

طراحی و ساخت حامل لنتی ویروس اینتگراز منفی جهت استفاده در

ژن درمانی

داود نوری اینانلو^{۱،۲*}، سیروس زینلی^۳، حسین خان احمد^۲، موسی گردانه^۱، تورج فرازمندر^۲، حسام موثق^۲، باقر یخچالی^{۱*}

۱- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

۲- انستیتو پاستور ایران، مجتمع تحقیقاتی - تولیدی، بخش ب ت 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 روش های درمان نقائص ژنتیکی خصوصاً بیماری های تک ژنی است. اما این روش برخلاف روش استفاده از حامل های ویروسی از کارایی پائینی برخوردار است. هدف این تحقیق طراحی و ساخت یک حامل لنتی ویروس فاقد عملکرد پروتئین اینتگراز است که بتواند با کارایی بالا وارد سلول شده ولی قادر به ادغام شدن در ژنوم سلول نباشد. در این تحقیق پس از ترانسداکت سلول های T۲۹۳ با ویروس های طبیعی و نوترکیب، در صد پروتئین eGFP در سلول های ترانسداکت شده با ویروس های طبیعی پس از دو هفته کاهش ناچیزی داشت، در حالیکه در ویروس اینتگراز منفی پس از زمان فوق کاهش معنی داری مشاهده گردید. نتایج نشان دهنده این است که ژنوم ویروس نوترکیب به صورت اپی زومال بوده و با کارایی کمتری در ژنوم سلول ادغام می شود که به نوبه خود کمترین اثر نامطلوب در بیان سایر ژن های سلول را باعث می شود. بنابر این با این سیستم امکان جایگزینی ژن معیوب با ژن سالم بدون وارد شدن تصادفی حامل ویروسی در ژنوم میزبان وجود دارد.

واژه های کلیدی

حامل لنتی ویروس،
اینتگراز،
ژن درمانی

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 می شود. کارایی 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 می گیرد و این مسئله می تواند باعث خاموش شدن ژنهای مفید مانند ژنهای سرکوب کننده تومور یا فعال شدن ژنهای مضرمانند انکوژن ها و ایجاد مسائلی مانند بدخیمی شود (۳). اخیراً بعلت وجود معایب فوق توجه بیشتری به روش هدف گیری ژنی (Gene targeting) برای ژن درمانی شده است. حاملهای مختلفی جهت انتقال ژن وجود دارند، یکی از مناسب ترین حاملها برای انتقال و بیان ژنهای نو ترکیب 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 می توانند 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 و همچنین جهش های حذفی (حذف ۴۰۰ نوکلئوتید از ناحیه U3) در نواحی ضروری توالی 3' LTR که مرتبط با افزایشنده (Enhancer) و راه انداز (Promoter) است منجر به غیر فعال سازی نسخه برداری از پرو ویروس شده و حاملهای حاصل از این جهشها، تحت عنوان حاملهای SIN (Self Inactivating Vector) یا حاملهای خود غیر فعال شونده نامیده می شوند. این حاملها به حاملهای نسل سوم لنتی ویروسی موسوم بوده و ایمن و مناسب انتقال ژنهای نو ترکیب هستند (۶). در چرخه آلوده نمودن سلولهای هدف گلیکوپروتئینهای پوشش ویروس HIV-1 به گیرنده های اختصاصی سلول متصل و با روشی وابسته به pH محیط، ویروس وارد سیتوپلاسم سلول هدف می شود. 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 می گیرد. tRNA-Lys3 به محل اتصال آغازگر (Primer binding site = PBS) متصل و سنتز cDNA آغاز می شود، سپس پرش های 5'-LTR به ناحیه R انتهای 3' ژنوم انجام شده و هیبرید RNA-DNA تشکیل می شود. در مرحله بعد RNA الگو تجزیه شده و رشته مکمل DNA نیز ساخته می شود. به این ترتیب در طرفین DNA دو رشته ای حاصل توالی های 5'-LTR و 3'-LTR تشکیل می شود. مولکولهای DNA حاصل به همراه پروتئینهای ماتریکسی (Matrix Protein)، اینتگراز (Integrase)، پروتئین R ویروسی (R=Vpr) و سایر فاکتورهای سلولی، مجموعه ادغام شونده اولیه (pre-integration complex= PIC) نامیده می شوند. آنزیمهای اینتگراز دارای توالی هائی هستند که به پروتئین ایمپورتین α و سپس این مجموعه به ایمپورتین β متصل می شوند. این مجموعه PIC به جایگاه منافذ هسته هدایت و وارد هسته سلول می شود (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 می برد در محل بریده شده وارد ژنوم میزبان می شود (۸) که در این حال به آنها پرو ویروس اطلاق می گردد. سپس RNA ویروسی به کمک RNA پلی مرز II میزبان رونویسی شده و همراه با سایر پروتئینهای ساختاری، ویروس های جدید بسته بندی و با انهدام سلول میزبان از آن خارج می شوند. ترادف cPPT (central polypurine tract) در حامل لنتی ویروسی سبب تسهیل عبور حامل از سیتوپلاسم به هسته سلولهای هدف غیر قابل تقسیم می شود (۹). همچنین ترادف PRE (posttranscriptional regulatory element) باعث انتقال RNA از هسته به سیتوپلاسم می شود (۱۰). توالی پاسخ دهنده به Rev (Rev response element) نیز سبب تسهیل خروج mRNA و تنظیمات پس از نسخه برداری آن می گردد (۱۱). ادغام شدن (Integration) یکی از مراحل اجباری در همانند سازی همه رترو ویروس ها است و توسط پروتئین اینتگراز صورت می گیرد. آنزیم اینتگراز به وسیله ژن pol ویروس کد و به عنوان قسمتی از

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 (۱۳ و ۱۲) 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 آمینه‌های، 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 ایتنگراز می‌شود و ناحیه C- انتهایی که شامل ۷۵ اسید آمینه می‌باشد که به طور غیر اختصاصی به DNA متصل می‌گردد. برای ایجاد حامل‌های غیر ایتنگره شونده لنتی ویروس از دو نوع جهش استفاده می‌شود. جهش نوع یک ایجاد یک یا چند جهش نقطه‌ای در ژن ایتنگراز است که منجر به جایگزینی یک اسید آمینه در ژن ایتنگراز بدون ایجاد خللی در فعالیت‌هایی از جمله: ورود ژنوم ویروس به هسته سلول، سنتز DNA ویروس و بسته بندی ویروس و در نتیجه حلقوی شدن ژنوم به وسیله آنزیم‌های میزبان می‌شود. این ژن‌های حلقوی به عنوان الگوهای کارا برای ماشین رونویسی سلول میزبان شناخته می‌شوند. جهش نوع دو شامل حذف قسمتی از ژن ایتنگراز 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 ایتنگراز 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 AgeI و MluI در سه پلاسمید وجود داشت. بدین ترتیب دو آنزیم AgeI و MluI انتخاب شدند که با استفاده همزمان آنها در یک واکنش هضم آنزیمی در مخلوطی از سه پلاسمید pLP1، pLP2 و pLP/VSV-G در 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 AgeI و MluI 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 *Escherichia 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 شرکت‌های سازنده کیت انجام شد. تهیه همه آنزیم‌های اندونوکلاز با اثر محدود و T4 DNA لیگاز از شرکت فرمتاز تهیه و ساخت آغازگرها نیز در شرکت ژن فن‌آوران انجام شد.

ایجاد جهش در ژن ایتنگراز

ژن ایتنگراز 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 ایتنگراز، با استفاده از روش overlap PCR extension (۱۶) یک جهش معنی‌دار در کدون اسید آمینه

سیکل	زمان	درجه حرارت	مراحل
۱	۲'	۹۴°C	
۲	۲'	۴۸°C	
۳	۳۰''	۹۴°C	
۴	۲'	۴۸°C	
۵	۳۵''	۹۴°C	
۶	۱'	۵۲°C	
۷	۱'	۷۲°C	
۸	۳۰	Go to step 5	
۹	۱۰'	۷۲°C	
۱۰	۱۰'	Hold at 4	

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 *AgeI* و *AflIII* 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 *AgeI* و *AflIII* هضم آنزیمی شدند و برای تایید جهش ایجاد شده در موقعیت D64 تعیین توالی شد.

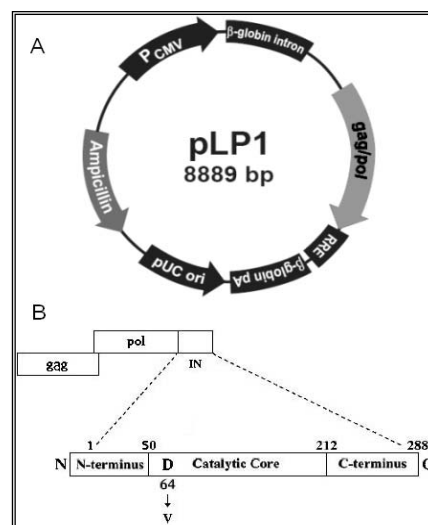
تولید لنتی ویروس طبیعی و اینتگراز منفی در رده سلولی 293T

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 تیترا 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 و pLP/VSV-G به همراه پلاسمید DEST حاوی ژن گزارشگر (pLOX-CWgfp) با استفاده از کیت BLOCK-IT Inducible H1 Lentiviral RNAi System (Invitrogen) جهت تولید ویروس به داخل سلول 293T منتقل شد. ابتدا کمپلکس lipofectamin™ 2000 - DNA آماده شد.

D64 ایجاد کرده و کد ژنتیکی اسید آمینه اسپارتیک 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' TTCTAAATGTGTACATACTAGCTGC3'
F2 int-	5' AGCTAGTATGTACACATTTAGAAGG3'
R2	5' TTGTA CTGCTGTCTTAAGATGTTTC3'

جدول (۱) - آغازگرهای مورد استفاده در ایجاد جهش در ژن

اینتگراز. محل شناسایی آنزیم‌های محدود الاثر و محل ایجاد

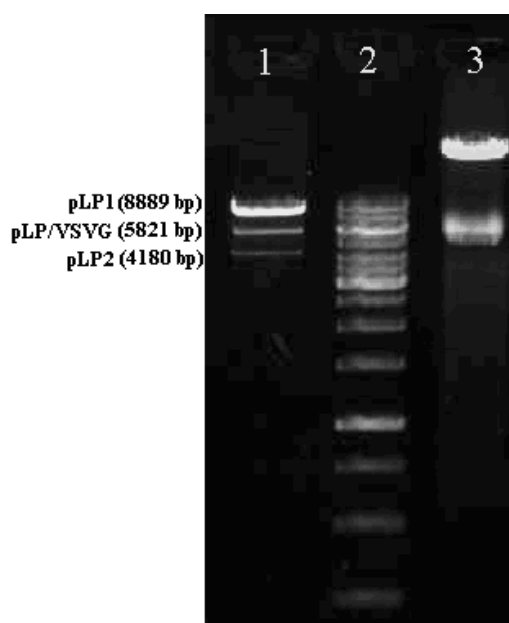
جهش مشخص شده است.

ابتدا با آغازگرهای F1، R1 int-، F2 int- و R2 واکنش PCR (جدول ۲) انجام شد. محصولات PCR ۲۱ پس از الکتروفورز از ژل آگاروز استخراج گردید. سپس قطعه DNA حاصل تکثیر شد. واکنش overlap extension PCR با استفاده از محصول PCR ۱ و ۲ به عنوان الگو انجام و محصول overlap extension PCR از ژل آگاروز استخراج گردید.

نتایج

جداسازی پلاسمیدهای کمکی

نتایج هضم سه پلاسمید با دو آنزیم *AgeI* و *MluI* در شکل ۲ 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*. ۲- مخلوط پلاسمیدی بریده شده ۲- مارکروزن مولکولی 1kb DNA. ۳- 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 ۲ و ۱

سلول‌های 293T (بانک سلولی ایران، C498) با تراکم $10^6 \times 1/2$ سلول در میلی لیتر تهیه شد. کمپلکس DNA – lipofectamin™ به بشقاب‌های کشت سلولی (Plate) ۱۰ سانتی متری حاوی ۵ میلی لیتر 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 37°C و ۵٪ CO_2 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 4°C سانتریفیوژ و سوپ رویی حاوی ویروس به کرایوتیوب منتقل و در 70°C - نگهداری شد.

تعیین تیترو ویروس در رده سلولی 293T

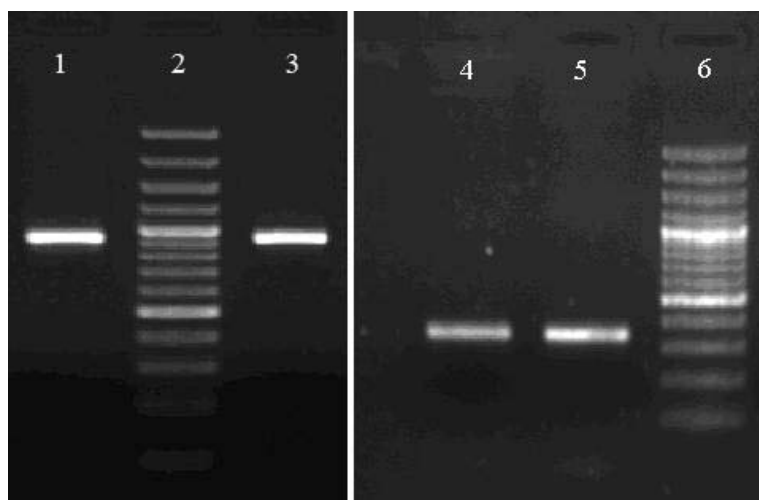
رقت‌های مختلف از لنتی ویروس اینتگراز منفی و اینتگراز طبیعی (10^{-2} - 10^{-6}) در یک میلی لیتر محیط کشت کامل تهیه شد. به هر چاهک بشقاب کشت سلولی ۶ خانه‌ای (micro plate) تعداد 10^5 سلول 293T اضافه شد. یک میلی لیتر محیط کشت کامل حاوی رقت‌های مختلف ویروس اضافه و به آرامی مخلوط شد. سپس تحت شرایط 37°C و ۵٪ CO_2 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 رقت‌های مختلف با میکروسکپ فلورسانس معکوس شمارش شد.

ترانسفکشن سلول‌های 293T با ویروس‌های اینتگراز منفی و مثبت

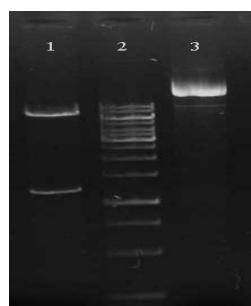
تعداد 10^6 سلول در دو خانه از بشقاب کشت سلولی ۶ خانه‌ای سلول 293T کشت داده شد. روز بعد با رسیدن به تراکم ۸۰-۹۰ درصد با نسبت $\text{MOI} = 10$ (Multiplicity Of Infection) از ویروس اینتگراز منفی به خانه اول و اینتگراز طبیعی به خانه دوم اضافه شد. سپس به مدت سه هفته به صورت روزانه توسط میکروسکوپ فلورسانس معکوس از نظر بیان پروتئین eGFP (Enhanced green fluorescent protein)، بشقاب‌های کشت سلولی بررسی و شمارش گردید.

کلون‌های حاوی پلاسمید pLP1 حاصل از کلونینگ محصول PCR extension overlap در جایگاه آنزیمی *AgeI* و *AflIII* پلاسمید pLP1 با هضم آنزیمی، با آنزیم‌های *AgeI* و *AflIII* بررسی شدند. نتیجه نشان دهنده کلونینگ محصول PCR در این پلاسمید بود (شکل ۵). پلاسمید تایید شده با هضم آنزیمی تعیین توالی گردید و نتیجه تعیین توالی نشان دهنده ایجاد جهش در محل مورد نظر و تغییر اسید آمینه D64 به اسید آمینه والین بود.

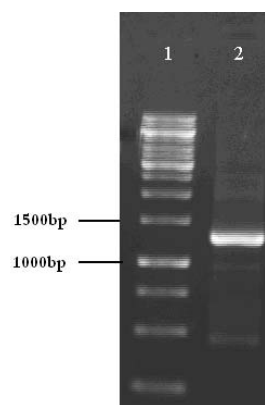
حاوی بخش همپوشان که در قسمت بعدی برای overlap extension PCR به عنوان الگو استفاده می‌شوند تکثیر شدند (شکل ۳). در تکثیر نهایی در واکنش PCR قطعات ۱ و ۲ به عنوان الگو استفاده شده و پس از اتصال دو قطعه از طریق بخش همپوشان با استفاده از آغازگرهای F1 و R2 و آنزیم *Pfu* ژن جهش یافته تکثیر شد (شکل ۴).



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



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



شکل (۴). اتصال دو بخش ژن اینتگراز جهش یافته، ۱- مارکروزن مولکولی DNA 1kb، ۲- محصول PCR اتصال دو بخش ژن (1280 bp).

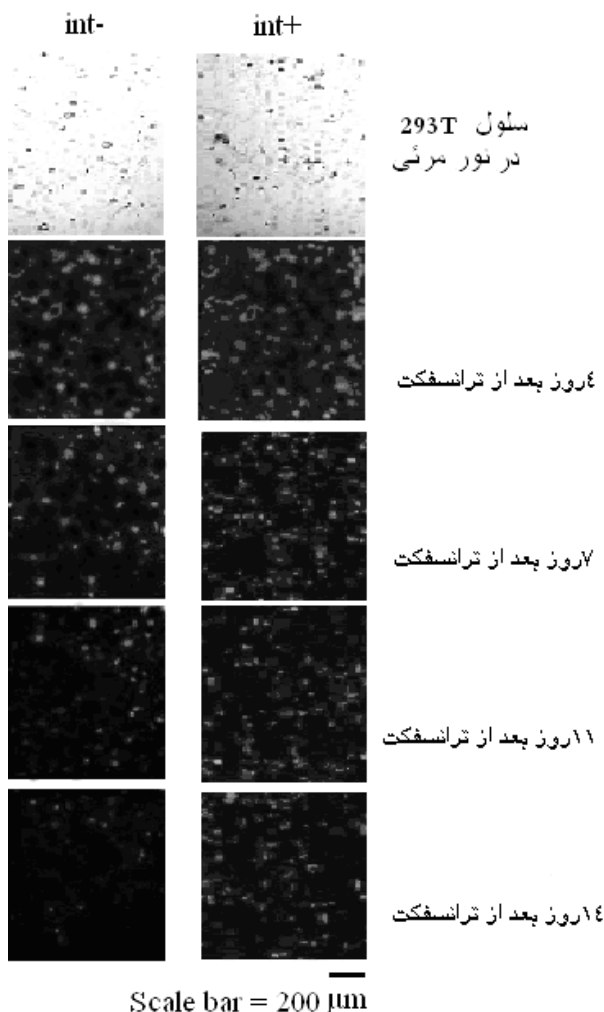
ساخت حامل لنتی ویروسی و تعیین تیتراژ آن

برای تولید حامل لنتی ویروسی پلاسمیدهای pLP2، pLP1 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 تیتراژ (با رقت های ۱۰ تا ۱۰^{-۶}) 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 تیتراژی 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. سلول‌های 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. در صورتیکه 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 (۶) - 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 (۱۹ و ۲۰) 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

امر حامل‌های ویروسی به علت داشتن قسمت زیادی از ژنوم ویروس وحشی و بیان پروتئین‌های ویروسی در کاربرد برای ژن درمانی واکنش‌های ایمنی بیمار را فعال کرده و در تجویز مجدد خطر بروز پاسخ‌های 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 (۲۴ و ۲۵). برای ایجاد حامل غیر ایتنگره شونده لنتی ویروس دو نوع جهش قابل استفاده است. جهش اول شامل وارد کردن یک جهش معنی‌دار که منجر به جایگزینی اسید آمینه در جایگاه‌های حساس این پروتئین می‌شود و معمولاً این نوع جهش‌ها باعث کاهش و یا از بین رفتن کامل عملکرد ژن ایتنگراز بدون ایجاد خللی در اعمالی از جمله ورود مجموعه ایتنگره شونده اولیه به هسته سلول میزبان و یا رونویسی معکوس ژنوم ویروس و در نهایت تیترو ویروس می‌شود. پروتئین ایتنگراز 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 Leavitt 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 ایتنگراز 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-CWgfp 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 ایتنگراز 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 ت ژ مجتمع تحقیقاتی - تولیدی انستیتو پاستور ایران جناب آقای مهندس بهادر یزدان پناه به دلیل همکاری در فراهم آوردن امکانات اجرایی تحقیق ابراز می‌دارند.

منابع

- 1- Biceroglu S, Memis A (2005) Gene therapy : application in interventional radiology . *Diagn Interv Radiol* . 11:113-118
- 2- Khanahmad H, Noori Dalooi 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- Lehmuvuura 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.

