

تولید لنتی ویروس اینتگراز منفی به منظور بیان گذرای پروتئین مورد نظر و کاهش اثرات جانبی ویروس در ژن درمانی

لاله شریعتی^۱، زهرا محمدی^۲، زهرا حجازی^۳، مهران مدرس^۴، دکتر منصور صالحی^۵،
دکتر محمد حسین مدرسی^۶، دکتر حسین خان احمد^۷

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: وکتورهای لنتی ویروسی ابزارهای مؤثری برای ژن درمانی می‌باشند؛ ولی ورود پرو-ویروس به ژنوم، استفاده از آن‌ها را خطرناک کرده است. بنابراین، وکتورهای لنتی ویروسی ناقص از نظر اینتگراز بی‌خطرتر را می‌توان با ایجاد موتاسیون در ژن اینتگراز تولید نمود تا به طور ویژه، از ورود پرو-ویروس به ژنوم جلوگیری نماید. در این مطالعه، یک وکتور لنتی ویروسی ناقص از نظر ژن اینتگراز نسل دوم، طراحی و ساخته شد؛ این محصول، برای هدف قرار دادن ژن به طور گذرا با وکتور ویروسی مناسب می‌باشد.

روش‌ها: با به کار بردن استراتژی جهش‌زایی هدفمند با تکنیک Overlap polymerase chain reaction، یک جهش بدمعنی (D64V) در ناحیه کاتالیتیک ژن اینتگراز در پلاسمید بسته‌بندی psPAX2 ایجاد و با تکنیک توالی‌یابی، تأیید گردید. لاین سلولی HEK293T با سه پلاسمید psPAX2 (طبیعی و ناقص از نظر اینتگراز)، pLOX (پلاسمید انتقال) و PMD2G (پلاسمید انولوپ) ترانسفکت گردید. سپس، ویروس برداشت و در لاین سلولی HEK293T منتقل گردید. میزان بیان ژن گزارشگر Green fluorescent protein (GFP)، به مدت ده روز، در سلول‌های منتقل شده با ویروس طبیعی و ناقص با میکروسکوپ فلورسنت بررسی گردید.

یافته‌ها: ما کاهش تعداد سلول‌های بیان کننده ژن GFP را با شیب ملایم در سلول‌های منتقل شده با ویروس طبیعی در طول دوره مشاهده کردیم. در مقابل، در مورد ویروس‌های ناقص، کاهش شدیدی در تعداد سلول‌های بیان کننده ژن GFP داشتیم.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، psPAX2 ناقص از نظر اینتگراز ساخته و تأیید گردید. نتایج نشان داد که وکتورهای لنتی ویروسی ناقص از نظر اینتگراز می‌تواند ابزار مفیدی برای بیان ژن به صورت گذرا و کارآمد باشد. به این ترتیب، معایب هدف قرار دادن ژن با ویروس طبیعی حذف می‌گردد.

واژگان کلیدی: بسته‌بندی لنتی ویروس، ناقص از نظر اینتگراز، بیان گذرا

ارجاع: شریعتی لاله، محمدی زهرا، حجازی زهرا، مدرس مهران، صالحی منصور، مدرسی محمد حسین، خان احمد حسین. تولید لنتی ویروس اینتگراز منفی به منظور بیان گذرای پروتئین مورد نظر و کاهش اثرات جانبی ویروس در ژن درمانی. مجله دانشکده پزشکی

اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۶): ۳۰۵-۳۱۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی و کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- کارشناس آزمایشگاه، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۶- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۷- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

مقدمه

در بین روش‌های تحویل ژن (Gene delivery) بر پایه‌ی ویروس، وکتورهای آدنوویروس کایمیریک، وکتور همراه آدنو (Adeno-associated vectors) یا AAV) و وکتورهای لنتی ویروسی وجود دارند. گرایش وکتورهای آدنوویروسی و وکتورهای همراه آدنو به سلول‌های متفاوت، محدود و وابسته به پروتئین‌های کپسید آن‌ها می‌باشد، اما در سطوح بالا قادر به تحویل ژن هستند (۱). وکتورهای لنتی ویروسی ابزارهای بسیار مناسبی برای تحویل ژن می‌باشند؛ چرا که می‌توانند طیف وسیعی از انواع سلول‌ها را بعد از یک بار تلقیح به صورت پایدار آلوده نمایند (۲). به طور مثال، همانندهای وحشی (HIV-1 و SIV) به طور اختصاصی به ژنوم هدف اینتگره می‌شوند (۳).

نگرانی‌هایی مربوط به استفاده از این وکتورها در تحویل ژن مانند ورود وکتور به ژنوم و خطر ایجاد جهش‌زایی تداخلی (Insertional mutagenesis) وجود دارد (۴). برای کمتر کردن این خطر، محققان وکتورهای لنتی ویروسی فاقد عملکرد پروتئین اینتگران (Integrase-defective lentiviral vectors) یا IDLVs را طراحی نموده‌اند. مزیت این وکتورها آن است که ژنوم ویروس نوترکیب به صورت اپی‌زومال (خارج کروموزومی) می‌باشد، آنتی‌ژن‌های ویروسی را در این فرم بیان می‌نمایند و خطرات اینتگره شدن انواع طبیعی را ندارند (۵).

در طی آلودگی با رتروویروس‌ها، نه تنها DNA پرو-ویروسی به ژنوم میزبان اینتگره می‌گردد، بلکه تجمعی از DNA اپی‌زومال وجود دارد که از حلقوی شدن cDNA ساخته شده‌ی ژنوم ویروس اینتگره

نشده به وجود آمده است (۶).

E-DNA حلقوی به دو شکل یک LTR (Long terminal repeat) و دو LTR پشت سر هم، در سلول‌های آلوده یافت می‌گردد. نوع اول با واکنش Autointegration به وجود می‌آید و منجر به بازآرایی اشکال حلقوی با نوترکیبی هم‌ساختی (Homologous recombination) بین دو LTR می‌شود. نوع دوم از اتصال سر به دم دو LTR در cDNAهای ساخته شده‌ی ویروس به وجود می‌آید (۷). اگرچه DNA وارد شده به ژنوم میزبان مسئول تولید ذرات ویروس جدید است، اما در این میان نقش E-DNA نامعلوم می‌باشد. دانشمندان نشان داده‌اند که E-DNA به طور فعال نسخه‌برداری می‌شود و E-DNAهای حلقوی در سلول‌های غیر تقسیم شونده حضور دارند (۷). ویروس‌های ناقص اغلب برای ارزیابی فعالیت نسخه‌برداری E-DNA استفاده می‌گردد و در لنتی ویروس‌های دارای نقص در آنزیم اینتگران، وارد ژنوم میزبان نمی‌شوند و E-DNA در سلول‌های غیر تقسیم شونده تجمع می‌یابد (۸).

استفاده از لنتی ویروس‌های دارای نقص در آنزیم اینتگران، محدودیت‌هایی دارد. این گونه‌ها به مدت طولانی در سلول‌های غیر قابل تقسیم مانند نورون‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های ماهیچه زنده می‌مانند، اما در سلول‌های در حال تقسیم همچون سلول‌های T، دارای نیمه عمر کوتاهی هستند و علت آن نداشتن منشأ همانندسازی در E-DNA می‌باشد که همین عامل از حفظ آن در سلول‌های در حال تقسیم جلوگیری می‌نماید. از ماهیت گذرا اما بیانی E-DNA در ژن درمانی بهره‌برداری شده است. تعییرات ژنومی هدف‌دار در سلول‌های منتقل شده با لنتی ویروس‌های

روش‌ها

سه پلاسمید PSpax2 (پلاسمید بسته‌بندی) (شکل ۱)، PMD2G (پلاسمید انولوپ) و PLOX (پلاسمید ترانسفر حاوی ژن GFP) تهیه گردید. در پلاسمید PSpax2 در ناحیه‌ی ۳۹۶۹، جایگاه برش آنزیم محدود کننده‌ی EcoR V و در ناحیه‌ی ۵۷۰۰ جایگاه برش آنزیم محدود کننده‌ی Afl II وجود دارد و کدون ۶۴ بین این دو ناحیه قرار گرفته است. چهار پرایمر یکی در ناحیه‌ی ۳۹۶۹ (F1)، یکی در ناحیه‌ی ۵۷۰۰ (R₂) و دو تا در محدوده‌ی کدون ۶۴ [یکی Reverse (R1_{int}) و یکی Forward (F2_{int})] که هر دو در کدون ۶۴ موتاسیون دارد] طراحی شد. دو پرایمر وسط با هم هم‌پوشانی داشت (جدول ۱).

PCR اول با پرایمر F1 و R1_{int} و PCR دوم با پرایمر F2_{int} و R2 انجام شد. طول قطعه در PCR اول برابر ۱۴۰۰ و در دومی ۴۰۰ جفت باز بود. هر دو PCR با آنزیم Taq DNA polymerase (*Thermus aquaticus*) بهینه‌سازی شد و با آنزیم Pfu DNA polymerase (*Pyrococcus furiosus*) انجام گردید. محصول هر دو PCR روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. عمل تصفیه با کیت فرمتاز مطابق دستورالعمل روی هر دو محصول انجام و دوباره محصول کار روی ژل آگارز بررسی و برای انجام Overlap PCR آماده گردید.

با محصول PCR اول و دوم، یک Overlap PCR با پرایمر F1 و R2 و سیکل دمایی ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد دو دقیقه، پنج سیکل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه، سی سیکل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی

ناقص مشاهده می‌شود (۱). گونه‌های اپی‌زومال وکتور را می‌توان جهت بیان مؤثر ژن مورد نظر در بیشتر وکتور لنتی ویروس ناقص از نظر اینتگران تحت کنترل درآورد.

سیستم‌های بسته‌بندی لنتی ویروسی در سه نسل طبقه‌بندی شده‌اند. در نسل اول وکتورهای بسته‌بندی لنتی ویروس‌های مهندسی شده دو عدد می‌باشد. پروتئین‌های مرکزی، آنزیم‌ها و فاکتورهای جانبی روی یک پلاسمید و ژن انولوپ از ویروس استوماتیتیس وزیکولار (Vesicular stomatitis virus G یا VSV-G) روی پلاسمید دیگری قرار دارد (۹). در نسل دوم که هنوز در بیشتر موارد استفاده می‌گردد، با کاهش تعداد اجزای ویروس HIV-1 (Human immunodeficiency virus) به gag، rev، pol و tat، احتمال ایجاد خطر زیستی بهبود می‌یابد (۹-۱۰).

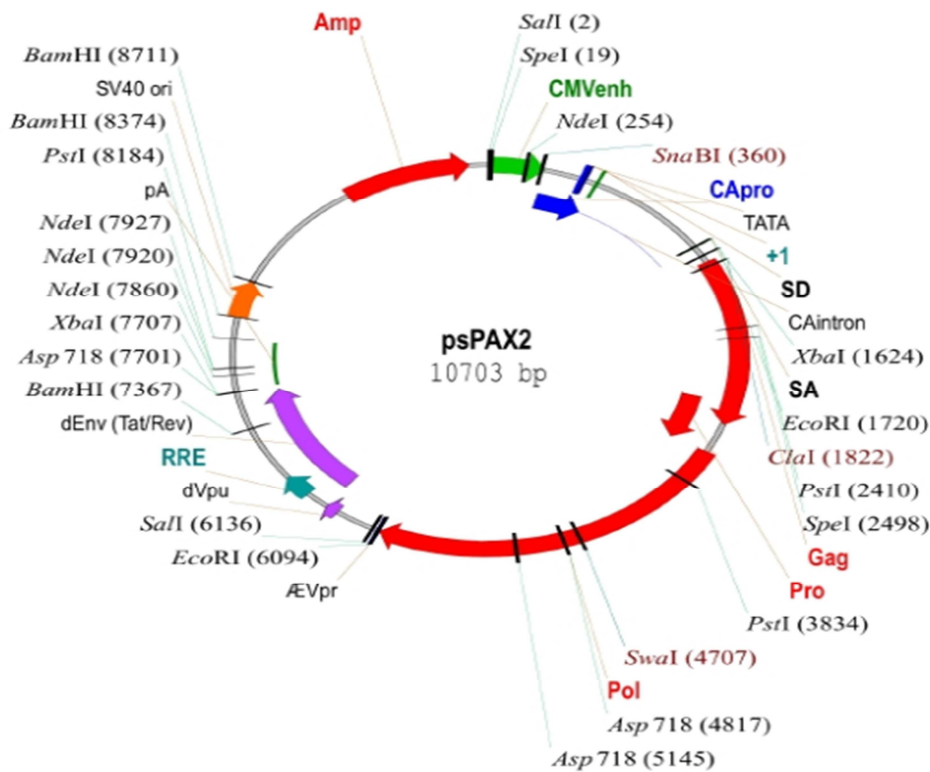
در نسل دوم وکتورهای بسته‌بندی لنتی ویروس‌های مهندسی شده سه عدد می‌باشد. ژن مورد نظر مطالعه‌ی حاضر در پلاسمید ترانسفر، gag، pol و rev در پلاسمید بسته‌بندی و ژن انولوپ از ویروس استوماتیتیس وزیکولار در پلاسمید انولوپ قرار دارد. نگرانی خطر زیستی مربوط به تولید ویروسی است که به طور بالقوه همانندسازی نماید (RCL یا Replication competent virus). نسل سوم، چهار وکتوری (پلاسمید ترانسفر، دو پلاسمید بسته‌بندی و پلاسمید انولوپ) می‌باشد (۱۱).

هدف از انجام تحقیق حاضر، ساخت یک لنتی ویروس ناقص از نظر اینتگران از نوع طبیعی با سیستم بسته‌بندی نسل دوم بود که با کارایی بالا وارد سلول می‌گردد، اما در ژنوم ادغام نمی‌شود.

دمای اتاق و تمام مدت شب در یخچال گذاشته شد؛ سپس، در باکتری *E. coli* Top10 (Escherichia coli) مستعد شده با روش کلسیم کلراید، ترانسفورم گردید. آن گاه، باکتری‌ها روی محیط LB (Lysogeny broth) آگار حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شدند و پس از آن، Colony PCR با پرایمرهای عمومی M13 انجام گرفت. کلون‌هایی که قطعه‌ی ۱۸۰۰ جفت بازی مورد نظر را داشتند، روی محیط LB قرار داده شدند و پلاسمید از آن‌ها استخراج گردید.

سانتی‌گراد ۴ دقیقه و ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گردید. محصول مورد نظر از روی ژل استخراج و PCR مورد نظر جهت اضافه شدن نوکلئوتید A با dATP و آنزیم Taq DNA polymerase انکوبه شد (Taq treatment).

کلون کردن قطعه‌ی مورد نظر در وکتور TA/cloning: واکنش اتصال بین قطعه‌ی حاصل از Overlap PCR (که Taq treatment شده و از روی ژل استخراج شده بود) و وکتور تجاری TA/cloning انجام گرفت و محصول اتصال به مدت یک ساعت در



شکل ۱. نقشه‌ی پلاسمید psPAX2

جدول ۱. ترادف پرایمرهای مورد استفاده در ساخت psPAX2 ناقص از نظر اینترگراز

پرایمر	ترادف پرایمر
F1	5'ACACCAGGGATTAGATATCATTA3'
R1 _{int}	5'TTCTAAATGTGTACATACTAGCTGC3'
F2 _{int}	5'AGCTAGTATGTACACATTTAGAAGG3'
R2	5'TTGTACTIONGCTGTCTTAAGATGTTC3'

فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت. ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکت، سوپ روی سلول‌ها برداشته شد و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. برداشت سوپ روی سلول‌ها طی سه مرحله به فاصله‌ی ۲۴ ساعت انجام گرفت.

تعیین تیترو ویروس: تعداد $10^5 \times 1/5$ سلول HEK293T در پلیت ۱۲ خانه‌ای کشت داده شد. رقت‌های 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} از لنتی ویروس طبیعی و جهش یافته تهیه و هر کدام در یک خانه اضافه گردید. سپس، سلول‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک هفته نگهداری و درصد سلول‌های سبز با روش فلوسایتمتری در هر خانه تعیین شد. تیترو ویروس طبق پروتکل استاندارد (۱۲) تعیین گردید.

انتقال سلول‌های HEK293T با لنتی ویروس طبیعی و جهش یافته: تعداد $10^5 \times 1/5$ سلول HEK293T در پلیت ۱۲ خانه‌ای کشت داده شد. از ویروس طبیعی به یک خانه و از ویروس جهش یافته به خانه‌ی دیگری با (Multiplicity of infection) MOI برابر با ۵ اضافه گردید. سپس سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند و تا دو هفته تحت نظر بودند و از نظر تعداد سلول‌های بیان کننده‌ی GFP و شدت بیان، با میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند

یافته‌ها

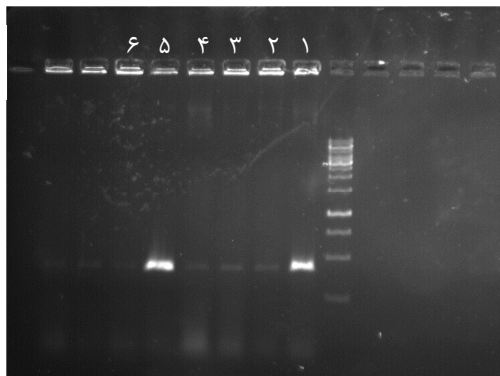
قطعات ۴۰۰ تایی و ۱۴۰۰ تایی با انجام دو PCR با پرایمرهای R2، F2_{int} و R1، F1_{int} حاصل شد

پلاسمید استخراج شده با دو آنزیم Afl II و EcoR V تحت عمل هضم قرار گرفت و روی ژل گذاشته شد. قطعه‌ی ۱۸۰۰ جفت بازی از ژل استخراج و جهت تأیید ایجاد جهش در موقعیت D64، با پرایمر R2 تعیین توالی گردید.

پلاسمید PSpax2 با دو آنزیم Afl II و EcoR V هضم شد و روی ژل ۱ درصد قرار گرفت. یک قطعه مربوط به ۱۸۰۰ جفت بازی و دیگری مربوط به پلاسمید می‌باشد که قطعه‌ی مربوط به پلاسمید استخراج گردید. عمل Ligation بین دو قطعه‌ی ۱۸۰۰ دارای جهش در موقعیت D64 و پلاسمید صورت گرفت. محصول واکنش اتصال، در باکتری E. coli Top10 مستعد شده با کلسیم کلراید ترانسفورم گردید. باکتری‌ها روی محیط LB آگار حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شد و عمل Colony PCR روی کلونی‌های حاصل با پرایمرهای عمومی انجام گردید.

تولید لنتی ویروس طبیعی و فاقد فعالیت ایتگراز در رده‌ی سلولی HEK293T: دو مجموعه پلاسمید بسته‌بندی شامل PSpax2 طبیعی و جهش یافته، PMD2G و پلاسمید ترانسفر بیان کننده‌ی ژن GFP (Plox) توسط پلوسی‌فکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen USA) به داخل سلول‌های رده‌ی HEK293T ترانسفکت شد (تعداد سلول و جزئیات طبق دستورالعمل کیت) (یک روز قبل از ترانسفکت سلول‌ها کشت داده شد). ابتدا کمپلکس DNA-Polyfect طبق پروتکل شرکت، آماده و محیط کشت سلول‌ها تعویض شد. این کمپلکس به سلول‌ها اضافه و محیط کشت بعد از ۱۴ ساعت تعویض گردید. سپس، سلول‌ها توسط میکروسکوپ

پلاسمید PSpax2 integrase minus ساخته شد. این پلاسمید داخل باکتری تغییر یافت و پلاسمید استخراج گردید.



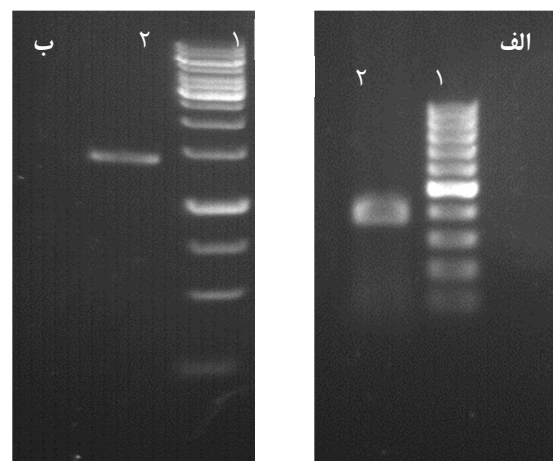
شکل ۳. ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی DNA ۱۰۰۰ جفت بازی و ستون ۲ و ۶، قطعه‌ی ۱۸۰۰ جفت بازی

تولید لنتی ویروس: قطعات لنتی ویروس در داخل سلول روی هم سوار شده، ویروس طبیعی و ناقص از نظر ژن اینتگران تولید می‌شود. میزان ترانسفکت از روی درصد سبز شدن سلول‌ها سنجیده می‌شود. حدود ۸۰ درصد سلول‌ها ترانسفکت شده بودند (شکل ۴).

تعیین تیترو ویروس: تیترو ویروس طبیعی $10^5 \times 2/1$ و تیترو ویروس ناقص $10^5 \times 1$ به دست آمد.

بررسی عملکرد لنتی ویروس ناقص از نظر ژن اینتگران: در روزهای اول حدود ۶۰-۷۰ درصد سلول‌ها در هر دو خانه سبز بودند، اما درصد سلول‌های سبز در خانه‌ی مربوط به ویروس‌های ناقص از روز ششم کمتر شد و این روند ادامه داشت؛ به گونه‌ای که در روز دهم تعداد کمی از سلول‌ها سبز مانده بودند. این در حالی است که در خانه‌ی مربوط به ویروس طبیعی، حدود ۵۰ درصد سلول‌ها سبز بودند (شکل ۵).

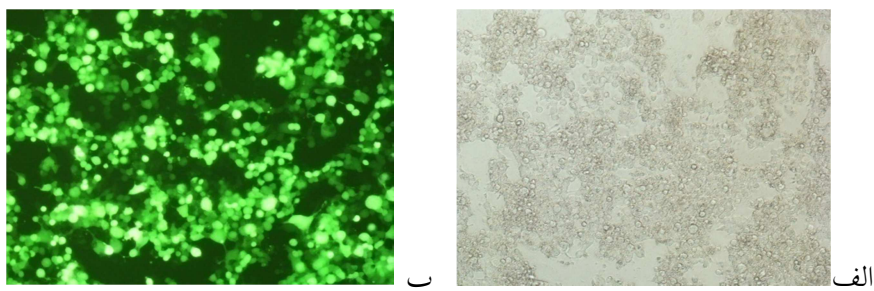
(شکل ۲). سپس، از این قطعات به عنوان الگو در Overlap PCR استفاده گردید. محصول روی ژل ۱ درصد قرار داده شد. قطعه‌ی ۱۸۰۰ نوکلئوتیدی از روی ژل استخراج و دوباره عمل PCR با پرایمر F1 و R2 روی آن انجام گردید. باز هم قطعه‌ی ۱۸۰۰ وجود داشت.



شکل ۲. الف، ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی DNA ۱۰۰ جفت بازی و ستون ۲، قطعه‌ی ۴۰۰ جفت بازی (الف)، ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی DNA ۱۰۰۰ جفت بازی و ستون ۲، قطعه‌ی ۱۴۰۰ جفت بازی (ب)

قطعه‌ی ۱۸۰۰ بعد از ساب کلون در وکتور PTZ57 و تغییر در باکتری E.coli Top10، در LB آگار کشت داده شد و عمل PCR روی آن انجام گردید. کلون‌هایی که قطعه‌ی ۱۸۰۰ داشتند، انتخاب شدند (شکل ۳). بعد از هضم آنزیمی پلاسمید، قطعه‌ی ۱۸۰۰ از ژل استخراج گردید و تعیین ترادف شد. موتاسیون در کدون ۶۴ (D64V) تأیید گردید.

پلاسمید PSpax2 هضم آنزیمی شد و قطعه‌ی ۱۸۰۰ بیرون انداخته شد و خطی گردید و عمل Ligation بین دو قطعه‌ی ۱۸۰۰ موتانت یافته و پلاسمید خطی شده صورت گرفت؛ بدین صورت،



شکل ۴. لاین سلولی HEK293T در نور مرئی (الف) و لاین سلولی HEK293T در نور UV (ب) (Ultraviolet) با طول موج ۴۹۸ نانومتر (ب)

بحث

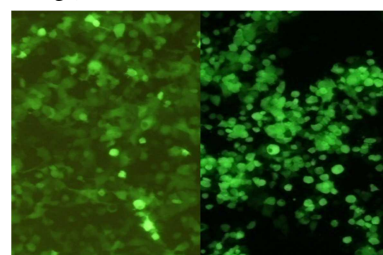
ژن درمانی بر اساس نوع سیستم تحویل ژن به دو روش ویروسی و غیر ویروسی انجام می‌گیرد (۱۳). روش‌های غیر ویروسی با وجود ظرفیت بالا برای انتقال ژن به درون سلول، نداشتن خطر سمیت و تحریک سیستم ایمنی، در مقایسه با وکتورهای ویروسی از کارایی کمتری برخوردار هستند (۱۴).

در حال حاضر، ۷۰ درصد پروتکل‌های ژن درمانی با استفاده از وکتورهای ویروسی انجام می‌شود (۱۵). بنابراین، با جایگزین کردن ژن‌های غیر ضروری ویروس با ژن درمانی هدف، وکتورهای ویروسی طراحی می‌شود و می‌تواند با به کار گیری مکانیسم طبیعی خود، ژن مورد نظر را به سلول هدف انتقال دهند. شایع‌ترین وکتورهای ویروسی مورد استفاده در ژن درمانی شامل آدنوویروس‌ها، رتروویروس‌ها، واکسینیا ویروس‌ها، پاکس ویروس‌ها، ویروس هرپس سیمپلکس، Adeno-associated virus و لنتی ویروس‌ها می‌باشد (۱۶). در این میان، لنتی وکتورها به دلیل توانایی آلوده کردن سلول‌های تقسیم شونده و به ویژه، غیر تقسیم شونده و همچنین، با درج ژن مورد نظر به درون ژنوم سلول هدف، امکان بیان طولانی مدت آن را فراهم می‌کنند (۱۷).

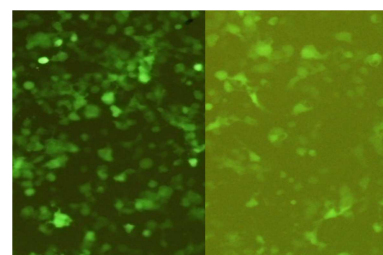
اینتگراز (-) / اینتگراز (+)



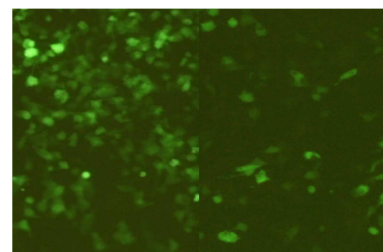
سلول‌های HEK293T در نور مرئی



۵ روز بعد از انتقال



۸ روز بعد از انتقال



۱۰ روز بعد از انتقال

شکل ۵. میزان نور فلورسانس در سلول‌های HEK293T منتقل شده با ویروس‌های طبیعی و ناقص از نظر اینتگراز

تغییر هر کدام از این اسیدهای آمینه منجر به نقص عملکرد پروتئین اینتگران می‌گردد (۲۰).

این وکتورها به شکل اپی‌زومال باقی می‌مانند و تعدادشان طی تقسیمات سلولی در سلول‌های تقسیم شونده کاهش می‌یابد و کم‌کم از بین می‌رود؛ هرچند، در سلول‌های خاموش به صورت پایدارتری باقی می‌مانند. بنابراین، IDLVs می‌توانند سبب بیان موقت در سلول‌های در حال تکثیر و بیان پایدار در سلول‌های غیر تقسیم شونده در محیط طبیعی و شرایط آزمایشگاهی شوند. در مقایسه با لنتی وکتورهای درج شونده، IDLVs خطر جهش‌زایی کمتر، احتمال نوترکیبی بین اجزا و تولید ذره‌ی ویروسی کامل کمتر و در مجموع ایمنی زیستی (Biosafety) بیشتری دارند. در عین حال در گزارش‌های اولیه، به سطح بیان کمتری از ژن هدف اشاره شده است؛ چرا که اپی‌زوم‌ها به اندازه وکتورهای پرو-ویروسی کروموزومی، مؤثر و کارآمد نمی‌باشند (۲۱، ۱۷). در مطالعه‌ی حاضر، کاهش تعداد سلول‌های بیان‌کننده‌ی ژن GFP نشان داد که ژن اینتگران در ویروس‌های ناقص، عمل نکرده و ورود DNA ویروسی به ژنوم میزبان مختل شده است. در مطالعه‌ی دیگر، در ژن اینتگران در لنتی ویروس‌های نسل سوم جهش ایجاد کردند (۲۲) که نتایجی مشابه با نتایج مطالعه‌ی حاضر داشت.

IDLVs علاوه بر بیان موقت، می‌توانند در صورت داشتن سیستم هماندسازی خارج کروموزومی مانند منشأ هماندسازی SV40 و آنتی‌ژن بزرگ T، برای مدت زمان طولانی بیان داشته باشند. در پژوهش Yu و همکاران با به کار گرفتن منشأ هماندسازی SV40، بیان ماندگار ژن را در سلول‌های

ذرات رتروویروسی، حاوی ۲ کپی یکسان از RNA تک رشته‌ی مثبت با طولی در حدود ۱۰-۷ کیلوباز می‌باشند. همچنین، آنزیم‌هایی مانند اینتگران (Integrase) و رونوشت‌بردار معکوس (Reverse transcriptase) دارند که در یک پوشش پروتئینی به نام کپسید واقع شده‌اند. کپسید توسط یک غشای دو لایه‌ی لیپیدی احاطه می‌شود. پروتئین‌های پوششی (Envelope) نیز به شکل زوایید گلیکوپروتئینی از آن خارج می‌شوند و نقش مهمی در تعیین اختصاصیت رتروویروس‌ها داشته، مسئول اتصال و ادغام شدن به غشای سلول میزبان می‌باشند. RNA رتروویروس توسط آنزیم RT به DNA برگردانده می‌شود. سپس DNA دو رشته‌ای ویروس از طریق آنزیم اینتگران وارد هسته‌ی سلول آلوده شده، در ژنوم آن ادغام می‌گردد. در نتیجه، DNA پرو-ویروسی به سلول‌های نسل بعد نیز منتقل می‌شود (۱).

هرچند در گذشته توانمندی درج شدن در ژنوم سلول، بسیار قابل توجه بوده، اما نتایج مطالعات اخیر این موضوع را به چالش کشیده است (۱۷). برخی از مطالعات موفق شدند که با استفاده از حایل (Insulator)، اثرات مکانی را که در اثر وارد شدن ژن ویروسی به ژن‌های اطراف و برعکس وارد می‌گردد، کاهش دهند (۱۸-۱۹). به همین دلیل، پژوهش‌ها به سمت تولید لنتی وکتورهای ناقص در درج شدن، پیشرفت نمود و از طریق ایجاد موتاسیون در ژن درج‌کننده (Integrase)، لنتی وکتورهای بدون توانایی درج شدن (IDLV) تولید شدند. پروتئین اینتگران دارای یک هسته‌ی اصلی با سه اسید آمینه‌ی ضروری (D64 و D116، E152) برای فعالیت کاتالیتیک می‌باشد. مطالعات نشان داده است که

تشکر و قدردانی

بخشی از منابع مالی این طرح پژوهشی از دانشگاه علوم پزشکی تهران و بخشی از صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری تأمین گردیده است. از همکاری صمیمانه‌ی کارکنان محترم بخش ژنتیک و بیولوژی مولکولی و آزمایشگاه مرکزی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

HEK293T حاوی آنتی ژن بزرگ T ویروس SV40 مشاهده کردند (۲۳).

نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که حامل‌های نسل دوم با نقص در آنزیم اینتگران، حامل‌های مناسبی جهت استفاده در ژن درمانی می‌باشند؛ چرا که، این وکتورها بسیار ضعیف در ژنوم وارد می‌شوند و خطر جهش‌زایی تداخلی به طور کامل حذف می‌گردد.

References

- Joglekar AV, Hollis RP, Kuflinec G, Senadheera S, Chan R, Kohn DB. Integrase-defective lentiviral vectors as a delivery platform for targeted modification of adenosine deaminase locus. *Mol Ther* 2013; 21(9): 1705-17.
- Wiznerowicz M, Trono D. Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology. *Trends Biotechnol* 2005; 23(1): 42-7.
- Hematti P, Hong BK, Ferguson C, Adler R, Hanawa H, Sellers S, et al. Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells. *PLoS Biol* 2004; 2(12): e423.
- Hacein-Bey-Abina S, von KC, Schmidt M, Le DF, Wulfraat N, McIntyre E, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; 348(3): 255-6.
- Vargas J, Gusella GL, Najfeld V, Klotman ME, Cara A. Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther* 2004; 15(4): 361-72.
- Cara A, Reitz MS. New insight on the role of extrachromosomal retroviral DNA. *Leukemia* 1997; 11(9): 1395-9.
- Michelini Z, Negri D, Cara A. Integrase defective, nonintegrating lentiviral vectors. *Methods Mol Biol* 2010; 614: 101-10.
- Saenz DT, Loewen N, Peretz M, Whitwam T, Barraza R, Howell KG, et al. Unintegrated lentivirus DNA persistence and accessibility to expression in nondividing cells: analysis with class I integrase mutants. *J Virol* 2004; 78(6): 2906-20.
- Naldini L, Blomer 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(5259): 263-7.
- Pacchia AL, Adelson ME, Kaul M, Ron Y, Dougherty JP. An inducible packaging cell system for safe, efficient lentiviral vector production in the absence of HIV-1 accessory proteins. *Virology* 2001; 282(1): 77-86.
- Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 1997; 15(9): 871-5.
- Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc* 2006; 1(1): 241-5.
- McTaggart S, Al-Rubeai M. Retroviral vectors for human gene delivery. *Biotechnol Adv* 2002; 20(1): 1-31.
- Pluta K, Kacprzak MM. Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochim Pol* 2009; 56(4): 531-95.
- Morris KV, Rossi JJ. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. *Gene Ther* 2006; 13(6): 553-8.
- Duarte S, Carle G, Faneca H, de Lima MC, Pierrefite-Carle V. Suicide gene therapy in cancer: where do we stand now? *Cancer Lett* 2012; 324(2): 160-70.
- Wanisch K, Yanez-Munoz RJ. Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age. *Mol Ther* 2009; 17(8): 1316-32.
- Rivella S, Callegari JA, May C, Tan CW, Sadelain M. The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites. *J Virol* 2000; 74(10): 4679-87.
- Farrell CM, West AG, Felsenfeld G. Conserved CTCF insulator elements flank the mouse and human beta-globin loci. *Mol Cell Biol* 2002;

- 22(11): 3820-31.
20. Gaur M, Leavitt AD. Mutations in the human immunodeficiency virus type 1 integrase D,D(35)E motif do not eliminate provirus formation. *J Virol* 1998; 72(6): 4678-85.
21. Banasik MB, McCray PB. Integrase-defective lentiviral vectors: progress and applications. *Gene Ther* 2010; 17(2): 150-7.
22. Farazmandfar T, Khanahmad SH, Haghshenas MR, Janbabai G, Azadeh H, Mansour SN. Use of integrase-minus lentiviral vector for transient expression. *Cell J* 2012; 14(2): 76-81.
23. Yu SS, Dan K, Chono H, Chatani E, Mineno J, Kato I. Transient gene expression mediated by integrase-defective retroviral vectors. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368(4): 942-7.

Producing Integrase Minus Lentivirus for Transient Expression of the Desired Protein and Reduced Side Effects of the Virus in Gene Therapy

Laleh Shariati MSc¹, Zahra Mohammadi², Zahra Hejazi³, Mehran Modarres MSc⁴, Mansour Salehi PhD⁵, Mohammad Hosein Modarresi PhD⁶, Hosein Khanahmad PhD⁷

Original Article

Abstract

Background: Lentiviral vectors are very efficient tools for gene therapy. But, proviral integration make their use dangerous; therefore, the safer integration deficient lentiviral vectors (IDLVs) can be produced through the use of integrase gene mutations that specifically prevent proviral integration. This study was launched to design and construct a second generation integration deficient lentiviral vector suitable for transient gene targeting with viral vector.

Methods: Applying the site directed mutagenesis strategy through the overlap polymerase chain reaction technique, a missense mutation (D64V) was induced in the catalytic domain of the integrase gene in the psPAX2 (packaging) plasmid and was verified using DNA sequencing. The HEK293T cell line was transfected using the psPAX2 plasmid (native and integrase minus), pLOX (transfer plasmid) and PMD2G (envelope plasmid). The viruses were harvested and the HEK293T cell line was transduced. The levels of expression of the green fluorescent protein (GFP) reporter gene were monitored in the cells transduced with either native or defective virus for ten days.

Findings: We observed a slight slope of decrease in the number of GFP-positive cells transduced with native viruses during the period. In contrast, in the case of defective viruses, a significant decrease in the number of GFP positive cells was noted.

Conclusion: In this study, the integrase-minus psPAX2 was constructed and confirmed. The results demonstrate that the IDLV can provide a useful tool for efficient transient gene expression and can help to avoid disadvantages of gene targeting using the native virus.

Keywords: Lentivirus packaging, Integrase-minus, Transient expression

Citation: Shariati L, Mohammadi Z, Hejazi Z, Modarres M, Salehi M, Modarresi MH, et al. **Producing Integrase Minus Lentivirus for Transient Expression of the Desired Protein and Reduced Side Effects of the Virus in Gene Therapy.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(326): 305-15

1- PhD Student, Department of Molecular Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- MSc Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- PhD Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

6- Professor, Department of Genetics, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

7- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Hosein Khanahmad PhD, Email: hossein_khanahmad@yahoo.com