

انتقال سازه ژنی حاوی بتاگلوبین و miniLCR به رده‌های سلولی COS-7 و K562 توسط لنتی‌ویروس نو ترکیب: مقدمه‌ای برای ژن‌درمانی بیماران بتا-تالاسمی ماژور

مریم بی‌خوف‌تربتی^۱، حسین خان‌احمد^۲، فاطمه جمشیدی^۳، مرتضی کریمی‌پور^۴،

مجید صادقی‌زاده^۵، محمدعلی شکرگذار^۶، امیر امان‌زاده^۷، سیروس زینلی^{۸*}

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه ب‌ب‌ژ، انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران
- ۳- کارشناس ارشد، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۴- استادیار، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۵- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۶- دانشیار، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۷- دکتری دامپزشکی، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۸- دانشیار، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۱۱

دریافت مقاله: ۸۶/۷/۹

چکیده

هدف: بیماری بتا-تالاسمی در اثر غیاب یا کاهش سنتز زنجیره بتاگلوبین به وجود می‌آید. یکی از روش‌های درمانی مؤثر برای این بیماری ژن‌درمانی توسط ناقل‌های ویروسی است. ظرفیت ناقل‌های لنتی‌ویروسی حدود ۸ کیلوباز است. با توجه به ظرفیت محدود ناقل‌های لنتی‌ویروسی از miniLCR طراحی شده به طول ۶ کیلوباز به جای ناحیه تنظیمی LCR در کنار ژن بتاگلوبین استفاده شد. هدف از این مطالعه ساخت لنتی‌ویروس‌های نو ترکیب حاوی ژن بتاگلوبین و miniLCR برای انتقال سازه ژنی مورد نظر به سلول‌های هدف به منظور ژن‌درمانی بتا-تالاسمی ماژور است.

مواد و روش‌ها: هر یک از قطعات HS2، HS3، HS4 (miniLCR) و ژن بتاگلوبین به همراه نواحی 5' UTR و 3' از DNA ژنومی افراد سالم با روش PCR تکثیر شد. هر یک از آن‌ها پس از کلونینگ در ناقل pTZ57R/T و ساب‌کلونینگ در ناقل pBGGT در نهایت در یک ناقل لنتی‌ویروسی به نام pLenti-Dest ساب‌کلون شد. طی ترانسفکشن همزمان ناقل نهایی به همراه سه ناقل کمکی (Plp1، Plp2، Plp/VSVG) با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به درون رده سلولی 293T، لنتی‌ویروس‌های نو ترکیب حاوی سازه ژنی مورد نظر تولید و با RT-PCR تأیید شدند. **نتایج:** تیتراژ لنتی‌ویروس‌های نو ترکیب در رده‌های سلولی COS-7 و K562 یکسان بود. MOI بهینه این ویروس‌ها برای سلول COS-7، ۵ به دست آمد. ترانسداکشن سلول‌های هدف در حضور پلی‌برن ۲ برابر شد. سلول‌های COS-7 ترانسدیوس شده پس از دو هفته انتخاب آنتی‌بیوتیکی باقی ماندند. DNA این کلونی‌های باقی‌مانده استخراج و با روش PCR وارد شدن سازه ژنی ساخته شده تأیید شد. **نتیجه‌گیری:** لنتی‌ویروس‌ها می‌توانند وسیله‌ای مناسب برای انتقال سازه ژنی فوق به سلول‌های هدف در حال تقسیم و آن‌هایی که تقسیم نمی‌شود مانند سلول‌های بنیادی با هدف ژن‌درمانی بیماری‌های خونی مانند بتا-تالاسمی باشند. کارایی استفاده از

* نشانی مکاتبه: تهران، خیابان کارگر جنوبی، خیابان ۱۲ فروردین، انستیتو پاستور ایران، بخش پزشکی مولکولی، صندوق پستی: ۱۶۶۷-۱۳۱۸۵
Email: sirouszeinali@yahoo.com

لنتی ویروس‌ها بیشتر از روش هدف‌گیری ژنی در ژن‌درمانی بتا-تالاسمی است. انتظار می‌رود با استفاده از واحدهای HS2 و HS3 و HS4 در mini LCR به جای LCR در کنار ژن بتاگلوبین و نیز انتخاب قطعه HS3 با طول بزرگتر میزان بیان بتاگلوبین را افزایش دهد.

کلیدواژگان: بتا-تالاسمی، ژن بتاگلوبین، miniLCR، لنتی ویروس، ژن‌درمانی.

۱- مقدمه

بیماری بتا-تالاسمی (β -thalassemia) یکی از شایع‌ترین اختلالات ژنتیکی در دنیا است. بتا-تالاسمی به‌طور شایع در مناطق مدیترانه‌ای، آسیای جنوب شرقی، شبه قاره هند و خاور میانه دیده می‌شود [۱]. در آسیا بالغ بر یکصد و هفده میلیون نفر حامل ژن بتا-تالاسمی بوده و سالانه بیش از یکصد و پنج هزار نوزاد مبتلا به بتا-تالاسمی ماژور (β -thalassemia Major) در این منطقه متولد می‌شوند. با توجه به آمارهای رسمی موجود در ایران حدود ۱۵-۲۰ هزار بیمار مبتلا به بتا-تالاسمی ماژور وجود دارد (انجمن تالاسمی ایران؛ تماس شخصی). این بیماری یک بیماری تک‌ژنی با وراثت اتوزومال مغلوب است. بیماری بر اثر کاهش (β +) یا فقدان (β^0) تولید زنجیره بتاگلوبین (β -globin) به‌وجود می‌آید. این امر سبب اختلال در تعادل بین سنتز زنجیره آلفا و بتا می‌شود. بیماری بتا-تالاسمی ناشی از تأثیر جهش‌های مختلف مؤثر در عملکرد ژن بتاگلوبین است [۱]. تاکنون حدود ۲۰۰ جهش در ژن بتاگلوبین شناسایی شده است [۲].

پیوند مغز استخوان قطعی‌ترین روش درمانی برای این بیماران است. اما این روش به دلیل در دسترس نبودن اهداکنندگان مناسب و داشتن عوارضی مانند واکنش‌های ایمنولوژیک میزبان بر علیه سلول‌های پیوند شده در عمل با مشکلات زیادی مواجه است [۳].

از آن جا که این بیماری یک اختلال ژنتیکی است، اصلاح نقص ژنتیکی سلول‌های بنیادی خون‌ساز در این بیماران با روش ژن‌درمانی و پیوند آن‌ها به بیمار روش ایده‌آل برای درمان این بیماری است [۱].

در انسان گلوبین‌های بتا (β)، دلتا (δ)، گاما آلانین و گاما گلابسین (γ , $A\gamma$) و اپسیلون (ϵ) جزء خانواده ژن‌های خوشه‌ژنی گلوبین هستند و در ناحیه‌ای به طول تقریباً ۶۰

کیلوباز در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ قرار دارند. توالی ژنی خانواده بتاگلوبین تنها حدود ۷ کیلوباز از ۶۰ کیلوباز موجود در ناحیه ژنی β را شامل شده و ۵۳ کیلوباز باقیمانده نواحی تنظیمی اختصاصی از قبیل ناحیه کنترل لوکوس (Locus Control Region: LCR) و توالی‌های افزایش‌دهنده بیان (Enhancer) است. منطقه LCR به وسعت ۱۵ کیلوباز دارای یک سری نواحی بسیار حساس (Hypersensitive: HS) به آنزیم DNaseI به نام HS بوده و شامل HS1، HS2، HS3، HS4 و HS5 هستند. LCR در فاصله ۶-۲۰ کیلوبازی از انتهای ۵ ژن اپسیلون یا حدود ۵۰-۶۰ کیلوباز بالا دست ژن بتاگلوبین قرار گرفته است. LCR باز شدن کروماتین را کنترل کرده و باعث بیان ژن بتاگلوبین به میزان بالا و مستقل از اثر مکانی (Positional effect) می‌شود [۴].

روش‌های متعددی برای انتقال ژن سالم به سلول‌های هدف وجود دارد که شامل استفاده از حامل‌های ویروسی، روش انتقال شیمیایی و روش‌های انتقال فیزیکی است. در انتقال ویروسی که شایع‌ترین و مؤثرترین روش انتقال است از ویروس‌های مختلف نظیر رتروویروس‌ها (Retroviruses)، آدنوویروس‌ها (Adenoviruses)، لنتی ویروس‌ها (Lentiviruses)، هرپس ویروس‌ها (Herpesviruses) و AAVها (Adeno-Associated Viruses) استفاده می‌شود [۳]. امروزه تحقیقات نشان داده است که می‌توان از ناقل‌های لنتی ویروسی برای ژن‌درمانی بتا-تالاسمی با توجه به مزیت آن‌ها استفاده کرد. این مزایا عبارتند از ارابه مؤثر ژن‌ها به هر دو نوع سلول هدف در حال تقسیم و آن‌هایی که تقسیم نمی‌شود، عدم ایجاد پاسخ ایمنی ناخواسته و میزان بالای بیان ژن [۵، ۶].

تاکنون ۳ نسل از ناقل‌های لنتی ویروسی معرفی شده است، به‌طوری‌که نسل سوم آن‌ها ایمنی زیستی بالاتری با توجه به خطر بیماریزایی بودن این ویروس‌ها دارند. در این تحقیق نیز از

بیشتری برخوردارند [۱۰]. حداقل توالی مناطق HS را بخش هسته (Core) می‌نامند. این نواحی به همراه توالی‌های جانبی آن واحد HS (HS unit) نامیده می‌شود. استفاده از واحد این توالی‌ها به جای بخش هسته آن‌ها باعث افزایش بیان بتاگلوبین می‌شود [۱۱].

در این مطالعه یک سازه ژنی متشکل از ژن بتاگلوبین و miniLCR با اندازه ۶ کیلوباز طراحی و ساخته شد و سپس این سازه ژنی توسط ناقل لنتی ویروسی به رده‌های سلولی Cos-7 و k562 با هدف وارد شدن پایدار در ژنوم میزبان و بیان ژن بتاگلوبین در راستای ژن‌درمانی بتا-تالاسمی منتقل شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- پلاسمیدها و مواد واکنش

همه پلاسمیدها با روش ترانسفورماسیون (Transformation) در باکتری اشرشیاکلی گونه 'Top10F' و براساس دستورالعمل استاندارد مربوط تکثیر شدند [۱۲]. برای رشد باکتری‌ها از محیط LB-broth (Luria Bertani-broth) (Merck, آلمان) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین استفاده شد. کلیه دستکاری‌های مولکولی از قبیل تخلیص پلاسمید و DNA، T/A کلونینگ و واکنش‌های آنزیمی بر اساس دستورالعمل شرکت‌های سازنده کیت انجام شد. DNA ژنومی انسان از خون محیطی فرد سالم با استفاده از کیت مربوط (Roche, آلمان) استخراج شد. همه آنزیم‌های آندونوکلاز با اثر محدود و DNA لیگاز و آغازگرهای (Primers) استفاده شده در این مطالعه از شرکت Cinnagen (ایران) تهیه شده است.

جدول ۱ توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر قطعات سازه همراه با جایگاه برش آنزیم آندونوکلاز و طول قطعات محصولات PCR آن‌ها

آغازگر	توالی آغازگر	جایگاه آنزیم محدودکننده	طول قطعات حاصل از PCR
HS4-F	5'GCTAGC GTGTGTGGAGACAAATGCAG 3'	NheI	۴۳۰ جفت باز HS4=
HS4-R	5'ACGCGT TGGCAGTCTCCTGTTATTTC 3'	MluI	
HS3-F	5'ACGCGT TGTCTAGCAAAAAGCAAGGCG 3'	MluI	۲۰۰۰ جفت باز HS3=
HS3-R	5'AGATCT GCCCTGCTTAGGAGCTTAATC 3'	BglII	
HS2-F	5'AGATCT AAGGTGCCTTCTCATCTGGGTAC 3'	BglII	۱۴۵۰ جفت باز HS2=
HS2-R	5'ACCGGT CGTATGTGAGCATGTGTCCTCTAAC 3'	AgeI	
HBB-F	5'ACCGGT AATACACTTGCAAAGGAGGATG3'	AgeI	۲۱۰۰ جفت باز *HBB=
HBB-R	5'CTCGAG AACCTCCAAATCAAGCCTCTAC 3'	XhoI	

*HBB: (Hemoglobin, beta)

ناقل‌های لنتی ویروسی نسل سوم استفاده شده که دارای ۴ ناقل مجزا بدون وجود توالی‌های همسان در آن‌ها است در این صورت امکان نوترکیبی بین این ناقل‌ها و کنار هم قرار گرفتن ژن‌های ویروسی وجود ندارد. این سیستم شامل یک ناقل انتقال دهنده pLenti-Dest و ۳ ناقل کمکی به نام‌های plp1، plp2 و pVSVG (شرکت Invitrogen) است. همچنین در توالی 3'LTR (Long Terminal Repeats) قسمتی از u3 حذف شده ($\Delta u3$) و ژن‌های ویروسی به ۳ ژن gag، pol و rev کاهش یافته است. به جای پروتئین Env ویروس نقص سیستم ایمنی انسان نوع ۱ (Human Immunodeficiency virus Tupe-1: HIV-1) از پروتئین VSV-G که متعلق به ویروس وزیکولار استوماتیتیس (vesicular stomatitis) است، استفاده می‌شود که گرایش (Tropism) بافتی وسیعی دارد. از طرفی هیچ‌یک از پلاسمیدهای کمکی دارای توالی‌های بسته‌بندی ویروس و LTR نیستند [۸،۷]. ظرفیت انتقال ژن توسط ناقل‌های لنتی ویروسی محدود و حدود ۸ کیلوباز است [۹]. از طرفی بیان ژن بتاگلوبین تحت کنترل پروموتور طبیعی خود و منطقه تنظیمی LCR با اندازه ۱۵ کیلوباز است که بیشتر از ظرفیت این ناقل‌ها است. برای حل این مشکل در مطالعات اخیر به جای LCR از miniLCR برای بیان بتاگلوبین استفاده شده است. miniLCR ترکیبی از مناطق مهم HSها از جمله HS2، HS3 و HS4 است. توالی HS2 مهم‌ترین بخش LCR است و نقش افزایش‌دهنده بیان را بر عهده دارد. پس از آن به ترتیب نواحی HS3 و HS4 از اهمیت

۲-۲- آغازگرها و PCR

آغازگرهای مورد نیاز با قرار دادن جایگاه برش آنزیمی مناسب در انتهای ۵' طراحی و سفارش ساخت آن‌ها داده شد (جدول ۱). چهار قطعه تشکیل دهنده سازه با استفاده از کیت High Fidelity Expand DNA Polymerase (Roche, آلمان) تکثیر شدند. برنامه PCR آن‌ها به صورت زیر انجام شد: واسرشتگی (Denaturation) اولیه به مدت ۲ دقیقه و واسرشتگی ثانویه به مدت ۲۰ ثانیه هر یک در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دمای اتصال (Annealing) ۳۰ آغازگر برای تمام قطعات ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای طویل شدن (Extension) برای آنزیم طویل سازی (Expand) ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود که براساس طول قطعات به ازای هر ۱ کیلوباز یک دقیقه محاسبه شد. چرخه فوق ۱۰ بار تکرار و ۲۰ چرخه بعدی نیز با مشخصات ۱۰ چرخه اول انجام شد. با این تفاوت که در هر چرخه زمان طویل شدن ۲۰ ثانیه افزایش یافت. در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد برای طویل شدن نهایی گذاشته شد و در انتها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شد.

محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) رنگ آمیزی شده و با استفاده از اشعه ماورا بنفش مشاهده شد. باندهای مورد نظر از روی ژل بریده و با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (Qiagen, آلمان) تخلیص شد. چهار قطعه تکثیر شده به‌طور جداگانه در ناقل کلونینگ pTZ57T/A (Fermentas, لیتوانی) کلون شد و پلاسمیدهای pT-HS4, pT-HS3, pT-HS2 و pT-HBG حاصل شد. قطعات ژنی با هضم آنزیمی با آنزیم‌های مربوط از پلاسمیدهای فوق خارج و ابتدا در پلاسمید حدواسط pBGGT (ثبت شده در بانک ژن تحت شناسه DQ384617) و سپس در ناقل pLenti4-GW/H1/TO-LaminshRNA یا pLenti-Dest ساب‌کلون شد. پلاسمید نهایی pLentiBGDEST نامیده شد (شکل ۱). برای تأیید صحت پلاسمید نهایی PCR و واکنش هضم آنزیمی برای تمام

قطعات روی این پلاسمید گذاشته شد. برای تعیین توالی سازه ژنی در دو جهت، آغازگر طراحی و همراه نمونه پلاسمید برای تعیین توالی ارسال شد. (Gen Fanavaran, ایران) PLentiBGDEST برای استفاده در مراحل بعدی با کیت تخلیص پلاسمید Midi-prep (Invitrogen, آمریکا) استخراج شد.

۲-۳- تولید لنتی ویروس نو ترکیب در سلول‌های

293T

سلول‌های 293T در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۲ میلی‌مولار گلوتامین و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (همه از Gibco, آمریکا) و در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دی‌اکسید کربن و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. در روز ترانسفکشن (Transfection) تعداد 6×10^6 سلول 293T در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت Opti-MEM (Invitrogen, آمریکا) حاوی سرم به یک ظرف ۱۰ سانتی‌متری که حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت Opti-MEM بدون آنتی‌بیوتیک و ۳ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی کمپلکس‌های DNA-LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, آمریکا) بدون سرم بود، براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت اضافه شد. سلول‌های ترانسفکت شده (Transfected cells) یک شبانه‌روز در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دی‌اکسید کربن و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. روز بعد محیط کشت با محیط کشت DMEM کامل حاوی ۲ میلی‌مولار گلوتامین و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و ۰/۱ میلی‌مولار MEM Sodium Pyrovalate تعویض شد. سوپ حاوی ویروس ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن جمع‌آوری و پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه برای مطالعات بعدی استفاده شد.

۲-۴- بررسی تولید لنتی ویروس با روش RT-PCR

به منظور تأیید تولید لنتی ویروس‌های نو ترکیب، RNA

سپس هر ۳ روز یکبار تعویض محیط با محیط کشت تازه حاوی ژئوسین انجام گرفت. ۱۲ روز پس از انتخاب آنتی‌بیوتیکی کلونی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در هر خانه پس از رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله (Crystal violet) شمارش و تیترو ویروس تعیین شد. مراحل مشابهی برای تعیین تیترو ویروس در رده سلولی K562 نیز انجام شد.

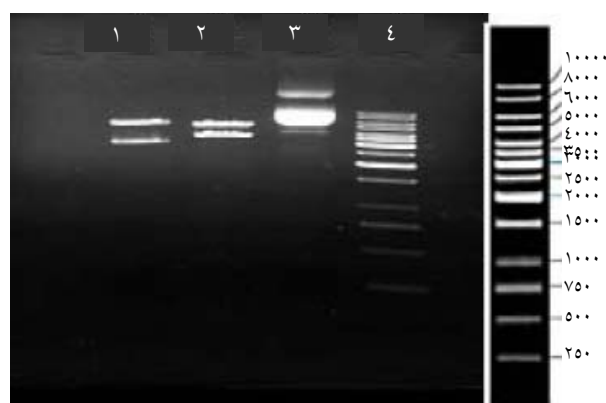
۲-۶- کشت سلولی و ترانسداکشن

سلول‌های COS-7 (بانک سلولی ایران، C143) در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومايسين، ۲ میلی‌مولار گلوتامین و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (همه از Gibco، آمریکا) و در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دی‌اکسید کربن و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. روز قبل از ترانسداکشن تعداد 2×10^6 سلول COS-7 در ظرف‌های کشت سلول ۱۰۰ میلی‌متری کشت داده شده تا تراکم سلول در سطح به ۳۰ تا ۵۰ درصد برسد. روز بعد محیط کشت با ۱۰ میلی‌لیتر محیط تازه DMEM حاوی 10^6 TU/ml ویروس (number of transducing units per milliliter: TU/ml) و ۶/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر پلی‌برن (Invitrogen، آمریکا) تعویض شد. بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت تعویض شد و ۴۸ ساعت بعد از ترانسداکشن آنتی‌بیوتیک ژئوسین با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر یک از خانه‌ها اضافه شد. سپس هر ۳ روز یکبار تعویض محیط با محیط کشت تازه حاوی ژئوسین انجام گرفت. پس از ۲ هفته انتخاب آنتی‌بیوتیکی کلونی‌های مقاوم به ژئوسین به ظرف‌های ۶۰ میلی‌متری جدید منتقل شد و پس از یک هفته سلول‌های تکثیر شده به مدت ۳-۵ دقیقه تحت اثر تریپسین (Trypsin) با غلظت ۰/۲۵ درصد قرار گرفت و به محض جدا شدن از ظرف‌ها با سرعت ۱۵۰۰ دور و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. DNA این سلول‌ها برای بررسی‌های بعدی با PCR توسط کیت DNP (Cinnagen، ایران) استخراج شد.

ویروس تولید شده در سوپ ویروسی با استفاده از تریزول (Trizol) تخلیص و ۱ میکروگرم از آن با آنزیم نسخه‌برداری معکوس (M-MLV reverse transcriptase) M-MLV به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و در حضور آغازگر الیگومر تیمیدین (oligo-dt) و مهارکننده RNase و در نهایت ۱۰ دقیقه ماندن در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد رونویسی معکوس شد. واکنش PCR به تعداد ۳۵ چرخه در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۲ میکرولیتر cDNA، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومولار از هر یک از dNTPها، ۲۰ پیکومول از هر آغازگر و ۰/۴ واحد آنزیم (ABI, USA) AmpliTaq Gold DNA polymerase براساس دستورالعمل استاندارد انجام شد.

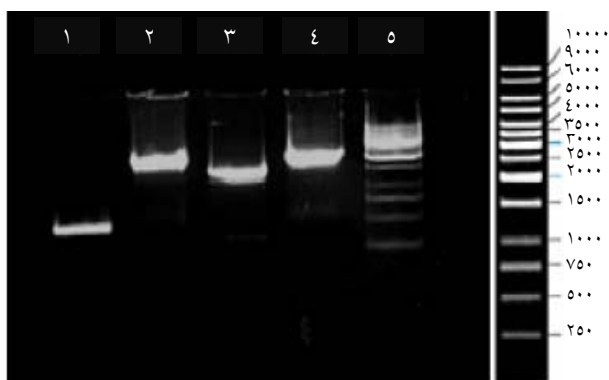
۲-۵- تعیین تیترو ویروسی‌های نو ترکیب

تیترو ویروس‌های تولید شده در سلول COS-7 که یک رده سلولی کلیه میمون است و نیز در سلول اریتروییدی انسانی K562 اندازه‌گیری شد. روز قبل از ترانسداکشن (Transduction) 2×10^6 سلول COS-7 برای هر ویال از ظرف‌های ۶ خانه شمارش و در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دی‌اکسید کربن و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. به طوری که در روز ترانسداکشن به تراکم سطحی ۳۰-۵۰ درصد رسیده باشد. در روز ترانسداکشن رقت‌های ۱۰ برابری از ۲-۱۰ تا ۶-۱۰ از سوپ ویروسی در حجم ۱ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۶/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر پلی‌برن (polybrene) (Invitrogen، آمریکا) تهیه و با استفاده از آن، محیط هر خانه از ظرف ۶ خانه‌ای تعویض شد. یک خانه نیز به عنوان کنترل منفی اختصاص یافت. روز بعد تعویض محیط با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومايسين، ۲ میلی‌مولار گلوتامین و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (همه از Gibco، آمریکا) انجام شد. ۴۸ ساعت بعد از ترانسداکشن آنتی‌بیوتیک ژئوسین (Zeocin) با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر یک از خانه‌ها اضافه شد.



شکل ۱ هضم pFBG با آنزیم‌های محدود کننده: ۱- هضم با XhoI و MluI (۵۵۵۰+۳۱۵۰ جفت باز)، ۲- هضم با BglIII و XhoI (۵۱۳۰+۳۵۵۰ جفت باز)، ۳- پلاسمید هضم نشده pFBG، ۴- نشانگر (Marker) (۱ کیلوبازی).

نتایج تعیین توالی، فقدان هرگونه جهش بیماری‌زا در ژن بتاگلوبین و دیگر قطعات pLentiBGDEST را تأیید کرد. مقدار مؤثر ژنوسین روی رده‌های سلولی COS-7 و K562 در این مطالعه مشخص شد.



شکل ۲ حاصل PCR چهار قطعه سازه روی پلاسمید نهایی (pLentiBGDEST). ۱- HS4 (۰/۴۳ کیلوبازی)، ۲- HS3 (۲ کیلوبازی)، ۳- HS2 (۱/۴۵ کیلوبازی)، ۴- HBB (۲/۱ کیلوبازی)، ۵- نشانگر (۱ کیلوبازی).

۲-۳- نتایج تعیین تیتراژ لنتی ویروس‌های

نو ترکیب

تیتراژ ویروس‌های تولید شده قبل از استفاده آن‌ها در ترانسداکشن رده‌های سلولی مورد نظر در همان سلول‌ها تعیین شد. نتایج تیتراژ ویروس در سلول‌های COS-7 و K562، 10^6 TU/ml بود (شکل ۳).

۲-۷- واکنش PCR روی DNA سلول‌های

انتخاب شده

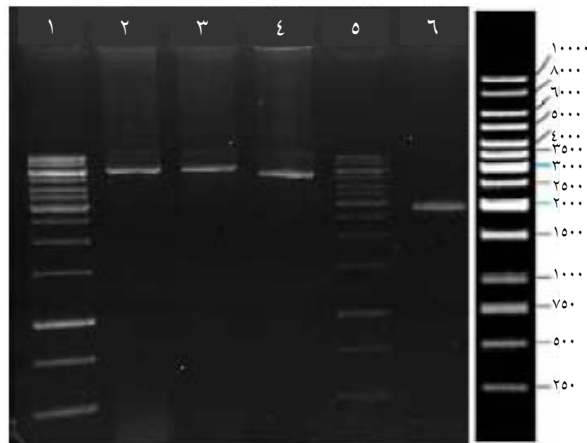
PCR برای تکثیر کل سازه ژنی بتاگلوبین وارد شده در ژنوم سلول‌های COS-7 با استفاده از آغازگرهای جلویی HS4-F (HS4-Forward) و برگشتی (HS4-Reverse) (HBB-R (جدول ۱)، تکثیر قطعه‌ای که متشکل از قطعات HBB+HS2+HS3 با استفاده از آغازگرهای جلویی HS3-F و برگشتی (جدول ۱) و نیز قطعه‌ای متشکل از ۸۰۰ باز بالادست قطعه HS4 روی ژن مقاومت به ژنوسین و قبل از 3'LTR به علاوه خود HS4 و بخشی از HS3، با استفاده از کیت Long Expand DNA Polymerase (Roshe، آلمان) انجام شد. محصولات PCR فوق در دو جهت تعیین توالی شدند.

۳- نتایج

۱-۳- نتایج PCR و کلونینگ

چهار قطعه DNA به روش PCR تکثیر شد. نواحی حساس به آنزیم DNAase I شامل بخش‌هایی از HS2، HS3، HS4 از ژن LCR و نیز ژن بتاگلوبین همراه با ناحی 3'-UTR (Untranslated Region) از DNA ژنومی انسان سالم به ترتیب تکثیر شدند. محصولات PCR در ناقل pTZ 57T/A کلون و با هضم آنزیمی، PCR تعیین توالی صحت قطعات کلون شده تأیید شدند. تمام این قطعات در کنار هم در ناقل حدواسط pBGGT ساب‌کلون و یک کاست ژنی با طول ۶ کیلوباز به نام miniLCRHBG در pBGGT ایجاد شد. پلاسمید حاصل pFBG نامیده شد که با PCR و هضم آنزیمی تأیید شد (شکل ۱). سپس کاست miniLCRHBG در ناقل pLenti4-Dest ساب‌کلون و پلاسمید نهایی pLentiBGDEST نامیده شد. صحت و درستی تمام مراحل کلونینگ و ساب‌کلونینگ با PCR و آنالیز آنزیمی تأیید شد. در آخر نیز pLentiBGDEST با PCR (شکل ۲) تأیید و در دو جهت تعیین توالی شد.

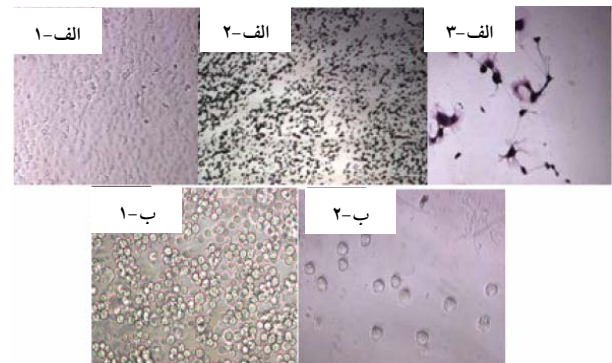
MOI بهینه که در آن تقریباً تمام سلول‌ها ترانسدیوس شدند، MOI=۵ بود. این کلونی‌ها به محیط کشت جدید منتقل شد. DNA آن‌ها استخراج و با PCR آنالیز شد (شکل ۵). تکثیر بخشی از سازه ژنی ساخته شده با PCR از روی DNA سلول‌های ترانسدیوس شده باقی مانده پس از دو هفته درمان آنتی‌بیوتیکی و تعیین توالی محصول PCR، تأیید کننده ورود سازه ژنی فوق در ژنوم سلول میزبان بود.



شکل ۵ حاصل PCR سازه ژنی وارد شده درون ژنوم سلول‌های باقیمانده پس از انتخاب آنتی‌بیوتیکی. ۱- نشانگر (۱ کیلوبازی)، ۲- کنترل مثبت کل سازه ساخته شده (۶ کیلوباز)، ۳- کل سازه ژنی ساخته شده حاوی HBB+HS2+HS3+HS4 (۶ کیلوباز)، ۴- سازه ژنی ساخته شده حاوی HBB+HS2+HS3 (۵/۵۵ کیلوباز)، ۵- نشانگر (۱ کیلوباز)، ۶- باند متشکل از قطعات ژنوسین+EM7+Psv40+HS4 و بخشی از HS3 (۲/۸ کیلوباز)

۴- بحث

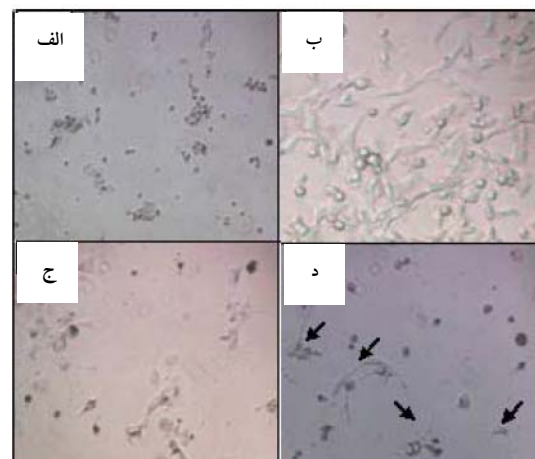
استراتژی‌های زیادی برای ژن‌درمانی بتا-تالاسمی وجود دارد. برخی از استراتژی‌های متداول مورد استفاده در این زمینه شامل استفاده از ناقل‌های ویروسی [۱۴،۱۳]، ناقل‌های هدف‌گیری ژن [۱۵-۱۷]، نوترکیبی همسان قطعات کوچک [۱۸]، الیگونوکلوئوتیدهای تشکیل دهنده سه تایی [۱۹]، آنتی‌سنس snRNA (Small nuclear RNA) [۲۰]، RNAi (RNA interference) و ریبوزوم (Ribozyme) [۲۱] است. هدف از این مطالعه ساختن یک سازه جدید حاوی ژن بتاگلوبین و miniLCR برای انتقال به وسیله لنتی‌ویروس‌های نوترکیب به رده‌های سلولی پستانداران است. در بین روش‌های ژن‌درمانی مذکور عمده‌ترین آن‌ها شامل هدف‌گیری ژنی و استفاده از لنتی‌ویروس‌ها است. نتایج این تحقیق نشان داد که ناقل‌های لنتی‌ویروسی از لحاظ کارایی ناقلی مناسب برای ترانسدیوس کردن



شکل ۳ نتایج تعیین تیترو ویروس پس از ۲ هفته انتخاب آنتی‌بیوتیکی در گستره رقتی 10^{-2} تا 10^{-6} از ویروس تولید شده روی رده‌های سلولی (الف) COS-7، (ب) K562. (الف-۱) قبل از انتخاب آنتی‌بیوتیکی، (الف-۲) پس از دو هفته انتخاب آنتی‌بیوتیکی و رنگ‌آمیزی کلونی‌های زنده توسط کریستال و بوله در رقت 10^{-2} ویروس و (الف-۳) در رقت 10^{-6} ویروس.

۳-۳- نتایج ترانسداکشن سلول‌های COS-7 با لنتی‌ویروس‌های تولید شده

سلول‌های COS-7 توسط لنتی‌ویروس نوترکیب با تیترو TU/ml 10^6 در MOI (multiples of infection) های ۱، ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ در حضور پلی برن ترانسدیوس (Transduce) شدند. پس از ۱۲ روز انتخاب آنتی‌بیوتیکی هیچ سلول زنده‌ای در ظرف‌های منفی دیده نشد و این در حالی بود که تعدادی کلونی مقاوم به آنتی‌بیوتیک در ظرف‌های تیمار شده با لنتی‌ویروس مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴ ترانسداکشن سلول‌های COS-7 با لنتی‌ویروس‌های نوترکیب. (الف) سلول‌های ترانسدیوس نشده (کنترل) که پس از تیمار با ژنوسین همه مردند، (ب) سلول‌های ترانسدیوس شده و تیمار شده با ژنوسین پس از یک روز، (ج) پس از یک هفته، (د) تعداد کمی از کلونی‌ها پس از دو هفته تیمار با ژنوسین زنده ماندند.

با افزایش MOI تعداد کلونی‌های زنده بیشتر شد. به طوری که

استفاده از یک روش با کارایی بالا در ارایه ژن به این سلول‌ها مانند ناقل‌های لنتی ویروسی (فراوانی 2×10^{-1}) در مقایسه با روش هدف‌گیری ژنی (فراوانی 2×10^{-6}) مؤثرتر بوده و نیاز به تعداد زیاد سلول را در فرایند ژن‌درمانی مرتفع می‌سازد.

در ناقل انتقال‌دهنده pLenti-Dest که حاوی ژن بتا گلوبین و بخش تنظیمی miniLCR (pLentiBGDEST) است، بیان بتا گلوبین تحت کنترل پروموتور طبیعی خودش است. این ناقل لنتی ویروسی دارای توالی‌های LTR^{5'} و LTR^{3'} است و قادر است به کمک آنزیم اینتگراز (Integrase) به صورت اتفاقی در ژنوم میزبان وارد شود. آنزیم اینتگراز توسط ژن pol در ناقل plp1 بیان می‌شود. سایر عناصر ناقل pLenti-Dest عبارتند از پروموتور PRSV، علامت بسته‌بندی ویروسی Ψ ، توالی متصل شونده به پروتئین Rev یا RRE (Rev responsive element) پروموتور یوکاریوتی PSV40 برای بیان نشانگر مقاومت به آنتی بیوتیک ژئوسین.

با توجه به ظرفیت محدود ناقل‌های لنتی ویروسی از miniLCR به جای LCR با اندازه‌ای بزرگتر حدود ۴ کیلوباز نسبت به سازه‌هایی که سایر محققین در گذشته بررسی کرده‌اند در کنار ژن بتا گلوبین استفاده کردیم. مطالعات اخیر نشان دادند استفاده از واحدهای HS2، HS3 و HS4 در miniLCR با طول ۳/۵۵ کیلوباز میزان بیان بتا گلوبین را تا ۲۳/۵ برابر افزایش می‌دهد [۱۰]. در حالی که miniLCR ای متشکل از همین قطعات و با طول ۳ کیلوباز بیان بتا گلوبین را تنها ۱۵ درصد افزایش می‌دهد [۲۷]. از آنجا که وجود یا عدم وجود HS4 نقش زیادی در افزایش بیان بتا گلوبین ندارد، طول قطعه HS4 را کوچکتر از سازه‌های ژنی ساخته شده قبلی و حدود ۰/۴۳ کیلو باز انتخاب کردیم و در عوض طول قطعه HS3 بزرگتر و حدود ۲ کیلوباز انتخاب شد. برخی گزارش‌ها بیانگر آن است که توالی‌های مجاور HS3 و خصوصاً نواحی تنظیمی در کنار بخش هسته HS3 قادر است میزان بیان را تا ۷۰ درصد افزایش دهد [۲۷]. بنابراین با ساخت miniLCR ای با ویژگی‌های مذکور انتظار می‌رود میزان بیان بتا گلوبین پس از ترانسداکشن آن به سلول‌های هدف تا حد قابل قبولی برخلاف مطالعات قبلی افزایش یابد. لنتی ویروس‌های نو ترکیب حامل سازه ژنی بتا گلوبین ساخته شده، ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن همزمان

سلول‌های پستانداران است و در مطالعات آینده می‌توان از آن‌ها برای ارایه ژن بتا گلوبین و miniLCR به سلول‌های بنیادی خونساز مغز استخوان استفاده نمود. نتایج به دست آمده بیانگر آن است که به‌طور متوسط از هر ۱۰۰ سلول مواجه شده با ویروس در $MOI=1$ حدود ۲۰ سلول پس از دو هفته درمان آنتی بیوتیکی در ظرف باقی می‌ماند که تقریباً معادل درصد ترانسداکشن و ورود سازه ژنی در ژنوم میزبان است. بنابراین با این روش فراوانی ورود سازه ژنی در ژنوم میزبان حدود (2×10^{-1}) است. در صورتی که این فراوانی برای روش هدف‌گیری ژنی بین $(1 \times 10^{-5}$ تا $1 \times 10^{-7})$ است [۱۶]. به عنوان مثال در تحقیق انجام شده توسط دکتر خان‌احمد (Khanahmad) و همکاران در سال ۲۰۰۶ میزان هدف‌گیری ژنی سازه ژنی بتا گلوبین 2×10^{-6} بود [۳]. مقایسه فراوانی ترانسداکشن به دست آمده در این تحقیق با فراوانی هدف‌گیری ژنی در تحقیقات قبلی روی سلول COS-7 بیانگر کارایی بالای استفاده از ناقل‌های لنتی ویروسی برای ارایه ژن به سلول هدف است.

ناقل‌های لنتی ویروسی بر پایه HIV-1 هستند و برای اولین بار با نقص در سیستم همانندسازی ویروس توسط پیج (Page) و لاندو (Landau) و همکارانشان طراحی شدند [۲۳، ۲۲]. ناقل‌های لنتی ویروسی قادرند هر دو نوع سلول هدف در حال تقسیم و آن‌هایی که تقسیم نمی‌شود را آلوده کنند زیرا این ویروس‌ها با تشکیل کمپلکس پری اینتگریشن (Preintegration) از غشای هسته عبور می‌کنند. از طرفی کارآمدی این ویروس‌ها سبب انتقال مؤثرتر ژن مورد نظر و در نتیجه بیان بالای آن خواهد شد. همچنین عدم ایجاد پاسخ ایمنی ناخواسته در استفاده از این ویروس‌ها، آن‌ها را جذاب‌ترین سیستم انتقال در ژن‌درمانی بتا-تالاسمی کرده است [۲۵، ۲۴]. امروزه از لنتی ویروس‌ها در ژن‌درمانی بسیاری از بیماری‌ها مانند بیماری‌های متابولیکی، بیماری‌های ویروسی، سیستیک فیبروز (Cystic fibrosis)، دیستروفی عضلانی (Muscular dystrophy)، هموفیلی (Haemophilia)، رتینوید پیگمنتوزا (Retinitis pigmentosa) و آلزایمر (Alzheimer) استفاده می‌شود. همچنین لنتی ویروس‌ها برای انتقال ژن به سلول‌های بنیادی با هدف ژن‌درمانی بیماری‌های خونی مانند بتا-تالاسمی نیز مناسب است [۲۶-۵، ۲۴]. با توجه به دسترسی محدود به سلول‌های بنیادی خون‌ساز بیماران،

است و میزان ترانسداکشن سلول‌های هدف را می‌توان با افزایش تیترو ویروس و نیز استفاده از ترکیبات پلی‌کاتیونی نظیر پلی‌برن افزایش داد. همچنین در پایان ورود سازه ژنی در ژنوم میزبان با روش PCR روی DNA سلول‌هایی که پس از دو هفته انتخاب آنتی‌بیوتیکی باقی مانده‌اند، تأیید شد. زیرا در این مدت درمان دارویی، اگر سازه وارد ژنوم نشده باشد توسط تقسیم سلولی زایل شده (Wash out) یا توسط آگزونوکلازها از بین می‌رود. ضمناً در MOI معادل ۵، تقریباً تمام سلول‌ها ترانسدیوس شدند ولی انتظار می‌رود در این حالت بیش از یک نسخه از سازه ژنی فوق در ژنوم سلول‌ها وارد شده باشد که برای بررسی این امر در مطالعات بعدی، می‌توان تعداد نسخه‌های ژنی وارد شده (Copy number) را با روش Real time PCR بررسی کرد.

از آنجا که سلول‌های K562 یک رده سلولی اریتروییدی انسان است، قابلیت بیان بتاگلوبین و تولید هموگلوبین پس از تمایز را دارد که می‌توان با روش الکتروفورز هموگلوبین، اثر سازه طراحی شده فوق را در میزان بیان بتاگلوبین پس از انتقال با ناقل‌های لنتی ویروسی سنجید. همچنین می‌توان بیان بتاگلوبین را تحت کنترل miniLCR ساخته شده در سلول‌های بنیادی خون‌ساز بیماران مبتلا به بتا-تالاسمی ماژور به‌منظور رفع نقص آن‌ها بررسی کرد.

۵- تشکر و قدردانی

کلیه هزینه‌های این تحقیق از محل بودجه تحقیقاتی مصوب در انستیتو پاستور تهران، بخش پزشکی مولکولی تأمین شده است که بدین‌وسیله از زحمات و مساعدت‌های انجام شده سپاسگزار می‌شود.

ناقل pLentiBGDEST و ناقل‌های بسته‌بندی ویروس plp1، pVSVG و plp2 در سلول‌های 293T تولید شدند. RNA این ویروس‌ها دارای توالی‌های LTR 5' و 3' در دو انتها و سازه ژنی در وسط است که پس از استخراج RNA از این ویروس‌ها و انجام RT-PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی تولید ویروس‌ها تأیید شد.

تیترو لنتی ویروس‌های نو ترکیب ساخته شده در سلول‌های COS-7 و K562 پس از ۲ هفته اثر دادن آنتی‌بیوتیک زئوسین در هر دو رده سلولی فوق 10^6 TU/ml بود که تیترو مناسبی برای ترانسداکشن رده‌های سلولی پستانداران است. با روش اولتراساتریفوژ می‌توان تیترو این ویروس‌ها را بیش از این افزایش داد.

ترانسداکشن سلول‌های COS-7 در حضور ۶/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر پلی‌برن تا ۲ برابر افزایش یافت زیرا پلی‌برن یک ترکیب پلی‌کاتیونیک است و ترکیباتی که بار مثبت دارند موجبات رسوب ذرات ویروسی با بار منفی را روی سطح غشای سلول‌های هدف فراهم می‌کنند [۲۸]. همچنین با توجه به مطالعاتی که در رابطه با افزایش بقای سلول‌های آلوده به ویروس HIV در حضور پلی‌برن وجود دارد، می‌توان استنباط کرد که پلی‌برن علاوه بر افزایش ترانسداکشن، آثار نامطلوب ناقل ویروسی روی سلول‌های هدف را نیز کاهش داده و باعث افزایش بقای سلول‌های ترانسدیوس شده می‌شوند [۲۹].

به‌طور خلاصه از نتایج این تحقیق می‌توان چنین استنباط کرد که در بین روش‌های ژن‌درمانی بتا-تالاسمی استفاده از لنتی ویروس‌ها از لحاظ کارایی انتقال و ورود سازه ژنی به ژنوم سلول‌های هدف نسبت به روش هدف‌گیری ژنی کارآمدتر و حدود ۱۰۵ برابر میزان آن بیشتر

۶- منابع

- [1] Weatherall DJ, Gibbons Higgs OR, Olivier NF, Wood WG. The thalassaemia syndromes. 4th ed, italy, black well science ltd, 2001; p: 287-296, 150-164, 206-238.
- [2] Rund D, Rachmilewitz E. New trends in the treatment of beta-thalassemia. Crit Rev Oncol Hematol 2000; 33(2): 105-18.
- [3] Khanahmad H, Noori Dalooi MR, Shokrgozar MA, Azadmanesh K, Niavarani AR, Karimi M, Rabbani B, Khalili M, Bagheri R, Maryami F, Zeinali S. A novel single step double positive double negative selection strategy for beta-

- globin gene replacement. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345(1): 14-20.
- [4] Beris P.D., Regis D, and Philippe E. Prevention of beta thalassemia major and Hb Bart's Hydrops fetalis syndrome. *Seminars in Hemat.* 1995; 32: 4. 244-261.
- [5] Naldini L, Blomer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272(5259): 263-7.
- [6] Wolkowicz R, Nolan GP. Retroviral technology applications for expressed peptide libraries. *Front Biosci* 2003; 8: d603-19.
- [7] Yee JK, Friedmann T, Burns JC. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* 1994; 43: 99-112.
- [8] Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 1998; 72(12): 9873-80.
- [9] Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 2001; 7(1): 33-40.
- [10] Molete JM, Petrykowska H, Bouhassira EE, Feng YQ, Miller W, Hardison RC. Sequences flanking hypersensitive sites of the beta-Globin locus control region are required for synergistic enhancement. *Mol Cell Biol* 2001; 21(9): 2969-80.
- [11] Hardison R, Slightom JL, Gumucio DL, Goodman M, Stojanovic N, Miller W. Locus control regions of mammalian beta-globin gene clusters: combining phylogenetic analyses and experimental results to gain functional insights. *Gene* 1997; 205(1-2): 73-94.
- [12] Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning*. 3th ed, New York, CSHL Press, 2001.
- [13] Malik P, Arumugam PI, Yee JK, Puthenveetil G. Successful correction of the human Cooley's anemia beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector flanked by the chicken hypersensitive site 4 chromatin insulator. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1054: 238-49.
- [14] Imren S, Fabry ME, Westernman KA, Pawliuk R, Tang P, Rosten PM, Nagel RL, Leboulch P, Eaves CJ, Humphries RK. High-Level beta-globin expression and preferred intragenic integration after lentiviral transduction of human cord blood stem cells. *J Clin Invest* 2004; 114(7): 953-62.
- [15] Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 1985; 317(6034): 230-4.
- [16] Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(15): 8403-10.
- [17] Lu ZH, Books JT, Kaufman RM, Ley TJ. Long targeting arms do not increase the efficiency of homologous recombination in the beta-globin locus of murine embryonic stem cells. *Blood* 2003; 102(4): 1531-3.
- [18] Gruenert DC, Bruscia E, Novelli G, Colosimo A, Dallapiccola B, Sangiuolo F, Goncz KK. Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragments. *J Clin Invest* 2003; 112(5): 637-41.
- [19] Seidman MM, Glazer PM. The potential for gene repair via triple helix formation. *J Clin Invest* 2003; 112(4): 487-94.
- [20] Vacek MM, Ma H, Gemignani F, Lacerra G,

- Kafri T, Kole R. High-level expression of hemoglobin A in human thalassemic erythroid progenitor cells following lentiviral vector delivery of an antisense snRNA. *Blood* 2003; 101(1): 104-11.
- [21] Lan N, Howrey RP, Lee SW, Smith CA, Sullenger BA. Ribozyme-mediated repair of sickle beta-globin mRNAs in Erythrocyte precursors. *Science* 1998; 280(5369): 1593-6.
- [22] Page KA, Landau NR, Littman DR. Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. *J Virol* 1990; 64(11): 5270-6.
- [23] Landau NR, Page KA, Littman DR. Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range. *J Virol* 1991; 65(1): 162-9.
- [24] Amado RG, Chen IS. Lentiviral Vectors--the promise of gene therapy within reach? *Science* 1999; 285(5428): 674-6.
- [25] Adler, K., Gifford J., Sumner R. HIV as a Vector in Gene Therapy. [Online.] <http://wwwpp.uwrf.edu/%7Ekk00/hivvector/hivvector.htm>. [12-13-99, last date accessed.]
- [26] Planelles V. Homepage of Vicente Planelles. [Online.] http://www.urmc.rochester.edu/gebs/faculty/Vicente_Planelles.htm. 1999. [12-13-99, last date accessed.]
- [27] Bharadwaj RR, Trainor CD, Pasceri P, Ellis J. LCR-regulated transgene expression levels depend on the Oct-1 site in the AT-rich region of beta-globin intron-2. *Blood* 2003; 101(4): 1603-10.
- [28] Lehmusvaara S, Rautsi O, Hakkarainen T, Wahifors J. Utility of cell-permeable peptides for enhancement of virus-mediated gene transfer to human tumor cells. *Biotechniques* 2006; 40(5): 573-4, 576.
- [29] Castro, BA, Weiss CD, Wiviott LD, Levy JA. Optimal conditions for recovery of human immunodeficiency virus from peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Microbiol* 1988; 26(11): 2371-6.