学校编码：10384　　分类号_____密级_____
学　　号：21620070153820　　UDC_____

厦门大学

博　士　学　位　论　文

慢病毒基因载体系统的拓展应用性研究

Studies of lentiviral system for gene transferring and its expansile application

刘宽灿

指导教师姓名：　袁　立　教　授
专　业　名　称：　动　物　学
论文提交日期：　2010 年 11 月
论文答辩时间：　2010 年　　月
学位授予日期：　　年　　月

答辩委员会主席：_____
评　　阅　　人：_____

2010 年 12 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（　　）课题（组）的研究成果，获得（　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（　　）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于　　年　　月　　日解密，解密后适用上述授权。

（　　）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年　月　日

目 录

CONTENTS

摘 要

慢病毒载体因为具有能感染分裂和未分裂的宿主细胞，并且带给宿主细胞轻微的免疫原性的优点，而在转基因改造、基因功能分析和基因治疗中得到了广泛的应用。但是，慢病毒载体的整合特性，尤其是它整合到基因组的转录活性区域或邻近活性区域的特性，使基因功能分析的结果产生未知干扰，并给实际应用带来风险。慢病毒的整合可能会引起突变，或者改变非目的基因的表达从而对目的基因的功能研究产生影响，而且病毒序列整合到宿主细胞基因组中可能会在转基因操作中带来长期和有害的影响。我们的研究旨在利用慢病毒的优良特性的同时，通过其他的改进措施来解决慢病毒整合带来的消极影响，拓展慢病毒的应用性。

为了避免插入突变的风险，我们对慢病毒包装系统的 pMDLg/pRRE 载体上的整合酶中的 5 个氨基酸位点进行定点错义突变，并对慢病毒载体相关部件和包装技术进行优化。获得了 IDLV-D64A、 IDLV-D116A、IDLV-R262A-R263A-K264H、IDLV-D64A-D116A、 IDLV-D64A- D116A-R262A -R263A-K264H 五种整合酶缺陷的慢病毒，通过对这 5 种慢病毒的包装效率、整合酶缺陷慢病毒所介导的外源基因表达能力、残留整合酶活性、整合缺陷形成的 2LTR 与慢病毒基因组的比率以及介导外源基因表达能力的持续性的比较，综合分析其应用的可行性和安全性。我们发现整合酶上这些位点的突变并没有协同效应或相加效应，而 IDLV-D64A 病毒可有效用于基因功能分析和基因治疗。

目前, 对于小鼠等少数胚胎干细胞技术成熟的模式动物，可以通过同源重组技术获得稳定的基因改造；对于多数的其他动物，还需要依赖慢病毒整合来获得稳定的转基因细胞和转基因动物，需要利用 Cre 酶切除整入基因组的病毒序列残存来消除转基因的安全隐患。Cre 酶定位切除还在小鼠的条件性基因敲除中广泛应用。为了对 Cre 酶的表达和发挥功能的情况进行定位和监视，我们构建了由 CMV 驱动的 Cre 重组酶和荧光蛋白联合表达的慢病毒载体。该载体中 Cre 重组酶与绿色/红色荧光蛋白通过口蹄疫病毒的 2A 序列藕联，我们发现这种改建不影响病毒的包装和感染以及 Cre 的功能活性，而荧光报告却精准有效。在载体病毒

中我们还引入了突变型 LoxP 中重组活性很高的位点 Lox5171，将两组 LoxP 位点同向置于一个慢病毒载体中，借助 Cre 酶的剪切能将残留病毒片段最小化。这些改建提供了利用慢病毒整合获得安全转基因的改进方案。

有报道指出细胞内 Rad51 和 Ku70 蛋白含量的改变能大大提高细胞的基因打靶效率，但也有资料指出 Rad51 和 Ku70 蛋白与细胞凋亡密切相关。对于在提高基因打靶效率中，改变这两种蛋白含量对细胞凋亡所产生的影响尚不清楚。我们首先通过双分子荧光互补技术（BiFc）对细胞的 Rad51 与 p53、Ku70 与 Bax 两组蛋白之间的相互作用进行了研究，研究结果表明 Rad51 与 p53、Ku70 与 Bax 之间都有相互作用。在鸡 DF-1 细胞中对 Rad51 蛋白过量表达或 Ku70 基因的表达进行有效干扰后，用流式细胞技术和 Tunel 对 DF-1 细胞凋亡情况进行检测，我们发现：在没有凋亡胁迫时，这两种蛋白的含量变化对 DF-1 细胞凋亡的影响很小；但 Rad51 和 Ku70 的过量表达能阻抑 DF-1 细胞在 STS 诱导下的细胞凋亡，而 Ku70 的干扰则促进细胞在 STS 诱导下的 DF-1 细胞凋亡，Rad51 能在一定程度上减弱 Ku70 干扰引起的 DF-1 细胞凋亡作用。与 Rad51 相似，过表达能促进 p53 蛋白进行泛素化降解的 Mdm2 蛋白也能一定程度上抑制 STS 对 DF-1 细胞的凋亡诱导作用。已有的资料表明 P53 的蛋白修饰对于 Bax 的转录是必需的，但我们的 Western 结果显示：尽管 Rad5 的过表达能增加其与 P53 蛋白结合，但 Bax 含量却没出现预期的变化，表明 Rad51 蛋白并没有参与 Bax 基因表达的调节，它对 DF-1 细胞凋亡的阻抑可能主要通过它的 DNA 修复功能而起作用。这些结果表明，这些基因参与的细胞凋亡中的作用在哺乳动物和其它脊椎动物中具有普遍性， Rad51 的过表达和 Ku70 的有效干扰可用于提高细胞的基因打靶效率，且并不会因为它们干扰细胞凋亡而造成明显的不利影响。

关键词：转基因技术 慢病毒载体系统 整合酶缺陷慢病毒 Cre/LoxP系统 细胞凋亡

ABSTRACT

Lentiviral vectors have been extensively implicated in transgenic modification, gene function analysis and gene therapy because they are able to infect a wide range of dividing and non-dividing host cells with weak immunogenicity. However, their property of integration, preferentially to integrate into or close to transcriptionally active genome regions, gives rise to big puzzle for gene function analysis or serious potential risk in their applications. Lentiviral integration possibly causes mutation or altered expression of non-targeting genes that would affect the function study of aimed genes, and the integration of viral sequence into the cell genome would leave a risk long-term harm in transgenic manipulations. This study concerns the technologies and the related problems in overcoming the integrative risks while making use of the superiority of the lentiviral vectors, with an aim to expand their application.

To conquer the risk of insertional mutagenesis, we performed missense mutation of five amino acids in integrase of packaged lentiviral vectors derived from pMDLg/pRRE and optimizations of lentiviral components and packaging protocols. We have obtained five different integrase-deficient lentivirus (IDLVs), named IDLV-D64A、 IDLV-D116A、IDLV-R262A -R263A-K264H、IDLV- D64A-D116A and IDLV-D64A-D116A-R262A-R263A-K264H. By comparative studies of important characteristics of IDLVs including efficiency of virus packaing, residual integrase activity, capability of exogenous-gene expression and ratio of 2LTR to total HIV DNA, we found that the mutations on these sites of the integrase did not have synergistic or additive effect and the IDLV-D64A mutant is safe and effective vehicle for applications such as gene repair, knock in and knock out, where transient expression is sufficient.

At present, stable gene modification could be achieved by homologous recombination only in a few animals such as mice where technology of embryonic stem cells has been well established; in most other animals, stable gene transfer needs

to make use of the lentiviral integration and the Cre recombinase is usually used to remove the viral sequence that has integrated into the host genome. The Cre/LoxP sytem is also intensively applied in conditional KO in mice. To trace precisely the presence of Cre expression and to estimate better the effectiveness of the Cre activity, we generated a lentiviral vector to allow the coordinate expression of the Cre recombinase and the RFP or EGFP intermediated with FMDV 2A region driven by a single CMV promoter, and this modification of construct also can package and infect cells effectively. We demonstrated that the coordinate expression with RFP/EGFP with Cre mediated by FMDV 2A region did not influence the Cre activity. To minimize the residual fragment of lentivirus on genomic DNA of host cells, we introduced Lox5171, which has been showed to have strong activity of recombination, into a lentiviral vector. These modifications provided improved solutions to the safety problems in transgenic trials on many animals.

Recent studies demonstrated that the efficiency of gene targeting could be improved by overexpression of Rad51 protein or inhibition of Ku70 protein, and the Rad51 and Ku70 proteins has been showed involved in apoptosis. However, it is not clear whether altered concentration of these proteins in achieving an increased gene-targeting efficiency would give rise to apoptotic problems. We first studied the protein interactions between Rad51 and p53 or Ku70 and Bax by using BiFc technology, and found that these protein interactions did exist. In chicken DF-1 cells, Rad51 overexpression or Ku70 inhibition has little effect on the apoptosis of cells under no apoptotic stress as examined with the FACS or Tunel assay; nevertheess, overexpression of Rad51 or Ku70 could inhibit STS-induced apoptosis, effective Ku70 knockdown could enhance STS-induced apoptosis, and Rad51 can reduce to some extent the apoptosis with Ku70 knockdown under the apoptotic stress condition. Similar to Rad51, overexpression of chicken Mdm2, a protein that can increse P53 degradetion via ubiquitination, could also have an effect on protecting cells from apoptotic stress. It has been shown that the modification of P53 protein is necessary for Bax expression, whereas western analysis from our experiment did not detect decreasing expression of Bax with Rad51 overexpression as we expected, although