

ORIGINAL ARTICLE

Designing and Constructing the Lentiviral Vector Coding miRNA-499a and Transduction of Human Mesenchymal Stem Cells

Vajiheh Neshati¹,
Samaneh Mollazadeh²,
Bibi Sedigheh Fazly Bazzaz^{3,4},
Majid Mojarrad^{5,6}
Zeinab Neshati⁷,
Mohammad Amin Kerachian^{8,9}

¹ PhD Candidate, Biotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

² PhD in Biotechnology, Biotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ Professor, Biotechnology Research Center, Institute of Pharmaceutical Technology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁴ Professor, Pharmaceutical Control Department, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁵ Associate Professor, Medical Genetics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁶ Associate Professor, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁷ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

⁸ Assistant Professor, Medical Genetics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁹ Assistant Professor, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received December 28, 2017; Accepted June 10, 2018)

Abstract

Background and purpose: Lentiviral vectors (LVs) are suitable candidates for gene delivery to cells with stable and high-level of transgene expression in target cells. MicroRNAs (miRNAs, miRs) are non-protein coding, short (~22 nucleotides) and single-stranded RNAs that act as post-transcriptional regulators of gene expression, and are involved in various cellular processes, including proliferation, differentiation and apoptosis. Several studies have shown that miR-499a promotes cardiac differentiation in cardiac stem cells. So, the aim of our study was to construct lentiviruses carrying miRNA-499a.

Materials and methods: Specific sequences of miRNA-499a (3p and 5p) were designed and constructed. Then, miRNA-499a was cloned into lentiviral vector. Analytical digestion and nucleotide sequence analysis were performed to ensure successful introduction of the miRNA to the vector. Then, the lentiviral particles produced (miRNA-499a-3p and miRNA-499a-5p) were used for transduction of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBM-MSCs).

Results: Analytical digestion and sequence analysis confirmed the accuracy of the constructs. The high expression of eGFP represented the high efficiency of transfection and transduction. The lentiviral particles carrying miRNA-499a-3p/5p were made and could transduce hBM-MSCs.

Conclusion: In this study we made lentiviral particles carrying miR-499a that could be used for differentiation of stem cells to cardiomyocytes.

Keywords: lentiviral vectors, MicroRNA, miRNA-499a-3p/5p, differentiation

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (166): 21-29 (Persian).

* Corresponding Author: Bibi Sedigheh Fazly Bazzaz - Biotechnology Research Center, Institute of Pharmaceutical Technology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran (E-mail: fazlis@mums.ac.ir)

طراحی و ساخت حامل لنتی ویروسی بیان کننده miRNA-499a و انتقال آن به سلول‌های بنیادی مزانشیعی انسان

وجیهه نشاطی^۱

سمانه ملازاده^۲

بی بی صدیقه فضلی بزار^{۳و۴}

مجید مجرد^{۵و۶}

زینب نشاطی^۷

محمد امین کراچیان^{۸و۹}

چکیده

سابقه و هدف: وکتورهای لنتی ویروسی حامل‌های مناسبی برای انتقال ژن به سلول‌ها بوده و می‌توانند سبب بیان بالا و مداوم ژن‌ها در سلول‌های میزبان شوند. ریز RNA‌ها (miRNAs)، گروهی از RNA‌های غیر کدکننده کوچک هستند که بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه یا القاء تجزیه mRNA کنترل می‌کنند و از این طریق فرآیندهای زیستی متعددی از جمله تمایز سلولی را تنظیم می‌نمایند. مطالعاتی نشان داده‌اند که miRNA-499a در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های قلبی نقش دارد. با توجه به مطالب ذکر شده، در این مطالعه ساخت وکتور لنتی ویروسی ناقل miRNA-499a جهت استفاده در تمایز سلول‌های قلبی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: رشته‌های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a طراحی و ساخته شده و در پلاسمید ویژه‌ای کلون شدند. برای اطمینان از ورود صحیح این رشته‌های نوکلئوتیدی، هضم آنزیمی و توالی یابی انجام گردید. سپس ذرات لنتی ویروسی حامل رشته‌های miRNA-499a-3p و miRNA-499a-5p ساخته شدند و برای ترانس‌داکشن سلول‌های مزانشیعی مغز استخوان انسان مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از هضم آنزیمی و توالی یابی، کلون شدن صحیح رشته‌های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a به داخل پلاسمید را نشان دادند. بیان بالای GFP نشان دهنده کارایی بالای ترانس‌فاکشن و ترانس‌داکشن بود. ویروس‌های حامل رشته‌های miRNA-499a-3p/5p ساخته شده، توانستند سبب ترانس‌داکشن سلول‌های بنیادی مزانشیعی گردند.

استنتاج: در این مطالعه حامل‌های لنتی ویروسی ناقل miRNA-499a-3p/5p تولید شدند، که با توجه به میزان مناسب ترانس‌داکشن سلول‌های بنیادی مزانشیعی، می‌توانند در تمایز این سلول‌ها به سلول‌های قلبی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: لنتی ویروس، ریز RNA، تمایز

مقدمه

وکتورهای مختلفی جهت انتقال ژن در فرآیندهای دستکاری ژنتیکی سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند

E-mail: fazlis@mums.ac.ir

مؤلف مسئول: بی بی صدیقه فضلی بزار - مشهد: بلوار وکیل آباد، پردیس دانشگاه، دانشکده داروسازی، گروه کنترل دارو

۱. دانشجویی دکترای تخصصی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲. دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳. استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دارویی، استیتو تکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴. استاد، گروه کنترل دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۵. دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۶. دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۷. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۸. استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۹. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۱۰. تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۷ تاریخ ارجاع چهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۱۰/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۲۰

(کاردیومیوسیت‌ها) ایفا می‌کند(۶-۸). miR-499a توسط miR-499b Myh7b کد شده و عضوی از خانواده miR-499 می‌باشد. این خانواده دارای دو عضو شناخته شده تحت عنوان miR-499a و miR-499b می‌باشد که دارای ساختار ساقه-لوب بوده و هر دو پس از پردازش، اولیگونوکلوتیدهای ۳p و ۵p را ایجاد می‌کنند. miR-499a در سلول‌های قلبی جنینی، نوزادان و افراد بالغ بیان شده و بیان آن در طی مراحل تکامل قلب افزایش می‌یابد(۱-۸). انتقال miR-499a به کمک وکتورهای لنتی ویروسی به سلول‌های بنیادی، سبب بیان پایدار این ریز RNA در سلول‌های مزبور شده است(۹-۱۰). همچنین بیان اجرای این ریز RNA در سلول‌های بنیادی مختلف، سبب افزایش بیان نشانگرهای ویژه سلول‌های قلبی و تمایز این سلول‌ها به کاردیومیوسیت‌ها شده است(۱۱). بنابراین لنتی ویروس‌های حامل miR-499a می‌توانند بعنوان ابزاری مؤثر در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های قلبی مورد استفاده قرار گیرند و با تولید کاردیومیوسیت‌ها، در درمان برخی بیماری‌های قلبی مرتبط با آسیب بافت قلب، به کار گرفته شوند. هدف از این مطالعه، تولید لنتی ویروس‌های حامل رشته‌های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a می‌باشد که با اثر بر سلول‌های بنیادی و ترانس داکشن آن‌ها، سبب بیان دائمی این ریز RNA در سلول‌های ترنسداکت شده گشتند. با استفاده از این حامل لنتی ویروسی و افزایش بیان پایدار از miRNA-499a در سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسان، می‌توان زمینه را برای مطالعات تمایز این سلول‌ها به سلول‌های قلبی و استفاده درمانی از سلول‌های تمایز یافته فراهم ساخت.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی است. miR-499a طراحی، ساخت و کلون کردن hsa-miR-) hsa-microRNA-499a توالی‌های بالغ (hsa-miR-499a-5p و 499a-3p miRBase از سایت

می‌باشد. یکی از مناسب‌ترین وکتورها برای انتقال و بیان ژن‌های مورد نظر، وکتورهای لنتی ویروسی می‌باشد. از مهم‌ترین وکتورهای لنتی ویروسی وکتورهایی هستند که بر پایه ویروس HIV-1 ساخته می‌شوند. ویروس HIV یک رترو ویروس و عضوی از زیرخانواده لنتی ویزیده و جنس لنتی ویروس‌ها بوده است و دارای بسیاری از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ویژه این خانواده می‌باشد. وکتورهای لنتی ویروسی قابلیت انتقال ژن به سلول‌های در حال تقسیم و همچنین سلول‌هایی که تقسیم نمی‌شوند را دارند و سبب بیان مداوم ژن‌ها در سلول‌های میزبان می‌شوند(۱،۲). این وکتورها گروههای سلولی متعددی مانند سلول‌های دستگاه عصبی مرکزی، شبکیه، سلول‌های فیروبلاست، سلول‌های عضلات اسکلتی و قلبی، سلول‌های غدد درون ریز، سلول‌های کبدی و همچنین سلول‌های بنیادی مختلف را مورد هدف قرار می‌دهند. وکتورهای لنتی ویروسی طوری طراحی می‌شوند که ایمن بوده و در میزبان دریافت کننده سبب ایجاد بیماری‌های مرتبط با ویروس نگرددند(۳).

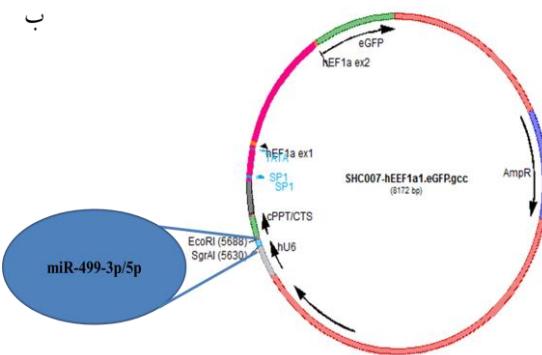
ریز RNA‌ها گروهی از RNA‌های غیر کدکننده کوچک (۲۰-۲۴ نوکلئوتیدی) هستند که در بسیاری از یوکاریوت‌ها بعنوان عناصر تنظیمی پس از رونویسی mRNA یافت می‌شوند و بیان ژن را از طریق مهار ترجمه miRNA یا القاء تجزیه آن کنترل می‌کنند. مولکول‌های mRNA با اتصال به توالی مکمل روی mRNA هدف در ناحیه ۳'-untranslated region-3' (UTR-3') انتهای مولکول mRNA، سبب تنظیم منفی بیان ژن پس از رونویسی می‌شوند و از این طریق فرآیندهای فیزیولوژیکی متعددی از جمله تکثیر سلولی، تمایز، آپوپتوز وغیره را تنظیم می‌کنند(۴،۵). مطالعات نشان داده اند که ریز RNA‌های متعددی در تکامل و تمایز بافت‌های مختلف بدن موجودات ایفای نقش می‌کنند. مطالعه مسیر تمایزی قلب نیز نشان داده است که ریز RNA‌های مختلفی در رشد و تکامل قلب دخیل هستند، که در میان آن‌ها miR-499a نقش مهمی را در ایجاد سلول‌های قلبی

نمونه‌های وکتور اصلی (نمونه‌هایی که miRNA به آنها وارد نشده و یا خود ترکیبی کردند) و وکتورهای حاوی miRNA، تفاوت ایجاد کنند، برش داده شدند. برای تأیید توالي اولیگونوکلئوتیدهای وارد شده به پلاسمید نوترکیب نیز از روش توالي یابی سنگر استفاده شد.

الف

hsa-miR-499a-5p-Forward
CCGGAAACATCACTGCAAGTCTTAACTCGAGTTAAGACTTGCACTGTGATGTTTTTG
 رشته مکمل معکوس
 hsa-miR-499a-5p-Reverse
AATTCAAAAAAACACATCACTGCAAGTCTTAACTCGAGTTAAGACTTGCACTGTGATGTTT
 رشته کد کننده
 hsa-miR-499a-3p-Forward
CCGGAGCACAGACTTGCTGTGATGTTCTCGAGAACATCACAGCAAGTCTGTGCTTTTG
 رشته کد کننده
 hsa-miR-499a-3p-Reverse
AATTCAAAAAAGCACAGACTTGCTGTGATGTTCTCGAGAACATCACAGCAAGTCTGTGCT
 رشته کد کننده

ب



تصویر شماره ۱: طراحی پرایمرهای پیشرو و پیرو برای رشته‌های کد کننده miRNA-499a و کلون کردن آن‌ها در شاتل لنتی ویروسی، الف: توالي‌های سبز روش رشته‌های کد کننده و سبز تیره توالي‌های مکمل معکوس آن را نشان می‌دهند. توالي قرمز رنگ برای ایجاد لوب و تشکیل ساختار سنجاق سری ضروری است و توالي‌های سیاه رنگ نیز جایگاه‌های اثر آنزیمی را مشخص می‌دهند، ب: نقشه ژنتیکی و وکتور SHC007 که در آن بخش‌های مختلف وکتور، جایگاه‌های برش آنزیم‌های EcoRI و SgrAI و محل قرارگیری miRNA-499a نشان داده شده است.

ترانس فکشن سلول‌های HEK-293T
 ابتدا سلول‌های HEK-293T در فلاسک‌های ۱۷۵cm² کشت شدند و زمانی که تراکم سلول‌ها به ۶۵-۷۰ درصد رسید، محیط ترانس فکشن به سلول‌ها

(<http://www.mirbase.org/>) به دست آمد و از این توالي‌ها برای ساخت یک رشته اولیگوریبونوکلئوتیدی استفاده شد. در رشته مذبور، به ترتیب توالي مربوط به جایگاه اثر آنزیم SgrAI، توالي مکمل معکوس توالي کد کننده hsa-miR-499a-5p یا hsa-miR-499a-3p توالي مربوط به جایگاه اثر آنزیم XhoI که به عنوان hsa-miR-499a-3p کد کننده hsa-miR-499a-5p نوکلئوتیدهای T که سیگنال پایان رونویسی برای polymerase III RNA می‌باشند و توالي مربوط به جایگاه اثر آنزیم EcoRI قرار گرفتند. این رشته به عنوان رشته پیشرو در نظر گرفته شد و با توجه به آن رشته پیرو ساخته شد. تصویر شماره ۱-الف، توالي‌های کد کننده و توالي‌های مکمل معکوس را نشان می‌دهد. در ادامه هیبریداسیون دو رشته پیرو و پیشرو انجام شد. برای انجام واکنش هیبریداسیون، اولیگونوکلئوتیدهای پیرو و پیشرو کد کننده miR-499a-3p/5p با غلظت ۱۰۰ μM در دمای اتاق قرار گرفتند. محصول هیبریداسیون توسط فرآیند لیگاسیون وارد شاتل وکتور لنتی ویروسی (Sigma-Aldrich) SHC007 (آلمان) شد. برای انجام لیگاسیون ابتدا این پلاسمید توسط آنزیم‌های EcoRI و SgrAI که هر دو انتهای چسبنده ایجاد می‌کنند برش داده شد. طی واکنش لیگاسیون که در دمای اتاق و به مدت یک ساعت و نیم انجام گرفت، اولیگونوکلئوتیدها با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase (آمریکا) وارد وکتور شدند. تصویر شماره ۱-ب، نقشه ژنتیکی و وکتور SHC007 را نشان می‌دهد. واکنش ترانسفورماسیون و ورود وکتورهای نوترکیب به داخل باکتری *Escherichia coli* سویه Gene Hog با استفاده از شوک حرارتی انجام گردید. واکنش هضم آنزیمی به منظور تأیید ورود صحیح توالي‌های مربوط به ۳p/5p- miR-499a به وکتور مورد نظر انجام شد. بدین ترتیب که وکتورهای لنتی ویروسی مربوط، توسط ۴ آنزیم (XbaI، PstI، HaeII، AccI) که می‌توانستند بین

برداشته شد و سلول‌ها سه مرتبه با PBS شستشو داده شدن، به آن‌ها محیط کشت معمولی حاوی FBS (۱۰ درصد) اضافه شد. کارایی ترانس داکشن با استفاده eGFP از نور فلورسنت سبز ساطع شده توسط enhanced Green Fluorescent Protein (enhanced Green Fluorescent Protein) پس از تأثیر ویروس، بررسی شد.

یافته‌ها

تائید ورود صحیح توالی‌های مربوط به miR-499a-3p و miR-499a-5p

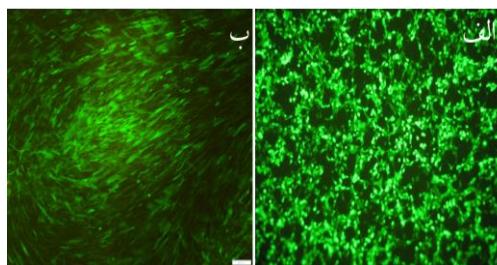
و کتورهای لتنی ویروسی حامل miRNA-499a-3p و کنترل، توسط ۴ آنزیم (XbaI، AccI، HaeII، PvuI) و کنترل، توسط ۴ آنزیم (XbaI، AccI، HaeII، PvuI) برش داده شدند. با توجه به نقشه ژنتیکی و کتور حامل توالی‌های miR-499a-3p در صورت ورود صحیح توالی‌ها به و کتور باید باندهای مشابه با تصویر شماره ۲-الف ایجاد گردد. از آنجایی که و کتورهای مورد نظر از کلون‌های مختلفی بدست آمده بودند، واکنش هضم آنزیمی و کتورهایی که به طور صحیح اولیگونوکلئوتیدها را دریافت کرده بودند را تأیید کرد (تصویر شماره ۲-ب و ج). واکنش توالی‌یابی که به منظور تأیید عدم جهش در بین نوکلئوتیدهای مورد نظر انجام شد تنها صحت توالی وارد شده در برخی و کتورها را تأیید کرد. و کتورهای صحیح حامل توالی‌های miR-499a-3p برای ساخت لتنی ویروس‌های مربوطه استفاده شدند.



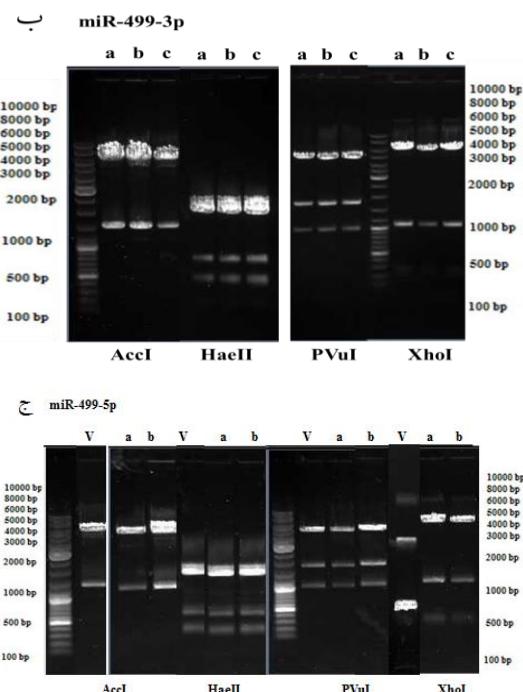
اضافه شد. این محیط حاوی NaCl (۱۵۰ mM)، PEI (PolysciencesEurope)، آلمان)، miR-499a-3p/5p و دو پلاسمید کمکی pLPVSVG و pS-PAX2 به ترتیب با نسبت ۱:۱:۲ بود. پس از قرار گیری سلول‌ها به مدت ۱۶-۱۴ ساعت در این محیط، میزان تنسفکت سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد. سپس محیط ترانس فکشن تعویض شده و پس از شستشوی سلول‌ها با PBS محیط تازه به آن‌ها اضافه گردید.

افزایش خلاصت ویروس‌های به دست آمده پس از ۴۸ ساعت، محیط کشت سلول‌ها که حاوی ذرات ویروسی بود، سانتریفیوژ شد تا سلول‌های موجود در آن حذف گردد. به منظور تخلیص و تغليظ ذرات لتنی ویروسی، محیط کشت حاوی ویروس به فالکون منتقل شده و سوکروز ۲۰ درصد به آن اضافه گردید. به مدت دو ساعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد اولترا سانتریفیوژ شد. ویروس‌های چسبیده به ته فالکون در ۵۰ میکرولیتر BSA (۱ درصد) حل شد و در فریزر -80°C نگهداری شدند.

ترانس داکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان (hBM-MSCs) تعیین خصوصیت شده، از مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و پژوهشی ترمیمی جهاد دانشگاهی مشهد تهیه شدند. سلول‌های مورد نیاز از پاساژ ۳ انتخاب شد و به تعداد 5×10^3 کشت شدند. حدود ۴۸ ساعت پس از کشت سلول‌ها، میزان آن‌ها به حدی رسید که حدود ۸۰ درصد کف فلاسک را پوشاندند. در این مرحله سلول‌های مذکور با ویروس‌های کنترل (ویروس بدون ریز RNA)، ویروس‌های حامل miR499a-3p و miR499a-5p با غلظت ۳ $\mu\text{l}/\text{ml}$ به طور جداگانه یمار شدند. محیط حاوی ویروس به مدت ۱۶ ساعت در مععرض سلول‌ها قرار گرفت و پس از آن به طور کامل



تصویر شماره ۳: بررسی بیان eGFP در سلول های HEK-293T، ب: سلول های بنیادی مزانشیمی. همانطور که در تصویر مشاهده می شود حدود ۸۰ درصد سلول های HEK-293T و درصد سلول های بنیادی مزانشیمی eGFP⁺ بوده و رنگ سبز را نشان داده اند.



تصویر شماره ۲: نتایج حاصل از هضم آنزیمی توسط آنزیم های AccI، PvU1، HaeII و XhoI، الف: اندازه باند های مورد انتظار پس از اثر آنزیم ها بر نمونه های مختلف، ب: باند های ایجاد شده حاصل از هضم آنزیمی در کلون های مختلف از miR-499a-3p، ج: کلون های مختلف با حروف انگلیسی نشان داده شده اند، V (وکتور اصلی که هضم آنزیمی بر روی آن انجام شده است).

ترانس فکشن سلول های HEK-293T
نتایج ترانس فکشن سلول های HEK-293T نشان
داد که حدود ۹۰ درصد از سلول های HEK-293T
eGFP را بیان می کنند (تصویر شماره ۳-الف).

ترانس داکشن سلول های بنیادی مزانشیمی
نتایج ترانس داکشن سلول های بنیادی مزانشیمی
که در معرض ذرات لنتی ویروسی قرار گرفته بودند
نشان داد که در حدود ۸۰ درصد سلول ها پس از
گذشت سه روز eGFP را بیان کردند (تصویر شماره ۳-
ب). از آنجایی که بیان بالای eGFP نشان دهنده بیان
بالای ژن های کلون شده همراه آن می باشد، سلول های
بنیادی مزانشیمی توансند به میزان مناسبی
miR-499a-3p را بیان کنند.

بحث

انفارکتوس قلبی از علل عمدۀ مرگ و میر در جهان بوده و به علت کاهش یا عدم خون رسانی در بخش هایی از قلب و متعاقب آن آسیب به سلول های قلبی ایجاد می گردد(۱۲). یکی از اهداف مهم پزشکی ترمیمی مرتبط با بیماری های قلبی، ترمیم بافت های آسیب دیده و جایگزین نمودن آنها با سلول های عملکردی می باشد(۱۳). منابع سلولی متعددی از جمله سلول های بنیادی جنینی و بالغ، توانایی تمایز به کار迪ومیوسیت ها و بهبود عملکرد قلب پس از پیوند به آن را دارند(۱۴، ۱۵). به دست آوردن تعداد زیادی کار迪ومیوسیت نیازمند اعمالی چون القاء سلول های بنیادی در شرایط *in vitro* و استفاده از روش هایی مانند ورود ژن به این سلول ها و تمایز هدفمند آنها است. با استفاده از وکتورهای ویروسی مانند لنتی ویروس ها می توان القاء مدام و بیان همیشگی ژن های مورد نظر در سلول های هدف را سبب شد(۱۲).

مطالعه مسیر تمایزی قلب نشان می دهد که ژن ها، RNA ها و عوامل متعددی در تکوین و تکامل قلب، تمایز سلول های قلبی و ایجاد کار迪ومیوسیت ها دخیل هستند(۱۶). در این میان مطالعات نوین نشان داده اند که ریز RNA های متعددی سبب تمایز و ایجاد کارديوميسيت ها می شوند که از میان آنها نقش miR-499a به دلیل

می شود. انواعی از سلول های بنیادی همچون سلول های بنیادی رویانی، سلول های بنیادی قلبی انسان و سلول های بنیادی مزانشیمی رت، باللتی ویروس های حامل miR-499a القاء شده و به کار迪ومیوسیت ها بالغ و دارای عملکرد تمایز یافته اند^(۹). بر اساس مطالعات تاکنون ترانس داکشن سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان با لنتی ویروس های حامل miR-499a و miR-499a-3p و ۵p مربوط به آن انجام نشده است. از آنجایی که کارایی ترانس داکشن سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان توسط لنتی ویروس های ساخته شده بالا بوده است، می توان از این ویروس ها در مطالعات مربوط به تمایز سلول های بنیادی و کاربردهای درمانی آنها استفاده نمود (تصویر شماره ۳-ب). همچنین القاء hBM-MSCs توسط لنتی ویروس های حامل رشته های ۳p و ۵p، می تواند نقش متفاوت رشته های ۳p و ۵p را در فرآیند تمایز این سلول ها مشخص سازد. در سال های اخیر، پژوهشی ترمیمی، با هدف جایگزینی بافت های از دست رفته با بافتی زنده و دارای عملکرد مناسب، به عنوان یکی از شاخه های مهم علم پژوهشی، در درمان بیماری های مختلف از جمله بیماری های قلبی، مورد توجه واقع شده است. استفاده از سلول های بنیادی و القاء آنها توسط ریز RNA ها با توجه به کارکردهای مهم آنها، می تواند عملکرد این مولکول ها در فرآیند تمایز را نشان داده و بهینه سازی تمایز سلول های بنیادی به بافت های مورد نظر را سبب گردد.

سپاسگزاری

این مطالعه قسمتی از پژوهه پایان نامه دکترای تخصصی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (طرح پژوهشی شماره ۹۱۰۷۸۷) بوده و با حمایت مالی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده است. نویسنده کان مقاله مراتب قدردانی خود را از همکاری صمیمانه اعضاء آزمایشگاه کار迪ولوژی، مرکز دانشگاه پزشکی لایدن هلند اعلام می دارند.

شرکت در مسیرهای سلولی چندگانه مرتبط با تمایز سلول های قلبی، قابل توجه است^(۱۷). با توجه به مطالب ذکر شده در این مطالعه، ساخت حامل های لنتی ویروسی ناقل miRNA-499a-3p و miRNA-499a-5p گرفت. بدین منظور توالی رشته های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a طراحی و ساخته شده و در پلاسمید ویژه ای کلون شدند.

نتایج حاصل از هضم آنزیمی و توالی یابی، کلون شدن صحیح رشته های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a به داخل پلاسمید لنتی ویروسی را نشان دادند. پس از ساخت لنتی ویروس ها و اثر بر سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان، کارایی ترانس داکشن ویروس های ساخته شده تأیید شد و نتایج نشان داد که تعداد زیادی از سلول های بنیادی مزانشیمی توانسته اند ویروس حامل ریز RNA را دریافت کنند.

مطالعات زیادی نشان داده اند که miRNA-499a در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی بدن نقش داشته و می تواند به عنوان یک نشانگر زیستی در برخی بیماری ها مورد توجه قرار گیرد^(۱۸). به عنوان مثال بیان این ریز RNA در هنگام آسیب بافت مغز افزایش یافته و سطح سرمی آن بالا می رود^(۱۹، ۲۰). مطالعات دیگری نیز نشان داده اند که بیان miRNA-499a بطور مشخصی در انواعی از سرطان تغییر می کند و بیان بالای آن به عنوان یک عامل مهاری در رشد، تکثیر و مهاجرت سلول های سرطانی مانند سرطان ریه و سینه عمل می کند^(۲۱). همان طور که ذکر شد، در بسیاری از مطالعات نقش عملکردی این ریز RNA در فرآیند تکامل قلب و تمایز سلول های قلبی نیز بررسی شده است. مولکول miRNA-499a کنترل بیان تعدادی از رژن های ویژه قلبی را بر عهده دارد که این امر نقش مهم این مولکول زیستی را در تمایز قلب روشن می سازد^(۱۰). افزایش اجباری بیان miRNA-499a، سبب تسریع و پیشرفت تمایز سلول های بنیادی به کار迪ومیوسیت ها

References

1. Barth AS, Kizana E, Smith RR, Terrovitis J, Dong P, Leppo MK, et al. Lentiviral vectors bearing the cardiac promoter of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger report cardiogenic differentiation in stem cells. *Mol Ther* 2008; 16(5): 957-964.
2. Limoni SK, Salimi F, Moghaddam MF. Designing pLEX-LAMP-DARPin Lentiviral Vector for Expression of HER2 Targeted DARPin on Exosome Surface. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2017; 27(151):12-23 (Persian).
3. Allahverdi A, Abroun S, Jafarian A, Soleimani M, Taghikhani M, Eskandari F. Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Insulin Producing Cells by Using A Lentiviral Vector Carrying PDX1. *Cell J* 2015; 17(2): 231-242.
4. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803(11): 1231-1243.
5. Zheng S, Zhang S, Song Y, Guo W, Zhai W, Qiu X, et al. MicroRNA-297a regulates vascular calcification by targeting fibroblast growth factor 23. *Iran J Basic Med Sci* 2016; 19(12): 1331-1336 (Persian).
6. Tao L, Bei Y, Zhou Y, Xiao J, Xinli L. Non-Coding RNAs in Cardiac Regeneration. *Oncotarget* 2015; 6(40): 42613-42618.
7. Tian J, An X, Niu L. Role of microRNAs in cardiac development and disease. *Exp Ther Med* 2017; 13(1): 3-8.
8. Jakob P, Landmesser U. Role of microRNAs in stem/progenitor cells and cardiovascular repair. *Cardiovasc Res* 2012;(4): 614-422.
9. Hosoda T, Zheng H, Cabral-Da-Silva M, Sanada F, Ide-Iwata N, Ogórek B, et al. Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a mircrine mechanism. *Circulation* 2011; 123(12): 1287-1296.
10. Wilson KD, Hu S, Venkatasubrahmanyam S, Fu J, Sun N, Abilez OJ, et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Role for miR-499. *Circ Cardivasc Genet.* 2010; 3(5):426-435.
11. Li X, Wang J, Jia Z, Cui Q, Zhang C, Wang W, et al. MiR-499 regulates cell proliferation and apoptosis during late-stage cardiac differentiation via Sox6 and cyclin D1. *PLoS One* 2013; 8(9): e74504.
12. Zhang L lu, Liu J jin, Liu F, Liu W hua, Wang Y shun, Zhu B, et al. MiR-499 induces cardiac differentiation of rat mesenchymal stem cells through wnt/β-catenin signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 420(4): 875-881.
13. Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, Flaxman A, et al. The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: the global burden of disease 2010 study. *Circulation* 2014; 129(14): 1493-1501.
14. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007;100(9):1249-1260.
15. Rajala K, Pekkanen-mattila M, Aalto-set K. Cardiac Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int* 2011; 2011(1).
16. Serradifalco C, Zummo G, Felice V. MicroRNA and Cardiac Stem Cell Therapy. *J Clin Exp Cardiolg* 2012; S11.
17. Fu JD, Rushing SN, Lieu DK, Chan CW, Kong CW, Geng L, et al. Distinct roles of microRNA-1 and -499 in ventricular specification and functional maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One* 2011; 6(11): e27417.
18. Xin Y, Yang C, Han Z. Circulating miR-499

- as a potential biomarker for acute myocardial infarction. *Ann Transl Med* 2016; 4(7): 7–10.
19. Hu Z, Yu D, Almeida-suhett C, Tu K, Marini AM, Eiden L, et al. Expression of miRNAs and Their Cooperative Regulation of the Pathophysiology in Traumatic Brain Injury. *Plos One* 2012; 7(6): e39357.
20. You WD, Tang QL, Wang L, Lei J, Feng JF, Mao QY, et al. Alteration of microRNA expression in cerebrospinal fluid of unconscious patients after traumatic brain injury and a bioinformatic analysis of related single nucleotide polymorphisms. *Chin J Traumatol* 2016; 19(1): 11-15.
21. Li M, Zhang S, Wu N, Wu L, Wang C, Lin Y. Overexpression of miR-499-5p inhibits non-small cell lung cancer proliferation and metastasis by targeting VAV3. *Nat Publ Gr* 2016; 1-10.