ژنتیک نوین
دوره چهارم، شماره ٤، زمستان ١٣٨٨
صفحه٦٩-٦١

طراحی و ساخت حامل لنتی ویروس اینتگراز منفی جهت استفاده در ژن درمانی

داود نوری اینانلو[1و2و3]، سیروس زینلی[3]، حسین خان احمد[2]، موسی گردانه[1]، تورج فرازمندفر[2]، حسام موثق[2]، باقر یخچالی*[1]

۱- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
۲- انستیتو پاستور ایران، مجتمع تحقیقاتی – تولیدی، بخش ب ث ژ
۳- انستیتو پاستور ایران ، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش پزشکی مولکولی
*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Bahar@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

ژن درمانی با استفاده از روش هدف گیری ژنی (Gene targeting) یکی از بهترین روش‌های درمان نقائص ژنتیکی خصوصاً بیماری‌های تک ژنی است. اما این روش برخلاف روش استفاده از حامل‌های ویروسی از کارایی پائینی برخوردار است. هدف این تحقیق طراحی و ساخت یک حامل لنتی ویروس فاقد عملکرد پروتئین اینتگراز است که بتواند با کارائی بالا وارد سلول شده ولی قادر به ادغام شدن در ژنوم سلول نباشد. در این تحقیق پس ازترانسداکت سلول‌های T۲۹۳ با ویروس‌های طبیعی و نوترکیب، در صد پروتئین eGFP در سلول‌های ترانسداکت شده با ویروس‌های طبیعی پس از دو هفته کاهش ناچیزی داشت، در حالیکه در ویروس اینتگراز منفی پس از زمان فوق کاهش معنی‌داری مشاهده گردید. نتایج نشان دهنده این است که ژنوم ویروس نوترکیب به صورت اپی زومال بوده و با کارائی کمتری در ژنوم سلول ادغام می‌شود که به نوبه خود کمترین اثر نامطلوب در بیان سایر ژن‌های سلول را باعث می‌شود. بنابر این با این سیستم امکان جایگزینی ژن معیوب با ژن سالم بدون وارد شدن تصادفی حامل ویروسی در ژنوم میزبان وجود دارد.

واژه‌های کلیدی

حامل لنتی ویروس،
اینتگراز،
ژن درمانی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.6.6]

مقدمه

ژن درمانی، انتقال مواد ژنتیکی به منظور دست یابی به اثرات درمانی در سلولهای هدف است. ژن درمانی در درمان بیماری‌های تک ژنی نظیر هموفیلی، تالاسمی، فیبروز سیستیک، سرطان‌ها، بیماری‌های عفونی و قلبی عروقی مورد استفاده قرار گرفته است (۱). در حال حاضر در اغلب پروژه‌های ژن درمانی از حامل‌های ویروسی استفاده می‌شود. کارائی این حامل‌ها برای ارائه ژن به سلول بسیار بالا است (۲). در اغلب این حامل‌ها جایگزین شدن ژن مورد نظر در ژنوم بصورت تصادفی صورت می‌گیرد و این مسئله می‌تواند باعث خاموش شدن ژن‌های مفید مانند ژن‌های سرکوب کننده تومور یا فعال شدن ژن‌های مضرمانند انکوژن‌ها و ایجاد مسائلی مانند بدخیمی‌شود (۳). اخیراً بعلت وجود معایب فوق توجه بیشتری به روش هدف‌گیری ژنی (Gene targeting) برای ژن درمانی شده است. حامل‌های مختلفی جهت انتقال ژن وجود دارند، یکی از مناسب‌ترین حامل‌ها برای انتقال و بیان ژن‌های نوترکیب حامل لنتی ویروسی است (۴). حامل‌های لنتی ویروسی مشتق از HIV-1 توانائی آلوده کردن سلول‌های در حال تقسیم میتوز و فاقد قابلیت تقسیم را دارند و می‌توانند داخل ژنوم میزبان شوند. سلول‌های هدف حامل لنتی ویروسی انواع سلول‌های تمایز یافته نظیر سلول‌های کبدی، سلول‌های عصبی نظیر سلول‌های میکروگلیال و سلول‌های خونی هستند (۵). حذف ژن‌های اصلی، فرعی و تنظیمی وهمچنین جهش‌های حذفی (حذف ۴۰۰ نوکلئوتید از ناحیه U3) در نواحی ضروری توالی 3′LTR که مرتبط با افزاینده (Enhancer) و راه انداز (Promoter) است منجر به غیر فعال‌سازی نسخه‌برداری از پرووِیروس شده و حامل‌های حاصل از این جهش‌ها، تحت عنوان حامل‌های SIN (Self Inactivating Vector) یا حامل‌های خود غیر فعال شونده نامیده می‌شوند. این حامل‌ها به حامل‌های نسل سوم لنتی ویروسی موسوم بوده و ایمن و مناسب انتقال ژن‌های نوترکیب هستند (۶). درچرخه آلوده نمودن سلول‌های هدف گلیکوپروتئین‌های پوشش ویروس HIV-1 به گیرنده‌های اختصاصی سلول متصل و با روشی وابسته به pH محیط، ویروس وارد سیتوپلاسم سلول هدف می‌شود. پس از ورود ویروس به سیتوپلاسم، نسخه برداری از ژنوم توسط آنزیم نسخه بردار معکوس (Reverse transcriptase) آغاز و به کمک tRNA اختصاصی لیزین سلول (tRNA–Lys3) به عنوان آغازگر صورت می‌گیرد. tRNA–Lys3 به محل اتصال آغازگر (Primer binding site =PBS) متصل و سنتز cDNA آغاز می‌شود، سپس پرش‌های 5′-LTR به ناحیه R انتهای 3′ ژنوم انجام شده و هیبرید RNA-DNA تشکیل می‌شود. در مرحله بعد RNA الگو تجزیه شده و رشته مکمل DNA نیز ساخته می‌شود. به این ترتیب در طرفین DNA دو رشته‌ای حاصل توالی‌های 5′-LTR و 3′-LTR تشکیل می‌شود. مولکول‌های DNA حاصل به همراه پروتئین‌های ماتریکسی (Matrix Protein)، اینتگراز (Integrase)، پروتئین R ویروسی (Viral protein R=Vpr) و سایر فاکتورهای سلولی، مجموعه ادغام شونده اولیه (pre-integration complex=PIC) نامیده می‌شوند. آنزیم‌های اینتگراز دارای توالی‌هائی هستند که به پروتئین ایمپورتین α و سپس این مجموعه به ایمپورتین β متصل می‌شوند. این مجموعه PIC به جایگاه منافذ هسته هدایت و وارد هسته سلول می‌شود(۷). داخل هسته میزبان ابتدا cDNA از ناحیه LTR ها و به کمک ۴ تا ۶ نوکلئوتید انتهائی خود به صورت حلقوی در آمده و توسط آنزیم اینتگراز که ژنوم میزبان را به طور تصادفی می‌برد در محل بریده شده وارد ژنوم میزبان می‌شود (۸) که در این حال به آنها پرووِیروس اطلاق می‌گردد. سپس RNA ویروسی به کمک RNA پلی مراز II میزبان رونویسی شده و همراه با سایر پروتئین‌های ساختاری، ویروس‌های جدید بسته‌بندی و با انهدام سلول میزبان از آن خارج می‌شوند. ترادف cPPT (centeral polypurine tract) در حامل لنتی ویروسی سبب تسهیل عبور حامل از سیتوپلاسم به هسته سلول‌های هدف غیر قابل تقسیم می‌شود (۹). همچنین ترادف PRE (posttranscriptional regulatory element) باعث انتقال RNA از هسته به سیتوپلاسم می‌شود (۱۰). توالی پاسخ دهنده به Rev (Rev responce element) نیز سبب تسهیل خروج mRNA و تنظیمات پس از نسخه‌برداری آن می‌گردد (۱۱). ادغام شدن (Integration) یکی از مراحل اجباری در همانندسازی همه رتروویروس‌ها است و توسط پروتئین اینتگراز صورت می‌گیرد . آنزیم اینتگراز به وسیله ژن *pol* ویروس کد و به عنوان قسمتی از

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.6.6]

پلی پروتئین Gag -Pol ترجمه شده و به وسیله آنزیم پروتئاز (که توسط ویروس کد می‌شود)، پیرایش و به شکل بالغ خود می‌رسد. مشخص شده که این پروتئین دارای سه ناحیه ساختمانی (۱۳و۱۲) شامل ناحیه N – انتهایی که متشکل از ۵۰ اسید آمینه با یک بخش اتصال به اتم روی، ناحیه مرکزی متشکل از ۱۶۰ اسید آمینه با سه موقعیت به شدت محافظت شده (در ویروس HIV-1 شامل اسید آمینه های، اسید آسپارتیک ۶۴، اسید آسپارتیک ۱۱۶ و اسید گلوتامیک ۱۵۲) که جانشینی هر کدام از این اسیدهای آمینه منجر به از دست رفتن عملکرد پروتئین اینتگراز می‌شود و ناحیه C–انتهائی که شامل ۷۵ اسید آمینه می باشد که به طور غیر اختصاصی به DNA متصل می‌گردد. برای ایجاد حامل‌های غیر اینتگره شونده لنتی ویروس از دو نوع جهش استفاده می‌شود. جهش نوع یک ایجاد یک یا چند جهش نقطه‌ای در ژن اینتگراز است که منجر به جایگزینی یک اسید آمینه در ژن اینتگراز بدون ایجاد خللی در فعالیت‌هایی از جمله: ورود ژنوم ویروس به هسته سلول، سنتز DNA ویروس و بسته‌بندی ویروس و در نتیجه حلقوی شدن ژنوم به وسیله آنزیم‌های میزبان می‌شود. این ژن‌های حلقوی به عنوان الگوهایی کارا برای ماشین رونویسی سلول میزبان شناخته می‌شوند. جهش نوع دو شامل حذف قسمتی از ژن اینتگراز است که نوع جهش بر روی ورود ژنوم ویروس به هسته سلول میزبان اثر می‌گذارد (۱۴). هدف از این مطالعه ساخت حامل لنتی ویروس فاقد عملکرد پروتئین اینتگراز می‌باشد که بتواند با کارائی بالا وارد سلول شده ولی قادر به ادغام شدن در ژنوم سلول نباشد. سازه ژنی وارد شده در حامل لنتی ویروسی پس از ورود به هسته سلول با استفاده از پدیده نوترکیبی همسان جایگزین ژن مورد نظر می‌شود، به طوریکه هیچ جزئی از ژنوم ویروس داخل ژنوم سلول نگردد.

مواد و روش‌ها

تکثیر، کلونینگ و ترادف یابی

مجموعه پلاسمیدهای سازنده لنتی ویروسی pLP1، pLP2 و pLP/VSV-G (Invitrogen) تهیه گردید. از آنجائیکه برای تفکیک این سه پلاسمید و استفاده آنها به صورت انفرادی نیاز به تمایز آنها بصورت خطی در ژل آگاروز در الکتروفورز است. توالی‌های این سه پلاسمید توسط نرم افزار Gene runner V.3.0.1 از نظر مکان برش با آنزیم‌های برش دهنده اختصاصی بررسی شد و تنها یک جایگاه برش مشترک برای دو آنزیم *Age*I و *Mlu*I در سه پلاسمید وجود داشت. بدین ترتیب دو آنزیم *Age*I و *Mlu*I انتخاب شدند که با استفاده همزمان آنها در یک واکنش هضم آنزیمی در مخلوطی از سه پلاسمید pLP1، pLP2 و pLP/VSV-Gدر هر پلاسمید تنها یک برش ایجاد شده و آنها به صورت خطی در آورده می‌شوند. سه پلاسمید pLP1 ، pLP2 و pLP/VSV-G با هضم آنزیمی توسط دو آنزیم محدود الاثر *Age*I و *Mlu*I بصورت خطی در آمده، محصول هضم آنزیمی این پلاسمید در ژل آگاروز الکتروفورز و باندهای مربوطه از روی ژل بریده و DNA آن با کیت (Qiagen) از ژل استخراج گردید. هر کدام از پلاسمیدهای خطی بدست آمده سپس با آنزیم T4 DNA لیگاز بصورت حلقوی در آمده و محصول آن به باکتری *Eschrichia coli* Top10F´ مستعد شده منتقل شد. پس از رشد و بررسی کلون‌ها، یک کلنی از هر فرآیند انتقال در محیط LB مایع (Merck) حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی سیلین تکثیر و با کیت استخراج پلاسمید (Fermentas) ، پلاسمید موجود در باکتری تخلیص و با واکنش هضم آنزیمی صحت پلاسمیدهای pLP1، pLP2 و pLP/VSV-G بر اساس روش‌های استاندارد بررسی شد(۱۵). کلیه دستکاری‌های مولکولی از قبیل تخلیص پلاسمید و DNA، کلونینگ و واکنش‌های آنزیمی بر اساس دستورالعمل شرکت های سازنده کیت انجام شد. تهیه همه آنزیم های اندونوکلئاز با اثر محدود و T4 DNA لیگاز از شرکت فرمنتاز تهیه و ساخت آغازگرها نیز در شرکت ژن فن‌آوران انجام شد.

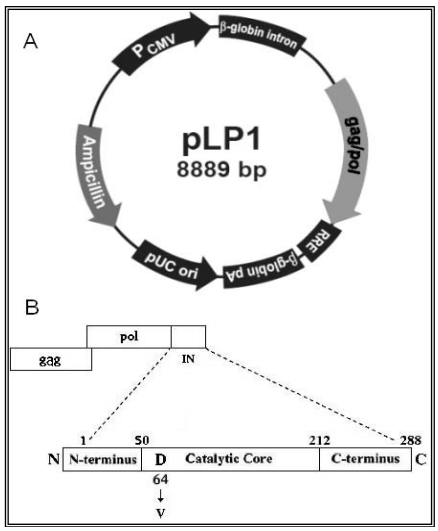
ایجاد جهش در ژن اینتگراز

ژن اینتگراز در انتهای مجموعه ژن *gag-pol* در پلاسمید pLP1 واقع است. برای جهش در این ژن برای از بین بردن عملکرد آن در ناحیه هسته کاتالیتیک اینتگراز، با استفاده از روش overlap extension PCR (۱۶) یک جهش معنی‌دار در کدون اسید آمینه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.6.6]

D64 ایجاد کرده و کد ژنتیکی اسید آمینه آسپارتیک اسید به کدون والین تغییر داده شد (شکل ۱).



شکل (۱)- ژن gag-pol در پلاسمید pLP1 (A)، محل ایجاد جهش در ژن اینتگراز (B).

با استفاده از نرم‌افزار gene runner و بررسی توالی ژن اینتگراز در پلاسمید pLP1 آغازگرهای مناسب (جدول ۱) طراحی شدند.

آغازگر	*توالی آغازگر*
F1	5´AAGAACCGGTACATGGAGTG3´
R1 int-	5´TTCTAAATGTGTACA*TA*CTAGCTGC3´
F2 int-	5´AGCTAG*TA*TGTACACATTTAGAAGG3´
R2	5´TTGTACTTGCTGTCTTAAGATGTTC3´

جدول (۱)- آغازگرهای مورد استفاده در ایجاد جهش در ژن اینتگراز. محل شناسائی آنزیم‌های محدود الاثر و محل ایجاد جهش مشخص شده است.

ابتدا با آغازگرهای F1, -R1 int و همچنین -F2 int, R2 واکنش PCR (جدول ۲) انجام شد. محصولات PCR ۱و۲ پس از الکتروفورز از ژل آگاروز استخراج گردید. سپس قطعه DNA حاصل تکثیر شد. واکنش overlap extension PCR با استفاده از محصول PCR ۱ و۲ به عنوان الگو انجام و محصول overlap extension PCR از ژل آگاروز استخراج گردید.

سیکل	زمان	درجه حرارت	مراحل
	۲´	۹٤°C	۱
	۲´	٤۸°C	۲
	۳۰´´	۹٤°C	۳
	۲´	٤۸°C	٤
	۳٥´´	۹٤°C	٥
	۱´	٥۲°C	٦
	۱´	۷۲°C	۷
۳۰		Go to step 5	۸
	۱۰´	۷۲°C	۹
	۱۰´	Hold at 4	۱۰

جدول (۲)- برنامه Overlap extension PCR .

کلون کردن محصول PCR نهایی در پلاسمید pLP1

پلاسمید pLP1 و محصول PCR مرحله نهایی overlap extension توسط آنزیم‌های برش‌دهنده اختصاصی *Age*I و *Afl*II هضم آنزیمی شدند. پس از الکتروفورز، باند مربوطه بریده و DNA آن استخراج شد. واکنش اتصال (Ligation) بین آنها انجام و محصول واکنش اتصال به *E.coli* Top10 F´ منتقل شد. کلون‌های بدست آمده با آنزیم‌های *Age*I و *Afl*II هضم آنزیمی شدند وبرای تایید جهش ایجاد شده در موقعیت D64 تعیین توالی شد.

تولید لنتی ویروس طبیعی و اینتگراز منفی در رده سلولی 293T

رده سلولی 293T از سلول‌های جنینی انسان مشتق شده است و آنتی ژن T ویروس SV40 را به طور پایدار بیان می‌کند و توانایی بالایی در تولید ویروس در تیتر بالا دارد. رشد این سلول‌ها بسیار سریع و راندمان ترانسفکشن در آنها بسیار بالاست (۱۳).

دو مجموعه پلاسمید بسته‌بندی (packaging) شامل pLP1 طبیعی و جهش‌یافته، pLP2 وpLP/VSV-G به همراه پلاسمید DEST حاوی ژن گزارشگر(pLOX-CW*gfp*) با استفاده از کیت BLOCK-IT Inducible H1 Lentiviral RNAi System (Invitrogen) جهت تولید ویروس به داخل سلول 293T منتقل شد. ابتدا کمپلکس2000 ™lipofectamin – DNA آماده شد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.6.6]

سلول‌های 293T (بانک سلولی ایران، C498) با تراکم $۱/۲ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی لیتر تهیه شد. کمپلکس DNA – lipofectamin™ 2000 به بشقاب‌های کشت سلولی (Plate) ۱۰ سانتی‌متری حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت Opti-MEM®I حاوی سرم و بدون آنتی بیوتیک اضافه شد. ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی 293T به محیط اضافه و محتویات بشقاب کشت سلولی با هم مخلوط و در دمای ۳۷ °C و ۵٪ CO2 انکوبه گردید. پس از ۲۴ ساعت محیط تعویض شد. ۷۲–۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، محیط کشت حاوی ویروس برداشته و ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm در دمای ۴°C سانتریفیوژ و سوپ رویی حاوی ویروس به کرایوتیوب منتقل و در ۷۰°C – نگهداری شد.

تعیین تیتر ویروس در رده سلولی 293T

رقت‌های مختلف از لنتی ویروس اینتگراز منفی و اینتگراز طبیعی ($۱۰^{-۶}$–$۱۰^{-۲}$) در یک میلی لیتر محیط کشت کامل تهیه شد. به هر چاهک بشقاب کشت سلولی ۶ خانه‌ای (micro plate) تعداد $۱۰^{۵}$ سلول 293T اضافه شد. یک میلی‌لیتر محیط کشت کامل حاوی رقت‌های مختلف ویروس اضافه و به آرامی مخلوط شد. سپس تحت شرایط ۳۷°C و ۵٪ CO2 به مدت یک هفته انکوبه شد. طی این زمان از روز دوم تعداد سلول‌های سبز در هر دو چاهک بشقاب کشت سلولی اینتگراز منفی و اینتگراز طبیعی و در رقت های مختلف با میکروسکپ فلورسانت معکوس شمارش شد.

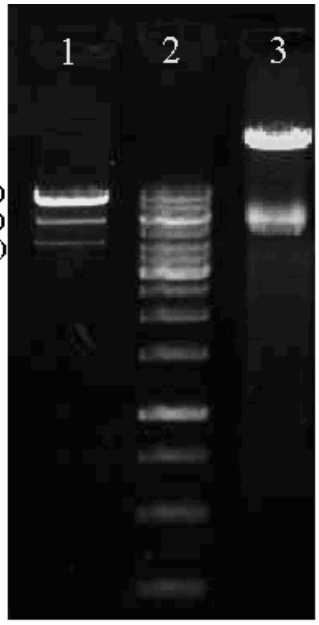
ترانسفکشن سلول‌های 293T با ویروس‌های اینتگراز منفی و مثبت

تعداد $۱۰^{۶}$ سلول در دو خانه از بشقاب کشت سلولی ۶ خانه‌ای سلول 293T کشت داده شد. روز بعد با رسیدن به تراکم ۹۰–۸۰ درصد با نسبت MOI= 10 (Multiplicity Of Infection) از ویروس اینتگراز منفی به خانه اول و اینتگراز طبیعی به خانه دوم اضافه شد. سپس به مدت سه هفته به صورت روزانه توسط میکروسکوپ فلورسانس معکوس از نظر بیان پروتئین eGFP (Enhanced green fluorescent protein)، بشقاب‌های کشت سلولی بررسی و شمارش گردید.

نتایج

جداسازی پلاسمیدهای کمکی

نتایج هضم سه پلاسمید با دو آنزیم *Age*I و *Mlu*I در شکل۲ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود سه پلاسمید با برش آنزیمی به صورت خطی در آمده و از یکدیگر کاملاً قابل تفکیک هستند. از این پلاسمیدها برای ایجاد جهش و غیر فعال کردن ژن اینتگراز و کلونینگ ژن‌های مورد نظر استفاده می‌شود.



شکل (۲) . ۱– برش آنزیمی مخلوط سه پلاسمید کمکی با آنزیم‌های AgeI و MluI، 1– مخلوط پلاسمیدی بریده شده ۲– مارکروزن مولکولی DNA 1kb، 3– مخلوط سه پلاسمید بریده نشده.

ایجاد جهش در ژن اینتگراز توسط روش overlap extension PCR

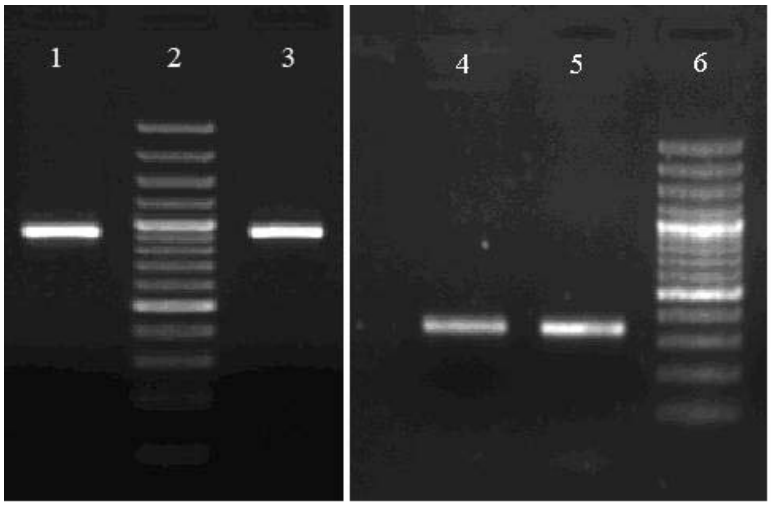
برای غیر فعال کردن ژن اینتگراز از ایجاد جهش و تغییر کدون اسید آمینه اسید آسپارتیک به کدون والین توسط PCR استفاده شد. در این روش با استفاده از چهار آغازگر در قسمت ژن مورد نظر طوری تکثیر شدند که یک قطعه همپوشان در آن وجود داشته باشد. شرایط انجام PCR ابتدا با آنزیم*Taq* بهینه و سپس تکثیر قطعات DNA با آنزیم *Pfu* انجام شد. مرحله اول قطعات ۱و۲

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

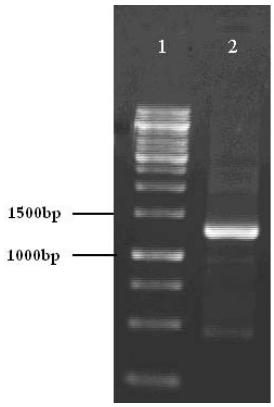
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.6.6]

حـاوی بخـش همپوشـان کـه در قسـمت بعـدی بـرای overlap extension PCR به عنوان الگو استفاده مـی‌شـوند تکثیـر شـدند (شکل ۳). در تکثیر نهایی در واکنش PCR قطعات ۱و۲ بـه عنـوان الگو اسـتفاده شـده و پـس از اتصـال دو قطعـه از طریـق بخـش همپوشـان بـا اسـتفاده از آغازگرهـای F1 و R2 و آنـزیم *Pfu* ژن جهش یافته تکثیر شد (شکل ۴).

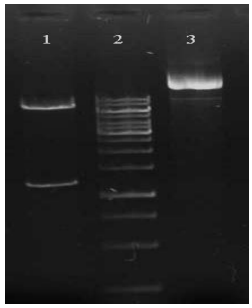
کلون‌های حـاوی پلاسـمید pLP1 حاصـل از کلونینـگ محصـول overlap extension PCR در جایگـاه آنزیمـی *Afl*II و *Age*I پلاسـمید pLP1 بـا هضـم آنزیمـی، بـا آنـزیم‌هـای *Afl*II و *Age*I بررسی شدند. نتیجه نشان دهنده کلونینگ محصول PCR در ایـن پلاسمید بود (شکل ۵). پلاسمید تایید شده با هضم آنزیمی تعیین توالی گردید و نتیجه تعیین توالی نشـان دهنـده ایجـاد جهـش در محل مورد نظر و تغییر اسید آمینه D64 به اسید آمینه والین بود.



شکل (۳) . PCR قطعات اول و دوم ژن اینتگراز ، ۱و۳- قطعه ۱ (۹۵۶ (bp، 4و۵- قطعه ۲ (۳۴۷ (bp، 2و۶- مارکر وزن مولکولی DNA 100bp.



شکل (٤)- اتصال دو بخش ژن اینتگراز جهش یافته، ۱- مارکروزن مولکولی 1kb DNA، ۲- محصول PCR اتصال دو بخش ژن(1280 bp).



شکل (۵) . ۱- برش آنزیمی پلاسمید pLP1 اینتگراز منفی، ۱- *Age*I و *Afl*II (1280bp و 7609bp) ، ۲- مارکروزن مولکولی 1kb DNA ، ۳- پلاسمید pLP1 بریده نشده.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

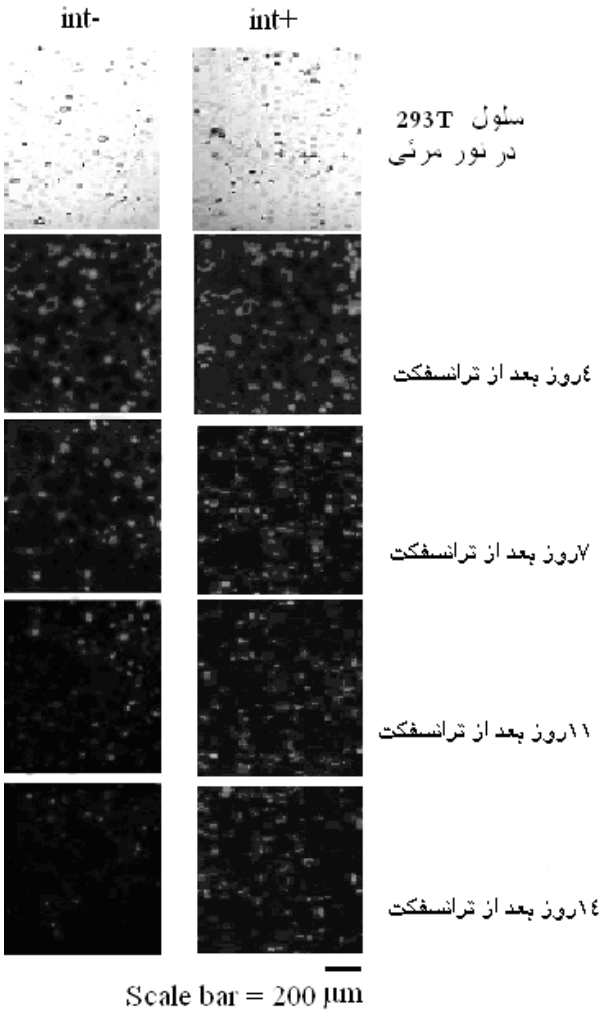
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.6.6]

ساخت حامل لنتی ویروسی و تعیین تیتر آن

برای تولید حامل لنتی ویروسی پلاسمیدهای pLP1، pLP2 و pLP/VSV-G حامل اجزاء لنتی ویروس به سلول 293T منتقل شدند. مونتاژ اجزاء ویروس در داخل سلول منجر به تولید و آزاد شدن لنتی ویروس شد. با استفاده از پلاسمید pLP1 حاوی ژن اینتگراز طبیعی و جهش یافته دو حامل لنتی ویروس طبیعی و جهش یافته تولید شد. ویروس‌های حاصل جهت تعیین تیتر (با رقت های ۱۰ تا 10^{-6}) به سلول‌های 293T منتقل شدند. در مجموعه پلاسمیدهای سازنده لنتی ویروسی پلاسمید DEST حاوی ژن *gfp* است که در صورت بیان تحت تابش نور UV با طول موج ۴۹۸ نانومتر رنگ سبز ساطع می‌شود که نشان دهنده حضور ویروس (حامل) در سلول است. شمارش و درصد سلول‌های سبز شمارش شده طبق دستورالعمل استاندارد (۱۷) محاسبه و تیتری برابر با $10^6 \times 1/1$ و $10^6 \times 1/3$ به ترتیب برای ویروس‌های اینتگراز منفی و طبیعی بدست آمد.

انتقال و بیان حامل لنتی ویروس اینتگراز منفی و طبیعی در رده سلولی 293T

برای بررسی عملکرد حامل لنتی ویروسی اینتگراز منفی حاصل از جهش در ژن اینتگراز، ویروس‌های حاصل به رده سلولی 293T منتقل و بیان ژن *gfp* بعنوان مارکر ورود ویروس در ژنوم سلول بررسی شد. بیان پایدار *gfp* در واکنش‌های متوالی نشانه ورود ژن به همراه DNA ویروسی در ژنوم سلول است. سلول های ترانسفکت شده با هر دو ویروس اینتگراز طبیعی و منفی به صورت روزانه بررسی و شمارش گردیدند. در روزهای اول با کارایی حدود ۸۵-۸۰٪ سلول‌های ترانسفکت شده، سبز رنگ بودند (در هر دو نمونه) که نشان دهنده بیان ژن *gfp* در سلول است. ولی به مرور زمان در بشقاب کشت سلول‌هایی که با ویروس اینتگراز منفی ترانسفکت شده بودند تعداد سلول‌های سبز کاهش یافت و در روز چهاردهم تعداد اندکی از سلول‌های سبز باقی ماندند. درصورتیکه در بشقاب کشت سلولی ترانسفکت شده با ویروس‌های بدون جهش در ژن اینتگراز درصد بالایی از سلول‌ها سبز باقی ماندند که این نتایج نشان دهنده عملکرد بسیار پایین اینتگراز در ویروس‌های با جهش در ژن اینتگراز و ورود DNA ویروسی به داخل ژنوم سلول است (شکل ۶) .



شکل (٦)- میزان نور فلورسانس در سلول‌های T۲۹۳ ترانسفکت شده با ویروس‌های اینتگراز منفی و طبیعی.

بحث

در حال حاضر استراتژی‌های متعددی برای ژن درمانی مطرح می‌باشد که شایع‌ترین آنها استفاده از حامل‌های ویروسی خصوصاً رتروویروس‌ها و لنتی ویروس‌ها، روش‌های هدف‌گیری ژن، نوترکیبی همسان با استفاده از قطعات کوتاه DNA (۱۸)، RNAi و استفاده از ریبوزیم (۲۰و۱۹) است. در اوایل دهه ۹۰ و همزمان با ابداع حامل‌های ویروسی، تحقیقات در زمینه ژن درمانی بیماری‌ها به سمت استفاده از این حامل‌ها معطوف شد. در ابتدای

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.6.6]

امر حامل‌های ویروسی به علت داشتن قسمت زیادی از ژنوم ویروس وحشی و بیان پروتئین‌های ویروسی در کاربرد برای ژن درمانی واکنش های ایمنی بیمار را فعال کرده و در تجویز مجدد خطر بروز پاسخ های ایمنی شدید وجود داشت. بتدریج نسل‌های جدید حامل‌های ویروسی دارای حداقل ژنوم مورد نیاز تولید ویروس ساخته شد که ظرفیت پذیرش ژن در این حامل‌ها افزایش و پاسخ‌های ایمنی نسبت به آنها کاهش یافت (۲۱). حامل‌های لنتی ویروسی مناسب‌ترین و موثرترین وسیله جهت انتقال ژن به سلول‌های هدف می‌باشند. ناقلین لنتی ویروسی توانایی آلوده کردن طیف وسیعی از انواع سلول‌ها را دارا هستند. در این حامل‌ها به منظور افزایش ایمنی زیستی ژن‌های غیر ضروری و بیماری‌زای ویروس به حداقل رسانده شده و دارای نقص در سیستم همانندسازی می‌باشند. حامل‌های لنتی ویروس نسل سوم از چهار حامل مجزا تشکیل شده که یکی از آنها حامل انتقال دهنده و سه حامل دیگر، حامل‌های کمکی برای بسته‌بندی ویروس هستند. این چهار حامل با هم همولوژی ندارند و همین امر امکان نوترکیبی بین آنها و قرار گرفتن ژن‌های ویروسی در مجاورت یکدیگر را کاهش داده و ایمنی استفاده از آنها را افزایش می‌دهد (۲۲). یکی از مهمترین معایب حامل‌های ویروسی ورود تصادفی ژن توسط این حامل‌ها به داخل ژنوم و مشکلات ناشی از جهش زائی دخولی را دارا می‌باشند (۲۳). در مطالعه‌ای که توسط Rivella و همکارانش در سال ۲۰۰۰ و Farrell و همکارانش در سال ۲۰۰۲ انجام شد، موفق شدند با استفاده از حائل (Insulator) اثرات مکانی که در اثر وارد شدن ژن ویروسی به ژن‌های اطراف و بالعکس وارد می‌شود را کاهش دهند (۲۵و۲۴). برای ایجاد حامل غیر اینتگره شونده لنتی ویروس دو نوع جهش قابل استفاده است. جهش اول شامل وارد کردن یک جهش معنی‌دار که منجر به جایگزینی اسید آمینه درجایگاه‌های حساس این پروتئین می‌شود و معمولاً این نوع جهش‌ها باعث کاهش و یا از بین رفتن کامل عملکرد ژن اینتگراز بدون ایجاد خللی در اعمالی از جمله ورود مجموعه اینتگره شونده اولیه به هسته سلول میزبان و یا رونویسی معکوس ژنوم ویروس و در نهایت تیتر ویروس می‌شود. پروتئین اینتگراز در ویروس HIV-1 وزن مولکولی معادل ۳۲ kDa دارد و دارای یک هسته اصلی با سه اسید آمینه ضروری برای فعالیت کاتالیتیک (D64,D116,E152) است. مطالعاتی که توسط Leavitl و Gaur انجام شد (۲۶) نشان داد که تغییر هر کدام از این سه اسید آمینه به یک اسید آمینه دیگر منجر به نقص عملکرد پروتئین اینتگراز و منجر به ایجاد یک حامل لنتی ویروس اپی زومال می‌شود. حامل انتقال دهنده‌ایی که در این تحقیق استفاده شد یک حامل SIN از نسل سوم لنتی ویروسی بنام pLOX-CW*gfp* است. در این تحقیق از سلول 293T جهت مطالعات ترانسفکشن سلول با لنتی ویروس‌های نوترکیب حاوی ژن گزارشگر *gfp* استفاده گردید. مشاهده شد که میزان ترانسداکشن سلول‌های 293T در حضور ترکیب پلی کاتیونیک پلی برن (Polyberene) حدود دو برابر افزایش می‌یابد، زیرا پلی برن موجب رسوب ذرات ویروسی با بار منفی بر روی سطح غشای سلول هدف می‌شود (۲۷). همچنین با توجه به مطالعاتی که در رابطه با افزایش بقا سلول‌های آلوده به ویروس HIV-1 در حضور پلی برن وجود دارد، می‌توان استنباط کرد که پلی برن علاوه بر افزایش ترانسفکشن، اثرات نامطلوب حامل‌های ویروسی روی سلول‌های هدف را کاهش داده و باعث افزایش بقای سلول‌های ترانسفکت شده می‌شود (۲۸). نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که این حامل‌های نسل سوم اینتگراز منفی می‌توانند آینده روشنی در استراتژی‌های ژن درمانی داشته باشند و در پروژه‌های با نیاز به بیان‌گذرای یک ژن در سلول‌های تقسیم شونده یا برای ارائه میان مدت ژن به سلول‌هایی که تقسیم نمی‌شوند مانند سلول‌های عصبی با استفاده از لنتی ویروس‌ها کاربرد داشته باشند.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر خود را از زحمات رئیس محترم بخش ب ث ژ مجتمع تحقیقاتی – تولیدی انستیتو پاستور ایران جناب آقای مهندس بهادر یزدان پناه به دلیل همکاری در فراهم آوردن امکانات اجرائی تحقیق ابراز می دارند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.6.6]

منابع

1- Biceroglu S, Memis A (2005) Gene therapy : application in interventional radiology . Diagn Interv Radiol . 11:113-118

2- Khanahmad H, Noori Daloii MR, Shokrgozar MA, Azadmanesh K, *et al* (2006) A novel single step double positive double negative selection strategy for β-globin gene replacement . Biochem Biophys Res Commun . 345:14-20

3- Lu HZ, Books TJ, Kaufman MR, Ley JT (2003) Long targeting arms does not increase the efficiency of homologous recombination in the β-globin locus of murine embryonic stem cells. Blood. 102:1531-1533

4- Amit C.Nathwani , Andrew M. Davidoff, David C. Linch (2004) A review of gene therapy for haematological disorders. British J Haematol. 128: 3-17

5- Reiser J, Lai Z. Zahang XY, Brady RO (2000) Development of multigene and regulated lentivirus vectors. J Virol .74 : 10589-10599

6- Lever AML, Strappe PM, Zhao J,(2004) Lentiviral vectors, J Biomed Sci .11:439-449

7- Acheampong E, Rosario-Otero M, Dornburg R, Pomerantz R.J (2003) Replication of lentiviruses . Frontiers in Bioscience. 8(1): 156-174

8- Hffar D.K, Popov S, Dubrovsky L,*et al* (2000)Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 preintegration complex. J Mol Biol. 299:359-368

9- Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. Cell. 101:173-185

10- Logan A.C, Lutzko C, Kohn DB (2002) Advances in lentiviral vectors design for gene-modification of hematopoietic stem cell .Cue Opin Biotechnol. 13:429-436

11- Farson D, Witt R, McGuinness R, Dull T, Kelly M, Song J, et al (2001) A new generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. Hum Gene Ther. 12: 981-997

12- Dlelis O, Carayon K, SaÏb A,Deprez E, Mouscadet J-F (2008) Integrase and integration: biochemical activities of HIV-I integrase. Retrovirology 5:114

13- Johnson M.S, Mcclure M.A, Feng D.F, Gray J, and Doolittle R.F (1988) Computer analysis of retroviral *pol* genes : Assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes. Proc. Natl.Acad.Sci,USA .83:7648-7652

14- Engelman A, Mizuuchi K, and Craigie R (1991) HIV-1 DNA integration : Mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. Cell. 67:1211-1221

15- Sambrook J., Russell D(2001) Molecular cloning ,3rd edition ,CSHL Press. New York

16- Urban A, Neukirchen S, Jaeger K-E (1997) A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. Nucleic Acids Res.25(11): 2227-2228

17- Tiscornia G, Singer O, Verma I.M (2006) Production and purification of lentiviral vectors. Nat Protocols. 1(1): 241-245

18- Gruenert C.D, Bruscia E, Novelli G (2003) Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragments . Clin Invest .112(5): 637-641

19- Smithies O,Grey R.G, Boggs S.S, Koralewski M.A, Kucherlapati R.S (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β-globin locus by homologous recombination. Nature. 317:230-240

20- Li J, and Baker D.M (2000) Mechanisms involved in targeted gene replacement in mammalian cells. Genetics. 126: 809-821

21- Manilla P, Rebello T, Afable C, *et al* (2005) Regulatory considerations for novel gene therapy products: A review of the process leading to the first clinical lentiviral vector. Human Gene Ther . 16:17-26

22- Pawliuk R, Bachelot T, Raftopoulos M. H *et al* (1998) Retroviral vectors aimed at gene therapy of human β-globin gene disorders. Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 850:151-162

23- Kalberer P.C, Pawliuk R, Imren S, *et al* (2000) Preselection of retrovirally transduced bone marrow avoids subsequent stem cell gene silencing and age-dependent extinction of expression of human β-globin in engrafted mice. PNAS. 97(10): 5411-5415

24- Rivella S, Callegari J.A, May C, *et al* (2000) The CHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites. J virol. 74(10): 4679-87

25- Farrell C.M, Weat A.G, and Felsenteld G (2002) Conserved CTCF insulator elements flank the mouse man β-globin loci. Mol and cell Biol. 22(11): 3820-3831

26- Gaur M, and Leavitt A.D (1998) Mutation in the human immunodeficiency virus type 1 integrase D, D(35) E motif do not eliminate provirus formation. J Virol. 72:4674-4685

27- Lehmuvaara S, Rautsi O, Hakkarainen T, wahifors J (2006) Utility of cell permeable peptides for enhancement of virus – mediated gene transfer to human tumor cells. Biol Tech. 40:573-76

28- Castro B.A, *et al* (1988) Optimal conditions for recovery of HIV from peripheral blood mononuclear cells. J Clin Microbiol. 26(11): 2371-2376.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.6.6]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.6.6] [Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]