

انتقال و بیان ژن NGF در سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش با استفاده از دو وکتور لنتی ویروسی HIV و FIV

سمیه اکبری^۱ M.Sc.، آریتا پروانه تفرشی^{۱*} Ph.D.، شاه صنم عباسی^۱ M.Sc.،
حسن مومن^۱ M.Sc.، محمد معصومی^۲ Ph.D.

۱- پژوهشکده علوم پایه زیست فناوری، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران کد پستی ۱۴۹۶۵-۱۶۱
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه پیام نور اصفهان، ایران
۳- دپارتمان زیستی سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات تکنولوژی سلول‌های بنیادی، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: tafreshi@nigeb.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۱۶

چکیده

هدف: در این مطالعه میزان انتقال بیان ژن توسط لنتی ویروس‌های مشتق از ویروس نقصان ایمنی انسانی (HIV) "Human immunodeficiency virus" با میزان انتقال بیان ژن توسط لنتی ویروس مشتق از ویروس نقصان ایمنی گربه (FIV) Feline Immunodeficiency virus به سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: حامل‌های ویروسی با استفاده از وکتورهای آماده، سلول‌های HEK-293T، شاتل‌های لنتی ویروسی با پایه‌های HIV و FIV حامل ژن GFP به عنوان کنترل، و FIV و HIV حامل ژن NGF (Nerve growth factor) تولید شدند. سپس سوپرناتانت سلول‌های HEK-293T حاوی ویروس‌های ساخته شده در معرض سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که سلول‌های مغز استخوان تیمار شده با وکتور HIV-NGF، NGF را بیان کردند. اما پس از تیمار با وکتور FIV-NGF، فاقد این توانایی و قادر به بیان NGF نبودند. نتایج بیان NGF توسط نتایج انتخاب سلول‌ها، به وسیله آنتی بیوتیک، مورد تایید قرار گرفتند.

نتیجه گیری: لنتی ویروس‌های مشتق از FIV در مقایسه با لنتی ویروس‌های مشتق از HIV جهت آلوده سازی و بیان ژن خارجی در سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان مناسب نیستند.

واژگان کلیدی: لنتی ویروس‌های HIV based و FIV based، سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش، NGF.

مقدمه

انتقال ژن در زمره مهم‌ترین تکنیک‌های مورد استفاده در مطالعات تکاملی و فیزیولوژیکی، تشخیص بیماری‌ها، درمان و پیشگیری از آن‌ها می‌باشد. به علت توانایی طبیعی ویروس‌ها در انتقال ژن و الحاق به ژنوم میزبان که بخشی ضروری از سیکل زندگی آن‌ها است، از آن‌ها بعنوان ابزاری قوی برای انتقال ژن‌های بیگانه به درون سلول‌های میزبان استفاده می‌شود (۱). لنتی ویروس‌ها ناقلین ویروسی می‌باشند که به دلیل ویژگی‌های برجسته‌ای مانند اینتگراسیون، تولید آسان و ترانسداکشن فراوان، در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند. لنتی ویروس‌ها از خانواده رتروویریده می‌باشند و همانند رترو ویروس‌ها قادرند پس از ورود به سلول میزبان، ژن‌های خود را به داخل ژنوم میزبان وارد کنند. البته رتروویروس‌ها تنها قادر به آلوده سازی سلول‌های در حال تقسیم می‌باشند در حالیکه لنتی ویروس‌ها قادر به آلوده سازی سلول‌های تکثیرشونده و غیرقابل تکثیر هستند (۲). وکتورهای رتروویروسی مشابه وکتورهای با پایه ویروس سرطان خون موشی (MLV) (murine leukemia virus) می‌باشند ولی نسبت به آدنوویروس‌ها دارای مزایایی مانند بیان طولانی مدت ژن نوترکیب، عدم ایجاد پاسخ ایمنی ناخواسته و توانایی بیان نسبتاً بالای یک ژن در انواع سلول‌های پستانداران هستند (۳). لنتی ویروس ایدز (HIV) توانایی آلوده سازی سلول‌های در حال تقسیم و سلول‌های تکثیر ناپذیر را دارا بوده که این توانایی به علت عدم نیاز این ویروس‌ها به فاکتورهای مهم هسته‌ای برای انتقال به هسته می‌باشد. این وکتورها قابلیت انتقال ژن به سلول‌های اولیه در حال رشد و ماکروفاژهای تمایز یافته در شرایط آزمایشگاهی را دارا بوده و در *in vivo* نیز قابلیت انتقال ژن به نورون‌های تمایز یافته، سلول‌های شبکه‌ای، کبد، ماهیچه و سلول‌های دیگری را دارند (۴ و ۵). توانایی لنتی ویروس‌ها به عنوان حاملین مناسب انتقال ژن به سلول‌های مختلف انسان و پستانداران مخصوصاً به بافت‌هایی مثل سیستم عصبی یا بافت کبد که دارای سلول‌های تقسیم ناپذیر می‌باشند، منجر به اهمیت روز افزون استفاده از آن‌ها شده است. از مهم‌ترین حامل‌های لنتی ویروسی می‌توان حامل‌های لنتی ویروسی FIV مشتق از Feline Immunodeficiency virus” حامل‌های لنتی ویروسی HIV مشتق از “Human immunodeficiency virus” و حامل‌های لنتی ویروسی SIV مشتق از Simian Immunodeficiency virus را نام برد که عموماً برای انتقال ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶، ۷ و ۸).

اگر چه لنتی ویروس‌های پریمات‌ها مانند SIV و HIV دارای ساختاری توسعه یافته می‌باشند، اما لنتی ویروس‌های غیرپریمات‌ها نیز دارای توانایی‌های مشابهی می‌باشند که کمتر مورد توجه محققان قرار گرفته است. ویروس نقص ایمنی FIV دارای ساختاری نسبتاً مشابه با ویروس HIV است و می‌تواند مدل بسیار مناسبی برای گسترش تولید واکسن‌های نو ترکیب و درمان بیماری‌های ویروسی باشد. از سوی دیگر این لنتی ویروس را می‌توان به منظور ایجاد وکتورهای مناسب‌تر جهت سازگاری با میزبان‌های مختلف بکار برد (۹). آنالیز فیلوژنیک وکتور FIV نشان می‌دهد که این ویروس دارای فاصله نسبتاً زیادی با لنتی ویروس‌های پریمات می‌باشد و شواهد اپیدمیولوژیک وقوع sero conversion (تولید آنتی بادی‌های اختصاصی قابل تشخیص برای میکروارگانسیم‌ها در سرم خونی که در نتیجه آلوده سازی یا ایمنی زایی تولید می‌شوند) در جوامع انسانی را نشان نمی‌دهد (۱۰). بعضی از ویژگی‌های چرخه زندگی لنتی ویروس FIV شامل ورود و خروج از هسته، ادغام (integration) و سازماندهی پروموتور متفاوت از ویروس‌های پریمات‌ها است. به همین دلیل این وکتورها می‌توانند به عنوان حامل‌های لنتی ویروسی دارای ایمنی بالاتر، برای انتقال ژن به انواع سلول‌های انسانی مورد استفاده قرار گیرند. ویروس FIV که از طریق قرار گرفتن در معرض مخاط منتقل می‌شود دارای ساختار کلی مشابه با ویروس‌های HIV می‌باشد، ولی تفاوت‌هایی از جمله تفاوت در اندازه ژنوم (۹۴۰۰ نوکلئوتید در ژنوم FIV)، نوع گیرنده موجود در سطح سلول هدف (CXCR4) گیرنده ورود FIV به سلول هدف گیرنده) و در بعضی از پروتئین‌های کمکی به چشم می‌خورد (۹، ۱۰ و ۱۱). یکی از ژن‌های کاندید جهت درمان بسیاری از بیماری‌های نورولوژیک، ژن نوروتروفین‌ها است که با بکارگیری از وکتورهای لنتی ویروسی به سلول‌های بنیادی قابل انتقال می‌باشد. نوروتروفین‌ها خانواده‌ای از فاکتورهای رشد می‌باشند که در تنظیم رشد، تعیین سرنوشت سلول، تمایز، عملکرد، و بقای سلول‌های عصبی نقش‌های مهمی دارند. ساهلاست که بر نقش نوروتروفین‌ها در تمایز و بقای سلول‌های عصبی تاکید می‌شود. نوروتروفین‌ها پروتئین‌های آندوژن حل شونده‌ای هستند (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۱۷) که باعث تنظیم بقا رشد، تغییرات مورفولوژیک و همچنین سنتز پروتئین‌های دخیل در تمایز نورون‌ها می‌گردند. از میان سلول‌های بنیادی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با قابلیت تبدیل به انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های عصبی و عدم

تک کلنی های حاوی پلاسمید مقاوم به آمپی سیلین over night (۳۷ درجه سانتی گراد) داده شد.

استخراج پلاسمیدها به مقدار زیاد (Maxi prep): ابتدا یک تک کلنی از پلیت کشت داده شده از پلاسمیدهای نوترکیب در محیط کشت مایع استریل حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد و سپس به روش ارائه شده در بروشور شرکت (Qiagen) و از فیلتر مخصوص کیت برای جدا سازی DNA استفاده شد. بعد از عبور محلول از فیلتر بافر شستشو از ستون فیلتردار عبور داده شد. پس از خشک شدن، رسوب DNA های نوترکیب با آب مقطر شستشو داده شد. پلاسمیدهای استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش ذخیره شدند.

انتقال وکتورهای لنتی ویروسی به رده سلولی HEK 293T (Transfection): سلول های HEK-293T به دلیل توانایی بالا در تکثیر و پروتئین سازی به عنوان سلول بسته بندی کننده وکتورهای لنتی ویروسی به صورت گسترده‌ای برای تولید انواع ویروس‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. برای تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب فعال، سلول های مولد ویروس همزمان با سه ناقل لنتی ویروس شامل package envelope با روش رسوب DNA-کلسیم ترانسفکت شدند. تولید لنتی ویروس با کمک وکتورهای pMD2G ، pPSPAX2 و وکتور ترانسفر (ژن مورد نظر ما توسط شرکت GeneCoepia کلون و خریداری شد). این وکتورهای لنتی ویروسی از نسل دوم بوده که ذیلا راجع به خصوصیات آن‌ها اشاره شده است. مخلوط DNA ویروسی شامل ۱۰/۲ میکروگرم از وکتور pMD2G (بیان کننده پوشش گلیکوپروتئینی ویروس تورم تاولی دهان)، ۱۰/۲ میکروگرم از وکتور pSPAX2 (بیان کننده پروتئین های gag, rev, tat و ۱۳/۲ میکروگرم از وکتور pEZLV 156 و یا pEZLV2 (شاتل های لنتی ویروسی حامل NGF و GFP خریداری شده از شرکت GeneCoepia) بود. پلاسمیدهای ترانسفر برای NGF based- (Lv156) HIV based- و برای NGF based- (Lv23) (شرکت GeneCoepia) بودند. جهت Transfection از یک سو به ناقلین لنتی ویروسی و از سوی دیگر به سلول های مولد ویروس نیاز بود. تولید لنتی ویروسی با انتقال ژن به داخل سلول مولد ویروس صورت پذیرفت که اصطلاحا ترانسفکشن خوانده می‌شود. برای این کار ۲۴ ساعت قبل سلول ها به تعداد تقریبی ۲/۵ تا ۳ میلیون برای هر پلیت ۱۰ سانتی در محیط

تحریک سیستم ایمنی گزینه ای جذاب به حساب می آید. بررسی بیان نوروتروفین NGF در این سلول ها حاکی از آن است که آنها بطور ذاتی این نوروتروفین را بیان می کنند (۱۸). لذا در این مطالعه جهت افزایش بیان ژن NGF در سلول های بنیادی مزانشیمی از وکتورهای ویروسی FIV و HIV حامل NGF استفاده گردید و میزان توانایی این وکتورها در انتقال و بیان ژن NGF به این سلول ها مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

تکثیر وکتورهای لنتی ویروسی: در این تحقیق از باکتری E.coli سویه Top 10 استفاده شد و طبق دستورالعمل زیر باکتری ها برای پذیرش پلاسمید مستعد شدند و سپس پلاسمیدها به آن ها انتقال داده شد.

تهیه سلول مستعد با استفاده از کلرید کلسیم (CaCl₂): برای تهیه سلول های باکتریایی مستعد از محلول ۱۰۰ میلی مولار CaCl₂ و آنتی بیوتیک های آمپی سیلین با غلظت های نهایی (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در محیط کشت، مورد استفاده قرار گرفت. پس از تهیه پلیت آگار حاوی آمپی سیلین، از استوک باکتری E.coli سویه Top10 بر روی پلیت کشت داده و سپس یک تک کلون از پلیت باکتری Top10 را تحت شرایط استریل برداشته و در محیط کشت مایع کشت داده شد تا جذب نوری آن در طول موج ۵۰۰ نانومتر به ۴۵۰ برسد. سپس محیط کشت داده شده حاوی گونه باکتری Top10 را سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه 5000 rpm) و پس از تخلیه محلول رویی به رسوب حاصل از سانتریفیوژ ۱۰۰ میلی مولار CaCl₂ اضافه شد. پس از انکوبه شدن (۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد)، سانتریفیوژ، مراحل بالا تکرار و در ویال های استریل به دمای ۷۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شدند.

ترانسفورماسیون: برای ازدیاد پلاسمید هریک از پلاسمیدها به باکتری اشرشیاکلی Top10 وارد شدند. برای ترانسفورماسیون پلاسمیدها، ابتدا به ۵۰۰ میکرو لیتر از باکتری مستعد شده /اشرشیاکلی Top10، یک نوع پلاسمید (۵ میکرو لیتر) اضافه شد و پس از مخلوط شدن آرام ۳۰ دقیقه ای در دمای اتاق (۹۰ ثانیه در بن ماری ۴۲ درجه سانتی گراد) قرار گرفتند. پس از افزودن LB مایع به هریک از لوله ها (۱ ساعت، ۱۰۰۰ rpm، ۳۷ درجه سانتی گراد) هریک از سوسپانسیون های سلولی، روی پلیت LB- آگار دارای آمپی سیلین کشت شد و به این ترتیب اجازه رشد به

DMEM + ۱۰ درصد سرم کشت داده شدند. سپس سه پلاسمید لنتی ویروسی شامل ناقل وکتور transfer (۱۱/۵ میکروگرم) در دو وکتور HIV based و FIV based، ناقل بسته بندی ویروس (Packaging Vector) (۷ میکروگرم) و ناقل مربوط به غشاء ویروسی (۴/۵ میکروگرم)، بودند استفاده شدند. پلاسمید لنتی ویروسی وکتور GFP نیز به عنوان کنترل مورد آزمون قرار گرفت. ترانسفکشن به روش رسوب DNA - کلسیم فسفات انجام شد. مخلوط DNA - کلرید کلسیم قطره قطره به سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۶ تا ۸ ساعت انکوبه گردید تا DNA وارد سلول‌ها گردد. برای ممانعت از آسیب فسفات کلسیم به سلول‌ها، محیط سلول‌ها تعویض و یک‌بار با PBS شستشو شده و با افزودن محیط جدید به آن‌ها (۲۴ تا ۴۸ ساعت و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) کشت داده شدند. در این فاصله زمانی ذرات ویرونی پس از تشکیل در درون سلول‌ها به فضای خارج سیتوپلاسمی رها شدند.

تغلیظ ویروسی و آلوده سازی سلول‌های هدف (Infection):

محیط‌های ویروسی جمع آوری شده در مرحله تولید ترانسفکشن با رعایت تمام شرایط ایمنی و استریل به ستون‌های تغلیظ پروتئین (Amicon) منتقل (۱۵ تا ۲۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵۰۰ rpm) سانتریفوژ گردیدند. در موارد کافی نبودن مقدار محیط حاوی ویروس نو ترکیب این مرحله برای ۱۰ تا ۱۵ دقیقه دیگر تکرار شد. محیط حاوی ویروس پس از گذشت ۲۴ ساعت از تعویض محیط ترانسفکشن، جمع آوری و پس از سانتریفوژ به محیط سلول‌های هدف افزوده گردید. سلول‌های هدف شامل HEK 293T و یا سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موشی BMSC بودند. سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موشی پس از استخراج از استخوان فمور رت در پتری‌دیش کشت داده شدند. برای آزمون آلودگی (infection) به وسیله ویروس، رقت‌های سریالی از هر یک از ویروس‌های نو ترکیب به سلول‌های هدف کشت شده در پلیت ۲۴ خانه اضافه شد. مشاهده GFP پس از ۴۸ ساعت، بیانگر آلوده شدن به ویروس بود. حداکثر بیان GFP در این مطالعه پس از ۱۴۴ ساعت بود.

روش وسترن بلات: استخراج پروتئین: پس از اتمام زمان آلودگی، محیط سلول‌ها خارج و فلاسک ۲ بار با PBS سرد شست‌وشو داده شد. سپس به هر فلاسک T25، تریپسین اضافه و فلاسک برای ۵ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. بعد از اطمینان

از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک، PBS دارای ۱۰ درصد FBS به سلول‌ها اضافه شد و سوسپانسیون سلولی منتقل گردید. پس از (۵ دقیقه، rpm ۱۵۰۰) محلول رویی دور ریخته و رسوب سلولی در PBS تعلیق و به یک ویال انتقال یافت. پس از سانتریفوژ (۵ دقیقه، rpm ۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰۰ rpm) محلول رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی یا برای نگه‌داری طولانی مدت در -۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و یا مستقیماً برای استخراج پروتئین، مورد استفاده قرار گرفت. به رسوب سلولی حاوی ۵۰۰ تا ۸۰۰ هزار سلول، بافر لیز کامل اضافه گردید. سپس به کمک یک سرنگ انسولین، رسوب سلولی حدود ۱۰ بار پیپتاژ شد تا هیچ توده‌ی سلولی باقی نماند و ویال‌ها (۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه روی شیکر) و سپس (۲۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد و rpm ۱۲۰۰۰) انجام شد. محلول رویی شامل پروتئین به یک ویال جدید منتقل شد تا غلظت آن اندازه‌گیری گردد.

پس از الکتروفورز پروتئین‌ها، آن‌ها بر روی PVDF ترانسفر و مراحل ایمونوبلاتینگ انجام شد:

۱- قرار دادن بلات در محلول بلوک کننده (۴ درجه سانتی‌گراد، overnight، شیکر) موجب می‌شود تا پروتئین‌های موجود در شیر خشک مانع از اتصال آنتی بادی‌ها به نواحی فاقد پروتئین گردد.

۲- آبکشی سریع توسط TBST و اضافه نمودن آنتی بادی اولیه شامل:

آنتی بادی β -Actin (Sigma): رقیق شده با نسبت ۱:۲۵۰۰۰ در TBST، ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

آنتی بادی NGF (Millipore): رقیق شده با نسبت ۱:۲۵۰۰ در TBST، ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

۳- جمع آوری آنتی بادی اولیه و ۳ شست‌وشوی ۱۰ دقیقه‌ای با TBST در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

۴- اضافه نمودن Anti-rabbit IgG HRP-Conjugated (SantaCruz): رقیق شده با نسبت ۱:۱۰۰۰۰ در TBST، ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و روی شیکر (برعلیه آنتی بادی NGF) و یا آنتی بادی ثانویه موشی Anti-mouse IgG HRP-Conjugated (SantaCruz): رقیق شده با نسبت ۱:۱۰۰۰۰ در TBST، ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و روی شیکر (برعلیه آنتی بادی β -Actin)

خوانده شد. غلظت RNA استخراج شده به کمک فرمول زیر محاسبه گشت.

$$\text{غلظت RNA (}\mu\text{g/ml)} = \text{عکس رقت} \times 40 \times \text{OD}_{260}$$

سنتز cDNA: پیش از سنتز cDNA، جهت حذف آلودگی احتمالی به RNA.DNA با DNase I (Roche (10_{U/μl}) با DNase I انکوبه شد. به این ترتیب که ۲ میکروگرم از RNA با ۱ میکرولیتر از DNase I مخلوط و حجم نهایی با آب-DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط ابتدا (۱۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد) و سپس (۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد) قرار گرفت تا پس از حذف DNA، آنزیم DNase I نیز غیرفعال گردد. در این مرحله ۱ میکرولیتر از Rando Hexamer (40_{U/μl}) به مخلوط اضافه گشت و ویال (۵ دقیقه، ۶۵ درجه سانتی گراد) تا loop احتمالی موجود در mRNA وجود دارد، از بین رفته و هگزامر به خوبی به آن متصل گردند. سپس ویال به سرعت روی یخ قرار داده شد و سایر مواد به آن اضافه گردیدند:

۴μl 5X Buffer

۲μl dNTPs Mix (10mM)

۱μl RNase Inhibitor (40_{U/μl})

۱M-MuLV Reverse Transcriptase (20_{U/μl}) μl

۲۰μl Total

ویال‌ها درون دستگاه Thermal Cycler قرار داده شدند و ابتدا (۱۰ دقیقه، ۲۵ درجه سانتی گراد) سپس (۱ ساعت، ۴۲ درجه سانتی گراد) و در نهایت (۵ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد) انکوبه شدند. پس از اتمام مراحل، cDNA سنتز شده برای نگهداری طولانی مدت در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

RT-PCR ژنهای β-ACTIN و NGF

توالی پرایمرهای β-ACTIN (طول قطعه= ۱۰۲ bp)

F: 5' AAGCCAACCGTGAAAAGAT 3'

R: 5' ACCAGAGGCATACAGGGACA 3'

توالی پرایمرهای NGF (طول قطعه= ۱۱۷ bp)

F: 5' AAT TAG GCT CCC TGG AGG TG 3'

R: 5' TGA GCT TGG GTC CAG CAT 3'

۵- جمع آوری آنتی بادی ثانویه و ۳ شست‌وشوی ۱۰ دقیقه‌ای با TBST در دمای آزمایشگاه و روی شیکر

۶- اضافه کردن ECL (شرکت زیست فناوران نجم) بر روی بلات به حدی که سطح را بپوشاند. پس از ۵ دقیقه بلات درون یک نایلون و سپس در کاست عکاسی قرار گرفت. در اتاق تاریک فیلم X-ray، بسته به شدت نور، برای مدت زمان ۱ ثانیه تا چند دقیقه روی بلات قرار گرفت. سپس فیلم درون داروی ظهور انداخته شد. پس از شست‌وشو با آب مقطر، فیلم را در داروی ثبوت قرار داده و پس از آن با آب شسته شد.

استخراج RNA: سلول‌ها پس از رسیدن به ۸۰ درصد فراوانی سلولی (پس از ۲ هفته) با PBS شست‌شو و سپس تریپسینه گردیدند و تریپسین با محیط کشت حاوی سرم خنثی شد. سوسپانسیون سلولی سانتریفیوژ (۵'، ۴°C، ۱۵۰۰ rpm) شد. رسوب سلولی در PBS سوسپانس و دوباره سانتریفیوژ (۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد و ۱۵۰۰ rpm) گردید. رسوب سلولی برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت. رسوب سلولی به همان روش که در بخش قبل تشریح شد، آماده گردید. از محلول easy[®] BLUON (INtron، ناموهر) به این رسوب اضافه گردید. سپس به کمک سرنگ انسولین و سرسنگ‌های ۲۱^G، رسوب سلولی حدود ۷ تا ۸ بار پیپتاژ شد تا سلول‌های لیز شده RNA سلولی خارج شود. پس از گذشت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، کلروفرم به محلول اضافه شد (۳۰ ثانیه تکان شدید در جهت بالا و پایین) و پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد و ۱۲۰۰ rpm) شد که منجر به تشکیل سه فاز تشکیل گردید. فاز آبی رنگ حاوی پروتئین و ضایعات سلولی در پایین، فاز کدر شیری رنگ شامل DNA در وسط و فاز بی‌رنگ رویی حاوی RNA تمام سلول‌ها است. فاز رویی به یک ویال جدید منتقل و ایزوپروپانول به آن اضافه شد. ویال چند بار به آرامی واژگون گشت. ایزوپروپانول، RNA را رسوب می‌دهد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، سانتریفیوژ (۱۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد و ۱۲۰۰ rpm) انجام شد. ایزوپروپانول دور ریخته شد و اتانول ۷۵٪ به رسوب RNA اضافه و دوباره سانتریفیوژ (۷ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد و ۷۵۰۰ rpm) گردید. اتانول خارج و رسوب RNA در ویال با در باز قرار گرفت تا اتانول آن به طور کامل ولی نه در حد خیلی خشک تبخیر گردد. پس از آن رسوب در آب-DEPC حل شد. سپس ۱ میکرولیتر از آن برداشته و با رقت ۱:۱۰۰ جذب آن در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر

جهت انجام PCR:

۱ μl Template (cDNA)

۲ μl PCR buffer (10X)

۱/۶ μl dNTPs (10mM)

۱ μl MgCl₂ (50mM)

۲ μl Primers (5μM)

۱۲ μl ddH₂O

۰/۴ μl Taq DNA Polymerase

۲۰ μl Total

طبق جدول زیر برنامه به دستگاه داده شد.

ایمونوسیتوشیمی پروتئین NGF برای اثبات تولید پروتئین NGF تست ICC انجام شد. ابتدا $10^4 \times 5$ سلول BMSCs آلوده شده با لنتی‌ویروس نو ترکیب دارای NGF و به

همان میزان سلول BMSC آلوده نشده به عنوان کنترل در چاهک‌های جداگانه در پلیت ۲۴ خانه کشت شدند (البته در چاهک‌ها لامل قرار داده شده بود و سلول‌ها روی لامل در پلیت ۲۴ خانه کشت شدند). پس از دو روز، محیط کشت لامل‌های حاوی سلول خارج و با PBS شستشو گردیدند. پس از آن، سلول‌ها با پارافرمالدهید سرد فیکس و با PBS شستشو شدند. در مرحله بعد، محلول بلاکینگ حاوی ۱ درصد BSA (۲۰ دقیقه) اضافه و بعد از شستشوی مجدد با PBST ۱ درصد (PBS دارای ۱ درصد Tween 20)، در آنتی بادی اولیه علیه NGF (۶۰ دقیقه) انکوبه گردید. پس از شستشو، سلول‌ها با آنتی بادی ثانویه (۴۵ دقیقه) انکوبه شدند. بعد از خارج کردن آنتی بادی ثانویه و شستشوی سلول‌ها، DAPI برای رنگ کردن هسته سلول‌ها استفاده شد. با استفاده از گلیسرول ۹۰ درصد Cover slip های حاوی سلول بر گلیسرول ۹۰ درصد بر روی لام قرار گرفته و با میکروسکوپ مشاهده شدند.

قسمت	دما	زمان	تعداد سیکل
Initial Denaturation	۹۴°C	۵'	۱
Denaturation	۹۴°C	۳۰"	۳۵ (ژن β-ACTIN)
Annealing	۵۶°C (β-ACTIN) ۶۰°C (NGF)	۳۰"	
Extension	۷۲°C	۳۰"	۴۵ (ژن NGF)
Final Extension	۷۲°C	۵'	۱

آنالیز آماری

باند‌های RT-PCR و Western blotting توسط نرم افزار Labimage اسکن و دانسیته باندهای NGF نسبت به باند بتا اکتین نیمه کمی گردیدند و با آزمون Student t-Test مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

لنتی ویروس‌های FIV و HIV حاوی GFP قادر به ترانسفکت کردن سلول‌های HEK-293T می‌باشند.

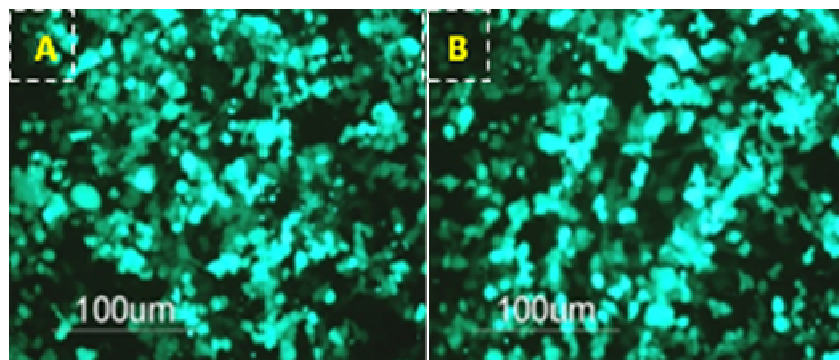
سلول‌های HEK-293T بعد از ترانسفکشن با هر دو نوع وکتور حاوی GFP درصد بالایی از بیان GFP را نشان دادند و تفاوت محسوسی مشاهده نگردید (شکل ۱).

لنتی ویروس‌های FIV و HIV حاوی NGF هر دو قادر به آلوده سازی سلول‌های HEK-293T می‌باشند.

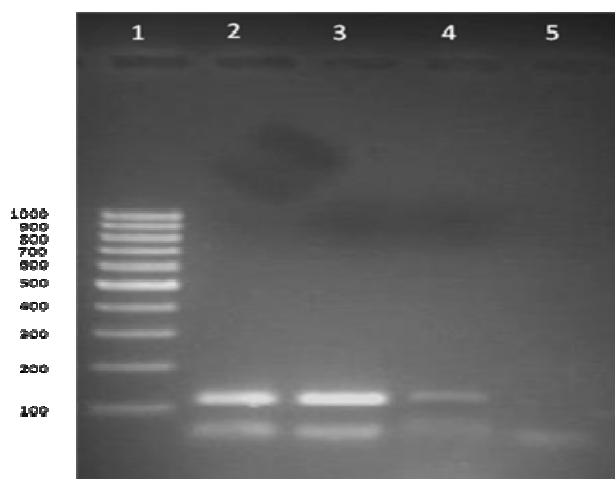
بطور طبیعی ژن NGF در سلول‌های HEK-293T بیان می‌شود که پس از آلوده سازی HEK-293T با ویروس FIV-NGF، این افزایش بیان مشاهده شد. نتایج آزمون بیان NGF^{mRNA} توسط RT-PCR در سلول‌های HEK-293T آلوده شده با ویروس FIV-NGF نسبت به سلول‌های آلوده نشده نشان داد که این میزان ۲ برابر شده است (شکل ۲). البته همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، این بیان هنوز کمتر از سلول‌های BMSC دست نخورده است که بطور طبیعی NGF را به میزان بالاتری از سلول‌های HEK-293T آلوده شده توسط ویروس FIV-NGF (۱/۷) برابر بیان می‌کنند. نتایج بدست آمده از تکنیک وسترن بلات (شکل ۳) نیز نشان داد که بیان نسبی

سلول‌های آلوده نشده، نسبت بیان NGF به بتا اکتین به میزان ۰/۷ برابر کمتر است.

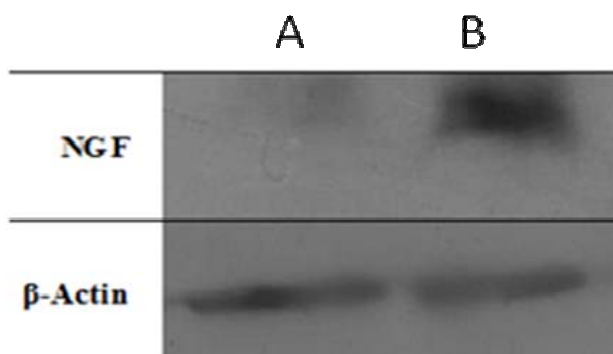
پروتئین NGF (۱۳ کیلو دالتون) به پروتئین بتا اکتین (۹۸ کیلو دالتون) در سلول‌های HEK-293T آلوده شده توسط ویروس FIV-NGF ۱/۹ برابر افزایش داشته است، در حالی که در



شکل ۱: مقایسه بیان GFP در سلول‌های آلوده شده HEK-293T توسط سازه های (A) FIV-GFP و (B) HIV-GFP. بررسی بیان GFP در سلول‌های HEK-293T بعد از ترانسفکشن با هر دو نوع وکتور حاوی GFP (FIV based-GFP و HIV based GFP) درصد بالایی از بیان GFP را نشان دادند و تفاوت محسوسی میان دو وکتور مشاهده نگردید.



شکل ۲: مقایسه بیان ژن NGF در سلول‌های HEK-293T آلوده شده توسط ویروس FIV-NGF و سلول‌های BMSC آلوده نشده. ۱- DNA marker 100 bp - ۲- سلول‌های HEK-293T آلوده شده به ویروس FIV-NGF - ۳- سلول BMSC دست نخورده - ۴- سلول HEK-293T آلوده نشده - ۵- کنترل منفی (واکنش بدون cDNA). لنتی ویروس FIV قادر آلوده سازی سلول‌های HEK-293T میباشد.



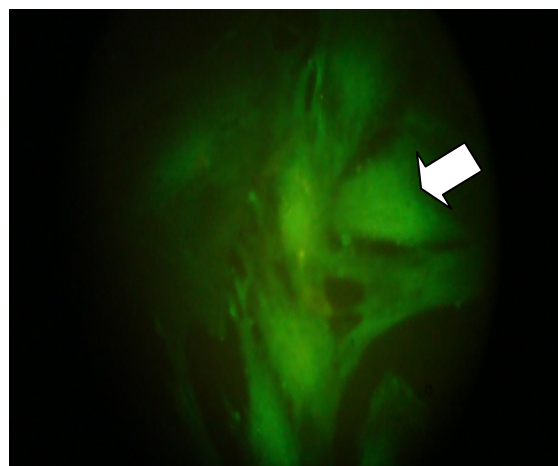
شکل ۳: وسترن بلاتینگ بیان پروتئین NGF در سلول‌های HEK-293T (A) آلوده نشده و (B) آلوده شده به ویروس FIV-NGF در این سلول‌ها. بیان NGF ۱۳ کیلودالتونی می باشد. بیان NGF در سلول‌های HEK-293T آلوده شده توسط ویروس FIV-NGF نسبت به ژن بتا اکتین حدود ۲ برابر بیشتر و در سلول‌های آلوده نشده ۰/۷ برابر کمتر می باشد.

بحث

لنتی‌ویروس‌ها گزینه‌ای مناسب جهت انتقال ژن به سلول‌های بنیادی به حساب می‌آیند. روش‌های لنتی‌ویروسی بر روش‌های غیر ویروسی و بر روش‌های متکی بر سایر ویروس‌ها نظیر رتروویروس‌ها ارجح است. علل استفاده از لنتی‌ویروس‌های نو ترکیب ۱- تولید این ویروس‌ها در تیترا بالا در عرض ۴۸ ساعت ۲- کارایی و تولید بالا ۳- عدم نیاز به عوامل ترنسفکت شده گران در سلول‌های مولد ویروس ۴- سهولت آلوده سازی سلول‌های تقسیم ناپذیر می‌باشند. لذا استفاده از لنتی‌ویروس‌ها علاوه بر بکارگیری سازه‌های تولید شده به منظور آلوده سازی سلول‌های بنیادی، مزایای دیگری نیز دارا هستند که از آن‌ها می‌توان ۱- افزایش مقاومت نسبت به خاموشی ژنی (Gene Silencing) ۲- مسئله امنیت و سلامت استفاده از لنتی‌ویروس در مقایسه با سایر ویروس‌ها و وجود امکانات تشخیصی حساس به HIV در صورت تولید لنتی‌ویروس‌های بیماریزا را نام برد (۱۹). وکتورهای لنتی FIV-based به دلیل ایمن بودن برای انسان از لحاظ انتقال ژن در مقایسه با لنتی ویروس‌های HIV-based مورد توجه خاصی قرار گرفته‌اند. Poeschla و همکاران (۸)، وکتورهای FIV را با عملکردی مناسب در مغز، چشم، گوش، ریه، کبد، ماهیچه، پانکراس و سیستم هماتوپویتیک معرفی کردند، اگر چه تا کنون مطالعات اندکی در مورد میزان موفقیت و کارایی وکتورهای FIV جهت انتقال ژن به سلول‌های بنیادی صورت گرفته است (۸). یافته‌های زیادی دال بر ژن درمانی با فاکتورهای رشد عصبی یا نوروتروفین‌ها در جهت تعدیل و یا پیشگیری از بیماری‌های نورولوژیک است. Bonner و همکاران با استفاده از لنتی‌ویروس حاوی ژن نوروتروفین BDNF در سلول‌های پیش ساز نورونی در موش‌های مدل جراحت نخاعی باعث رشد اعصاب قطع شده به سمت بافتهای هدف شدند (۲۰). Park و همکاران با استفاده از لنتی‌ویروس حاوی ژن‌های نوروتروفین VEGF, IGF-I, BDNF, NT3, GDNF در موش‌های مدل ALS باعث بهبود عملکرد آن‌ها شدند (۲۱). Zhang و همکاران (۲۲) با استفاده از لنتی‌ویروس حاوی ژن‌های نوروتروفین NT3 در موش‌های مدل ایسکمی باعث بهبود عملکرد آن‌ها شدند (۲۳). سلول‌های بنیادی غیرخونی در مغز استخوان از گزینه‌های سلول درمانی در بیماری‌های نورولوژیک محسوب می‌شوند. این سلول‌ها دارای قابلیت تبدیل شدن به سلول‌های پیش ساز عصبی هستند و به‌علاوه بطور ذاتی دارای توانایی تولید فاکتورهای رشد عصبی

فقط لنتی ویروس HIV و نه FIV قادر به آلوده سازی سلول‌های BMSC می‌باشد.

آلوده سازی سلول‌های BMSC توسط سوپرناتانت بدست آمده از سلول‌های HEK-293T و سپس تیمار سلول‌های آلوده شده توسط آنتی بیوتیک G418، هیچ گونه مقاومتی نسبت به این آنتی بیوتیک در این سلول‌ها ایجاد نکرد. همچنین اگر چه در سلول‌های BMSC آلوده شده با HIV-GFP پس از گذشت ۴۸ ساعت بیان پروتئین GFP مشاهده گردید و بیان آن با استفاده از ایمونوسیتوشیمی تایید شد (شکل ۴)، اما بیان مارکر (GFP) در سلول‌های BMSC آلوده شده با ژن FIV-GFP حتی با گذشت ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از آلوده سازی هم دیده نشد. به‌علاوه به دلیل آنکه این سلول‌ها ژن مقاومت به G418 را دریافت نکرده بودند، پس از ۴ روز تیمار با G418 مرگ سلولی رخ داد. با تغییر زمان تیمار با G418 به مدت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز تغییری در نتایج ایجاد نشد. همچنین با تغییر میزان دفعات آلودگی (۲ الی ۳ بار در روزهای متوالی) تغییری در نتایج ایجاد نشد و کماکان مرگ سلولی رخ داد. به‌علاوه در یک‌سری از آزمایشات دیگر (نشان داده نشده است) ترنسفکشن مستقیم وکتور FIV-GFP بدون مداخله سلول‌های HEK-293T با استفاده از الکتروپوریشن (electroporation) سلول‌های هدف (BMSC) صورت گرفت، باز هم بیان قابل ملاحظه‌ای از GFP در BMSC دیده نشد. با تغییر در تعداد سلول‌های BMSC، به نسبت محیط ویروسی نیز تفاوتی در نتیجه اینفکشن ژن FIV-NGF مشاهده نگردید و سه روز پس از تیمار با G418 سلول زنده‌ای مشاهده نشد.



شکل ۴: بیان ژن HIV-NGF در سلول‌های BMSC. سیتوپلاسم سلول‌های BMSC آلوده شده با ویروس نو ترکیب HIV-NGF (فلش) دارای ژن NGF بوده و با آنتی بادی NGF قابل شناسایی هستند.

دارای توانایی آلودگی سلول‌های ۲۹۳T بودند، عدم توانایی FIV-NGF در آلوده سازی سلول‌های بنیادی مغز استخوان مشاهده شد که دلیل آن برای ما مشخص نیست و نیاز به بررسی‌های بیشتر ملکولی و ساختاری در وکتور FIV-NGF را دارد. در مجموع پیشنهاد می‌شود تا در استفاده از وکتور FIV جهت ژن درمانی سلول‌های بنیادی پستانداران با تامل بیشتری گام برداشته شود.

نتیجه گیری

علی‌رغم آنکه در وکتورهای ویروسی با پایه FIV تغییراتی جهت پایدار سازی، تسهیل ورود ویروس و الحاق ژنی گزارش شده است، ولی در این مطالعه این امر اثبات نشد. سلول‌های مغز استخوان موش دریافت کننده وکتور FIV الحاق شده با ژن NGF قادر به زنده ماندن در محیط حاوی آنتی بیوتیک ایجاد کننده مقاومت در وکتور نبودند. در مجموع بر اساس یافته‌های این تحقیق، استفاده از وکتورهای با پایه FIV جهت الحاق ژنی در سلول‌های پستانداران پیشنهاد نمی‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله با حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به انجام رسیده است. در ضمن از سرکار خانم فاطمه وحید دستجردی و آقای مصطفی جمشیدی بابت خرید و در اختیار قرار دادن وکتورهای کلون شده HIV-NGF و FIV-NGF صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Kootstra NA, Verma IM. Gene therapy with viral vectors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003; 43: 413-439.
2. Quinonez R, Sutton RE. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol*. 2002; 21(12): 937-951.
3. Saenz DT, Teo W, Olsen JC, Poeschla EM. Restriction of feline immunodeficiency virus by Ref1, Lv1, and primate TRIM5alpha proteins. *J Virol* 2005; 79(24): 15175-15188.
4. Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, et al. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 1997; 17(3): 314-317.
5. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272(5259): 263-267.

نوروتروفین‌ها هستند. از آن‌جا که میزان نوروتروفین‌های پایه این سلول‌ها اندک است، بایستی اقدام به افزایش بیان نوروتروفین‌ها در آن‌ها با استفاده از ژن درمانی کرد. لذا در این تحقیق سلول‌های بنیادی مغز استخوان دست ورزی شده با بکار گیری سیستم‌های لنتی‌ویروسی ژن نوروتروفین NGF به منظور استفاده از آن در مدل حیوانی بیماری مالتیپل اسکلروزیس مورد هدف قرار گرفتند. الحاق ژنی با بکارگیری سیستم‌های لنتی‌ویروسی صورت پذیرفت و تفاوت‌های کارآمدی دو وکتور ویروسی HIV based، FIV based که هر دو حامل ژن NGF بودند مقایسه گردید. وکتورهای FIV-based بدلیل ایمن بودن برای انسان از لحاظ انتقال ژن در مقایسه با لنتی ویروس‌های- HIV based مورد توجه خاصی قرار گرفته اند. وکتور FIV با وجود مزایایی در مقابل HIV از جمله عدم القا پاسخ ایمنی در انسان و کارآمدی بالای انتقال ژن و آلوده سازی سلول‌های تقسیم ناپذیر پس از ایجاد تغییرات در پروموتور و ژنوم آن، هنوز کاملاً مورد ارزیابی کامل واقع نشده است. در مطالعه حاضر، بررسی آلوده سازی سلول‌های بنیادی مغز استخوان با وکتورهای لنتی ویروسی FIV و HIV و آنالیز بیان ژن NGF صورت گرفت. نتایج بخش سلولی و آنالیز ایمونوراکتیویته NGF پس از استفاده از وکتور HIV-NGF در مقایسه با NGF-FIV، تجمع سیتوپلاسمی پروتئین NGF در سلول‌های مغز استخوان را پس از استفاده از وکتور HIV-NGF و نه NGF-FIV نشان می‌دهد. همچنین آزمایشات RT-PCR نیز بیان NGF mRNA در این سلول‌ها را پس از HIV-NGF و نه FIV-NGF تأیید کرد. به منظور تأیید هر چه بیشتر این نتایج، آلودگی با استفاده از سلول‌های ۲۹۳T نیز انجام شد. بر خلاف انتظار ما، بررسی سطح ترشحاتی میزان NGF در سلول‌های ۲۹۳T ترنسفکت شده با لنتی ویروس HIV based-NGF نسبت به سلول‌های ۲۹۳T ترنسفکت شده با لنتی ویروس FIV based-NGF نشان داد که در این فاز هر دو وکتور قادر به آلوده سازی سلول‌های ۲۹۳T هستند. این افزایش در میزان بیان پروتئین NGF تا حدی بالا بود که قابل سنجش و نمایش با تکنیک‌های وسترن بلاتینگ بود. این درحالی است که به ندرت می‌توان رفتارسی در مورد القای بیان این ژن و سنجش میزان بیان پروتئین NGF یافت. در مطالعات مختلف به بررسی بیان پروتئین گیرنده TrkA توسط وسترن بلات بسنده شده است و نتایج حاصل از بیان پروتئین NGF ارائه نشده است (۲۳). در هر صورت علی‌رغم آن‌که وکتورهای ویروسی FIV-NGF و HIV-NGF هر دو

6. Poeschla EM. Non-primate lentiviral vectors. *Curr Opin Mol Ther.* 2003; 5 (5): 529-540.
7. Poeschla EM. Primate and feline lentiviruses in current intrinsic immunity research: the cat is back. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011; 143(3-4): 215-220.
8. Poeschla EM, Wong-Staal F, Looney DJ. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat Med.* 1998; 4(3):354-357.
9. Elder JH, Sundstrom M, de Rozieres S, de Parseval A, et al. Molecular mechanisms of FIV infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008; 123 (1-2): 3-13.
10. Johnston JC, Gasmi M, Lim LE, Elder JH, et al. Minimum requirements for efficient transduction of dividing and nondividing cells by feline immunodeficiency virus vectors. *J Virol.* 1999; 73 (6): 4991-5000.
11. Poeschla EM, Looney DJ. CXCR4 is required by a nonprimate lentivirus: heterologous expression of feline immunodeficiency virus in human, rodent, and feline cells. *J Virol.* 1998; 72(8): 6858-6866.
12. Frielingsdorf H, Simpson DR, Thal LJ, Pizzo DP. Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus. *Neurobiol Dis.* 2007; 26(1): 47-55.
13. Heese K, Low JW, Inoue N. Nerve growth factor, neural stem cells and Alzheimer's disease. *Neurosignals.* 2006; 15(1): 1-12.
14. Hu Z, Ulfendahl M, Olivius NP. NGF stimulates extensive neurite outgrowth from implanted dorsal root ganglion neurons following transplantation into the adult rat inner ear. *Neurobiol Dis.* 2005; 18 (1): 184-192.
15. Lindsay RM. Role of neurotrophins and trk receptors in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996; 351(1338): 365-373.
16. Memberg SP, Hall AK. Proliferation, differentiation, and survival of rat sensory neuron precursors in vitro require specific trophic factors. *Mol Cell Neurosci.* 1995; 6(4): 323-335.
17. Davies AM. The role of neurotrophins in the developing nervous system. *J Neurobiol.* 1994; 25 (11): 1334-1348.
18. Jiang J, Lv Z, Gu Y, Li J, et al. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. *Neurosci Res.* 2010; 66(1): 46-52.
19. Federico M. Ed. Lentivirus gene engineering protocols. Humana Press. 2003.
20. Bonner JF, Blesch A, Neuhuber B, Fischer I. Promoting directional axon growth from neural progenitors grafted into the injured spinal cord. *J Neurosci Res.* 2009; 88(6): 1182-1192.
21. Park S, Kim HT, Yun S, Kim IS, et al. Growth factor-expressing human neural progenitor cell grafts protect motor neurons but do not ameliorate motor performance and survival in ALS mice. *Exp Mol Med.* 2009; 41(7): 487-500.
22. Zhang ZH, Wang RZ, Li GL, Wei JJ, et al. Transplantation of neural stem cells modified by human neurotrophin-3 promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 2008; 444(3): 227-230.
23. Triaca V, Tirassa P. Circulating NGF antibody alters the distribution of NG2 and CD56 positive cells in the brain of an animal model of inflammatory disorder. *Arch Ital Biol.* 2003; 141(2-3): 127-139.