

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

سامان رحمتی<sup>۱</sup>، محسن کریمی‌ارزنانی<sup>۲</sup>، کاظم پریور<sup>۱</sup>، مهدی کدیور<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، <sup>۲</sup> بخش پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران، <sup>۳</sup> 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 حامل‌های لنتی ویروسی انجام می‌شود. یکی از مهم‌ترین فاکتورهای 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 نو ترکیب 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

<sup>۴</sup> نویسنده مسئول: دکتر مهدی کدیور، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوشیمی

Email: Kadivar@pasteur.ac.ir



## مقدمه

سایر فاکتورها عمل می‌کند و در بیان انواع مختلفی از ژن‌های مختص به این سلول‌ها نقش دارد (۸ و ۷). در میان حامل‌های ویروسی، لنتی ویروس‌ها دارای مزایایی جهت استفاده در ژن درمانی از جمله ارابه موثر ژن‌ها به انواع متفاوت سلول‌های هدف، عدم ایجاد واکنش‌های ایمنی ناخواسته در میزبان و میزان بالای بیان ژن می‌باشند (۹ و ۱۰).

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 و ۱۱). 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 رده سلولی HEK293T Human embryonic kidney تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به عنوان میزبان یوکاریوتی بیان ژن استفاده شد. سلول‌های HEK293T یکی از رده‌های سلولی می‌باشد که مورفولوژی سلول‌های اپیتلیال را دارند و به عنوان یکی از بهترین رده‌های سلولی برای بیان ژن‌های نوترکیب و تولید انواع ویروس‌ها می‌باشند.

دیابت ملیتوس از شایع‌ترین 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 روزانه 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 گلیسمیا 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 مزانشیمی برای تمایز آن‌ها به سلول‌های تولید کننده انسولین معطوف شده است و مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان یا سایر بافت‌ها می‌توانند در شرایط *in vivo* و *in vitro* به سلول‌های بیان کننده انسولین تمایز یابند (۴ و ۵). 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 تمایز سلول‌های بتا در بالا دست

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 *pIRES2-EGFP-pdx-1*، 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 نو ترکیب *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 آنزیمی تأیید 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

از پلاسمید pcDNA3.1-pdx-1 حاوی ژن *pdx-1*، حامل pSINTREM و اجد ژن‌های لنتی ویروسی، حامل *pIRES2-EGFP* و اجد 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*) و توالی الیگونوکلوتیدی پرایمر Reverse به صورت 5'-GGATCCGCTCACCTCAGACTGCTG-3' (ناحیه خط کشی شده مربوط به جایگاه برشی *IBamH*) بود. PCR با شرایط دمایی و اسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل به ترتیب با دمایی و اسرشت سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و دمایی اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و سپس دمایی 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 دمایی اتاق انجام گرفت. سپس ۵ میکرولیتر از محصول اتصال برای ترانسفورم کردن باکتری‌های مستعد (*Invitrogen*) Top10F به روش شوک حرارتی استفاده شد. در نهایت تعداد ۱۰ عدد از کلونی‌های سفید از میان کلون‌های سفید و آبی انتخاب شد و پس

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 بافر PBS<sup>(۲)</sup> 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 بافر SAP<sup>(۳)</sup> 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 آرامی میکروتیوب حاوی سلول‌ها و رتکس 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

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 آنزیمی و 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، در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شد. این سلول‌ها در محیط DMEM<sup>(۱)</sup> 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 لپو 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 دستگاه BD FACsort، 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

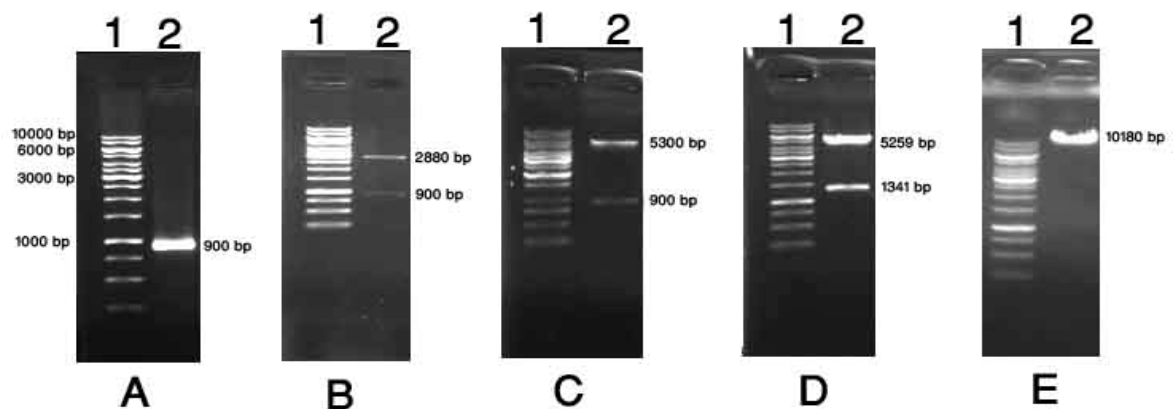
1-Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)  
2-Phosphate Buffer Saline (PBS)  
3-Saponin (SAP)

آنزیمی، با آنزیم *XhoI* جهت خطی کردن وکتور نو ترکیب 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<sup>(۱)</sup> می‌باشد (تصویر ۲).

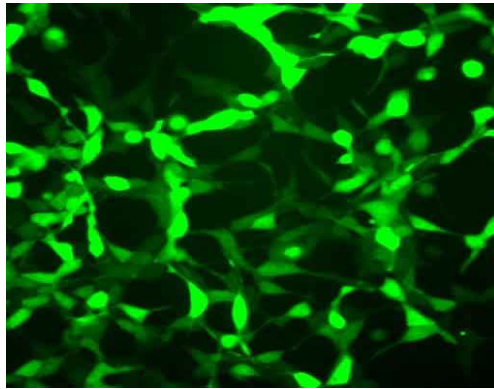
چگونگی تولید پروتئین GFP و بیان ژن *pdx-1* در سلول‌های ترانسفکت شده با سازه نو ترکیب نهایی و عدم بیان آنها در سازه اولیه با استفاده از روش فلوسایتمتری در تصویر ۳ نشان داده شده است.

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 آنزیمی دوگانه *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

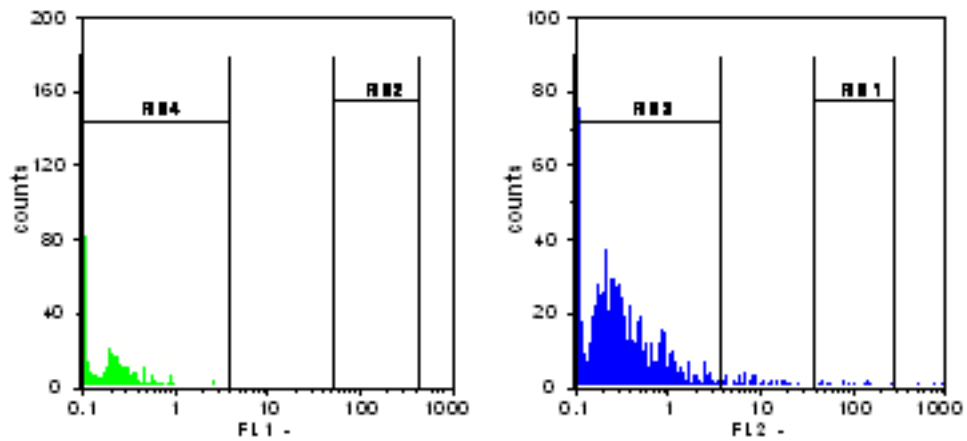


**تصویر ۱:** الکتروفورس محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز. A: ستون ۱، مارکر ۱ kb، ستون ۲، محصول PCR ژن *pdx-1* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و سازه مرجع *pcDNA3.1-pdx-1* (قطعه ۹۰۰ bp)؛ ستون ۱، مارکر ۱ kb، ستون ۲، تأیید وجود ژن *pdx-1* درون ناقل *pTG19-T* با استفاده از هضم آنزیمی دو گانه با *SacII* و *BamHI* (ایجاد قطعات ۲۸۸۰ bp و ۹۰۰ bp)؛ C: ستون ۱، مارکر ۱ kb، ستون ۲، تأیید سازه نو ترکیب *pIRES2-EGFP-pdx-1* با استفاده از هضم آنزیمی دو گانه با *SacII* و *BamHI* (ایجاد قطعات ۵۳۰۰ bp و ۹۰۰ bp)؛ D: ستون ۱، مارکر ۱ kb، ستون ۲، تأیید سازه نو ترکیب *pTRE-CMV-pdx-1-IRES-EGFP* با استفاده از هضم آنزیمی دو گانه با *BamHI* و *XhoI* (ایجاد قطعات ۵۲۵۹ bp و ۱۳۴۱ bp)؛ E: ستون ۱، مارکر ۱ kb، ستون ۲، تأیید سازه نو ترکیب نهایی *pSINTREM-TRE-CMV-pdx-1-IRES-EGFP* با استفاده از هضم آنزیمی با *XhoI* (ایجاد قطعه ۱۰۱۸۰ bp).

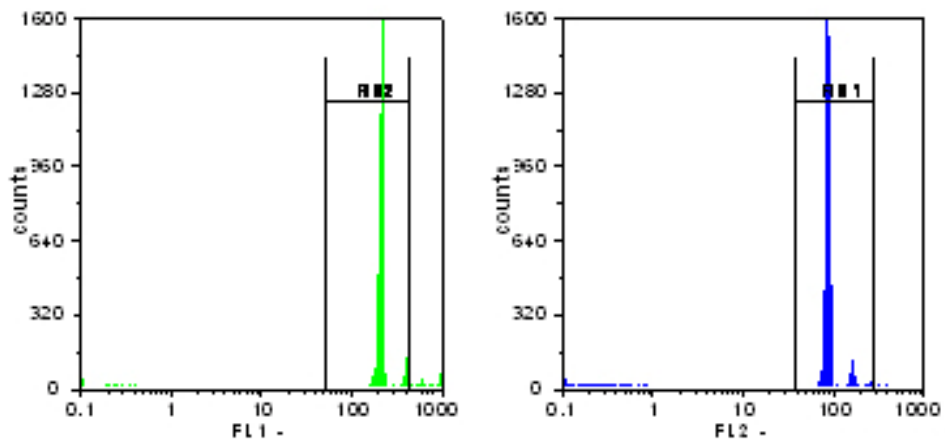
1-Green Fluorescent Protein (GFP)



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



A)



B)

تصویر ۳: نتایج آنالیز فلوسایتومتری پس از ترانسفکشن سازه اولیه و سازه نهایی A: سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده با سازه اولیه فاقد ژن pdx-1 و ژن GFP (pSINTREM) پس از گذشت ۴۸ ساعت از ترانسفکشن. B: سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده با سازه نوترکیب نهایی 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.





## بحث

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 مگالو ویروس 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 vitro* و *in vivo* 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

با توجه به نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای تمایز آنها به سلول‌های تولید کننده انسولین (۵) و هدف این مطالعه بهینه‌سازی سازه لنتی ویروسی (۴)، 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

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.

## 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  $\beta$ -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  $\alpha$ - to- $\beta$ -cell reprogramming by forced Pdx1 expression. *Genes Dev* 2011; 25(16):1680-5.
9. Naldini L, Blomer 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.

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

Rahmati S<sup>1</sup>, Karimi Arznani M<sup>2</sup>, Parivar K<sup>1</sup>, Kadivar M<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, <sup>2</sup> Department of Molecular Medical, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, <sup>3</sup> 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