علوم و فناوری زیستی مدرس
دورهٔ ۲، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۰

تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب ناقل ژن فاکتور نوروتروفیک GDNF با تیتر بالا و انتقال آن‌ها به آستروسیت‌های انسانی

نفیسه دهشکار گونه فراهانی[۱]، موسی گردانه[۲*]، حسین عطار[۳]، نادر مقصودی[۴]، عباس رحیمی شم‌آبادی[۵]، احسان قریب[۶]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات
۲- استادیار ژنتیک مولکولی، دپارتمان ژنتیک ملکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
۳- استادیار بیوتکنیک، دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات
٤- دانشیار، زیست شناسی سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دپارتمان ژنتیک ملکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی، ژنتیک و زیست فناوری و دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان
٦- دانشجوی کارشناسی ارشد، دپارتمان ژنتیک ملکول، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، وپردیس کیش دانشگاه تهران

***تهران، صندوق پستی ١٤٩٦٥/١٦١**
mossa65@nigeb.ac.ir
(دریافت مقاله: ۸۹/۹/۱۳، پذیرش: ۹۰/۲/٤)

چکیده– لنتی ویروس از مؤثرترین ویروس‌های نوترکیب برای انتقال ژن به سلول‌ها و بافت‌های پستانداران است. این مطالعه دو بخش اساسی دارد: بررسی کارایی ستون‌های پروتئینی در تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب با تیتر بالا و به‌کارگیری این ستون‌ها در تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب حامل ژن فاکتور نوروتروفیک GDNF. در بخش اول مطالعه با استفاده از دو ناقل (حامل GFP یا Jred) لنتی ویروس نوترکیب تولید کردیم. با انتقال سوپرناتان سلول‌های ترانسفکت شده به ستون‌های پروتئینی Amicon و سانتریفوژ ستون‌ها بیش از ۹۹٪ سوپرناتان را جدا کردیم تا استوکی با حجم ۵۰۰ µl از سوپرناتان غلیظ شده و مملو از ویریون‌ها به‌دست آید. با افزودن رقت‌های مختلف این استوک ویروسی به سلول‌های هدف، انتقال[1] سلولی با موفقیت انجام شد به‌طوری‌که ترانسژن‌های گزارشگر در ۱۰۰٪ سلول‌ها مشاهده شد.همچنین تست بخش رقیق سوپرناتان، منجر به هیچ‌گونه بیان ژن که نشانگر فعالیت ویروسی باشد نشد. تولید تیتر بالای ویروسی با روش فیلتراسیون مزبور برای انتقال موفقیت‌آمیز ژن‌ها اهمیت دارد و از نظر هزینه، حجم کار و زمانبری بر سایر روش‌ها ارجحیت دارد. در بخش دوم این مطالعه، توالی مربوط به فاکتور مهم GDNF را به سازه لنتی ویروسی پیوند زدیم و به روش گفته شده، ویروس‌های تیتر بالا تولید کردیم. با انتقال این ویروس‌ها به آستروسیت‌های انسانی توانستیم افزایش ۳ برابر بیان ژن GDNF را در سطح mRNA به‌دست آوریم. این نتایج نشان دادکه میتوان لنتی ویروس‌های حامل GDNF را با روش گفته شده در تیتر بالا تولید و از آن برای مطالعات تمایزی و حفاظت نورونی استفاده کرد.

کلید واژگان: لنتی ویروس، انتقال ژن، ستون‌های پروتئینی، فاکتور نوروتروفیک.

1. transduction

۱- مقدمه

انتقال ژن در زمره ضروری‌ترین روش‌های مرتبط با بخش مهمی از مطالعات تکاملی و فیزیولوژیکی، تشخیص بیماری‌ها، درمان و پیشگیری از آن‌ها به‌شمار می‌رود. ابزارهای متعدد و گونه‌گون برای انتقال ژن به‌وجود آمده است که بیشتر دو دسته ناقلین ویروسی و ناقلین غیرویروسی تقسیم می‌شوند [۱]. به‌خاطر توانایی طبیعی ویروس‌ها در انتقال ژن و الحاق به ژنوم میزبان بخش ضروری از دوره حیاتی خود، اشکال تغییر یافته آن‌ها به‌عنوان ابزاری برای انتقال ژن‌های بیگانه به سلول‌های میزبان به‌کار می‌رود. لنتی ویروس از جمله این ناقلین ویروسی است که به‌خاطر ویژگی‌های برجسته مورد توجه قرار گرفته است.

لنتی ویروس‌ها ازدسته‌ی ویروس‌های آرام (Slow viruses) از خانواده رتروویریده (Retroviridae) است که دوره انکوباسیون طولانی دارند. لنتی ویروس‌ها خصوصیات برجسته‌ای دارند که موجب معرفی آن‌ها به‌عنوان یکی از بهترین ناقلین برای انتقال ژن به سیستم عصبی مرکزی [۲]، بافت کبدی [۳] و حتی بافت خونی [٤]، مغز استخوان [٥] و ریه [٦] شده است. در مقایسه با رتروویروس‌ها، لنتی ویروس‌ها با داشتن مکانیسم پیچیده‌ای بدون نیاز به تقسیم سلولی می‌توانند وارد هسته میزبان شده و الحاق به ژنوم آن را پیش ببرند و بدین ترتیب هردو نوع سلول یعنی سلول تقسیم‌پذیر و تقسیم‌ناپذیررا آلوده کنند [۷]. گرچه کارایی ویروس‌هایی مثل آدنوویروس‌ها از نظر انتقال ژن ممکن است شبیه لنتی ویروس‌ها باشد ولی لنتی ویروس‌ها از لحاظ تحریک سیستم ایمنی بدن بر آدنوویروس‌ها برتری دارند؛ زیرا ۱) بجز بیماران HIV^+ سایر افراد جوامع، آنتی ژن مرتبط با این ویروس‌ها را در بدن خود ندارند و بنابراین سیستم ایمنی بدن آن‌ها نسبت به این ویروس‌ها پیشاپیش تحریک نشده است؛ در حالی‌که بیشتر جوامع بشری حداقل نسبت به یکی از تیپ‌های آدنوویروس‌ها آلوده شده است [۸]. ۲) نیمه‌عمر RNA هایی که لنتی ویروس‌ها تولید می‌کنند خیلی کوتاه است و فرصت آن را پیدا نمی‌کنند که سیستم ایمنی میزبان را تحریک کنند. ۳) ویروس‌های Adeno-associated (AAV) شبیه لنتی ویروس‌ها می‌توانند به‌آسانی بافت‌هایی مثل سیستم عصبی، ریه و کبد را آلوده کنند [۹]. اما ظرفیت پذیرش ژن خارجی در آن‌ها حداکثر ۵ کیلوباز یعنی تقریباً نصف ظرفیت بیشینه لنتی ویروس‌ها است [۱۰]. مزیت دیگر لنتی ویروس‌ها در الحاق ژنهای خارجی به بخش‌های فعال ژنوم میزبان است درحالی‌که رتروویروس‌ها عمدتاً گرایش به بخش غیرفعال یا هتروکروماتین دارند [۱۱] و [۱۲]؛ بدین سبب امکان فعال کردن ژن‌های خطرآفرین مثل پروتوانکوژن‌ها (ژن‌های بالقوه سرطان‌زا) در بدن میزبان به‌وسیله‌ی لنتی‌ویروس‌ها به‌مراتب کمتر از رتروویروس‌هاست. در نهایت بیان ترانسژن‌ها به‌شکل پایدار و بدون آن‌که به‌وسیله‌ی میزبان خاموش شده باشد، به اثبات رسیده است که این امر از مقاومت بالای لنتی‌ویروس‌ها نسبت به رتروویروس‌ها در برابر خاموشی ژنی (Gene Silencing) حکایت می‌کند [۱۳]. به سبب داشتن این ویژگی‌های برجسته، لنتی ویروس‌ها در انتقال ژن به سلول‌های مختلف انسان و پستانداران و به‌خصوص به بافت‌هایی مثل سیستم عصبی یا بافت کبد که سلول‌های تقسیم‌ناپذیر دارند، اهمیت روز افزون پیدا کرده است [۱٤].

بالا بودن تیتر ویروسی در افزایش قدرت آلوده‌سازی ویروس اهمیت زیادی دارد. برای رسیدن به این هدف، ذرات ویریونی را پس از تولید تغلیظ می‌کنند. برای تغلیظ‌لنتی ویروس‌ها به‌طور سنتی از اولتراسانتریفوژ

استفاده می‌کنند؛ گرچه در موارد نادری نیز از روش‌های کروماتوگرافی به‌خصوص در مقیاس بالا بهره گرفته‌اند [۱۵]. در این مطالعه ما برآن شدیم تا با تغلیظ ویروس با روش ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر و سریع‌تر تیتر بالایی از لنتی‌ویروس‌ها را به‌دست آوریم؛ به‌طوری‌که با افزودن بخش کوچکی از آن به سلول‌های هدف توانستیم سلول‌های میزبان را ۱۰۰٪ با ویروس آلوده کنیم. از این روش برای تولید لنتی‌ویروس‌های حامل ژن فاکتور رونویسی GDNF استفاده و با آلوده‌سازی سلول‌های انسانی، افزایش بیان آن‌را آشکار کردیم.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- بیولوژی مولکولی

ناقل pGtx/GFP و ناقلین لنتی‌ویروسی به‌نام‌های pLV-eGFP (pNL-EGFP/CMV-WPRE) (ناقل یا ترانسفر)، pCD/NL-BH*ΔΔΔ (ناقل بسته‌بندی ویروس)، LTR-G (ناقل غشایی) از آزمایشگاه Dr. J. Reiser تهیه شد [۱۶]. ناقل pcDNA3.1/Zeo (+)- (Kozak) mGDNF حامل توالی GDNF موشی از آزمایشگاه Dr. K. Kiuchi (GIFU, Japan) [۱۷] در ژاپن تهیه و پیش‌تر به‌وسیله‌ی نویسنده مسئول و همکاران از آن استفاده شده است [۱۸]. خالص‌سازی نمونه‌های پلاسمیدی با استفاده از کیت Maxiprep از کیاژن انجام شد. کیت استخراج از ژل نیز از Roche تهیه شد. آنزیم‌های محدودکننده از فرمنتاس و آنزیم لیگاز از پرومگا خریداری شد.

تمام مراحل مربوط به خالص‌سازی DNA، برش‌های آنزیمی و واکنش لیگاسیون مطابق دستور سازنده مواد و یا طبق روش‌های استاندارد انجام شد [۱۹]. به‌طور خلاصه نمونه‌های DNA به‌وسیله‌ی آنزیم‌های محدودکننده مناسب در بافر و شرایط اعلام‌شده به‌وسیله‌ی سازنده آنزیم، برش یافته و روی ژل آگاروز ۱٪ تفکیک شدند. برای تخلیص DNA، نمونه‌ها از روی ژل بریده شده و پس از حل آگاروز در محلول سوسپانسیون موجود در کیت، نمونه های DNA با استفاده از ستون‌های مخصوص موجود در کیت و طبق راهنمای شرکت سازنده، تخلیص شدند. برای تهیه نمونه DNA در مقیاس کوچک (Miniprep) نیز از کیت‌های استخراج پلاسمید استفاده شد که طی آن باکتری‌های نمونه، لیز و پس از رسوب پروتئین‌ها و اجزای سلولی، DNA پلاسمیدی با استفاده از ستون‌های کوچک تخلیص شدند. واکنش‌های لیگاسیون با استفاده از آنزیم لیگاز (فرمنتاس) در ۱۶ درجه انجام شد. این واکنش‌ها بیشتر شامل نمونه ناقل برش‌یافته (حدود ۱۰۰ نانوگرم)، نمونه DNA هدف برش و تخلیص‌شده (نیم تا ۱ میکروگرم)، بافر لیگاسیون و آنزیم لیگاز (۱واحد) در حجم ۲۰ میکرولیتر در طول شب انجام شد. برای تست درستی لیگاسیون از کلنی باکتری‌ها نمونه DNA پلاسمیدی (Miniprep) تهیه شده و با آنزیم‌های محدودکننده معین برش داده شدند تا قطعات مورد نظر حاصل شود.

۲-۲- کشت سلول

سلول‌های مولد ویروسی از رده HEK-293T و آستروسیت‌های انسانی رده 1321N1در محیط DMEM همراه ۱۰٪ سرم FBS در شرایط ۳۷ درجه و ۵٪ CO2 کشت و پاساژ داده شدند. برای ترانسفکشن و تولید ویروس، ۲ میلیون سلول HEK-293T در ظرف‌های پتری ۱۰ سانتی‌متری گرد و مخصوص کشت سلول، ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن کشت داده شدند تا در روز بعد حدودا ۵۰-۶۰٪ فضای ظرف پتری را پر کنند. برای

آلوده‌سازی ویروسی نیز ۵۰ هزار سلول، ۲٤ ساعت قبل از آلوده‌سازی در پلیتهای ۲٤ خانه کشت داده شدند.

۲-۳- تولید ویروس

برای تولید لنتی‌ویروس‌های نوترکیب و فعال، سلول‌های مولد ویروس را هم‌زمان با سه ناقل لنتی‌ویروسی به‌میزان ۱۵ µg از ناقل ترانسفر، و ۱۰ µg میکروگرم از هریک از ناقلین بسته‌بندی و غشایی با روش رسوب DNA- فسفات کلسیم ترانسفکت کردیم. برای تشکیل رسوب مذکور، DNA را همراه 50 µl کلرید کلسیم 2.5 mM با آب استریل، به حجم 500µl رساندیم و هم حجم آن 2xHEPES اضافه کردیم. محلول حاصل را ۲۰ دقیقه در دمای اطاق و زیر هود نگه‌داشتیم تا رسوب مطلوب به‌دست آید؛ سپس این رسوب را قطره قطره به آرامی به سلول‌ها اضافه کردیم. پس از آن سلول‌ها مدت ٦-۸ ساعت انکوبه شدند و بعد محیط آن‌ها با محیط جدید تعویض شد. بعد از این مراحل سلول‌ها تا تولید ویروس و رها سازی آن به محیط در شرایط انکوباتوری گفته شده نگه‌داری شدند.

۲-٤- تغلیظ ویروس و آلوده‌سازی سلولهای هدف

محیط سلول‌های ترانسفکت شده در ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد جمع‌آوری شده و از فیلتر ۰/٤۵ µm گذرانده شد. محیط فیلترشده را درون ستون‌های Amicon-100 MW (Millipore) ریخته و به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور 450 rpm سانتریفوژ کردیم. این مرحله منجر به عبور بخش اعظم سوپرناتان از فیلتر ستون بالا و عملاً جداشدن آن از بقیه محلول شد؛ به‌طوری‌که محلول باقیمانده در ستون حجمی معادل 500 µl از محلول غلیظ و تیره؛ مملو از ذرات ویریونی پشت فیلتر جمع‌اوری شد. این محلول را به لوله‌های میکروفیوژ منتقل کرده و از آن به‌عنوان استوک ویروسی فوری استفاده کردیم. برای آلوده کردن سلولهای هدف حجم‌های مختلف از این استوک را به آرامی به سلول‌ها اضافه کرده و در شرایط رشد ذکر شده در بالا انکوبه کردیم تا بیان ترانسژن فلورسنتی دیده شود؛ همچنین برای اطمینان از نبودن ویروس فعال در محلول عبور داده شده از فیلتر، مراحل آلوده‌سازی ویروسی را روی آن‌ها نیز به اجرا گذاشتیم. تصاویر سلول‌ها در مراحل ترانفکشن و آلودگی ویروسی زیر میکروسکوپ فلورسنت را جمع‌آوری کردیم.

واکنش *RT-PCR*: نود و شش ساعت پس از انتقال سلولی، کل RNA را با استفاده از کیت *High Pure RNA Isolation Kit (Roche)* استخراج کردیم و پس از تیمار با *DNase* با انجام ژل الکتروفورز از سالم بودن آن اطمینان حاصل کردیم. برای سنتز *cDNA* از ۲ میکروگرم نمونه *RNA* در یک واکنش ۱ ساعته در ***دمای*** ٤۲ درجه استفاده کردیم که در آن از آنزیم *MuLV reverse transcriptase (Fermentas, Lithuania)*، هگزامرهای تصادفی و *RNase inhibitor* استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱ اجزای واکنش رونویسی معکوس

اجزاء واکنش ***RT-PCR*** بخش رونویسی معکوس	مقادیر
RNA template	*2 ug*
MuLV Reverse Transcriptase (20U/ul)	*1ul*
Random Hexamers	*1ul (0.2 ug)*
dNTP	*1ul of 10mM stock*
RNase Inhibitor (Ribolock Inhibitor) (40U/ul)	*1ul*
RT Buffer (10X)	*4ul*

از پرایمرهای زیر برای تکثیر یک قطعه ۲۶۲ نوکلئوتیدی برروی ***cDNA*** سنتز شده استفاده کردیم [۱۸]:

Forward: 5'- CTTCCTCGAAGAGAGAGGAATCG -3'
Reverse: 5'- GTTAGCCTTCTACTCCGAGACAGG -3'

مقادیر مساوی از هر نمونه cDNA برای واکنش PCR به‌کار برده شد. نمونه‌ها ابتدا در ۹۵ درجه، ۲ دقیقه دناتوره شدند و سپس واکنش PCR طبق جدول (۲) روی آن‌ها انجام شد محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱.۲ درصدی آنالیز شده و دانسیته باندهای حاصل به‌وسیله‌ی نرم‌افزار ImageJ (http://rsbweb.nih.gov/ij/) اندازه‌گیری شد. آزمایش‌های RT-PCR حداقل ۳ بار و هر بار به‌صورت آزمایش مستقل تکرار شد.

جدول ۲ شرایط انجام برای واکنش PCR

زمان	اجزای واکنش *RT-PCR* بخش *PCR*	
2 min	95	
1 min	Denaturation 94 °C	PCR reaction 30 cycles
1 min	Annealing 59 °C	
1 min	Extension 72 °C	

۲-۳- محاسبه سلول‌های *GFP+* و *Jerd+*

برای شمارش سلول‌ها از حدود ۱۰ میدان میکروسکوپی مختلف از هر چاهک ۹۶ خانه استفاده و تعداد سلول‌های GFP^+ و سلول‌های $Jred^+$ با استفاده از نرم‌افزار Grid Cell Counter محاسبه شد (http://www.dnabaser.com/download/Cell-counter/grid-cell-counter.html).

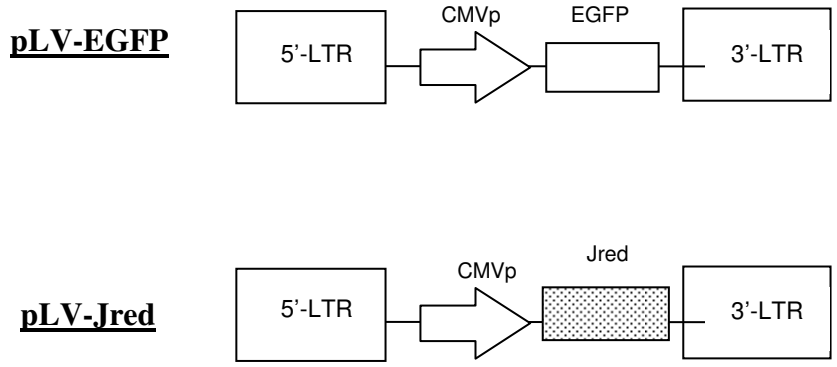
۲-٤- آنالیز آماری

داده‌های مندرج در تصاویر جداول، نماینده میانگین (Mean±SEM) حداقل ۳ آزمایش جداگانه است که به‌شکل تریپلیکیت تکرار شده‌اند. برای آنالیز تفاوت بین دو گروه از تست Student یا همان Student's t-test استفاده و سپس با نرم افزار SPSS version 16 بررسی شد. ارزش $P<0.05$ را معنی‌دار و ارزش‌های $P<0.01$ و کمتر بسیار معنی‌دار تفسیر کردیم.

۳- یافته‌ها

۳-۱- تولید ناقل لنتی‌ویروسی حامل ژن گزارشگر *Jred*

ما ناقل ترانسفر pLV-eGFP را با آنزیم‌های محدودکننده *NheI/XhoI* و ناقل دیگری به‌نام pLEX-Jred (Open Biosystems) را با *BamHI* برش دادیم تا اولی eGFP و دومی Jred را رها سازند. هر دو نمونه را با آنزیم Klenow در حضور dNTPs تیمار دادیم تا انتهای برش‌یافته آن‌ها به‌شکل Blunt درآید. بدین ترتیب ژن Jred آزادشده از pLEX-Jred را به‌جای ژن eGFP در pLV-eGFP پیوند زدیم تا pLV-Jred به‌دست آید (شکل ۱).



شکل ۱ شمایی از دو ناقل لنتی‌ویروسی حامل ژن‌های گزارشگر *EGFP* و *Jred*

۳-۲- ترانسفکشن سلول‌ها و تولید ویروس

دو ناقل ترانسفر pLV-eGFP و pLV-Jred را جداگانه در آزمایشهای ترانسفکشن به‌کار بردیم. سپس بیان پروتئین‌های eGFP و Jred به‌وسیله‌ی سلول‌های HEK-293T را زیر میکروسکوپ فلورسنت به‌ترتیب ٦، ١٢ و ١٨ ساعت پس از ترانسفکشن مشاهده کردیم. در این فواصل تعداد سلول‌های مثبت را به‌طور تصادفی در چندین میدان دید میکروسکوپی برای هر دو پروتئین شمارش کردیم که نتایج آن در جدول (١) و شکل ٢- الف نشان داده شده است. شکل ٢- ب نیز تصاویر بیان را ٢٤ ساعت بعد نشان می‌دهد که طی آن بین ٩٥ تا ١٠٠٪ سلول‌ها مثبت است.

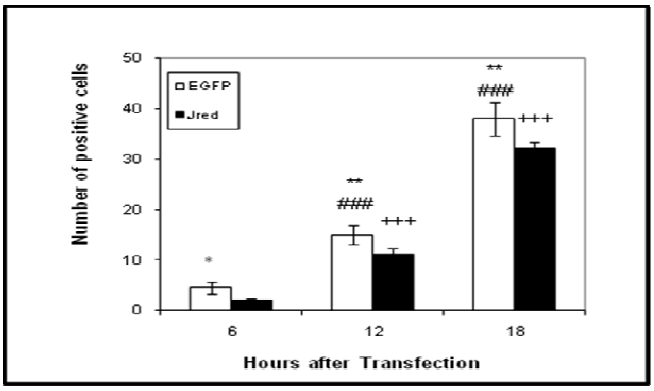
آنالیز آماری نتایج حاصل نشان می‌دهد که با گذشت فواصل زمانی مشخص تعداد سلول‌های مثبت نیز برای هر دو ژن گزارشگر به‌شکلی معنی‌دار افزایش پیدا می‌کند. برای نمونه افزایش تعداد سلول‌های GFP^+ و $Jred^+$ بین دو فاصله زمانی با اختلاف ٦ ساعت بسیار معنی‌دار است ($P<0.001$). علاوه براین افزایش تعداد سلول‌های GFP^+ و $Jred^+$ ١٨ ساعت پس از ترانسفکشن به‌صورت تصاعدی به اوج خود رسیده است و در نتیجه در هردو مورد اختلاف بسیار معنی‌داری نسبت به فواصل زمانی قبلی ایجاد شده است ($P<0.0001$) (شکل ٢-الف).

جدول ١ شمارش سلول‌های مثبت به GFP و Jred به فواصل زمانی پس از ترانسفکشن.

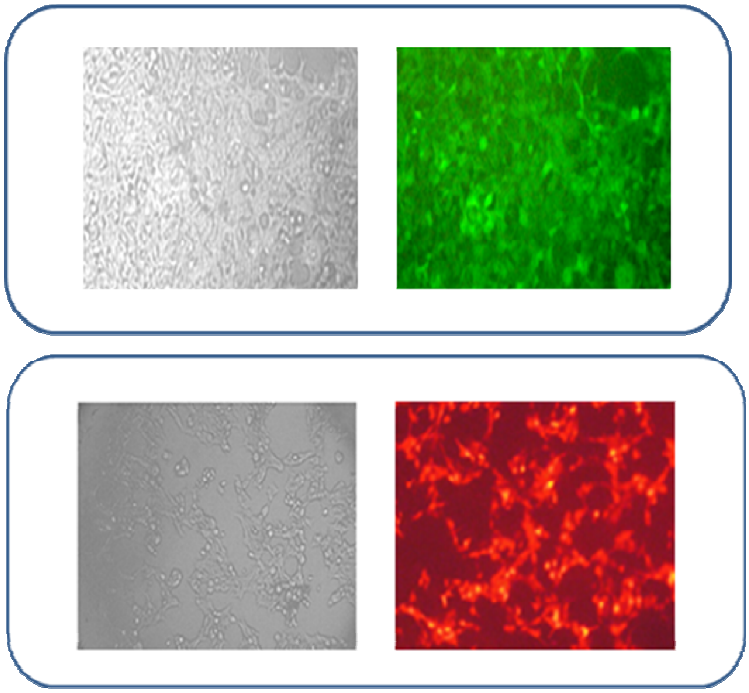
	Hours Post-Transfection		
	6	12	18
GFP	4.5 ± 0.6	15 ± 0.9	38 ± 1.6
Jred	2 ± 0.4	11 ± 1.3	32 ± 1.5

۳-۳- جمع‌آوری و تغلیظ ویروس

سوپرناتان سلول‌های ترانسفکت شده را هم ٢٤ و هم ٤٨ ساعت پس از ترانسفکشن جمع‌آوری کرده و به هم افزودیم. آزمایش‌های مقایسه‌ای ما نشان داده است که چنین ترکیبی قدرت آلودگی و انتقال ژن بالاتری نسبت به هر یک از دو محلول به‌طور جداگانه دارد. تغلیظ ویروس با استفاده از ستون‌های مخصوص پروتئین‌های بزرگ‌تر از ١٠٠ کیلودالتون انجام شد که به‌آسانی و در کمتر از ١٥ دقیقه این مرحله به پایان رسید (شکل ٣). برای تست کارایی این روش، ما در مرحله بعدی هم از بخش غلیظ‌شده سوپرناتان و هم از بخش زاید و در ظاهر عاری از ویروس آن استفاده کردیم.

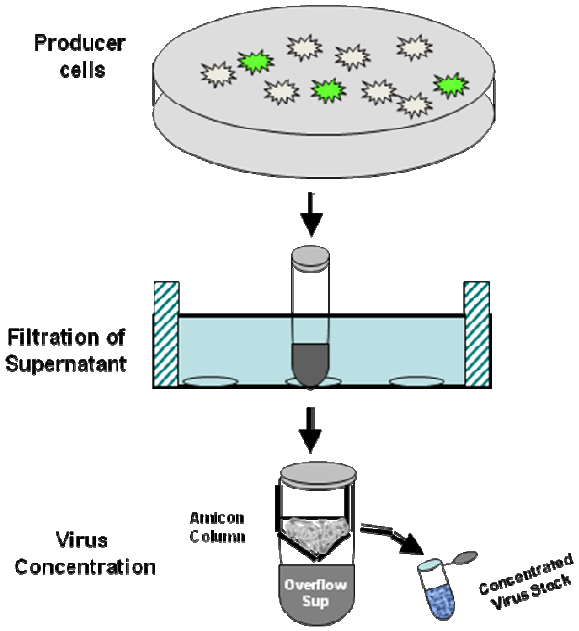


(الف)



(ب)

شکل ۲ تولید لنتی‌ویروس‌های نوترکیب. الف) تعداد سلول‌های مثبت *HEK-293T* بیان‌کننده *EGFP* و *Jred* در مرحله ترانسفکشن. تعداد سلول‌ها در ۱۰ فیلد میکروسکوپی در هر ترانسفکشن شمارش و هر ترانسفکشن ۳ بار به‌طور جداگانه تکرار شد. در این تصویر هر ستون نماینده میانگین تعداد سلول‌ها در ۳ ترانسفکشن مجزا است. آنالیز آماری با تست Student's T-test انجام شد. تفاوت آماری در تعداد سلول‌های GFP^+ بین ساعات ٦ و ١٢ و بین ١٢ و ١٨ بصورت ($P<0.001$ or $P<0.0001$) نشان داده شده است؛ تفاوت آماری در تعداد سلول‌های $Jred^+$ بین ساعات ٦ و ٩ و بین ١٢ و ١٨ به‌صورت ($P<0.0001$ یا $P<0.001$) +++ مشخص شده است. از سوی دیگر تفاوت آماری بین سلول‌های GFP^+ و سلول‌های $Jred^+$ در ساعت ٦ ($P<0.05$)* به‌صورت و در ساعات ١٢ و ١٨ هرکدام به‌صورت ($P<0.01$)** نشان داده شده است. شکل ٢ب) *تصویر میکروسکوپ فلورسنت از بیان پروتئین‌های گزارشگر EGFP و Jred به‌وسیله سلول‌های HEK-293T ترانسفکت شده با ناقلین pLV-EGFP و pLV-Jred*.



شکل ۳ مراحل استحصال لنتی‌ویروس‌های نوترکیب: ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از ترانسفکشن، محیط کشت سلول‌های مولد کـه مملـو از ذرات ویریـونی است جمع‌آوری و سانتریفوژ می‌شود. با انجام یک مرحله فیلتراسیون، از وجود آلـودگی باکتریـایی اطمینـان حاصـل شـده و سـپس محـیط فیلترشده از ستون‌های Amicon-100 یا ستون‌های پروتئینی مشابه عبور داده می‌شود تا تغلیظ شود. [مأخذ: موسی گردانـه. گـزارش کارگـاه: کاربرد لنتی‌یروس‌های نوترکیب در انتقال ژن و ژن درمانی- ۱۳۸٦- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری- تهران].

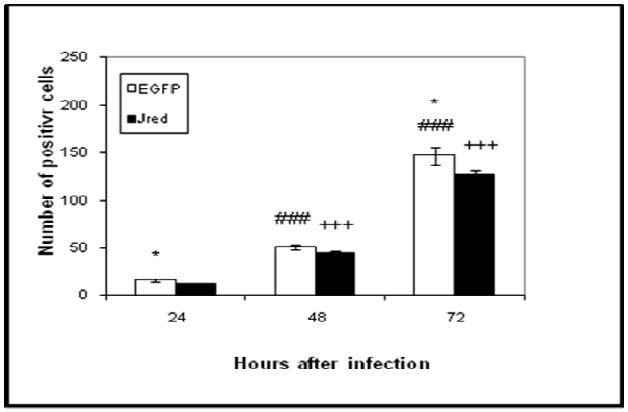
۳-٤- آلوده کردن سلول‌های هدف با ویروس

برای تست آلودگی از سلول‌های HEK-293T استفاده کـردیم و رقـت‌هـای سـریالی 10, 25, 50, 75 µl از هریـک از ویروس‌های نوترکیب را به این سلول‌ها در پلیت‌های ۲٤ خانـه اضافه کردیم. اولـین نشـانه‌هـای بیـان ترانسـژن‌هـای eGFP و Jred حدود ۲٤ سـاعت پـس از آلـودگی زیـر میکروسـکوپ فلورسـنت ظـاهر شـد. در فواصـل زمـانی ۲٤-۷۲ سـاعت سلول‌های مثبت به ظـور تصـادفی در ۱۰ فیلـد میکروسـکوپی شمارش شدند که نتایج آن‌ها در شکل ٤-الف مـنعکس شـده است. درحالی‌که در رقـت‌هـای ویروسـی 10 µl، حـداکثر ٦۰ درصد سلول‌ها ۹٦ ساعت پس از آلودگی مثبت بودند، درصـد سلول‌های مثبت به GFP در کلیه رقت‌های ویروسی 25 µl به بالا به ۱۰۰٪ در زمان ۷۲ ساعت و درصد سلول‌های مثبـت بـه Jred به ۹۵٪ در ۹٦ ساعت رسید (شکل ٤-ب).

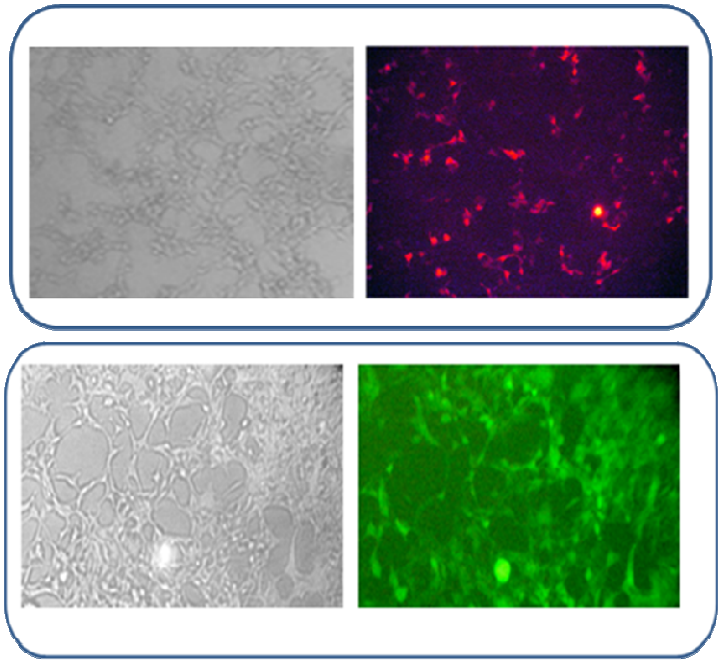
آنالیز آماری سلول‌های بیان‌کننده ترانسژن‌هـا، الگـویی شـبیه بیان ترانسژن‌ها در مرحلـه ترانسفکشـن را اثبـات کـرد. تعـداد سلول‌های GFP^+ ۲٤ تـا ٤۸ سـاعت پـس از ترانسدوکشـن ۳ برابـر شـد ($P<0.0001$) و تـا ۷۲ سـاعت نیـز ۳ برابـر دیگـر افزایش یافت ($P<0.001$). افزایش تعداد سلول‌های $Jred^+$ نیـز از ۲٤ تا ٤۸ ساعت پس از انتقال حدود ٤ برابر و تا ۷۲ سـاعت حدود ۳ برابر بوده است ($P<0.0001$).

جدول ۲ شمارش سلول‌های مثبت به GFP و Jred در فواصل زمانی پس از انتقال.

	Hours Post-Transduction		
	24	48	72
GFP	16± 1.3	51± 2.6	147± 1.1
Jred	12± 0.6	45± 2.1	128± 4.7



(الف)



(ب)

شکل ٤ الف) تعداد سلول‌های مثبت بیان‌کننده *EGFP* و *Jred* در مرحله *Infection* تعداد سلول‌ها در ۱۰ فیلد میکروسکوپی در هر Infection شمارش شد و هر آزمایش Infection سه بار به‌طور جداگانه تکرار شد. در این تصویر هر ستون نماینده میانگین تعداد سلول‌ها در سه آزمایش Infection مجزا است. آنالیز آماری با تست Student's T-test انجام شد. تفاوت آماری در تعداد سلول‌های GFP^+ بین ساعات ۲٤ و ٤۸ و بین ساعات ٤۸ و ۷۲ ($P<0.001$ or $P<0.0001$) نشان داده شده است؛ همچنین تفاوت آماری در تعداد سلول‌های $Jred^+$ بین ساعات ۲٤ و ٤۸ و بین ساعات ٤۸ و ۷۲ ($P<0.0001$) به‌صورت +++ مشخص شده است. از سوی دیگر تفاوت آماری بین سلول‌های GFP^+ و سلول‌های $Jred^+$ در ساعت ۲٤ و نیز در ساعت ۷۲ ($P<0.05$) به‌صورت* نشان داده شده است درصورتی‌که در ساعت ٤۸، تفاوت آماری معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد. **ب)** تصویر میکروسکوپ فلورسنت از بیان پروتئین‌های گزارشگر *EGFP* و *Jred* به‌وسیله‌ی سلولهای *HEK-293T* آلوده به لنتی‌ویروس‌های نوترکیب *pLV-EGFP* و *pLV-Jred*

۳-۵- کارایی ستون *Amicon* در نگه‌داری ویروس‌ها

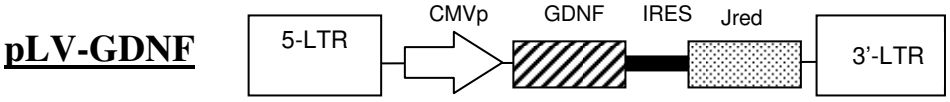
برای اطمینان از کارایی ستون‌های Amicon در حفظ حداکثر تعداد ویروس فعال، 1 ml از سوپرناتان Overflow را به $2x10^5$ سلول 293T در پلیت‌های ٦خانه اضافه کردیم (به‌شکل تریپلیکیت هم برای EGFP و هم برای Jred). پس از گذشت ۹٦ ساعت هیچ‌گونه بیان EGFP و یا Jred را در زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده نکردیم.

۳-٦- تولید لنتی‌ویروس حامل ژن *GDNF*

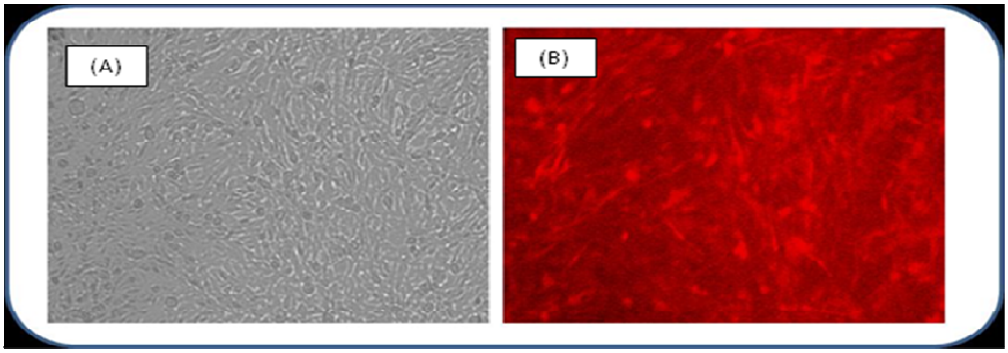
برای این‌کار ابتدا ناقل ترانسفر pLV-Jred را با *BamHI* برش دادیم سپس قطعه IRES را با آنزیم‌های *BglII/BamHI* از ناقل pGTx/GFP جدا کرده و به ناقل برش یافته pLV-Jred متصل کردیم تا ناقل جدیدی به‌نام pLV-IRES-Jred تولید شود. در نهایت قطعه GDNF موشی را با آنزیم‌های *NheI/XhoI* از ناقل pcDNA3.1/Zeo (+)-mGDNF (Kozak) جدا کرده و به ابتدای IRES (سایت آنزیمی *BglII*) در pLV-IRES-Jred پیوند زدیم. بدین ترتیب ناقل لنتی‌ویروسی مورد نظر ما به نام pLV-GDNF به‌وجود آمد که در آن قطعه GDNF-IRES-Jred در پایین دست و زیر نظر پروموتر CMV قرار گرفته است (شکل ۵).

۳-۷- تولید لنتی‌ویروس *pLV-GDNF* و بیان ژن گزارشگر در آستروسیت‌های انسانی

با همان شیوه بیان شده در بخش‌های پیشین، تیتر بالایی از لنتی‌ویروس pLV-GDNF به‌وجود آوردیم و از استوک تولید شده برای انتقال سلول‌های آستروسیتومای انسانی استفاده کردیم. در حدود یک دهم از استوک ویروسی برای انتقال ۵۰ هزار آستروسیت به کار برده شد و حداکثر ۵ روز بعد تمامی سلول‌ها Jred را بیان کردند (شکل ٦).



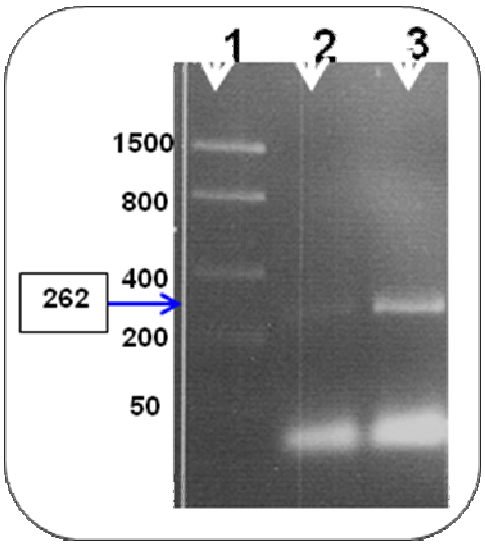
شکل ۵ شمایی از ناقل لنتی ویروسی *pLV-GDNF*.



شکل ٦ تصویر میکروسکوپ فلورسنت از بیان پروتئین *Jred* به‌وسیله‌ی سلول‌های آستروسیتومای انسانی آلوده به لنتی‌ویروس‌های نوترکیب *pLV-GDNF* .

۳-۸- اثبات بیان ژن *GDNF* در آستروسیت‌ها پس ازانتقال

آستروسیت‌ها به‌طور طبیعی فاکتور GDNF را در حد پایه بیان می‌کنند. پس از انتقال آستروسیت‌ها با ویروس pLV-GDNF افزایش بیان GDNF mRNA را در آن سلول‌ها با استفاده از واکنش RT-PCR مشاهده کردیم (شکل ۷). با استفاده از نرم‌افزار ImageJ (به بخش روش‌ها رجوع شود) غلظت[1] باند GDNF مربوط به آستروسیت‌های آلوده با pV-GDNF را با باند مربوط به آستروسیت‌های آلوده به pLV-Jred [بعنوان کنترل] مقایسه کردیم؛ که این آزمایش نشان داد بیان فاکتور GDNF در آستروسیت‌های آلوده به pLV-GDNF نسبت به سلول‌های کنترل، بیش از ۳ برابر افزایش یافته است.



شکل ۷ تصویرژل الکتروفورز محصول *RT-PCR* .برای بیان *GDNF*. ۱ *DNA marker*، ۲. نمونه واکنش از سلول‌های آستروسیتومای انسانی آلوده به لنتی‌ویروس‌های نوترکیب *pLV-Jred* و ۳. همان سلول‌ها آلوده به *pLV-GDNF* .

1. Density

٤- بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ما ابتدا روش تغلیظ لنتی‌ویروس‌های نوترکیب را با استفاده از ستون‌های پروتئینی Amicon بهینه کرده و کارایی آن‌را برای تولید استوک ویروسی با تیتر بالا سنجیدیم. این آزمایش‌ها نشان داد که روش تغلیظ به‌کار رفته، تیتر ویروسی مؤثر برای فعالیت عفونی ویروس ایجاد می‌کند. شمارش سلول‌های مثبت به پروتئین‌های گزارشگر که به‌وسیله‌ی دو ناقل لنتی‌ویروسی مستقل حمل می‌شدند کارایی بالای ویروس‌های تولیدشده را در مرحله انتقال به اثبات رسانید. با توجه به نتایج امیدوارکننده، یک ناقل لنتی‌ویروسی جدید تولید کردیم که ژن فاکتور نوروتروفیک GDNF و Jred را هم‌زمان حمل می‌کند. آلوده کردن آستروسیت‌های انسانی با این لنتی‌ویروس جدید از کارایی بالای آن در انتقال و افزایش بیان ژن هدف مطمئن شدیم.

لنتی‌ویروس‌ها از مزایای برجسته‌ای نسبت به ویروس‌های دیگر در انتقال ژن برخوردارند. این مزایا سبب شده از لنتی‌ویروس‌ها به‌عنوان ناقلین ژن برتر برای مطالعات فیزیولوژیکی- تکاملی و نیز در مطالعه بیماری‌های مختلف به‌خصوص بیماری‌های مغزو اعصاب، بافت‌های مهم کبدی، اپیتلیالی، انواع تومورها و همچنین برای تولید مدل‌های حیوانی این بیماری‌ها بهره‌برداری وسیع شود [۲۰]. ما در این مطالعه توانستیم هم ترانسژن موجود در سازه لنتی‌ویروسی را با ترانسژن دیگر و به‌روش کلونینگ تعویض کنیم و هم هر دو ترانسژن را به‌شکلی به سلول‌های انسانی انتقال دهیم؛ به‌طوری‌که ۱۰۰٪ آن‌ها بیان شود. ما این موفقیت صد در صدی را مدیون روش فیلتراسیونی می‌دانیم که در این مطالعه به‌کار بردیم و طی آن استوک ویروسی تغلیظ شده با تیتر حداکثری را به‌دست آوردیم.

تلاش‌های زیادی برای تولید ویروس با تیتر بالا انجام شده است زیرا قدرت عفونی ویروس با تیتر آن رابطه مستقیم و تنگاتنگی دارد. بطور سنتی، لنتی ویروس‌ها را با اولتراسانتریفوژ در دور بالای ۵۰ هزار و به مدت بیش از ۹۰ دقیقه رسوب می‌دهند [۲۱]. در این روش لازم است از لوله‌های مخصوص و متناسب با حجم سوپرناتان ویروسی استفاده شود که به‌علت درباز بودن این لوله‌ها نیاز به استریل کردن روتور سانتریفوژ نیز احساس می‌شود. به‌علاوه، رسوب ویروسی در بیشتر موارد ناچیز و یا غیرقابل رویت است و امکان فروپاشی ساختمان ذرات ویروسی در دور بالای سانتریفوژ وجود دارد. همچنین امکان شکستن لوله‌ها در چنین دور بالایی از سانتریفوژ بیشتر است تا در دورهای پایین‌تر.

برای رفع مشکلات گفته شده و رفع نیاز به اولتراسانتریفوژ گران‌قیمت و دورهای بالای سانتریفوژ، ما در این مطالعه لنتی‌ویروس‌های عفونی با تیتر بالا را با استفاده از ستون‌های پروتئینی تولید کردیم. این ستون‌ها در دسترس است و روزمره برای تخلیص پروتئین به‌کار می‌رود. ما ستون‌هایی را با منافذ انتخابی برای پروتئین‌های بزرگ‌تر از ۱۰۰ کیلودالتون انتخاب کردیم که قادرند ویروس‌ها را در خود نگه‌داشته و ذرات ریزتر را از خود عبور دهند. تنها ۱۰-۱۵ دقیقه زمان برای سانتریفوژ آن‌هم در دوری بسیار پایین‌تر از روش گفته شده صرف شد که این امر نیاز به دستگاه اولتراسانتریفوژ و روتورهای مخصوص ویروس را برطرف می‌کند. بدین ترتیب ما نشان دادیم که استوک ویروسی به‌دست آمده در این روش از قدرت عفونی حداکثری برخوردار است و حجم کوچکی به‌میزان یک بیستم آن (۲۰=۲۵:۵۰۰) قادر است تمام سلول‌های هدف را آلوده کند. تست محلول بیرون‌رفته از ستون هم نشان داد که عملاً هیچ‌گونه ویروسی در این روش از دست نرفته و ۱۰۰٪ ویروس‌ها در استوک تولید شده حفظ شده‌اند. بنابراین روش ما هم از نظر حجم محصول ویروسی و هم از نظر قدرت عفونی مورد نیاز و انتقال ژن می‌تواند ما را به هدف برساند و جایگزین مناسبی برای روش سنتی باشد؛ به‌علاوه از نظر هزینه، میزان کار و وقت لازم برای انجام آزمایش، با این روش به طور محسوسی صرفه‌جویی می‌شود.

در مسیر سنتز پروتئین‌ها، رونویسی از پلاسمیدها (که نسبت به ژنوم میزبان کوچک‌ترند) بلافاصله پس از ورود پلاسمید به هسته روی می‌دهد؛ بنابراین همان‌طور که از نتایج برمی‌آید بیان ترانسژن در اولین ساعات پس از ترانسفکشن قابل مشاهده خواهد بود. از سوی دیگر رپلیکاسیون پلاسمیدها نیز به‌دلیل کم بودن حجم آن‌ها با سرعت روی می‌دهد و این امر در کمتر از ۲٤ ساعت پس از ورود آن‌ها به هسته سلول میزبان، سرعت و شدت بیان را به‌طور تصاعدی بالا می‌برد. در خصوص اختلاف بیان بین GFP و Jred تجربیات ما نشان می‌دهد که معمولاً شدت بیان GFP به‌طور محسوسی بالاتر از Jred است. به این دلیل در ساعات اولیه پس از ترانسفکشن و پس از Infection، سلول‌های GFP^+ بسیار واضح‌تر از سلول‌های $Jred^+$ به چشم می‌خورد و قابل شمارش هستند. اختلاف به‌وجود آمده در نمودارها نیز ممکن است از این موضوع ناشی شده باشد. از این رو برای بررسی تفاوت‌های واقعی بین بیان این دو ترانسژن گزارشگر بایستی شدت بیان آن‌دو نیز مد نظر قرار گیرد و ما اکنون این موضوع را با استفاده از نرم‌افزارهای استاندارد در دست آزمایش داریم.

برای تست کارایی روش فیلتراسیون، لنتی‌ویروس‌های نوترکیب جدید را به‌وجود آوردیم که در آن‌ها ژن GDNF هم‌زمان با ژن گزارشگر Jred بیان می‌شود.

فـاکتور GDNF بـرای حفاظـت نـورون‌هـای حرکتـی (Motoneurons) به‌خصوص نورون‌های دوپـامین‌سـاز و همین‌طور برای تمایز این نورون‌ها اهمیت بالایی داشـته و در کلینیک برای درمان بیماری‌های نورودژنراتیـو و بیشـتر بیماری پارکینسون، مراحل آزمایشـی خـود را مـی‌گذرانـد [۲۲] و [۲۳]. بیان ایـن فـاکتور در حـد بهینـه‌ی آن بـرای عملکرد مفیدش ضرورت دارد و مقـادیر غیراسـتاندارد آن می‌تواند آثار جانبی بدی در پی داشته باشـد [۲٤] و [۲۵]. از سوی دیگـر تولیـد ایـن فـاکتور بـه‌صـورت نوترکیـب می‌تواند در عرصه بیوتکنولـوژی صـنعتی کـاربرد تجـاری داشته باشد. بدین منظور ما هم در مرحلـه سـاخت سـازه لنتی‌ویروسی، یک ژن گزارشـگر را گنجانـدیم تـا مراحـل انتقال و بیان را به‌سرعت و سـهولت آشـکار کنـیم و هـم مراحل تولید ویروسی را با روش فیلتراسیون بهینه کـردیم تا مقادیر متنابهی از فاکتور GDNF به‌دست آید. نتایج این مطالعه برای دیگر ژن‌های کاندید قابل تعمیم است ضـمن آن‌کـه از سـازه pLV-GDNF مـی‌تـوان در مطالعـات و درمان بیماری‌های نورودژنراتیو استفاده کرد.

۵- مراجع

[1] Neeltje A., Verma KM. (2003) Gene therapy with viral vectors. Ann Rev Toxicol. 43:413-439.

[2] Jakobsson J., Lundberg C. (2006) Lentiviral vectors for use in the central nervous system. Mol Ther. 13 (3):484-93.

[3] Follenzi A., Gupta S. (2004) The promise of lentiviral gene therapy for liver cancer. J Hepatol. 40 (2):337-40. Review.

[4] Van Damme A., Chuah MK, Collen D., VandenDriessche T. (2004) Onco-retroviral and lentiviral vector-based gene therapy for hemophilia: preclinical studies. Semin Thromb Hemost. 30 (2):185-95. Review.

[5] Woods NB, Ooka A., Karlsson S. (2002) Development of gene therapy for hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. Leukemia. 16 (4):563-9. Review.

[6] Copreni E., Penzo M., Carrabino S., Conese M. (2004) Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium: a promising approach to gene therapy of cystic fibrosis. Gene Ther. 11 Suppl 1:S67-75.

[7] Naldini L. (1998) Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. Curr Opin Biotechnol. 9 (5):457-63. Review.

[8] Bessis N., GarciaCozar FJ, Boissier MC. (2004) Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. Gene Ther. 2004, 11:S10-7. Review.

[9] Wu Z., Asokan A., Samulski RJ. (2006) Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. Mol Ther. 14 (3):316-27.

[10] Lundstrom K. (2003) Latest development in viral vectors for gene therapy. Trends Biotechnol 21 (3):117-122.

[11] Schroder AR., Shinn P., Chen H., Berry C., Ecker J. R., and Bushman F. (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. Cell, 110: 521-529.

[12] Mitchell, RS, et al. (2004) Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. PLoS Biol. 2: E234.

[13] Naldini L., Blömer U., Gage FH, Trono D., Verma IM. (1996) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 93 (21):11382-8.

[14] Quinonez R., Sutton RE. (2002) Lentiviral vectors for gene delivery into cells. DNA Cell Biol. 21 (12):937-51. Review.

[15] Yamada K., McCarty DM, Madden VJ, Walsh CE. (2003) Lentivirus vector purification using anion exchange HPLC leads to improved gene transfer. Biotechniques. 34 (5):1074-8, 1080.

[16] Pluta K., Luce ML, Bao L., Agha-Mohammadi S., Reiser J. (2005) Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. J Gene Med. 7:803–817.

[17] Matsushita, N., Fujita, Y., Tanaka, M., Nagatsu, T., Kiuchi, K., (1997) Cloning and structural organization of the gene encoding the mouse glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF. Gene. 203: 149–157.

[18] Sandhu JK, Gardaneh M., Iwasiow R., Lanthier P., Gangaraju S., Ribecco-Lutkiewicz M., Tremblay R., Kiuchi K., Sikorska M. (2009) Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity. Neurobiol. Dis. 33: 405–414.

[19] Sambrook J., Fritsch EF, Maniatis T. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd ed., NY

[20] Pluta K., Kacprzak MM. (2009) Use of HIV as a gene transfer vector. Acta. Biochim. Pol. 56 (4):531-95. Review.

[21] Tiscornia G., Singer O., & Verma IM. (2006) Production and purification of lentiviral vectors. Nature Protocols 1: 241 – 245.

[22] Slevin JT., Gash DM., Smith CD., Gerhardt GA., Kryscio R., Chebrolu H., Walton A., Wagner R., Young AB., (2007) Unilateral intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor in patients with Parkinson disease: response to 1 year of treatment and 1 year of withdrawal. J. Neurosurg. 106: 614-20.

[23] Yasuhara, T., Shingo T., Date I., (2007) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) therapy for Parkinson's disease. Acta Med. Okayama. 61: 51-6.

[24] Georgievska B., Kirik D., Bjorklund A. (2002) Aberrant sprouting and downregulation of tyrosine hydroxylase in lesioned nigrostriatal dopamine neurons induced by longlasting overexpression of glial cell line derived neurotrophic factor in the striatum by lentiviral gene transfer. Exp. Neurol. 177: 461–474.

[25] Rosenblad C., Georgievska B., Kirik D. (2003) Long-term striatal overexpression of GDNF selectively downregulates tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system. Eur. J. Neurosci. 17: 260–270.