دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دبیرخانه تاکورداشگاهی
کتابخانه مرکزی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی (Ph.D) رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

طراحی و ساخت ناقل هیبریدی نیوزوم- VSVG و بررسی توانایی آن در انتقال ژن GDNF در مدل برون‌تنی بیماری پارکینسون

توسط: محمد هادی نعمت اللهی

استاد راهنما: دکتر غلامرضا اسدی کرم- دکتر عباس پرداختی

استاد مشاور: دکتر مسعود ترکزاده ماهانی

سال تحصیلی : ۱۳۹۶-۱۳۹۷

Kerman University of Medical Science

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of Requirements for the degree Ph.D in Clinical biochemistry

Title:

Design and construction of a Niosome-VSVG hybrid carrier and investigation of its GDNF gene delivery potential in in-vitro models of Parkinson's disease

By:

Mohammad Hadi Nematollahi

Supervisors:

Dr. Gholamreza Asadikaram

Dr. Abbas Pardakhty

Advisor:

Dr. Masoud Torkzadeh-Mahani

Nov. 2017

چکیده

مقدمه و اهداف: یکی از مهمترین الزامات برای انتقال ژن با ناقل‌های غیرویروسی کارایی بالای این نوع ناقل‌ها برای غلبه بر سدهای خارج سلولی و داخل سلولی در جهت انتقال ژن هدف به سلول می‌باشد. علی رغم تلاش‌های زیاد، مشکلات زیادی در استفاده از ناقل‌های ویروسی و غیرویروسی وجود دارد. هدف این مطالعه طراحی و خصوصیت یابی یک حامل برای انتقال ژن با استفاده از قرار دادن گلیکوپروتئین سطحی ویروس VSV (VSV-G) در غشاء نیوزوم می‌باشد تا از مزایای ناقل‌های ویروسی و غیرویروسی استفاده گردد. از نیوزوم‌ها در مطالعات زیادی برای انتقال دارو و ژن استفاده شده است، ولی ویژگی‌ها و شباهت‌های نیوزوم‌ها با لیپوزوم‌ها به خوبی شناسایی نشده است. از راه‌کارهای دیگر برای افزایش کارایی انتقال ژن متراکم کردن ماده ژنتیکی با پپتیدهای کاتیونی می‌باشد. این پپتیدهای کاتیونی با فشرده‌سازی باعث محافظت قطعه ژنتیکی در برابر آنزیم‌های نوکلئاز خارج سلولی شده است. همچنین با اضافه کردن پپتید دارای سیگنال مکان یابی هسته‌ای (NLS) به این پپتیدها ورود این قطعات به داخل هسته تسهیل می‌گردد. به طور خلاصه، در این مطالعه هدف نهایی قرار دادن پروتئین غشایی VSV-G داخل غشاء نیوزوم به منظور انتقال ژن در مدل برون‌تنی بیماری پارکینسون بود.

روش‌ها: ابتدا برای ساخت نیوزوم‌ها باکارایی مورد نظر، خصوصیات نیوزوم‌ها با لیپوزوم‌های مشابه با آزمایش‌های بیوفیزیکی و بیوشیمیایی مقایسه گردید. سپس، تأثیر افزودن کلسترول بر خصوصیات بیوفیزیکی و بیوشیمیایی نیوزوم‌ها بررسی گردید. همچنین محلول‌سازی نیوزوم‌ها با تریتون X-100 به عنوان مقدمه‌ای برای قرار دادن پروتئین VSV-G در غشاء در حضور و عدم حضور کلسترول در نیوزوم‌ها بررسی گردید. برای افزایش کارایی ترانسفکشن پروتئین نوترکیبی شامل دو توالی پشت سرهم از پروتئین هسته آدنوویروس‌ها به نام Mu و سیگنال NLS در سویه DE3 باکتری *E. Coli* بیان و با استفاده از رزین‌های نیکل خالص سازی شد. ویژگی‌های متراکم سازی و محافظتی این پروتئین نوترکیب علیه نوکلئاز، میزان سمیت، همولیز و کارایی ترانسفکشن بر روی رده سلول‌های HEK293 و MCF-7 بررسی گردید. در مرحله بعد، پروتئین VSV-G در سلول‌های HEK293 بیان و خالص سازی نسبی صورت گرفت. سپس در غشاء نیوزوم‌های ST80CH قرار داده شد. در قسمت آخر مدل برون‌تنی بیماری پارکینسون در رده سلولی SH-SY5Y ایجاد شد و توانایی انتقال ژن ناقل طراحی شده در انتقال پلاسمید کد کننده ژن GDNF بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که نیوزوم‌ها وزیکل‌های پایداری بوده ولی با روش کلسئین-کبالت مشخص شد که زشت‌پذیری بیشتری نسبت به لیپوزوم‌ها دارند. همچنین نفوذپذیری نیوزوم‌ها نیز در مقابل پروتون بیشتر از لیپوزوم‌ها بود. میزان فشرده بودن غشاء در نیوزوم‌ها مقداری کمتر از لیپوزوم بود. همچنین نشان داده شد که پپتیدهای ملیتین و آلامتیسین به طور مشابهی بر روی غشاء هر دو سیستم وزیکلی اثرگذارند. علاوه بر این، کلسترول در نیوزوم باعث افزایش پایداری غشاء و کاهش سیالیت می‌گردد. در آزمایش محلول‌سازی مشخص شد که نیوزوم‌های حاوی کلسترول مقدار تریتون بیشتری برای محلول‌سازی نسبت به همتای بدون کلسترول خود نیاز دارند. پروتئین نوترکیب VSV-G با موفقیت بیان شد و در غشاء نیوزوم‌ها قرار گرفت و میزان کارایی آن با انتقال ژن گزارشگر به سلول‌های HEK293 و MCF-7 به خوبی تأیید گردید. پروتئین نوترکیب NMM نیز با موفقیت در باکتری بیان و تخلیص شد. در ادامه، توانایی فشرده سازی، محافظت علیه آنزیم نوکلئاز و تراسفکشن پلاسمید بررسی شد. از این پروتئین نوترکیب برای متراکم کردن پلاسمید هدف داخل ویروزوم‌های نیوزومی استفاده گردید. در نهایت ویروزوم‌های نیوزومی که حاوی پلاسمید متراکم شده GDNF بودند توانایی انتقال ژن در مدل برون تنی بیماری پارکینسون از خود نشان دادند.

نتیجه گیری: نیوزوم‌ها از بسیاری جهات مشابه لیپوزوم‌ها عمل می‌کنند و جایگزینی مناسب و ارزان برای لیپوزوم‌ها می‌باشند. بر اساس جستجوی پایگاه‌های اطلاعاتی این مطالعه برای اولین بار نشان داد که نیوزوم‌ها توانایی قرارگیری پروتئین‌های غشایی (در این مطالعه از پروتئین VSV-G استفاده شد) را در غشاء خود دارند و این ویروزوم‌های نیوزومی توانایی انتقال ژن در سلول‌های نوروبلاستومای انسانی را دارا می‌باشند.

کلمات کلیدی: نیوزوم، لیپوزوم، ویروزوم، ژن‌درمانی

Abstract

Background and Objectives: One of the important requirements for non-viral gene delivery systems is to achieve high levels of transfection efficiency by overcoming extracellular and intracellular barriers. Despite extensive efforts, several obstacles impede successful application of viral and non- viral delivery strategies. The aim of current study was to design and characterize a delivery device for genes, based on reconstitution of VSV virus envelope glycoprotein (VSV-G) in to the niosome membrane in order to combine the advantages of viral and non-viral vectors. In many studies, niosomes are used for drug delivery or gene transfer. However, their properties and features relative to liposomes are not well documented. Another way to increase the efficacy of gene delivery is condensing of DNA by cationic peptides. *DNA condensation* leads to protection of DNA against extracellular nuclease degradation. Furthermore, through insertion of NLS signal to noted peptides, their nuclear trafficking are improved. In brief, the aim of current study was gene delivery by niosomal virosomes in *In vitro* model of Parkinson disease.

Methods: Firstly, to characterize and more rationally optimize niosome formulations, the properties of these vesicle systems are compared to similar liposomes by biophysical and biochemical assays. Then, the impact of cholesterol on biophysical and biochemical properties of niosome was investigated. As first step to reconstitute VSV- G, the solubilization of niosomes by Triton X-100 (TR) in presence and absence of cholesterol was done. To improve transfection efficiency, a multi-domain fusion protein including nuclear localization motif (NLS) and two DNA-binding (Mu) domains, namely NLS-Mu-Mu (NMM) has been designed, cloned and expressed in *E. coli DE3* strain. DNA condensing properties of NMM and protamine were evaluated by various experiments. Furthermore, we examined the potential of recombinant protein to condense and protect DNA against nuclease as well as their cytotoxicity, hemolysis, and transfection potential in HEK293T and MCF-7 cell lines. In the next step, VSV-G protein was expressed in HEK293T and partially purified. Then it reconstituted in to the ST80CH niosomes. Finally, an in vitro model of Parkinson's was generated in SH-SY5Y cells line and the potential of designed niosomal VSV-G virosome to transfer the GDNF plasmid was evaluated.

Results: Niosomes are highly stable but only slightly leakier than liposomes as assayed by calcein leakage. Furthermore, the permeability of niosome for protons is higher than that of liposomes. The packing of niosomal membranes is slightly lower than that of liposomes. The peptides alamethicin and melittin act similarly on both vesicular systems. Our results indicated

that cholesterol in niosomes increases membrane stability decreases the fluidity of the membrane. We showed that cholesterol-containing niosomes needed higher amount of TR concentration for solubilization. VSV-G reconstitution was done successfully in niosome membrane and the transfection efficiency was assessed by reporter gene expression in HEK293 and MCF-7 cell lines. The recombinant NMM was expressed and purified successfully. It was observed that the recombinant NMM is able to condense DNA, protect it from nuclease and increase transfection efficiency of reporter gene. Finally, VSV-G niosomal virosome containing condensed GDNF plasmid with NMM protein had gene transfer ability to in vitro model of Parkinson disease.

Conclusion: In various biophysical and biochemical aspects, niosomes are comparable to liposomes and they may offer an excellent, inexpensive alternative for delivery purposes. We have demonstrated for the first time that the reconstituted VSV-G niosomal virosomes are efficient vehicles for the delivery of foreign genes into human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) as a model of Parkinson disease.

Keywords: Niosome, Liposome, Virosome, Gene delivery,