دانشکده پزشکی

گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی

عنوان پایان نامه

بررسی توانایی وکتورهای لنتی ویروسی ناقص از نظر آنزیم های رونوشت برداری معکوس و اینتگراز در بیان ترانس ژن در رده سلولی 293T

شماره طرح تحقیقاتی : ۳۹۱۳۳۵

نویسنده

آرزو کرم زاده

تحت راهنمایی

دکتر حسین خان احمد

تحت مشاوره

دکتر رسول صالحی

اسفند ۱۳۹۲

چکیده پایان نامه

مقدمه

یکی ازراهکارهای ژن درمانی عفونت HIV-1 ، کشتن سلول های آلوده به ویروس با استفاده از ژن های خودکشنده است.اما چالش مهم در این روش ، منحصر کردن بیان ژن خود کشنده در این سلول هاست.راه حلی که برای این مشکل پیشنهاد می شود ، آن است که با حذف توالی ژنی دومن RNase H از آنزیم رونوشت بردار معکوس و آنزیم اینتگراز با یا بدون جهش دومن P_{51} (تبدیل تریپتوفان ۲۲۹ به لیزین) از ناقل

pLP1 ، یکی از سه ناقل کمکی ، در ساخت وکتورهای لنتی ویروسی نسل سوم ، لنتی وکتوری ناقصی از نظر آنزیم های اینتگراز و رونوشت بردار معکوس ساخته شود.انتظار می رود این وکتورها از این دو آنزیم که تنها در سلول های آلوده به ویروس HIV-1 وجود دارد، برای تبدیل RNA ژنومی خود به DNA ، درج آن و درنتیجه بیان ژن خود کشنده و کشتن اختصاصی این سلول ها استفاده کنند.. در مطالعه حاضر ،توانایی تولید چنین لنتی وکتور ناقصی از نظر آنزیم های اینتگراز و رونوشت بردار معکوس ، بررسی شد.

روشها

قطعه P_{51} جهش یافته و قطعه P_{51} به ترتیب با روش Overlap extension PCR و PCR تکثیر شدند .ساخت دو نوع پلاسمید pLP1 جهش یافته، با کلون کردن هریک از این قطعات در پلاسمید pLP1 فاقد ژن اینتگراز و RNase H انجام شد . تولید وکتور لنتی ویروسی با ترانسفکشن همزمان ناقل pLenti-DEST به همراه ناقل های کمکی pLP2 ، pLP/VSV-G و pLP1 (جهش یافته یا طبیعی) ، به روش کلسیم- فسفات به درون رده سلولی 293T،صورت گرفت.پس از استخراج RNA ویروس و سنتز cDNA، با تکنیک Absolute Real-time PCR تیتر وکتورهای لنتی ویروسی ناقص و طبیعی مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین بیان ژن eGFP ، بعد از ترانسداکشن حجم های متفاوت (۱۲۸، ۶۴، ۱۶،۴ و۱ میکرولیتر) ازسوپ تغلیظ شده ویروس ها، در سلول های 293T ، با میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد.

نتایج

تیتر لنتی وکتورهای طبیعی $۵/۲۵\times۱۰^{۵}$ TU/ml محاسبه شد وهیچ یک از لنتی وکتور های ناقص طراحی شده دراین مطالعه، تکثیری نداشتند. همچنین برخلاف لنتی وکتورهای طبیعی که بین افزایش غلظت ویروس و درصد سلول های 293T سبز شده ارتباط مستقیم وجود داشت، وکتورهای لنتی ویروسی ناقص هیچ بیانی از ژن eGFP نشان ندادند که همراه با نتایج حاصل از Real-time PCR ، بیانگر عدم تولید این وکتورها در این مطالعه بود.

بحث و نتیجه گیری

دلایل احتمالی عدم موفقیت در تولید وکتورهای لنتی ویروسی ناقص می تواند این باشد که ، مطالعاتی با حذف های مشابه این تحقیق، که موفق به تولید لنتی ویروس های ناقص شده بودند ، از وکتور pNL4-3 که حاوی توالی کامل ژنوم ویروس HIV-1 و ژن های ویرولانس بود، استفاده کرده نمودند ، برخلاف وکتورهای لنتی ویروسی نسل سه که برای ساختشان نیازمند سه پلاسمید مجزا هستند. این مطلعات همچنین با کاهش تیتر ۷۰-۳۰ % لنتی ویروس های حاصل از حذف همزمان دومن های اینتگراز و RNase H مواجه شدند،با توجه به این که لنتی وکتورهای نسل سه ازتیتر پایینی برخور دارند، حال با افزودن دو نقص آنزیمی مذکور ، چه بسا تیتر این وکتورها نیز چنان کاهشی پیدا کرده است که غیر قابل تیتراسیون هستند . از طرفی شاید همچون Integrase-deficient leniviral vectors (IDLVs) ها، تنها گروه خاصی از جهش ها در تولید لنتی ویرال وکتور ناقص از نظر آنزیم های رونوشت بردار معکوس و اینتگراز کاربردی بوده و حذف های ژنی انجام شده در این مطالعه، در دسته جهش های ممانعت کننده از ساخت وکتور محسوب می شوند .در آخر پیش بینی می شود که شاید با افزایش تیتر تولیدی وکتورهای لنتی ویروسی طبیعی تا $۱۰^{۶}$ TU/ml و یا بیشتر،امکان تولید چنین وکتورهای ناقصی وجود داشته باشد.

کلید واژه : HIV-1 ، ژن درمانی ، ژن خودکشنده ، لنتی وکتور ، لنتی وکتور ناقص از نظر RTو IN ، توالی p51.

نام مقاله مستخرج از پایان نامه :

Study of the effect mutant integrase and reverse transcriptase defection on lentiviral vector production.

فهرست مطالب

فصل اول : مقدمه

۱- ۱ مقدمه.....
۱
۱-۲ خانواده رتروویریده.....۱
۱-۲-۱ ساختار لنتی ویروس ها .....
۲
۱-۲-۲ ژنوم رترو/ لنتی ویروس ها .....
۲
۱-۲-۳ فعالیت و ساختار آنزیم Reverse transcriptase .....
۴
۱-۲-۴ سیکل زندگی لنتی ویروس ها .....
۵
۱-۳ ژن درمانی عفونت HIV-1 .....
۶
۱-۴ انواع راهکارهای ژن درمانی عفونت HIV-1 ..... ۶
۱-۵ ژن درمانی خود کشنده ۷
۱-۶ لنتی وکتور های HIV-1 ..... ۸
۱-۷ اهداف و فرضیات.....۱۳

فصل دوم : مواد و روشها

۲-۱ توالی و مشخصات پرایمر های استفاده شده در این تحقیق..... ۱۵

۲-۲ تکثیر پلاسمیدهای کمکی لنتی ویروس (pLP1 ، pLP2 و pLP/VSV-G) و وکتور انتقال دهنده pLOX/CWgfp در باکتری E.coli Top10 F' (ترانسفورماسیون) ۱۶

۲-۳ برش پلاسمید با آنزیم های محدودالاثر اختصاصی (Restriction analysis) ۱۷

۲- ۴ ساخت پلاسمید جهش یافته Mutant pLP1 (RNase H , IN minus) ۱۸

۲-۵ ایجاد جهش در توالی دومن P_{51} با روش Overlap extension PCR ۱۹

۲- ۵-۱ ساخت پلاسمید جهش یافته Mutant pLP1 (RNase H , IN minus & $P_{51\ mutant}$) ۲۰

۲-۶ برنامه و مخلوط واکنش PCR برای تکثیر اختصاصی قطعات P_{51} ، Over II و Over I P_{51} و $P_{51mutant}$ ۲۱

۲-۷ هضم آنزیمی پلاسمید pLP1 و قطعات P_{51} و $P_{51mutant}$ ۲۲

۲-۷-۱ کلون کردن قطعه P_{51} یا قطعه $P_{51mutant}$ در پلاسمید pLP1 ..... ۲۳

۲-۸ تایید پلاسمید جهش یافته Mutant pLP1 (RNase H , IN minus) ۲۴

۲-۸-۱ Colony PCR ۲۵

۲-۹ تایید پلاسمید جهش یافته Mutant pLP1 (RNase H , IN minus & $P_{51\ mutant}$) ۲۵

۲-۹-۱ تایید بیشتر هر دونوع پلاسمید جهش یافته pLP1 با Sequencing ۲۵

۲- ۱۰ کشت دادن سلول های HEK 293T ۲۵

۲-۱۱ تولید وکتور لنتی ویروسی ۲۶

۲-۱۱-۱ تعیین غلظت لنتی وکتورها ۲۶

۲- ۱۲ استخراج RNA از لنتی ویروس ها و ساخت cDNA (واکنش نسخه برداری معکوس) ۲۷

۲-۱۳ رسم منحنی استاندارد جهت اندازه گیری تیتر جهش یافته و طبیعی با استفاده از روش Real-time qPCR ۲۷

۲-۱۳- ۱ اندازه گیری تیتر لنتی وکتورهای جهش یافته و طبیعی با استفاده از روش Real-time qPCR براساس منحنی استاندارد ۳۰

فصل سوم : نتایج

۳-۱ تایید ترانسفورماسیون پلاسمیدهای pLP1 ، pLP2 ، pLP/VSV-G و pLOX/CWgfp ۳۳

۳-۲ تایید تکثیر توالی دومن P_{51} ۳۴

۳-۳ تایید ایجاد جهش در توالی دومن P_{51} با روش Overlap extension PCR ۳۴

۳-۴ نتیجه هضم آنزیمی پلاسمید pLP1 و قطعات تکثیر شده P_{51} و $P_{51mutant}$ ۳۵

۳-۵ نتیجه ساختن پلاسمید جهش یافته (Mutant pLP1 (RNase H , IN minus ۳۷

۳-۶ نتیجه ساختن پلاسمید جهش یافته (Mutant pLP1 (RNase H , IN minus & $P_{51\ mutant}$ ۳۹

۳-۷ ساخت حامل لنتی ویروسی و تعیین تیتر آن ۴۱

۳-۸ تیتراسیون لنتی ویروس های جهش یافته و طبیعی توسط Real-Time qPCR ۴۲

۳-۸-۱ محاسبه تیتر لنتی وکتورهای طبیعی بر اساس منحنی استاندارد ۴۳

فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری

..... ۴۶

منابع.....

۵۶

مقاله

..... ۶۶

پیوست

ها.....۸۹

فهرست شکل ها

فصل اول : مقدمه

تصویر۱- ۱ .نمای شماتیک ذرات HIV-1 بالغ..... ۲

تصویر۱-۲ ساختارRNA ژنومی رتروویروس ، دو رشته ای پروویروس LTR ها می شودو نمای شماتیک HIV-1 LTR..... ۴

تصویر۱- ۳ نموداری از انواع روش های ژن درمانی عفونت HIV-1 ..... ۱۰

تصویر۱-۴.ساختار چهار پلاسمید در بردارنده ژن های ضروری برای تولید لنتی وکتورهای نسل سوم ۲۲

تصویر۱- ۵ .شمایی از وکتور کمکی pLP1 جهش یافته در ژن های آنزیم IN ، دومن RNaseH و دومن p51RT از آنزیم RT ۲۶

فصل دوم : مواد و روشها

تصویر۲- ۱.نحوه ساخت پلاسمید جهش یافته (Mutant pLP1 (RNase H , IN minus ۳۳

تصویر۲-۲. تصویری از ساخت قطعه $P_{51mutant}$ با واکنش Overlap extension PCR ۳۴

تصویر۲- ۳ . ساخت پلاسمید جهش یافته (Mutant pLP1 (RNase H , IN minus & $P_{51\ mutant}$ ۳۵

تصویر ۲-۴.تایید کلون های حاوی پلاسمید های موتانت با روش Colony PCR ۴۰

فصل سوم : نتایج

تصویر۳-۱ تایید پلاسمیدهای pLP1 ، pLP2 ، pLP/VSV-G و pLOX/CWgfp با هضم آنزیمی..... ۴۹

تصویر۳-۲ تایید توالی دومن P_{51} ۵۰

تصویر ۳-۳ PCR قطعات اول (OverI) و دوم (OverII) ژن دومن P_{51} ۵۱

تصویر ۳-۴ تایید هضم آنزیمی پلاسمید pLP1 و توالی های P_{51} و $P_{51mutant}$ ۵۲

تصویر۳- ۵ قطعات درجی و backbone پلاسمید تخلیص شده جهت ligation و ساخت وکتورهای جهش یافته pLP1 ..... ۵۳

تصویر ۳-۶ تایید پلاسمید (Mutant pLP1 (RNase H , IN minus با روش Colony PCR ۵۴

تصویر۳- ۷ تایید پلاسمید (Mutant pLP1 (RNase H , IN minus با روش PCR و هضم آنزیمی..... ۵۵

تصویر۳- ۸ تعیین توالی دومن P51 .....۵۶

تصویر۳- ۹ سلول های 293T ترانسداکت شده با لنتی وکتورهای طبیعی و جهش یافته جهت انجام تیتراسیون با بررسی بیان ژن eGFP با میکروسکوپ فلوروسانس..... ۵۸

تصویر۳- ۱۰ نحوه محاسبه تیتر لنتی وکتورهای طبیعی در این تحقیق ۵۹

تصویر۳- ۱۱ منحنی استاندارد مربوط به تکثیر رقت های متوالی پلاسمید pLOX/CWgfp با پرایمرهای اختصاصی ژن eGFP و موقعیت تکثیر ژن eGFP در گروه لنتی وکتورهای طبیعی..... ۶۰

فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری

تصویر۴-۱ وکتورخودکشنده در بردارنده سه عنصر Cis-acting از ویروس HIV-1..... ۶۶

تصویر۴-۲ دیاگرامی ازآنزیم اینتگراز HIV-1 ..... ۶۹

تصویر ۴-۳ تولید وکتورهای آدنوویروس نوترکیب برای رفع مشکل تیتر پایین وکتورهای لنتی ویروسی ، در ژن درمانی خودکشنده عفونت HIV-1 ..... ۷۱

فهرست جداول

جدول۲-۱ فهرست پرایمر های استفاده شده در تحقیق ۲۹

جدول۲-۲ اسامی و اندازه پلاسمیدهای مورد نیاز در تهیه لنتی وکتور های نسل سوم..... ۳۱

جدول ۲-۳ واکنش برش پلاسمید با آنزیم محدودالاثر ۳۲

جدول ۲-۴ حجم واکنش PCR با آنزیم Pfu DNA polymerase ۳۶

جدول۲-۵ برنامه PCR برای تکثیر قطعات شامل p51 ، over I ، over II ۳۷

جدول۲-۶ برنامه Overlap extension PCR برای تکثیر قطعه $P_{51mutant}$ ۳۷

جدول ۲-۷ واکنش اتصال محصول PCR در پلاسمید pLP1 ..... ۳۹

جدول ۲-۸ تهیه رقت های سریالی با تعداد نسخه مشخص از پلاسمید pLOX/CWgfp برای رسم منحنی استاندارد qPCR Real-time ۴۶

تصویر ۴-۳.تولید وکتورهای آدنوویروس نوترکیب برای رفع مشکل تیتر پایین وکتورهای لنتی ویروسی، در ژن درمانی خودکشنده عفونت HIV-1.

منابع

[1]. Buchschacher GL. Introduction to retroviruses and retroviral vectors. Somatic cell and molecular genetics. 2001;26(1):1-11.

[2]. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature. 1995 Jan 12;373(6510):117-22.

[3]. http://www.unaids.org/worldaidsday/2010 press/graphics.html /newly infected with HIV during 2013 Estimated number of adults and children.WHO UNAIDS (GENERIC).

[4]. Federico M. From lentiviruses to lentivirus vectors. METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY-CLIFTON THEN TOTOWA-. 2003;229:3-16.

[5]. Lu K, Heng X, Summers MF. Structural determinants and mechanism of HIV-1 genome packaging. J Mol Biol. 2011 Jul 22;410(4):609-33.

[6]. Jewell NA, Mansky LM. In the beginning: genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. J Gen Virol. 2000 Aug;81(Pt 8):1889-99.

[7]. Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Nov 10;106(45):19114-9.

[8]. Nienhuis AW. Development of gene therapy for blood disorders. Blood. 2008 May 1;111(9):4431-44.

[9]. Falkner FG, Holzer GW. Vaccinia viral/retroviral chimeric vectors. Curr Gene Ther. 2004 Dec;4(4):417-26.

[10]. Lever AM, Strappe PM, Zhao J. Lentiviral vectors. J Biomed Sci. 2004 Jul-Aug;11(4):439-49.

[11]. Pereira LA, Bentley K, Peeters A, Churchill MJ, Deacon NJ. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. Nucleic Acids Res. 2000 Feb 1;28(3):663-8.

[12] . Freed EO. HIV-1 replication. Somatic cell and molecular genetics. 2001;26(1):13-33.

[13]. Muesing MA, Smith DH, Capon DJ. Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein. Cell. 1987 Feb 27;48(4):691-701.

[14]. Cujec TP, Cho H, Maldonado E, Meyer J, Reinberg D, Peterlin BM. The human immunodeficiency virus transactivator Tat interacts with the RNA polymerase II holoenzyme. Mol Cell Biol. 1997 Apr;17(4):1817-23.

[15]. Reddy TR, Kraus G, Suhasini M, Leavitt MC, Wong-Staal F. Identification and mapping of inhibitory sequences in the human immunodeficiency virus type1. J Virol. 1995 Aug;69(8):5167-70.

[16]. Li Y, Yamakita Y, Krug RM. Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Apr 28;95(9) :4864-9.

[17]. Rodgers DW, Gamblin SJ, Harris BA, Ray S, Culp JS, Hellmig B, et al. The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Feb 14;92(4):1222-6.

[18]. Sluis-Cremer N, Kempner E, Parniak MA. Structure-activity relationships in HIV-1 reverse transcriptase revealed by radiation target analysis. Protein Sci. 2003 Sep;12(9):2081-6.

[19]. Telenti A. Host polymorphism in steps of the HIV-1 lifecycle after entry and other genetic variants influencing HIV-1 pathogenesis. Curr Opin HIV AIDS. 2006 May;1(3):232-40.

[20]. Dropulic B, Jeang KT. Gene therapy for human immunodeficiency virus infection: genetic antiviral strategies and targets for intervention. Hum Gene Ther. 1994 Aug;5(8):927-39.

[21]. Sarver N, Rossi J. Gene therapy: a bold direction for HIV-1 treatment. AIDS Res Hum Retroviruses. 1993 May;9(5):483-7.

[22]. Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, Boden D, Hurley A, Fang F, et al. The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. Nat Med. 2000 Jan;6(1):82-5.

[23]. Dinges MM, Cook DR, King J, Curiel TJ, Zhang XQ, Harrison GS. HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene confers long-term protection against HIV type 1 infection in the human promonocytic cell line U937. Hum Gene Ther. 1995 Nov;6(11):1437-45.

[24]. Young J, Tang Z, Yu Q, Yu D, Wu Y. Selective killing of HIV-1-positive macrophages and T cells by the Rev-dependent lentivirus carrying anthrolysin O from Bacillus anthracis. Retrovirology. 2008;5:36.

[25]. Rossi JJ, June CH, Kohn DB. Genetic therapies against HIV. Nat Biotechnol. 2007 Dec;25(12) :1444-54.

[26]. Schambach A, Baum C. Clinical application of lentiviral vectors - concepts and practice. Curr Gene Ther. 2008 Dec;8(6):474-82.

[27]. Huelsmann PM, Hofmann AD, Knoepfel SA, Popp J, Rauch P, Di Giallonardo F, et al. A suicide gene approach using the human pro-apoptotic protein tBid inhibits HIV-1 replication. BMC Biotechnol. 2011;11:4.

[28]. Vocero-Akbani AM, Heyden NV, Lissy NA, Ratner L, Dowdy SF. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. Nat Med. 1999 Jan;5(1):29-33.

[29]. Ragheb JA, Couture L, Mullen C, Ridgway A, Morgan RA. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by Tat/Rev-regulated expression of cytosine deaminase, interferon alpha2, or diphtheria toxin compared with inhibition by transdominant Rev. Hum Gene Ther. 2004 Jan 1;10(1):103-12.

[30]. Hamouda T, McPhee R, Hsia SC, Read GS, Holland TC, King SR. Inhibition of human immunodeficiency virus replication by the herpes simplex virus virion host shutoff protein. J Virol. 1997 Jul;71(7):5521-7.

[31]. Young LS, Searle PF, Onion D, Mautner V. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. J Pathol. 2006 Jan;208(2):299-318.

[32]. Wu Y, Beddall MH, Marsh JW. Rev-dependent lentiviral expression vector. Retrovirology. 2007;4:12

[33]. Stathopulos PB. Taking the good out of the bad: lentiviral-based gene therapy of the hemoglobinopathies. Biotechnol Adv. 2003 Sep;21(6):513-26.

[34]. Modrow S, Kattenbeck B, von Poblotzki A, Niedrig M, Wagner R, Wolf H. The gag proteins of human immunodeficiency virus type 1: mechanisms of virus assembly and possibilities for interference. Med Microbiol Immunol. 1994 Sep;183(4):177-94.

[35]. Sandefur S, Smith RM, Varthakavi V, Spearman P. Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag). J Virol. 2000 Aug;74(16):7238-49.

[36]. Zybarth G, Carter C. Domains upstream of the protease (PR) in human immunodeficiency virus type 1 Gag-Pol influence PR autoprocessing. J Virol. 1995 Jun;69(6):3878-84.

[37]. Kaplan AH, Manchester M, Swanstrom R. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. J Virol. 1994 Oct;68(10):6782-6..

[38]. Cara A, Klotman ME. Retroviral E-DNA: persistence and gene expression in nondividing immune cells. J Leukoc Biol. 2006 Nov;80(5):1013-7.

[39]. Vogt VM. Proteolytic processing and particle maturation. Curr Top Microbiol Immunol. 1996;214:95-131

[40]. Loeb DD, Hutchison CA, 3rd, Edgell MH, Farmerie WG, Swanstrom R. Mutational analysis of human immunodeficiency virus type 1 protease suggests functional homology with aspartic proteinases. J Virol. 1989 Jan;63(1):111-21

[41]. Wlodawer A, Miller M, Jaskolski M, Sathyanarayana BK, Baldwin E, Weber IT, et al. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. Science. 1989 Aug 11;245(4918):616-21

[42]. Tessmer U, Krausslich HG. Cleavage of human immunodeficiency virus type 1 proteinase from the N-terminally adjacent p6* protein is essential for efficient Gag polyprotein processing and viral infectivity. J Virol. 1998 Apr;72(4):3459-63.

[43]. Wan M, Takagi M, Loh BN, Xu XZ, Imanaka T. Autoprocessing: an essential step for the activation of HIV-1 protease. Biochem J. 1996 Jun 1;316 (Pt 2):569-73.

[44]. Quillent C, Dumey N, Dauguet C, Clavel F. Reversion of a polymerase-defective integrated HIV-1 genome. AIDS Res Hum Retroviruses. 1993 Oct;9(10):1031-7.

[45]. Quillent C, Borman AM, Paulous S, Dauguet C, Clavel F. Extensive regions of pol are required for efficient human immunodeficiency virus polyprotein processing and particle maturation. Virology. 1996 May 1;219(1):29-36.

[46]. Krausslich HG. Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Apr 15;88(8):3213-7.

[47]. Bukovsky A, Gottlinger H. Lack of integrase can markedly affect human immunodeficiency virus type 1 particle production in the presence of an active viral protease. J Virol. 1996 Oct;70(10):6820-5.

[48]. Engelman A, Englund G, Orenstein JM, Martin MA, Craigie R. Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication. J Virol. 1995 May;69(5):2729-36.

[49]. Navia MA, McKeever BM. A role for the aspartyl protease from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in the orchestration of virus assembly. Ann N Y Acad Sci. 1990;616:73-85.

[50]. Wu X, Liu H, Xiao H, Conway JA, Hunter E, Kappes JC. Functional RT and IN incorporated into HIV-1 particles independently of the Gag/Pol precursor protein. EMBO J. 1997 Aug 15;16(16):5113-22.

[51]. Ansari-Lari MA, Gibbs RA. Expression of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in trans during virion release and after infection. J Virol. 1996 Jun;70(6):3870-5.

[52]. Dudek T, Knipe DM. Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. Virology. 2006 Jan 5;344(1):230-9.

[53]. Zabihollahi R, Sadat SM, Vahabpour R, Aghasadeghi MR, Memarnejadian A, Ghazanfari T, et al. Development of single-cycle replicable human immunodeficiency virus 1 mutants. Acta Virol. 2011;55(1):15-22.

[54]. Liao WH, Wang CT. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Pr160 gag-pol mutants with truncations downstream of the protease domain. Virology. 2004 Nov 10;329(1):180-8.

[55]. Nevinsky GA, Andreola ML, Jamkovoy VI, Levina AS, Barr PJ, Tarrago-Litvak L, et al. Functional analysis of primers and templates in the synthesis of DNA catalyzed by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. Eur J Biochem. 1992 Jul 1;207(1):351-8.

[56]. Muller B, Restle T, Weiss S, Gautel M, Sczakiel G, Goody RS. Co-expression of the subunits of the heterodimer of HIV-1 reverse transcriptase in Escherichia coli. J Biol Chem. 1989 Aug 25 ; 264(24) :13975-8.

[57]. Tisdale M, Ertl P, Larder BA, Purifoy DJ, Darby G, Powell KL. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by using monoclonal antibodies: role of the C terminus in antibody reactivity and enzyme function. J Virol. 1988 Oct;62(10):3662-7.

[58]. Hizi A, McGill C, Hughes SH. Expression of soluble, enzymatically active, human immunodeficiency virus reverse transcriptase in Escherichia coli and analysis of mutants. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Feb;85(4):1218-22.

[59]. Restle T, Muller B, Goody RS. Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. A target for chemotherapeutic intervention. J Biol Chem. 1990 Jun 5;265(16):8986-8.

[60].el Dirani-Diab R, Andreola ML, Nevinsky G, Tharaud D, Barr PJ, Litvak S, et al. Biochemical characterization of the p51 sub-unit of human immunodeficiency virus reverse transcriptase in homo- and heterodimeric recombinant forms of the enzyme. FEBS Lett. 1992 Apr 13;301(1):23-8.

[61]. Dufour E, El Dirani-Diab R, Boulme F, Fournier M, Nevinsky G, Tarrago-Litvak L, et al. p66/p51 and p51/p51 recombinant forms of reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type- 1 interactions with primer tRNA(Lys3), initiation of cDNA synthesis, and effect of inhibitors. Eur J Biochem. 1998 Jan

[62]. Pelemans H, Esnouf R, De Clercq E, Balzarini J. Mutational analysis of trp-229 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) identifies this amino acid residue as a prime target for the rational design of new non-nucleoside RT inhibitors. Mol Pharmacol. 2000 May ; 57(5):954-60.

[63]. Ghosh M, Jacques PS, Rodgers DW, Ottman M, Darlix JL, Le Grice SF. Alterations to the primer grip of p66 HIV-1 reverse transcriptase and their consequences for template-primer utilization. Biochemistry. 1996 Jul 2;35(26):8553-62.

[64]. Sambrook, J. and D.W. Russell. Molecular cloning: a laboratory manual. CSHL press 2001;1.

[65]. European AIDS Clinical Society (EACS), Guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected Adults in Europe, 2007. Available at: www.eacs.eu/guide/index.htm

[66]. Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. Delta Coordinating Committee. Lancet. 1996 Aug 3;348(9023):283-91.

[67]. Motwani B, Khayr W. Pharmacoenhancement of protease inhibitors. Am J Ther. 2006 Jan-Feb;13(1):57-63.

[68]. Clotet B, Raffi F, Cooper D, Delfraissy JF, Lazzarin A, Moyle G, et al. Clinical management of treatment-experienced, HIV-infected patients with the fusion inhibitor enfuvirtide: consensus recommendations. AIDS. 2004 May 21;18(8):1137-46.

[69]. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. Lancet. 2008 Jul 26;372(9635):293-9.

[70]. Brenner B, Wainberg MA, Salomon H, Rouleau D, Dascal A, Spira B, et al. Resistance to antiretroviral drugs in patients with primary HIV-1 infection. Investigators of the Quebec Primary Infection Study. Int J Antimicrob Agents. 2000 Dec;16(4):429-34.

[71]. Potter SJ, Dwyer DE, Saksena NK. Differential cellular distribution of HIV-1 drug resistance in vivo: evidence for infection of CD8+ T cells during HAART. Virology. 2003 Jan 20;305(2):339-52.

[72]. Fanning G, Amado R, Symonds G. Gene therapy for HIV/AIDS: the potential for a new therapeutic regimen. J Gene Med. 2003 Aug;5(8):645-53.

[73]. Wolkowicz R, Nolan GP. Gene therapy progress and prospects: novel gene therapy approaches for AIDS. Gene Ther. 2005 Mar;12(6):467-76.

[74]. Ranga U, Woffendin C, Verma S, Xu L, June CH, Bishop DK, et al. Enhanced T cell engraftment after retroviral delivery of an antiviral gene in HIV-infected individuals. Proc Natl Acad Sci U S A. ٢٠٠٠Feb 3;95(3):1201-6.

[75]. Morgan RA, Walker R. Gene therapy for AIDS using retroviral mediated gene transfer to deliver HIV-1 antisense TAR and transdominant Rev protein genes to syngeneic lymphocytes in HIV-1 infected identical twins. Hum Gene Ther. 1996 Jun 20;7(10):1281-306.

[76]. Browning CM, Cagnon L, Good PD, Rossi J, Engelke DR, Markovitz DM. Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gene expression and virus production by an HIV-١tat activation-response RNA decoy. J Virol. 1999 Jun;73(6):5191-5.

[77]. Bukovsky AA, Song JP, Naldini L. Interaction of human immunodeficiency virus-derived vectors with wild-type virus in transduced cells. J Virol. ٢٠٠٢Aug;73(8):7087-92.

[78]. An DS, Morizono K, Li QX, Mao SH, Lu S, Chen IS. An inducible human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vector which effectively suppresses HIV-1 replication. J Virol. ٢003 Sep;73(9):7671-7.

[79]. Mautino MR, Keiser N, Morgan RA. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by HIV-1-based lentivirus vectors expressing transdominant Rev. J Virol. 2001 Apr;75(8):3590-9.

[80]. Lemiale F, Korokhov N. Lentiviral vectors for HIV disease prevention and treatment. Vaccine. 2009 May 26;27(25-26):3443-9.

[81]. Mautino MR, Morgan RA. Gene therapy of HIV-1 infection using lentiviral vectors expressing anti-HIV-1 genes. AIDS Patient Care STDS. 2002 Jan;16(1):11-26.

[82]. Mautino MR, Ramsey WJ, Reiser J, Morgan RA. Modified HIV-based lentiviral vectors display decreased sensitivity to transdominant Rev. Human Gene Therapy 2000;11:895–908.

[83]. Movassagh M, Boyer O, Burland MC, Leclercq V, Klatzmann D, Lemoine FM. Retrovirus-mediated gene transfer into T cells: 95% transduction efficiency without further in vitro selection. Hum Gene Ther 2000;11:1189–1200.

[84]. Marzio G, Verhoef K, Vink M, Berkhout B. In vitro evolution of a highly replicating, doxycycline-dependent HIV for applications in vaccine studies. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:6342–6347.

[85]. Verhoef K, Marzio G, Hillen W, Bujard H, Berkhout B. Strict control of human immunodeficiency virus type 1 replication by a genetic switch: Tet for Tat. J Virol 2001;75:979–987.

[86]. Marcello A, Giaretta I. Inducible expression of herpes simplex virus thymidine kinase from a bicistronic HIV1 vector. Res Virol۲۰۰۲ Nov-Dec;149(6):419-31.

[87]. Agarwal S, Nikolai B, Yamaguchi T, Lech P, Somia NV: Construction and use of retroviral vectors encoding the toxic gene barnase. Mol Ther 2006, 14:555-563.

[88]. Vocero-Akbani AM, Heyden NV, Lissy NA, Ratner L, Dowdy SF. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. Nat Med. ۲۰۰۰ Jan;5(1):29-33.

[89]. Gao X, Voytas DF. A eukaryotic gene family related to retroelement integrases. Trends Genet. 2005 Mar;21(3):133-7.

[90]. Wanisch K, Yanez-Munoz RJ. Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age. Mol Ther. 2009 Aug;17(8):1316-32.