

مطالعه و ارزیابی استفاده از لنتی ویروس ها به عنوان حامل های انتقال دهنده ژن در سلول های فیبروبلاست انسانی (HDFs)

مهدی اله بخشیان فارسانی^۱، پیام قاسمی دهکردی^۱، نرگس عبدیان^۱، سمیه خسروی فارسانی^۱، امین میرزائیان^۲، مسعود نصری^۱، علیرضا کریمی طاقانکی^۳، گشتاسب مردانی^۴، سیده بهشته امیری^۱، مرتضی هاشم زاده چالستری^{۱*}

^۱مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران؛ ^۳مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۴مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۲۸

چکیده:

زمینه و هدف: سلول های بنیادی پرتوان القایی (Induced pluripotent stem cells= iPSc) سلول های اولیه و تمایز نیافته ای هستند که قادر به ایجاد تقریباً هر نوع سلولی در بدن می باشند. هدف از پژوهش حاضر تولید و استفاده مؤثر از وکتور لنتی ویروسی TetO-FUW-OSKM جهت انتقال ژن ها به سلول های فیبروبلاست انسانی (Human fibroblast cells= HDFs) و در نهایت ارزیابی عملکرد این وکتور بود. روش بررسی: در این مطالعه تجربی پس از جداسازی و کشت سلول های HDF، وکتور لنتی ویروسی TetO-FUW-OSKM (به عنوان پلاسمید انتقال دهنده) حاوی ژن های برنامه ریزی مجدد همراه با پلاسمیدهای PsPAX2 و PMDG2 (به عنوان پلاسمیدهای کمکی لازم برای بسته بندی ویروس) به لاین سلولی HEK-293T جهت تولید ویروس ها ترانسفکت شدند. محیط رویی سلول های HEK-293T حاوی ویروس های تولید شده پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت برداشت شد و این ویروس ها جهت برنامه ریزی مجدد سلول های HDF به این سلول ها ترانس داکت گردیدند. یافته ها: نتایج این مطالعه نشان دهنده تولید موفقیت آمیز وکتور لنتی ویروسی TetO-FUW-OSKM، کارایی مؤثر روش انتقال ژن با استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی و بیان مناسب فاکتورهای رونویسی در سلول های HDF پس از ترانس داکشن بود. نتیجه گیری: با توجه به این یافته ها می توان از وکتورهای لنتی ویروسی جهت انتقال ژن و برنامه ریزی مجدد سلول های بالغ از قبیل HDF در مطالعات بعدی و تولید سلول های iPS استفاده کرد.

واژه های کلیدی: سلول های فیبروبلاست انسانی، وکتور لنتی ویروسی TetO-FUW-OSKM، برنامه ریزی مجدد، سلول های بنیادی پرتوان القایی، RT-PCR.

مقدمه:

که سبب بیان مداوم ژن ها در سلول های میزبان می شوند. با حذف بخشی از ژن های بیماری زا و همچنین ژن های غیر ضروری برای انتقال ژن، وکتورهای لنتی ویرال نسل سوم تولید می شوند که ایمن و مناسب اهداف انتقال ژن های نو ترکیب می باشند (۱، ۲).

وکتورهای لنتی ویرال قابلیت انتقال ژن های نو ترکیب به سلول های در حال تکثیر و سلول های خفته را دارند. سلول های هدف وکتورهای لنتی ویرال طیف وسیعی

وکتورهای مختلفی جهت انتقال ژن ها در فرآیندهای دستکاری ژنتیکی سلول ها مورد استفاده قرار می گیرند. این وکتورها شامل باکتروفاژها، پلاسمیدها، لنتی ویروس ها، وکتورهای هرپس سیمپلکس و سایر ناقل های انتقال ژن می باشند که نحوه آلوده سازی و وارد شدن آن ها به سلول و همچنین پایداری آنها در سلول میزبان با یکدیگر متفاوت می باشد. یکی از مناسب ترین وکتورها برای انتقال و بیان ژن های نو ترکیب، وکتورهای لنتی ویرال می باشند

از سلول ها، از جمله سلول های دستگاه اعصاب مرکزی، شبکه، سلول های فیروبلاست، سلول های عضلات اسکلتی و قلبی، سلول های غدد درون ریز، کبدی و همچنین سلول های بنیادی مختلف می باشند. از این رو تقریباً هر سلولی را می توان به شکل مؤثری با استفاده از آن ها مورد هدف قرار داد (۴،۳).

سلول های بنیادی پرتوان القایی یا (Induced pluripotent stem cells= iPSCs) سلول های ابتدایی و تمایز نیافته ای هستند که به صورت بالقوه توانایی تکثیر بالایی دارند و می توانند با فعالیت خود نوزایی شان سلول های کاملاً شبیه به خود را ایجاد نمایند. با توجه به پتانسیل تمایزی و میزان اولیه بودن، این سلول ها قابلیت تبدیل به رده های مختلف سلولی را خواهند داشت. این سلول ها پس از تمایز می توانند وظایف ویژه ای را در بافت های مختلف انجام دهند. چنین خصوصیت های برجسته ای جایگاهی ویژه را به این سلول ها در ژن درمانی و درمان های احیاء کننده پزشکی، بخشیده است (۳،۵). در سال های اخیر پیشرفت های چشمگیری در دانش سلول های بنیادی با برنامه ریزی مجدد (R eprogramming) سلول های سوماتیک بالغ و تمایز یافته مانند سلول فیروبلاست انسانی (HDF) به یک سلول iPS صورت پذیرفته است. سلول های iPS، سلول هایی با ویژگی های بسیار مشابه با سلول های بنیادی رویانی (ESCs =Embryonic stem cells= ESCs) هستند و در عین حال مشکلات اخلاقی ناشی از تهیه سلول های بنیادی رویانی را ندارند و همچنین امکان رد پیوند این سلول ها توسط سیستم ایمنی میزبان به دلیل استفاده از سلول های سوماتیک خود فرد که به عنوان منبع تولید سلول های پرتوان القایی استفاده شده اند، وجود ندارد. از این رو تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی انسان یا (human Induced pluripotent stem cells= hiPSCs) انقلاب بزرگی در مطالعات سلول های بنیادی بود و استنباط دانشمندان را در خصوص چگونگی برنامه ریزی سلولی به شدت تحت تأثیر قرار داد (۶). از جمله خصوصیت این سلول ها که سبب مشابهت این سلول ها با سلول های بنیادی

رویانی می شود می توان توانایی تکثیر زیاد و طولانی مدت (۷)، فعالیت بالای تلومراز و آلکالین فسفاتاز (۸)، افزایش بیان در انکوژن هایی مانند MYC و KLF4 (۹، ۱۰) و تشابه های ساختاری در الگوهای بیان ژن (۱۱-۱۳)، شکل کلونی سلولی و همین طور الگوی اپی ژنتیک این سلول ها اشاره کرد (۱۴). به علاوه این سلول ها مارکرهای حالت پرتوانی را از جمله مارکرهای سطح سلولی مانند SSEA-3، SSEA-4، TRA-1-60، TRA-1-81 و فاکتورهای رونویسی SOX2، NANOG و OCT4 بیان می کنند (۱۵).

به منظور ایجاد سلول های بنیادی پرتوان القایی از سلول های سوماتیک بالغین چندین فاکتور رونویسی جهت برنامه ریزی مجدد آن ها استفاده می شود. وکتورهای لنتی ویرال به دلیل قابلیت درج ژنومی و یکی شدن ماده ژنتیکی آن ها (Insertion) در ژنوم سلول هدف قادر خواهند بود برای زمان های طولانی ژن نوترکیب را بیان نمایند. همچنین مطالعات مختلف نشان دهنده ی قابلیت بسیار بالای لنتی ویروس ها از نظر درصد سلول های ترانس داکت شده و میزان بیان ژن های انتقال یافته می باشد. دو دسته وکتورهای لنتی ویروسی شامل فاکتورهای OCT4، SOX2، C-MYC و KLF4 (TetO-FUW-OSKM) توسط Yamanaka و همکاران و همچنین OCT4، SOX2، NANOG و LIN28 به وسیله ی Thomson و همکاران جهت برنامه ریزی مجدد سلول های سوماتیک انسانی و ایجاد سلول های بنیادی پرتوان القایی (iPSc) معرفی و استفاده شده است (۱۶). در مطالعه حاضر کارایی وکتور لنتی ویروسی حاوی ژن های OCT3/4، SOX2، KLF4 و C-MYC جهت برنامه ریزی مجدد سلول های فیروبلاست انسانی جدا شده از نمونه های پوست ختنه گاه (Foreskin)، مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی:

مطالعه حاضر از نوع تجربی بود و با هدف استفاده از وکتور لنتی ویروسی TetO-FUW-OSKM حاوی ژن های OCT3/4، SOX2، KLF4 و C-MYC

همکاران گرفته شد (۱۷) و صحت اتصال پرایمرها به توالی ژن های مربوطه با استفاده از نرم افزار Oligo و نرم افزار DNASTAR Lasergene 10 (۱۸) مورد بررسی قرار گرفت (جدول شماره ۱).

به منظور برنامه ریزی مجدد سلول های HDF و ارزیابی عملکرد وکتورها، صورت پذیرفت. توالی ژن های OCT4، SOX2، C-MYC و همچنین ژن GAPDH به عنوان کنترل مثبت RT-PCR ابتدا از سایت NCBI گرفته شد. توالی پرایمر ژن ها از مقاله Takahashi و

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای SOX2، OCT4، C-MYC و GAPDH جهت تکثیر این ژن ها

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه (bp)
SOX2-F	5'-ACAGATGCAACCGATGCACC-3'	۵۳
SOX2-R	5'-TGGAGTTGTACTGCAGGGCG-3'	
OCT4-F	5'-ACATCGCCAATCAGCTTGG-3'	۵۱
OCT4-R	5'-AGAACCATACTCGAACCACATCC-3'	
C-MYC-F	5'-GGCTGGAGATGTTGAGAGCAA-3'	۵۲
C-MYC-R	5'-AAAGGAAATCCAGTGGCGC-3'	
GAPDH-F	5'-TTCACCACCATGGAGAGGGC-3'	۵۲
GAPDH-R	5'-CCCTTTGGCTCCACCCT-3'	

psPAX، pMD2.G و OCT-GFP جهت تأیید آنها انجام شد و نتایج برش آنزیمی با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ مشخص گردید. سپس به منظور تهیه پلاسمیدها به مقدار زیاد (Large scale) از کیت QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN®) پروتکل شرکت سازنده استفاده گردید.

جهت جداسازی سلول های HDF ابتدا نمونه های پوست ختنه گاه (Foreskin) از بیمارستان کاشانی شهرکرد در محیط انتقال (Transfer media) حاوی DMEM و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین G و استرپتومایسین به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس نمونه ها در الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفتند و با ۲ تا ۳ بار شستشو و به قطعات کوچکتر برش داده شدند. قطعات پوست بدست آمده را در محلول ۰/۲۵٪ Trypsin-EDTA (Gibco®، آلمان) به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷°C قرار داده و پس از اتمام گرمخانه گذاری (incubation) محیط رویی را خارج و مجدداً ۵ میلی لیتر محلول ۰/۲۵٪ Trypsin به رسوب اضافه می شود. پس از ۱۵ دقیقه گرمخانه گذاری در انکوباتور در دمای ۳۷°C آنزیم مورد استفاده با FBS خنثی گردید. سوپانسیون سلولی بدست آمده را پس از ورتکس و

وکتورهای psPAX و pMD2.G از آزمایشگاه

Trono و همچنین وکتورهای TetO-FUW-OSKM و OCT-GFP از Rudolf Jaenisch تهیه گردیدند.

برای تأیید پلاسمیدهای لنتی ویروسی موجود ابتدا توالی هر پلاسمید از سایت Addgene گرفته شد و توسط نرم افزار DNASTAR® Lasergene 10 جایگاه برش آنزیم های محدود کننده مشخص گردید و نقشه برش پلاسمید توسط آنزیم های موجود در آزمایشگاه به دست آمد. در ادامه با استفاده از آنزیم های HindIII، XbaI، BamHI، AflIII، PvuI، EcoRI، PvuII (همگی شرکت فرمنتاس، آلمان) اختصاصی برای هر پلاسمید، عمل برش صورت پذیرفت و محصول هضم آنزیمی هر پلاسمید با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

در مرحله اول ترانسفورماسیون پلاسمیدهای لنتی ویروسی حاوی ژن های مورد نظر با استفاده از کیت T/A Cloning (فرمنتاس، آلمان) طبق دستور العمل شرکت سازنده انجام شد. استخراج پلاسمیدها با استفاده از کیت Plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER، کره جنوبی) صورت پذیرفت. هضم آنزیمی بر روی پلاسمیدهای TetO-FUW-OSKM،

سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰ rpm به محیط کشت DMEM حاوی ۲۰٪ FBS انتقال داده و در انکوباتور ۳۷°C دارای ۵٪ CO₂ قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت میزان چسبندگی و مورفولوژی سلول های HDF بررسی گردید و گلبول های قرمز و همچنین سلول های مرده و نجسبیده از محیط رویی خارج گردید و با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS جایگزین شد. در نهایت ۴ تا ۵ روز پس از جداسازی، سلول ها آماده اولین پاساژ شدند.

به منظور تولید ویروس های لنتی حاوی ژن های مورد نظر جهت برنامه ریزی سلول های HDF از سلول های لاین HEK-293T (جدا شده از کلیه جنین انسان) به عنوان Packaging cell line استفاده گردید. ابتدا یک ویال از سلول های فریز شده HEK-293T از تانک ازت بیرون آورده شد و پس از ذوب، تمامی محیط را به ۱۰ میلی لیتر محیط جدید حاوی ۱۰٪ سرم منتقل و ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. سپس رسوب بدست آمده را در ۵ میلی لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS منتقل و در انکوباتور CO₂ با دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری شد. پس از رسیدن سلول های HEK-293T به تراکم ۸۰٪ محیط روی سلول ها جمع آوری و شستشو با PBS انجام شد. ۲۵۰ میکرولیتر ۰/۲۵٪ Trypsin/EDTA به فلاسک مربوطه اضافه و پس از جدا شدن سلول های مورد نظر، با یک میلی لیتر محیط کامل حاوی FBS فعالیت آنزیم متوقف گردید. پس از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه محیط رویی را خارج و به رسوب حاصله یک میلی لیتر محیط تازه اضافه شد. سلول بدست آمده را به کمک لام نئوبار شمارش کرده و ۸۰۰×۱۰^۳ سلول در هر پلیت ۱۰cm² کشت شد. پس از گذشت ۲ روز و رسیدن تراکم سلولی به ۸۰٪ پلیت آماده ترانسفکت جهت تولید ویروس گردید. برای تهیه ویروس های لنتی و انتقال (ترانسفکشن) آنها به سلول های هدف از بافر HBS 2X و CaCl₂ 2.5M استفاده شد. مراحل

ترانسفکشن به این ترتیب انجام شد که پس از رسیدن تراکم سلول ها به حدود ۸۰٪ محلول رویی سلول ها با محیط DMEM فاقد سرم تعویض گردید و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷°C حاوی CO₂ قرار داده شد. از آنجایی که TetO-FUW-OSKM فاقد یک Reporter مناسب بود از PW-XLD که فقط حاوی ژن GFP می باشد به عنوان گزارشگر کنترل تولید و انتقال ژن توسط ویروس (ترانس داکشن) استفاده گردید. جهت تهیه محلول ترانسفکشن از پلاسمیدهای TetO-FUW-OSKM و OCT-GFP (حاوی ژن GFP به عنوان گزارشگر) هر کدام جداگانه با غلظت ۲۲/۵ و از پلاسمیدهای psPAX و pMD2.G با غلظت به ترتیب ۱۴/۵ mg و ۷/۹ mg استفاده شد. سپس جداگانه هر محلول ترانسفکشن با ۱۱۴ میکرولیتر ۲M CaCl₂ در یک فالدون ۱۵ میلی لیتر مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. به محلول فوق ۱۱۶۰ میکرولیتر بافر HBS 2X اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس قطره قطره به پلیت حاوی سلول های HEK-293T اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت محیط رویی خارج و با محیط جدید DMEM دارای ۱۰٪ FBS جایگزین گردید. همچنین با کمک میکروسکوپ فلورسنت میزان سبز شدن سلول هایی که وکتور حاوی ژن GFP به آن ها انتقال یافته مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت در دو نوبت پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت محیط رویی را جمع آوری و سپس با فیلتر ۰/۴۵μm فیلتر کرده و به منظور تغلیظ کردن ویروس ها، با دور ۶۰۰۰۰ G به مدت ۱/۵ ساعت اولترا سانتریفیوژ انجام گردید.

به منظور بررسی تولید ویروس در محیط رویی سلول ها و همچنین تعیین حدودی مقدار پارتیکل های ویروسی از کیت الیزا HIV AB & Ag (DIA.PRO) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. به منظور ترانس داکشن سلول های HDF مقدار ۴۰۰×۱۰^۳ سلول را به هر خانه پلیت ۶ خانه اضافه کرده و یک شب در

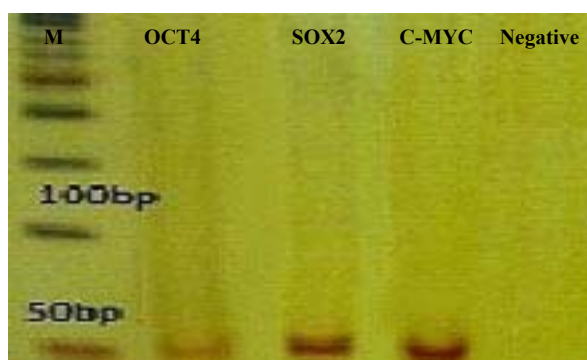
واکنش PCR از دستگاه Thermal Cycler Astec Co, Ltd: Gene Atlas استفاده شد و واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت ۲۰ نانوگرم cDNA الگو، ۲ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، یک واحد آنزیم DNA پلیماز Taq و ۲۰۰ میکرو مولار dNTP Mix انجام گرفت. همچنین شرایط دمایی جهت تکثیر ژن ها شامل یک سیکل حرارتی $95^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری $94^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $58^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $72^{\circ}C$ به مدت ۷۲ ثانیه و یک سیکل انتهایی $72^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه بود. محصولات RT-PCR به دست آمده، بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ الکتروفورز و با رنگ آمیزی نیترا ت نقره مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها:

به منظور تأیید صحت کلنی های ترانسفورم شده با پلاسمید TetO-FUW-OSKM از تکنیک Colony-PCR استفاده گردید (تصویر شماره ۱).

انکوباتور دارای CO_2 با دمای $37^{\circ}C$ قرار داده شد. پس از اینکه تراکم سلولی به ۷۰٪ رسید مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از ویروس تولید شده به HDF های کشت داده شده اضافه گردید و به مدت ۸-۱۲ ساعت در انکوباتور دارای CO_2 با دمای $37^{\circ}C$ گرمخانه گذاری شد. پس از تعویض محیط روی سلول های HDF، به هر خانه ۲ میلی لیتر محیط DMEM دارای ۱۰٪ FBS افزوده شد.

ارزیابی بیان ژن های وارد شده در سلول های HDF پس از ترانسداکشن ابتدا با تخلیص RNA سلولی و سپس تهیه cDNA و انجام RT-PCR بررسی گردید. تخلیص RNA با استفاده از کیت تخلیص RNX Plus شرکت سیناژن (سیناژن، ایران) صورت پذیرفت. نمونه های RNA بلافاصله پس از استخراج به فریزر $-70^{\circ}C$ جهت نگهداری آن ها تا مراحل بعدی منتقل گردید. برای تهیه cDNA از کیت cDNA Synthesis (Takara, Bio Inc.) Takara Kit طبق دستور العمل شرکت سازنده استفاده شد و نمونه های cDNA با استفاده از تکنیک RT-PCR تکثیر شدند. جهت انجام



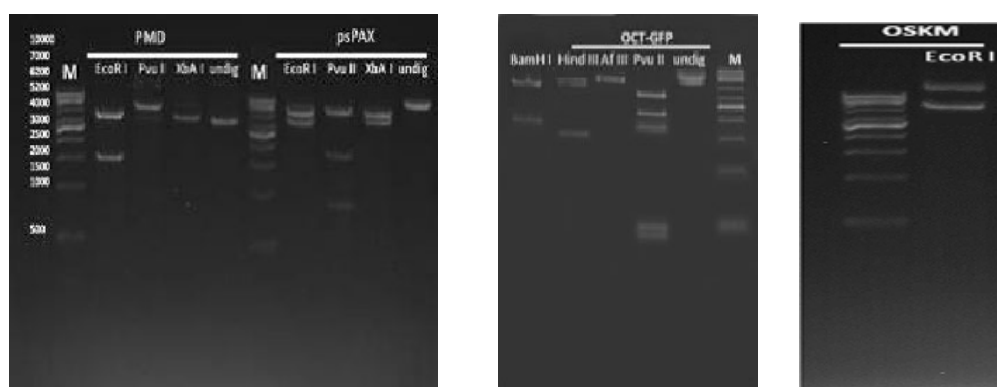
تصویر شماره ۱: تصویر قطعات تکثیر شده برای ژن های OCT_4 (۵۱ bp)، SOX_2 (۵۳ bp) و C-MYC (۵۲ bp) پلاسمید TetO-FUW-OSKM تولیدی بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ (M: مارکر با سایز ۵۰ bp (ساخت شرکت فرمتاس، آلمان)، Negative Control: نمونه کنترل منفی)

به دست آمد و سپس به کمک اطلاعات بدست آورده تعداد برش هر آنزیم بر روی هر پلاسمید مشخص گردید. نتایج به دست آمده از برش آنزیمی بر روی هر پلاسمید در جدول و تصویر شماره ۲ خلاصه شده است.

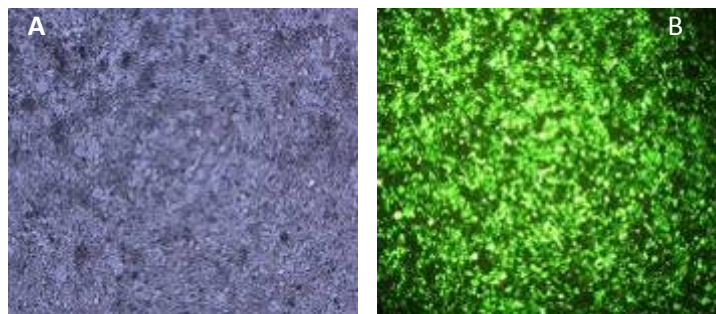
انجام هضم آنزیمی جهت تأیید هر نمونه پلاسمید با استفاده از برنامه ۱۰ DNASTAR® Lasergene ابتدا الگوی برش با آنزیم های مختلف بر روی پلاسمیدهای TetO-FUW-OSKM، pPAX، pMD2.G و OCT-GFP

جدول شماره ۲: تعداد برش های آنزیم های مختلف بر روی هر نمونه پلاسمید

پلاسمید	نام آنزیم	تعداد قطعات به دست آمده	سایز قطعات پس از هضم آنزیمی (bp)
TetO-FUW-OSKM (۱۳۴۵۷ bp)	<i>EcoRI</i>	۲	۸۳۷۶، ۵۰۸۱
	<i>psPAX</i>	۲	۶۳۳۸، ۴۳۷۴
(۱۰۷۱۲ bp)	<i>PvuII</i>	۳	۷۵۱۴، ۱۰۴۴، ۲۱۵۴
	<i>XbaI</i>	۲	۴۶۲۹، ۶۰۸۳
	<i>pMD2.G</i>	۲	۴۱۵۳، ۱۶۷۱
(۵۸۲۴ bp)	<i>PvuI</i>	۱	۵۸۲۴
	<i>XbaI</i>	۰	فاقد جایگاه برش
	<i>OCT-GFP</i>	۴	۵۸۵۸، ۴۲، ۱۲، ۱۶۳۷
(۷۵۴۹ bp)	<i>AflIII</i>	۱	۷۵۴۹
	<i>PvuII</i>	۵	۲۶۱۸، ۳۶۰، ۵۹۳، ۱۸۱۸، ۲۱۶۰
	<i>BamHI</i>	۲	۵۵۳۳، ۲۰۱۶



تصویر شماره ۲: قطعات به دست آمده از هضم آنزیمی پلاسمیدهای تخلیص شده شامل TetO-FUW-OSKM، psPAX، pMD2.G و OCT-GFP بر روی ژل آگارز ۱٪ (M: مارکر یک کیلو جفت بازی ساخت شرکت فرمتاس آلمان)



تصویر شماره ۳: سلول های لاین HEK-293T ۷۲ ساعت پس از ترانسفکت با پلاسمید OCT-GFP در حال تولید ویروس با میکروسکوپ در حالت نور معمولی (A) و فلورسانت (تولید نور سبز رنگ) (B)

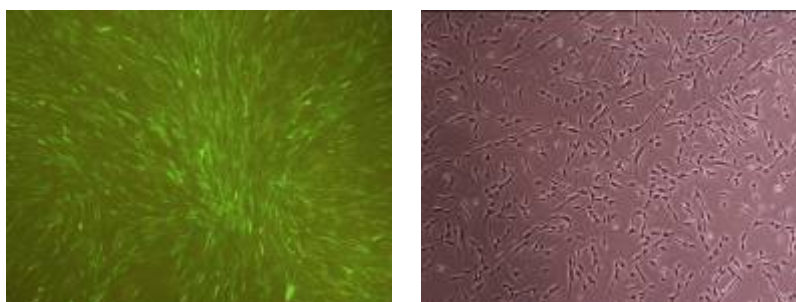
جدول شماره ۳: نتایج تست الیزا جهت تأیید ویروس های لنتی تولید شده

نمونه	شاهد (Blank)	کنترل منفی	کنترل مثبت	کالیبراتور	OCT-GFP	TetO-FUW-OSKM
جذب نوری (OD)	۰/۴۵۰	۰/۸۱۱	۳/۰۲۱	۰/۹۳۴	۳/۰۶۷	۳/۰۷۲

شاهد (Blank): فاقد هر نوع نمونه یا محلول conjugate و هر معرف تولید کننده رنگ به جز سوبسترا، کنترل منفی: فاقد هر گونه آنتی بادی یا آنتی ژن ویروس، کنترل مثبت: دارای آنتی ژن ویروس، کالیبراتور: حاوی آنتی ژن p24 با غلظت حدود ۱۰۰ پیکوگرم در هر میلی لیتر، OCT-GFP و TetO-FUW-OSKM: وکتورهای ویروسی تولید شده که در مقایسه با نمونه کنترل مثبت تولید خوبی داشته اند.

سلول های HDF بعد از جداسازی در پاساژ اول جهت برنامه ریزی مجدد مورد استفاده قرار گرفتند. پس از تولید موفق ویروس های TetO-FUW-OSKM و OCT-GFP، سلول های HDF توسط ویروس های تولید شده آلوده گردید (تصویر شماره ۴) و پس از ۴۸ ساعت با جداسازی RNA و تولید cDNA، تکثیر ژن های مورد نظر به روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت (تصویر شماره ۵).

به منظور تولید وکتورهای ویروسی لنتی از لاین HEK-293T استفاده شد که تصویر شماره ۳ نشان دهنده وکتور OCT-GFP حاوی ژن GFP به عنوان گزارشگر (تولید نور سبز) و ترانسفکشن موفقیت آمیز جهت تولید ویروس های لنتی می باشد و ۸۰-۷۰٪ این سلول ها تولید ویروس را نشان دادند. تعیین تیتراژ و تأیید ویروس های تولید شده توسط تست الیزا انجام شد. نتایج جدول شماره ۳ نشان می دهد که ویروس با تیتراژ بالا تولید شده است.



تصویر شماره ۴: سلول های HDF پس از پاساژ اول (راست) و پس از ترانسداکشن با پلاسمید OCT-GFP حاوی ژن فلورسانت (چپ)

نام ژن	Tranducted HDF	کنترل منفی
SOX ₂		
OCT ₄		
C-MYC		
GAPDH		

تصویر شماره ۵: تصویر قطعات تکثیر شده به روش RT-PCR نمونه های cDNA سنتز شده برای ژن های ویروسی تولیدی بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ (SOX₂ (۵۳ bp)، OCT₄ (۵۱ bp)، C-MYC (۵۲ bp)، GAPDH: نمونه کنترل مثبت (قطعه ۵۲ bp)، Tranducted HDF: سلول های ترانس داکت شده با ویروس و کنترل منفی: نمونه های فاقد DNA (۵۲)

بحث:

در مطالعه حاضر از وکتور لنتی ویروسی TetO-FUW-OSKM حاوی فاکتورهای SOX2، OCT3/4، KLF4 و C-MYC جهت برنامه ریزی مجدد سلول های فیروبلاست جدا شده از نمونه های Foreskin استفاده گردید. نتایج حاصل از ترانسفکشن سلول های لاین HEK-293T نشان داد که ۸۰-۷۰٪ این سلول ها ترانسفکت شده اند که بیانگر تولید موفقیت آمیز وکتور لنتی ویروسی TetO-FUW-OSKM بود. همچنین ژن های پرتوانی در سلول های HDF پس از ترانس داکشن بیان مناسبی داشتند که می تواند جهت برنامه ریزی مجدد سلول های HDF و تولید سلول های iPS با خاصیت تکثیری بالا استفاده شود.

به منظور ایجاد سلول های iPS از سلول های سوماتیک بالغین چندین فاکتور رونویسی جهت برنامه ریزی مجدد آن ها استفاده می شود. دو گروه از این فاکتورها شامل OCT4، SOX2، C-MYC و KLF4 توسط Yamanaka و همکاران و OCT4، SOX2، NANOG و LIN28 به وسیله ی Thomson و همکاران جهت برنامه ریزی مجدد سلول های سوماتیک انسانی و ایجاد سلول های iPS معرفی و استفاده شده است (۱۶). Yamanaka و همکاران در سال ۲۰۰۷ اقدام به تولید سلول های iPS از سلول های HDF با استفاده از ۴ فاکتور رونویسی شامل OCT4، SOX2، C-MYC و KLF4 نمودند و از سلول های (Mouse embryonic fibroblasts= MEF) به عنوان لایه تغذیه کننده (Feeder) جهت تولید سلول های iPS استفاده کردند (۱۷). روش پژوهش حاضر بر اساس مطالعه Yamanaka و همکاران استوار گردید و کارایی وکتور لنتی ویروسی TetO-FUW-OSKM جهت برنامه ریزی سلول ها مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین مطالعه آن ها پس از ترانسفکشن سلول های لاین HEK-293T نشان داد که در ۸۰-۷۰٪ این سلول ها ویروس تولید شده است که شبیه مشاهدات مطالعه حاضر بود. در همان زمان که Yamanaka و همکاران

تولید iPS انسانی را با استفاده از رتروویروس ها گزارش کردند، Yu و همکاران در سال ۲۰۰۷ موفق به ایجاد iPS انسانی با استفاده از روش های لنتی ویروسی جهت بیان مجموعه ی متفاوتی از فاکتورهای OCT4، NANOG، SOX2 و LIN28 شدند (۱۹). تحقیق انجام شده توسط Aoi و همکاران در سال ۲۰۰۸ موجب برنامه ریزی مجدد سلول های فیروبلاست موشی با استفاده از ویروس های Moloney که سه فاکتور از فاکتورهای OCT3/4، NANOG، SOX2 و C-MYC را بیان می کردند، گردید اما میزان کارایی این روش به طور قابل توجهی پایین بود. در مطالعه ای دیگر از آدنو ویروس برای انتقال ژن های برنامه ریزی مجدد به سلول های هدف فیروبلاست موشی استفاده شد. البته کارآمدی این روش نسبت به روش های لنتی ویروسی به طور قابل توجهی پایین تر بود (۲۰). به علاوه Aoi و همکاران در تلاشی دیگر در سال ۲۰۰۸ توانستند فیروبلاست های جنینی موشی را با استفاده از چندین ترانس فکشن موقتی با کمک دو پلاسمید بیان کننده OCT4-KLF4-SOX2 و همچنین C-MYC برنامه ریزی مجدد نمایند. اگر چه در این روش کارایی تولید سلول های iPS پایین بود اما بدون درج شدن وکتور در ژنوم بیمار به انجام رسید. این موضوع جالب توجه است که بسیاری از رده های سلولی تولید شده پس از ترانس فکشن موقتی دارای پلاسمیدهای درج شده در ژنوم سلول بودند. این موضوع پیشنهاد می کند که ادغام شدن پایدار توالی های خارجی در ژنوم سلول می تواند اتفاق افتد (۲۱). Zhao و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از وکتورهای رترو ویروسی حاوی فاکتورهای OCT3/4، NANOG، SOX2 و C-MYC اقدام به تولید سلول های iPS از سلول های فیروبلاست جدا شده از پوست گوش میمون های نر بالغ نمودند (۲۲). Ho و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه ای به بررسی برنامه ریزی مجدد سلول های

DNA غیر ویروسی است که در سال ۱۹۶۰ برای اولین بار مورد استفاده قرار گرفت. این روش بر پایه برهمکنش DNA با یون کلسیم و ایجاد رسوب استوار است. انتقال DNA در این روش به صورت اندوسیتوز انجام می شود و با اینکه بازدهی حدود ۱۰٪ دارد ولی یک روش ارزان بوده که با کمترین امکانات قابل اجرا است (۲۶،۱۷). در این تحقیق برای تولید ویروس ابتدا پلاسمیدهای تولید کننده لنتی ویروس به روش فسفات کلسیم وارد لاین سلولی HEK-293T شده و تولید ویروس توسط تست الایزا تأیید گردید. سپس ویروس های تولید شده حاوی فاکتورهای مورد نظر به سلول های HDF به منظور برنامه ریزی مجدد آن ها جهت تولید سلول های iPS ترانس داکت شد.

بازدهی پایین ریز تزریقی (Micro injection) برای انتقال ژن باعث ایجاد روش های جدید انتقال ژن گردیده است که از جمله این روش ها استفاده از لنتی ویروس ها و زیر مجموعه این خانواده رتروویروس ها می باشد. وکتورهای لنتی با توانایی انتقال DNA با بازدهی بالا به خصوص در سلول هایی که به طور فعال در حال تقسیم نیستند در این مطالعه مورد توجه قرار گرفت. انتقال و بیان ژن ها از طریق وکتورهای لنتی می تواند در سلول های هدف به صورت پایدار اتفاق افتد. تهیه وکتورهای انتقال دهنده فاکتورهای رونویسی مؤثر در برنامه ریزی مجدد سلول های میزبان، به عنوان مهمترین و اولین قدم در تولید سلول های iPS می باشد. در مطالعه حاضر نیز برای انتقال ژن های مورد نظر از لنتی ویروس استفاده شد. در این پژوهش از ژن های psPAX و pMD2.G به عنوان ژن های کمکی در انتقال و تنظیم بیان اپران وکتور لنتی ویروسی TetO-FUW-OSKM حاوی ژن های OCT3/4، SOX2، KLF4 و C-MYC استفاده شد. در این مطالعه ژن های مورد نیاز با استفاده از یک وکتور پلی سیسترونیک واحد در HDF بیان شد. این موضوع سبب می شود تا نسبت به استفاده از ۴ وکتور جداگانه

(Human umbilical vein endothelial cells= HUVEC) و تولید سلول های iPS توسط دو فاکتور غیر تومورزای OCT3/4 و SOX2 پرداختند (۲۳). پژوهش آن ها از لحاظ نوع روش مورد استفاده تا حدودی شبیه روش کار مطالعه حاضر بود با این تفاوت که در پژوهش حاضر از ویروس های لنتی جهت انتقال ژن های مورد نظر به سلول های HDF استفاده گردید. Thomson و همکاران جهت برنامه ریزی مجدد سلول های سوماتیک انسانی و ایجاد سلول های iPS فاکتورهای OCT4، SOX2، NANOG و LIN28 را معرفی و استفاده نمودند. در حالی که در مطالعه حاضر از فاکتورهای OCT3/4، SOX2، KLF4 و C-MYC برای این منظور استفاده گردید (۱۶). مطالعات زیادی در سال های اخیر بر روی ژن درمانی بتا تالاسمی با استفاده از وکتورهای آدنوویروسی، رتروویروسی و به تازگی لنتی ویروسی در طیف وسیعی از سلول ها از قبیل رده های سلولی پستانداران، سلول های بنیادی جنینی موش و سلول های بنیادی خون ساز موش و انسان صورت گرفته است (۲۴،۴). نادریان و همکاران در سال ۲۰۰۷ با ساب کلونینگ ژن آنزیم گلوکوسیروزیداز موش سوری در وکتور لنتی ویرال و انتقال آن به رده سلولی HEK نشان دادند که یکی از مناسب ترین وکتورها برای انتقال و بیان ژن های نو ترکیب، وکتور لنتی ویرال است که مطالعه حاضر نیز کارایی بالای این وکتورها را در ترانسداکشن سلول های HDF نشان داد. همچنین وکتورهای لنتی ویرال مشتق از HIV-1 قابلیت انتقال ژن های نو ترکیب را به سلول های قابل تقسیم و غیر قابل تقسیم دارند (۲۵). مطالعه بی خوف تری و همکاران در سال ۲۰۰۹ به منظور ژن درمانی بیماران بتا تالاسمی استفاده موفق لنتی وکتورها به عنوان انتقال مؤثر، کارآمد و پایدار ژن به سلول های هدف را نشان داد و آنها بیان کردند که از لنتی وکتورها در ژن درمانی بسیاری از بیماری های ژنتیکی و همچنین سرطان ها که امروزه شیوع بالایی دارند، می توان استفاده کرد (۴).

روش فسفات کلسیم یکی از روش های انتقال

ارزیابی استفاده از لنتی ویروس ها به عنوان حامل های انتقال ژن درج های ژنی (insertion) کمتری در ژنوم میزبان رخ دهد. درج های ژنی احتمال بروز بدخیمی ناشی از درج شدن های تصادفی در طول ژنوم سلول میزبان و آسیب به آن را در سلول برنامه ریزی شده افزایش می دهند. از سوی دیگر بر خلاف سایر روش هایی که از IRES (Internal ribosomal entry site) جهت بیان جداگانه ژن های مختلف از یک پروموتور استفاده می کنند، در این مطالعه از پپتیدهای 2A جهت بیان ژن های مختلف توسط یک پروموتور استفاده گردید که نسبت به IRES اندازه کوچک و کارایی بالاتری در بیان ژن های بالا دست و پایین دست پروموتور داشته و موجب می شود که حتی ژن هایی که از پروموتور فاصله ی دوری دارند به خوبی بیان شوند. این موضوع برای موفقیت در القاء برنامه ریزی در سلول هایی که ژن به آنها وارد شده است حیاتی می باشد. به علاوه استفاده از یک وکتور لنتی پلی سیسترونیک به جهت تولید تنها یک مرحله لنتی ویروس نسبت به چهار ویروس جداگانه، بسیار آسان تر است و همچنین در صورتی که ویروس وارد سلول میزبان شود می توان مطمئن شد که حتماً در یک زمان هر چهار ژن ضروری جهت برنامه ریزی مجدد در این سلول ها بیان خواهند شد (۲۶). Merkl و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از وکتورهای القایی غیر ویروسی حاوی ژن های OCT4، SOX2، C-MYC و KLF4 اقدام به تولید iPS های کارا در رت نمودند. آنها نشان دادند که برنامه ریزی مجدد سلول ها بر پایه پلاسمیدها منجر به تولید iPS های شبیه ES در رت می شود. انتقال DNA با این روش نشان دهنده درج کمتر در ژنوم سلول ها در مقایسه با استفاده از وکتورهای لنتی و رتروویروسی بود و بر خلاف استفاده از وکتورهای لنتی که بیان مداوم فاکتورهای

مهدی اله بخشیان فارسانی و همکاران

برنامه ریزی مجدد را نشان می دهند، نتایج آنها بیان کوتاه مدت این ژن ها را در سلول های رت به منظور تولید iPS نشان داد (۲۷).

نتیجه گیری:

با توجه به یافته های مطالعه حاضر وکتورهای لنتی ویروسی به دلیل قابلیت درج ژنوم خود در ژنوم سلول هدف قادر خواهند بود برای زمان های طولانی ژن های لازم جهت باقی ماندن سلول ها در حالت بنیادی را بیان کنند و همچنین به دلیل استفاده از یک وکتور لنتی پلی سیسترونیک TetO-FUW-OSKM به جای چهار وکتور ویروسی جداگانه امکان درج های خود به خودی در ژنوم سلول های HDF کاهش می یابد. با توجه به اینکه تولید وکتورهای لنتی ویروسی با تیترا بالا یکی از مهم ترین پیش نیازهای ایجاد سلول های iPS می باشد، این نتایج نشان دهنده استفاده موفق از وکتورهای لنتی ویروسی به عنوان یک روش ساده و ارزان به منظور برنامه ریزی مجدد سلول ها بود.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد (شماره گرانت: ۱۲-۱۲-۹۰) و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی به منظور فراهم نمودن امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پروژه تحقیقاتی اعلام می نمایند. همچنین از زحمات آزمایشگاه های Rudolf Jaenisch و Trono به منظور فراهم نمودن پلاسمیدها قدردانی می گردد.

منابع:

1. Delenada C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. J Gene Med. 2004; 6: 125-38.

2. Van Damme A, Chuah MK, Collen D, Vanden Driessche T. Oncoretroviral and lentiviral vector-base gene therapy for hemophilia: preclinical studies. *Semin Thromb Hemost*. 2004; 30: 185-95.
3. Naldini L, Blmer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996; 272(5259): 263-67.
4. Bikhof-Torbati M, Khanahmad H, Jamshidi F, Karimipor M, Sadeghizadeh M, Shokrgozar MA, et al. HIV type 1-based particles effect in transduction of HT1080 cell line: A technique in β -thalassemia gene therapy. *Med Sci J Islamic Azad Univ Tehran Med Branch*, 2009; 19(3): 160-67.
5. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126(4): 663-76.
6. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(4): 268-77.
7. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*. 2000; 227(2): 271-8.
8. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer*. 2007; 96: 1020-4.
9. Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach. *Genes Dev*. 2008; 22(20): 2755-66.
10. Evans PM, Liu C. Roles of Krupel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2008; 40: 554-64.
11. Sperger JM, Chen X, Draper JS, Antosiewicz JE, Chon CH, Jones SB, et al. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci*. 2003; 100(23): 13350-5.
12. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genet*. 2008; 40(5): 499-507.
13. Wong DJ, Liu H, Ridky TW, Cassarino D, Segal E, Chang HY. Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(4): 333-44.
14. Calvanese V, Horrillo A, Hmadcha A, Suarez-Álvarez B, Fernandez AF, Lara E, et al. Cancer genes hypermethylated in human embryonic stem cells. *PLoS One*, 2008; 3(9): e3294.
15. Hoffman LM, Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2005; 23(6): 699-708.
16. Liao J, Wu Z, Wang Y, Cheng L, Cui C, Gao Y, et al. Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res*. 2008; 18(5): 600-3.
17. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007; 131(5): 861-72.
18. Plasmid 20321: TetO-FUW-OSKM [Internet] Available from: <http://www.addgene.org/20321>.
19. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318(5858): 1917-20.
20. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*. 2008; 322(5903): 945-9.

21. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*. 2008; 321(5889): 699-702.
22. Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W, et al. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell stem cell*. 2008; 3(5): 475-9.
23. Ho PJ, Yen ML, Lin JD, Chen LS, Hu HI, Yeh CK, et al. Endogenous KLF4 expression in human fetal endothelial cells allows for reprogramming to pluripotency with just OCT3/4 and SOX2--brief report. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010; 30(10): 1905-7.
24. Wang H, Shayakhmetov DM, Leege T, Harkey M, Li Q, Papayannopoulou T, et al. A capsid-modified helper-dependent adenovirus vector containing the beta-globin locus control region displays a nonrandom integration pattern and allows stable, erythroid-specific gene expression. *J Virol*. 2005; 79(17): 10999-1013.
25. Naderian H, Kazemi B, De Vries A. Sub cloning of mouse mousculus glucocerebrosidase enzyme gene in lentiviral vector and transfer to HEK cell line. *FEYZ*. 2007; 11(1): 1-7.
26. Hyun I, Hochedlinger K, Jaenisch R, Yamanaka S. New advances in iPS cell research do not obviate the need for human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007 Oct; 1(4):367-8.
27. Merkl C, Saalfrank A, Riesen N, Kuhn R, Pertek A, Eser S, et al. Efficient generation of rat induced pluripotent stem cells using a non-viral inducible vector. *PLOS ONE*. 2013; 8(1): e55170.

The assessment of lentiviral vectors application for gene transformation in human dermal fibroblasts (HDFs)

Allahbakhshian-Farsani M^{1,2}, Ghasemi-Dehkordi P¹, Abdian N¹, Khosravi-Farsani S¹, Mirzaeian A³, Nasri M¹, Karimi-Taghanaki A⁴, Mardani G⁴, Amiri SB¹, Hashemzadeh-Chaleshtori M^{1*}

¹ Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ² Hematology and Blood Banking Dept., Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran; ³ Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Sharekord; I.R. Iran; ⁴ Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 28/Apr/2013

Accepted: 20/Oct/2013

Background and aims: Induced pluripotent stem cells (iPSC) are primary, undifferentiated cells that are able to create almost any type of cells in the body. The purpose of the present study was to produce and transmit TetO-FUW-OSKM lentiviral vector to human dermal fibroblast cells (HDFs) and to investigate the application of this vector.

Methods: In this experimental study after isolation and culture of HDF cells, TetO-FUW-OSKM lentiviral vector (as transfer vector) containing the reprogramming genes and PsPAX2 and PMDG2 vectors (as packaging plasmids) were transfected to HEK-293T cell line for virus production. The supernatants of packaging cells were harvested 48 h and 72 h after transfection. Then, these viruses were transduced to HDF for reprogramming these cells.

Results: The results of this study demonstrated successful production of TetO-FUW-OSKM lentiviral vector, efficiency of transmission method of gene via lentiviral vectors, and suitable expression of the transcription factors in HDF cells after transduction.

Conclusion: According to these findings lentiviral vectors could be used for gene transmission and reprogramming of adult cells such as HDF in future studies and to generate iPS cells.

Keywords: Human dermal fibroblast cells, TetO-FUW-OSKM lent viral vector, Reprogramming, Induced pluripotent stem cell, RT-PCR.

Cite this article as: Allahbakhshian-Farsani M, Ghasemi-Dehkordi P, Abdian N, Khosravi-Farsani S, Mirzaeian A, Nasri M, Karimi-Taghanaki A, Mardani G, Amiri SB, Hashemzadeh-Chaleshtori M. The assessment of lentiviral vectors application for gene transformation in human dermal fibroblasts (HDFs). J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 15(Suppl): 12-24.

***Corresponding author:**

Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Rahmatieh, Shahrekord, I.R. Iran, Tel: 00983813346692, E-mail: biotechnologyskums@gmail.com.