

לנטיווירוס

הלנטיווירוס שייך למשפחת הרטרווירוסים - Retroviridae. אלו הם ווירוסים שאינם אונקוגניים המאופיינים בזמן אינקובציה ארוך (מכאן השם Lenti שפירושו בלטינית- איטי) ובהדבקה תמידית/קבועה.

קיימות 5 קבוצות סרולוגיות המדבקות יונקים: לנטיווירוס של בקר, סוסים, חתוליים, גדיים ופרימטים.

בתוך קבוצת הפרימטים ניתן למצוא גם את

Human immunodeficiency virus (HIV) types 1 – 3

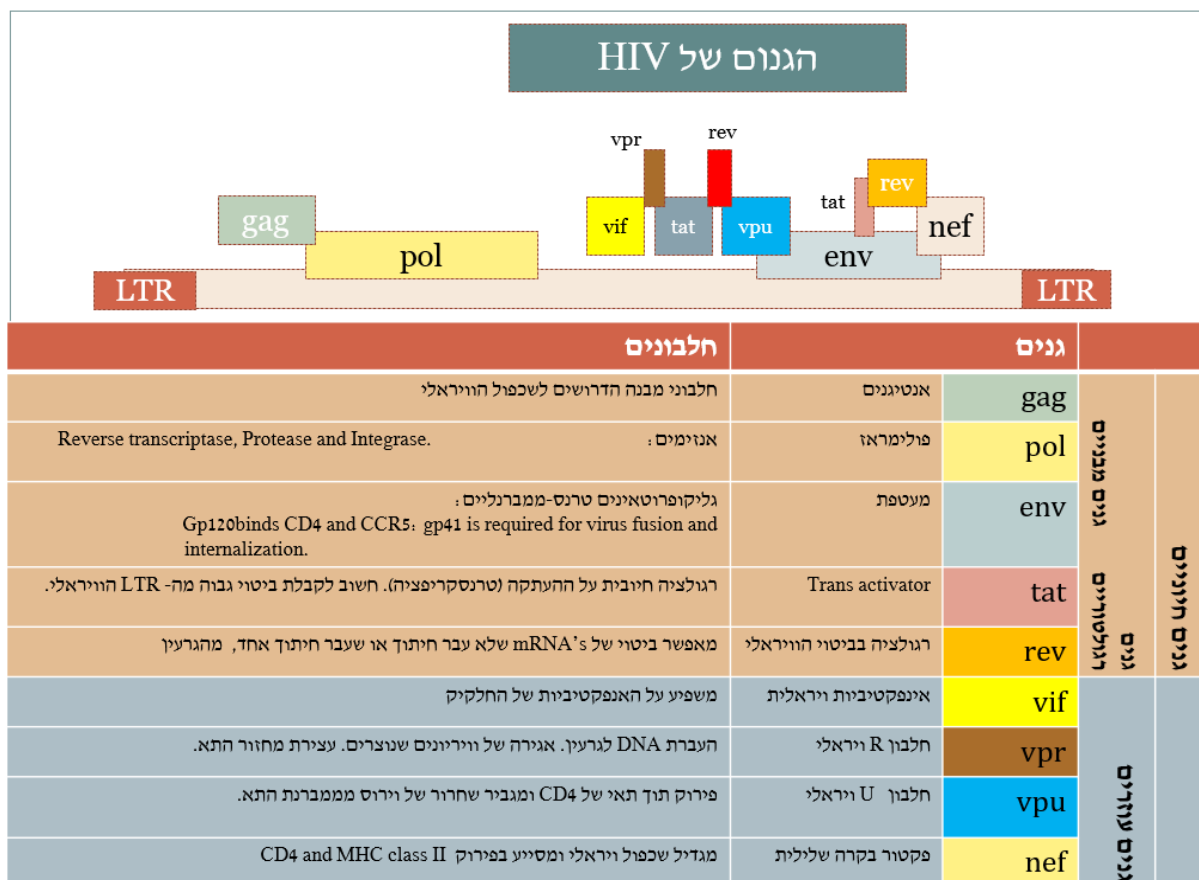
רוב הווקטורים הוויראליים של לנטיווירוס שבשימוש היום, מקורם ב- HIV.

הלנטיווירוס יכול להעביר כמות גדולה של מידע גנטי, לתוך הגנום של התא המארח.

הגנום הוויראלי מוחדר בצורה קבועה ויציבה לתוך הגנום המארח והוא מועבר לתא החדש המתקבל בעת חלוקת התא.

בשל כך משמשת מערכת הלנטיווירוס, כאחד הכלים היעילים ביותר בהעברת גנים לתאי מטרה.

הגנום של הלנטיווירוס הוא קומפלקס של גנים המקודדים מספר חלבונים רגולטוריים, מבניים וחלבונים מסייעים/עוזרים (accessory - שאינם מצויים ברטרווירוסים אחרים).



בנוסף לגנים **gag, pol** ו-**env**, המשותפים לכל הרטרווירוסים, ה-**HIV** מכיל גם 2 גנים רגולטוריים, **tat & rev**, שהם חיוניים לרפליקציה של הווירוס וכמו כן הוא מכיל 4 גנים מסייעים/עוזרים החשובים ברפליקציה ובפתוגניות של הווירוס **in-vivo**: **vif, vpr, vpu & nef**.

בדיעבד, הסתבר כי ארבעת הגנים הללו אינם חיוניים כשמגדלים את הווירוס **in-vitro**.

משני צידי הגנום של ה-**HIV** נמצאים רצפים חוזרניים ארוכים

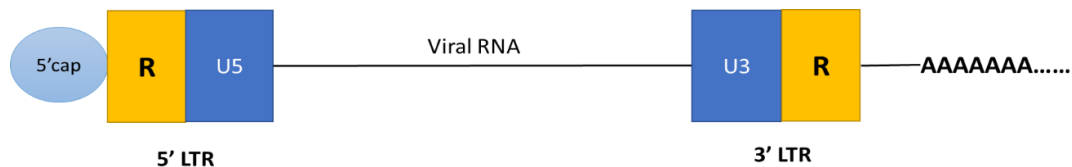
ה-**LTR (Long Terminal Repeats)**, שאינם רצפים מקודדים ושלהם תפקיד חשוב ברפליקציה של הווירוס ובתרגום הגנים.

ה-**LTR's** מכילים רצפי **U3, U5, R**.

אזור ה-**U3** הוא למעשה הפרומוטור של ה-**HIV** והוא מכיל את מגביר הטראנסקריפציה (תרגום).

אזור ה-**R** מציין את נקודת התחלת הטראנסקריפציה.

אזור ה-**U5** קשור ב-**Reverse Transcription**.



בניית הווקטור הוויראלי

מקורו של הווקטור הוויראלי של הלנטי ווירוס הוא ב-**HIV**.

כדי להקטין את הסיכוי לרקומבינציה ויצירה מחודשת של הווירוס המקורי, נעשו מספר צעדים:

בשלב הראשון, כל הגנים החיוניים הופרדו לפלסמידים שונים, כך שידרשו מספר רב של אירועי רקומבינציה, כדי לקבל את הלנטיווירוס המסוגל להתחלק:

(RCL) Replicative Competent Lentivirus

בשלב השני: ה-**HIV** מדביק מגוון תאים של מערכת החיסון, כמו תאי **CD4+T**, מקרופאגים ותאי מיקרוגליה. כניסת הווירוס לתא המטרה מתווכת ע"י אנטראקציה בין הגליקופרוטאינים שבמעטפת הווירוס (**gp120**) עם מולקולות ה-**CD4** וה-**Chemokine co-receptor CCR5** של **CXCR4** התא המארח.

כדי להדביק מגוון גדול יותר של תאים, היה צריך להחליף את הגליקופרוטאינים שבמעטפת הוויריון.

לשם כך השתמשו בגנים המקודדים את הגליקופרוטאינים (**G**) של הווירוס:

(VSV) Vesicular Stomatitis Virus

לשינוי הטרופיזם התאי של הווירוס קוראים: **Pseudotyping**.

יתרון נוסף שהתקבל על ידי קבלת ה-**VSV-G Pseudotyping**, הוא הגדלת היציבות של החלקיק הוויראלי, המאפשר לאחר מכן את ריכוז החלקיקים הוויראליים באולטראצנטריפוגה.

התוצאה שהתקבלה, הוגדרה דור ראשון של לנטיווירוס.

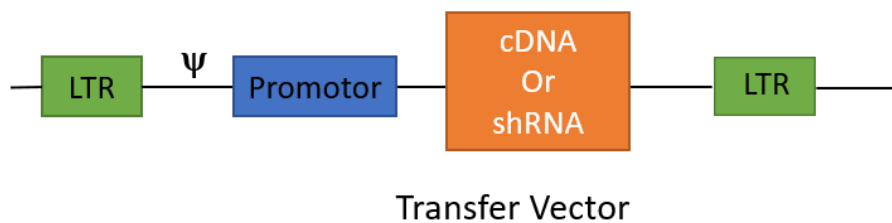
1st Genera



Transfer Vector

המיידע הגנטי המצוי בגנום של ה- Transfer Vector/Transfer Plasmid הוא היחיד המועבר לתא המטרה.

בתוך הפלסמיד הזה מצוי רצף הקרוי: **Packaging Signal (Ψ sequence)**.



ה- LTR הוא מרכז הבקרה של הביטוי הגני (ב- HIV).

סיגנל האריזה (Ψ) הוא האלמנט הדרוש לאריזה של הגנום הוויראלי.

אצל הפלסמידים המוגדרים כ- (Packaging & Envelope Plasmid) Helper Plasmids

לא קיים סיגנל האריזה ולכן הגנים שלהם לא יארוזו לתוך הקפסיד הוויראלי.

הפלסמידים המכיל את הגנים המקוריים של המעטפת (Envelope Plasmid) של ה- HIV הוחלפו עם הגנים של הווירוס VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus- Glycoproteins).

הלנטי ווירוס המתקבל כתוצאה מההחלפה (VSV-G), יכול להדביק מגוון גדול יותר של תאים לעומת ה- HIV-1, כולל את אלו של מערכת הנשימה (כתוצאה מאירוע היוצר אירוסולים).

למארז חומצות הגרעין של הלנטיווירוס, בזמן שהוא עובר אינטגרציה לתוך הגנום המארז, קוראים: **Provirus**.

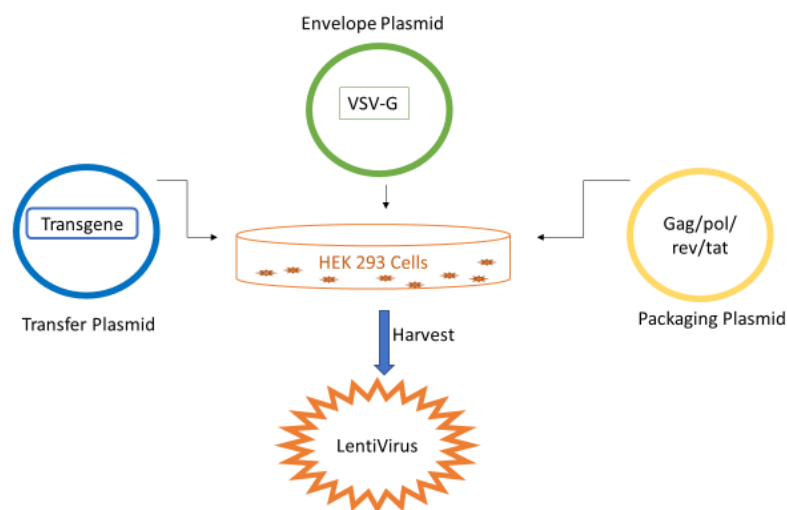
✚ כתוצאה מהאינטגרציה מתקבל ביטוי יציב של הגנים שהוכנסו, אבל באותה מידה מתקבל פוטנציאל ל- **Mutagenesis** בגנום התא המודבק.

האינטגרציה של הפרו-וירוס יכול להפריע לפעילותם של הגנים התאיים ולהוביל לאקטיבציה של אונקוגנים או אינאקטיבציה של Tumor Suppressors ולתוצאה סופית של תא סרטני.

✚ גם ווקטור של לנטיווירוס שאינו יכול להתחלק, הנושא בתוכו גנים שאינם מהווים סיכון (כמו GFP), יכול להוות גורם סיכון.

✚ חשוב לזכור שגם וירוס רקומביננטי שאינו מסוגל להתחלק, יכול בהחלט להדביק.

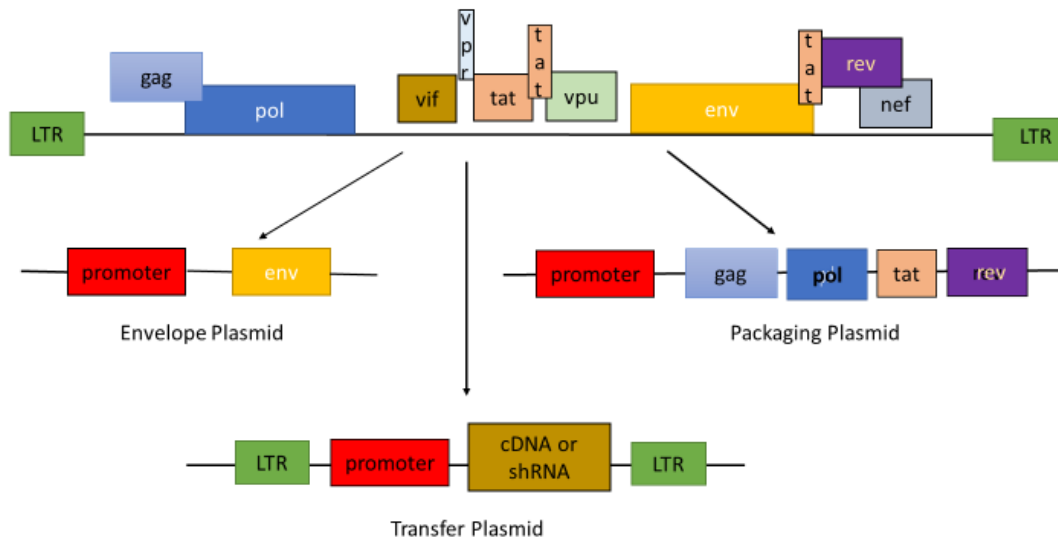
על מנת ליצור את החלקיק הוויראלי/הווקטור של הלנטיווירוס, הפלסמידים מוכנסים לתוך תאי HEK 293. ה- Transfer Vector נכנס לגרעין התא והפלסמידים האחרים מייצרים את החלבונים החיוניים לוירוס (כמו אנזימים, חלבוני מעטפת ועוד..)



במשך הזמן נעשו שינויים בדרך ארגון הווקטור הוויראלי, על מנת להגדיל את בטיחותו של הווקטור הוויראלי המתקבל.

לשם כך הוצאו הגנים המסייעים (כלומר: vif, vpr, vpu & nef) שכן אין להם חשיבות כשמגדלים את הווירוס in-vitro.

2nd Generation Vector



הערה:

חוקרים העובדים עם לנטיווירוס דור 2 (ומטה), מתבקשים לבצע ניסוי בדיקה (ניתן לפנות לממונה על הבטיחות הביולוגית כדי לקבל הנחיות), כדי לוודא שהווקטור הוויראלי שהתקבל, אינו מסוגל ליצור חלקיק המסוגל להתרבות (Recombinant incompetent).

3rd Generation Vector

בווריונים מהדור השלישי, הוצא הגן של ה- tat .

ב- HIV , הפרומוטור שב- 5' LTR צריך את ה- tat לצורך האקטיבציה. כדי לפצות על הוצאתו, יש להכניס פרומוטור חיצוני כמו CMV או RSV, כדי לאפשר את הטרנספקציה.

בנוסף בדור השלישי, ה- REV הוכנס לפלסמיד נפרד.



1. על מנת להקטין את "בעיית" האינטגרציה לגנום המארח, ניתן לגרום למוטציה בחלבון האינטגרז (של הווירוס) לקבלת Integrase Deficient Lentivirus (IDLV). התוצאה תהיה ווקטור מעגלי אפיוזומלי בתא המטרה, המסולק לאחר החלוקה (קבלה של ביטוי זמני). ביטוי זה יהיה יציב בתאים שאינם מתחלקים.
2. בהדבקה של תאי מכרסמים עם לנטיווירוס, ניתן להשתמש ב- Pseudotype /חלבוני מעטפת המאפיינים אך ורק תאי מכרסמים.

בטיחות בעבודה עם ווקטורי לנטיווירוס

קריטריונים להערכת סיכונים עבור הלנטיווירוס:

בקביעת רמת הסיכון של הווקטור הוויראלי, נלקחים בחשבון מספר פרמטרים:

1. טבעו של הטרנסגן המוכנס (לדוג: האם הוא אונקוגני או שהוא גן עם פוטנציאל לאונקוגניות גבוהה, האם הוא מקודד לרעלן, האם הוא מעורב ב-cell-growth, כמויות או אפופטוזיס או שהוא טוקסי לתאים וכ"ו).
 2. מערכת הווקטור והסיכוי לקבל חלקיק/ווקטור וויראלי, המסוגל להתחלק/להתרבות (באיזה דור המערכת).
 3. הכמות הסופית של הווקטור הוויראלי (The vector titer) .
 4. מבחן RCL שלילי
 5. יכולת מניעת ההפצה/פיזור של החיה המדבקה.
 6. **אנשים שהם נשאים של HIV** , הנשאים בתוכם את הווירוס הטבעי, נמצאים בסיכון גבוה, בעת עבודה עם לנטיווירוס, בשל האפשרות לרקומבינציה בין הווירוס הטבעי לווירוס הרקומביננטי.
- נשאים צרכים ליידע את הממונה עליהם, בטרם התחלת העבודה עם הווקטור הוויראלי.**

להלן טבלה המסייעת בהערכת רמת הסיכון:

שיקולי בטיחות ביולוגית	סיכון גבוה	סיכון נמוך
סוג הווקטור	*מערכת של 2 פלסמידים לבניית הווקטור. *ביטוי מספר גדול של גנים של HIV ה-	*מערכת של 3 פלסמידים או יותר לבניית הווקטור. *הוצאה של חלק גדול של הגנים של HIV ה-
SIN ווקטור Self Inactivating Vector	אינו מצוי/קיים	קיים/מצוי
טרנסגן	פוטנציאל אונקוגני, אפופטוטי, טוקסי לתאים	לא אונקוגני, לא אפופטוטי ולא טוקסי לתאים
החיה ה"מארחת"	Permissive Host* (שהווירוס המקורי יכול להתרבות בהן) *חיות שתאים אנושיים הושתלו בהם.	חיות שהווירוס אינו מסוגל להתרבות בהן
אופן הטיפול בחיות	שימוש במחסים וכלים חדים, בעת הזרקת הלנטיווירוס	טיפול בחיות ללא שימוש בכלים חדים
כמות הווקטור המתקבלת	כמויות גדולות	כמויות המתקבלות בעבודת מעבדה רגילה.

*Dr. Esther Michael
Biosafety Manager
Tel-Aviv University
Tel. 640-9966
Fax: 640-6533
estermic@tauex.tau.ac.il
<https://safety.tau.ac.il>*