

ساب کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسبروزیداز موش سوری در وکتور لتی ویرال و انتقال آن به رده سلولی HEK

*۱ همایون نادریان ، ۲ بهرام کاظمی ، ۳ آتوان دو وریس

خلاصه

سابقه و هدف: ژن درمانی یکی از مهم‌ترین شیوه‌های تحقیقات بالینی است که ارایه‌دهنده روش‌های جدیدی برای درمان نقص‌های ژنتیکی می‌باشد. نقص ژنتیکی آنزیم گلوکوسبروزیداز (Gba) عامل بیماری گوشی بیش از بقیه بیماری‌ها در ژن درمانی مورد توجه قرار گرفته است. هدف از انجام این پروژه کلونینگ و انتقال ژن آنزیم گلوکوسبروزیداز توسط لتی ویرال وکتور ارتقاپایافه به رده سلول‌های HEK می‌باشد.

مواد و روش‌ها: مطالعه به روش تجربی و به منظور تولید و تکثیر cDNA ژن آنزیم گلوکوسبروزیداز به کمک پرایمرهای اختصاصی به روش PCR انجام گرفت و در وکتور غیر بیان‌کننده، کلون و تراویف‌بایی گردید. سپس ژن نوترکیب را در لتی ویرال وکتور ارتقاپایافه دارای ژن گزارش‌گر GFP ساب کلون شد. پس از کشت سلول‌های HEK وکتور نوترکیب لتی ویرال به آنها منتقل شد و انتقال ژن Gba با استفاده از ژن گزارش‌گر GFP بررسی گردید.

نتایج: تکثیر و کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسبروزیداز با استفاده از آنزیم‌های محدود‌گر تایید گردید. تراویف‌های گزارش شده‌ی آن کاملاً تطبیق داشت. ساب کلونینگ ژن Gba در وکتور لتی ویرال با استفاده از آنزیم‌های محدود‌کننده‌ی مختلف تایید شد. انتقال ژن نوترکیب Gba توسط بیان ژن گزارش‌گر با استفاده از پروتئین‌های فلورستی تایید گردید.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق بخشی از فرآیند پروتکل ژن درمانی با انتقال ژن آنزیم گلوکوسبروزیداز موش به سلول‌های HEK توسط وکتور لتی ویرال انجام گرفت.

واژگان کلیدی: ژن درمانی، انتقال ژن، گلوکوسبروزیداز

- ۱- استادیار گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی
- ۲- دانشیار گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی شبکه پزشکی مولکولی کشور، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی
- ۳- استاد بخش ژن درمانی دپارتمان بیولوژی سلولی مولکولی دانشگاه لیدن هلند

* نویسنده مسؤول: همایون نادریان

آدرس: کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، گروه علوم تشریح

پست الکترونیک: Naderian_H@kaums.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۳۳۶۱ ۰۶۶۱

دورنویس: ۰۳۶۱ ۵۵۵۱۱۱۲

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۲

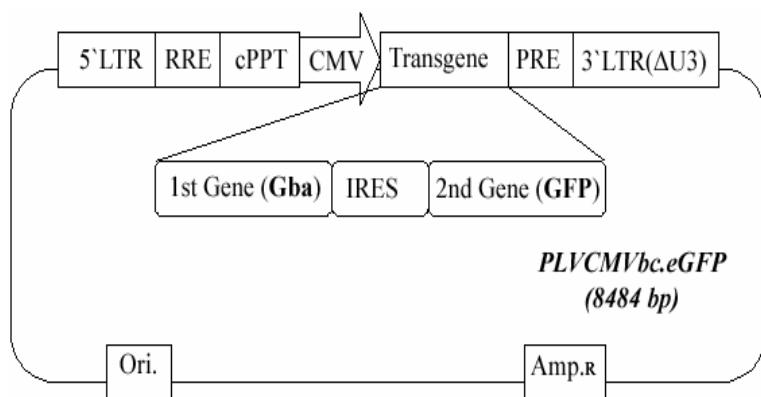
تاریخ پذیش نهایی: ۸۶/۲/۲۷

[۳]. بیماری گوشی یکی از بهترین انتخاب‌ها برای ژن درمانی می‌باشد [۴]. پس از تکثیر و کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسبروزیداز در وکتور بیان‌کننده با انتقال و سپس بیان آن در سلول‌های خونی می‌توان بیماری را درمان نمود. وکتورهای مختلفی جهت انتقال ژن وجود دارند، یکی از مناسب‌ترین وکتورها برای انتقال و بیان ژن‌های نوترکیب وکتور لتی ویرال است. وکتورهای لتی ویرال مشتق از HIV-1 قابلیت انتقال ژن‌های نوترکیب را به سلول‌های قابل تقسیم و غیرقابل تقسیم دارند. سلول‌های هدف وکتور لتی ویرال انواع سلول‌های تمایزیافته تخصصی نظر سلول‌های دستگاه

مقدمه
ژن درمانی، انتقال مواد ژنتیکی نوترکیب به سلول‌های
هدف به منظور تغییر در بیان ژن و دستیابی به اثرات درمانی آنها
می‌باشد. استراتژی اولیه ژن درمانی برای درمان بیماری‌های تک-
ژنی نظر بیماری گوشی بوده است [۱]. بیماری گوشی به دلیل
جهش در ژن آنزیم گلوکوسبروزیداز (Gba) ایجاد می‌شود [۲].
این آنزیم، مسؤول هیدرولیز گلوکوسبروزید است که در صورت
نقص ژنتیکی آنزیم گلوکوسبروزیداز، ماکروفازهای بافت‌های
کبد، طحال و مغز استخوان گلوکوسبروزید را فاگوستیه می‌کنند و
سبب بزرگی کبد، بزرگی طحال و نشانه‌های نوروپاتیک می‌گردد

وکتور با استفاده از ترادرف IRES می‌توان دو ژن را با یک پروموموتور مناسب بیان نمود [۲]. به همین منظور ژن اول، ژن نوترکیب هدف و ژن دوم ژن گزارش گر eGFP⁶ است که پس از ترادرف IRES⁷ کلون می‌شود (شکل شماره‌ی ۱). سلول‌های HEK (293T) یکی از رده‌های سلولی می‌باشند، این سلول‌ها مورفو‌لوژی سلول‌های اپی‌تیلیا را دارند و به عنوان یکی از بهترین رده‌های سلولی برای بیان ژن‌های نوترکیب و تولید انواع ویروس‌ها هستند [۱۳]. تقریباً تمام وکتورهای ویروسی قادر به اتصال، انتقال، و یکی نمودن ژنوم خود در این سلول‌ها می‌باشند، که پس از یکی شدن در ژنوم سلول هدف به عنوان بخشی از ژنوم آن درآمده و همانند بقیه ژن‌های سلول بیان می‌شوند و تولید پروتئین می‌کنند. هدف از این مطالعه انتقال ژن Gba در سلول‌های HEK می‌باشد تا در آینده با استفاده از ویروس‌های نوترکیب تولید شده از این رده‌ی سلولی، آنها را به انواع سلول‌های قابل تقسیم و غیرقابل تقسیم انتقال دهیم. این مطالعه در سه مرحله انجام می‌پذیرد. در مرحله‌ی اول تکثیر ژن Gba در وکتور غیر بیان‌کننده و ترادرف یابی آن می‌باشد. در مرحله‌ی دوم ساپ کلونینگ ژن ترادرف بیان‌شده در وکتور انتقالی لتی ویرال است. در صورت موفقیت در ساپ کلونینگ ژن آنزیم گلوكوسبروزیداز در مرحله‌ی سوم انتقال آن به رده‌ی سلولی HEK می‌باشد.

اعصاب مرکزی، شبکیه، حلزون گوش میانی، سلول‌های عضلات اسکلتی و قلبی، سلول‌های غدد درون‌ریز، کبدی و سلول‌های خونی می‌باشند [۵]. با حذف ژن‌های اصلی، فرعی و تنظیمی و حذف بخشی از ترادرف ناحیه نسخه‌داری لتی ویروس نسل سوم وکتور لتی ویرال انتقالی تولید می‌شوند که این می‌مناسب انتقال ژن‌های نوترکیب می‌باشند. حذف ژن‌ها از وکتور سبب کاهش کارایی و توانایی القای آن می‌شود [۶، ۷]. به همین منظور ترادرف ژن‌هایی را در وکتور قرار می‌دهند تا قابلیت القای سلول‌های هدف را داشته باشد. ترادرف cPPT¹ در وکتور لتی ویرال سبب تسهیل عبور وکتور از سیتوپلاسم به هسته‌ی سلول‌های هدف در سلول‌های غیر قابل تقسیم می‌باشد [۸]. ترادرف PRE² باعث انتقال RNA از هسته به سیتوپلاسم می‌گردد [۹]. ترادرف RRE³ نیز سبب تسهیل خروج mRNA و تنظیمات پس از نسخه‌داری آن می‌شود [۱۰]. سه ژن فوق، قابلیت القای وکتور و بیان ژن نوترکیب را در سلول‌های هدف افزایش می‌دهند. پروموموتورهای ویروسی به عنوان یکی از بهترین عناصر تنظیمی بیان ژن در انواع سلول‌های پستانداران می‌باشد. CMV⁴ پروموموتوری بسیار مناسب برای رده‌های سلولی نظری رده سلولی HEK⁵ و رده‌های سلولی است [۱۱]. ساپ کلونینگ ژن‌های نوترکیب در ناحیه ترانس ژنیک لتی ویروس به جای ژن‌های اصلی آن قرار می‌گیرد. در لتی ویرال



شکل ۱- ساختار وکتور لتی ویرال انتقالی با ۸۴۸۴ جفت باز، جایگاه ترادرف‌های ارتقای وکتور جهت افزایش کارایی آن مشخص می‌باشد. در ناحیه‌ی کلونینگ ژن اول محل کلونینگ ژن آنزیم گلوكوسبروزیداز (Gba) و ژن دوم محل کلونینگ ژن گزارش گر (GFP) است. پروموموتور CMV قبل از ژن اول (ژن نوترکیب هدف) قرار دارد، ترادرف IRES بین دو ژن نوترکیب واقع شده است.

6- enhance green flurecent protein
7- Internal ribosomal entry sites

1- central polypurine tract
2- Posttranscriptional regulatory element
3- Reverses transcriptase response element
4- Cytomegalovirus
5- Human embryonic kidney

مواد و روش‌ها

تکثیر، کلونینگ و ترادفیابی: ترادف ژن آنزیم گلوكوسبروزیداز از بانک ژن جستجو گردید [۱۴]. سه پرایمر نسخه‌برداری معکوس، رفت و برگشت طراحی و (توسط شرکت Invitrogen) تولید و تهیه گردید.

RT-primer: 5'-CCTTTAATGTCATGCTAACG-3'
F-primer: 5'-GGGTCTACGGGCAGTGTCTA-3'
R-primer: 5'-CTGCTCAGGTGTCAGTTCCA-3'
پس از استخراج RNA از طحال موش^۸ بر اساس پروتکل TRIzol (محصول شرکت Invitrogen) ژن cDNA Gba را با استفاده از روش RT-PCR تولید و در دمای آنلینگ ۵۵/۵۵°C با ۳۵ سیکل به روش PCR تکثیر شد. پس از الکتروفورز در کنار نشان‌گر، محصول PCR از روی ژل آگارز تخلیص گردید. وکتور غیر بیان‌کننده PUCBM21^۹ دارای ۲۷۲۵ دندریتی جفت باز در جایگاه کلونینگ با آنزیم HincII خطی شد و پس از دیفسفوریله کردن وکتور با آکالین فسفاتاز (از شرکت Frementase)، ژن تکثیر شده mGba را با وکتور فوق با استفاده از آنزیم لیگاز در دمای ۲۲°C به مدت یک شب انکوبه گردید. پس از لیگاند وکتور و ژن تکثیر شده، وکتورهای نوترکیب در سلول پذیرای DH10B کلون گردید [۱۵]. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از آنزیم‌های محدودگر غربال شدند و توسط بخش ژندرمانی دانشگاه لیدن هلند ترادف‌یابی گردیدند. از پلاسمیدهای نوترکیب PUCBM21mGba ترادف‌یابی شده محلول ذخیره گلوبول تهیه و در ۸۰°C-نگهداری گردید.

ساب کلونینگ در لتی ویرال وکتور: با استفاده از نرمافزار ^{۱۰}Gc2 جایگاه‌های آنزیم‌های محدودگر در وکتور شناسایی و ۱ میکروگرم وکتور ^{۱۱}PLVCMVbc.eGFP دارای ۸۴۸۴ جفت باز (هدهی دکتر آتنوان دو وریس از دانشگاه لیدن هلند) در جایگاه کلونینگ ابتدا توسط آنزیم Smal در دمای ۳۰°C و پس آنزیم XbaI (همهی آنزیم‌ها از شرکت Frementase) در دمای ۳۷°C هر کدام به مدت ۱۲۰ دقیقه هضم و انکوبه گردیدند. پس از الکتروفورز قطعه ۸۴۶۱ جفت باز آن از روی ژل آگارز تخلیص شد. ۵ میکروگرم از پلاسمیدهای نوترکیب PUCBM21mGba با استفاده از نرمافزار Gc2 پس از تعیین جایگاه‌های آنزیمی با آنزیم‌های HpaI و XbaI در دمای ۳۷°C به مدت ۱۲۰ دقیقه هضم و انکوبه گردید. جایگاه آنزیم XbaI در وکتور و قطعه mGba مشترک انتخاب گردید تا کدون آغازی

نتایج

کلونینگ و ترادفیابی: با استفاده از پرایمرهای اختصاصی cDNA ژن آنزیم گلوكوسبروزیداز (mGba) با ۱۶۱۶ جفت باز تولید، تکثیر و تخلیص گردید (شکل شماره ۲، الف). وکتور خطی شده دارای ۲۷۲۵ جفت باز نیز از ژل آگارز تخلیص شد. از اتصال وکتور با ژن آنزیم گلوكوسبروزیداز ساختار پلاسمید نوترکیب PUCBM21mGba جدیدی با ۴۳۴۱

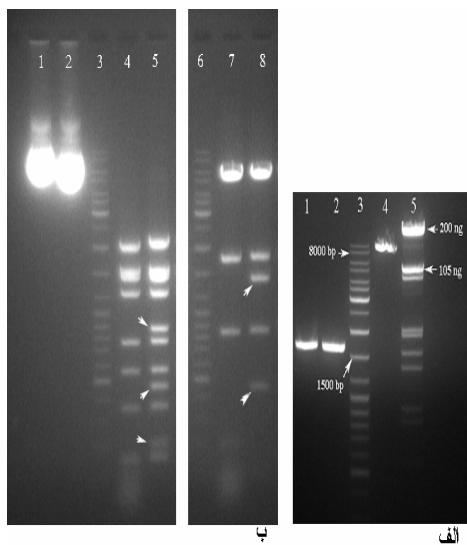
8- Mus musculus

9- Plasmid universal cloning

10- Gene Constriction Kit 2 (version 2.0.17)

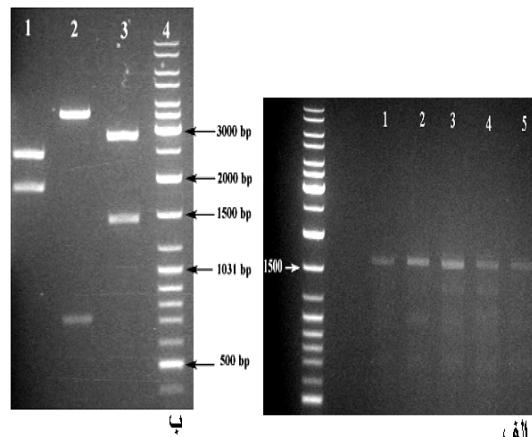
11- Plasmid lentiviral cytomegalovirus bicisternic enhance green flurecent protein

پلاسمیدهای نوترکیب PLVCMVmGbaeGFP با ۱۰۱۳۱ پس از غربالگری با آنزیم محدودگر تایید شد. جفت باز پس از غربالگری لتی ویرال نوترکیب هضم شده و نیز الکتروفورز پلاسمیدهای لتی ویرال غیر نوترکیب در کنار نشانگر تایید شد. سه آنزیم محدودگر کلونینگ آنها تایید گردید (شکل شماره‌ی ۲ ب).



شکل-۳-الف: الکتروفورز وکتور لتی ویرال و قطعه ژن Gba پس از هضم و تخلیص در کنار نشانگر طولی (ستون ۳) و نشانگر وزنی (ستون ۵)، ستون‌های ۱ و ۲ قطعه ژن Gba با ۱۶۷۰ جفت باز و حدود ۲۰۰ نانوگرم DNA. ستون ۴ وکتور لتی ویرال با ۸۴۶۱ جفت باز و حدود ۲۰۰ نانوگرم DNA. ب: آنالیز آنزیمی پلاسمید نوترکیب و غیر نوترکیب ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز در لتی ویرال وکتور روی ژل آگارز ۱٪ ستون ۱ و ۲ به ترتیب پلاسمید نوترکیب و غیر نوترکیب بدون هضم آنزیمی ۴ و ۷ هضم پلاسمیدهای غیر نوترکیب لتی ویرال (کترول) به ترتیب با آنزیم‌های AvaI و BsmAI. ستون‌های ۵ و ۸ هضم پلاسمیدهای نوترکیب با همان آنزیم‌ها، پیکان‌ها قطعات هضم شده مربوط به پلاسمید نوترکیب Gba می‌باشدند که در پلاسمید غیر نوترکیب ستون‌های ۴ و ۷ دیده نمی‌شوند.

جفت باز به سلول‌های پذیرا انتقال داده شد. استخراج پلاسمیدهای نوترکیب با آنزیم‌های محدودگر غربال گردیدند. پلاسمیدهای غربال شده به مقدار زیاد استخراج و به منظور اطمینان با استفاده از ۲ ب.



شکل-۲-الف: cDNA تکثیر شده ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز ۱۶۱۶ جفت باز به روش PCR با دمای گرادیان روی ژل آگارز ۱٪، هر ستون ۱/۵°C افزایش دما را نشان می‌دهد. ستون ۳ دمای آنیلینگ ۵۵/۵°C. ب: آنالیز آنزیمی ساختار پلاسمیدی PUCBM21mGba AtaII باز روی ژل آگارز ۱٪، ستون ۱ هضم با آنزیم EcoRV دو قطعه ۲۴۵۳ و ۱۸۸۸ جفت باز، ستون ۲ هضم با آنزیم EcoRV دو قطعه ۳۶۰۰ و ۷۴۱ جفت باز، ستون ۳ هضم با آنزیم PstI دو قطعه ۲۸۵۸ و ۱۴۸۳ جفت باز مشاهده می‌شود

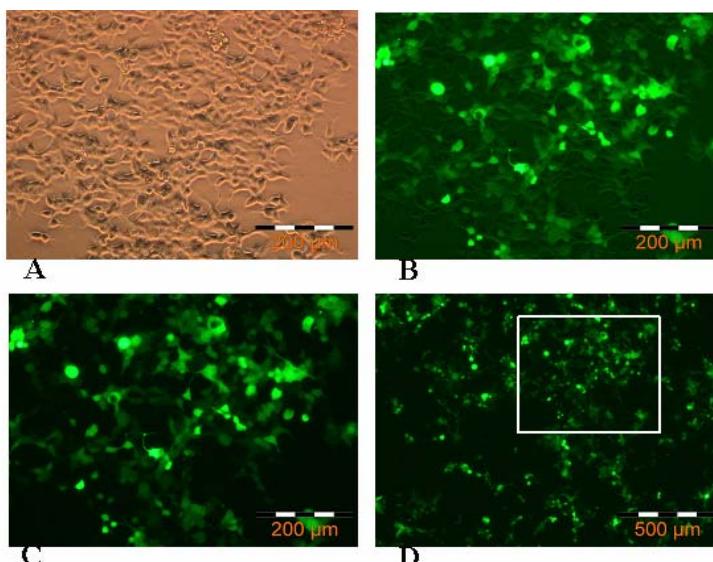
هر کدام از آنزیم‌های مورد استفاده حداقل دارای یک جایگاه شناسایی آنزیمی بر روی تراوف ژن نوترکیب Gba هستند. تراوف یابی ژن کلون شده mGba (ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز) با ۱۶۱۶ جفت باز به صورت کامل بدون هیچ جهشی با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas و Multialin تایید گردید.

ساب کلونینگ در وکتور لتی ویرال: هضم وکتور لتی ویرال با آنزیم‌های محدودگر تایید ۸۴۶۱ جفت باز آن از روی ژل آگارز تخلیص شد. وکتور نوترکیب حاوی نیز mGba پس از هضم آنزیمی و الکتروفورز، قطعه ۱۶۷۰ mGba باز آن از روی ژل تخلیص گردید. تخلیص وکتور هضم شده لتی ویرال با ۸۴۶۱ جفت باز و قطعه ژن نوترکیب Gba با ۱۶۷۰ باز را در کنار نشانگرهای وزنی و طولی الکتروفورز گردید (شکل شماره‌ی ۳ الف). پس اتصال قطعات ژن نوترکیب آنزیم گلوکوسربروزیداز و وکتور لتی ویرال و کلونینگ آنها، ساختار

گلوكوسربروزیداز به سلول‌های HEK و انجام نسخه برداری از ژن Gba می‌باشد. سلول‌های HEK پس از کشت بیش از ۸۰٪ سطح فلاسک را پوشانده‌اند، که حداقل ۷۰٪ سلول‌های کشت داده شده ژن گزارش‌گر GFP بیان نمودند. بیان ژن گزارش‌گر در سلول‌های تولید کننده پروتئین‌های فلورستنی در زیر میکروسکوپ فلورستنی دیده می‌شوند (شکل شماره‌ی ۴).

مقدار DNA استخراج شده پلاسمید نوترکیب لتی ویرال ۲ میکروگرم در میکرولیتر بود.

انتقال به سلول‌های HEK: وکتور لتی ویرال دارای دو ژن نوترکیب mGba و نیز ژن گزارش‌گر GFP می‌باشد. پروموتور CMV وکتور لتی ویرال سبب بیان ژن گزارش‌گر GFP می‌گردد. بیان ژن گزارش‌گر نشان‌دهنده انتقال ژن آنزیم



شکل ۴- انتقال ژن‌های نوترکیب Gba و GFP در سلول‌های HEK کشت داده شده در زیر میکروسکوپ فلورستن. A: سلول‌های HEK زمینه روشن با نور عادی، B: همان سلول‌ها زمینه روشن با نور عادی و نور فلورستن، C: سلول‌های فلورستنی با بزرگنمایی کمتر، مریع ناحیه مربوط به تصویر C با بزرگنمایی بیشتر می‌باشد. در تصاویر C و D سلول‌های فلورستنی مشاهده می‌شوند.

توسط محققین فوق کاملاً مطابقت داشت. Kim ژن آنزیم گلوكوسربروزیداز را از طریق لتی ویرال وکتور دارای ژن GFP به سلول‌های مغز استخوان در محیط کشت انتقال داد و سپس این سلول‌ها را به موش تزریق نمود و پس از ۲، ۳ و ۶ ماه سلول‌های بیان‌کننده پروتئین‌های فلورستنی را در بافت‌های کبد، طحال و Havenga مغز استخوان در زیر میکروسکوپ مشاهده نمود [۱۸]. نیز ژن گلوكوسربروزیداز را از طریق دیگر وکتورهای رتروویرال به سلول‌های هماتوپویتیک منتقل نمود و اظهار داشت حدود ۶۰٪ از این سلول‌ها ژن را بیان نموده‌اند [۱۹]. در مطالعه‌ما از سلول‌های HEK به منظور انتقال ژن استفاده گردید و مشاهده شد در بیش از ۷۰٪ از این سلول‌ها ژن آنزیم گلوكوسربروزیداز و نیز ژن فلورستنی منتقل گردیدند، که با مطالعات محققین فوق منطبق بود. بیان طولانی مدت ژن‌های نوترکیب منتقل شده در مطالعات مختلف نشان‌دهنده قابلیت القای بسیار بالای لتی ویروس‌ها از نظر طول زمان بیان و درصد سلول‌های القا شده است. در این پژوهش استفاده از سلول‌های HEK به دلیل قابلیت القاگذیری و

بحث

در این پژوهش در مرحله‌ی اول موفق شدیم ژن آنزیم گلوكوسربروزیداز را به صورت کامل تکثیر و در وکتور غیر بیان‌کننده، کلون و تراالف‌یابی نماییم و سپس همراه با ژن GFP با استفاده از وکتور لتی ویرال به بیش از ۷۰٪ از سلول‌های HEK انتقال دهیم. هدف از ژن‌درمانی انتقال و بیان موثر ژن هدف در سلول‌های مختلف است تا اثرات درمانی آن به دست آید. وکتورهای لتی ویرال به دلیل قابلیت یکی شدن ژنوم آنها در ژنوم سلول هدف قادر خواهند بود برای زمان‌های طولانی ژن نوترکیب را بیان نمایند. بیشترین تحقیقات ژن‌درمانی و انتقال ژن تا کنون بر روی بیماری‌های تک ژنی نظریه بیماری گوشه بوده است. Carstea، ژن آنزیم گلوكوسربروزیداز را در وکتور PUC19 کلون نمود O'Neill [۱۶]. پس از کلونینگ ژن آنزیم گلوكوسربروزیداز موقعیت همه اگزون‌های آن را در موش و انسان یکسان مشخص نمودند [۱۷]. در این مطالعه تراالف‌یابی انجام شده از ژن آنزیم گلوكوسربروزیداز با ۱۶۱۶ جفت باز با تراالف‌های گزارش شده

مشاهده سلول‌های فلورستی در بیش از ۷۰٪ آنها نشان‌دهنده انتقال و نسخه‌برداری از ژن آنزیم گلوکوسربروزیداز حداقل در بیش از ۷۰٪ سلول‌ها بوده است. Kafri هدف ژن‌درمانی را بیان طولانی مدت ژن نوترکیب در سلول بدون افزایش میزان خطر آلدگی دانست. او با استفاده از وکتور لتی ویرال انتقالی در In vivo پس از ۵ ماه در کبد و ۸ ماه در عضله ژن گزارش گر را بررسی نمود و هیچ واکنش التهابی را پس از این مدت مشاهده ننمود [۲۲]. در مطالعه‌ی بیان ژن پس از چند ماه بدون هیچ واکنش پاتولوژیک دارای اهمیت بود. لتی ویرال مورد استفاده در مطالعه‌ی ما مشابه وکتور مورد استفاده Kafri بود که با حذف ژن‌های پاتولوژیک اینمن شده بود و استفاده از آن در مطالعات آینده برای انتقال ژن امکان‌پذیر است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش سعی شد تا با استفاده از جدیدترین پروتکل‌ها مهمترین مرحله‌ی یک پروژه‌ی ژن‌درمانی که ساب کلونینگ و انتقال یک ژن نوترکیب در سلول می‌باشد، انجام گیرد تا در آینده بتوان با تحقیقات بیشتر شاهد انجام ژن‌درمانی در کشور باشیم.

تشکر و قدردانی

از همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و کاشان و از پژوهش‌گران بخش ژن‌درمانی دانشگاه لیدن هلند که در انجام این پروژه‌ی ما را باری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

- [1] Biceroglu S. Memis A. Gene therapy: applications in interventional radiology. *Diagn Interv Radiol* 2005; 11: 113-118.
- [2] Mizukami H. Mi Y. Wada R. Kono M. Yamashita T. Liu Y. et al. Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *J Clin Invest* 2002; 109: 1215-1221.
- [3] de Fost M. Aerts JM. Hollak CE. Gaucher disease: from fundamental research to effective therapeutic interventions. *Neth J Med* 2003; 61: 3-8.
- [4] Grabowski GA. Clinical and basic studies of enzyme and gene therapy in Gaucher disease type I. *Japan J Inheri Met Dise* 1997; 13: 283-292.
- [5] Reiser J. Lai Z. Zhang XY. Brady RO. Development of multigene and regulated lentivirus vectors. *J Virol* 2000; 74: 10589-10599.
- [6] Delenada C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* 2004; 6: 125-138.
- [7] Van Damme A. Chuah MK. Collen D. VandenDriessche T. Oncoretroviral and lentiviral vector-base gene therapy for hemophilia: preclinical studies. *Semin Thromb and Hemost* 2004; 30: 185-195.
- [8] Zennou V. Petit C. Guetard D. Nerhbass U. Montagnier L. Charneau P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 2000; 101: 173-185.
- [9] Zufferey R. Donello JE. Trono D. Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 1999; 73: 2886-2892.

تولید ویروس‌های نوترکیب بوده است تا در آینده در شرایط In vivo سلول‌های مختلف القا گردد. استفاده از پرومومتور CMV در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. Harms و Logann آن را در مطالعات ژن‌درمانی و سلول‌های مختلف یوکاریوتی موثر دانستند [۲۰، ۲۱]. بیان ژن نوترکیب در بیش از ۷۰٪ از سلول‌ها در مطالعه ما نشان‌دهنده تاثیر پرومومتور فوق در القای سلول‌ها به ویژه رده سلولی HEK می‌باشد. تراالف‌های لتی ویرال وکتور برای افزایش کارایی وکتور در عبور از سیتوپلاسم به هسته و از هسته به سیتوپلاسم و نسخه‌برداری به ویژه برای القای سلول‌های غیر قابل تقسیم ضروری هستند. بدون استفاده از وکتورهای ارتقایافته بیان موثر ژن مورد نظر تقریباً امکان‌پذیر نیست و امکان دست‌یابی به اشرات درمانی آن بسیار ناچیز است. لتی ویرال وکتور مورد استفاده در مطالعه‌ی ما دارای تمام تراالف‌های ضروری برای القای ژن نوترکیب است (شکل شماره‌ی ۱). در مورد کارایی القای لتی ویروس، یکی شدن ژن‌نوم آن با ژنوم سلول‌های هدف پس از انتقال و قابلیت القای تعداد بیشتر سلول‌دارای اهمیت است که بیان ژن GFP در ۷۰٪ سلول‌ها قابلیت القای آن را مشخص می‌کند. استفاده از تراالف IRES برای بیان هم‌زمان بیش از یک ژن می‌باشد. IRES در هنگام نسخه‌برداری سبب می‌شود تا mRNA پس از رسیدن به کدون پایانی ژن اول همواره اتصال خود را با rRNA حفظ و سبب پایداری آن گردد تا با رسیدن به کدون آغازی ژن دوم آن را نسخه‌برداری نماید. Martine اظهار داشت بیان ژن دوم توسط یک پرومومتور در وکتورهای bc نشان‌دهنده بیان قطعی ژن اول می‌باشد [۲۱]. در مطالعه ما ژن اول Gba و ژن دوم GFP بود.

- [10] Farson D. Witt R. McGuinness R. Dull T. Kelly M. Song J. et al. A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 981-997.
- [11] Logan AC. Lutzko C. Kohn DB. Advances in lentiviral vector design for gene-modification of hematopoietic stem cells. *Cur opin Biothechnol* 2002; 13: 429-436.
- [12] Sokolic RA. Sekhsaria S. Sugimoto Y. Whiting-Theobald N. Linton GF. Li F. et al. A bicistronic retrovirus vector containing a picornavirus internal ribosome entry site allows for correction of X-linked CGD by selection for MDR1 expression. *Blood* 1996; 87: 42-50.
- [13] Shaw G. Mores S. Ararat M. Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* 2002; 16: 869-871.
- [14] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=118130967> (NM_008094)
- [۱۵] نادریان همایون، کاظمی بهرام، حسینی احمد، صادقی یوسف، دو وریس آتنوان. کلونینگ ژن آنزیم گلوكوسبروزیداز موش و ایجاد جهش در آن. *مجله علوم تشریحی ایران* ۱۳۸۴؛ سال ۳، شماره ۳: صفحات ۱۹۰ تا ۱۸۵.
- [16] Carstea ED. Murray GJ. O'Neill RR. Molecular and functional characterization of the murine glucocerebrosidase gene. *Biochem Biophys Res commun* 1992; 184: 1477-1483.
- [17] O'Neill RR. Tokoro T. Kozak CA. Brady RO. Comparison of the chromosomal localization of murine and human glucocerebrosidase genes and of the deduced amino acid sequences. *PNAS* 1989; 86: 5049-5053.
- [18] Kim EY. Hong YB. Lai Z. Kim HJ. Cho YH. Brady RO. et al. Expression and secretion of human glucocerebrosidase mediated by recombinant lentivirus vectors in vitro and in vivo: implications for gene therapy of Gaucher disease. *Biochem Biophys Res commun* 2004; 318: 381-390.
- [19] Havenga M. Fisher R. Hoogerbrugge P. Roberts B. Valerio D. Van Es HH. Development of safe and efficient retroviral vectors for Gaucher disease. *Gene Ther* 1997; 4: 1393-1400.
- [20] Harms JS. Eakle KA. Kuo LS. Bremel RD. Splitter GS. Comparison of bovine leukemia virus (BLV) and CMV promoter-driven reporter gene expression in BLV-infected and non-infected cells. *Genet Vaccines Ther* 2004; 2: 11.
- [21] Martin P. Albagli O. Poggi MC. Boulukos KE. Pognonec P. Development of a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity. *BMC Biotechnol* 2006; 6: 4.
- [22] Kafri T. Blomer U. Peterson DA. Gage FH. Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genetic* 1997; 17: 314-317.