

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

Vajiheh Neshati<sup>1</sup>,  
Samaneh Mollazadeh<sup>2</sup>,  
Bibi Sedigheh Fazly Bazzaz<sup>3,4</sup>,  
Majid Mojarrad<sup>5,6</sup>,  
Zeinab Neshati<sup>7</sup>,  
Mohammad Amin Kerachian<sup>8,9</sup>

<sup>1</sup> PhD Candidate, Biotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>2</sup> PhD in Biotechnology, Biotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>3</sup> Professor, Biotechnology Research Center, Institute of Pharmaceutical Technology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>4</sup> Professor, Pharmaceutical Control Department, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>5</sup> Associate Professor, Medical Genetics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>6</sup> Associate Professor, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>7</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

<sup>8</sup> Assistant Professor, Medical Genetics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>9</sup> 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 سلول های بنیادی مزانشیمی انسان

وجیهه نشاطی<sup>۱</sup>  
سمانه ملازاده<sup>۲</sup>  
بی بی صدیقه فضل‌بزاز<sup>۳</sup>  
مجید مجرد<sup>۴</sup>  
زینب نشاطی<sup>۵</sup>  
محمد امین کراچیان<sup>۶</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** وکتورهای لنتی ویروسی حامل های مناسبی برای انتقال ژن به سلول ها بوده و می توانند سبب بیان بالا و مداوم ژن ها در سلول های میزبان شوند. ریز RNA ها (miRNAs)، گروهی از RNA های غیر کد کننده کوچک هستند که بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه یا القاء تجزیه mRNA کنترل می کنند و از این طریق فرآیندهای زیستی متعددی از جمله تمایز سلولی را تنظیم می نمایند. مطالعاتی نشان داده اند که miRNA-499a در تمایز سلول های بنیادی به سلول های قلبی نقش دارد. با توجه به مطالب ذکر شده، در این مطالعه ساخت وکتور لنتی ویروسی ناقل miRNA-499a جهت استفاده در تمایز سلول های قلبی مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** رشته های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a طراحی و ساخته شده و در پلاسمید ویژه ای کلون شدند. برای اطمینان از ورود صحیح این رشته های نوکلئوتیدی، هضم آنزیمی و توالی یابی انجام گردید. سپس ذرات لنتی ویروسی حامل رشته های miRNA-499a-3p و miRNA-499a-5p ساخته شدند و برای ترانس داکشن سلول های مزانشیمی مغز استخوان انسان مورد استفاده قرار گرفتند.

**یافته ها:** نتایج حاصل از هضم آنزیمی و توالی یابی، کلون شدن صحیح رشته های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a به داخل پلاسمید را نشان دادند. بیان بالای eGFP نشان دهنده کارایی بالایی ترانس فکشن و ترانس داکشن بود. ویروس های حامل رشته های miRNA-499a-3p/5p ساخته شده، توانستند سبب ترانس داکشن سلول های بنیادی مزانشیمی گردند. **استنتاج:** در این مطالعه حامل های لنتی ویروسی ناقل miRNA-499a-3p/5p تولید شدند، که با توجه به میزان مناسب ترانس داکشن سلول های بنیادی مزانشیمی، می توانند در تمایز این سلول ها به سلول های قلبی مورد استفاده قرار گیرند.

**واژه های کلیدی:** لنتی ویروس، ریز RNA، تمایز

## مقدمه

وکتورهای مختلفی جهت انتقال ژن در فرآیندهای دستکاری ژنتیکی سلول ها مورد استفاده قرار می گیرند که از لحاظ نحوه آلوده سازی، ورود به سلول و هم چنین پایداری در سلول های میزبان، با یکدیگر متفاوت

E-mail: fazlis@mums.ac.ir

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

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲. دکتری تخصصی بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳. استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو 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، دانشکده 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

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

می‌باشند. یکی از مناسب‌ترین و کتورها برای انتقال و بیان ژن‌های مورد نظر، وکتورهای لنتی ویروسی می‌باشد. از مهم‌ترین وکتورهای لنتی ویروسی وکتورهای هستند که بر پایه ویروس *HIV-1* ساخته می‌شوند. ویروس *HIV* یک رترو ویروس و عضوی از زیر خانواده لنتی ویریده 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 (۲۰، ۲۱). این وکتورها گروه‌های سلولی متعددی مانند سلول‌های دستگاه عصبی مرکزی، شبکه، سلول‌های فیروبلست، 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 نگردند (۳).

ریز RNA ها گروهی از RNA های غیر کد کننده کوچک (۲۴-۲۰ نوکلئوتیدی) هستند که در بسیاری از یوکاریوت‌ها به نوان عناصر تنظیمی پس از رونویسی یافت می‌شوند و بیان ژن را از طریق مهار ترجمه mRNA یا القاء تجزیه آن کنترل می‌کنند. مولکول‌های miRNA با اتصال به توالی مکمل روی mRNA هدف در ناحیه 3'-UTR (untranslated region-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 و غیره را تنظیم می‌کنند (۵، ۴). مطالعات نشان داده اند که ریز RNA های متعددی در تکامل و تمایز بافت‌های مختلف بدن موجودات ایفای نقش می‌کنند. مطالعه مسیر تمایزی قلب نیز نشان داده است که ریز RNA های مختلفی در رشد و تکامل قلب دخیل هستند، که در میان آن‌ها miR-499a نقش مهمی را در ایجاد سلول‌های قلبی

(کاردیومیوسیت‌ها) ایفا می‌کند (۸-۶). miR-499a توسط ژن *Myl7b* 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-لوپ بوده و هر دو پس از پردازش، اولیگونوکلئوتیدهای 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 (۱۱-۸). 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 اجباری 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 دایمی این ریز RNA در سلول‌های ترنسداکت شده گشتند. با استفاده از این حامل لنتی ویروسی و افزایش بیان پایدار 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.

طراحی، ساخت و کلون کردن *miR-499a*

توالی‌های بالغ hsa-miR-499a (hsa-miR-)

3p-499a و 5p-499a (hsa-miR-499a) از سایت miRBase

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

## الف

```

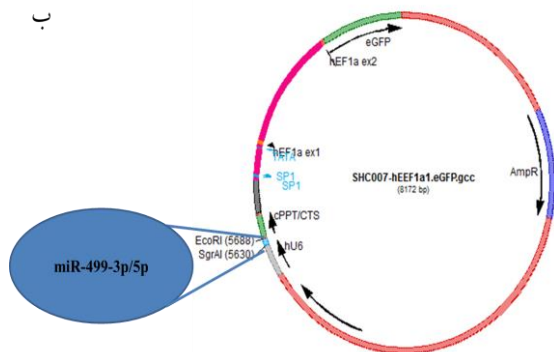
hsa-miR-499a-5p-Forward
CCGGAACATCACTGCAAGCTTAACTCGAGTTAAGACTTGCAGTGTGTTTTTTTG
    رشته مکمل معکوس           رشته کدکننده

hsa-miR-499a-5p-Reverse
AATTCAAAAAAGCATCACTGCAAGCTTAACTCGAGTTAAGACTTGCAGTGTGTTTT
    رشته کدکننده           رشته مکمل معکوس

hsa-miR-499a-3p-Forward
CCGAGACACAGACTTGTGTGATGTCTCGAACAATCACAGCAAGTCTGTGCTTTTTTG
    رشته مکمل معکوس           رشته کدکننده

hsa-miR-499a-3p-Reverse
AATTCAAAAAGCACAGACTTGTGTGATGTCTCGAACAATCACAGCAAGTCTGTGCT
    رشته کدکننده           رشته مکمل معکوس
  
```

## ب



تصویر شماره ۱: طراحی برایم‌های پیشرو و پیرو برای رشته‌های کدکننده miRNA-499a و کلون کردن آن‌ها در شاتل لنتی ویروسی، الف: توالی‌های سبز روشن رشته‌های کدکننده و سبز تیره توالی‌های مکمل معکوس آن‌ها را نشان می‌دهند. توالی قرمز رنگ برای ایجاد لوپ و تشکیل ساختار سنجاج سری ضروری است و توالی‌های سیاه رنگ نیز جایگاه‌های اثر آنزیمی را شکل می‌دهند، ب: نقشه ژنتیکی 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 ۱۷۵cm<sup>2</sup> کشت شدند و زمانی که تراکم سلول‌ها به ۷۰-۶۵ درصد رسید، محیط ترانس فکشن به سلول‌ها

(<http://www.mirbase.org/>) به دست آمد و از این توالی‌ها برای ساخت یک رشته اولیگونوکلئوتیدی استفاده شد. در رشته مزبور، به ترتیب توالی مربوط به جایگاه اثر آنزیم SgrAI، توالی مکمل معکوس توالی کدکننده hsa-miR-499a-3p یا hsa-miR-499a-5p توالی مربوط به جایگاه اثر آنزیم XhoI که به عنوان لوپ عمل می‌کند، توالی کدکننده hsa-miR-499a-3p یا hsa-miR-499a-5p، نوکلئوتیدهای T که سیگنال پایان رونویسی برای RNA polymerase III می‌باشند و توالی 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، توالی‌های کدکننده و توالی‌های مکمل معکوس را نشان می‌دهد. در ادامه هیبریداسیون دو رشته پیرو و پیشرو انجام شد. برای انجام واکنش هیبریداسیون، الیگونوکلئوتیدهای پیرو و پیشرو کدکننده miR-499a-3p/5p با غلظت ۱۰۰ μM تهیه، و مخلوط شدند و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. محصول هیبریداسیون توسط فرآیند لیگاسیون وارد شاتل وکتور لنتی ویروسی SHC007 (Sigma-Aldrich، 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 (Fermentase، آمریکا) وارد وکتور شدند. تصویر شماره ۱-ب، نقشه ژنتیکی وکتور SHC007 را نشان می‌دهد. واکنش ترانسفورماسیون و ورود وکتورهای نو ترکیب به داخل باکتری *Escherichia coli* سویه Gene Hog با استفاده از شوک حرارتی انجام گردید. واکنش هضم آنزیمی به منظور تأیید ورود صحیح توالی‌های مربوط به 3p/5p-miR-499a به وکتور مورد نظر انجام شد. بدین ترتیب که وکتورهای لنتی ویروسی مربوط، توسط ۴ آنزیم (XhoI، PVuI، HaeII، AccI) که می‌توانستند بین

برداشته شد و سلول‌ها سه مرتبه با PBS شستشو داده شدند، به آن‌ها محیط کشت معمولی حاوی FBS (۱۰ درصد) اضافه شد. کارایی ترانس داکشن با استفاده از نور فلورسنت سبز ساطع شده توسط eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein)، ۷۲ ساعت پس از تأثیر ویروس، بررسی شد.

## یافته‌ها

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

وکتورهای لنتی ویروسی حامل *miRNA-499a-3p/5p* و کنترل، توسط ۴ آنزیم (PVuI، HaeII، AccI) و XhoI) برش داده شدند. با توجه به نقشه ژنتیکی وکتور حامل توالی‌های *miR-499a-3p/5p* در صورت ورود صحیح توالی‌ها به وکتور باید باندهایی مشابه با تصویر شماره ۲-الف ایجاد گردد. از آنجایی که وکتورهای مورد نظر از کلون‌های مختلفی بدست آمده بودند، واکنش هضم آنزیمی وکتورهایی 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 وکتورها را تأیید کرد. وکتورهای صحیح حامل توالی‌های *miR-499a-3p/5p* برای ساخت لنتی ویروس‌های مربوطه استفاده شدند.



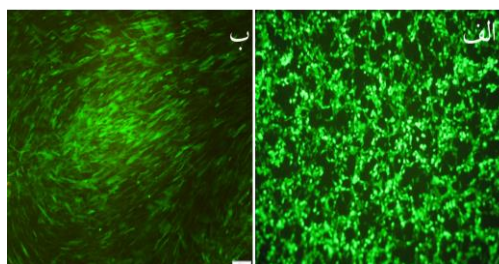
اضافه شد. این محیط حاوی NaCl (۱۵۰ mM) و پلی اتیلن ایمین (PolysciencesEurope (PEI، آلمان)، پلاسמיד حامل *miR-499a-3p/5p* و دو پلاسמיד کمکی pLPVSVG، psPAX2 به ترتیب با نسبت ۱:۱:۲ بود. پس از قرارگیری سلول‌ها به مدت ۱۶-۱۴ ساعت در این محیط، میزان ترنسفکت سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد. سپس محیط ترانس فکشن تعویض شده و پس از شستشوی سلول‌ها با PBS محیط تازه به آن‌ها اضافه گردید.

افزایش غلظت ویروس‌های به دست آمده

پس از ۴۸ ساعت، محیط کشت سلول‌ها که حاوی ذرات ویروسی بود، سانتریفیوژ شد تا سلول‌های موجود در آن حذف گردند. به منظور تخلیص و تغلیظ ذرات لنتی ویروسی، محیط کشت حاوی ویروس به فالكون 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 فالكون در ۵۰۰ ماکرولیت BSA (۱ درصد) حل شد و در فریزر  $-80^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند.

ترانس داکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی

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

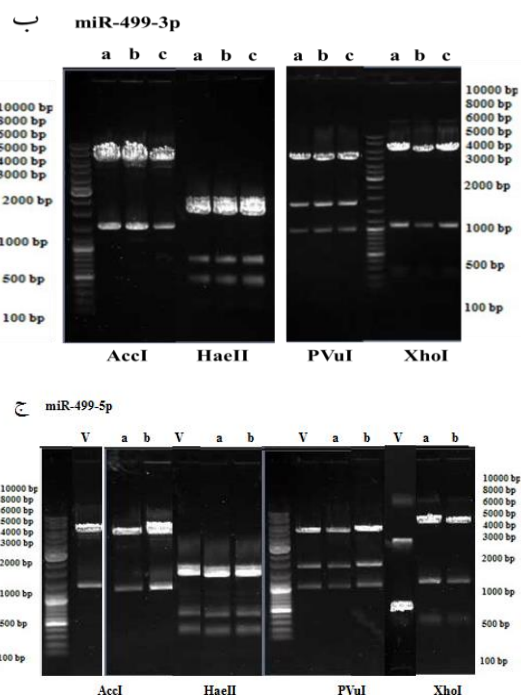


تصویر شماره ۳: بررسی بیان eGFP. الف: بیان eGFP در سلول های HEK-293T، ب: سلول های بنیادی مزانشیمی. همانطور که در تصویر مشاهده می شود حدود ۸۰ درصد سلول های HEK-293T و ۷۰ درصد سلول های بنیادی مزانشیمی eGFP<sup>+</sup> بوده و رنگ سبز را نشان داده اند.

## بحث

انفارکتوس قلبی از علل عمده 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 آن ها با سلول های عملکردی می باشد (۱۳). منابع سلولی متعددی از جمله سلول های بنیادی جنینی و بالغ، توانایی تمایز به کاردیومیوسیت ها و بهبود عملکرد قلب پس از پیوند به آن را دارند (۱۴، ۱۵). به دست آوردن تعداد زیادی کاردیومیوسیت 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 آن ها است. با استفاده از وکتورهای ویروسی مانند لنتی ویروس ها می توان القاء مداوم 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، ریز RNA ها و عوامل متعددی در تکوین و تکامل قلب، تمایز سلول های قلبی و ایجاد کاردیومیوسیت ها دخیل هستند (۱۶). در این میان مطالعات نوین نشان داده اند که ریز RNA های متعددی سبب تمایز و ایجاد کاردیومیوسیت ها می شوند که از میان آن ها نقش miR-499a به دلیل



تصویر شماره ۲: نتایج حاصل از هضم آنزیمی توسط آنزیم های ACCI، HaeII، PVuI 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: miR-499a-5p، 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 توانستند به میزان مناسبی miR-499a-3p/5p را بیان کنند.

می‌شود. انواعی از سلول‌های بنیادی هم‌چون سلول‌های بنیادی رویانی، سلول‌های بنیادی قلبی انسان و سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت، با لنتی ویروس‌های حامل miR-499a القاء شده و به کاردیومیوسیت‌ها بالغ و دارای عملکرد تمایز یافته‌اند (۹، ۱۰، ۱۲). بر اساس مطالعات تاکنون ترانس داکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان با لنتی ویروس‌های حامل miR-499a و رشته‌های ۳p و ۵p مربوط به آن انجام نشده است. از آنجایی که کارایی ترانس داکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان توسط لنتی ویروس‌های ساخته شده بالا بوده است، می‌توان از این ویروس‌ها در مطالعات مربوط به تمایز سلول‌های بنیادی و کاربردهای درمانی آن‌ها استفاده نمود (تصویر شماره ۳-ب). همچنین القاء hBM-MSCs، توسط لنتی ویروس‌های حامل رشته‌های ۳p و ۵p miR-499a، می‌تواند نقش متفاوت رشته‌های ۳p و ۵p را در فرآیند تمایز این سلول‌ها مشخص سازد. در سال‌های اخیر، پزشکی ترمیمی، با هدف جایگزینی بافت‌های از دست رفته با بافتی زنده و دارای عملکرد مناسب، به عنوان یکی از شاخه‌های مهم علم پزشکی، در درمان بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های قلبی، مورد توجه واقع شده است. استفاده از سلول‌های بنیادی و القاء آن‌ها توسط ریز RNA‌ها با توجه به کارکردهای مهم آن‌ها، می‌تواند عملکرد این مولکول‌ها در فرآیند تمایز را نشان داده و بهینه‌سازی تمایز سلول‌های بنیادی به بافت‌های مورد نظر را سبب گردد.

## سپاسگزاری

این مطالعه قسمتی از پروژه پایان‌نامه 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. نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از همکاری صمیمانه اعضای آزمایشگاه کاردیولوژی، مرکز دانشگاه پزشکی لایدن هلند اعلام می‌دارند.

شرکت در مسیرهای سلولی چندگانه مرتبط با تمایز سلول‌های قلبی، قابل توجه است (۱۷). با توجه به مطالب ذکر شده در این مطالعه، ساخت حامل‌های لنتی ویروسی ناقل miRNA-499a-3p و miRNA-499a-5p جهت القاء سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور توالی رشته‌های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a طراحی و ساخته شده و در پلاسמיד ویژه ای کلون شدند.

نتایج حاصل از هضم آنزیمی و توالی‌یابی، کلون شدن صحیح رشته‌های ۳p و ۵p مربوط به miRNA-499a به داخل پلاسמיד لنتی ویروسی را نشان دادند. پس از ساخت لنتی ویروس‌ها و اثر بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان، کارایی ترانس داکشن ویروس‌های ساخته شده تأیید شد و نتایج نشان داد که تعداد زیادی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانسته‌اند ویروس حامل ریز RNA را دریافت کنند.

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که miRNA-499a در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی بدن نقش داشته و می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی در برخی بیماری‌ها مورد توجه قرار گیرد (۱۸). به عنوان مثال بیان این ریز RNA در هنگام آسیب بافت مغز افزایش یافته و سطح سرمی آن بالا می‌رود (۱۹، ۲۰). مطالعات دیگری نیز نشان داده‌اند که بیان miRNA-499a بطور مشخصی در انواعی از سرطان تغییر می‌کند و بیان بالای آن به عنوان یک عامل مهاری در رشد، تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی مانند سرطان ریه و سینه عمل می‌کند (۲۱). همان‌طور که ذکر شد، در بسیاری از مطالعات نقش عملکردی این ریز RNA در فرآیند تکامل قلب و تمایز سلول‌های قلبی نیز بررسی شده است. مولکول miRNA-499a کنترل بیان تعدادی از ژن‌های ویژه قلبی را بر عهده دارد که این امر نقش مهم این مولکول زیستی را در تمایز قلب روشن می‌سازد (۱۰). افزایش اجباری بیان miR-499a، سبب تسریع و پیشرفت تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت‌ها

## References

- Barth AS, Kizana E, Smith RR, Terrovitis J, Dong P, Leppo MK, et al. Lentiviral vectors bearing the cardiac promoter of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger report cardiogenic differentiation in stem cells. *Mol Ther* 2008; 16(5): 957-964.
- 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).
- 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.
- Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803(11): 1231-1243.
- 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).
- Tao L, Bei Y, Zhou Y, Xiao J, Xinli L. Non-Coding RNAs in Cardiac Regeneration. *Oncotarget* 2015; 6(40): 42613-42618.
- Tian J, An X, Niu L. Role of microRNAs in cardiac development and disease. *Exp Ther Med* 2017; 13(1): 3-8.
- Jakob P, Landmesser U. Role of microRNAs in stem/progenitor cells and cardiovascular repair. *Cardiovasc Res* 2012;(4): 614-422.
- 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.
- 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 Cardiovasc Genet.* 2010; 3(5):426-435.
- 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.
- 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/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 420(4): 875-881.
- 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.
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007;100(9):1249-1260.
- Rajala K, Pekkanen-mattila M, Aalto-set K. Cardiac Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int* 2011; 2011(1).
- Serradifalco C, Zummo G, Felice V. MicroRNA and Cardiac Stem Cell Therapy. *J Clin Exp Cardiolg* 2012; S11.
- 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.
- 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.