مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۷، شماره ٦، بهمن و اسفند۱۳۹۱(شماره پی در پی ۷۲)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 1:26 +0330 on Tuesday October 19th 2021

ساخت یک سازه بهینه شده لنتی ویروسی نوترکیب حاوی ژن *pdx-1* برای انتقال ژن به سلول‌های بنیادی در راستای ژن درمانی دیابت نوع ۱

سامان رحمتی[۱]، محسن کریمی‌ارزنانی [۲]، کاظم پریور [۱]، مهدی کدیور [۳*]

[۱] واحد علوم وتحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، [۲] بخش پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران، [۳] بخش بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۹ تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۷/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: امروزه بسیاری از پروتکل‌های ژن درمانی با حامل های لنتی ویروسی انجام می شود. یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی که در تکوین پانکراس و رونویسی ژن انسولین نقش دارد فاکتور رونویسی Pancreatic & duodenal homeobox 1 (Pdx-1) است. هدف از این مطالعه بهینه‌سازی سازه لنتی ویروسی حاوی ژن *pdx-1* برای ترانسفکشن سلول‌های بنیادی در راستای ژن درمانی دیابت نوع ۱ بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ابتدا ژن *pdx-1* از حامل pcDNA3.1-*pdx-1* به وسیله PCR تکثیر و در حامل pTG19–T کلون شد. سپس ژن *pdx-1* در بالا دست ژن IRES–EGFP در حامل pIRES2–EGFP ساب کلون شد. در مرحله بعد قطعات کلون شده IRES–EGFP و نیز *pdx-1* با هضم آنزیمی از حامل مربوطه جداسازی و به درون سازه ی بیانی لنتی ویروسی pSINTREM در بالا دست ژن TRE-CMV کلون شدند. سازه‌ی نهایی پس از تعیین توالی به سلول‌های HEK293 ترانسفکت شد و بیان ژن *pdx-1* به وسیله آنالیز فلوسایتومتری و میکروسکوپ معکوس فلورسنت ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج فلوسایتومتری و نیز مشاهده مستقیم با میکروسکوپ معکوس فلورسنت، نشانگر تأیید بیان ژن‌های *pdx-1* و GFP در سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده با سازه نوترکیب نهایی بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که سازه حاضر به منظور تضمین بیان طولانی مدت با بازدهی بالا در سلول‌های بنیادی طراحی شده و از سامانه ی القایی Tet on های در آن استفاده شد، می‌تواند یکی از بهترین سازه‌ها در جهت انتقال هر نوع ژن به سلول‌های بنیادی باشد.

واژه‌های کلیدی: ژن درمانی، دیابت، سلول‌های بنیادی

[*] **نویسنده مسئول: دکتر مهدی کدیور، تهران**، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوشیمی

Email: Kadivar@pasteur.ac.ir

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 1:26 +0330 on Tuesday October 19th 2021

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 1:26 +0330 on Tuesday October 19th 2021

مقدمه

دیابت ملیتوس از شایع ترین اختلالات متابولیکی در جهان امروز بوده و اهمیت آن بیشتر به دلیل شیوع، سیر طولانی و عوارض آن است(۱). در حال حاضر بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ با تزریق روزانه انسولین، قند خون را کنترل می‌کنند. اگر چه تزریق روزانه‌ی انسولین می‌تواند نیاز این بیماران را برطرف سازد، اما عدم تنظیم انسولین در این روش منجر به نوسان میزان گلوکز خون شود که پیامد آن هایپر یا هایپو گلایسمیا است(۲). پیوند پانکراس، جایگزینی و یا تولید مجدد سلول‌های بتای آسیب دیده و ژن درمانی راهکارهایی هستند که در درمان دیابت نوع ۱ مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳).

در سال‌های اخیر توجه زیادی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌برای تمایز آن ها به سلول‌های تولید کننده انسولین معطوف شده است و مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌مشتق از مغز استخوان یا سایر بافت‌ها می‌توانند در شرایط *in vivo* و *in vitro* به سلول‌های بیان کننده‌ی انسولین تمایز یابند(۵ و۴). تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های تولید کننده انسولین می‌تواند از طریق فاکتورهای محیطی یا ژنتیکی صورت گیرد(۶). مهم‌ترین فاکتورهایی ژنتیکی که در تکوین پانکراس و رونویسی ژن انسولین نقش دارد، یک فاکتور رونویسی هومئودمین به نام PDX–1 (Pancreatic & duodenal homeobox 1) است. این فاکتور در مسیر تمایزی سلول‌های بتا در بالا دست سایر فاکتورها عمل می‌کند و در بیان انواع مختلفی از ژن‌های مختص به این سلول‌ها نقش دارد(۸ و۷). در میان حامل‌های ویروسی، لنتی ویروس‌ها دارای مزایایی جهت استفاده در ژن درمانی از جمله ارایه موثر ژن‌ها به انواع متفاوت سلول‌های هدف، عدم ایجاد واکنش‌های ایمنی ناخواسته در میزبان و میزان بالای بیان ژن می‌باشند(۱۰ و۹).

با وجود همه مزایای ذکر شده در مورد وکتورهای لنتی ویروسی، انتقال ژن به وسیله این وکتورها به سلول‌های بنیادی با بازده بالا صورت نمی‌گیرد(۱۲ و۱۱). بنابراین لازم است تا ضمن ایجاد تغییراتی در این وکتور، آن را برای انتقال ژن به سلول‌های بنیادی بهینه کرد. در این راستا هدف این مطالعه بهینه کردن سازه لنتی ویروسی pSINTREM و اضافه کردن قطعه IRES-EGFP به آن، ژن *pdx-1* در راستای ژن درمانی دیابت نوع ۱ در این سازه بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی سلول‌های اشریشیاکلی به عنوان میزبان حامل‌های نوترکیب استفاده شدند. از رده‌ی سلولی Human embryonic kidney HEK293T تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به عنوان میزبان یوکاریوتی بیان ژن استفاده شد. سلول‌های HEK293T یکی ازرده‌های سلولی می‌باشد که مورفولوژی سلول‌ها ی اپیتلیال را دارند و به عنوان یکی از بهترین رده‌های سلولی برای بیان ژن‌های نوترکیب و تولید انواع ویروس‌ها می‌باشند.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 1:26 +0330 on Tuesday October 19th 2021

از پلاسمید pcDNA3.1-pdx-1 حاوی ژن *pdx-1*، حامل pSINTREM واجد ژن‌های لنتی ویروسی، حامل pIRES2-EGFP واجد ژن IRES–EGFP و حامل pTG19-T (VIVantis) برای کلون کردن محصول PCR استفاده شد.

پرایمرهای ژن *pdx-1* به وسیله برنامه Generunner طراحی و سپس سنتز شد. توالی الیگونوکلوتیدی پرایمر Forward به صورت 5'-CCGCGGCCACCATGAACAGTGAGGAG-3' (ناحیه خط کشی شده مربوط به جایگاه برشی SacII) وتوالی الیگونوکلوتیدی پرایمر Reverse به صورت 5'-GGATCCGCTCACCCTCAGACTGCTG-3' (ناحیه خط کشی شده مربوط به جایگاه برشی IBamH) بود. PCR با شرایط دمای واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل به ترتیب با دمای واسرشت سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و سپس دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد(۱۳).

محصول PCR به وسیله کیت استخراج از ژل (Fermentas) از ژل تخلیص شد. سپس اتصال بین ناقل خطی pTG19–T و ژن *pdx-1* به وسیله آنزیم T4 لیگازو در دمای اتاق انجام گرفت. سپس ۵ میکرولیتراز محصول اتصال برای ترانسفورم کردن باکتری‌های مستعد Top10F(Invitrogen) به روش شوک حرارتی استفاده شد. در نهایت تعداد ۱۰ عدد از کلونی‌های سفید از میان کلون‌های سفید و آبی انتخاب شد و پس از استخراج پلاسمیدها به روش mini prep، نتایج کلونینگ به وسیله هضم آنزیمی تأیید شد(۱۴).

ژن *pdx-1* (قطعه 900bp) به وسیله آنزیم‌های SacII و IBamH از حامل pTG19–T جدا شده و با کیت استخراج از ژل خالص‌سازی شد. از طرفی حامل بیانی pIRES2–EGFP هم به وسیله این دو آنزیم بریده شده و خالص‌سازی گردید. مطابق روش ذکر شده در مرحله قبل پس از واکنش اتصال به منظور تأیید ساخت *pdx-1*pIRES2–EGFP-، پلاسمیدهای حاصل از اتصال، استخراج و نتایج کلونینگ به وسیله هضم آنزیمی تأیید شدند(۱۵).

قطعه ژنی TRE–CMV (441bp) به وسیله آنزیم‌های XhoI و SacII از حامل pSINTREM جدا و خالص‌سازی گردید. از طرفی حامل بیانی نوترکیب pIRES2–EGFP-*pdx-1* هم به وسیله این دو آنزیم بریده و خطی شد و قطعه 6159bp از روی ژل آگارز ۸ درصد الکتروفورز خالص‌سازی شد. این بار نیز مطابق قبل، پس از واکنش اتصال به منظور تأیید ساخت pTRE-CMV-*pdx-1*-IRES-EGFP، استخراج پلاسمیدها انجام شده و صحت نتایج کلونینگ با هضم آنزیمی‌تأیید شد(۱۵).

برای ساخت سازه‌ی نو ترکیب نهایی، ناقل pTRE-CMV-*pdx-1*-IRES-EGFP به وسیله آنزیم NotI خطی و سپس با آنزیم Klenow، انتهای آن blunt گردید. سپس به وسیله آنزیم XhoI قطعه ژنی TRE–CMV–*pdx-1*–IRES–EGFP (2657bp) جدا شده و از روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز خالص

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 1:26 +0330 on Tuesday October 19th 2021

سازی گردید. از طرفی قطعه 7523bp به وسیله دو آنزیم XhoI و EcoRV از حامل pSINTREM جدا شده و روی ژل آگارز ۸ درصد خالص سازی گردید. سپس واکنش اتصال بین ناقل خطی شده pSINTREM و قطعه TRE–CMV-*pdx-1*-IRES-EGFP، مطابق روش ذکر شده در مراحل قبل صورت گرفت. به منظور تأیید ساخت سازه نهایی (pSINTREM-TRE-CMV-*pdx-1*-IRES-EGFP)، استخراج پلاسمیدها انجام شده و صحت نتایج کلونینگ با هضم آنزیمی‌و تعیین توالی تأیید شد(۱۵).

به منظور بررسی بیان ژن *pdx-1*، سلول‌های HEK293 در روز قبل از ترانسفکشن به میزان یک میلیون **در** هر چاهک، درپلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شد. این سلول‌ها در محیط DMEM [1]حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند. در روز ترانسفکشن، یک میکرو گرم سازه نو ترکیب نهایی با لیپو فکتامین ۲۰۰۰ مخلوط شده و بر اساس دستورالعمل کیت مربوطه به این سلول‌ها ترانسفکت شدند. ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن محیط کشت تعویض شد. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، به منظور بررسی بیان ژن *pdx-1* در سلول‌های ترانسفکت شده، بیان ژن *pdx-1* به وسیله میکروسکوپ معکوس فلورسنت و نیز آنالیز فلوسایتومتری با استفاده از دستگاهFACsort, BD ارزیابی شد. به همین دلیل سلول‌های دو چاهک به منظور آنالیز فلوسایتومتری تریپسینه شدند که یکی از چاهک‌ها به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و دیگر چاهک‌ها به زیر میکروسکوپ معکوس فلورسنت منتقل شدند. مراحل زیر به منظور آماده شدن سلول‌ها برای آنالیز فلوسایتومتری در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر انجام شد. سلول‌ها ۲ بار در ۲۰۰ میکرولیتر بافرPBS [2] شستشو شدند. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر پارا فرم آلدئید ۴ درصد به آن اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. در مرحله بعد پارا فرم آلدئید خارج شد و سلول‌ها با بافر PBS شستشو شدند. سپس روی سلول‌ها ۲ میلی‌لیتر بافرSAP [3] ریخته شد و سلول‌ها در ۲۰۰ دور برای ۷ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بافر SAP خارج شد و فقط ۲۰۰ میکرولیتر از این بافر روی سلول‌ها ریخته شد. در مرحله بعد روی سلول‌ها ۱۰ میکرولیتر آنتی بادی مونوکلونال ضد pdx-1 ریخته شد. به آرامی‌میکروتیوب حاوی سلول‌ها ورتکس شد تا آنتی بادی با تمام سلول‌ها مجاور شود و به مدت ۳۰–۴۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی (زیر فویل آلومینیوم) قرار گرفت. سپس سلول‌ها ۲ بار با ۲ میلی لیتر بافر SAP شستشو داده شدند. در نهایت بافر SAP خارج شد و روی سلول‌ها ۴۰۰ میکرولیتر PBS ریخته شد(۱۶).

یافته‌ها

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده، PCR انجام شد و محصول حاصل از تکثیر ژن pdx-1 روی ژل آگارز ۱ درصد در کنار نشانگر

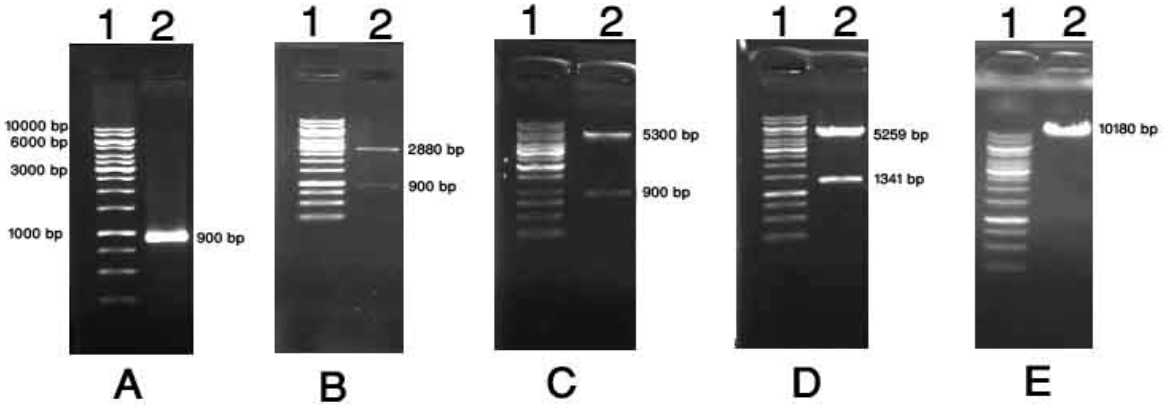
1-Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
2-Phosphate Buffer Saline (PBS)
3-Saponin (SAP)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 1:26 +0330 on Tuesday October 19th 2021

بارگذاری شد. صحت کلونینگ وکتور pTG19–T-pdx-1 با هضم آنزیمی دو گانه با آنزیم‌های SacII و BamHI، به منظور جدا کردن ژن *pdx-1* به طول ۹۰۰ جفت باز از وکتور pTG19–T به طول ۲۸۸۰ انجام شد. به همین ترتیب کلونینگ pIRES2–EGFP-pdx-1 جهت جدا کردن ژن *pdx-1* به طول ۹۰۰ جفت باز از وکتور pIRES2–EGFP به طول ۵۳۰۰ جفت باز تأیید شد. جهت تأیید کلونینگ وکتور pTRE-CMV-pdx-1-IRES-EGFP، هضم آنزیمی‌دوگانه XhoI و BamHI جهت جدا کردن قطعه TRE-CMV-pdx-1 به طول ۱۳۴۱ جفت باز از وکتور pIRES2–EGFP به طول ۵۲۵۹ جفت باز انجام شد. در مورد کلونینگ سازه نهایی واکنش هضم آنزیمی، با آنزیم XhoI جهت خطی کردن وکتور نوترکیب نهایی به طول ۱۰۱۸۰ جفت باز انجام شد(تصویر ۱).

در نهایت صحت کلونینگ سازه نهایی با تعیین توالی نیز تأیید شد. وجود سیگنال فلورسنت رنگ سبز در سلول‌های ترانسفکت شده HEK293 نشانه انتقال و بیان مناسب سازه‌ی نهایی در سلول‌های مذکور و نیز تولید صحیح پروتئین GFP[1] می‌باشد(تصویر ۲).

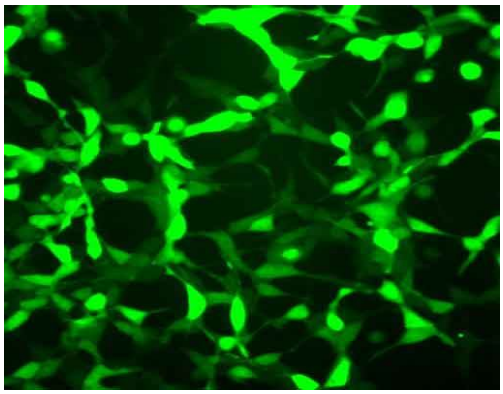
چگونگی تولید پروتئین GFP و بیان ژن pdx-1 در سلول‌های ترانسفکت شده با سازه نوترکیب نهایی و عدم بیان آنها در سازه اولیه با استفاده از روش فلوسایتومتری در تصویر ۳ نشان داده شده است.



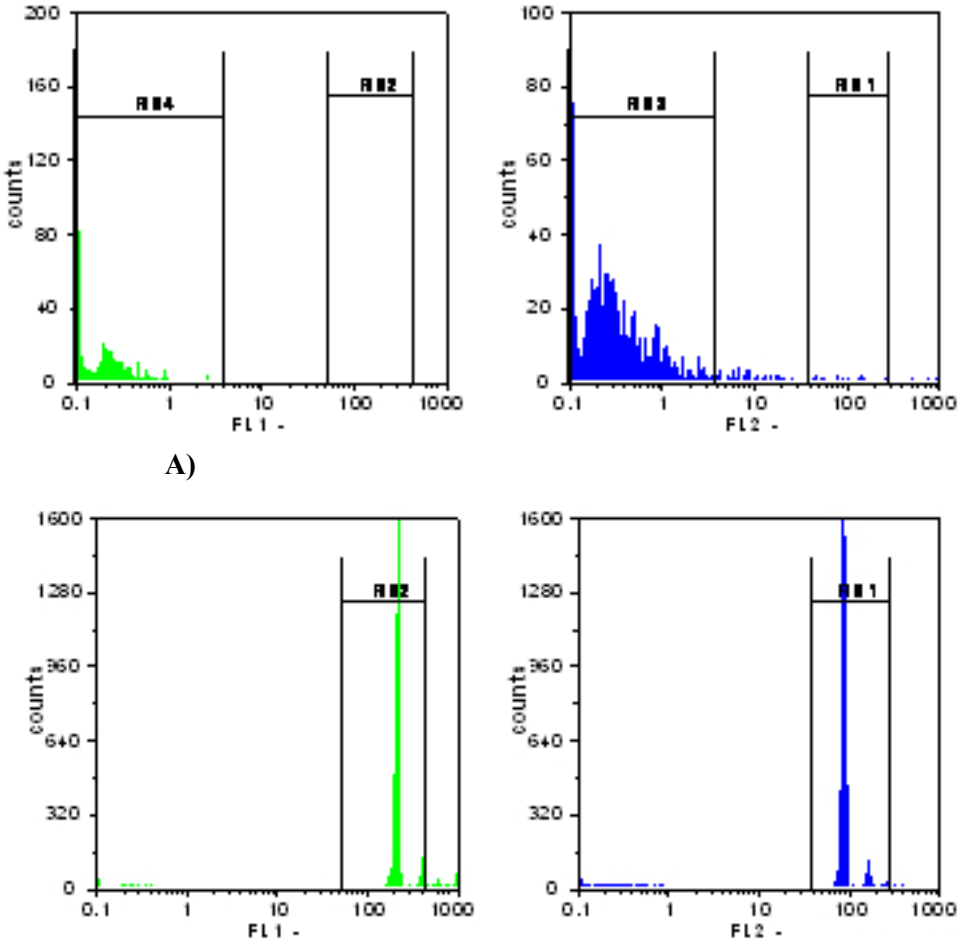
تصویر ۱: الکتروفوز محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز A: ستون ۱، مارکر 1kb، ستون ۲، محصول PCR ژن *pdx-1* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و سازه مرجع *pcDNA3.1-pdx-1* (قطعه ۹۰۰bp).B: ستون ۱؛ مارکر 1kb، ستون ۲: تأیید وجود ژن *pdx-1* درون ناقل pTG19–T با استفاده از هضم آنزیمی دو گانه با SacII وIBamH (ایجاد قطعات ۲۸۸۰bp و ۹۰۰bp).C: ستون ۱؛ مارکر 1kb، ستون ۲؛ تأیید سازه نوترکیب *pdx-1* -pIRES2–EGFP با استفاده از هضم آنزیمی دو گانه با SacII وIBamH (ایجاد قطعات ۵۳۰۰bp و۹۰۰bp). D: ستون ۱؛ مارکر 1kb، ستون ۲؛ تأیید سازه نوترکیب pTRE-CMV-*pdx-1*-IRES-EGFPبا استفاده از هضم آنزیمی‌دو گانه با IBamH وXhoI (ایجاد قطعات ۵۲۵۹bp و۱۳۴۱bp). E: ستون ۱؛ مارکر1kb، ستون ۲؛ تأیید سازه نوترکیب نهائی pSINTREM-TRE-CMV-*pdx-1*-IRES-EGFP با استفاده از هضم آنزیمی‌با XhoI (ایجاد قطعهbp ۱۰۱۸۰).

1-Green Fluorescent Protein (GFP)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 1:26 +0330 on Tuesday October 19th 2021



تصویر ۲: شکل فلورسنت سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده با سازه نوترکیب نهایی پس از گذشت ۴۸ ساعت از ترانسفکشن (بزرگنمایی ۴۰۰برابر)



تصویر ۳: نتایج آنالیز فلوسایتومتری پس از ترانسفکشن سازه اولیه و سازه نهاییA؛ سلول‌هایHEK293 ترانسفکت شده با سازه اولیه فاقد ژن pdx-1 و ژن GFP (pSINTREM) پس از گذشت ۴۸ ساعت از ترانسفکشن. B؛ سلول‌هایHEK293 ترانسفکت شده با سازه نوترکیب نهائی پس از گذشت ۴۸ ساعت از ترانسفکشن. در قسمت A تصویر FL1، نشان دهنده بیان ژن GFP و تصویر FL2، نشان دهنده بیان ژن pdx-1 است.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 1:26 +0330 on Tuesday October 19th 2021

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 1:26 +0330 on Tuesday October 19th 2021

بحث

با توجه به نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای تمایز آنها به سلول‌های تولید کننده انسولین(۵ و ۴)، هدف این مطالعه بهینه‌سازی سازه لنتی ویروسی حاوی ژن *pdx-1* برای ترانسفکشن سلول‌های بنیادی در راستای ژن درمانی دیابت نوع ۱ بود.

در این مطالعه ضمن بهینه کردن سازه لنتی ویروسی pSINTREM و اضافه کردن قطعه IRES-EGFP به آن، ژن *pdx-1* در راستای ژن درمانی دیابت نوع ۱ در این سازه کلون شد. حامل pSINTREM شامل سیستم بیانی قابل القاء Tet on می‌باشد. در این سامانه در صورت وجود آنتی بیوتیک تتراسیکلین یا داکسی سیکلین در محیط کشت، بیان فعال می‌شود. از دیگر دلایل استفاده از حامل pSINTREM آن بود که این سیستم همه قطعات تنظیمی مناسب برای کنترل بیان طولانی مدت با بازدهی بالا در سلول‌های بنیادی در *in vitro* و نیز در *in vivo* را دارا می‌باشد. یکی دیگر از دلایل استفاده از این حامل لنتی ویروسی آن است که بر خلاف بسیاری از حامل‌های دارای سیستم Tet on، بیان در حالت غیر القاء در حد زمینه می‌ماند(۱۲ و ۱۱).

سازه نهایی به گونه‌ای طراحی شد که قطعه ژنی TRE–CMV–*pdx-1*–IRES–EGFP طی چند مرحله ساب کلونینگ در حامل خطی pSINTREM قرار گرفت. TRE (Tetracycline Response Element) در سازه‌ی ژنی در تنظیم بیان ژن مؤثر است. سیستم بیانی Tet Off نوعی سیستم القایی بیان ژن در سلول‌های یوکاریوتی است. در این نوع سیستم وقتی تتراسیکلین یا داکسی سیکلین در محیط کشت وجود داشته باشد، بیان متوقف می‌شود. در مقایسه، در سیستم القایی Tet on در صورت وجود یکی از این دو آنتی بیوتیک در محیط کشت، بیان فعال می‌شود. در مقایسه با دیگر سیستم‌های بیانی که بیان در آنها به آسانی قابل حصول نیست، در این سیستم بیانی حداکثر سطح بیان قابل توجه می‌باشد، زیرا این سیستم حاوی پروموتور سیتو مگالوویروس است(۱۷).

در مطالعه‌ای با موضوع بررسی بیان ژن به وسیله حامل‌های لنتی ویروسی در سامانه‌ی القایی Tet on در سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک مشخص شد که سازه لنتی ویروسی pSINTREM نسبت به سازه‌های مورد بررسی دیگر هم در *in vivo* و هم در *in vitro* مؤثرترین سازه‌ی بیانی در سامانه القایی Tet on در سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک است(۱۱). در مطالعه دیگری از حامل لنتی ویروسی یاد شده برای بیان TRAIL تحت کنترل سیستم القایی Tet on استفاده شد و این حامل را به سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای محدود کردن متاستاز سرطان، ترانسفکت کرده‌اند. نتایج نیز حاکی از بیان مؤثر و طولانی مدت ژن TRAIL در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط *in vivo* و *in vitro* بود.

نتیجه‌گیری

در مجموع با توجه به مطالب گفته شده، سازه ساخته شده حاضر به عنوان یکی از مناسب‌ترین سازه‌ها در جهت انتقال هر نوع ژن به سلول‌های

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 1:26 +0330 on Tuesday October 19th 2021

بنیادی پیشنهاد می‌شود. لازم به ذکر است اثبات عملی کارایی بیان هر ژنی که به وسیله این سازه به سلول‌های بنیادی فرستاده شود، نیاز به مطالعات جداگانه دارد.

تقدیر و تشکر

هزینه‌های این مطالعه از محل بودجه طرح تحقیقاتی شماره ۳۹۶ انستیتو پاستور ایران تأمین شده است.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 1:26 +0330 on Tuesday October 19th 2021

REFERENCES

1.Van Leeuwen M, Louwerse M, Opmeer B, Limpens J, Serlie M, Reitsma J. Glucose challenge test for detecting gestational diabetes mellitus: a systematic review. BJOG 2012; 119(4): 393-401.

2.Peng T, Liu T, Yao Z, Wang C. Stem cells therapy for type 1 diabetes. Diabetes Res Clin Prac 2007; 78(1): 1-7.

3. Samson SL, Chan L. Gene therapy for diabetes: reinventing the islet. Trends Endocrinol Metab 2006; 17(3): 92-100.

4.Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. Exp Cell Res 2004; 295(2): 395-406.

5.Itakura S, Asari S, Rawson J, Ito T, Todorov I, Liu CP, et al. Mesenchymal Stem Cells Facilitate the Induction of Mixed Hematopoietic Chimerism and Islet Allograft Tolerance without GVHD in the Rat. Am J Transplant 2007; 7(2): 336-46.

6.Cerf ME. Transcription factors regulating β-cell function. Eur J Endocrinol 2006; 155(5): 671-9.

7.Kaneto H, Matsuoka TA, Katakami N, Matsuhisa M. Combination of MafA, PDX-1 and NeuroD is a useful tool to efficiently induce insulin-producing surrogate beta-cells. Curr Med Chem 2009; 16(24): 3144-51.

8.Yang YP, Thorel F, Boyer DF, Herrera PL, Wright CV. Context-specific α- to-β-cell reprogramming by forced Pdx1 expression. Genes Dev 2011; 25(16):1680-5.

9.Naldini L, Blmer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH. In vivo gene delivery and stable transduction of non-dividing cells by a lentiviral vector. Science 1996; 272(5259): 263-7.

10.Balaggan KS, Ali RR. Ocular gene delivery using lentiviral vectors. Gene Ther 2012; 19:145-53.

11.Barde I, Zanta-Boussif MA, Paisant S, Leboeuf M, Rameau P, Delenda C, Danos O. Efficient control of gene expression in the hematopoietic system using a single Tet-on inducible lentiviral vector. Mol Ther 2006; 13(2): 382-90.

12.Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, Janes SM. Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. Cancer Res 2009; 69(10): 4134-42.

13.Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene 1990; 96: 23-8.

14.Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. Diabetes 2004; 53: 1721-1732.

15.Yoshida S, Kajimoto Y, Yasuda T, Watada H, Fujitani Y, Kosaka H. Pdx-1 induces differentiation of intestinal epithelioid IEC-6 into insulin-producing cell. Diabetes 2002; 51(8): 2505-13.

16.Lin KN, Wang XX, Huang XQ, Cai BL, Fang SH, Lu YB, ET AL. Construction of HEK293 cell lines expressing hCysLT receptor and its application in screening of antagonists. Zhejiang Da XueXueBao Yi Xue Ban 2011; 40(2):123-30.

17.Yin DX, Zhu L, Schimke RT. Tetracycline controlled gene expression system achieves high – level and quantitative control of gene expression. Anal Biochem 1996; 235(2): 195-201.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 1:26 +0330 on Tuesday October 19th 2021

Construction Of An Optimized Lentiviral Vector Containing Pdx-1 Gene For Transduction Of Stem Cells Towards Gene Therapy Diabetes Type 1

Rahmati S[1], Karimi Arznani M[2], Parivar K[1], Kadivar M[3]*

[1]Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, [2] Department of Molecular Medical, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, [3] Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 30 Jul 2012 Accepted: 21 Oct 2012

Abstract

Background & aim: Nowadays, most of gene therapy protocols are performed by lentiviral vectors. One of the most important factors which is involved in pancreas development and transcription of insulin gene is pancreatic & duodenal homeobox 1 (PDX-1) transcription factor. The goal of this study was to optimize a lentiviral construct, containing *pdx-1* gene, to transfect stem cells towards gene therapy of type-1 diabetes.

Methods: In this experimental study, first, the *pdx-1* gene was multiplied by PCR from pcDNA3.1-pdx-1 and cloned into pTG19-T vector. Then, *pdx-1* was subcloned on upstream of *IRES-EGFP* gene into IRES2-EGFP vector. At the next step, the cloned parts of *IRES-EGFP* and *pdx-1* were isolated and cloned into the lentiviral expression vector pSINTREM in upstream of TRE-CMV gene. After sequencing, final construct was transfected into HEK 293 cells and gene expression of *pdx-1* was evaluated using flow cytometry analysis and reverse fluorescent microscopy.

Results: Flow cytometry results and inverted fluorescent microscopy observing showed that pdx-1 and GFP genes are expressed in cells transfected with final recombinant construct.

Conclusion: Regarding the design of this construct, to ensure long time expression with higher *in vivo* and *in vitro* expression efficiency for stem cells and also use of Tet on induced optimized system, it seems that the current construct can be among the best ones to transfect stem cells.

Key words: Gene therapy, Diabetes, Stem cells

***Corresponding Author: Kadivar M**, Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email: Kadivar@pasteur.ac.ir