مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / زمستان ۱۳۸۹ / دوره ۱۲ / شماره ۴ (پی در پی ۳۶) / صفحات ۵۵ تا ۶۳
Archive of SID

تحقیقی

ساخت ویریون‌های HIV با قابلیت یک سیکل تکثیر با هدف مطالعات ویروس‌شناسی و واکسن

سیدمهدی سادات[۱]، دکتر رضوان ذبیح الهی[۲]، روح اله وهاب پور[۳]، دکتر سیدداور سیادت[۴]، فوزیه جوادی[۳]
دکترعباس رضایی[۵]، دکتر کاظم پریور[۶]، دکتر محمدرضا آقا صادقی*[۴]
۱- دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۲- پزشک، پژوهشگر، گروه هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران.
۳- کارشناس ارشد گروه هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران. ۴- استادیار گروه هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران.
۵- استاد گروه ایمونولوژی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. ۶- استاد گروه زیست‌شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

چکیده

زمینه و هدف : *ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) از خانواده رتروویریده و عامل سندرم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS) می‌باشد. تهدیدی که عفونت HIV برای نظام سلامت جهانی ایجاد کرده؛ باعث شده است که مطالعه برای دستیابی به ترکیبات ضدویروسی جدید و همچنین طراحی و تولید واکسن HIV اهمیت ویژه‌ای پیدا کند. این مطالعه به منظور ساخت ویریون‌های HIV با توان یک سیکل همانندسازی با نام Single Cycle Replicable (SCR) با استفاده از پرووِیروس‌های بدون آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT) انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه آزمایشگاهی ویریون‌هایی به نام SCR HIV با قابلیت یک سیکل تکثیر، به وسیله ترانسفکشن هم‌زمان سه پلاسمید pSPAX.2 ، pMD2.G و pmzNL4-3 به سلول‌های HEK تولید و سپس توان همانندسازی این ویریون‌ها در سه رده سلول HEK ، MT-2 و سلول‌های طحال موش با بررسی روش الیزا برای ترشح p24 و میزان تشکیل سنسیشیوم بررسی گردید. همچنین عفونت‌زایی ویریون‌های نسل دوم روی سلول‌های MT-2 مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها : *نتیجه بررسی‌های انجام شده نشان‌دهنده توان مناسب تولید ویریون‌های SCR در تمامی سلول‌های مورد بررسی می‌باشد. همچنین تمامی آنتی‌ژن‌های HIV به شکل طبیعی خود به وسیله همانندسازی ویریون‌های SCR تولید می‌شوند؛ اما این اجسام ویروسی نسل دوم به‌طور کامل از نظر توانایی تکثیر، غیرفعال می‌باشند.*

نتیجه‌گیری : *این مطالعه توانست ویریون‌های SCR را تولید نماید که کاندید مناسبی برای واکسن HIV بوده و همچنین با توجه به توان یک سیکل زندگی ویریون‌های SCR نیازمند تمهیدات شدید ایمنی زیستی مورد نیاز در مطالعات رتروویروس‌ها نمی‌باشد.*

کلید واژه‌ها : *ویروس نقص ایمنی انسان ، ویریون با قابلیت یک سیکل تکثیر ، واکسن*

---

* نویسنده مسؤول : دکتر محمدرضا آقاصادقی ، پست الکترونیکی : mrasadeghi@pasteur.ac.ir
نشانی : تهران ، انستیتو پاستور ایران ، گروه هپاتیت و ایدز ، تلفن و نمابر : ۶۶۹۶۹۲۹۱ (۰۲۱)
وصول مقاله : ۸۸/۸/۶، اصلاح نهایی : ۸۹/۱/۳۰، پذیرش مقاله : ۸۹/۲/۱۹

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) یک RNA ویروس و از گروه رتروویروس‌ها می‌باشد. ویروس، RNA ژنومی خودرا توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس (Reverse Transcriptase, RT) به DNA پروویروسی رونوشت‌برداری کرده و سپس پروویروس را با استفاده از آنزیم اینتگراز (Integrase, IN) به DNA میزبان وارد می کند (۱). ابتلا به HIV باعث ایجاد سندرم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS) می‌شود. ایدز یک بیماری عفونی مزمن، با کاهش پیشرونده تعداد سلول‌های T CD4+ می‌باشد. سلول‌های CD4+ میزبان اصلی HIV می‌باشند و با کاهش پیشرونده گنجینه این سلول‌ها، عفونت‌های فرصت‌طلب و تومورها منجر به مرگ میزبان می‌شوند (۱). بر طبق گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی در سراسر جهان ۳۳ میلیون نفر آلوده به HIV می‌باشند و روزانه ۵۷۰۰ نفر بر اثر ایدز جان خود را از دست می‌دهند (۱و۲). به دلیل بار اقتصادی و بهداشتی سنگینی که HIV به نظام سلامت جهانی وارد کرده است؛ پژوهش در زمینه واکسن و داروهای بازدارنده ویروس HIV از اهمیت بالایی برخوردار است. داروهای ضدویروسی تنها راه کنترل بیماری ایدز در حال حاضر می‌باشند و به همین جهت پژوهش برای یافتن داروهای ضدویروسی مؤثر روی HIV ارزشمند است. از طرف دیگر تحقیقات در زمینه واکسن HIV با اهداف پیشگیرانه و ایمن‌سازی، ارزش بالایی در کنترل بیماری دارد.

ویریون‌های HIV توسط گلیکوپروتئین‌های سطحی خود (gp40, gp120) به سطح سلول‌های هدف متصل می‌شوند و به دنبال اتصال آنها به CD4 و CXCR4 در سطح سلول هدف، پوشینه ویروسی در غشای سلول ادغام می‌شود. گلیکوپروتئین سطحی HIV ادغام (Fusion) پوشینه با غشای سلول هدف را انجام می‌دهد. Pre integrating complex (PIC) که حاوی RNA ژنومی ویروس و آنزیم‌های رونوشت‌بردار معکوس و اینتگراز ویروسی می‌باشد؛ به داخل سیتوپلاسم سلول هدف رها می‌شود و PIC به هسته سلول هدف منتقل می‌شود. آنزیم رونوشت‌بردار معکوس، DNA پروویروسی را از روی RNA رونویسی می کند و آنزیم اینتگراز، DNA پروویروسی را به ژنوم میزبان وارد می کند (۳و۴). mRNA های ویروسی به وسیله سیستم رونویسی سلول از روی پروویروس رونویسی شده و در ادامه توسط سیستم‌های سلولی پروتئین‌های ویروسی ساخته می‌شوند. RNA ویروسی به همراه پروتئین‌های ویروسی gag، gag-pol، ENV و پروتئین‌های کمکی، اجسام ویروسی جدید را تشکیل می‌دهند (۵).

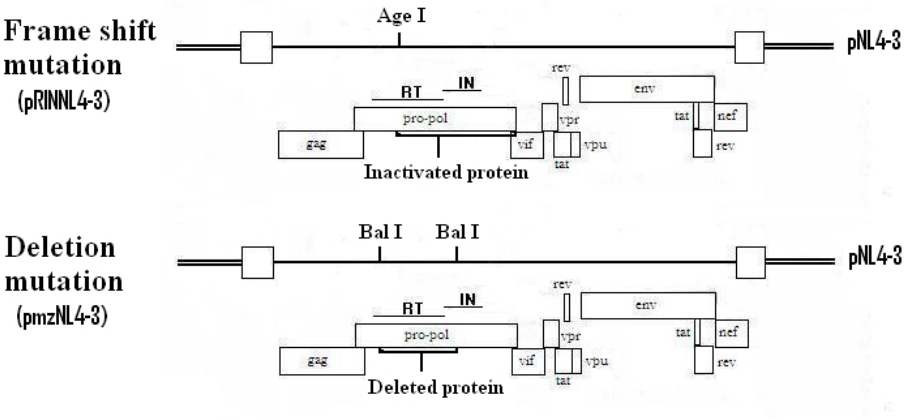
به منظور رسیدن به اهداف خاص ویروس‌شناسی، وکتورهای لنتی ویروسی (Lentiviral) با توان محدود همانندسازی، تحت عنوان وکتورهای خود غیرفعال شونده Self Inactivating (SIN) ساخته شده‌اند (۶و۷). وکتورهای SIN حاوی جهش حذفی در توالی U3 LTR می‌باشند (۶). در ویروس‌هایی که حاوی RNA ژنومی SIN می‌باشند؛ جهش مذکور در حین رونوشت‌برداری معکوس به هر دو LTR 3' و5' کپی و سپس به ژنوم سلول هدف اینتگره می‌شود (۹-۶). وکتورهای SIN ایمنی زیستی کار با وکتورهای لنتی ویروسی را افزایش داده‌اند (۹و۱۰). غیرفعال شدن خودبه‌خودی این وکتورها باعث کاهش شانس تولید تیپ‌های دارای قدرت همانندسازی در سلول‌های هدف شده است (۹و۱۰). همچنین با وجود این وکتورها، شانس نوترکیبی با سوش‌های وحشی کاهش می‌یابد (۷و۱۰).

وکتورهای SIN توان انتقال هر ژن دلخواه به سلول‌های هدف را دارند (۶). پاسخ ایمنی نسبت به آنتی‌ژن بیان شده در سلول هدف باارزش است (۱۱و۱۲). همان‌طور که در بالا اشاره شد؛ وکتورهای SIN از ایمنی زیستی بالایی برخوردارند (۹و۱۰) و همین حقیقت آنها را کاندید بررسی‌های واکسن برای تحویل ژن ایمنوژن کرده است (۱۱و۱۲). نتایج تجربیات گذشته در این زمینه حاکی از توان مناسب این وکتورها در برانگیختن پاسخ ایمنی مطلوب می‌باشد (۱۱و۱۲). در مقابل وکتورهای لنتی ویروسی، ویروس‌های ضعیف شده SIN قرار دارند (۱۶-۱۳). ویروس‌های ضعیف شده لنتی ویروسی به سبب نقص‌های ژنتیکی (مثلاً در پروتئین nef) پاتوژنسیته پایینی دارند. ویروس‌های ضعیف شده قادر به تکثیر برای نسل‌های متوالی می‌باشند؛ اما سرعت تکثیر کنترل شده‌ای دارند (۱۳و۱۴).

فرضیه این مطالعه براین اساس است که ویریون‌های SCR مانند ویروس‌های وحشی HIV سلول هدف را آلوده و

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ : مقایسه جهش‌های غیرفعال کننده آنزیم‌های RT و IN برای تولید دو پروویروس mzNL4-3 و RINNL4-3

پروویروس خود را به ژنوم میزبان وارد می‌کنند؛ اما ویریون‌های حاصل از تکثیر ویروس‌های SCR غیرفعال می‌باشند. ویریون‌های SCR حاوی تمامی اجزای ویروس‌های وحشی HIV می‌باشند؛ ولی پس از همانندسازی، ویروس‌های فاقد آنزیم‌های RT و IN تولید می‌کنند. غیرفعال شدن ویریون‌های نسل دوم به سبب نقص RNA ژنومی ویروس‌های SCR در تولید آنزیم‌های RT و IN می‌باشد. در واقع هر پروویروس حاوی جهش غیرفعال کننده در آنزیم‌های RT و IN می‌تواند به این منظور استفاده شود. در این مطالعه از پروویروس HIV با نام mzNL4-3 به عنوان پروویروس بدون RT استفاده شده است (۱۷).

این مطالعه به منظور ساخت ویریون‌های HIV با توان یک سیکل همانندسازی با نام Single Cycle Replicable (SCR) با استفاده از پروویروس‌های بدون آنزیم RT انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه آزمایشگاهی در گروه هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران طی سال ۱۳۸۹ انجام شد. موش‌های مورد استفاده در این مطالعه با نژاد BALB/c از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه و با توجه به آئین‌نامه کمیته اخلاق انستیتو نگهداری و آزمون شدند.

پلاسمیدها

برای تولید ویریون‌های HIV SCR از پلاسمید pSPAX.2 استفاده شده است که یک پلاسمید بیان کننده gag-pro-pol (حاوی آنزیم‌های RT و IN) می‌باشد. پلاسمید دیگری که برای تولید ویریون‌های SCR استفاده شد؛ پلاسمید pmzNL4-3 بود که حاوی پروویروس HIV به همراه جهش حذفی در توالی کدکننده آنزیم‌های RT و IN می‌باشد (۱۷). البته هر پلاسمید کدکننده RNA ژنومی با نقص در توالی‌های کدکننده RT و IN و قابل بسته‌بندی می‌تواند؛ جایگزین pmzNL4-3 گردد (شکل یک). همان‌طور که در شکل یک مشاهده می‌شود؛ برای ایجاد پروویروس RINNL4-3 جهش تغییر قالب (Frame Shift) در ابتدای توالی‌های کدکننده RT و IN (در نقطه Age I) در وکتور pNL4-3 ایجاد شده است. پروویرس mzNL4-3 از طریق حذف توالی‌های کدکننده RT و IN تولید شده است. در این مطالعه منبع پروویروس برای تهیه پرویروس‌های بدون RT، پلاسمید pNL4-3 بود (۱۸). از پلاسمید pMD2.G نیز برای تولید گلیکوپروتئین سطحی ویروسی وزیکولار استوماتیت (VSVG) استفاده شده است.

کشت سلول و تولید ویروس

در این مطالعه سلول‌های انسانی HEK293T، MT-2 و سلول‌های طحالی موش کشت داده شده‌اند. سلول‌های HEK در محیط DMEM به همراه ۱۵درصد FBS ، L-Glutamine ، پنی‌سیلین و استرپتومایسین نگهداری شدند (۱۹). در مرحله ترانسفکشن به محیط سلول‌های HEK ، HEPES اضافه شد. سلول‌های MT-2 و طحال موش BALB/c در محیط RPMI حاوی ۱۵درصد FBS ، L-Glutamine و پنی‌سیلین- استرپتومایسین کشت داده شدند. تمامی سلول‌ها در انکوباتور تحت فشار ۵درصد CO2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

www.SID.ir

Archive of SID

نگهداری شدند.

برای تولید ویریون‌های SCR HIV پلاسمیدهای pSPAX.2 و pmzNL4-3 و pMD2.G با نسبت‌های مشخص، هم‌زمان به سلول‌های HEK293T ترانسفکت شدند. ترانسفکشن توسط کیت پلیفکت (Qiagen) و طبق روش شرکت سازنده، در پلیت‌های ۶ چاهکی انجام گرفت. در مرحله ترانسفکشن ، HEPES به میزان ۲۵ mM به محیط سلول‌ها اضافه شد. سوپ‌های حاوی ویروس در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ جمع‌آوری و محیط تازه به سلول‌ها اضافه شد. سوپ‌های حاوی ویروس با هم مخلوط و پس از فیلتر شدن با فیلتر ۰/۲۲µm در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۰). بخشی از ویروس تولید شده به وسیله سانتریفیوژ با دور بالا تغلیظ شد. برای تغلیظ ویروس‌ها، سوپ حاوی ویروس فیلتر شده برای ۲ ساعت با نیروی 60×10^3g و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ سوپ روی رسوب ویروسی برداشته شد و این رسوب در RPMI با نسبت یک به ۳۰ میلی‌لیتر سوپ اولیه، توسط gentle vortex برای طول شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حل گردید (۲۱). میزان ویروس تخلیص شده، توسط کیت الیزای تشخیص پروتئین پوششی ویروس (BioMerieux, Capture P24 ELISA) طبق پروتکل کیت بررسی شد.

تخلیص سلول طحالی

سلول‌های طحالی طبق پروتکل‌های موجود تخلیص شدند (۲۲و۲۳). یک موش ماده BALB/c از طریق بیهوش نمودن و قطع نخاع کشته و پس از غوطه‌ور ساختن در الکل ۷۰ درصد، طحال آن در شرایط استریل خارج شد. با فشردن ملایم طحال در شرایط استریل، سلول‌های طحالی وارد محیط RPMI حاوی ۵درصد FBS شدند. سلول‌های به دست آمده با RPMI شستشو داده شدند و به آن ml ۶ بافر لیزکننده گلبول قرمز افزوده شد. پس از ۷ دقیقه واکنش لیز با اضافه کردن ۶میلی‌لیتر RPMI حاوی ۵درصد FBS پایان داده شد. سلول‌های طحالی در این مرحله سه مرتبه با RPMI حاوی ۵درصد FBS شستشو داده شدند. در نهایت ۲۰ میلیون سلول طحالی در محیط کامل به علاوه ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر PHAکشت داده شدند. سلول‌ها برای ۴۸ ساعت با PHA تحریک شدند و سپس برای آزمایش همانندسازی ویریون‌های SCR HIV مورد استفاده قرار گرفتند.

تولید ویریون‌های نسل دوم و آزمایش عفونت‌زایی آنها

برای تولید ویریون‌های نسل دوم 60×10^3 سلول HEK در یک چاهک از پلیت ۲۴ خانه‌ای با ۵ میکروگرم P24 ویروس SCR HIV سودوتایپ شده با VSVG در ۲۵۰ میکرولیتر محیط کامل هم‌جوار شدند. بعد از۵ ساعت سلول‌ها دوبار با محیط کامل درون چاهک شسته شد و سپس ۸۰۰ میکرولیتر محیط تازه به چاهک‌ها اضافه شد. سوپ‌های حاوی ویریون‌های نسل دوم در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ بعد از آلودگی جمع‌آوری و با هم مخلوط شدند. سوپ حاوی ویروس‌های نسل دوم پس از بررسی میزان p24 در حجم‌های کوچک‌تر تقسیم و در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۴).

برای آزمایش عفونت‌زایی ویریون‌های نسل دوم 100×10^3 سلول MT-2 در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه‌ای با ۱۰۰۰نانوگرم P24 جسم ویروسی نسل دوم در حجم یک میلی‌لیتر هم‌جوار شدند. پس از ۱۶ ساعت سلول‌ها دوبار با RPMI شستشو و ۵۰۰ میکرولیتر محیط تازه افزوده شد. در هر سه روز یک بار ۳۰۰ میکرولیتر محیط تازه با محیط قبلی تعویض گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده از سوپ سلول‌های MT-2 مواجه شده با ویریون‌های نسل دوم در طی روزهای متوالی (تا ۲۰ روز) به روش الیزا از نظر میزان تیتر P24 بررسی شدند.

بررسی میزان همانندسازی

برای بررسی میزان همانندسازی ویریون‌های SCR HIV سودوتایپ شده با VSVG از سلول‌های HEK استفاده شد. تعداد 60×10^3 سلول HEK و یا MT-2 در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه‌ای حاوی ۲۵۰ میکرولیتر محیط کشت قرار داده شدند. به هر چاهک ۶۰۰ نانوگرم P24 ویریون SCR HIV اضافه شد. پس از ۵ ساعت سلول‌ها دوبار درون چاهک به وسیله محیط کامل شستشو داده شدند (۲۴). با توجه به نوع مطالعه هر ۲۴ ساعت و یا در یک نوبت در۷۲ ساعت سوپ سلول‌ها جمع‌آوری شد. در مورد سلول‌های HEK کل محیط

www.SID.ir

Archive of SID

و در مورد سلول‌های MT-2 ، ۳۰۰میکرولیتر از محیط کشت با محیط تازه جایگزین شد. میزان P24 سوپ سلولی به روش الیزا طبق پروتکل شرکت سازنده سنجیده شد.

برای بررسی همانندسازی در سلول‌های طحالی، یک میلیون سلول در ۲۵۰ میکرولیتر محیط کشت با ۶میکروگرم P24 ویروس SCR HIV آلوده شدند. پس از ۵ ساعت سلول‌ها دوبار با RPMI حاوی ۵ درصد FBS شسته شدند. در نهایت سلول‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر محیط کامل به علاوه ۱۰میکروگرم در میلی‌لیتر PHA قرار داده شدند. میزان P24 سوپ این سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت به روش الیزا سنجیده شد.

بررسی میزان همانندسازی یک دوره‌ای

توان همانندسازی ویریون‌های SCR روی سه رده سلولی HEK ، MT-2 و سلول‌های طحالی موش‌های BALB/c آزموده شد. سلول‌های HEK و MT-2 توسط ۶۰۰ نانوگرم P24 ویروس SCR به مدت ۵ ساعت آلوده شدند. سلول‌ها سه‌بار شستشو داده شدند و در ۵۰۰ میکرولیتر محیط کامل کشت داده شدند. ۳۰۰ میکرولیتر از سوپ سلول‌ها روزانه با محیط تازه تعویض و از نظر میزان P24 بررسی شد. سلول‌های طحالی با همین روش اما توسط ۶میکرولیتر P24 ویروس SCR آلوده شدند. سوپ سلول‌های طحالی ۷۲ ساعت پس از آلودگی جمع‌آوری و از نظر میزان P24 بررسی شد.

همانندسازی ویریون‌های SCR با استفاده از روش الیزا برای p24 ارزیابی شد.

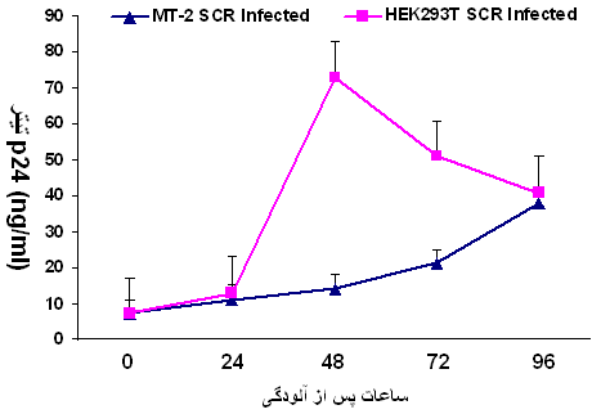
بررسی میزان تشکیل سنسیشیوم

برای بررسی میزان تشکیل سنسیشیوم میان سلول‌های MT-2 به دنبال آلودگی به ویریون‌های SCR HIV، حدود ۲۰×۱۰^{۳} سلول MT-2 در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی ۵۰ میکرولیتر محیط قرار داده شد و به وسیله ۸۰۰نانوگرمP24 و یا میزان‌های مختلف ویریون SCR HIV آلوده شدند. پس از ۱۶ ساعت ۲۰۰ میکرولیتر محیط کامل به هر چاهک اضافه شد. ۷۲ ساعت بعد از آلودگی تعداد سنسیشیوم‌ها زیر میکروسکوپ نوری شمرده شدند (۲۵و۲۶). برای شمارش سنسیشیوم‌ها پنج فیلد از هر چاهک مورد شمارش قرار گرفت و سلول‌های با حجم چهاربرابر حجم طبیعی و بیشتر، سنسیشیوم در نظر گرفته شدند.

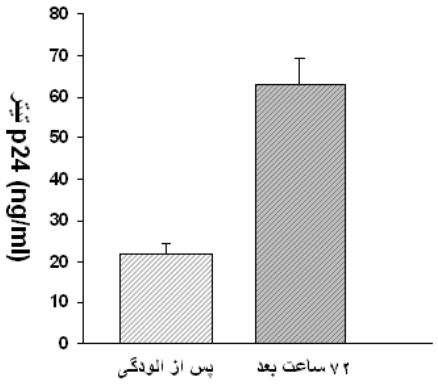
یافته‌ها

تولید ویروس

بررسی میزان تولید ویریون‌های SCR توسط سنجش کمی P24 به روش الیزا انجام و مشخص شد که تولید ویریون‌های SCR به میزان چند برابر بهتر ۲۵۰۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از ویریون‌های mzNL4-3 (۸۰۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و GPF reporter (۲۸۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) بود؛ که شاید به



الف) همانندسازی ویریون‌های SCR در سلول‌های HEK 293T و MT-2 . سلول‌های HEK به خوبی توسط ویریون‌های SCR HIV آلوده شده و ویروس تولید کرده‌اند.

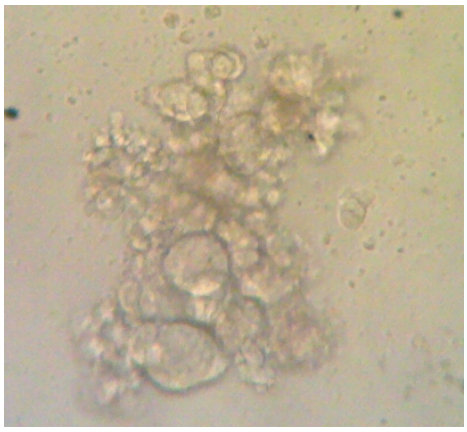


ب) همانندسازی ویریون‌های SCR در سلول‌های طبیعی طحال موش. افزایش سطح p24 در سوپ سلول‌ها طی سه روز پس از آلودگی در مقایسه با زمان آلوده شدن با ویریون‌های SCR نشان‌دهنده همانندسازی این ویروس‌ها در این سلول‌ها است. تمامی تست‌ها به صورت تکرار سه‌تایی انجام پذیرفته و میزان SD روی نمودارها نمایش داده شده است.

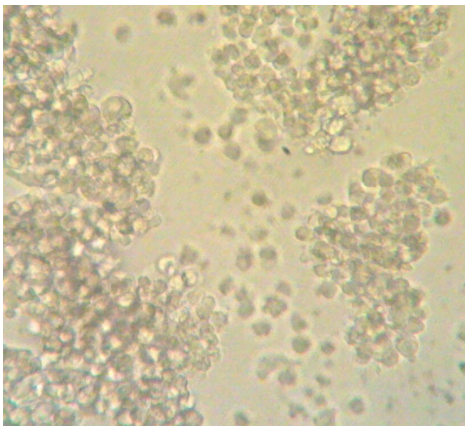
نمودار۱ : همانندسازی ویریون‌های SCR روی رده‌های مختلف‌سلولی

www.SID.ir

Archive of SID



الف) سلول‌های آلوده شده به ویریون‌های SCR



ب) سلول‌های طبیعی

شکل ۲ : سنسشیوم‌های تشکیل شده بر اثر همانندسازی ویریون‌های SCR در سلول‌های MT-2

دلیل اثر سینرژیستی pmzNL4-3 و pSPAX.2 در تولید ویروس و یا فعال شدن بیش از حد پروموتور LTR باشد.

بررسی میزان همانندسازی یک دوره‌ای و عفونت‌زایی ویریون‌های نسل دوم

همانندسازی ویروس‌های SCR در سلول‌های HEK بسیار خوب و افزایش معنی‌دار میزان P24 سوپ، ۲۴ ساعت پس از آلودگی مشاهده شد. توان آلوده‌کنندگی ویریون‌های SCR برای سلول‌های طحالی به عنوان سلول‌های طبیعی موش بسیار ارزشمند است. میزان افزایش P24 سوپ سلول‌های طحالی خفیف بود و با توجه به ماهیت این سلول‌ها به عنوان سلول‌های طبیعی میرا قابل توجیه است. همان‌طوری که در نمودار یک دیده می‌شود؛ ویریون‌های SCR سودوتایپ شده با VSVG در تمامی سلول‌های آزمون، همانندسازی خود را کامل کردند. همچنین هیچ افزایشی در میزان تیتر P24 سوپ سلول‌های MT-2 آلوده شده به ویروس‌های نسل دوم SCR تا ۲۰ روز بعد از آلودگی مشاهده نشد.

بررسی میزان تشکیل سنسشیوم

تشکیل سنسشیوم توسط سلول‌های MT-2 به دنبال همانندسازی ویریون‌های SCR روی این سلول‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. تشکیل سنسشیوم‌ها که گویای همانندسازی ویریون‌های SCR می‌باشد؛ در گروه سلول‌های آلوده شده به ویریون‌های SCR HIV ۶۰ برابر گروه کنترل منفی بود.

بحث

دستیابی به واکسن HIV و ترکیبات ضدویروسی مؤثر در درمان یا پیشگیری از ابتلاء به ویروس عامل AIDS ؛ هنوز بخش قابل توجهی از تحقیقات علمی را دربرمی‌گیرد. فراهم ساختن سطح مناسبی از ایمنی زیستی برای انجام تحقیقات آزمایشگاهی روی HIV یکی از دغدغه‌های محققان در کشورهای در حال توسعه است. در مطالعه حاضر ابزاری طراحی شد تا در این نوع مطالعات آزمایشگاهی احتمال آلودگی به میزان بسیار بالایی کاهش یابد. وکتورهای سنتی لنتی ویروسی خود غیرفعال شونده (SINL) که حاوی حذف گسترده در توالی U3 خود می‌باشد؛ در مطالعات با هدف انتقال ژن (Gene delivery) طراحی شده و کاربرد دارند (۶و۷). طی پروسه نسخه‌برداری معکوس، توالی حاوی جهش حذفی در '3 و '5 LTR ها نسخه‌برداری شده و سپس در ژنوم سلول‌های میزبان ادغام (Integrate) می‌گردد (۷و۹). در حقیقت DNA ادغام شده حاوی LTR طبیعی (Native) نمی‌باشد و در نتیجه قادر به بسته‌بندی شدن (Packaging) در ویریون‌های جوانه‌زده بعدی نیست (۶و۷و۹). با درنظرگرفتن این نکته وکتورهای سنتی ویروسی نوترکیب از لحاظ ایمنی زیستی در سطح بهتری هستند. زیرا به گونه عفونی تبدیل نشده و به شکل فعال باز نخواهند گشت (۷و۸و۱۰). ما در این مطالعه اقدام به طراحی، تولید و بررسی عملکرد بیولوژیک ویریون‌های HIV با قابلیت یکبارهمانندسازی (SCR HIV)

www.SID.ir

Archive of SID

نمودیم. همان‌گونه که در شکل ۲ دیده می‌شود؛ ویریون‌های SCR HIV به وسیله ترانسفکشن سه پلاسمید pSPAX2، pmzNL4-3 و pMD2.G در سلول‌های HEK 293T تولید می‌شود و به صورت یک ویریون که قادر است؛ فقط یک سیکل همانندسازی انجام دهد؛ بسته‌بندی شده و از غشاء سلول جوانه می‌زند. ویریون‌های SCR HIV حاوی RNA ژنومی معیوب در توالی‌های ژن RT و IN می‌باشند (شکل یک). پرووریوس‌های نوترکیب یاد شده منجر به تولید ویریون‌های بدون آنزیم RT و IN می‌شوند. این ویریون‌ها که حاصل تکثیر ویریون‌های SCR HIV می‌باشند (نسل دوم) غیرفعال می‌باشند (نمودار یک). پدیده SCR HIV مشابه وکتورهای سنتی ویروسی خودغیرفعال شونده (SINL) می‌باشد؛ با این تفاوت که پرووریوس ویریون‌های SCR برخلاف وکتورهای SINL توان تولید RNA قابل بسته‌بندی را دارد.

وکتورهای رتروویروسی SINL حاوی آنتی‌ژن‌های HIV/ SIV و ویریون‌های تخفیف حدت یافته (attenuated) HIV یا SIV به عنوان واکسن‌های محافظت کننده (protective) و درمانی (therapeutic) نتایج موفقیت‌آمیزی در مطالعات از خود نشان داده‌اند (۶و۷و۲۲و۲۴). Negri در سال ۲۰۰۷ مطالعاتی روی ایمنوژنیسیته لنتی ویروس‌های SINLکه حاوی ژن گلیکوپروتئین‌های سطحی HIV بودند؛ انجام داد. نتایج آن مطالعه نشان داد که پاسخ هومورال و سلولار قابل توجهی علیه این آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس راه‌اندازی شده است (۱۱). در تحقیق دیگری Buffa نشان داد که وکتور لنتی ویروسی با توالی‌های کدکننده ناحیه Gag بسیارایمنوژن بوده است (۱۲). در مطالعه دیگر Reynolds در سال ۲۰۰۸ یک واکسن تخفیف حدت یافته SIV را با ویروس SIV هترولوگ پاتوژن مورد چالش (Challenge) قرار داد و نتایج کاهش قابل توجهی در میزان بار ویروسی (Viral load) در میمون‌هایی که واکسن دریافت کرده بودند را نشان داد (۱۶). این مطالعات نشانگر پتانسیل بالای وکتورهای لنتی ویروسی خودغیرفعال شونده و ویریون‌های تخفیف حدت‌یافته برای راه‌اندازی پاسخ ایمنی می‌باشد. ویریون‌های SCR HIV طراحی شده در مطالعه حاضر همانند ویریون‌های تخفیف حدت‌یافته قادر به تکثیر می‌باشند؛ اما طی یک سیکل آن قابلیت همانندسازی خود را به طور کامل از دست می‌دهند. این ویژگی آنها را از ویریون‌های HIV ضعیف شده (attenuated) که قادر به ادامه تکثیر به میزان نامحدود هستند؛ متمایز می‌سازد. در حقیقت ویریون‌های حاصل از همانندسازی SCR HIV (ویریون‌های نسل دوم) حاوی تمام پروتئین‌های ویروسی در شکل فعال خود، به‌جز آنزیم‌های رونویسی معکوس(RT) و اینتگراز (IN) می‌باشند. با در نظر گرفتن این ویژگی‌ها ویریون‌های SCR HIV گزینه مناسبی برای مطالعات واکسن HIV در آینده می‌باشد.

مزایای زیادی برای واکسن‌های با ساختار (VLP) ذکر شده است. برای مثال آنتی‌ژن‌های گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروسی (ENV) در فرم و ساختار طبیعی خود قادرند تا پاسخ ایمنی گسترده‌ای را راه‌اندازی کنند؛ در حالی که در فرم‌های دیگر با ساختار غیرطبیعی خود چنین ایمنوژنیسیته‌ای نخواهند داشت (۲۶و۲۷). نتایج بررسی تشکیل سنسیشیوم در مطالعه حاضر نشانگر این مسأله می‌باشد که در اثر آلوده شدن سلول‌های هدف با ویریون‌های SCR آنتی‌ژن‌های ENV به احتمال زیاد عملکرد بیولوژیک (Functional) و در شکل ساختاری طبیعی خود را دارا هستند (شکل ۲). لذا می‌توان امیدوار بود که ویریون‌های SCR HIV احتمالاً کاندید مناسبی برای مطالعات واکسن‌های هومورال باشند. مطالعات اولیه در مورد ایمنوژنیسیته ویریون‌های SCR توسط ما در گروه هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران در حال انجام است. آزمایشاتی نظیر بررسی میزان همانندسازی ویروس، بررسی میزان اثر سایتوپاتیک ویروس و بررسی تشکیل سنسیشیوم، برای مطالعه ترکیبات دارویی ضدرتروویروسی روی چرخه زندگی ویروس مورد نیاز می‌باشد (۲۰و۲۱و۲۳). تنها ویریون‌های دارای قابلیت همانندسازی می‌توانند؛ در این نوع آزمایشات به‌کار روند. استفاده از کلون‌های ویروس وحشی HIV به دلیل عفونی بودن دربردارنده خطرات زیادی از نظر آلودگی محققین و محیط کار می‌باشند. همان‌گونه که ذکر شد؛ ویریون‌های SCR HIV طراحی شده در این مطالعه قادر به همانندسازی می‌باشند؛ اما بعد از یک سیکل تکثیر به احتمال زیاد غیرعفونی شده و توانایی همانندسازی را ندارند.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده آن است که ویریون‌های SCR HIV سودو تایپ شده با گلیکوپروتئین سطحی ویروس وزیکولار استوماتیت (VSVG) قادرند تا سلول‌های طبیعی(native) و رده‌های سلولی (line) انسانی و غیرانسانی را آلوده سازند. این ویژگی‌ها محققین را قادر می‌سازد که به کمک ویریون‌های SCR HIV طیف گسترده‌ای از مطالعات ویروس‌شناسی را با احتمال خطر بسیار پایین‌تری به انجام رسانند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب انستیتو پاستور ایران و در قالب پایان‌نامه برای اخذ درجه دکترای تخصصی (PhD) ژنتیک مولکولی بود. بدین‌وسیله از زحمات همکارگرامی جناب آقای دکتر کیهان‌آزادمنش که با راهنمایی‌های تکنیکی ما را در انجام این طرح تحقیقاتی یاری رساندند؛ صمیمانه قدردانی می‌شود.

References

1. Anglaret X. [Global AIDS epidemic: from epidemiology to universal treatment]. Rev Med Interne. 2008 Dec;29 Suppl 3:S269-73. [Article in French]

2. World Health Organization. AIDS epidemic update. UNAIDS, Geneva, Switzerland. December 2007. Available at: data.unaids.org/pub/epislides/2007/2007_epiupdate_en.pdf

3. Katzman M, Sudol M, Pufnock JS, Zeto S, Skinner LM. Mapping target site selection for the non-specific nuclease activities of retroviral integrase. Virus Res. 2000 Jan;66(1):87-100.

4. Cook PR. A model for reverse transcription by a dimeric enzyme. J Gen Virol. 1993 Apr;74 (Pt 4):691-7.

5. Sakuragi J, Iwamoto A, Shioda T. Dissociation of genome dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1. J Virol. 2002 Feb; 76(3):959-67.

6. Miyoshi H, Blömer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Development of a self-inactivating lentivirus vector. J Virol. 1998 Oct; 72(10):8150-7

7. Bayer M, Kantor B, Cockrell A, Ma H, Zeithaml B, Li X, et al. A Large U3 Deletion Causes Increased In Vivo Expression from a Nonintegrating Lentiviral Vector. Mol Ther. 2008 Dec; 16(12): 1968-76.

8. Logan AC, Haas DL, Kafri T, Kohn DB. Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration. J Virol. 2004 Aug;78(16):8421-36.

9. Mukherjee S, Lee HL, Pacchia AL, Ron Y, Dougherty JP. A HIV-2-based self-inactivating vector for enhanced gene transduction. J Biotechnol. 2007 Jan 20;127(4):745-57.

10. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. J Virol. 1998 Dec;72(12):9873-80.

11. Negri DR, Michelini Z, Baroncelli S, Spada M, Vendetti S, Buffa V, et al. Successful immunization with a single injection of non-integrating lentiviral vector. Mol Ther. 2007 Sep;15(9):1716-23.

12. Buffa V, Negri DR, Leone P, Borghi M, Bona R, Michelini Z, et al. Evaluation of a self-inactivating lentiviral vector expressing simian immunodeficiency virus gag for induction of specific immune responses in vitro and in vivo. Viral Immunol. 2006 Winter;19(4):690-701.

13. Wodarz D. Immunity and protection by live attenuated HIV/SIV vaccines. Virology. 2008 Sep 1;378(2):299-305.

14. Amara RR, Patel K, Niedziela G, Nigam P, Sharma S, Staprans SI, et al. A combination DNA and attenuated simian immunodeficiency virus vaccine strategy provides enhanced protection from simian/human immunodeficiency virus-induced disease. J Virol. 2005 Dec;79(24):15356-67.

15. Karpenko LI, Nekrasova NA, Ilyichev AA, Lebedev LR, Ignatyev GM, Agafonov AP, et al. Comparative analysis using a mouse model of the immunogenicity of artificial VLP and attenuated Salmonella strain carrying a DNA-vaccine encoding HIV-1 polyepitope CTL-immunogen. Vaccine. 2004 Apr 16; 22(13-14):1692-9.

16. Reynolds MR, Weiler AM, Weisgrau KL, Piaskowski SM, Furlott JR, Weinfurter JT, et al. Macaques vaccinated with live-attenuated SIV control replication of heterologous virus. J Exp Med. 2008 Oct 27;205(11):2537-50.

17. Rezaei A, Zabihollahi R, Salehi M, Moghim SH, Tamizifar H, Yazdanpanahi N, Amini G. Designing a non-virulent HIV-1 strain: Potential implications for vaccine and experimental research. Journal of Research in Medical Sciences. 2007; 12(5): 227-34.

18. Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, et al. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. J Virol. 1986 Aug;59(2):284-91.

19. Campbell EM, Perez O, Melar M, Hope TJ. Labeling HIV-1 virions with two fluorescent proteins allows identification of virions that have productively entered the target cell. Virology. 2007 Apr 10;360(2):286-93.

20. Cavrois M, Neidleman J, Yonemoto W, Fenard D, Greene WC. HIV-1 virion fusion assay: uncoating not required and no effect of Nef on fusion. Virology. 2004 Oct 10;328(1):36-44.

21. Svarovskaia ES, Barr R, Zhang X, Pais GC, Marchand C, Pommier Y, et al. Azido-containing diketo acid derivatives inhibit human immunodeficiency virus type 1 integrase in vivo and influence the frequency of deletions at two-long-terminal-repeat-circle junctions. J Virol. 2004 Apr;78(7):3210-22.

www.SID.ir

Archive of SID

22. Bower JF, Yang X, Sodroski J, Ross TM. Elicitation of neutralizing antibodies with DNA vaccines expressing soluble stabilized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers conjugated to C3d. J Virol. 2004 May;78(9):4710-9.

23. Bower JF, Sanders KL, Ross TM. C3d enhances immune responses using low doses of DNA expressing the HIV-1 envelope from codon-optimized gene sequences. Curr HIV Res. 2005 Apr;3(2):191-8.

24. Morgan JR, LeDoux JM, Snow RG, Tompkins RG, Yarmush ML. Retrovirus infection: effect of time and target cell number. J Virol. 1995 Nov;69(11):6994-7000.

25. Rui-Rui Wanga, Qiong Gub, Yun-Hua Wanga, Xue-Mei Zhangb, Liu-Meng Yanga, Jun Zhoub, et al. Anti-HIV-1 activities of compounds isolated from the medicinal plant Rhus chinensis. Ethnopharmacology. 2008;117(2):249-56.

26. Madani N, Hubicki AM, Perdigoto AL, Springer M, Sodroski J. Inhibition of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein- mediated single cell lysis by low-molecular-weight antagonists of viral entry. J Virol. 2007 Jan;81(2):532-8.

27. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. Nature. 2001 Apr 19;410(6831):980-7.

www.SID.ir