مجله ایمنی زیستی
دوره ۷، شماره ۲، زمستان ۱۳۹۳

استفاده از فناوری ترانسپوزون زیبای خفته برای مهندسی ایمن سلول و ژن

نغمه قلی‌پور[۱*]، ملیحه نادری[۲]، امیر موسوی[۳]، فاطمه اکبریان[۱] سیمین نافیان دهکردی[۱]، فرزانه خانی[۱] و فاطمه نافیان دهکردی[٤]

[۱]دانشجوی دکتری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

[۲]کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ایران.

[۳] استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

[٤]دانشجوی دکتری دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

ngholipour@nigeb.ac.ir

چکیده

تولید پایدار ژن تراریخته برای ژن درمانی در سلول‌های انسانی، می‌تواند ترکیبی از روش‌های ویروسی و غیرویروسی باشد. ارسال ژن با ویروس‌های نوترکیب، انتقال کارآمد ژن به سلولهای اولیه را پیشنهاد می‌کند و گزارشاتی از درمان موفق را ارائه می‌دهد. ولی این‌کار معایب زیادی را در بردارد. در حالی‌که امروزه انتقال ژن با استفاده از ترانسپوزون، جایگزین مناسبی برای وکتورهای ویروسی می‌باشد. استفاده از پلاسمیدها با هزینه کاهش یافته، ایمنوژنسیتی پایین و الحاق کارآمد، می‌تواند جایگزین مناسبی برای وکتورهای ویروسی باشد. در چند دهه گذشته، سیستم ترانسپوزونی زیبای خفته (SB) بعنوان وکتوری برای ژن درمانی غیر ویروسی توسعه یافته است. این وکتور مزیت‌های ویروس‌ها و دی.ان.ای برهنه را با هم ترکیب می‌کند. سیستم ترانسپوزونی SB، برای تولید اختصاصی رسپتور کایمر آنتی‌ژن (CAR) در سلول‌های T انسانی، با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته‌است. در این مقاله مروری، به معرفی فناوری ترانسپوزون برای انتقال ایمن ژن به سلول‌های انسانی، با تاکید بر ترانسپوزون SB پرداخته شده است. همچنین سیستم‌های انتقال ژن ویروسی و غیرویروسی و مزایا و معایب آن‌ها شرح داده شده است.

کلمات کلیدی: وکتورهای ترانسپوزونی، وکتورهای ویروسی، ترانسپوزون زیبای خفته، ژن درمانی، ایمنی زیستی

مقدمه

عناصر قابل جابه‌جائی را می‌توان به عنوان وسیله انتقال دهنده دی.ان.ای معرفی کرد، مانند، ویروس‌های الحاق شونده (integrating viruses) که قادر به درج ژنومی (genomic insertion) کارآمد می‌باشند. عناصر حرکتی قابل‌جابه‌جائی کلاس II (DNA ترانسپوزون)، در صورت داشتن آنزیم ترانسپوراز که از جمله واکنش‌گرهای جابه‌جائی است، قابل کنترل هستند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1393.7.2.1.1]

بنابراین، از دی.ان‌ای موردنظر که بین دو توالی تکراری معکوس از حامل ترانسپوزونی کلون می‌شود، می‌توان برای درج ژنومی پایدار به شیوه‌ای کنترل شده و بسیار کارآمد استفاده کرد (۲۱). این‌گونه روش‌های شناختی، راه‌هایی را برای دستکاری ژنومی مهره‌داران، از جمله انتقال ژن برای تولید سلول‌های تراریخته در کشت بافت، تولید حیوانات با رده زایشی (germline) تراریخته برای تحقیقات پایه‌ای و کاربردی، غربالگری ژنتیکی برای دستیابی به عملکرد ژن در حیوانات مدل و درمان بیماری‌های ژنتیکی در انسان را فراهم می‌کند. زیبای خفته (SB: Sleeping Beauty) اولین ترانسپوزونی بود که توانایی انتقال ژن به سلول‌های مهره‌داران را از خود نشان داد و نتایج اخیر تایید می‌کنند که SB طیف کاملی از مهندسی ژنتیک از جمله، انتقال ژن، جهش‌زایی درجی (insertional)، انتقال ژن‌های سوماتیک درمانگر در ex vivo و in vivo را تحت پوشش قرار می‌دهد. اولین کاربرد بالینی سیستم SB، به تایید اعتبار ایمنی و کارایی این روش کمک خواهد کرد (۲۱).

انتقال ژن با واسطه دی.ان‌ای غیر، برای ژن درمانی به منظور جلوگیری از چهار عیب اصلی سیستم‌های ورودی مبتنی بر ویروس مورد بررسی قرار می‌گیرد: (الف) ناقل‌های ویروسی برای آماده‌سازی در مقدار و تیترهای بالای مورد نیاز برای ژن درمانی، وقت‌گیر و گران‌قیمت هستند، (ب) آماده‌سازی ویروس‌ها، دارای خطرات ناشی از آلودگی توسط عوامل عفونی هستند (۲٤)، (ج) وکتور ویروسی ممکن است موجب عواقب سلولی ناخواسته مانند، پاسخ‌های ایمنی حاد (۲۷)/ التهاب (۱۰) یا سمیت عصبی شوند، (د) انتشار ژنتیکی کارآمد وکتورهای ویروسی، ممکن است اندازه محموله‌های درمانی را محدود کند و ممکن است نیازمند موتیف‌های ژنتیکی برای تنظیم همانندسازی وکتور باشد. در مقابل، آماده‌سازی وکتورهای مبتنی بر دی.ان‌ای پلاسمیدی غیرویروسی با خالص‌سازی نسبتا ارزان، ایمنی بالا و بدون هیچ گونه محدودیتی در ورود به توالی‌های مورد نظر است. از مشکلات عمده سیستم‌های مبتنی بر پلاسمید (وکتورهای غیرویروسی)، به شرح زیر است: (الف) سرعت کم ورود وکتورها به هسته‌های سلول‌های هدف، (ب) سرعت کم ادغام ترانس‌ژن‌ها که عموما همراه با توالی پلاسمیدی است، که تمایل به بیان خاموش دارند (۱۷) و (ج) یکپارچه‌سازی نسخه‌های متعدد (کانکاتامرها) ترانس‌ژن، که می‌تواند بیان خود را خاموش کند (۷).

این مشکلات را می‌توان با استفاده از ترانسپوزون‌ها کاهش داد که معایب ذکر شده در بالا را ندارند. SB یک مثال از یک سیستم انتقالی است که می‌تواند با ژن درمانی انسانی سازگار شود (۱۲). از زمان ساخت آن در سال ۱۹۹۷، سیستم جابجایی SB در بیشتر از ۲۰۰ مقاله شرح داده شده است. سیستم SB به‌منظور فراهم کردن یک روش غیرویروسی و کارآمد به‌منظور توزیع توالی‌های دی.ان‌ای مشخص به کروموزوم‌های مهره‌داران توسعه یافته است. ترانسپوزاز SB، یک آنزیم سنتتیک است که برای استفاده در مهره‌داران به روش مهندسی معکوس قدم به قدم از توالی‌های منقرض شده ماهی قزل‌آلا ساخته شده است (۱۹). ترانسپوزون‌های SB، می‌توانند در بیش از ۲×۱۰^{۸} جایگاه در ژنوم پستانداران وارد شود. در نتیجه این ادغام گسترده غیرمرتبط، آن‌ها برای جهش‌زایی درونی، به دام اندازی ژن، القاء نئوپلازی و انتقال ژن

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1393.7.2.1.1]

برای تغییر عملکردهای موردنظر جدید به سلول‌ها و بافت‌ها استفاده می‌شوند. به دنبال آن، یک مجموعه‌ای از علوم پدید آمده است که اجازه ارزیابی خطرات تصادفی توالی‌های ژنتیکی درونی به واسطه SB را می‌دهد و می‌تواند برای توجیه سازگاری سیستم SB برای برنامه‌های کاربردی ژن درمانی نیز استفاده شود (۹).

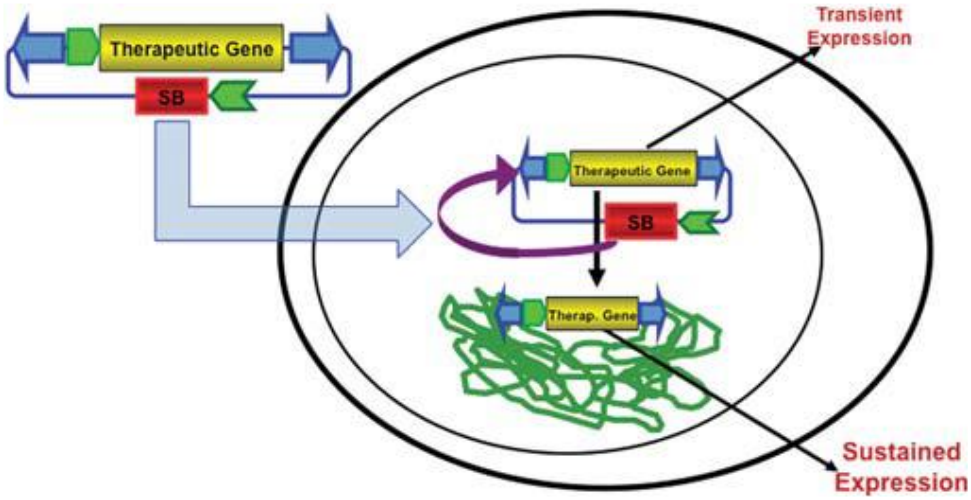
در این مقاله مروری، به بررسی خصوصیات سیستم‌های ترانسپوزونی و ایمنی زیستی آن‌ها (با تاکید زیاد به SB) در مقایسه با سیستم‌های ویروسی پرداخته و فن‌آوری ایمن ترانسپوزونی را در علم ژنتیک و درمان بیماری‌ها برجسته شده است.

سیستم ترانسپوزون SB

پیشرفت‌ها در طول دهه گذشته در توسعه وکتورهای ویروسی در زمینه ژن درمانی انسانی قابل‌توجه بوده است. با این‌حال، در استفاده از ویروس‌ها به عنوان وکتورهای ورود ژن، عوارض جانبی زیادی دیده شده است، از جمله ادغام در جایگاه نامناسب، که ممکن است عوارض جانبی را افزایش دهد (۱۲)، نیاز به خالص سازی گسترده و کنترل کیفیت برای جلوگیری از تکثیر کامل ویروس‌ها دارد و هزینه‌های مرتبط با تولید و مدیریت آن‌ها بالا است (۱۸). مزایای استفاده از حامل‌های غیرویروسی عبارتند از سهولت استفاده، هزینه نسبتا پایین، تولید مقادیر کافی مورد نیاز برای استفاده در کل جمعیت بیماران، ثبات در ذخیره‌سازی و عدم ایجاد واکنش ایمنی در داخل سلول میزبان. دو مشکل اصلی در روش‌های ژن‌درمانی غیرویروسی وجود دارد که تقریبا همیشه مبتنی بر ارائه و بیان ژن‌های حمل شده در پلاسمید مهندسی شده در *E.coli* است. اول، بیان ژن در اکثر سلول‌های پستانداران با توجه به شکست درون سلولی توالی وارد شده، گذرا است که می‌تواند به علت منشا پروکاریوتی پلاسمید باشد. دوم، ممکن است ورود مولکول‌های دی.ان‌ای به سلول‌های اندام خاص امکان‌پذیر نباشد. به دلیل این مشکلات، حامل‌های غیر ویروسی هنوز برای درمان بیماری ارثی سیستمیک آزمایش نشده‌اند. با این‌حال، استفاده از سیستم ترانسپوزون SB (SBTS) این دیدگاه را تغییر داده است. این وکتور غیرویروسی، که مزایای استفاده از ویروس‌ها و دی.ان‌ای برهنه را ترکیب می‌کند (۲۲)، سریع‌ترین پیشرفت را از تولد تا کاربرد در انسان‌ها، بعنوان ابزارهای کلینیکی داشته است (شکل ۱). SBTS متشکل از دو جزء است: الف) یک ترانسپوزون حاوی یک قطعه ژن بیانی و (ب) منبع آنزیم ترانسپوراز. با استفاده از وارد کردن بخش بیانی از یک پلاسمید به ژنوم، رونوشت پایداری از یک ژن خارجی را می‌توان به دست آورد.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1393.7.2.1.1]



شکل۱- ترانسپوزون SB انتقال ژن به دی.ان.ای کروموزومی را برای بیان طولانی ژن‌های درمانی میانجی‌گری می‌کند. روش‌های متفاوت برای ارسال سیستم ترانسپوزونی بسته به این‌که سلول‌ها کشت شده باشند (الکتروپوریشن و ترانسفکشن) یا در بافت موجود باشند (تزریق هیدرودینامیک)، وجود دارد. در بیشتر مطالعات، منبع ترانسپوراز SB، ژنی است که روی همان پلاسمید حاوی ترانسپوزون یا در پلاسمید جداگانه‌ای قرار داده می‌شود.

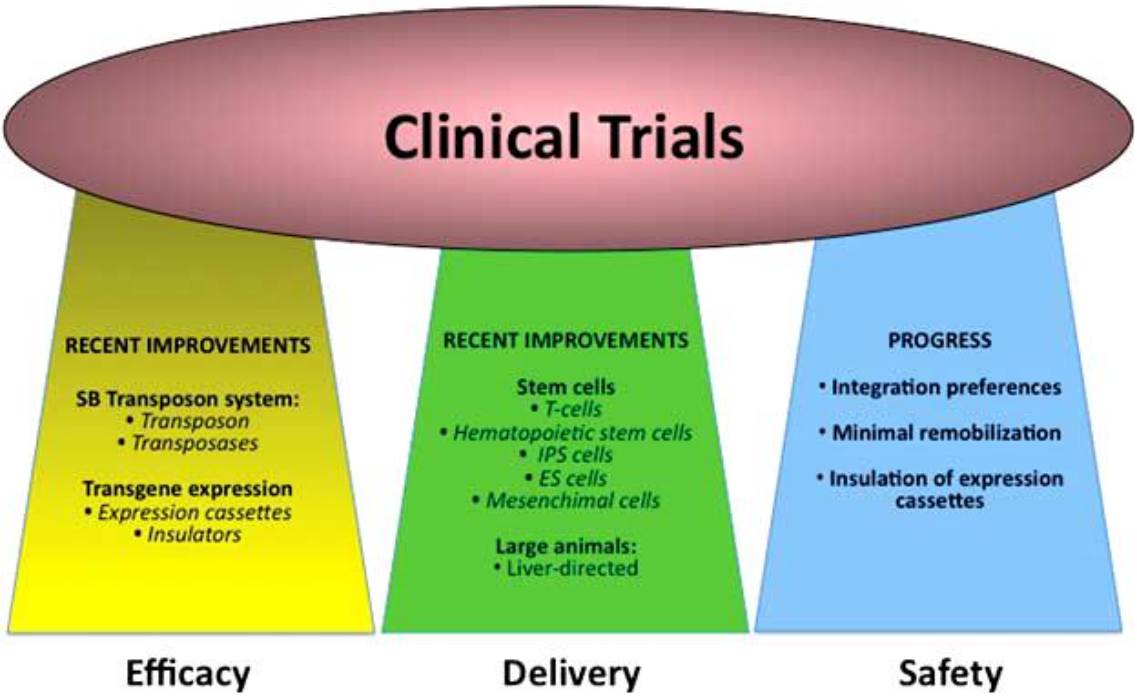
قدرت سیستم SB برای درمان بیماری اولین بار توسط Yant و همکاران نشان داده شد (۴۳)، در این آزمایش، بیان پایدار آنتی‌تریپسین-α1 در موش‌های سالم و فاکتور لخته کننده‌ی IX (FIX) در موش‌های مبتلا به هموفیلی دارای کمبود FIX، القا شد. این دستاوردها توسط درمان موفق مدل‌های موشی دیگر از جمله تیروزینمیای ارثی (۲۸)، هموفیلی A (۲٤) و موکوپلی ساکاریدوزیس (MPS) نوع I و VII (۲) دنبال شد. علاوه‌براین، ترانسپوزون‌های SB برای درمان اپیدرمولیزیس (epidermolysis) (۳۱)، گلیوبلاستومای چند شکلی (۲۹)، کم‌خونی سلول داسی شکل (۵) و لنفوم سلول B استفاده شده است (۲۳). در موش‌ها، ترانسپوزون‌های SB، برای درمان پرفشاری خون ریوی و زردی مورد استفاده قرار گرفته است (۲٦).

بنابراین، مطالعات اولیه اثر بخشی بیان ژن پایدار SBTS برای ژن درمانی را مورد تایید قرار داده است (شکل ۲). سایر ملاحظات مهم ژن‌درمانی شامل اثر بخشی در حیوانات بزرگتر و ایمنی زیستی آن است.

پیشرفت در تمام جنبه‌های SBTS برای استفاده از آن در درمان لازم است. این خدمات عبارتند از: (الف) بهره‌وری همه جانبه از اثر انتقالی و قطعات مهندسی برای رسیدن به بیان مناسب ژن‌های درمانی یا ژن‌های گزارش‌گر، مانند ترانسپوزاز SB، (ب) روش‌های ورودی و مسیرهای ورود پلاسمید مناسب در شرایط کشت سلولی استفاده شده برای انتقال ژن‌ها به سلول‌های درمانی هدف، (ج) تنظیمات ایمنی ترکیبی ترانسپوزاز SB و مدت زمان واکنش جابجایی در سلول‌های القا شده (۳).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1393.7.2.1.1]



شکل ۲- موفقیت یک وکتور در حیطه درمانی باید از سه جنبه، کارآیی، ارسال و ایمنی مورد ارزیابی قرار گیرد. پیشرفت‌های اخیر در کاربردهای درمانی SBTS همه این زمینه‌ها را به بهترین نحو تحت پوشش قرار می‌دهد (۳).

ترانسپوزون به عنوان یک وکتور برای ژن درمانی

تلاش‌های زیادی به استراتژی‌های پیشرفت ارسال ژن برای درمان بیماری‌های ارثی و کسب شده در انسان اختصاص داده شده‌اند. یک روش ژن درمانی مطلوب باید الف) قادر به ارسال ژن‌های درمان کننده با کارآیی بالا بخصوص در سلول‌های مورد نظر باشد، ب) با تغییرات ایجاد شده مورد نیاز در آن برای طراحی وکتور سازگار باشد، ج) خطر سمیت ژنی در آن حداقل باشد و د) از نظر هزینه قابل انجام باشد (۲۱).

استفاده از ویروس‌ها برای انتقال ژن، روشی متداول است. برای مثال، وکتورهای رترویروس گاما و لنتی ویروس، برای الحاق دی.ان‌ای خارجی به کروموزوم‌های سلول‌های الحاقی، کارآمد هستند و پتانسیل زیادی برای بیان طولانی مدت ژن دارند (۳٤). یک نگرانی عمده در استفاده از وکتورهای رترویروسی در قدرت جهش‌زایی در محل‌های درج ژنومی است (۱۵). بعلاوه، ایجاد موتاسیون درجی در آزمایش‌های بالینی که در آن از وکتورهای رترووویروسی برای ژن درمانی استفاده شده، موجب نقص ایمنی شدید وابسته به X می‌شود (۳۵). استفاده کلینیکی از وکتورهای رترووویروسی، به‌علت محدودیت اندازه قابل حمل، محدود شده است. در نهایت، موارد قانونی و قیمت بالای رترووویروس‌های تولید شده، استفاده گسترده از آن‌ها را در موارد بالینی منع می‌کند. یک وکتور درمانی ایده‌آل، باید ترکیبی از صفات مطلوب درج وکتورهای رترویروسی (درج پایدار کروموزومی) باشد، درحالی‌که با کاهش پتانسیل حوادث نامطلوب همراه باشد. مزیت ارسال ژن بر پایه

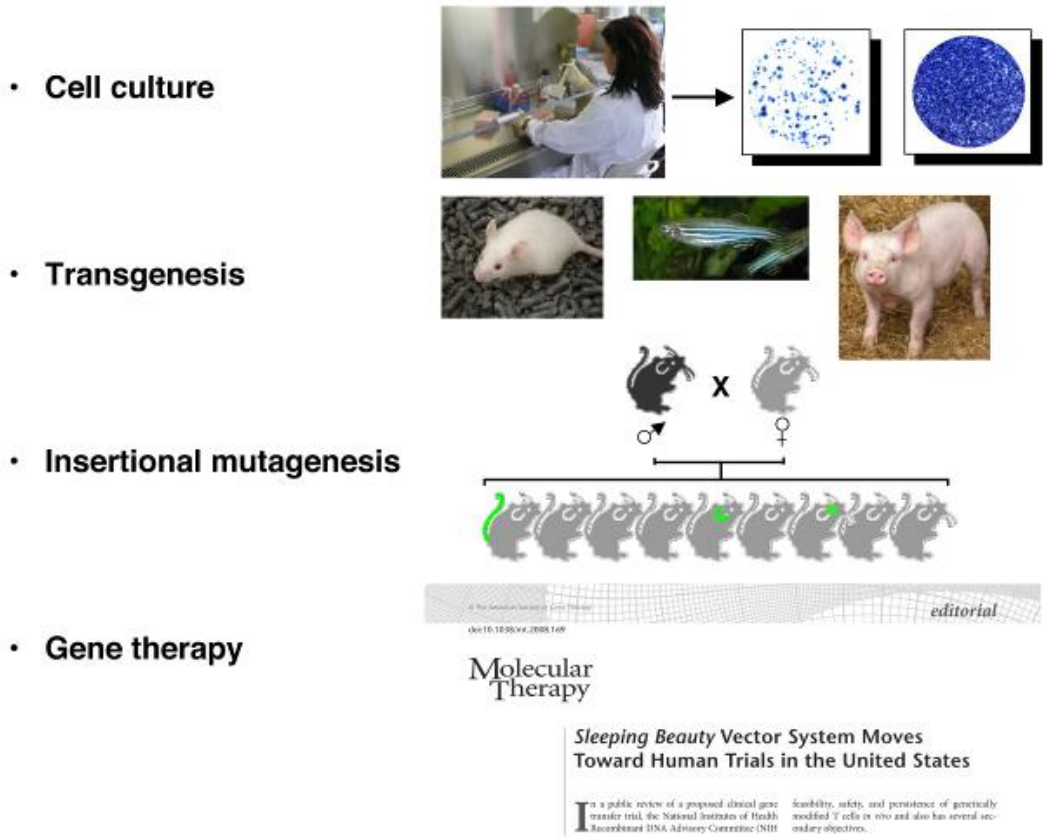
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1393.7.2.1.1]

ترانسپوزون SB این است که به علت درج پایدار ژنومی کاست بیانی، می‌تواند منجر به بیان بلند مدت و کارآمد ژن تراریخت در مرحله پیش بالینی (preclinical) حیوانات مدل شود (شکل ۳) (۱٤). بنابراین، ترانسپوزون SB بر پایه پلاسمید، مزیت‌های وکتورهای ویروسی را با آن‌هایی‌که از مولکول‌های دی.ان‌ای برهنه استفاده می‌کنند، با هم ترکیب می‌کند. با وجود این تضاد در وکتورهای ویروسی، وکتورهای ترانسپوزونی می‌توانند به‌عنوان، دی.ان‌ای پلاسمید نگهداری و انتقال داده شوند، که آن‌ها را به وسیله‌ای ساده و ارزان تبدیل می‌کند. این مهم، می‌تواند مزیت مهمی برای راه‌اندازی آزمایش‌های بالینی آینده باشد. یک مزیت دیگر سیستم SB، شامل کاهش تحریک سیستم ایمنی (immunogenicity) (٤۳)، بدون محدودیت سخت‌گیرانه برای سایز کاست بیانی (٤٤) و ایمنی گسترده است (۳۷). به علت این‌که مکانیسم انتقال، درگیر رونویسی معکوس نیست، وکتورهای ترانسپوزونی بر پایه دی.ان.ای، تمایلی به تجمع جهش ندارند و می‌توانند ژن‌های تراریخت بزرگتر و پیچیده‌تر، مانند آن‌هایی که دارای موتیف‌های تکرار دی.ان.ای هستند را حمل کنند.

علاوه‌بر آن، استفاده از وکتورهای ترانسپوزونی، ریسک بازآرائی کاست‌های بیانی را ندارد (۲۰). در مقایسه با سیستم‌های رتروویروسی، وکتورهای SB به‌طور ذاتی دارای تقویت کننده/ فعالیت پروموتری کمی هستند (۳۸). الحاق توالی عایق جانبی در واحدهای رونویسی انتقالی، برای جلوگیری از فعال‌سازی تصادفی ترانس‌پروموترهای ژن‌های همسایه، ویژگی ایمنی سیستم SB را افزایش می‌دهد (۳۸). به‌طور قابل توجهی، ترانسپوراز می‌تواند بعنوان آر.ان.ای پیامبر تولید شود، از این طریق موجب کاهش خطر پرش دوباره وکتورهای ترانسپوزونی شود (۳۹). الحاق کروموزومی SB، دقیق و تصادفی است و هیچ‌گونه تاثیر مضر مرتبط با SB گزارش نشده است (۱٤).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1393.7.2.1.1]



شکل ۳- کاربردهای وسیع وکتورهای ترانسپوزونی در ژنتیک مهره‌داران.

نتایج و بحث

در چند سال گذشته، رشد پایداری در تمایل به استفاده از سیستم SB، برای درمان چندین بیماری شامل، هموفیلی A و B (۱۶)، تاول‌های پوستی ژنتیکی (junctional epidermolysis bullosa) (۳۰)، تیروزینمی I (۲۸)، بیماری هانتینگتون (۱۰)، بیماری سلول داسی شکل (۴۵)، موکوپلی‌ساکاریدمی (۱)، سرطان (۳۲) و دیابت تیپ I مورد استفاده قرار گرفته است. به‌علاوه قدم‌های مهمی برای انتقال ژن از طریق SB در ریه، برای درمان نقص آنتی‌تریپسین-α۱، سیستیک فیبروزیس و تعدادی از بیماری‌های قلبی عروقی برداشته شده است (۶). بنابراین، تولید وکتورهای الحاقی غیرویروسی، علاقه قابل‌ملاحظه‌ای برای ارتقا وکتورهای ایمن و کارآمد در ژن درمانی انسان ایجاد کرده است (۲۰).

سیستم بیش فعال ترانسپوزون SB100X (کارآیی صد برابری نسبت به SB)، انتقال ژن پایدار و کارا را برای اهداف درمانی در سلول‌های اولیه از جمله، سلول بنیادی و سلول‌های اجدادی ارزانی داشته است. برای مثال، استفاده از سیستم SB100X موجب کارآیی انتقال ژن، به سلول‌های اجدادی خونساز (۴۱)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های اجدادی/ بنیادی ماهیچه (میوبلاست) و iPSC ها می‌شود (۴). این سلول‌ها، اهداف مناسبی برای مهندسی سلول‌های

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1393.7.2.1.1]

بنیادی و ساخت دارو و درمان‌های وابسته به ژن و سلول در بیماری‌های پیچیده ژنتیکی است. بطور قابل‌توجهی، بیان ترانسپوراز بیش فعال SB100X، تاثیر سوئی روی تمایز یا عملکرد این‌گونه سلول‌های بنیادی/ اجدادی نداشته و نشانه‌ای از ناهنجاری سیتوژنتیکی در آن‌ها مشاهده نشده است (٤٢). اخیرا اثبات شده، ترانسپوزون SB ارسال ژن، فاکتور رونویسی PAX3 به سلول‌های iPSCs و تمایز آن به سلول‌های اجدادی میوژنیک MyoD و میوفیبرهای چند سلولی را میانجی‌گری می‌کند. پیشنهاد شده که PAX3 ممکن است به‌عنوان یک مولکول سویچ میوژنیک در iPSCs استفاده شود (٤٢).

اولین کاربرد بالینی سیستم SB در حال حاضر، در حال انجام است، استفاده از سلول‌های T اوتولوگوس تغییر یافته ژنتیکی را به سمت دودمان سلولی بدخیم B هدایت می‌کند (٤٠). لمفوسیت‌ها، پایگاه مناسبی برای آزمایش سیستم‌های جدید انتقال ژن می‌باشند. همان‌طور که صدها تزریق سلول T تغییر یافته ژنتیکی با روش‌های ویروسی و غیرویروسی، بدون هیچ سمیت ژنی وجود داشته است (٨). اولین ترانسپوزون SB که بر روی انسان مورد آزمایش قرار گرفت، حامل یک رسپتور آنتی‌ژن کیمر (CAR: chimeric antigen receptor) بود که برای تحویل سم سلولی (cytotoxic) سلول‌های T، به تومورهای لمفوئید CD19 مثبت مورد استفاده قرار گرفت (٣٣). مزیت استفاده از سیستم ترانسپوزون SB برای تغییرات ژنتیکی سلول‌های T، شامل کاهش هزینه مرتبط با ساخت دی.ان.ای پلاسمید برای استفاده‌های بالینی در مقایسه با وکتورهای نوترکیب ویروسی است. این مساله بخصوص زمانی مهم است که اثرات ضد تومور تزریق سلول‌های T، CAR مثبت اثبات شده است (٣٦). فعالیت آنزیمی افزایش یافته SB100X، ممکن است قادر به الحاق کارآمد نسبت به وکتورهای رتروویروسی باشد که برای آزمایش‌های نسل بعدی به‌دست آمده است.

سپاس‌گزاری

نویسندگان از تمام کسانی که با آن‌ها را نوشتن این مقاله همکاری داشته‌اند، نهایت تشکر را دارند.

فهرست منابع **References**

1- **Aronovich, E.L., Bell, J.B., Belur, L.R., Gunther, R., Koniar, B., Erickson, D.C., Schachern, P.A., Matise, I., McIvor, R.S., Whitley, C.B. and Hackett, P.B., 2007.** Prolonged expression of a lysosomal enzyme in mouse liver after Sleeping Beauty transposon-mediated gene delivery: implications for non-viral gene therapy of mucopolysaccharidoses. *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, *9*(5), pp.403-415.

2- **Aronovich, E.L., Bell, J.B., Khan, S.A., Belur, L.R., Gunther, R., Koniar, B., Schachern, P.A., Parker, J.B., Carlson, C.S., Whitley, C.B. and McIvor, R.S., 2009.** Systemic correction of storage disease in MPS I NOD/SCID mice using the sleeping beauty transposon system. *Molecular Therapy*, *17*(7), pp.1136-1144.

3- **Aronovich, E.L., McIvor, R.S. and Hackett, P.B., 2011**. The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy. *Human molecular genetics*, *20*(R1), pp. R14-R20.

4- **Belay, E., Mátrai, J., Acosta-Sanchez, A., Ma, L., Quattrocelli, M., Mátés, L., Sancho-Bru, P., Geraerts, M., Yan, B., Vermeesch, J. and Rincón, M.Y., 2010.** Novel hyperactive transposons for

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1393.7.2.1.1]

genetic modification of induced pluripotent and adult stem cells: a nonviral paradigm for coaxed differentiation. *Stem Cells*, *28*(10), pp.1760-1771.

5- **Belcher, J.D., Vineyard, J.V., Bruzzone, C.M., Chen, C., Beckman, J.D., Nguyen, J., Steer, C.J. and Vercellotti, G.M., 2010.** Heme oxygenase-1 gene delivery by Sleeping Beauty inhibits vascular stasis in a murine model of sickle cell disease. *Journal of molecular medicine*, *88*(7), pp.665-675.

6- **Belur, L.R., Frandsen, J.L., Dupuy, A.J., Ingbar, D.H., Largaespada, D.A., Hackett, P.B. and McIvor, R.S., 2003**. Gene insertion and long-term expression in lung mediated by the Sleeping Beauty transposon system. *Molecular Therapy*, *8*(3), pp.501-507.

7- **Bestor, T.H., 2000.** Gene silencing as a threat to the success of gene therapy. *The Journal of clinical investigation*, *105*(4), pp.409-411.

8- **Bonini, C., Grez, M., Traversari, C., Ciceri, F., Marktel, S., Ferrari, G., Dinauer, M., Sadat, M., Aiuti, A., Deola, S. and Radrizzani, M., 2003.** Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. *Nature medicine*, *9*(4), p.367.

9- **Carlson, C.M. and Largaespada, D.A., 2005.** Insertional mutagenesis in mice: new perspectives and tools. *Nature Reviews Genetics*, *6*(7), p.568.

10- **Chen, Z.J., Kren, B.T., Wong, P.Y.P., Low, W.C. and Steer, C.J., 2005.** Sleeping Beauty-mediated down-regulation of huntingtin expression by RNA interference. *Biochemical and biophysical research communications*, *329*(2), pp.646-652.

11- **Graham, A., Walker, R., Baird, P., Hahn, C.N. and Fazakerley, J.K., 2006.** CNS gene therapy applications of the Semliki Forest virus 1 vector are limited by neurotoxicity. *Molecular Therapy*, *13*(3), pp.631-635.

12- **Hackett, P.B., Ekker, S.C., Largaespada, D.A. and McIvor, R.S., 2005.** Sleeping beauty transposon-mediated gene therapy for prolonged expression. *Advances in genetics*, *54*, pp.189-232.

13- **Hackett, C.S., Geurts, A.M. and Hackett, P.B., 2007**. Predicting preferential DNA vector insertion sites: implications for functional genomics and gene therapy. *Genome biology*, *8*(1), p. S12.

14- **Hackett PB, Largaespada DA, Cooper LJ. A transposon and transposase system for human application. (2010).** Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. 18(4):674-83. Epub 2010/01/28.

15- **Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G.P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K. and Asnafi, V., 2008.** Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of clinical investigation*, *118*(9), pp.3132-3142.

16- **Hausl, M.A., Zhang, W., Müther, N., Rauschhuber, C., Franck, H.G., Merricks, E.P., Nichols, T.C., Kay, M.A. and Ehrhardt, A., 2010.** Hyperactive sleeping beauty transposase enables persistent phenotypic correction in mice and a canine model for hemophilia B. *Molecular Therapy*, *18*(11), pp.1896-1906.

17- **Henikoff, S., 1998.** Conspiracy of silence among repeated transgenes. *Bioessays*, *20*(7), pp.532-535.

18- **Hodges, B.L. and Cheng, S.H., 2006.** Cell and gene-based therapies for the lysosomal storage diseases. *Current gene therapy*, *6*(2), pp.227-241.

19- **Ivics, Z., Hackett, P.B., Plasterk, R.H. and Izsvák, Z., 1997.** Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, *91*(4), pp.501-510.

21 **Ivics, Z. and Izsvák, Z., 2010**. The expanding universe of transposon technologies for gene and cell engineering. *Mobile DNA*, *1*(1), p.25.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1393.7.2.1.1]

22- Izsvák, Z., Hackett, P.B., Cooper, L.J. and Ivics, Z., 2010. Translating Sleeping Beauty transposition into cellular therapies: victories and challenges. *Bioessays*, *32*(9), pp.756-767.

23- Jena, B., Dotti, G. and Cooper, L.J., 2010. Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, *116*(7), pp.1035-1044.

24- Kay, M.A., Glorioso, J.C. and Naldini, L., 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature medicine*, *7*(1), p.33.

25- Kren, B.T., Unger, G.M., Sjeklocha, L., Trossen, A.A., Korman, V., Diethelm-Okita, B.M., Reding, M.T. and Steer, C.J., 2009. Nanocapsule-delivered Sleeping Beauty mediates therapeutic Factor VIII expression in liver sinusoidal endothelial cells of hemophilia A mice. *The Journal of clinical investigation*, *119*(7), pp.2086-2099.

26- Liu, L., Liu, H., Visner, G., Fletcher, B.S., Liu, L., Liu, H., Visner, G. and Fletcher, B.S., 2006. Sleeping Beauty-mediated eNOS gene therapy attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *The FASEB journal*, *20*(14), pp.2594-2596.

27- Lozier, J.N., Csako, G., Mondoro, T.H., Krizek, D.M., Metzger, M.E., Costello, R., Vostal, J.G., Rick, M.E., Donahue, R.E. and Morgan, R.A., 2002. Toxicity of a first-generation adenoviral vector in rhesus macaques. *Human gene therapy*, *13*(1), pp.113-124.

28- Montini, E., Held, P.K., Noll, M., Morcinek, N., Al-Dhalimy, M., Finegold, M., Yant, S.R., Kay, M.A. and Grompe, M., 2002. In vivo correction of murine tyrosinemia type I by DNA-mediated transposition. *Molecular Therapy*, *6*(6), pp.759-769.

29- Ohlfest, J.R., Lobitz, P.D., Perkinson, S.G. and Largaespada, D.A., 2004. Integration and long-term expression in xenografted human glioblastoma cells using a plasmid-based transposon system. *Molecular Therapy*, *10*(2), pp.260-268.

30- Ortiz-Urda, S., Thyagarajan, B., Keene, D.R., Lin, Q., Fang, M., Calos, M.P. and Khavari, P.A., 2002. Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nature medicine*, *8*(10), p.1166.

31- Ortiz-Urda, S., Lin, Q., Yant, S.R., Keene, D., Kay, M.A. and Khavari, P.A., 2003. Sustainable correction of junctional epidermolysis bullosa via transposon-mediated nonviral gene transfer. *Gene therapy*, *10*(13), p.1099.

32- Peng, P.D., Cohen, C.J., Yang, S., Hsu, C., Jones, S., Zhao, Y., Zheng, Z., Rosenberg, S.A. and Morgan, R.A., 2009. Efficient nonviral Sleeping Beauty transposon-based TCR gene transfer to peripheral blood lymphocytes confers antigen-specific antitumor reactivity. *Gene therapy*, *16*(8), p.1042.

33- Singh, H., Manuri, P.R., Olivares, S., Dara, N., Dawson, M.J., Huls, H., Hackett, P.B., Kohn, D.B., Shpall, E.J., Champlin, R.E. and Cooper, L.J., 2008. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer research*, *68*(8), pp.2961-2971.

34- Sinn, P.L., Sauter, S.L. and McCray Jr, P.B., 2005. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors–design, biosafety, and production. *Gene therapy*, *12*(14), p.1089.

35- Thrasher, A.J., Gaspar, H.B., Baum, C., Modlich, U., Schambach, A., Candotti, F., Otsu, M., Sorrentino, B., Scobie, L., Cameron, E. and Blyth, K., 2006. Gene therapy: X-SCID transgene leukaemogenicity. *Nature*, *443*(7109), p. E5.

36- Till, B.G., Jensen, M.C., Wang, J., Chen, E.Y., Wood, B.L., Greisman, H.A., Qian, X., James, S.E., Raubitschek, A., Forman, S.J. and Gopal, A.K., 2008. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1393.7.2.1.1]

specific T cells. *Blood*, *112*(6), pp.2261-2271.

37- VandenDriessche, T., Ivics, Z., Izsvák, Z. and Chuah, M.K., 2009. Emerging potential of transposons for gene therapy and generation of induced pluripotent stem cells. *Blood*, *114*(8), pp.1461-1468.

38- Walisko, O., Schorn, A., Rolfs, F., Devaraj, A., Miskey, C., Izsvák, Z. and Ivics, Z., 2008. Transcriptional activities of the Sleeping Beauty transposon and shielding its genetic cargo with insulators. *Molecular Therapy*, *16*(2), pp.359-369.

39- Wilber, A., Frandsen, J.L., Geurts, J.L., Largaespada, D.A., Hackett, P.B. and McIvor, R.S., 2006. RNA as a source of transposase for Sleeping Beauty-mediated gene insertion and expression in somatic cells and tissues. *Molecular Therapy*, *13*(3), pp.625-630.

40- Williams, D.A., 2008. Sleeping beauty vector system moves toward human trials in the United States. *Molecular therapy*, *16*(9), pp.1515-1516.

41- Xue, X., Huang, X., Nodland, S.E., Mátés, L., Ma, L., Izsvák, Z., Ivics, Z., LeBien, T.W., McIvor, R.S., Wagner, J.E. and Zhou, X., 2009. Stable gene transfer and expression in cord blood–derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells by a hyperactive Sleeping Beauty transposon system. *Blood*, *114*(7), pp.1319-1330.

42- Yamanaka, S., 2009. A fresh look at iPS cells. *cell*, *137*(1), pp.13-17.

43- Yant, S.R., Meuse, L., Chiu, W., Ivics, Z., Izsvak, Z. and Kay, M.A., 2000. Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nature genetics*, *25*(1), p.35.

44- Zayed, H., Izsvák, Z., Walisko, O. and Ivics, Z., 2004. Development of hyperactive sleeping beauty transposon vectors by mutational analysis. *Molecular Therapy*, *9*(2), pp.292-304.

45- Zhu, J., Kren, B.T., Park, C.W., Bilgim, R., Wong, P.Y.P. and Steer, C.J., 2007. Erythroid-specific expression of β-globin by the Sleeping Beauty transposon for sickle cell disease. *Biochemistry*, *46*(23), pp.6844-6858.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1393.7.2.1.1]

Using the technology of Sleeping Beauty transposons for genetic engineering and cell-mediated immunity

Naghmeh Gholipour[1*], Malihe Naderi[2], Amir Mousavi[3], Fatemeh Akbarian[1], simin nafian dehkordi[1] Farzaneh Khani[1] and fatemeh nafian dehkordi[4]

[1]PhD student of National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.
[2] M.Sc, Department of Microbiology,Qom branch,Islamic Azad University,Qom, Iran.
[3]Associate Professor of National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.
[4]PhD student of Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

ngholipour@nigeb.ac.ir

Abstract

Sustainable production of transgenes in human cells can be combined of both viral and non-viral methods for gene therapy. Efficient transfection into primary cells is proposed by recombinant virus technology; even though provided by reports of successful treatment, it still has a lot of disadvantages. As of today, the use of plasmids can be a viable alternative to viral vectors for its reduced costs, low immunogenicity, and effective insertion. In the past decades, Sleeping Beauty transposons (SB) have been developed as a non-viral vector system for gene therapy, with the shared benefits of both vectors and naked DNA. The SB system has been successfully used in human T cells for generating specific chimeric antigen receptors (CAR). This article is aimed to introduce transposon technology for a safe genetransfer into human cells with the emphasis on SB systems. Moreover, viral and non-viral gene transfer systems are described by considering both the advantages and disadvantages.

Keywords: Transposon system, Sleeping Beauty transposon, nonviral vector, gene therapy, biosafety.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1393.7.2.1.1]