



## ساخت سازه ی ژنی حاوی ژن گاما گلوبین و مناطق تنظیمی خوشه ژنی بتا جهت بررسی

### موتاسیونهای موثر در فنوتیپ HPFH

مریم بی خوف تربتی<sup>۱\*</sup>، فاطمه جمشیدی<sup>۲</sup>، حسین خان احمد<sup>۳</sup>، سیروس زینلی<sup>۴</sup>، مرتضی کریمی پور<sup>۵</sup>

#### چکیده

در بیماران بتاتالاسمی موتاسیون یا حذف هایی در ژن بتاگلوبین رخ داده که سبب کاهش یا توقف سنتز HbA می شود. هموگلوبین بالغین (HbA) دارای دو زنجیره ی آلفا گلوبین و دو زنجیره ی بتا گلوبین ( $\alpha\beta 2$ ) می باشد. در حالی که هموگلوبین جنینی (HbF) دارای دو زنجیره ی آلفا گلوبین و دو زنجیره ی گاماگلوبین ( $\alpha\gamma 2$ ) است. تغییر HbF به HbA در هفته های اول زندگی اتفاق می افتد. یکی از حالت های خوش خیم بیماری بتا تالاسمی، باقی ماندن ارثی هموگلوبین جنینی (HPFH) می باشد. در این بیماران میزان HbF همچنان بالا باقی می ماند که می تواند اثر HbA معیوب را در حمل اکسیژن بپوشاند. ژن گاما گلوبین درون خوشه ژنی بتا قرار دارد و تحت کنترل ناحیه تنظیمی LCR در بالا دست خوشه ژنی بتاگلوبین می باشد. LCR شامل ۵ منطقه به شدت حساس به آنزیم DNaseI به نام مناطق HS1-5 است.

در این تحقیق به منظور شناسایی و ایجاد موتاسیونهای رایج در بروز فنوتیپ HPFH یک سازه ی ژنی به عنوان کنترل مثبت طراحی و ساخته شد که حاوی '3' HS2, HS3, HS4 '5' به اندازه ۴ kb همراه با بخش های بینابینی به نام mini LCR در کنار ژن A Gamma به اندازه ۲ kb قرار گرفت. وکتور

pTZ57T/A برای کلونینگ اولیه ی محصولات PCR و pBGGT نیز به عنوان وکتور ثانویه برای ساب کلونینگ استفاده شدند.

**کلمات کلیدی:** بتاتالاسمی، گاماگلوبین، هموگلوبین جنینی، LCR, HPFH

#### مقدمه

تالاسمی از شایعترین اختلالات تک ژنی در انسان بوده و در این بیماری نقص در سنتز یکی از زنجیره های آلفا یا بتاگلوبین رخ می دهد. تالاسمی در نواحی مدیترانه ای، خاورمیانه، بخشهایی از آفریقا، هند و شرق گسترش بیشتری دارد [۱۱]. در صورتیکه کاهش و یا فقدان تولید زنجیره بتاگلوبین رخ دهد سنتز HbA مختل شده و در این حال بتاتالاسمی نامیده می شود [۱۰]. هموگلوبین بالغین (HbA) دارای دو زنجیره ی آلفا گلوبین و دو زنجیره ی بتا گلوبین ( $\alpha\beta 2$ ) می باشد. HbA قبل از هفته ۸ تا ۱۰ حاملگی قابل ردیابی نیست، ولی بعد از ماه سوم حاملگی ۴ تا ۱۳ درصد هموگلوبین از نوع HbA است. در حالی که هموگلوبین جنینی (HbF) دارای دو زنجیره ی آلفا گلوبین و دو زنجیره ی گاماگلوبین ( $\alpha\gamma 2$ ) است. HbF از اوایل دوره ی رویانی قابل مشاهده است و سنتز آن به طور سریع افزایش می یابد. به طوری که در هفته هشتم حاملگی، حداقل ۹۰ درصد هموگلوبین از این نوع می باشد و در طی دوران جنینی و نوزادی به شکل غالب باقی می ماند. تغییر HbF به HbA در هفته های اول زندگی اتفاق می افتد به طوری که مقدار HbF

\*- نویسنده مسئول مکاتبات (Maryam\_bt2001@yahoo.com)

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرری

۲- کارشناس ارشد، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستورتهران

۳- استادیار، گروه ب ت ژ، انستیتو پاستورتهران

۴- دانشیار، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستورتهران

۵- استادیار، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستورتهران



ژنی بتا از جمله بیان ژن گاماگلوبین را در مراحل مختلف جنینی و بعد از تولد کنترل می کند [۵، ۴، ۸]. در طول رشد و تکامل از دوران جنینی تا بلوغ به ترتیب زنجیره  $\epsilon$ ، سپس  $\gamma$  و در مراحل انتهایی جنینی و تمام دوران بعد از تولد زنجیره  $\beta$  جایگزین می شود [۵، ۸]. آگاهی از مکانیسم های مولکولی روشن شدن ژن گاما گلوبین در دوران جنینی می تواند راهکاری برای افزایش بیان ژن گاماگلوبین در بیماران بتاتالاسمی و ژن درمانی این بیماری باشد. پژوهش ها نشان داده بروز موتاسیون هایی در بخش تنظیمی ژن گاما گلوبین با ایجاد فنوتیپ HPFH باعث افزایش بیان ژن گاما گلوبین می شود [۶].

## مواد و روش کار

### استخراج DNA:

تخلیص DNA ژنومیک از خون انسان سالم به روش رسوب دهی با نمک (Salting Out) از مقدار ۵ میلی لیتر خون همراه با نیم میلی لیتر EDTA ۱۰٪ انجام شد. DNA استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز یا توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین غلظت گردید [۱۰].

### طراحی سازه ی ژنی:

در این مرحله پس از مطالعه و بررسی وکتورها و کارایی سازه ژنی در آینده، طرح نهایی سازه ژنی با استفاده از نرم افزار Gene runner ترسیم شد. اجزای تشکیل دهنده و ترتیب قرار گیری آن ها عبارتست از:

HS4, HS3, HS2, A Gamma

برای ساخت سازه ی ژنی از پرایمر جلوبر HS4-F و پرایمر معکوس HS4-R جهت تکثیر قطعه HS4، از پرایمر جلوبر HS3-F و پرایمر معکوس HS3-R جهت تکثیر قطعه HS3 و از پرایمر جلوبر HS2-F و پرایمر معکوس HS2-R برای تکثیر قطعه HS2 استفاده شد [۱]. همچنین پرایمرهای AGamma-F و AGamma-R برای تکثیر قطعه A Gamma طراحی شد.

تا ششمین ماه پس از تولد به حدود ۳ درصد کل هموگلوبین کاهش می یابد و پس از یک سالگی به کمتر از ۲ درصد می رسد [۶]. شروع اختلال بتاتالاسمی معمولاً تا هنگام جایگزینی تولید گلوبین بتا به جای گاما یعنی چند ماه پس از تولد آشکار نیست.

یکی از حالت های خوش خیم بیماری بتا تالاسمی، باقی ماندن ارثی هموگلوبین جنینی (HPFH) می باشد. این بیماران قادر به ادامه حیات هستند زیرا ژن گاما بعد از تولد فعال باقی مانده و میزان HbF در آنها همچنان بالا می ماند که می تواند اثر HbA معیوب را در حمل اکسیژن پوشاند [۱۲ و ۱۰].

در این تحقیق به منظور بررسی موتاسیون هایی که در القای مجدد ژن گاما گلوبین موثر هستند، یک سازه ی ژنی به عنوان کنترل مثبت طراحی و ساخته شد که حاوی ژن سالم گاما گلوبین و قسمتی از منطقه ی تنظیمی LCR است. هدف از این طراحی آن است که بتوان در آینده با ایجاد موتاسیون هایی در این سازه ی ژنی که احتمال می رود در بروز فنوتیپ HPFH موثرند اولاً اثر موتاسیونهای گزارش شده را در افزایش بیان گاما گلوبین تأیید کرد و نهایتاً از این سازه به منظور ژن درمانی بتاتالاسمی استفاده کرد.

در انسان گلوبین های بتا ( $\beta$ )، دلتا ( $\delta$ )، گاما آلانین ( $A\gamma$ )، گاما گلیسین ( $G\gamma$ ) و اپسیلون ( $\epsilon$ ) جزء خانواده ژنهای خوشه ژنی گلوبین هستند و در ناحیه ای به طول تقریباً ۶۰ کیلوباز در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ قرار دارند. توالی ژنی خانواده بتاگلوبین شامل نواحی تنظیمی اختصاصی از قبیل: ناحیه کنترل لوکوس (LCR) و توالیهای افزایش دهنده بیان (Enhancer) نیز می باشد. منطقه LCR (Locus Control Region) به وسعت ۱۵ kb دارای یکسری نواحی بسیار حساس (Hypersensitive) به آنزیم DNaseI به نام HS بوده و شامل HS1, HS2, HS3, HS4 و HS5 می باشند. LCR در فاصله kb ۲۰-۶ بالا دست انتهای ۵ ژن اپسیلون قرار گرفته است. LCR باز شدن کروماتین و بیان خوشه ی



تکثیر شدند [۱۰]. برای رشد باکتری‌ها از محیط LB- آمپی‌بروت (Merck، آلمان) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی‌سیلین استفاده شد. کلیه دستکاری‌های مولکولی از قبیل تخلیص پلاسمید و DNA، T/A کلونینگ و واکنشهای آنزیمی بر اساس دستورالعمل شرکت‌های سازنده کیت انجام شد. همه آنزیم‌های آندونوکلاز با اثر محدود و T4 DNA لیگاز و پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه از شرکت (سیناژن، ایران) تهیه شده است. برای کلون کردن کلیه ی محصولات PCR از T/A وکتور pTZ57R (Fermentas) (لیتوانی) استفاده شد. سپس ساب کلونینگ قطعات در وکتور pBGGT (ثبت شده در بانک ژن تحت شناسه DQ384617) انجام شد. کلیه مراحل کلونینگ و ساب کلونینگ با هضم آنزیمی و در برخی موارد با تعیین توالی تأیید گردید.

### نتایج

در این مطالعه، طرح نهایی سازه ی ژنی به ترتیب زیر مشخص گردید: HS4-HS3-HS2-A Gamma و نیز ترتیب آنزیم‌های برش دهنده به ترتیب زیر مشخص شد: NheI-MluI-BglII-AgeI-Sall. وکتور pTZ57T/A برای کلونینگ اولیه ی محصولات PCR انتخاب شد و pBGGT نیز به عنوان وکتور ثانویه برای ساب کلونینگ کاندید شد. شکل ۱ نتیجه ی PCR قطعه ی HS4، HS3، HS2 و A Gamma را نشان می‌دهد. شرایط انجام PCR ابتدا با آنزیم Taq بهینه و سپس با کیت Expand، قطعات سازه ی ژنی تکثیر شد.

پرایمرهای مورد نیاز دارای جایگاه برش آنزیمی مناسب در انتهای ۵' بوده و تمامی پرایمرها BLAST شدند (جدول ۱).

پرایمر	توالی پرایمر
HS4-F	5' GCTAGC GTGTGTGGAGACAAATGCAG 3'
HS4-R	5' ACGCGT TGGGCAGTCTCCTGTTATTTC 3'
HS3-F	5' ACGCGT TGCTAGCAAAAGCAAGGGC 3'
HS3-R	5' AGATCT GCCCTGCTTAGGAGCTTAATC 3'
HS2-F	5' AGATCT AAGGTGCCTTCTCATCTGGGTAC 3'
HS2-R	5' ACCGGT CGTATGTGAGCATGTGTCCTCTAAC 3'
A Gamma-F	5' ACCGGTAATTAGCAGTATCCTCTTGGGG 3'
A Gamma-R	5' GTCGACATAAATGAGGAGCATGCACAC 3'

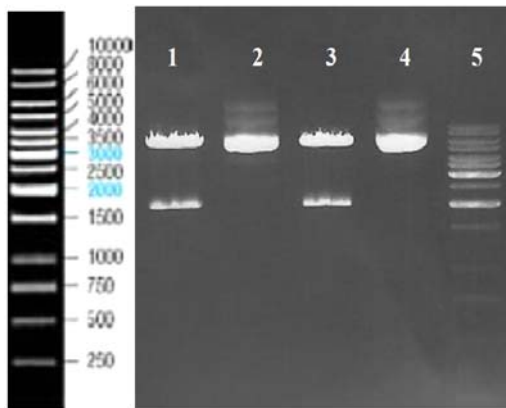
جدول ۱: توالی پرایمرهای جلوبر و معکوس برای تکثیر قطعات HS4، HS3، HS2 و A Gamma (۴)

### شرایط PCR:

واکنش PCR برای هر قطعه بر اساس برنامه ی زیر و با استفاده از کیت High Fidelity Expand DNA Polymerase (Roche، آلمان) انجام شد [۱۰]: ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۱۰ سیکل بعدی در هر سیکل ۹۴ درجه به مدت ۲۰ ثانیه - ۶۰ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و ۶۸ درجه به مدت ۲ دقیقه سپس ۲۰ سیکل بعدی ۹۴ درجه برای ۲۰ ثانیه ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۸ درجه به مدت ۲ دقیقه به طوری که در هر سیکل آن ۲۰ ثانیه اضافه شد سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۶۸ درجه طویل شدن نهایی انجام خواهد گرفت. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و با استفاده از اشعه ماورا بنفش مشاهده شد. باندهای مورد نظر از روی ژل بریده و با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (Qiagen، آلمان) طبق پروتکل کیت تخلیص شد.

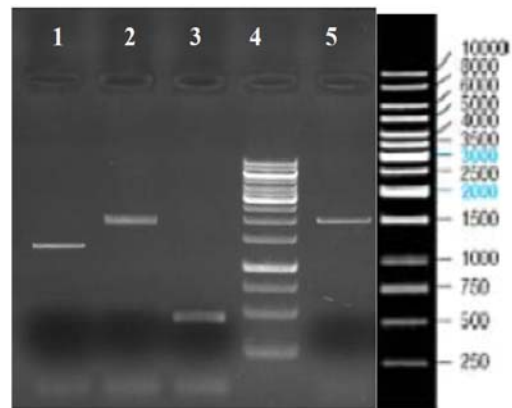
### کلونینگ:

همه پلاسمیدها با روش ترانسفورمیشن در باکتری E.Coli سویه Top10F' و بر اساس دستورالعمل استاندارد مربوطه



شکل ۳: هضم آنزیمی سازه نهایی.

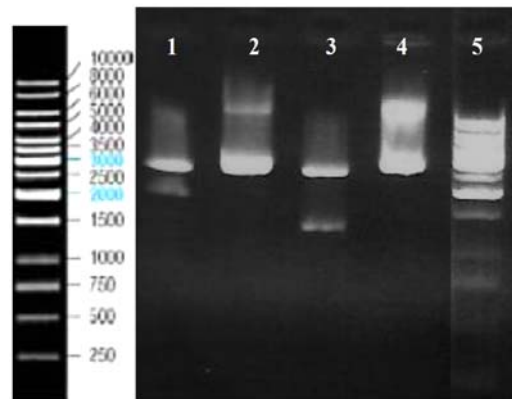
1- هضم آنزیمی سازه نهایی با Age I و Sal I (قطعه 2000bp و قطعه 6580bp ایجاد می شود)، 2، 4- پلاسمید سازه نهایی 3- هضم آنزیمی سازه نهایی با Bgl III و Mlu I (قطعه 2000bp و قطعه 6580bp ایجاد می شود)، 5- مارکر 1kb



شکل ۱: PCR کل قطعات سازه با پرایمرهای هر قطعه.

1- قطعه ی HS2 (1450 bp)، 2- قطعه HS3 (2000 bp)، 3- قطعه HS4 (430 bp)، 4- مارکر 1kb و 5- قطعه A Gamma (2000bp)

هر یک از چهار قطعه تشکیل دهنده سازه ژنی پس از تکثیر با روش PCR در وکتور pTZ57T/A کلون شدند. کلونینگ با روش آنالیز آنزیمی با آنزیم های قرار داده شده در دو انتهای قطعات تایید شد. تعیین توالی با آغازگرهای جلوبر و معکوس M13 نیز صحت انجام ساخت سازه را تایید نمود. شکل ۲ هضم آنزیمی pT- A Gamma و pT- HS2 را نشان می دهد و شکل ۳ هضم آنزیمی سازه نهایی را نشان می دهد.



شکل ۲: هضم آنزیمی pT- A Gamma و pT- HS2.

1- هضم آنزیمی pT- A Gamma با آنزیم های Age I و Sal I (قطعه 2000 bp و قطعه 2700 bp ایجاد می شود)، 2- پلاسمید pT- A Gamma، 3- هضم آنزیمی pT- HS2 با آنزیم های Age I و Bgl II (قطعه 1450 bp و قطعه 2700 bp ایجاد می شود)، 4- پلاسمید pT- HS2، 5- مارکر 1kb

### بحث

در بیماران بتانالاسمی موتاسیون یا حذف هایی در ژن بتاگلوبین رخ داده که سبب کاهش یا توقف سنتز HbA می شود. در حال حاضر پیوند مغز استخوان قطعی ترین روش درمانی برای این بیماران می باشد. اما این روش به دلیل در دسترس نبودن اهداکنندگان مناسب و داشتن عوارضی مانند واکنش های ایمنولوژیک میزبان بر علیه سلولهای پیوند شده در عمل با مشکلات زیادی مواجه است [۴]. یکی دیگر از روش های درمان این بیماران القای مجدد بیان ژن گاما گلوبین به کمک داروهای شیمیایی مانند هیدروکسی اوره، مشتقات بوتیرات، همین، اریترو پوئین و ... می باشد که در دوران جنینی فعال است. افزایش بیان ژن گاما گلوبین سبب افزایش تولید HbF در این بیماران شده که جایگزین HbA معیوب برای حمل اکسیژن می گردد [۳]. ولی اثرات جانبی متعدد این داروها استفاده طولانی مدت از آن ها را محدود می کند.

مطالعات نشان داده در برخی از بیماران بتا تالاسمی که از نوع HPFH هستند هموگلوبین جنینی به طور ارثی بالا است. زیرا بیان ژن گاماگلوبین به دلیل بروز موتاسیونهایی در آن و یا در نواحی تنظیمی آن، پس از تولد نیز همچنان فعال باقی مانده و



همراه با بخش های بینایی به عنوان mini LCR طراحی شد که در کنار ژن A Gamma قرار گرفت. این سازه به عنوان کنترل مثبت جهت شناسایی و ایجاد موتاسیونهای رایج در بروز فنوتیپ HPFH و سپس انتقال آن به سلولهای بنیادی رده ی اریتروییدی کاربرد دارد تا در صورت بیان کافی HbF، از آن در جهت ژن درمانی بیماران بتاتالاسمی مازور استفاده گردد.

### منابع

- 1- Bikhof Torbati M, Khanahmad H, Jamshidi F, Karimipor M, Sadeghizadeh M, Shokrgozar M.A., Amanzadeh A, Zeinali S. 2008. Transduction of COS-7 and K562 cell lines by recombinant lentiviral particles carrying mini LCR and  $\beta$ -globin gene: Introduction to gene therapy of major  $\beta$ -thalassemia. *Modares Journal of Medical Sciences*.10(3 & 4):1-11
- 2- Eleni Papanikolau, Maria Georgomanoli and Nicholas P. Anagnou. 2008. Novel insulated gamma globin SIN lentiviral vectors with the HPFH-2 enhancer and the -117 HPFH active promoter efficiently transducer thalassemic CD34+ cells and prevent their apoptosis, *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 40( 2): 279-280.
- 3- Kattamis A. Treatment of Thalassemia With Hydroxyurea. 2007. An Indispensable Alternative Therapy. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 29(11):729-730.
- 4- Khanahmad H, Noori Dalooi MR, Shokrgozar MA, Azadmanesh K, Niavarani AR, Karimi M. 2006. A novel single step double positive double negative selection strategy for beta-globin gene replacement. *Biochem Biophys Res Commun*. 23; 345(1):14-20.
- 5- Li Wang, Li-Jun Di, Xiang Lv, Wei Zheng, Zheng Xue, Zhi-Chen Guo, De-Pei Liu, and Chi-Chuan Liang. 2009. Inter-MAR Association Contributes to Transcriptionally Active Looping Events in Human  $\beta$ -globin Gene Cluster. *PLoS ONE*. 4(2): e4629.

میزان HbF در آنها بالا می ماند بنابراین اثر HbA معیوب را در حمل اکسیژن می پوشاند و شدت بیماری را کاهش می دهد [۲]. تاکنون برخی از این موتاسیون ها شناخته شده و تحقیقات بیشتر در راستای شناسایی سایر موتاسیون های مرتبط ادامه دارد. بر این اساس در صورتیکه بتوان موتاسیون های رایج بیماران HPFH را پس از شناسایی با روشهای مولکولی در ژن گاماگلوبین ایجاد کرده، به گونه ای که میزان تولید HbF افزایش یابد می توان با انتقال این سازه ژنی به سلولهای بنیادی خونساز بیماران بتاتالاسمی، گامی در جهت ژن درمانی این بیماران برداشت.

ژن گاما گلوبین درون خوشه ژنی بتا قرار دارد و تحت کنترل ناحیه تنظیمی LCR در بالا دست خوشه ژنی بتاگلوبین به وسعت ۱۵ kb می باشد. LCR شامل ۵ منطقه به شدت حساس به آنزیم DNaseI به نام مناطق HS است. اتصال فاکتورهای رونویسی به مناطق HS از LCR که عنصر تنظیمی اختصاصی برای سلول های رده اریتروییدی می باشد، سبب تسهیل باز شدن کروماتین می شود. بدین ترتیب عناصر تنظیمی به ژن گاما گلوبین دسترسی یافته و سبب می شوند این ژن در سطح بالا بیان شود. LCR مانع اعمال اثرات مکانی کروماتین بر ژن گاما گلوبین و خاموش شدن ژن انتقال یافته می گردد. هم چنین این عنصر باعث افزایش بیان ژن تحت کنترل خود می شود [۸]. با توجه به ظرفیت محدود وکتورها در انتقال سازه های ژنی، قرار دادن قطعات کامل HS در داخل آنها امکان پذیر نمی باشد بنابراین، می توان در کنار ژن گاماگلوبین به جای LCR کامل قسمتی از عناصر Core مینیمال LCR که برای بیان گاماگلوبین ضروری هستند را استفاده کرد. عناصر Core (core element). قطعات کوچکتر HS هستند که بخش عمده فعالیت LCR مربوط به آنها می باشند. مطالعات نشان داده که توالی های موجود در فواصل بین بخش های Core از HS ها نیز برای فعالیت و عملکرد LCR ضروری هستند [۱۱]. بر این اساس در این تحقیق یک کاست '3' HS4,HS3,HS2 '5' به اندازه ۴ kb



- 6- Mantovani R, Malgaretti N, Nicolis S, Ronchi A, Giglioni B, and Ottolenghi S. 1988. The effects of HPFH mutations in the human gamma-globin promoter on binding of ubiquitous and erythroid specific nuclear factors. *Nucleic Acids Res.* 16(16): 7783–7797.
- 7- Molete JM, Petrykowska H, Bouhassira EE, Feng YQ, Miller W, Hardison RC. 2001. Sequences flanking hypersensitive sites of the beta-globin locus control region are required for synergistic enhancement. *Mol Cell Biol.* 21(9):2969-80.
- 8- Qiliang Li, Kenneth R. Peterson, Xiangdong Fang, and George Stamatoyannopoulos. 2002. Locus control regions. *BLOOD.* 100( 9):3077-3086.
- 9- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular cloning*, Third edition, CSHL Press.
- 10- Sankaran VG, Menne TF, Xu J, et al. 2008. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science.*322:1839-42.
- 11- Sengupta T, Chen K, Milot E, and Bieker J. 2008. Acetylation of EKLF Is Essential for Epigenetic Modification and Transcriptional Activation of the {beta}-Globin Locus. *Mol. Cell.Biol.*28(20):6160-6170.
- 12- Weatherall DJ, Gibbons Higgs OR, Olivier NF, Wood WG. 2001. *The thalassaemia syndromes*. 4th edition, black well science ltd: pp 287-296, pp 150-164, pp 206-238.