Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):1-8

Production of Recombinant HEK293T with miR-1 Overexpression as a Biological Model for Cardiac Studies

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Rasekhi M.[1] *MSc*,
Bakhshande B.* *PhD*,
Sadeghizadeh M.[2] *PhD*,
Salimi A.[3] *PhD*,
Soleimani M.[4] *PhD*

How to cite this article
Rasekhi M, Bakhshande B, Sadeghizadeh M, Salimi A, Soleimani M. Production of Recombinant HEK293T with miR-1 Overexpression as a Biological Model for Cardiac Studies. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):1-8.

*Biotechnology Department, Science Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran
[1]National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, Iran
[2]Genetic Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4]Hematology Departmen, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Biotechnology Department, No. 13, Shafiee Alley, Qods Sreet, Enqelab Sq., Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 66491622
Fax: +98 (21) 61113835
b.bakhshandeh@ut.ac.ir

Article History
Received: March 10, 2015
Accepted: February 5, 2017
ePublished: March 20, 2018

ABSTRACT

Aims The induction of artificial over-expression of miRNAs is an appropriate approach to more effective cell differentiation. The significant role of microRNA-1(miR-1) has been reported in the development and differentiation of cardiac cells. Lentivirus is an effective vector for stable cell line production. The aim of this study was the production of recombinant HEK293T with miR-1 overexpression as a biological model for cardiac studies.

Materials & Methods In this experimental study, HEK 293T cells were cultured in DMEM medium with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and L-glutamine 2mM and Penicillin-Streptomycin 1X in incubator medium. After cloning of miR-1 gene, recombinant clones were selected and the recombination was confirmed by sequencing. The miR-1 carrying vector and auxiliary vectors were packaged in the HEK293T to produce the recombinant virus. The infection of HEK293T by recombinant virus was performed in order to achieve stable cell line. Then, GFP fluorescent marker evaluated the efficiency of transfection and effective virus dilution. Finally, the alteration in expression level of miR-1 was assessed by qPCR. Data analysis was performed by comparing the threshold cycle and Pfaffl method.

Findings The most GFP expression was detected in transfected cells by 150 micromole dilution. GFP fluorescent marker facilitated optimization and purification of recombinant cells. qPCR investigation demonstrated the significant increase in expression of miR-1 in transfected cells in comparison to controls.

Conclusion The stable recombinant HEK293T miR-1 over-expressing cell line in lentivirus can be utilized as a suitable biological model for investigation of cardiac evolution and development processes.

Keywords MicroRNA-1; HEK293 Cells; Cell Differentiation; Viral Cell Transformation; Biological Model

CITATION LINKS

[1] MicroRNAs in cardiovascular health: From order ... [2] Developing microRNA therapeutics: Approaching the unique ... [3] Computational prediction of microRNA ... [4] Experimental strategies for microRNA ... [5] Circulating microRNAs: Novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular ... [6] MicroRNAs in the pathogenesis of ... [7] Comparison of miR-24, miR-106 ... [8] MicroRNA signature associated with osteogenic ... [9] A microRNA signature associated with ... [10] Down-regulation of miRNA-221 triggers ... [11] The roles of microRNAs in heart diseases ... [12] and ischemic heart disease: Towards a better comprehension of pathogenesis, new diagnostic tools and new therapeutic ... [13] MicroRNAs in cardiomyocyte ... [14] MicroRNA-1 in cardiac diseases and ... [15] The role of microRNA-1 and microRNA-133 ... [16] MicroRNA-mediated in in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to ... [17] Induction of tolerogenic murine dendritic cells by downregulating the ... [18] Dysregulation of cardiogenesis, cardiac ... [19] MiR-17-92 cluster: An apoptosis ... [20] Anomalous megakaryocytopoiesis in mice with mutations in the ... [21] The role of small molecules in musculoskeletal ... [22] Effective combination of hydrostatic pressure and aligned nanofibrous scaffolds on human bladder smooth muscle cells: Implication for bladder tissue ... [23] A review of cellularization strategies for tissue engineering of ... [24] A comparative study on nonviral genetic modifications in cord blood and bone marrow mesenchymal stem ... [25] When less becomes more: Optimization of protein expression in HEK293-EBNA1 cells using plasmid titration - a case study ... [26] MiR-1-mediated induction of cardiogenesis in mesenchymal stem cells via downregulation ... [27] The effect of recombinant lentiviral vector encoding miR-145 on human esophageal cancer ... [28] Generation of functional cardiomyocytes from mouse induced pluripotent ... [29] Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem ...

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

تولید رده نوترکیب HEK293T با بیش- بیانی پایدار miR-1 به‌عنوان مدل زیستی برای مطالعات قلبی

مهسا راسخی MSc
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
بهناز بخشنده* PhD
گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
مجید صادقی‌زاده PhD
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
علی سلیمی PhD
مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله(عج)، تهران، ایران
مسعود سلیمانی PhD
گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: القای مصنوعی بیش- بیان miRNA راهکار مناسبی برای القای موثرتر تمایز سلولی است. نقش موثر miR-1 در تکوین و تمایز سلول‌های قلبی گزارش شده است. لنتی‌ویروس یک ناقل کارآمد برای تهیه رده‌های سلولی پایدار است. هدف پژوهش حاضر تولید رده سلولی با بیش- بیان پایدار miR-1 برای ایجاد یک مدل زیستی برای مطالعات قلبی بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، سلول‌های HEK 293T در محیط کشت DMEM به‌همراه سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰% و ال- گلوتامین ۲میلی‌مولار و پنی‌سیلین- استرپتومایسین 1X در محیط انکوباتور کشت داده شدند. پس از کلون‌کردن ژن miR-1، کلون‌های نوترکیب انتخاب شدند و حضور قطعه ژنی در وکتور نوترکیب با توالی‌یابی تایید شد. وکتور حامل miR-1 به‌همراه وکتورهای کمکی در سلول HEK293T به‌صورت ویروس نوترکیب بسته‌بندی شد. ترآلایی سلول‌های HEK293T با ویروس نوترکیب برای تولید رده پایدار انجام شد. سپس کارآیی ترآلایی و رقت موثر ویروس با نشانگر GFP سنجش شد. تغییرات بیان miR-1 با روش qPCR بررسی شد. تحلیل داده‌ها از طریق بررسی مقایسه‌ای چرخه آستانه و روش Pfaffl انجام گرفت.

یافته‌ها: بیشترین میزان بیان GFP مربوط به سلول‌های آلوده‌شده با رقت ۱۵۰میکرومولار بود. نشانگر فلورسنت GFP موجب تسهیل فرآیند بهینه‌سازی و تخلیص سلول‌های نوترکیب شد. در ارزیابی qPCR، بیان miR-1 در سلول‌های ترآلایی شده در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت.

نتیجه‌گیری: رده سلولی پایدار نوترکیب HEK293T بیش- بیان‌کننده miR-1 در لنتی‌ویروس، به‌عنوان مدل زیستی مناسب برای بررسی فرآیندهای تکامل و تکوین قلب است.

کلیدواژه‌ها: microRNA-1، سلول‌های HEK293T، تمایز سلولی، ترآلایی ویروسی سلول، مدل زیستی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۷

*نویسنده مسئول: b.bakhshandeh@ut.ac.ir

مقدمه

میکروRNAها (miRs)، دسته‌ای از RNAهای تنظیمی با طول تقریبی ۲۲نوکلئوتید هستند که بیان ژن را از طریق تخریب رونوشت ژن هدف یا مهار ترجمه کنترل می‌کنند[1, 2]. امروزه بیش از ۱۵۰۰ مولکول miR در پایگاه داده‌های miRBase ثبت شده است. پیش‌بینی‌های رایانه‌ای مولکول‌های هدف miR ادعا می‌کنند که بیش از ۳۰% ژن‌های کدکننده پروتئین در انسان احتمالاً توسط مولکول‌های miR تنظیم و کنترل می‌شوند که این امر miRها را به یک گروه مهم تنظیم‌کننده‌های پس از رونویسی تبدیل می‌کند[3]. به این منظور miRها معمولاً از طریق بخش‌های نوکلئوتیدی ۷ یا ۸تایی که توالی seed نامیده می‌شود، با ناحیه غیرترجمه‌ای انتهایی (3´UTR) یک یا چند mRNA مکمل می‌شوند. بنابراین برش توسط مجموعه ریبونوکلئوپروتئینی miRNP به ناحیه کدکننده mRNA آسیب نمی‌زند، اما در فرآیند شروع ترجمه تداخل ایجاد می‌کند و سبب خاموشی ژن هدف می‌شود[4, 5]. شواهد متعددی نیز وجود داشته است که miRها در رخدادهای مولکولی دیگری مانند تنظیم تکوین و هومئوستاز بافت و همچنین در روندهای حیاتی سلول مانند تکثیر، پیری سلولی، آپوپتوز و تمایز نقش دارند[6, 7]. با توجه به اینکه miRها به‌عنوان کلیدهای تنظیمی در تمایز به رده‌های مختلف سلولی شناخته شده‌اند، به نظر می‌رسد القای مصنوعی بیش- بیان miRها در سلول‌ها با هدف کنترل بیان mRNAهای خاص، یک راهکار مناسب برای القای سلول‌های ترمیم‌کننده بافت‌های آسیب‌دیده باشد[8-10].

مطالعات انجام‌شده نشان داده‌اند که microRNA-1 (mir-1) نقش موثری در تکوین و تمایز سلول‌های قلبی دارد و علاوه بر فیزیولوژی قلب، در پاتولوژی و اختلالات عملکردی اندام قلب نیز به نقش این miR تنظیمی اشاره شده است[11-14]. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که بیان mir-1 در سلول‌های قلبی بالاست و این miR در تکوین هایپرتروفی قلبی نقش دارد[3]. این miR بسیار حفاظت‌شده با هدف‌قراردادن هیستون‌دیسیتیلاز ۴ (HDAC4) که یک ممانعت‌کننده بیان ژن‌های ماهیچه‌ای است، به ماهیچه‌زایی در عضله قلبی کمک می‌کند[15]. یک گروه تحقیقاتی با استفاده از افزایش بیانmir-1 و چند miR دیگر با روش ترآلایی لنتی‌ویروسی، توانسته‌اند فیبروبلاست‌های قلبی را به سلول‌های ماهیچه‌ای قلب تغییر داده و برنامه سلولی آنها را بازآرایی کنند[16]. لنتی‌ویروس‌ها از مزایای برجسته‌ای نسبت به ویروس‌های دیگر در انتقال پایدار ژن‌ها برخوردارند. این مزایا سبب شده است تا از لنتی‌ویروس‌ها به‌عنوان ناقلان ژن برتر برای مطالعات فیزیولوژیکی- تکاملی و بیماری‌های مختلف بهره‌برداری شود[17]. در مطالعه دیگری در موش‌های فاقد mir-1 اختلالاتی در هدایت الکتریکی سلول‌های قلبی، شکل‌زایی سلول‌های قلبی و تنظیم چرخه سلولی سلول‌های قلبی گزارش شده است[18]. براساس مطالعات انجام‌شده به نظر می‌رسد بیش- بیان mir-1 در تمایز موثرتر و عملکرد بهتر سلول‌ها به رده قلبی کمک می‌نماید.

در این مطالعه با هدف فراهم‌آوردن زیرساخت‌های لازم برای طب ترمیمی بافت قلب در مطالعات آتی، ساخت ناقل نوترکیب حامل ژن miR-1 و انتقال این سازه ژنی به رده سلولی HEK 293T به‌منظور بسته‌بندی و تولید لنتی‌ویروس‌های بیان‌کننده miR-1 انجام شد. بنابراین هدف پژوهش حاضر، تولید رده نوترکیب HEK293T با بیش- بیانی پایدار miR-1 به‌عنوان مدل مطالعات قلبی بود.

مواد و روش‌ها

رده سلولی: در پژوهش تجربی حاضر، سلول‌های HEK 293T در محیط کشت DMEM به‌همراه سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰%، ال- گلوتامین ۲میلی‌مولار و پنی‌سیلین- استرپتومایسین 1X (شرکت Gibco؛ انگلستان) در محیط انکوباتور حاوی ۵% دی‌اکسیدکربن و در دمای ۳۷°C کشت داده شدند.

تعیین خلوص و غلظت DNA و کنترل کیفی آن: بدین منظور، گلبول‌های سفید هسته‌دار از خون کامل انسان جداسازی و سپس DNA ژنومی با استفاده از روش نمک‌اشباع استخراج شد. جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰نانومتر به‌وسیله دستگاه بیوفوتومتر

BioPhotometer® D30 (اپندورف؛ آلمان) سنجیده شد. در نهایت به‌منظور کنترل کیفی DNA، ۷میکرولیتر از محلول حاوی DNA روی ژل آگارز ۱% الکتروفورز شد و مورد بررسی قرار گرفت.

طراحی آغازگرها و تکثیر ناحیه ژنی مورد نظر: به‌منظور طراحی آغازگرهای مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) ابتدا توالی‌های نوکلئوتیدی فرادست و فرودست ژن کدکننده miR-1که روی کروموزوم ۱۸ انسانی قرار دارد، از پایگاه داده NCBI با شماره دستیابی NR 110369.1 اخذ شد. پس از شناسایی منطقه کدکننده pre-mir-1، طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار Gen Runner 3 انجام و در نهایت توالی برش آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده XbaI و BamHI و توالی Hanging به انتهای ’5 اضافه شد (جدول ۱).

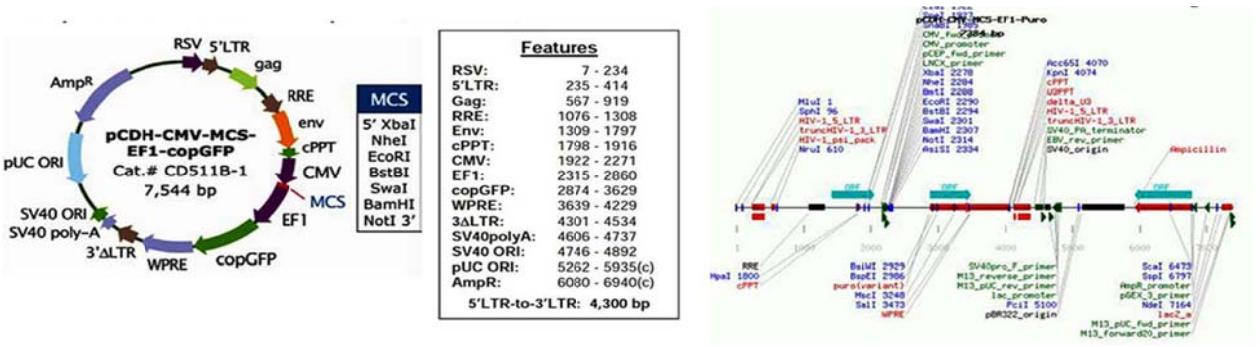
جدول ۱) توالی آغازگرها برای برش آنزیمی قطعه

آغازگر	توالی	محتوای GC (درصد)	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)
آغازگر مستقیم (دارای جایگاه آنزیمی XbaI)	GTTCTAGAAATACACTCTGTAACACTACAC	۳۶/۶	۶۴
آغازگر معکوس (دارای جایگاه آنزیمی BamHI)	TCGGATCCATTCCTCATTCTTTTGTGCTAG	۴۳/۰	۶۴/۴

به‌منظور تکثیر قطعه ژنی ۷۱۶جفت‌بازی حاوی توالی پیش‌ساز miR-1، مخلوط واکنش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) به حجم ۲۵میکرولیتر شامل ۲میکروگرم DNA ژنومی استخراج‌شده، یک‌میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (۱۰پیکومول در میکرولیتر)، ۱۲/۵میکرولیتر مسترمیکس (dNTPs، بافر و آنزیم) و ۸/۵میکرولیتر آب تهیه شد. سپس مخلوط فوق در دستگاه ترموسایکلر Eppendorf MasterCycler® gradient (اپندورف؛ آلمان) با برنامه یک سیکل به‌مدت ۴دقیقه در دمای ۹۴°C، ۳۲ سیکل (۳۰ثانیه در دمای ۹۴°C، ۳۵ثانیه در دمای ۵۸°C و ۳۰ثانیه در دمای ۷۲°C) و یک سیکل انتهایی به‌مدت ۵دقیقه در دمای ۷۲°C قرار داده شد.

محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵% رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیوم‌بروماید تفکیک شدند و با استفاده از اشعه ماورای بنفش و دستگاه لومینومتر (labnet؛ **فنلاند**) مورد بررسی قرار گرفتند. باندهای حاصل با نشانگر نردبانی ۱کیلوبازی سنجیده شدند.

کلونینگ ژن microRNA-1 در پلاسمید pCDH: این مرحله شامل هضم آنزیمی محصول PCR و پلاسمید و نهایتاً اتصال این دو بود. در این مطالعه از پلاسمید pCDH-CMV-MCS-EF1-cop GFP (system bioscience؛ ایالات متحده) که حاوی کاست بیان ژن گزارشگر GFP است استفاده شده و توسط کیت استخراج پلاسمید (Invitrogen؛ ایالات متحده) تخلیص شد. در این پلاسمید ژن مارکر GFP و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین وجود دارد (شکل ۱). برای برش آنزیمی از آنزیم‌های محدودکننده BamHI و XbaI استفاده شد. برای انجام واکنش اتصال (Ligation) محصولات برش‌یافته از آنزیم T4 DNA ligase (شرکت Fermentas؛ ایالات متحده) استفاده شد. واکنش فوق در دمای اتاق، یک ساعت انکوباسیون شد و سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C قرار گرفت، سپس آنزیم در دمای ۶۵°C به‌مدت ۱۵دقیقه غیرفعال شد.

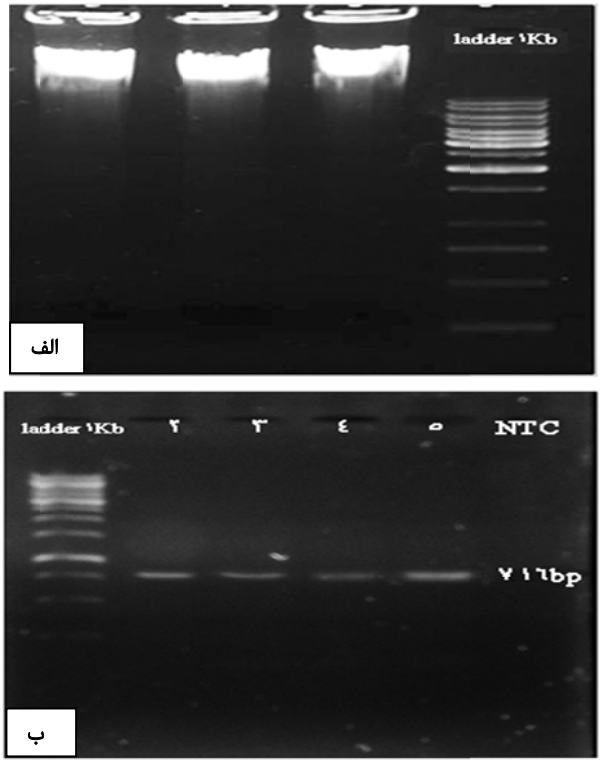


شکل ۱) نقشه پلاسمید pCDH-CMV-MCS-EF1-cop GFP

انتقال پلاسمید کلون‌شده به سویه باکتریایی DH5α و غربال‌کردن کلون‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب: برای واردکردن پلاسمید به باکتری نوترکیب و تغییر در جداره باکتری و مستعدنمودن آن از کلریدکلسیم استفاده شد. سپس فرآیند انتقال پلاسمید به باکتری که واکنش ترانسفورماسیون نامیده می‌شود، انجام گرفت. ابتدا ۵۰میکرولیتر از باکتری مستعد به میکروتیوب استریل انتقال داده شد، سپس ۵میکرولیتر از پلاسمید به میکروتیوب فوق اضافه و پس از ۳۰دقیقه انکوباسیون روی یخ، مخلوط فوق به‌مدت ۹۰ثانیه به دمای ۴۲°C منتقل شد و بلافاصله به‌مدت ۲دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس ۸۰۰میکرولیتر از محیط کشت LB فاقد آنتی‌بیوتیک افزوده و ۹۰دقیقه در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. مخلوط واکنش در دمای ۴°C در ۲۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۴دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل که حاوی پلاسمید نوترکیب بود، روی پلیت‌های LB آگار دارای آمپی‌سیلین کشت داده شد. در نهایت پلیت‌ها به‌مدت یک شب در انکوباتور شیکردار در ۳۷°C قرار گرفتند. باکتری‌هایی که روی محیط کشت آمپی‌سیلین رشد کردند احتمالاً پلاسمید نوترکیب را دریافت کردند.

تایید پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه مورد نظر: در پژوهش حاضر پس از استخراج پلاسمید به‌منظور بررسی درستی اتصال از سه روش کلونی PCR برش آنزیمی و در نهایت تعیین توالی پلاسمید نوترکیب استفاده شد. در صورت وجود قطعه مورد نظر در پلاسمید نوترکیب، واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی مربوط به آن قطعه انجام می‌شود. بنابراین با بهره‌گیری از پرایمرهای کلونینگ اولیه واکنش PCR روی پلاسمیدهای استخراج‌شده انجام گرفت. سپس برای انتخاب پلاسمید کلون‌شده، تمامی کلون‌های الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵% انجام شد. کلون‌هایی که حاوی باند ۷۱۶جفت‌بازی

قطعه pri-miR-1 بودند، برای مراحل بعدی انتخاب شدند. همچنین با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده XbaI و BamHI، پلاسمیدهای استخراج‌شده از کلون‌های مثبت تکثیرشده در مرحله قبل، برش داده شد و مجدداً توسط الکتروفورز بررسی شدند. نهایتاً برای تایید قطعه ژنی کلون‌شده، پلاسمیدهای مثبت مرحله قبل، تعیین توالی شدند. به‌منظور تایید نهایی کلون مثبت، کلون‌های حاوی ژن پیش‌ساز mir-1 برای تعیین توالی ارسال شد که نتایج خوانش، پس از قرائت در نرم‌افزار chromas 2.6 در سایت NCBI بلاست شد.



شکل ۲) نتایج الکتروفورز DNA ژنومی ژل آگارز ۱% و محصول PCR قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-1 ژل آگارز ۱/۵%
الف) الکتروفورز DNA ژنومی ژل آگارز ۱%؛ ب) الکتروفورز محصول PCR قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-1 ژل آگارز ۱/۵%
ستون ۱: نشانگر اندازه یک کیلوبازی، ستون‌های ۵-۲: محصول PCR قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-1، ستون۶: کنترل فاقد DNA الگو (NTC)

تولید ویروس: تقریباً ۲۴ ساعت قبل از ترانسفورماسیون سلول‌ها با پلاسمید، حدود ۵میلیون سلول HEK 293T در محیط کشت DMEM به همراه سرم جنین گاوی ۱۰% و ال- گلوتامین ۲میلی‌مولار و پنی‌سیلین- استرپتومایسین 1X کشت داده شدند. سپس سلول‌ها در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفته شدند تا به تراکم ۷۰% برسند. به‌منظور تولید لنتی‌ویروس‌های نوترکیب و فعال، مجموعه پلاسمید نوترکیب لنتی- miR و سایر پلاسمیدهای حامل ژن‌های پوششی و ساختاری ویروس با استفاده از لیپوفکتامین به درون سلول‌ها تراآلایی شد. در مورد کار با لنتی‌ویروس‌ها، کلیه قوانین ایمنی کاربر و محیط در نظر گرفته شد و همچنین از دکونکس به‌عنوان عامل پاکسازی هود لامینار کلاس دو در این مورد استفاده شد.

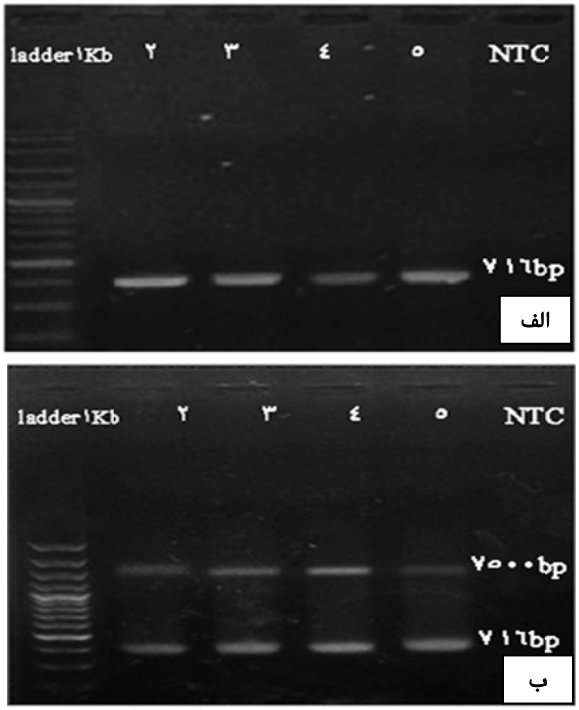
تغلیظ ویروس و تعیین تیتر ویروسی: پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، محیط سلول‌های تراآلایی‌شده جمع‌آوری شد و به‌مدت ۱۵۰دقیقه در ۲۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریوفیوژ شد. سپس رسوب حاصل در دمای ۸۰°C- در محیط DMEM، فاقد سرم جنین گاوی نگهداری شد. برای تعیین تیتر ویروس‌های تولید و تغلیظ‌شده، حجم‌های مختلفی از استوک ویروسی (۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰میکرولیتر) به سلول‌هایHEK293T تراآلایی شد. با توجه به وجود ژن GFP، برای اندازه‌گیری کمّی و کیفی میزان ترانسفکشن، تکنیک میکروسکوپ فلورسانت مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج RNA، سنتز cDNA و ارزیابی تغییرات بیان microRNA-1 توسط ریل‌تایم PCR: پس از ۲۴ ساعت از تراآلایی ویروسی سلول‌های HEK293T، RNA سلول‌ها توسط واکنشگر ترایزول استخراج شد. سپس cDNA تک‌رشته‌ای از نمونه RNA با استفاده از کیت Stratagene (Agilent؛ ایالات متحده) منطبق با پروتکل شرکت سازنده ساخته شد. در نهایت این cDNA با پرایمرهای قبلی تشخیص miR-1، تحت آنالیز PCR قرار گرفت. بیان miR-1 با بیان ژن کنترل داخلی U6 snRNA مقایسه شد (U6 قطعه کوتاهی در حد miRs تولید می‌کند).

تحلیل داده‌ها از طریق بررسی مقایسه‌ای چرخه آستانه (Comparative threshold cycle method) و روش Pfaffl انجام گرفت. برای مقایسه میان دو گروه نیز از آزمون T استیودنت صورت گرفت. همه آزمایش‌ها حداقل سه مرتبه تکرار شدند.

یافته‌ها

نسبت جذب DNA استخراجی از خون محیطی در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰، برابر با ۱/۷–۱/۸ بود. الکتروفورز روی ژل آگارز ۱% نمایانگر کیفیت مناسب و یکپارچگی DNA تخلیص‌شده بود (شکل ۲).



شکل ۳) الکتروفورز محصول کلونی- PCR روی ژل آگارز و الگوی الکتروفورزی برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب بریده شده
الف) نمونه الکتروفورز محصول کلونی- PCR روی ژل آگارز؛ ستون ۱: نشانگر اندازه یک‌کیلوبازی، ستون ۵-۲: محصول PCR به‌دست‌آمده از کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، ستون ٦: کنترل فاقد DNA الگو
ب) الگوی الکتروفورزی برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب بریده‌شده با BamHI و XbaI روی ژل آگارز؛ ستون ۱: کنترل فاقد DNA الگو، ستون‌های ۵-۲: باند ۷۱٦جفت‌بازی مربوط به حضور قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-1 و باند ۷/۵کیلوبازی مربوط به پلاسمید، ستون ۶: نشانگر اندازه یک‌کیلوبازی

تکثیر قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-1 توسط PCR به‌صورت تک‌باند ۷۱۶جفت‌بازی روی ژل الکتروفورز مشاهده شد. اندازه توالی مورد نظر نشان‌دهنده اختصاصیت آغازگرهای طراحی‌شده و بهینه‌بودن شرایط دمایی و زمانی تکثیر بود (شکل۲). پس از هضم آنزیمی محصول PCR و پلاسمید و انجام واکنش اتصال، پلاسمیدهای نوترکیب به درون سویه DH5α باکتری *اشرشیاکلی* (*Escherichia coli*) انتقال داده شدند. باکتری‌های حاصل روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شدند و پس از رشد کلونی‌ها چندین کلونی انتخاب و استخراج پلاسمید انجام گرفت. سپس واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به قطعه مورد نظر انجام شد تا تنها پلاسمیدهایی که دارای قطعه مورد نظر هستند، برای مرحله بعد انتخاب شوند. کلون‌های به‌دست‌آمده ممکن بود حاوی قطعه مورد نظر یا پلاسمید خوداتصال‌یافته باشند (شکل ۳).

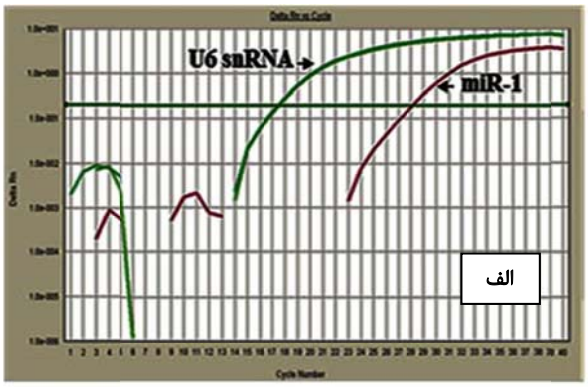
```
Query  1      AGTTACACTGCCTCTGAGCTGCCTTCTCTACATCGCAGTGGGGTCAGCTTCTACCGGGGC  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  97724  AGTTACACTGCCTCTGAGCTGCCTTCTCTACATCGCAGTGGGGTCAGCTTCTACCGGGGC  97783

Query  61     GGCGTCCCGGGGTCTTGGAACTGCATGCAGACTGCCTGCTTGGGAAACATACTTCTTTAT  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  97784  GGCGTCCCGGGGTCTTGGAACTGCATGCAGACTGCCTGCTTGGGAAACATACTTCTTTAT  97843

Query  121    ATGCCCATATGGACCTGCTAAGCTATGGAATGTAAAGAAGTATGTATCTCAGGCCGGGAC  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  97844  ATGCCCATATGGACCTGCTAAGCTATGGAATGTAAAGAAGTATGTATCTCAGGCCGGGAC  97903

Query  181    -TCTCTCGCCGCACTGAGGGGCACTCCACACCACGGGGGCCGCCGCGGCCGACAGCCAGC  239
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  97904  CTCTCTCGCCGCACTGAGGGGCACTCCACACCACGGGGGCCGCCGCGGCCGACAGCCAGC  97963
```

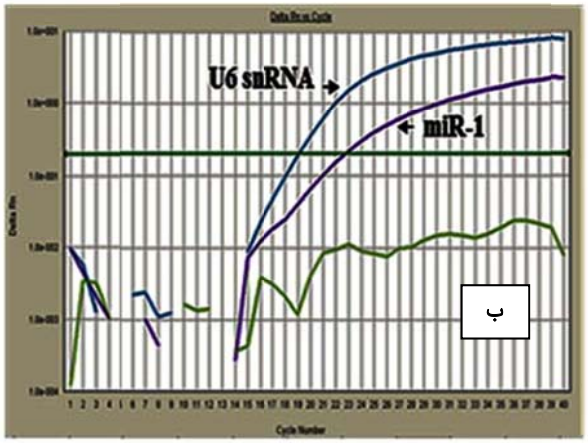
شکل ۴) بلاست نتیجه تعیین توالی ژن پیش‌ساز miR-1 مربوط به کلون مثبت با توالی ثبت‌شده در پایگاه NCBI

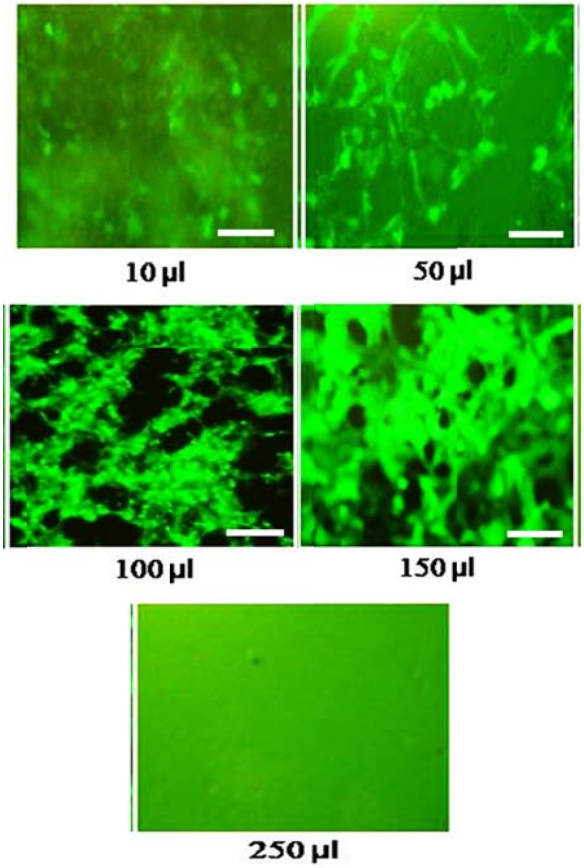
در صورت ورود قطعه مورد کلونینگ به پلاسمید، تعداد جفت‌بازهای به‌دست‌آمده پس از هضم آنزیمی متفاوت می‌شود. در نتیجه به‌منظور تشخیص پلاسمیدهای نوترکیب از برش آنزیمی پلاسمیدها توسط دو آنزیم محدودگر BamHI و XbaI استفاده شد (شکل ۳).

از بین سه مورد از کلون‌های تاییدشده از مرحله قبلی که حاوی ژن پیش‌ساز mir-1 بودند، دو نمونه با قطعه ۱۰۰% همخوانی داشت و یک نمونه نیز در یک باز، جهش داشت. برای انجام مطالعات بعدی یکی از کلون‌های مثبت سالم انتخاب شد (شکل ۴).

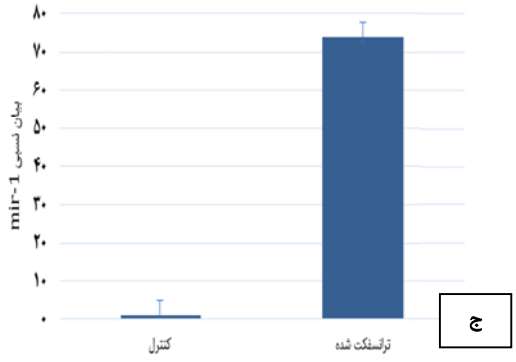
بالاترین میزان بیان ژن GFP مربوط به ترانسفکشن با رقت ۱۵۰میکرومولار از ویروس بود که سبب شد بیش از ۷۰% سلول‌ها القا شوند و بیان فلورسانت داشته باشند (شکل ۵).







شکل ۵) میزان بیان ژن گزارشگر GFP در سلول‌های 293T القاشده با رقت‌های مختلف از ویروس



نمودار ۱) منحنی تکثیر مربوط به cDNA ساخته‌شده از روی miR-1 در دو گروه سلولی القاشده و القانشده و نتایج آنالیز Pfaffl

الف) منحنی تکثیر مربوط به cDNA ساخته‌شده از روی miR-1 در گروه سلولی القاشده

ب) منحنی تکثیر مربوط به cDNA ساخته‌شده از روی miR-1 در گروه سلولی القانشده

ج) نتایج آنالیز Pfaffl

نتایج به‌صورت میانگین آماری است.

رقت ۲۵۰میکرولیتر از ویروس برای سلول قابل تحمل نبود و تمامی سلول‌ها دچار مرگ شدند.

متعاقب تاثیر لنتی‌ویروس‌های حاوی miR-1 بر سلول‌های نوترکیب HEK 293T در دو گروه تراآلایی‌شده و کنترل، بررسی الگوی بیانی mir-1 از طریق ریل‌تایم PCR نشان داد که میزان بیان miR-1 در سلول‌های تراآلایی‌شده نسبت به سلول‌های کنترل افزایش چشمگیری داشت. به‌دلیل بیش- بیان miR-1 توسط لنتی‌ویروس، منحنی تکثیر miR-1 در گروه سلولی القانشده در مقایسه با گروه سلولی القاشده زودتر وارد فاز تصاعدی شد. در سلول‌های گروه کنترل، منحنی تکثیر U6 snRNA در چرخه ۱۷/۵ و منحنی تکثیر miR-1 در چرخه ۲۸ وارد فاز تصاعدی شد و به خط آستانه رسیدند، در حالی که در سلول‌های آلوده‌شده با لنتی‌ویروس نوترکیب، منحنی تکثیر U6 snRNA در چرخه ۱۹ و منحنی تکثیر miR-1 در چرخه ۲۳ وارد فاز تصاعدی شد و به خط آستانه رسیدند. براساس آنالیز Pfaffl، افزایش تقریباً ۷۳برابری بیان mir-1 در سلول‌های تراآلایی‌شده اثبات شد (نمودار ۱).

بحث

پژوهش حاضر با هدف تولید رده نوترکیب HEK293T با بیش بیانی پایدار miR-1 به‌عنوان مدل مطالعات قلبی انجام شد. در دهه اخیر دسته جدیدی از RNAهای غیرکدکننده به نام میکروRNA برای تنظیم بیان ژن‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. miRها مولکول‌های کوچکی هستند که سبب تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی می‌شوند[1, 2, 19]. نقش این مولکول‌ها در روندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک متعددی از قبیل تکثیر، تمایز و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی به اثبات رسیده است. اهمیت این مولکول‌ها به اندازه‌ای است که آنها را هم‌ردیف فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها می‌دانند[7, 20]. با توجه به مشکلات فراوان استفاده از فاکتورهای رشد، کنترل اثرات آنها و همچنین هزینه بالا، استفاده از روند جایگزینی که بتواند بدون فاکتورهای رشد، سلول‌های پرتوان را به سمت سلول‌های دلخواه تمایز دهد، مورد توجه مجامع علمی قرار گرفته است[21]. بدین سبب miRها به‌عنوان کاندید مناسبی برای تنظیم فرآیندهای تکثیر و تعیین نوع تمایز سلولی به حساب می‌آیند، چرا که این مولکول‌ها در روند تکاملی موجودات زنده، بسیار حفاظت شده‌اند و توانایی آنها نیز در روندهای مختلف سلولی از جمله القای تمایز به سمت یک رده خاص به اثبات رسیده است[8, 9]. یکی از اَرکان طب ترمیمی و مهندسی بافت قلب، سلول‌های مورد استفاده هستند[22, 23]. به‌منظور تیمار و آماده‌سازی سلول‌ها و آغاز مسیرهای سیگنالینگ تمایز به یک رده خاص در سلول‌ها، می‌توان از فرآیند بیش- بیان پایدار برخی miRها استفاده کرد[10]. در مطالعات بسیاری به نقش فیزیولوژیک و پاتولوژیک mir-1 در تکوین و تمایز رده عضله قلب پرداخته شده است[5, 11, 15, 18]. از طرف دیگر، در بسیاری از مطالعات از لنتی‌ویروس‌ها در انتقال موثر و پایدار ژن‌ها به درون سلول‌های یوکاریوتی استفاده می‌شود[24]. در این مطالعه، از سیستم بیانی لنتی‌ویروس به‌منظور افزایش بیان پایدار miR-1 در رده سلولی HEK 293T برای تولید یک مدل سلولی قلبی استفاده شد.

مراحل کلون‌کردن ژن miR-1، انتخاب کلون نوترکیب و تایید کلونینگ انجام و سپس با توالی‌یابی تایید شد. وکتور حامل mir-1 به همراه وکتورهای کمکی در سلول HEK293T به‌صورت ویروس نوترکیب بسته‌بندی شد. تراآلایی سلول‌های HEK293T با ویروس نوترکیب به‌منظور تولید رده پایدار انجام شد. کارآیی تراآلایی و رقت موثر ویروس از طریق بررسی نشانگر GFP فلورسانت سنجش شد. بیشترین میزان بیان ژن GFP مربوط به سلول‌های تراآلایی‌شده با رقت ۱۵۰میکرولیتر بود. نشانگر فلورسنت GFP موجب تسهیل فرآیند بهینه‌سازی و تخلیص سلول‌های نوترکیب شد. مطالعات متعددی به نقش موثر استفاده از نشانگر فلورسانت GFP برای تخلیص آسان‌تر سلول‌های تراآلایی‌شده با پلاسمید اشاره نموده‌اند[25]. تنها مطالعه‌ای که از نشانگر GFP در انتقال mir-1 استفاده شده است، سلول هدف، سلول بنیادی بود[26].

در نهایت با استفاده از روش qPCR تغییرات بیان mir-1 ارزیابی شد. در این ارزیابی، بیان mir-1 در سلول‌های تراآلایی‌شده در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت (تا حدود ۷۳ برابر افزایش) و بدین ترتیب عملکردی‌بودن وکتور کلون‌شده نیز تایید می‌شود. این سیستم بیانی لنتی‌ویروسی به‌منظور افزایش سطح بیانی میکروRNA، در مورد سایر miRها نیز نتایج مشابهی را به همراه داشته است. به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای از این سیستم ویروسی و پلاسمید حاوی نشانگر GFP، برای افزایش بیان پایای mir-145 در سلول‌های سرطانی مری استفاده شده است[27].

از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به استفاده از روش ویروسی جهش‌زای بالقوه به‌منظور تراآلایی سلول‌ها، استفاده از سلول‌های نامیرا به‌جای استفاده از سلول‌های پرایمری رده قلبی اشاره کرد.

این رده سلولی پایدار نوترکیب بیش- بیان‌کننده miR-1، می‌تواند به‌عنوان مدل زیستی مناسبی برای بررسی فرآیندهای تکامل و تکوین قلب، غربالگری داروهای قلبی و مهندسی بافت عضله قلبی استفاده شود. گزارشات و تلاش‌های متعدد از تولید سلول‌های مختلف همانند کاردیومیوسیت[28]، ملانوسیت[29] و سایر سلول‌ها نشانگر این است که در بسیاری از مراکز درمانی و تحقیقاتی دنیا

سرمایه‌گذاری گسترده‌ای روی این فناوری انجام شده است و نتایج حاصل هم بسیار امیدوارکننده به نظر می‌رسد. بدین ترتیب پیشنهاد می‌شود با مطالعات بیشتر و شناسایی ژن‌های هدف miRهای دخیل در روندهای تمایزی بتوان در آینده از پتانسیل‌های تشخیصی و درمانی آنها به‌خصوص در ژن‌درمانی و پزشکی ترمیمی بهره برد.

نتیجه‌گیری

رده سلولی پایدار نوترکیب HEK293T بیش- بیان‌کننده miR-1 در لنتی‌ویروس، به‌عنوان مدل زیستی مناسب برای بررسی فرآیندهای تکامل و تکوین قلب است.

تاییدیه اخلاقی:موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.
تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.
سهم نویسندگان: مهسا راسخی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰%)؛ بهناز بخشنده (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۰%)؛ مجید صادقی‌زاده (نویسنده سوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۱۰%)؛ علی سلیمی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰%)؛ مسعود سلیمانی (نویسنده پنجم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۱۰%).
منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.

منابع

1- Karunakaran D, Rayner KJ. MicroRNAs in cardiovascular health: From order to disorder. Endocrinology. 2013;154(11):4000-9.
2- Jackson A L, Levin AA. Developing microRNA therapeutics: Approaching the unique complexities. Nucleic Acid Ther. 2012;22(4):213-25.
3- Hertel J, Langenberger D, Stadler PF. Computational prediction of microRNA genes. Methods Mol Biol. 2014;1097:437-56.
4- Thomson DW, Bracken CP, Goodall GJ. Experimental strategies for microRNA target identification. Nucleic Acids Res. 2011;39(16):6845-53.
5- Creemers EE, Tijsen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: Novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?. Circ Res. 2012;110(3):483-95.
6- Lovat F, Valeri N, Croce CM. MicroRNAs in the pathogenesis of cancer. Semin Oncol. 2011;38(6):724-33.
7- Ajami M, Atashi A, Soleimani M, Ajami M, Kaviani S. Comparison of miR-24, miR-106aand miR-107 expression in identical twins of different ages. J Zanjan Univ Med Sci Health Serv. 2015;23(96):22-33. [Persian]
8- Bakhshandeh B, Soleimani M, Hafizi M, Paylakhi SH, Ghaemi N. MicroRNA signature associated with osteogenic lineage commitment. Mol Biol Rep. 2012;39(7):7569-81.
9- Bakhshandeh B, Soleimani M, Paylakhi SH, Ghaemi N. A microRNA signature associated with chondrogenic lineage commitment. J Genet. 2012;91(2):171-82.
10- Bakhshandeh B, Hafizi M, Ghaemi N, Soleimani M. Down-regulation of miRNA-221 triggers osteogenic differentiation in human stem cells. Biotechnol Lett. 2012;34(8):1579-87.
11- Cai B, Pan Z, Lu Y. The roles of microRNAs in heart diseases: A novel important regulator. Curr Med Chem. 2010;17(5):407-11.
12- Silvestri P, Di Russo C, Rigattieri S, Fedele S, Todaro D, Ferraiuolo G, et al. MicroRNAs and ischemic heart disease: Towards a better comprehension of pathogenesis, new diagnostic tools and new therapeutic targets. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. 2009;4(2):109-18.
13- Malizia AP, Wang DZh. MicroRNAs in cardiomyocyte development. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2011;3(2):183-90.
14- Li J, Dong X, Wang Zh, Wu J. MicroRNA-1 in cardiac diseases and cancers. Korean J Physiol Pharmacol. 2014;18(5):359-63.
15- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nat Genet. 2006;38(2):228-33.
16- Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, Zhang L, Payne JA, Pandya K, et al. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. Circ Res. 2012;110(11):1465-73.
17- Mahmoodzadeh A, Pourfatollah A, Karimi M, Moazzeni S. Induction of tolerogenic murine dendritic cells by downregulating the co-stimulatory molecule of cd40 using lentivirus vector. J Zanjan Univ Med Sci Health Serv. 2014;22(94):1-10. [Persian]
18- Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. Cell. 2007;129(2):303-17.
19- Ranji N, Sadeghizadeh M, Shokrgozar MA, Bakhshandeh B, Karimipour M, Amanzadeh A, et al. MiR-17-92 cluster: An apoptosis inducer or proliferation enhancer. Mol Cell Biochem. 2013;380(1-2):229-38.
20- Metcalf D, Carpinelli MR, Hyland C, Mifsud S, Dirago L, Nicola NA, et al. Anomalous megakaryocytopoiesis in mice with mutations in the c-Myb gene. Blood. 2005;105(9):3480-7.
21- Lo KW, Ashe KM, Kan HM, Laurencin CT. The role of small molecules in musculoskeletal regeneration. Regen Med. 2012;7(4):535-49.
22- Ahvaz HH, Soleimani M, Mobasheri H, Bakhshandeh B, Shakhssalim N, Soudi S, et al. Effective combination of hydrostatic pressure and aligned nanofibrous scaffolds on human bladder smooth muscle cells: Implication for bladder tissue engineering. J Mater Sci Mater Med. 2012;23(9):2281-90.
23- Scarritt ME, Pashos NC, Bunnell BA. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. Front Bioeng Biotechnol. 2015;3:43.
24- Bakhshandeh B, Soleimani M, Hafizi M, Ghaemi N. A comparative study on nonviral genetic modifications in cord blood and bone marrow mesenchymal stem cells. Cytotechnology. 2012;64(5):523-40.
25- Halff EF, Versteeg M, Brondijk TH, Huizinga EG. When less becomes more: Optimization of protein expression in HEK293-EBNA1 cells using plasmid titration - a case study for NLRs. Protein Expr Purif. 2014;99:27-34.
26- Huang F, Tang L, Fang ZhF, Hu XQ, Pan JY, Zhou ShH. MiR-1-mediated induction of cardiogenesis in mesenchymal stem cells via downregulation of Hes-1. BioMed Res Int. 2013;2013: ID 216286.
27- Wang TY, Zhang QQ, Zhang X, Sun QL, Zhao CP, Wang XY. The effect of recombinant lentiviral vector encoding miR-145 on human esophageal cancer cells. Tumour Biol. 2015;36(12):9733-8.

28- So KH, Han YJ, Park HY, Kim JG, Sung DJ, Bae YM, et al. Generation of functional cardiomyocytes from mouse induced pluripotent stem cells. Int J Cardiol. 2011;153(3):277-85.

29- Ohta S, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Kuwahara R, Ohyama M, et al. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. PLoS One. 2011;6(1):e16182.