مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۹، شماره ۳، پاییز ۸۸، صفحات ۱۶۰ تا ۱۶۷

Original Article

استفاده از ویروس‌های نوترکیب مشتق از HIV-1 برای ترانسداکشن سلول‌های HT1080 با هدف ژن درمانی بیماران بتا- تالاسمی

مریم بی‌خوف تربتی[۱]، حسین خان‌احمد[۲]، فاطمه جمشیدی[۳]، مرتضی کریمی‌پور[۴]، مجید صادقی‌زاده[۵]، محمدعلی شکرگذار[۶]، امیر امان‌زاده[۷]، سیروس زینلی[۸]

[۱] مربی، دکترای زیست سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرری
[۲] استادیار، دکترای فراورده های بیولوژیک، انستیتو پاستورایران، کرج
[۳] کارشناس ارشد، فیزیولوژی جانوری، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستورایران
[۴] استادیار، دکترای فراورده های بیولوژیک، انیستیتو پاستور ایران
[۵] استادیار، دکترای ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس
[۶] دانشیار، دکترای فراورده های بیولوژیک، انستیتو پاستورایران، بانک سلولی
[۷] دکترای حرفه ای دامپزشکی، انستیتو پاستورایران، بانک سلولی
[۸] دانشیار، دکترای ژنتیک انسانی، انستیتو پاستورایران

چکیده

سابقه و هدف: *یکی از روش‌های درمانی موثر برای بیماری بتاتالاسمی، ژن‌درمانی توسط ویرال وکتورها می‌باشد. هدف از این مطالعه ساخت لنتی‌ویروس‌های نوترکیب حاوی ژن بتاگلوبین و mini LCR جهت انتقال سازه ژنی مورد نظر به سلول‌های هدف به منظور ژن درمانی بتاتالاسمی ماژور می‌باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه بنیادی- کاربردی، هر یک از قطعات ژن بتاگلوبین و mini LCR در یک لنتی‌وکتور به نام pLenti-Dest کلون شدند. طی ترانسفکشن هم‌زمان وکتور نهایی به همراه سه وکتور کمکی با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به درون رده سلولی 293T، لنتی‌ویروسهای نوترکیب حاوی سازه ژنی مورد نظر تولید و با RT PCR تایید شدند.*

یافته‌ها: *تیتر این لنتی‌ویروس‌های نوترکیب در رده سلولی HT1080 تعیین شد. ترانسداکشن سلول‌های هدف در حضور پلی‌برن ۲ برابر شد. سلول‌های HT1080 ترانسدیوس شده پس از دو هفته انتخاب آنتی‌بیوتیکی باقی ماندند. DNA این کلونی‌های باقی مانده استخراج و با روش PCR اینتگره شدن سازه ژنی ساخته شده تائید شد. MOI اپتیمم این ویروس‌ها برای سلول HT1080 بدست آمد.*

نتیجه‌گیری: *می‌توان از لنتی ویرال وکتورها سبب انتقال موثر، کارآمد و پایدار ژن به سلول‌های پستانداران مانند سلول‌های بنیادی با هدف ژن‌درمانی بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی از جمله بتاتالاسمی و سرطان استفاده کرد.*

واژگان کلیدی: *ژن درمانی، بتاتالاسمی، ژن بتاگلوبین، لنتی‌ویروس نوترکیب.*

مقدمه

بیماری بتاتالاسمی نوعی بیماری تک‌ژنی با وراثت اتوزومال مغلوب و یکی از شایع‌ترین اختلالات ژنتیکی کشورمان می‌باشد (۱). با توجه به آمارهای رسمی انجمن تالاسمی ایران حدود ۲۰-۱۵ هزار بیمار مبتلا به بتاتالاسمی ماژور در ایران وجود دارد. جهش‌های متعددی در ژن بتاگلوبین سبب کاهش یا فقدان تولید این پروتئین و به دنبال آن کم‌خونی شدید بیماران بتاتالاسمی می‌شود (۲). این امر موجب نیاز بیمار به تزریق مداوم خون و تجمع آهن در بدن آنها می‌شود. از این رو جهت درمان بیماران، همراه با تزریق خون از داروهای جذب

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش پزشکی مولکولی، دکتر سیروس زینلی
(**email**: sirouszeinali@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۰/۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۵/۱۴

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-04-18]

کننده آهن مانند دسفرال (chelating agent) نیز بطور روزانه استفاده می‌شود (۱). در میان روش‌های متعدد درمانی تاکنون پیوند مغز استخوان موثرترین روش درمانی برای این بیماران بوده است. اما این روش به دلیل در دسترس نبودن اهداکنندگان مناسب در عمل با موانعی مواجه است (۳). به همین جهت امروزه ژن‌درمانی را مناسب‌ترین روش برای درمان این بیماری می‌دانند (۳).

ژن بتاگلوبین انسان جزء خوشه ژنی گلوبین می‌باشد و توسط ناحیه تنظیمی اختصاصی LCR (Locus Control Region) به وسعت ۱۵ kb کنترل می‌شود. نواحی HS1-5 در LCR به آنزیم DNaseI بسیار حساس (Hypersensitive) بوده و نقش مهمی در عملکرد LCR دارند (۴).

قبلا" اغلب از روش‌های انتقال شیمیایی و یا فیزیکی جهت انتقال ژن سالم به سلول های هدف در ژن درمانی استفاده می‌شد، ولی امروزه از حامل‌های ویروسی استفاده می‌شود (۳). در میان وکتورهای ویروسی لنتی‌ویروس‌ها دارای مزایایی جهت استفاده در ژن‌درمانی بتاتالاسمی از جمله ارائه موثر ژن‌ها به انواع متفاوت سلول‌های هدف، عدم ایجاد واکنش‌های ایمونولوژیک ناخواسته در میزبان و میزان بالای بیان ژن می‌باشند (۶،۵). اغلب لنتی‌ویرال وکتورها بر اساس ساختار ویروس HIV-1 طراحی شده‌اند. در طراحی این وکتورها ژن‌های بیماری‌زای ویروس به حداقل رسانده شده و یا ژن مشابهی جایگزین برخی از ژن‌های ویروس HIV-1 شده است؛ مانند پروتئین VSVG که متعلق به ویروس vesicular stomatitis است و در یکی از وکتورهای بسته‌بندی ویروس قرار می‌گیرد. به کمک این پروتئین، ویروس‌ها به سطح سلول هدف متصل و وارد آن می‌شوند. نسل جدید لنتی‌وکتورها حاوی ۴ وکتور مجزا می‌باشند که از یک وکتور انتقال دهنده حاوی ژن خارجی و ۳ وکتور بسته‌بندی ویروس تشکیل شده است. لنتی‌ویروس‌های از نوع SIN دارای حذفی در ناحیه u3 توالی 3'LTR هستند (Δu3). این سبب می‌شود ویروس‌های تولید شده قابلیت تکثیر نداشته باشند. از طرفی به علت افزایش ایمنی زیستی هیچ یک از پلاسمیدهای کمکی دارای توالی‌های بسته‌بندی ویروس و LTR نیستند (۸،۷). از آنجایی که ظرفیت انتقال ژن توسط لنتی‌ویرال وکتورها حدود ۸ کیلوباز است (۹)، در این مطالعه سازه‌ای به طول ۶ کیلوباز استفاده شد. این سازه حاوی mini LCR در کنار ژن بتاگلوبین می‌باشد (۱۰) و قبلا" توسط همین گروه تحقیقاتی طراحی و ساخته شده است (۱۱). این سازه ژنی به رده سلولی سرطانی فیبروسارکومای انسانی HT1080 توسط لنتی‌ویروس‌های نوترکیب ساخته شده با هدف اینتگره شدن پایدار در ژنوم میزبان در راستای ژن درمانی بیماری بتاتالاسمی منتقل شد. از آنجایی که بیماران بتاتالاسمی دارای نقص در ژن بتاگلوبین و یا نواحی تنظیمی آن می‌باشند، در صورتی که بتوان سازه ژنی مناسبی متشکل از ژن بتاگلوبین و نواحی تنظیمی آن را به کمک لنتی ویروس های نوترکیب با کارایی و بازده بالا نسبت به سایر روش های انتقال ژن به سلول‌های هدف انسانی مانند HT1080 منتقل کرد به‌گونه‌ای که سازه ژنی فوق بتواند در ژنوم میزبان بصورت پایدار وارد شود، می‌توان چنین استنباط کرد که این روش قابل تعمیم به سایر سلول‌های انسانی از جمله سلول‌های بنیادی رده اریتروئیدی نیز بوده که با پیوند آنها به بیماران بتاتالاسمی می‌توان قدم موثری در راستای ژن‌درمانی این بیماران برداشت.

مواد و روشها

در این تحقیق بنیادی-کاربردی، به منظور تکثیر پلاسمید pFBGGT حاوی سازه ژنی، همه پلاسمیدها با روش ترانسفورمیشن در باکتری E. Coli سویه Top10F′ و بر اساس دستورالعمل استاندارد مربوطه تکثیر شدند (۱۲). برای رشد باکتری‌ها از محیط LB-broth (Merck، آلمان) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین استفاده شد.

برای ساب کلونینگ سازه ژنی بتاگلوبین و mini LCR در وکتور انتقال دهنده pLenti-Dest ، سازه ژنی که درپلاسمید حدواسط pBGGT (ثبت شده در بانک ژن تحت شناسه DQ384617) قبلا" کلون شده بود، با هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های XhoI و NheI (شرکت سیناژن) در دو انتهای سازه، از pBGGT خارج و سپس در وکتور pLenti4-GW/H1/TO-Lamin $_{shRNA}$ یا pLenti-Dest ساب‌کلون شد. پلاسمید نهایی، pLentiBGDEST نامیده شد. برای تائید صحت پلاسمید نهایی PCR و واکنش هضم آنزیمی برای تمام قطعات روی این پلاسمید گذاشته شد (شکل ۱). برای تعیین توالی سازه ژنی در دو جهت، پرایمر طراحی و همراه نمونه پلاسمید برای تعیین توالی ارسال شد (ژن فن آوران، ایران). PLentiBGDEST جهت استفاده در مراحل بعدی با کیت تخلیص پلاسمید Midi-prep (Invitrogen، آمریکا) استخراج شد (۱۱).

جهت بررسی میزان مؤثر داروی زئوسین بر روی رده سلولی HT1080، تعداد هزار سلول از رده سلولی HT1080 در پلیت‌های ۹۶ چاله‌ای کشت داده شدند. به ازاء هر غلظت دارو چهار چاله گذاشته شد. سپس به هر چاله غلظت‌های مربوطه از دارو اضافه شد. زئوسین در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰،

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-04-18]

۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط کشت اضافه شد و پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت بررسی شد. در چاله‌هایی که تعداد زیادی از سلول‌ها از بین رفته بودند، غلظت مورد استفاده در آن چاله یادداشت شد.

برای کشت سلول‌های 293T و HT1080، سلول‌های 293T (بانک سلولی ایران، C498) و HT1080 (بانک سلولی ایران، C437) در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۲ میلی‌مولار گلوتامین و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (همه از Gibco، آمریکا) و در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

به منظور تولید لنتی‌ویروس نوترکیب در سلول‌های 293T، لنتی‌ویروس‌های نوترکیب ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن تعداد ۶×۱۰^{۶} سلول 293T با کمپلکس‌های DNA-LipofectamineTM 2000 (Invitrogen، آمریکا) بر اساس دستورالعمل ارائه شده در تحقیقات قبلی همین گروه تحقیقاتی (۱۱) جمع‌آوری شد.

در بررسی تولید لنتی‌ویروس با روش RT-PCR، به منظور تائید تولید لنتی‌ویروس‌های نوترکیب، RNA ویروس تولید شده در سوپ ویروسی با استفاده از Trizol تخلیص و یک میکروگرم از آن با آنزیم M-MLV reverse transcriptase به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و در حضور پرایمر oligo-dt و مهارکننده RNase و نهایتا ۱۰ دقیقه ماندن در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد رونویسی معکوس شد. واکنش PCR به تعداد ۳۵ سیکل در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۲ میکرولیتر cDNA، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرومولار از هر یک از dNTP ها، ۲۰ پیکومول از هر پرایمر و ۰/۴ واحد آنزیم AmpliTaq Gold DNA polymerase(ABI, USA) بر اساس دستورالعمل استاندارد انجام شد.

برای تعیین تیتر لنتی‌ویروس‌های نوترکیب در رده سلولی HT1080، تیتر ویروس‌های تولید شده در سلول HT1080 که یک رده سلولی فیبروسارکومای انسانی است، اندازه‌گیری شد. روش تعیین تیتر ویروس در سلول‌های HT1080 مشابه روش تعیین تیتر ویروس در رده‌های سلولی دیگر از جمله Cos-7 و K562 گزارش شده توسط همین گروه تحقیقاتی بود (۱۱). بطوری‌که روز قبل از ترانسداکشن ۲×۱۰^{۵} سلول HT1080برای هر خانه از پلیت‌های ۶ خانه شمارش و در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد تا در روز ترانسداکشن به تراکم سطحی ۵۰-۳۰ درصد رسیده باشد. در روز ترانسداکشن رقت‌های ۱۰ برابری از $۱۰^{-۲}$ تا $۱۰^{-۶}$از سوپ ویروسی در حجم یک میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۶/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر polybrene (Invitrogen، آمریکا) تهیه و با آنها هر خانه از پلیت ۶ خانه‌ای تعویض محیط شد. یک خانه نیز به عنوان کنترل منفی اختصاص یافت. روز بعد از تعویض محیط با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۲ میلی‌مولار گلوتامین و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (همه از Gibco، آمریکا) انجام شد. ۴۸ ساعت بعد از ترانسداکشن آنتی‌بیوتیک زئوسین با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر یک از خانه‌ها اضافه شد. سپس هر ۳ روز یک بار تعویض محیط با محیط کشت تازه حاوی زئوسین انجام گرفت. ۱۲ روز پس از انتخاب آنتی‌بیوتیکی کلونی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در هر خانه پس از رنگ آمیزی با کریستال ویوله شمارش و تیتر ویروس تعیین شد.

جهت کشت سلولی و ترانسداکشن، سلول‌های HT1080 در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۲ میلی‌مولار گلوتامین و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (همه از Gibco، آمریکا) و در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دی‌اکسید کربن و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. روز قبل از ترانسداکشن تعداد ۲×۱۰^{۶} سلول HT1080 در پلیت‌های کشت سلول ۱۰۰ میلی‌متری کشت داده شده تا تراکم سلول در سطح به ۳۰ تا ۵۰ درصد برسد. روز بعد محیط کشت با ۱۰ میلی‌لیتر محیط تازه DMEM حاوی TU/ml $۱۰^{۶}$ ویروس و ۶/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر پلی‌برن تعویض شد. (Invitrogen، آمریکا) بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت تعویض شد و ۴۸ ساعت بعد از ترانسداکشن آنتی‌بیوتیک زئوسین با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر یک از خانه‌ها اضافه شد. سپس هر ۳ روز یک بار تعویض محیط با محیط کشت تازه حاوی زئوسین انجام گرفت. پس از ۲ هفته انتخاب آنتی‌بیوتیکی کلونی‌های مقاوم به زئوسین به پلیت‌های ۶۰ میلی‌متری جدید منتقل شد و پس از یک هفته سلول‌های تکثیر شده به مدت ۵-۳ دقیقه تحت اثر تریپسین با غلظت ۰/۲۵ درصد قرار گرفت و به محض جدا شدن از پلیت‌ها با سرعت ۱۵۰۰ دور و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. DNA این سلول‌ها جهت بررسی‌های بعدی با PCR توسط کیت DNP (سیناژن، ایران) استخراج شد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-04-18]

در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) بر روی DNA سلول‌های انتخاب شده HT1080، PCR برای کل سازه ژنی بتاگلوبین اینتگره شده در ژنوم سلول‌های HT1080 با استفاده از پرایمرهای جلوبر HS4-F با توالی 5' GCTAGCGTGTGTGGAGACAAATGCAG 3' و معکوس HBB-R با توالی 5' CTCGAGAACCTCCAAATCAAGCCTCTAC 3'، قطعه‌ای که متشکل از قطعات HBB+HS2+HS3 با استفاده از پرایمرهای جلوبر HS3-F با توالی 5' ACGCGTTGTCTAGCAAAAGCAAGGGC 3' و پرایمرهای معکوس HBB-R و نیز قطعه‌ای متشکل از ۸۰۰ باز بالادست قطعه HS4 روی ژن مقاومت به زئوسین و قبل از 3´LTR به علاوه خود HS4 و بخشی از HS3، با استفاده از کیت Long Expand DNA Polymerase (Roshe، آلمان) تکثیر شد. محصولات PCR فوق در دو جهت تعیین توالی شدند.

در بررسی MOI (Multiplicity Of Infection) مناسب برای ترانسداکشن سلول‌های HT1080، پس از تعیین تیتر ویروس، در یک پلیت ۶ چاهکی ۲×۱۰^{۵} سلول HT1080 در هر چاهک شمارش و کشت داده شد. سپس ترانسداکشن سلول‌های HT1080 در هر یک از این چاهک‌ها با ویروس‌هایی که تیتر آنها تعیین شده بود، در MOIهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۱۰ انجام شد. پس از دو هفته انتخاب آنتی‌بیوتیکی کلونی‌های باقی‌مانده رنگ‌آمیزی و شمارش شدند. در چاله‌هایی که تعداد زیادی از سلول‌ها از بین رفته بودند، غلظت مورد استفاده در آن چاله یادداشت شد.

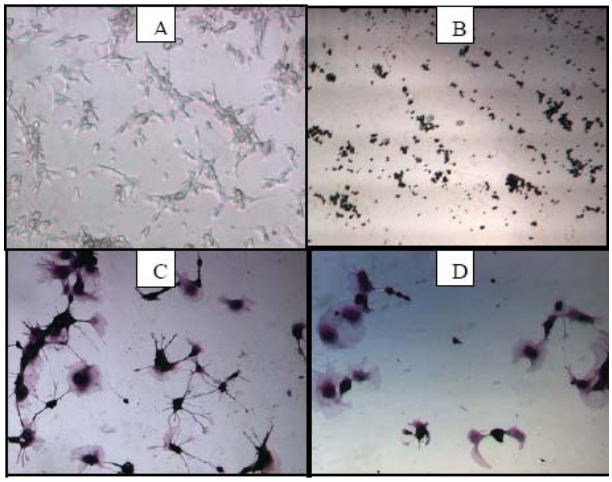
یافته‌ها

در مورد نتایج کلونینگ، یک کاست ژنی با طول ۶ کیلو باز به نام miniLCRHBG در وکتورpBGGT پس از هضم آنزیمی جدا و در وکتور pLenti4-Dest سابکلون و پلاسمید نهایی pLentiBGDEST ایجاد شد. صحت و درستی مراحل کلونینگ با PCR تایید و در دو جهت تعیین توالی شد.

نتایج تعیین توالی، فقدان هرگونه جهش بیماری‌زا در ژن بتاگلوبین و دیگر قطعات pLentiBGDEST را تایید کرد.

نتایج تعیین تیتر لنتی‌ویروسهای نوترکیب در سلول‌های HT1080 و MOI مناسب نشان داد که قبل از تعیین تیتر ویروس مقدار موثر زئوسین روی رده‌های سلولی HT1080 در این مطالعه ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

به منظور تعیین تیتر ویروس‌های تولید شده (شکل B-۱)، سلول‌های HT1080 با رقت ۲-۱۰ لنتی‌ویروس ترانسدیوس شدند. پس از دو هفته انتخاب آنتی‌بیوتیک زئوسین اغلب سلول‌ها زنده ماندند که بعد از رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله بنفش شده وبه علت کثرت قابل شمارش نبود. در حالی که وقتی از رقت‌های $۱۰^{-۴}$ و سپس $۱۰^{-۶}$ لنتی‌ویروس برای ترانسداکشن استفاده شد، به ترتیب تعداد کمتری کلونی پس ازانتخاب آنتی‌بیوتیک زئوسین باقی ماند که پس از رنگ‌آمیزی در شکل‌های (C-۱ و D-۱) مشاهده می‌شوند. پس از شمارش کلونی‌های زنده باقی‌مانده در هر یک از رقت‌های ویروس میانگین بدست آمده معرف تیتر ویروس بود که در سلول‌های HT1080، $۱۰^{۷}$ TU/ml بدست آمد (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج تعیین تیتر ویروس پس از ۲ هفته انتخاب آنتی‌بیوتیکی در گستره رقتی $۱۰^{-۲}$ تا $۱۰^{-۶}$ از ویروس تولید شده بر روی رده سلولی HT1080.

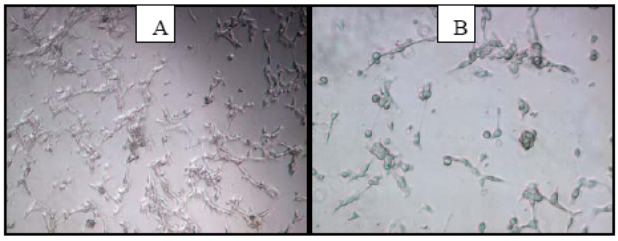
A: قبل از ترانسداکشن. B: رنگ‌آمیزی کلونی‌های زنده توسط کریستال ویوله بعد از ترانسداکشن با رقت $۱۰^{-۲}$ ویروس و پس از دو هفته انتخاب آنتی‌بیوتیکی. C: بعد از ترانسداکشن با رقت $۱۰^{-۴}$ ویروس و پس از دو هفته انتخاب آنتی‌بیوتیکی. D: بعد از ترانسداکشن با رقت $۱۰^{-۶}$ویروس و پس از دو هفته انتخاب آنتی‌بیوتیکی.

ترانسداکشن سلول‌های HT1080 در MOIهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۱۰ نشان داد با افزایش MOI تعدادکلونی‌های زنده بیشتر می‌شود، بطوری که MOI بهینه که در آن تقریبا" تمام سلولها ترانسدیوس شدند MOI برابر ۴ بود.

در بررسی نتایج ترانسداکشن سلول‌های HT1080 با لنتی‌ویروسهای تولید شده مشخص شد که سلول‌های HT1080 توسط لنتی‌ویروس نوترکیب با تیتر $۱۰^{۷}$ TU/ml ترانسدیوس شدند. پس از ۱۲ روز انتخاب آنتی‌بیوتیکی هیچ سلول زنده‌ای در پلیت‌های منفی دیده نشد و این در حالی بود که تعدادی کلونی مقاوم به آنتی بیوتیک در پلیت‌های تیمار

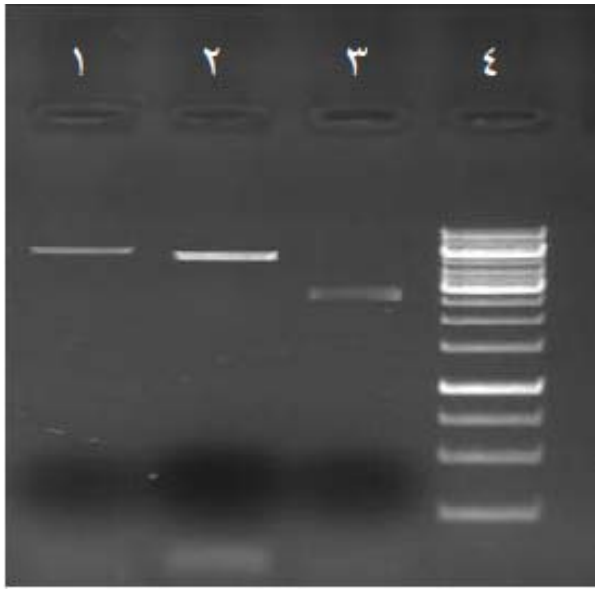
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-04-18]

شده با لنتی‌ویروس مشاهده شد (شکل ۲). این کلونی‌ها به محیط کشت جدید منتقل شدند. DNA آنها استخراج و با PCR آنالیز شد (شکل ۳). آخرین محصول PCR تعیین توالی شد و نتایج تعیین توالی تایید کننده اینتگره شدن سازه ژنی در ژنوم سلول میزبان بود.



شکل ۲- ترانسداکشن سلول‌های HT1080 با لنتی‌ویروسهای نوترکیب.

A: قبل از ترانسداکشن.**B**: سلول‌های ترانسدیوس شده و تیمار شده با زئوسین پس از دو هفته تیمار با زئوسین زنده ماندند.



شکل ۳- حاصل PCR سازه ژنی اینتگره شده درون ژنوم سلول‌های باقیمانده پس از انتخاب آنتی‌بیوتیکی.

۱: کل سازه ژنی ساخته شده حاوی **HBB+HS2+HS3+HS4** (٦ کیلوباز). ۲: سازه ژنی ساخته شده حاوی **HBB+HS2+HS3** (۵/۵۵ کیلوباز). ۳: باند متشکل از قطعات **Zeocin**+ **EM7**+ **HS4+Psv40** و بخشی از**HS3** (۲/۸ کیلوباز). ٤: مارکر (۱ کیلوباز).

بحث

روش ایده‌آل برای ژن درمانی، هدف‌گیری ژنی است ولی کارایی آن پائین است. اما استفاده از وکتورهای ویروسی جهت انتقال ژن روشی موثرتر است. یکی از اساسی‌ترین مشکلات هدف‌گیری ژنی، فراوانی پایین وقوع نوترکیبی همسان می‌باشد (۱۳). در اوایل دهه ۹۰ و همزمان با ابداع وکتورهای ویروسی، تحقیقات در زمینه ژن‌درمانی بیماری‌ها به سمت استفاده از این وکتورها معطوف شد. در ابتدای امر وکتورهای ویروسی به علت داشتن قسمت زیادی از ژنوم ویروس وحشی و بیان پروتئین‌های ویروسی در زمان تجویز برای ژن درمانی واکنش‌های ایمنی بیمار را برمی‌انگیختند و در تجویز مجدد خطر بروز پاسخ‌های ایمنی شدید وجود داشت (۱۸). نسل‌های جدید این وکتورها دارای حداقل ژنوم مورد نیاز می‌باشند، بنابراین ظرفیت پذیرش ژن در این وکتورها افزایش و ایمونوژنیسیتی آنها کاهش یافته است (۱۴). در چند سال اخیر مطالعات متعددی برای ژن‌درمانی بتاتالاسمی با استفاده از وکتورهای رتروویروسی و اخیراً لنتی‌ویروسی در طیف وسیعی از سلول‌ها از قبیل رده‌های سلولی پستانداران، سلول‌های بنیادی جنینی موش وسلول‌های بنیادی خون‌ساز موش و انسان صورت گرفته است (۱۵). LCR عنصر تنظیمی اختصاصی ژن بتاگلوبین است. اتصال فاکتورهای رونویسی به مناطق HS از LCR باعث تسهیل باز شدن کروماتین می‌شود. بدین ترتیب عناصر تنظیمی به ژن بتاگلوبین دسترسی می‌یابند و باعث می‌شوند این ژن در سطح بالا بیان شود. LCR مانع اعمال اثرات مکانی کروماتین بر ژن بتاگلوبین و خاموش شدن ژن انتقال یافته می‌گردد (۱۶). این خصوصیات LCR با توجه به ظرفیت محدود وکتورهای ویروسی منجر به طراحی وکتورهایی شد که حاوی ژن بتاگلوبین همراه با قطعات HS بودند. اما متاسفانه افزودن قطعات HS در وکتورهای ویروسی با مشکلاتی مواجه است، زیرا این قطعات باعث ناپایداری ژنوم ویروس و تیتر پایین آن می‌شوند. قطعات کوچکتر (۳۰۰ bp) به نام هسته (core element)، دارای بخشی از فعالیت LCR هستند (۱۷). این قطعات توسط گروه‌های مختلف در داخل ناقلین رتروویروسی قرار گرفتند و میزان بیان ژن بتاگلوبین توسط این وکتورها بررسی شد. بررسی‌ها نشان داده است که ناقلینی که دارای یک عنصر LCR با اندازه یک کیلوباز (حاصل ترکیب نواحی HS2,HS3,HS4) هستند، بتاگلوبین را در سطح متوسط در سلول‌های اریتروئیدی بیان می‌نمایند. همچنین این LCRهای کوچک قادر به بیان دائمی و بالای بتاگلوبین نیستند (۱۹،۱۸). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۰ توسط May انجام شد، نشان داده شد که استفاده از HS unit، که شامل Core و توالی‌های اطراف آن می‌باشد، در وکتور ویروسی سبب بیان بیشتر و پایدارتر ژن بتا در مقایسه با بکار بردن HS Core

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-04-18]

می‌شود (۲۷). این تحقیقات نشان داد که سلول‌های آلوده شده با عناصر LCR بزرگتر به خاموش شدن رونویسی (Transcriptional silencing) مقاوم‌تر هستند (۲۰). درسال ۲۰۰۱ Molete وهمکارانش نشان دادند استفاده از mini LCR متشکل از unitهای HS2 ، HS3 و HS4 به طول ۳/۵۵ کیلوباز، ۲۳/۵ برابر میزان بیان بتاگلوبین را افزایش می‌دهد (۲۱). در حالی که Rikki وهمکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان دادند اگر طول این mini LCR ۳ کیلوباز باشد، افزایش بیان بتاگلوبین ۱۵ درصد شده که حدود ۸/۵ درصد کاهش یافته است (۲۲). بنابراین هر چه طول mini LCR بزرگتر باشد، بیان ژن بتاگلوبین افزایش بیشتری خواهد یافت. در مطالعات اخیر بیشتر از وکتورهای لنتی ویروسی برای ژن درمانی استفاده می‌شود. با وجود آنکه لنتی‌ویروس‌ها متعلق به خانواده رتروویروس‌ها هستند، ولی لنتی‌وکتورها توانایی انتقال ژن به سلول‌هایی که در حال تقسیم نیستند را هم دارا می‌باشند، درحالی که وکتورهای رتروویروسی فقط توانایی انتقال ژن به سلول‌های درحال تقسیم را دارند (۲۳). به جهت کارآیی بالای لنتی‌ویروس‌ها، امروزه از آنها در ژن‌درمانی طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های متابولیکی، بیماری‌های ویروسی، فیبروز کیستیک، دیستروفی عضلانی، هموفیلی، رتینوئید پیگمنتوزا و آلزایمر استفاده می‌شود. از آنجایی که لنتی‌ویروس‌ها سلول‌های غیرتقسیمی را نیز آلوده می‌کنند، بنابراین می‌توان از آنها برای انتقال ژن به سلول‌های بنیادی با هدف ژن‌درمانی بیماری‌های خونی مانند بتاتالاسمی استفاده کرد (۵، ۲۶-۲۴). با توجه به اینکه جداسازی، نگهداری و تحقیق بر روی سلول‌های بنیادی خون‌ساز با مشکلاتی روبروست، در این تحقیق بر آن شدیم تا ابتدا میزان ترانسداکشن لنتی‌ویروس‌های حاوی ژن بتاگلوبین و mini LCR تولید شده را در یک رده سلولی فیبروسارکومای انسانی به نام HT1080 بررسی کرده و سپس از نتایج این مطالعه در تحقیقات آتی با انتقال سازه فوق به کمک لنتی‌ویروس‌ها به سلول‌های بنیادی خون‌ساز با هدف ژن درمانی بتاتالاسمی استفاده کنیم. هم‌چنین در همین راستا میزان ترانسداکشن سلول‌های HT1080 توسط این لنتی‌ویروس‌های نوترکیب با سایر سلول‌های پستانداران مانند Cos-7 (رده سلولی کلیه میمون) و نیز K562 (رده سلول اریتروئیدی انسانی) که حاصل مطالعات قبلی همین گروه تحقیقاتی است (۱۱) مقایسه شد.

وکتورهای لنتی‌ویرال بر پایه HIV-1 هستند. در این وکتورها به منظور افزایش ایمنی‌زیستی ژن‌های غیرضروری و بیماری‌زای ویروس به حداقل رسانده شده است و دارای نقص در سیستم همانندسازی می‌باشند. ایمنی‌زیستی وکتورهای لنتی‌ویرال نسل سوم نسبت به نسل‌های قبلی افزایش یافته است. زیرا نسل سوم این وکتورها از چهار وکتور مجزا تشکیل شده، بطوری که یکی از آنها وکتور انتقال دهنده و سه وکتور دیگر وکتورهای بسته‌بندی کننده ویروس هستند. این چهار وکتور با هم همولوژی ندارند. همین امر امکان نوترکیبی بین آنها و قرار گرفتن ژن‌های ویروسی در مجاورت یکدیگر را کاهش داده و در نتیجه احتمال تولید ذرات ویروسی بیماری‌زا بسیارکاهش یافته است.

در این تحقیق برای ورود ژن بتاگلوبین به همراه mini LCR به سلول‌های HT1080 از سیستم لنتی‌وکتور pLenti-Dest به همراه ۳ وکتور کمکی plp1، plp2 و pVSVG استفاده گردید. وکتورplp1 حاوی ژن‌های gag و pol است که ژن gag پروتئین‌های کپسید ویروس و ژن pol آنزیم اینتگراز را بیان می‌کنند. پروتئین Rev توسط وکتور plp2 و پروتئین VSVG که ژن آن از ویروس وزیکولار استوماتیتیس گرفته شده توسط وکتور pVSVG در سلول‌های تولیدکننده ویروس 293T بیان می‌شوند. پروتئین VSVG تروپیسم بافتی وسیعی دارد و از آن در ساختار ویروس برای توانمند ساختن ویروس جهت آلوده کردن طیف وسیعی از سلولها استفاده می‌شود. لنتی‌وکتور pLenti-Dest دارای توالی‌های LTR ´5 و ´3 است و قادر است از این نواحی به کمک آنزیم اینتگراز به صورت راندوم در ژنوم میزبان اینتگره شود. سایر عناصر وکتور pLenti-Dest عبارتند از: پروموتر PRSV، سیگنال بسته‌بندی ویروسی Ψ، توالی متصل شونده به پروتئین Rev (RRE)، پروموتر یوکاریوتی PSV40 جهت بیان مارکر مقاومت به آنتی بیوتیک زئوسین. برای تائید تولید لنتی‌ویروس‌های نوترکیب از روش RT-PCR استفاده شد. زیرا لنتی‌ویروس‌ها RNA دارهستند. بنابراین پس از استخراج RNA از آنها با انجام RT-PCR و به کمک پرایمرهای اختصاصی تولید ویروس‌ها تائید شد.

تیتر لنتی‌ویروس‌های نوترکیب ساخته شده در سلول HT1080 پس از ۲ هفته اثر دادن آنتی‌بیوتیک زئوسین 10^{7} TU/ml بود که تیتر مناسبی برای ترانسداکشن رده‌های سلولی پستانداران است. این تیتر در مقایسه با مطالعات قبلی که توسط همین گروه تحقیقاتی بر روی رده‌های سلولی Cos-7 و K562 صورت گرفته بود نشان داد میزان تیتر ویروس در سلول‌های HT1080 ده برابر بیشتر از رده‌های سلولی Cos-7 و K562 است. از این نتایج چنین استنباط می‌شود که توانایی ترانسداکشن لنتی‌ویروس‌ها به نوع سلول هدف نیز بستگی داشته و سلول‌های HT1080 نسبت به دیگر رده‌های سلولی

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-04-18]

مطالعه شده بیشتر ترانسدیوس می‌شوند. به همین جهت می‌توان از آنها در مطالعاتی که از لنتی ویروس‌ها استفاده می‌شود، در تعیین تیتر ویروس‌ها استفاده کرد.

هم‌چنین مشاهده شده که میزان ترانسداکشن سلول‌های HT1080 در حضور ترکیب پلی‌کاتیونیک پلی‌برن مانند سلول‌های Cos-7 و K562 حدود دو برابر افزایش می‌یابد؛ زیرا ترکیباتی که بار مثبت دارند موجبات رسوب ذرات ویروسی با بار منفی را بر روی سطح غشای سلول‌های هدف فراهم می کنند (۲۸). از طرفی برخی تحقیقات نشان داده‌اند که پلی‌برن علاوه بر افزایش ترانسداکشن، اثرات نامطلوب ویرال وکتور روی سلول‌های هدف را کاهش داده و باعث افزایش بقای سلول‌های ترانسدیوس شده نیز می‌شوند (۲۹). نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد سازه ژنی حاوی بتاگلوبین و mini LCR با طول حدود ۶ کیلو باز قادر است در لنتی‌ویروس‌های نوترکیب بسته‌بندی شده، بطوری که تیتر این ویروس‌های تولید شده برای ترانسداکشن سلول‌های پستانداران از جمله HT1080 مناسب بود. لنتی‌ویروس‌های نوترکیب حاصل قادر بودند سلول‌های HT1080 را که یک رده سلولی فیبروسارکومای انسانی است، ترانسدیوس کرده و داخل ژنوم آنها وارد شوند. بنابراین در صورتی که با هدف ژن‌درمانی از سلول‌های بنیادی خونساز بیماران بتاتالاسمی ماژور به عنوان سلول هدف برای وارد کردن سازه ژنی فوق به ژنوم آنها با همین روش استفاده گردد، می‌توان انتظار داشت این سازه ژنی در ژنوم سلول‌های بنیادی خونساز نیز بطور پایدار وارد شده و پروتئین بتاگلوبین را در آنها بیان کند.

از طرفی سلول HT1080 نوعی رده سلولی پستاندار و سرطانی است، بطوری که منشا فیبروسارکومای انسانی دارد. بنابراین چنین استنباط می‌شود که می‌توان از لنتی‌ویرال وکتورها به عنوان انتقال موثر، کارآمد و پایدار ژن به سلول‌های هدف در ژن‌درمانی بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی دیگر از جمله سرطان که امروزه شیوع بالایی دارد، نیز استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

کلیه هزینه‌های این تحقیق از محل بودجه تحقیقاتی مصوب در انستیتو پاستور تهران - بخش پزشکی مولکولی- تامین شده است که بدین وسیله از زحمات ومساعدت‌های انجام شده سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

1. Weatherall DJ, Gibbons Higgs OR, Olivier NF, Wood WG, eds. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Italy: Black Well Science Ltd; 2001. p.150-296.
2. Rund D, Rachmilewitz E. New trends in the treatment of beta-thalassaemia. Oncol Hematol 2000;33:105-18.
3. Khanahmad H, Noori Daloii MR, Shokrgozar MA, Azadmanesh K, Niavarani AR, Karimi M. A novel single step double positive double negative selection strategy for beta-globin gene replacement. Biochem Biophys Res Commun 2006;345:14-20.
4. Beris PD, Regis D, Philippe E. Prevention of beta thalassemia major and Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. Semin Hemat 1995;32:244-61.
5. Naldini L, Blmer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science 1996;272: 263-67.
6. Wolkowicz R, Nolan GP. Retroviral technology – Applications for expressed peptide libraries. Front Biosci 2003;8:603-19.
7. Yee JK, Friedmann T, Burns JC. Generation of high titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. Methods Cell Biol 1994;43:99-112.
8. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene therapy. J Virol 1998;72:9873-80.
9. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. Nat Med. 2001 Jan;7(1):33-40
10. Hardison R, Slightom JL, Gumucio DL, Goodman M, Stojanovic N, Miller W. Locus control regions of mammalian beta-globin gene clusters: combining phylogenetic analyses and experimental results to gain functional insights. Gene 1997; 205:73-94.
11. Bikhof Torbati M, Khanahmad H, Jamshidi F, Karimipour M, Sadeghizadeh M, Shokrgozar MA, et al. Transduction of mammalian cell lines by recombinant lentiviral particles carrying mini LCR and β-globin gene due to gene therapy of β-thalassemia. MMJ. Under press.
12. Sambrook J, Russell D, eds. Molecular cloning. 3rd ed. New York: CSHL Press; 2001.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-04-18]

13. Joyner LA. Gene targeting: a practical approach. 2nd ed. New York: Oxford University press; 2000. p.1-60.

14. Manilla P, Rebello T, Afable C, Lu X, Slepushkin V, Humeau LM, et al. Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector. Human Gene Ther 2005; 16:17-26.

15. Wang H, Shayakhmetov MD, Leege T. A capsid-Modified helper- dependent adenovirus vector containing the β-globin locus control region display s a nonrandom integration pattern and allows stable, erythroid-specific gene expression. J Virol 2005; 79:10999-1013.

16. Levings PP, Bungert J. The human β-globin locus control region, a center of attraction. Eur J Biochem 2002; 269:1589-99.

17. Farrell CM, Grinbery A, Huang SP, Chen D, Pichel JG, Westphal H, et al. A large upstream region is not necessary for gene expression or hypersensitive site formation at the mouse beta-globin locus. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97:14554-58.

18. Stathopulos PB. Taking the good out of the bad: lentiviral–based gene therapy of the hemoglobinopathies. Biotechnol Adv 2003; 21;513-26.

19. Imren S, Payen E, Westerman K, Pawliuk R, Fabry ME, Eaves CJ, et al. Permanent and panerythroid correction of murine β thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:14380-85.

20. Badley MB, Sattler RM, Raftopoules H, Ward M, Grossman IR, Townes TM, et al. Correction of phenotype in thalassemia mouse model using a nonmyeloblative marrow transplantation regimen. Biol Blood Marrow Transplant 2002; 8:453-61.

21. Molete JM, Petrykowska H, Bouhassira E, Feng YQ, Miller W, Hardison RC. Sequences flanking hypersensitive sites of the b-Globin locus control region are required for synergistic enhancement. Mol Cell Biol 2001;21:2969-80.

22. Bharadwaj RR, Trainor CD, Pasceri P, Ellis J. LCR-regulated transgene expression levels depend on the Oct-1 site in the AT-rich region of beta-globin intron-2. Blood 2003; 101:1603-10.

23. Pawliuk R, Bachelot TM, Raftopoulos H, Kalberer C, Humphries RK, Bank A, et al. Retroviral vectors aimed at gene therapy of human beta-globin gene disorders. Ann NY Acad Sci 1998; 850:151-62.

24. Amado RG, Chen YIS. Lentiviral Vectors- the promise of gene therapy within reach? Science 1999; 285:674-76.

25. Adler K, Gifford J, Sumner R. HIV as a Vector in Gene Therapy. Avaoable at: http://wwwpp.uwrf.edu/%7Ekk00/hivvector/hivvector.htm. Accessed date: 13 Dec, 1999.

26. Planelles V. Homepage of Vicente Planelles. Avaiable at: http://www.urmc.rochester.edu/gebs/faculty/Vicente_Planelles.htm. Accessed date: 13 Dec, 1999.

27. May C, Rivella S, Callegari J, Heller G, Gaensler KM, Luzzatto L, et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. Nature 2000; 406:82-86.

28. Lehmusvaara S, Rautsi O, Hakkarainen T, Wahlfors J. Utility of cell-permeable peptides for enhancement of virus-mediated gene transfer to human tumor cells. BiolTech 2006; 40:573-76.

29. Castro BA, Weiss CD, Wiviott LD, Levy JA. Optimal conditions for recovery of HIV from peripheral blood mononuclear cells. J Clin Microbiol 1988; 26:2371-76.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-04-18]