صورت گرفت. استوک‌های مناسب از سلول‌ها تهیه شده و در نیتروژن مایع نگهداری گردید. سلول‌های آماده با شرایط 500 ng DNA پلاسمیدی، $1 \mu\text{l}$ محلول Plus و $2/5 \mu\text{l}$ محلول لیپوفکتامین ترانسفکت گردیدند. لازم به ذکر است در ادامه روند تحقیقات بیان ژن نوترکیب با استفاده از روش *Real Time PCR* و تولید پروتئین با استفاده از روش *ELISA* مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

بحث

$IFN\beta$ انسانی، متعلق به گروه یک ایتترفرون‌ها، یک گلیکوپروتئین تنظیمی می‌باشد که توسط بیشتر سلول‌های بدن، به ویژه فیروبلاست‌ها، در پاسخ به عفونت ویروسی یا مواجهه با دیگر عوامل بیولوژیک تولید می‌شود. $IFN\beta$ از طریق اتصال به گیرنده خود در سطح سلول، منجر به فعال‌سازی یک سری از ژن‌ها می‌شود که در نهایت باعث ایجاد اثرات ضدویروسی، ضد تکثیر و بسیاری فعالیت‌های دیگر در سلول شده و بدین سبب از نظر درمانی مورد توجه ویژه می‌باشد (۳و۵). امروزه $IFN\beta$

بعد از انجام ترانسفورماسیون، باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط انتخابی به محیط کشت مایع LB حاوی آمپی سیلین انتقال داده شدند تا استخراج پلاسمید انجام شود. استخراج پلاسمید با استفاده از روش هولمز-کویجلی صورت گرفت. پلاسمیدهای استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۷٪ برده شد. پلاسمیدهای نوترکیب حاوی حذف در منطقه $3' \text{ UTR ARE}$ بعد از استخراج، در اندازه‌های مختلفی دیده شدند (شکل ۳). اندازه پلاسمید مورد نظر ما حدود ۷۸۰۰ جفت باز بود. وجود پلاسمیدهای نوترکیب با اندازه‌های متفاوت به دلیل جدا نشدن دقیق قطعات پلاسمیدی حاصل از هضم آنزیمی نسبی، بر روی ژل بود. بدین معنا که طی فرایند استخراج از ژل، قطعاتی با اندازه‌های غیر دلخواه نیز با باند مورد نظر ما جداسازی و طی تکنیک الحاق منجر به ایجاد این محصولات شده بود. برای تأیید کلونینگ ژن جهش یافته $IFN\beta$ انسانی به داخل وکتورهای مورد نظر بعد از استخراج پلاسمید، *PCR* با پرایمرهای مربوطه و هم‌چنین واکنش‌های هضم آنزیمی انجام گرفت. با توجه به اندازه قطعات حاصل، پلاسمید مناسب و صحیح برای مراحل بعدی انتخاب شد. شکل (۴) هضم آنزیمی وکتور نوترکیب و قطعات حاصل را نشان می‌دهد.

پلاسمیدهای مورد نظر در مرحله بعدی به منظور ترانسفکت نمودن در سلول‌های یوکاریوتی با استفاده از کیت فرمتاز استخراج گردیده و به منظور تأیید نهایی هضم آنزیمی مجدداً انجام شد.

mRNAهای مختلف، منجر به کاهش زیادی در قابلیت ترجمه می شود (۲۴ و ۲۵). آنها همچنین نشان دادند که مهار ترجمه همانند پایداری mRNA، با افزایش تعداد کپی موتیف های غنی از AU حاضر در انتهای ۳' mRNA افزایش می یابد (۱۶ و ۲۶). تنوع توالی AREها به آنها این امکان را می دهد که مجموعه ای از فاکتورهای ترانس را در خدمت بگیرند که تصور می شود با دم پلی A و ماشین ترجمه برهمکنش دارند (۱۰ و ۱۱). همچنین پروتئین های متصل شونده به ARE قادر به برهمکنش با کمپلکس چند پروتئینی به نام آگزوزوم بوده که باعث تجزیه mRNA در جهت ۳' به ۵' می گردد. مطالعات بر روی اتصالات بین ARE و پروتئین های اتصال به آن نشان می دهد که این پروتئین ها علاوه بر اتصال به توالی ARE مرکزی، قادر به شناسایی نواحی مجاور نیز می باشد. در واقع کنفیگوراسیون ARE تعیین کننده دسترسی آن به فاکتورهای عمل کننده ترانس می باشد (۱۳).

نتیجه گیری

پروتئین *IFNβ* نوترکیب با نام تجاری Cinnovex در داخل کشور تولید می شود. قیمت بالای دارو از جمله عواملی است که برای برخی بیماران مشکل ساز می باشد. به همین جهت یافتن راهی برای افزایش بازدهی و کاهش قیمت تولید دارو می تواند بسیار ارزشمند باشد. تحقیق حاضر با بررسی مقالات و تحقیقات معتبر راهکاری جهت افزایش بهره وری و سطح تولید ارائه می دهد که امید است مفید واقع شود.

در این تحقیق با توجه به اهمیت نقش توالی های غنی از AU در کاهش سطح ترجمه و نیز ناپایداری *IFNβ* mRNA، ناحیه ای ۱۸ نوکلئوتیدی از این منطقه حذف شد. این منطقه ۱۸ نوکلئوتیدی حاوی موتیفی می باشد که مشخصه AREهای نوع II می باشد. مطالعات انجام شده نشان می دهد که تعداد موتیف های نونامری حاضر در منطقه ARE، بر پایداری mRNA و نیز میزان ترجمه اثر دارد. از طرفی بررسی هایی که توسط نرم افزار آنلاین mfold صورت گرفت نشان داد که حذف این منطقه بر کنفیگوراسیون ناحیه ARE اثر گذاشته و ساختار آن را به هم می ریزد. این تغییر احتمالاً بر شناسایی این منطقه توسط پروتئین های اتصال یابنده به ARE تاثیر گذاشته و می تواند سطح ترجمه و نیز پایداری mRNA را تحت تاثیر قرار دهد و میزان تولید پروتئین را بالا ببرد. تاثیر این جهش حذفی در روند ترجمه و پایداری mRNA در آینده با روش های Real time PCR و ELISA مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

نوترکیب در مقیاس تجاری در سلول های *E. coli* و رده سلولی CHO تولید می شود و محصولات آن به ترتیب تحت عنوان *IFNβ1b* (Extavia و Betaseron) و *IFNβ1a* (Avonex و Rebif) و داروی Cinnovex تولید شده در ایران نامیده می شود و در درمان بیماری های ویروسی، رشد های توموری و سرطان و همچنین بیماری MS مورد استفاده قرار می گیرد (۷). بدین منظور تولید مقادیر بالای این پروتئین جهت مصارف درمانی همواره مد نظر قرار داشته است.

اما نکته حائز اهمیت این است که *IFNβ* همانند mRNA بسیاری از سایتوکاین ها و پروتئین های، به سرعت در سلول های یوکاریوتی تجزیه می شود و نیمه عمر آن کاملاً کوتاه می باشد. یکی از عناصر توالی که در کوتاهی نیمه عمر *IFNβ* mRNA تاثیرگذار است توالی غنی از AU می باشد که در ۳' UTR *IFNβ* mRNA قرار گرفته است (۸).

نخستین نمونه عملکردی از تجزیه mRNA وابسته به ARE، در نتیجه بررسی های صورت گرفته توسط Shaw و Kamen به دست آمد. آن ها نشان دادند که یک توالی ۵۱ نوکلئوتیدی غنی از AU در ۳' UTR mRNA فاکتور تحریک کننده کلونی ماکروفاژ گرانولوسیتی (GM-CSF) به عنوان توالی یک عمل کننده سیس، در ناپایداری mRNA مربوطه نقش دارد. وارد کردن ARE GM-CSF به داخل ۳' UTR *IFNβ* mRNA، نیمه عمر این mRNA را از ۱۷ ساعت به کمتر از ۳۰ دقیقه کاهش می دهد (۲۰ و ۲۱). Barreue و همکاران از طریق ایجاد جهش در موتیف *GM-CSF* UUAUUUAUUARE، نشان دادند که دادنیلاسیون و تجزیه mRNA حاوی دو یا چهار کپی نونامری، موثرتر از دادنیلاسیون mRNA حاوی یک کپی منفرد پیش می رود (۲۱). در بررسی دیگر که توسط Zubiaga و همکاران انجام گرفت مشخص شد که حذف یکی از ریشه های U از انتهای موتیف UUAUUUAUU، باعث کاهش قدرت این توالی و کاهش چشمگیر در فعالیت ناپایداری کننده mRNA می شود (۲۲).

ARE موجود در ۳' UTR mRNAهایی از قبیل mRNAهای c-fos، *IFNα*، همانند *IFNβ* mRNA، نه تنها بر روی پایداری، بلکه بر روی قابلیت ترجمه آن ها نیز اثر مهاری دارد (۲۳). حذف این منطقه از انتهای این mRNAها، اثر مهار ترجمه را معکوس می کند (۸).

Kruys و همکاران با بررسی اثر توالی های غنی از AU در مولکول های مختلف mRNA، بیان کردند که حذف توالی غنی از AU از mRNA سطح ترجمه از مولکول را به شدت بالا می برد. از طرف دیگر اضافه کردن ۳' UTR *IFNβ* mRNA به انتهای ۳'

References

- Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferon's: cell signaling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2000; **81**(10): 2341-2364.
- Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: interplay between induction, signaling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2008; **89**(Pt 1): 1-47.
- McCormick FP, Innis MA, Ringold GM. Human interferon β (IFN- β) produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells. US 5795779. 1998; Available from: <http://www.freepatentsonline.com/5795779.pdf>.

4. Dorin G, McAlary PJ, Wong KM. Production of Interferon- β (IFN- β) in E.coli. US 5814485. 1998; Available from: <http://www.freepatentsonline.com/5814485.pdf>.
5. Bentzien J, Inc X. Recombinant interferon-beta mutinies. US 6514729. 2003; Available from <http://www.freepatentsonline.com/6514729.pdf>.
6. Mark DF, Lin LS, Yu Lu SD. Structural genes, plasmids and transformed cells for producing Cysteine depleted muteins of Interferon- β . US 4737462. 1988; Available from: <http://www.Freepatentsonline.com/4737462.pdf>.
7. Runkel L, Meier W, Pepinsky RB, Karpusas M, Whitty A, Kimball K, et al. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human Interferon-beta(IFN-beta). *Pharm Res*1998; **15**(4): 641-649.
8. Raj NB, Pitha PM. 65-kDa protein binds to destabilizing sequences in the IFN-beta mRNA coding and 3' UTR. *FASEB J* 1993; **7**(8): 702-710.
9. Peppel K, Baglioni C. Deadenylation and turnover of interferon-beta mRNA. *J Biol Chem* 1991; **266**(11): 6663-6666.
10. Pasté M, Huez G, Kruys V. Deadenylation of interferon-beta mRNA is mediated by both the AU-rich element in the 3'-untranslated region and an instability sequence in the coding region. *Eur J Biochem* 2003; **270**(7): 1590-1597.
11. Espel E. The role of the AU-rich elements of mRNAs in controlling translation. *Sem Cell Devel Biol* 2005; **16**(1): 59-67.
12. Zhang T, Kruys V, Huez G, Gueydan C. AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of trans-activating factors. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**(Pt 6): 952-958.
13. Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Rajmakers R, Pruijn GJ, et.al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 2001; **107**(4): 451-464.
14. Whittemore L, Maniatis T. Postinduction turnoff of beta-interferon gene expression. *Mol Cell Biol* 1990; **10**(4): 1329-1337.
15. Whittemore L, Maniatis T. Postinduction repression of the beta-interferon gene is mediated through two positive regulatory domains. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990; **87**(20): 7799-7803.
16. Kruys V, Marinx O, Shaw G, Deschamps J, Huez G. Translational blockade imposed by cytokine-derived UA-rich sequences. *Science* 1989; **245**(4920): 852-255.
17. Sarkar G, Sommer SS. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Bio techniques* 1990; **8**(4): 404-407.
18. Kanoksilapatham W, Gonzalez JM, Robb FT. Directed-Mutagenesis and Deletion Generated through an Improved Overlapping-Extension PCR Based Procedure. *Silpakorn U Science & Tech J* 2007; **1**(2): 7-12.
19. Söderberg M, Lang MA. Megaprimer-based methodology for deletion of a large fragment within a repetitive polypyrimidine -rich DNA. *Mol Biotechnol* 2006; **32**(1): 65-71.
20. Winstall E, Gamache M, Raymond V. Rapid mRNA Degradation Mediated by the *c-fos*3' AU-Rich Element and That Mediated by the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor 3' AU-Rich Element Occur through Similar Polysome-Associated Mechanisms. *Mol Cell Biol*1995; **15**(7): 3796-3804.
21. Barreau C, Paillard L, Osborne H. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 2005; **33**(22): 7138-7150
22. Zubiaga A, Belasco J, Greenberg M. The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol Cell Biol* 1995; **15**(4): 2219-2230.
23. Khabar K, Young H. Post-Transcriptional Control of the Interferon System. *Biochim* 2007; **89**(6-7): 761-769.
24. Grafi G, Sela I, Galili G. Translational regulation of human beta interferon mRNA: association of the 3' AU-rich sequence with the poly (A) tail reduces translation efficiency in vitro. *Mol Cell Biol* 1993; **13**(6): 3487-3493.
25. Kruys V, Beutler B, Huez G. Translational control mediated by UA-rich sequences. *Enzyme* 1990; **44**(1-4): 193-202.
26. Kruys V, Wathelet M, Poupart, Huez G. The 3' untranslated region of the human interferon-beta mRNA has an inhibitory effect on translation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1987; **84**(17): 6030-6034.