

حذف بیان پروتئین دیستروفین با استفاده از تداخل در پردازش mRNA

مجید مجرد^۱، عطیه اصلاحی^۱، حسین تنی پور^۱، جواد زواررضا^{۲*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: پرش اگزونی (Exon Skipping) به عنوان یکی از امیدبخش ترین رویکردهای درمانی برای دیستروفی عضلانی دوشن (DMD) مطرح شده است. این استراتژی با بازسازی چهارچوب خوانش ژن دیستروفین، امکان تولید پروتئین کوتاه شده اما عملکردی را فراهم می کند. استفاده از ناقل های ویروسی AAV برای انتقال پایدار توالی های القاکننده exon skipping می تواند کارایی این روش را به طور قابل توجهی افزایش دهد.

روش بررسی: در این مطالعه، یک وکتور مبتنی بر AAV حاوی RNA U7 مهندسی شده برای القای حذف اگزون ۵۱ ژن دیستروفین طراحی و تولید شد. برای تسهیل و تسریع فرایند ساخت، از فناوری (LIC) ligase independent cloning استفاده گردید. ذرات ویروسی تولید شده برای آلوده سازی سلول های میوبلاست انسانی به کار رفتند و کارایی القای exon skipping با استفاده از RT-PCR و میزان بیان پروتئین دیستروفین با وسترن بلات ارزیابی شد.

نتایج: نتایج RT-PCR نشان دهنده حذف مؤثر اگزون ۵۱ از mRNA بالغ ژن دیستروفین در سلول های تیمار شده بود. همچنین، افزایش بیان پروتئین دیستروفین در سطح پروتئینی در مقایسه با نمونه های کنترل مشاهده شد که بیانگر بازسازی چهارچوب خوانش و ترجمه موفق ترانسکرپت اصلاح شده است.

نتیجه گیری: یافته های این مطالعه نشان می دهد که وکتور AAV مهندسی شده مبتنی بر U7 قادر است به طور مؤثر exon skipping اگزون ۵۱ را القا کند. استفاده از فناوری LIC امکان توسعه سریع و انعطاف پذیر وکتورهای exon skipping هدف گیرنده اگزون های مختلف ژن دیستروفین را فراهم می کند. این پلتفرم می تواند به عنوان یک راهبرد مناسب در پزشکی شخصی و درمان بخش قابل توجهی از بیماران مبتلا به DMD مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: دیستروفین، تداخل ژنی، پردازش

ارجاع: مجرد مجید، اصلاحی عطیه، تنی پور حسین، زواررضا جواد. حذف بیان پروتئین دیستروفین با استفاده از واسطه تداخل در پردازش mRNA. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۵؛ ۳۴ (۳): ۲۳-۱۰۱۱.

۱- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۲- بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۵۰۲۸۷۴۲، پست الکترونیکی: jzavar@gmail.com، صندوق پستی: ۸۹۱۵۱۷۳۱۴۹

مقدمه

دیستروفی عضلانی دوشن (DMD) یکی از شایع‌ترین اختلالات ژنتیکی است که از هر ۳۵۰۰ تولد مرد ۱ نفر اتفاق می‌افتد. DMD با تخریب شدید پیش‌رونده عضلانی مشخص می‌شود که منجر به آتروفی و ضعف عضلات اسکلتی می‌شود. پیشرفت بیماری منجر به از دست دادن تحرک و محدود شدن ویلچر بیمار تا سن ۱۵ سالگی می‌شود. تقریباً همه بیماران DMD تا سن ۳۰ سالگی می‌میرند (۱). تا به امروز، چندین راهکار درمانی، مانند انتقال ژن مینی یا میکرودیستروفین، راهکار کریسپر (CRISPR)، درمان با سلول‌های بنیادی، القاء بیان یوتروفین (utrophin expression) و درمان آنتی‌سنس به منظور بیان عملکردی دیستروفین در سلول‌های عضلانی توسعه یافته‌اند (۹-۲). راهکار پرش ژن (gene skipping) یا اگزون (exon skipping) یکی از امیدوارکننده‌ترین راهکارهای مبتنی بر نجات چارچوب خواندن باز دیستروفین در ژن‌های جهش‌یافته خارج از چارچوب است که منجر به بیان پروتئین دیستروفین کوتاه شده اما عملکردی می‌شود (۹، ۱۰). این تکنیک، یک روش ژنتیکی درمانی است که در آن با تغییر به‌ویژه فرایند پردازش (RNA splicing) یک اگزون خاص از روی mRNA حذف گردیده و یک پروتئین کوتاه‌تر ولی دارای عملکرد تولید می‌شود. در این استراتژی از الیگونوکلوئوتیدهای آنتی‌سنس (AO) استفاده می‌شود که با توالی‌های پیرایشی یا پیرایش توالی تنظیمی اگزون‌های خاص تداخل می‌کنند که منجر به حذف اگزون مورد نظر در سطح pre-mRNA می‌شود. کاربرد بالینی راهکار پرش اگزون اخیراً در برخی آزمایشات بالینی مستقل با استفاده از الیگونوکلوئوتیدهای اصلاح شده شیمیایی که اگزون ۵۱ دیستروفین را هدف قرار می‌دهند، نشان داده شده است (۱۱، ۱۲). استفاده از سیستم تحویل ویروس مرتبط با آدنو (AAV) برای انتقال وکتورهای بیان‌کننده الیگونوکلوئوتید، نتایج امیدوارکننده‌ای را برای درمان DMD نشان می‌دهد. وکتور ویروسی AAV استفاده می‌کنند تا نسخه‌ای اصلاح‌شده از ژن دیستروفین را به سلول‌های عضلانی منتقل کنند (۱۳، ۱۴). پروتئین تولیدی، یک نسخه کوتاه‌تر ولی کارآمد از ژن دیستروفین است که باعث بهبود عملکرد عضلات و کند شدن روند بیماری می‌شود (۱۷-۱۵). آقای

Chicoine L. و همکاران نشان دادند که افزایش بیان GALGT2 در عضله اسکلتی رزوس می‌تواند گلیکوزیلاسیون آلفادیستروگلیکان‌ها را تحزیک نموده و بیان پروتئین‌های باند کننده دیستروفین سیناپسی را افزایش دهد که می‌توانند در درمان برخی اشکال دیستروفی عضلانی به کار روند (۱۸). در سال ۲۰۰۷ گروه Salva از ویروس AVV برای انتقال ژن دیستروفین به موش‌های مدل دیستروفی عضلانی (MDX) استفاده نمودند. آن‌ها نشان دادند که با استفاده از این وکتور بیان دیستروفین در بافت قلب و عضله بسیار بیشتر از سایر بافت است (۱۹). تیم Mendell J. در سال ۲۰۲۵ کاربرد بالقوه درمانی و نیز مشکلات و کاستی‌ها این تکنیک‌ها را نشان دادند (۱۶). آن‌ها برای انتقال ژن از وکتور AVV Rh74 استفاده نمودند. آن‌ها ورود ویروس به داخل سلول عضله و بیان دیستروفین را نشان دادند. اما به دلیل بروز برخی عوارض ناخواسته مانند مشکلات مربوط به سیستم کمپلمان آن‌ها پیشنهاد کردند که دز، زمان مطالعه و شاخص‌های عملکردی بیشتری بررسی گردد (۱۶). تیم Niks و همکاران پیشرفت‌های اولیه در کارآزمایی‌های انسانی مانند استفاده از داروهایی مانند Eteplirsen و Drisapersen را بررسی کردند (۲۰). آن‌ها نشان دادند که این درمان‌ها، هرچند تولید دیستروفین کامل را ممکن نمی‌کنند، اما سطح قابل اندازه‌گیری دیستروفین کوتاه ولی دارای عملکرد را افزایش داده و می‌توانند روند تحلیل عضلانی را کند کنند. اگر چه اشکالاتی مانند کم بودن دیستروفین بیان شده، نیاز به تزریق پیوسته، ... را ذکر نمودند. آن‌ها استفاده از پرش اگزونی به‌عنوان رهیافتی موثر و اختصاصی برای در مان دوشن را پیشنهاد کردند (۲۰). همانگونه که گفته شد با وجود اثرات مثبت این درمان، بازده پایین انتقال رشته‌های آنتی‌سنس به سلول‌های عضلانی به‌عنوان چالش اصلی در استفاده از این استراتژی باقی مانده است. به علاوه ناهمگونی آلی زیاد دیستروفی عضلانی دوشن (DMD) باعث می‌شود که انواع الیگونوکلوئوتیدهای آنتی‌سنس مختلف برای درمان بیماران مورد نیاز باشد (۱۵) که یک مشکل چالش برانگیز برای استفاده از وکتورهای AAV در این راهکار درمانی است. بنابراین هدف این مطالعه، ساخت وکتوری با استفاده از روش شبیه‌سازی مستقل از اتصال (Ligation-)

نوترکیب از پلاسمید pAAV-MCS به عنوان پایه اولیه استفاده شد. به منظور تولید این پلاسمید توالی حاوی پروموتور CMV، ناحیه MCS و توالی HGH-pA-terminator با استفاده از واکنش inversPCR و پرایمرهای معکوس از پلاسمید حذف شدند. این قطعه محصول PCR پلاسمید pAAV-trunc نامیده شد (۱۹).

تولید پلاسمید AAV حاوی ژن U7 موشی: توالی ژن طبیعی U7 موشی با استفاده از واکنش PCR و پرایمرهای اختصاصی ناحیه بالادست و پایین دست این ژن از DNA ژنومیک موش (Mus Musculus) تکثیر و جدا شد. در مرحله بعد با استفاده از تکنولوژی ligase independent cloning (LIC) توالی ژن U7 طبیعی موشی شامل توالی پروموتور U7، توالی کد کننده U7 و توالی انتهایی 3' ژن U7 به داخل پلاسمید AAV حاصل از مرحله قبل وارد شد. پلاسمید حاصله با استفاده از تعیین توالی تایید ماهیت شد و به عنوان pAAV-U7 نامیده شد.

تولید پلاسمید AAV حاوی توالی U7 فاقد دومین اتصال به DNA: با استفاده از واکنش invers PCR پلاسمید دارای حذف ناحیه دومین اتصال به DNA توالی U7 تکثیر شد و توالی pAAV-U7del نامیده شد (جدول ۱).

(independent cloning) یا LIC است که به وسیله آن بتوان چندین کاست مستقل را در یک وکتور منفرد شبیه سازی کرد. در این مطالعه از شبیه سازی مستقل از لیگیشن (Ligation independent cloning) استفاده گردید که می توان از آن برای شبیه سازی چندین قطعه انتقالی مستقل بدون نیاز به هضم اندونوکلازی محدودالاثرا استفاده گردید (۱۸-۱۶). در مطالعه حاضر، یک وکتور AAV حامل یک کاست اصلاح شده RNA هسته ای کوچک (snRNA_{YU}) تولید گردید که اگزون ۵۰ یا ۵۱ الیگونوکلئوتید آنتی سنس را با استفاده از شبیه سازی مستقل از لیگیشن (LIC) بیان می کند. نتایج نشان دهنده کاربرد LIC در تولید بردارهای AAV چند کاست است.

روش بررسی

مواد: تمام پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول شماره ۱ لیست شده است. DNA ژنومیک موش از سویه Balb/c به دست آمده است و تمام طراحی های پرایمرها بر اساس ژنوم فرنس این سویه انجام گرفته است.

حذف کاست بیان ژن نوترکیب از پلاسمید pAAV-MCS: برای تولید پلاسمید پایه اولیه برای ساخت سازه بیان قطعه

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در فرایند تولید پلاسمید بیان کننده توالی تداخل کننده با اسپلایسینگ اگزون ۵۱ و بررسی حذف اگزون ۵۱ با استفاده از RT-PCR

GCGGCCGCCCACATCGCCTGCCACTACTT	U7cassettef:	پرایمرهای تکثیر U7
GCGGCCGCCCAGAGGAGGCAGAAAGGAAG	U7cassetter:	
AGCAGGTTTTCTGACTTCGG	PAAV-U7	پرایمرهای حذف کننده دومین اتصال به ناحیه اسپلایسینگ U7 در وکتور pAAV-U7
GCGGAAGTGCGTCTGTAG	PAAV-U7	
CTTCCGCTATGATAGGGACTTAGGGTGTCAAGGAAGATGG	AON1tailA1f	اولیگوهای کد کننده ناحیه تداخل کننده با اسپلایسینگ اگزون ۵۱
CATTTCT		
TCGTGCCAGAAATGCCATCTTCCTTGACACCCTAAGTCCCT	AON1tailA1r	
ATCATA		
GCGGATGTGGAAGGCTTTT	Dmdex51F	پرایمرهای شناسایی حذف اگزون ۵۱
GGGCGTCTCTGTTCCAAATC	Dmdex51R	

با تمایل بالا به hnRNP1 (بنام tailA1) به صورت سنتتیک ساخته شد. این توالی طوری طراحی شده بود که دارای هم پوشانی با توالی های دو انتهای pAAV-U7del در دو انتهای

تولید پلاسمید AAV حاوی کاست U7-exon skipping (ES)ex51-tail: توالی هیبرید شامل توالی مکمل ناحیه exonic splicing enhancer (ESE) اگزون ۵۱ و توالی دارای ناحیه اتصال

خود بود. این دو توالی با استفاده از تکنولوژی LIC با یکدیگر تلفیق شده و تولید پلاسمید pAAV-U7ESex51tail را دادند. این پلاسمید به داخل باکتری DH5Alpha ترانسفورم و تکثیر شدند. ماهیت توالی این پلاسمید با استفاده از تعیین توالی تایید شد.

تولید ویروس AAVES51: ویروس بیان کننده توالی U7-ESex51tail با کوترانسفکشن پلاسمید pAAV-U7ESex51tail و پلاسمیدهای کمکی pAAV-Rec و pHelper (که حاوی ژن‌های rep، cap و دیگر ژن‌های مورد نیاز برای تولید ویروس هستند) تولید شدند. برای این منظور سلول‌های HEK293 کشت داده شده و با استفاده از ماده Lipofectamin 2000 ترانسفکشن شدند. سلول‌ها ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن لیز شده و ذرات ویروسی با استفاده از گرادیان سزیم کلرید و اولتراسانتریفوژ تخلیص و تغلیظ شدند.

کشت سلول‌های میوبلاست و آلوده سازی با ویروس: سلول‌های میوبلاست انسانی نامیرا شده در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۲۰٪ سرم جنینی گاو (FBS)، و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند. تعداد 10^5 سلول در هر ول از پلیت ۱۲ خانه کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت تعداد 10^6 پارتیکل ویروسی به محیط سلول‌ها اضافه شد. بعد از گذشت ۴ ساعت محیط سلول‌ها عوض شده و پس از ۴۸ ساعت سلول‌ها برای بررسی میزان بیان RNA و پروتئین دیستروفین مورد استفاده قرار گرفتند (۲۰).

استخراج RNA و واکنش RT-PCR: از سلول‌های آلوده شده با ویروس AAVES51، RNA استخراج گردید. برای این منظور از محلول استخراج RNA (Tripure) ساخت کمپانی Roche استفاده شد. مراحل استخراج دقیقاً بر طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. در مرحله بعد با استفاده از کیت سنتز cDNA aquapower ساخت شرکت بیونیر و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده cDNA ساخته شد. روش انجام کار به اختصار به صورت زیر بود: برای ساخت cDNA از $1 \mu\text{g}$ RNA به عنوان الگو استفاده شد. این میزان RNA به همراه ۱ میکرولیتر پرایمر رندوم هگزامر به لوله حاوی پرمیکس لیوفلیزه RT افزوده و با

استفاده از آب مقطر به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانیده شد. در نهایت محلول واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به منظور بررسی کیفیت نمونه cDNA ساخته شده در واکنش قبلی، با استفاده از این نمونه و پرایمرهای اختصاصی ژن HPRT یک واکنش PCR انجام گردید. پس از تایید کیفیت cDNA تولید شده، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ناحیه بالادست و پایین دست اگزون ۵۱ ژن دیستروفین واکنش PCR انجام شد. این پرایمرها طوری طراحی شده بودند که وجود یا عدم وجود اگزون ۵۱ با بررسی طول محصول PCR مشخص شود. در واقع پرایمر فوروارد در انتهای ۳' اگزون ۵۰ و پرایمر فوروارد در انتهای ۵' اگزون ۵۲ قرار گرفته بود. در صورت حذف اگزون ۵۱ طول محصول PCR با این پرایمرها ۱۳۵ جفت باز و در صورت حضور اگزون ۵۱ این محصول ۳۶۸ جفت باز طول خواهد داشت.

شرایط واکنش PCR و سترن بلات: پروتئین کامل سلول از فاز ارگانیک به دست آمده از مراحل استخراج RNA تخلیص شد. برای این منظور به میزان ۴ برابر حجم محلول ارگانیک، به این محلول استون سرد اضافه شد و این محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه انکوبه شد. سپس این محلول به مدت ۱۰ دقیقه و با حداکثر سرعت سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله در مجاورت هوا خشک شد. پروتئین استخراج شده با 4X SDS sample beffer مخلوط شد و به این مخلوط آب مقطر اضافه شد تا غلظت نهایی بافر به 1X برسد. حجمی از این نمونه که حاوی ۲۰ میکروگرم از پروتئین استخراج شده بود، بر روی ژل اکریل آمید (۱۲٪، resolving gel, 5%)، لود شد و با ولتاژ ۲۰۰ به مدت ۲ ساعت ران شد. در مرحله بعد پروتئین‌ها به ممبران (PVDF) منتقل شدند (این عمل با استفاده از ولتاژ ۲۰۰ به مدت ۲ ساعت انجام شد). ممبران به مدت ۲ ساعت همراه با shacking با محلول بلاکینگ (BSA ۱٪ در محلول TBST) انکوبه شد. در مرحله بعد به مدت ۱ ساعت ممبران با محلول آنتی‌بادی اولیه (رقت ۱:۱۰۰ در بافر بلاکینگ) انکوبه شد و پس از شستشوی ممبران با محلول ۱ TBST X (سه

شد. تعیین توالی پلاسمید نو ترکیب نشان داد که توالی U7 بدون هیچ گونه حذف، اضافه یا جهش نقطه‌ای در محل صحیح قرار گرفته است. این سازه با نام pAAV-U7 شناسایی شد و به عنوان مرجع عملکرد طبیعی RNA U7 در ادامه مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

حذف هدفمند دومین اتصال به DNA در پلاسمید-pAAV

U7del: برای بررسی نقش دومین اتصال به DNA در عملکرد RNA U7، حذف هدفمند این ناحیه با استفاده از inverse PCR انجام شد. نتایج الکتروفورز محصول PCR نشان داد که پلاسمید حذف شده دارای اندازه کوچک‌تر نسبت به پلاسمید-pAAV U7 اولیه است که حذف موفق ناحیه هدف را تأیید می‌کند (شکل ۳). نتایج تعیین توالی نیز نشان داد که حذف دومین اتصال به DNA بدون تأثیر بر سایر نواحی ساختاری U7 انجام شده است. پلاسمید حاصل با نام pAAV-U7del به عنوان بستر مناسب برای ورود توالی‌های exon skipping طراحی شده مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت و تأیید پلاسمید pAAV-U7Sex51tail: توالی هیبرید سنتتیک شامل ناحیه مکمل ESE اگرزن ۵۱ ژن دیستروفین و توالی tailA1 با تمایل اتصال بالا به hnRNPA1 طراحی و سنتز شد. این توالی به گونه‌ای طراحی شده بود که از طریق هم‌پوشانی انتهایی، امکان اتصال مستقیم به پلاسمید pAAV-U7del را فراهم کند. نتایج کلونینگ با استفاده از روش LIC نشان داد که توالی هیبرید با موفقیت در محل مناسب وارد پلاسمید شده است. بررسی تکثیر PCR و الکتروفورز نشان داد که سازه نهایی کاملاً مطابق طراحی اولیه است (شکل ۱ج). پلاسمید حاصل با نام pAAV-U7Sex51tail برای تولید ویروس نو ترکیب مورد استفاده قرار گرفت.

تولید و تخلیص ویروس نو ترکیب AAVES51: ویروس

نو ترکیب AAVES51 با کو ترانسفکشن پلاسمید-pAAV U7Sex51tail به همراه پلاسمیدهای کمکی در سلول‌های HEK293 تولید شد. بررسی مورفولوژی سلول‌ها پس از ترانسفکشن نشان‌دهنده سلامت نسبی سلول‌ها و عدم بروز سمیت شدید بود. پس از تخلیص ویروس با استفاده از گرادیان

بار هر بار ۵ دقیقه همراه با shacking) به مدت ۱ ساعت با آنتی‌بادی ثانویه (رقت ۱:۲۵۰۰ در بافر بلوک‌کننده) همانند شرایط قبلی انکوبه شد. پس از ۳ بار شستشو با ۱X TBST، ممبران به مدت ۵ الی ۱۵ دقیقه با محلول سوبسترای رنگزا (محلول DAB حاوی ۳% H2O2) انکوبه شد تا باندهای پروتئین رویت شوند. پس از مرئی شدن باندهای پروتئین، ممبران با آب مقطر شستشو داده شد و از ممبران عکس برداری شد. با استفاده از نرم‌افزار دانسیتومتری میزان دانسیته باندهای مشاهده شده، اندازه گیری شدند.

نتایج

حذف موفق کاست بیان ژن نو ترکیب از پلاسمید-pAAV

MCS: به منظور تولید یک پلاسمید پایه AAV فاقد عناصر بیان ژن خارجی، واکنش inverse PCR بر روی پلاسمید-pAAV MCS انجام شد. نتایج الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR نشان داد که قطعه مورد نظر با اندازه پیش‌بینی شده با موفقیت تکثیر شده است (شکل ۱). حذف توالی‌های پروموتور CMV، ناحیه MCS و توالی خاتمه‌دهنده HGH-pA به طور کامل انجام شده و هیچ باند اضافی یا نشانه‌ای از تکثیر ناقص مشاهده نشد.

پلاسمید حاصل که با نام pAAV-trunc شناخته شد، به عنوان اسکلت پایه برای ورود توالی‌های U7 در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. حذف این کاست بیان از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا امکان کنترل دقیق‌تر بیان RNA های کوچک غیرکدکننده نظیر U7 را فراهم کرده و از تداخل پروموتورهای قوی ویروسی با عملکرد طبیعی سیستم اسپلایسینگ جلوگیری می‌کند (شکل ۱ الف).

تولید و شناسایی پلاسمید pAAV-U7 حاوی ژن طبیعی

U7 موشی: ژن U7 موشی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از DNA ژنومیک موش با موفقیت تکثیر شد. بررسی محصول PCR نشان‌دهنده وجود یک باند یکتا با اندازه مورد انتظار بود که بیانگر اختصاصیت بالای پرایمرها و صحت تکثیر ژن هدف است (شکل ۱ ب). در مرحله بعد، توالی U7 شامل پروموتور طبیعی، ناحیه کدکننده و توالی انتهایی ۳' به داخل پلاسمید-pAAV trunc به کمک روش ligase independent cloning (LIC) وارد

سزیم کلرید، ذرات ویروسی با خلوص مناسب برای آلوده‌سازی سلولی به‌دست آمدند.

آلوده‌سازی سلول‌های میوبلاست انسانی با ویروس AAVES51: سلول‌های میوبلاست انسانی نامیرا شده با ویروس AAVES51 آلوده شدند. بررسی مورفولوژی سلولی پس از ۴۸ ساعت نشان داد که سلول‌ها زنده‌مانی بالایی داشته و تغییرات مورفولوژیک قابل توجهی مشاهده نشد (شکل ۲). این یافته‌ها نشان می‌دهد که ویروس AAVES51 در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده، اثر سمی قابل توجهی بر سلول‌های میوبلاست انسانی ندارد و برای مطالعات عملکردی مناسب است.

القای حذف اگزون ۵۱ در سطح RNA: نتایج RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اطراف اگزون ۵۱ ژن دیستروفین نشان داد که در سلول‌های آلوده‌شده با ویروس AAVES51، باند غالب با طول ۲۱۰ جفت باز مشاهده شد که بیانگر حذف موفق اگزون ۵۱ است (شکل ۳). در مقابل، در نمونه‌های کنترل غیرآلوده، باند ۴۵۰ جفت بازی مربوط به حضور اگزون ۵۱ مشاهده شد. این تفاوت آشکار در الگوی باندها نشان‌دهنده کارایی بالایی سیستم U7-ESex51-tail در القای exon skipping هدفمند می‌باشد.

افزایش بیان پروتئین دیستروفین در سطح پروتئین: نتایج وسترن بلات نشان داد که در سلول‌های تیمار شده با ویروس AAVES51، شدت باند پروتئین دیستروفین نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش یافته است (شکل ۴). آنالیز دانسیتومتری باندها نیز افزایش قابل توجه میزان بیان پروتئین دیستروفین را نشان داد. این نتایج بیانگر آن است که حذف اگزون ۵۱ در سطح

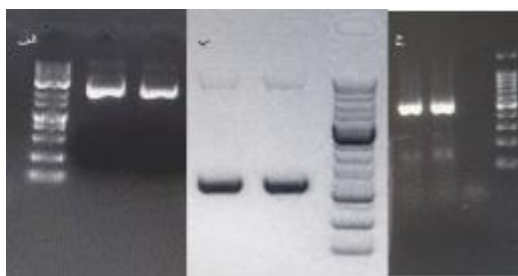
RNA منجر به بازسازی چهارچوب خوانش ژن دیستروفین و افزایش تولید پروتئین در سطح سلولی شده است.

بررسی حذف اگزون ۵۱ بدنبال آلوده سازی سلول میوبلاست طبیعی با ویروس AAV-ESex51 با استفاده از RT-PCR: آلوده‌سازی سلول‌های میوبلاست طبیعی با ویروس AAV-ESex51 منجر به حذف اگزون ۵۱ از mRNA بالغ دیستروفین شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از واکنش RT-PCR بخش قابل توجهی از mRNA استخراج شده از سلول آلوده در مقایسه با سلول کنترل دچار حذف اگزون ۵۱ شده است (شکل ۳).

***توجه به این نکته ضروری است که بخشی از باند محصول تکثیر توالی واجد اگزون ۵۱ در این واکنش می‌تواند به علت تکثیر توالی‌های hnRNA (نسخه‌های RNA نابالغ که هنوز تحت فرایند پردازش قرار نگرفته‌اند) باشد که نتیجتاً راندمان فرایند exon skipping ناشی از آلوده‌سازی سلول با ویروس AAV-ESex51 احتمالاً بیشتر از آنچه در عکس دیده شده است می‌باشد.

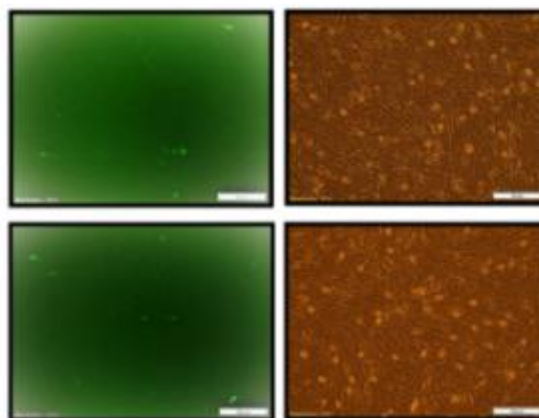
بررسی حذف اگزون ۵۱ به‌دنبال آلوده‌سازی سلول میوبلاست طبیعی با ویروس AAV-ESex51 با استفاده از وسترن بلات آلوده‌سازی سلول‌های میوبلاست طبیعی با ویروس AAV-ESex51 منجر به حذف اگزون ۵۱ از mRNA بالغ دیستروفین می‌شود. این واقعه باعث وقوع جهش تغییر چهارچوب (frameshift) می‌شود که نهایتاً منجر به تخریب RNA و عدم تولید پروتئین دیستروفین می‌شود (شکل ۳).

نتایج حاصل از بررسی وسترن بلات نیز به‌طور واضح نشان‌دهنده کاهش چشمگیر میزان پروتئین دیستروفین در سلول‌های آلوده به ویروس می‌باشد.



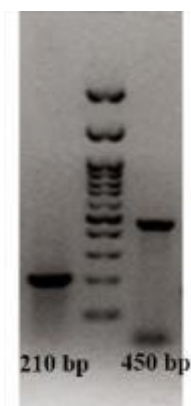
شکل ۱: نتایج مراحل مختلف تولید AAV تولید کننده توالی U7-ESex51-tail

الف) الکتروفورز ژل آگارز محصول inverse PCR برای حذف کاست بیان ژن نوترکیب از پلاسمید pAAV-MCS و تولید پلاسمید pAAV-trunc نتیجه این واکنش یک باند حدوداً ۵ کیلوبازی بود که همانطور که در تصویر دیده می‌شود تکثیر شده بود. ب) تکثیر ژن U7 موشی از DNA ژنومیک موش و بررسی محصول PCR بر روی ژل آگارز. ج) تأیید ورود توالی U7-ESex51-tail به پلاسمید pAAV-U7del با استفاده از PCR الکتروفورز.



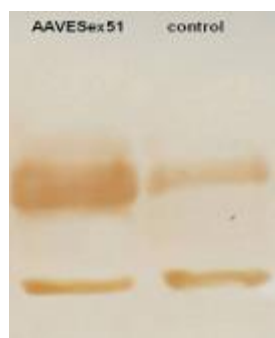
شکل ۲: بررسی مورفولوژی و آلوده‌سازی سلول‌های میوبلاست انسانی پس از تیمار با ویروس

AAVES51 تصاویر فلورسانس (ستون چپ) نشان‌دهنده حضور سلول‌های آلوده‌شده با ویروس می‌باشند، در حالی که تصاویر میدان روشن (ستون راست) مورفولوژی طبیعی و تراکم مناسب سلول‌ها را پس از تیمار نشان می‌دهند. عدم مشاهده تغییرات مورفولوژیک بارز بین نمونه‌های تیمار شده و کنترل بیانگر عدم سمیت قابل توجه ویروس AAVES51 در شرایط آزمایشگاهی است. (نوار مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر)



شکل ۳: نتایج RT-PCR: بررسی حذف اگزون ۵۱ ژن دیستروفین در سلول‌های میوبلاست انسانی پس از آلوده‌سازی با ویروس AAVES51

باند با اندازه تقریبی ۲۱۰ جفت باز نشان‌دهنده حذف اگزون ۵۱ در سلول‌های تیمار شده است، در حالی که باند حدوداً ۴۵۰ جفت باز در نمونه کنترل بیانگر حضور اگزون ۵۱ می‌باشد. مارکر وزن مولکولی DNA برای تخمین اندازه محصولات PCR استفاده شده است.



شکل ۴: نتایج وسترن بلات بررسی بیان پروتئین دیستروفین در سلول‌های میوبلاست DMD آلوده شده با ویروس AAVESex51 در مقابل سلول‌های کنترل.

پس از آلوده‌سازی با ویروس AAVESex51 افزایش شدت باند مربوط به پروتئین دیستروفین (باند بالایی) در نمونه تیمار شده با AAVESex51 نسبت به نمونه کنترل مشاهده می‌شود. باند پایینی مربوط به ژن خانه‌دار به‌عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌سازی میزان پروتئین به کار رفته است.

با رویکردهای مبتنی بر انتقال DNA نوترکیب، عدم دستکاری مستقیم ژنوم میزبان است. این ویژگی، خطرات بالقوه‌ای نظیر درج تصادفی توالی‌های خارجی در ژنوم، فعال‌سازی انکوژن‌ها یا اختلال در ژن‌های حیاتی را به‌طور قابل‌توجهی کاهش می‌دهد. به همین دلیل، exon skipping همان ابتدا به‌عنوان رویکردی ایمن‌تر نسبت به ژن‌درمانی کلاسیک مطرح شد. در یک دهه گذشته، مطالعات متعددی کارایی و ایمنی این تکنولوژی را در مدل‌های سلولی، حیوانی و حتی کارآزمایی‌های بالینی نشان داده‌اند. استفاده از الیگونوکلوئوتیدهای آنتی‌سنس (AONs) مانند eteplirsen که حذف اگزون ۵۱ را القا می‌کند، به تأیید سازمان FDA نیز رسیده و شواهد بالینی از افزایش نسبی دیستروفین و کند شدن سیر پیشرفت بیماری ارائه داده است (۱۲-۱۱). با این حال، محدودیت اصلی AON های سنتتیک، نیمه‌عمر کوتاه، نیاز به تزریق‌های مکرر و نفوذ ناکافی به بافت عضله اسکلتی بوده است. برای غلبه بر این محدودیت‌ها، استفاده از ناقل‌های ویروسی به‌ویژه ویروس‌های آدنو-مرتبط (AAV) به‌عنوان سیستم‌های تحویل پایدار مورد توجه قرار گرفت (۲۰). AAV ها به دلیل تمایل بافتی بالا به عضله، ایمنی نسبی و توانایی ایجاد بیان پایدار RNA، گزینه‌ای مناسب برای انتقال کاست‌های القاکننده exon skipping محسوب می‌شوند. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که بیان پایدار RNA های مبتنی بر U7 snRNA از طریق AAV می‌تواند منجر به القای طولانی‌مدت exon skipping در مدل‌های mdx شود. در مطالعه حاضر، ما موفق به طراحی و تولید

بحث

بیماری دیستروفی عضلانی دوشن (Duchenne Muscular Dystrophy; DMD) یکی از شایع‌ترین و شدیدترین بیماری‌های نوروموسکولار وابسته به جنس است که در اثر جهش‌های ایجادکننده فریم‌شیفت در ژن دیستروفین ایجاد می‌شود (۱). از اواسط دهه ۱۹۹۰ میلادی، معرفی مفهوم exon skipping به‌عنوان یک راهبرد درمانی مولکولی، افق تازه‌ای را در درمان این بیماری گشود. اساس این رویکرد بر حذف هدفمند یک یا چند اگزون از پیش mRNA استوار است تا چهارچوب خوانش ژن بازسازی شده و یک پروتئین دیستروفین کوتاه‌تر اما تا حدی عملکردی تولید شود؛ الگویی که از فرم خفیف‌تر بیماری یعنی دیستروفی عضلانی بیکر (Becker muscular dystrophy) الهام گرفته شده است. ایده استفاده از پدیده پرش اگزونی (Exon Skipping) به‌عنوان یک راهبرد درمانی برای دیستروفی عضلانی دوشن (DMD) از اواسط دهه ۱۹۹۰ میلادی مطرح شد و به‌سرعت به‌عنوان یکی از واقع‌گرایانه‌ترین رویکردهای درمانی برای این بیماری شناخته شد. منطق زیربنایی این استراتژی بر این اصل استوار است که حذف هدفمند یک یا چند اگزون می‌تواند چهارچوب خوانش ژن دیستروفین را بازسازی کرده و منجر به تولید یک پروتئین کوتاه‌شده اما عملکردی، مشابه آنچه در بیماران مبتلا به دیستروفی بکر مشاهده می‌شود، گردد (۹-۲). یکی از مهم‌ترین مزایای استراتژی exon skipping در مقایسه

جذاب است. با وجود مزایای قابل توجه exon skipping، این رویکرد محدودیت‌هایی نیز دارد. مهم‌ترین محدودیت آن، عدم اصلاح دائمی ژنوم است؛ به طوری که اثر درمانی وابسته به تداوم بیان RNA الفاکنده exon skipping باقی می‌ماند. در این زمینه، فناوری‌های ویرایش ژن نظیر CRISPR/Cas9 به عنوان جایگزین‌های بالقوه مطرح شده‌اند. CRISPR می‌تواند با حذف دائمی اگزون‌های معیوب یا اصلاح جهش‌ها، درمانی ریشه‌ای‌تر ارائه دهد. با این حال، سیستم CRISPR نیز با چالش‌های مهمی مواجه است؛ از جمله خطر برش‌های خارج از هدف (off-target effects)، پاسخ‌های ایمنی علیه Cas9، و پیچیدگی کنترل دقیق ویرایش در بافت‌های مختلف. در مقابل، exon skipping مبتنی بر RNA رویکردی ایمن‌تر و قابل کنترل‌تر محسوب می‌شود که به‌ویژه در شرایطی که ایمنی اولویت بالاتری دارد، همچنان گزینه‌ای جذاب است. از دیگر محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به استفاده از مدل سلولی به جای مدل حیوانی، عدم بررسی عملکرد عضلانی و عدم ارزیابی طولانی مدت پایداری بیان دیستروفین اشاره کرد. همچنین، بررسی دقیق میزان exon skipping در سطح کمی (quantitative) و مقایسه با سایر سیستم‌های تحویلی می‌تواند در مطالعات آینده مدنظر قرار گیرد (۱۶-۱۸).

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیب سیستم U7 اصلاح‌شده با ناقل‌های AAV و استفاده از فناوری LIC می‌تواند یک پلتفرم کارآمد، منعطف و بومی برای توسعه درمان‌های exon skipping در بیماری DMD فراهم کند. این رویکرد می‌تواند به عنوان پلی میان درمان‌های RNA محور و فناوری‌های ویرایش ژن، جایگاه ویژه‌ای در آینده درمان دیستروفی عضلانی دوشن داشته باشد.

سپاس‌گزاری

مطالعه ماحصل طرح تحقیقاتی با شماره ۱۵۷۵ مصوب دانشگاه شهید صدوقی یزد است.

یک وکتور AAV مبتنی بر U7 اصلاح‌شده شدیم که حذف هدفمند اگزون ۵۱ ژن دیستروفین را القا می‌کند. نتایج RT-PCR نشان داد که بخش قابل توجهی از ترانسکرپت‌های تولیدشده در سلول‌های میوبلاست آلوده‌شده، فاقد اگزون ۵۱ هستند. این یافته با نتایج مطالعات پیشین که از سیستم U7 برای القای exon skipping استفاده کرده‌اند، همخوانی دارد و نشان‌دهنده کارایی مناسب این سیستم در سطح RNA است. از منظر پروتئینی، نتایج وسترن بلات افزایش بیان دیستروفین در سلول‌های تیمار شده را نشان داد. این موضوع از نظر بیولوژیکی حائز اهمیت است، زیرا نشان می‌دهد که حذف اگزون ۵۱ منجر به بازسازی چهارچوب خوانش و ترجمه موفق mRNA اصلاح‌شده شده است. هرچند میزان دیستروفین تولیدشده به سطح فیزیولوژیک کامل نرسیده، اما شواهد متعددی نشان داده‌اند که حتی مقادیر اندک (۵-۱۵٪) دیستروفین می‌تواند اثرات درمانی قابل توجهی در بیماران DMD داشته باشد. یکی از دستاوردهای مهم این مطالعه، بومی‌سازی فناوری تولید ناقل‌های AAV الفاکنده exon skipping در قالب یک پلتفرم انعطاف‌پذیر است. استفاده از تکنولوژی ligase independent cloning (LIC) برای اولین بار در تولید وکتور AAV-U7 در این مطالعه، امکان طراحی سریع، دقیق و کم‌هزینه وکتورهای متنوع را فراهم کرده است. این موضوع از منظر پزشکی شخصی (personalized medicine) اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا ژن دیستروفین دارای طیف وسیعی از جهش‌های حذفی و مضاعف‌شدگی است و درمان همه بیماران با یک استراتژی واحد امکان‌پذیر نیست. پلاسمید پایه-pAAV-delU7 که در این مطالعه طراحی شد، این قابلیت را دارد که به عنوان یک اسکلت عمومی برای درج سریع توالی‌های exon skipping هدف‌گیرنده اگزون‌های مختلف ژن دیستروفین مورد استفاده قرار گیرد. این ویژگی، زمان تولید وکتورهای جدید را به کمتر از یک ماه کاهش داده و هزینه و پیچیدگی فرایند را به طور چشمگیری کم می‌کند. علاوه بر این، امکان طراحی وکتورهایی با چندین کاست U7 مستقل وجود دارد که می‌تواند حذف همزمان چند اگزون را هدف قرار دهد؛ راهبردی که برای بیماران دارای جهش‌های متنوع در نواحی hotspot ژن دیستروفین بسیار

مشارکت نویسندگان

دکتر مجید مجرد و دکتر جواد زواررضادر ارائه ایده، و طراحی مطالعه و تجزیه و تحلیل داده‌ها، خانم عطیه اصلاحی و حسین تنی‌پور در انجام کار آزمایشگاهی، جمع‌آوری داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

حامی مالی: دانشگاه شهید صدوقی یزد

تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد و مشهد تایید شده است.

References:

- 1-Kesari A, Pirra LN, Bremadesam L, McIntyre O, Gordon E, Dubrovsky AL, et al. *Integrated DNA, cDNA, and protein studies in Becker muscular dystrophy show high exception to the reading frame rule*. Hum mutat 2008; 29(5): 728-37.
- 2-Elangkovan N, Dickson G. *Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy*. J Neuromuscul Dis 2021; 8(s2): S303-S316.
- 3- Tominari T, Aoki Y. *Clinical Development of Novel Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy—Current and Future*. Neurology and Clinical Neuroscience 2022;11(3): 111-18.
- 4-Gaedigk R, Law DJ, Fitzgerald-Gustafson KM, McNulty SG, Nsumu NN, Modrcin AC, et al. *Improvement in Survival and Muscle Function in an Mdx/Utrn(-/-) Double Mutant Mouse Using A Human Retinal Dystrophin Transgene*. Neuromuscul Disord 2006;16(3):192-203.
- 5-Kawai M. *Establishment of an Evaluation Method for Muscular Dystrophy and a Patient Registration System for Clinical Trials*. Rinsho shinkeigaku 2009; 49(11): 863-6.
- 6-Tedesco FS. *Human Artificial Chromosomes for Duchenne Muscular Dystrophy and Beyond: Challenges and Hopes*. Chromosome Res 2015; 23(1): 135-41.
- 7-Świątkowska-Flis B, Zdolińska-Malinowska I, Sługocka D, Boruckowski D. *The Use of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Patients with Muscular Dystrophies: Results from Compassionate Use in Real-Life Settings*. Stem Cells Transl Med 2021; 10(10): 1372-83.
- 8-Koutsoulidou A, Koutalianos D, Georgiou K, Kakouri A, Oulas A, Tomazou M, et al. *Serum Mirnas as Biomarkers for the Rare Types of Muscular Dystrophy*. Neuromuscular Disorders 2022; 32(4): 332-46.
- 9-Przymuszała PM, Martyniak A, Kwiatkowska J, Meyer Szary M, Śledzińska K, Wierzba J, et al. *Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cell Line Derived from Becker Muscular Dystrophy Patient with CRISPR/Cas9-Mediated Correction of DMD Gene Mutation*. Stem Cell Res 2024; 76: 103327.
- 10- Matsuo M, Takeshima Y. *Rescue of Dystrophin Mrna of Duchenne Muscular Dystrophy by Inducing Exon Skipping*. Acta Myol 2005; 24(2): 110-4.

- 11- Brolin C, Shiraishi T. *Antisense Mediated Exon Skipping Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)*. Artif DNA PNA XNA 2011; 2(1): 6-15.
- 12- Cirak S, Arechavala-Gomeza V, Guglieri M, Feng L, Torelli S, Anthony K, et al. *Exon Skipping and Dystrophin Restoration in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy after Systemic Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer Treatment: An Open-Label, Phase 2, Dose-Escalation Study*. Lancet 2011; 378(9791): 595-605.
- 13- Nakano S, Ozasa S, Yoshioka K, Fujii I, Mitsui K, Nomura K, et al. *Exon-Skipping Events in Candidates for Clinical Trials of Morpholino*. Pediatr Int 2011; 53(4): 524-9.
- 14- Hoogaars WM, Mouisel E, Pasternack A, Hulmi JJ, Relizani K, Schuelke M, et al. *Combined Effect of AAV-U7-Induced Dystrophin Exon Skipping and Soluble Activin Type IIB Receptor in Mdx Mice*. Human Gene Ther 2012; 23(12): 1269-79.
- 15- Le Hir M, Goyenvallé A, Peccate C, Precigout G, Davies KE, Voit T, et al. *AAV Genome Loss From Dystrophic Mouse Muscles During AAV-U7 snRNA-mediated Exon-skipping Therapy*. Mol Ther 2013; 21(8): 1551-558.
- 16- Hart CC, Lee YI, Xie J, Gao G, Lin BL, Hammers DW, et al. *Potential Limitations of Microdystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy*. JCI Insight 2024; 9(11): e165869.
- 17- Mendell J, Muntoni F, McDonald C, Mercuri E, Ciafaloni E, et al. *AAV Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy: The EMBARK Phase 3 Randomized Trial*. Nat Med 2025; 31(1): 332-41.
- 18- Chwalenia K, Feng V, Hemmer N, Friedrichsen H, Vorobieva L, et al. *AAV Microdystrophin Gene Replacement Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy: Progress and Prospects*. Gene Ther 2025; 32(5): 447-61.
- 19- Chicoine LG, Rodino-Klapac LR, Shao G, Xu R, Bremer WG, Camboni M, et al. *Vascular Delivery of Raavrh74.MCK.GALGT2 to the Gastrocnemius Muscle of the Rhesus Macaque Stimulates the Expression of Dystrophin and Laminin A2 Surrogates*. Mol Ther 2014; 22(4): 713-24.
- 20- Salva MZ, Himeda CL, Tai PW, Nishiuchi E, Gregorevic P, et al. *Design of Tissue-Specific Regulatory Cassettes for High-Level Raav-Mediated Expression in Skeletal and Cardiac Muscle*. Mol Ther 2007; 15(2): 320-9.
- 21- Niks EH, Aartsma-Rus A. *Exon Skipping: A First in Class Strategy for Duchenne Muscular Dystrophy*. Expert Opin Biol Ther 2017; 17(2): 225-36.
- 22- van Vliet L, de Winter CL, van Deutekom JC, van Ommen GJ, Aartsma-Rus A. *Assessment of the Feasibility of Exon 45-55 Multiexon Skipping for Duchenne Muscular Dystrophy*. BMC Med Gen 2008; 9: 105.
- 23- Aslanidis C, de Jong PJ. *Ligation-Independent Cloning of PCR Products (LIC-PCR)*. Nucleic Acids Res 1990; 18(20): 6069-74.
- 24- Wendrich JR, Liao CY, van den Berg WA, De Rybel B, Weijers D. *Ligation-Independent Cloning For Plant Research*. Methods Mol Biol 2015; 1284: 421-31.

- 25- Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Hornung V. *Ligation-Independent Cloning (LIC) Assembly of TALEN Genes*. Methods Mol Biol 2015; 1239: 161-9.
- 26- Noori-Dalooi MR, Mojarad M, Rashidi-Nezhad A, Kheirollahi M, Shahbazi A, Khaksari M, et al. *Use of Sirna in Knocking Down of Dopamine Receptors, A Possible Therapeutic Option in Neuropsychiatric Disorders*. Mol Biol Rep 2012; 39(2): 2003-10.
- 27- Nesmith AP, Wagner MA, Pasqualini FS, O'Connor BB, Pincus MJ, August PR, et al. *A Human in Vitro Model of Duchenne Muscular Dystrophy Muscle Formation and Contractility*. J Cell Biol 2016; 215(1): 47-56.

Rescue of Dystrophin Protein Expression by Interfering of mRNA Processing

Majid Mojarrad¹, Atieh Eslahi¹, Hossein Tanipur¹, Javad Zavar Reza^{*2}

Original Article

Introduction: Exon skipping has emerged as one of the most promising therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy (DMD), because it restores the correct reading frame of dystrophin mRNA without directly modifying the genome. Delivery systems based on adeno-associated virus (AAV) enable long-term expression of exon-skipping components and improve therapeutic efficiency.

Methods: In this study, an AAV-based vector encoding a modified U7 snRNA designed to induce skipping of dystrophin exon 51 was constructed using a ligase-independent cloning (LIC) strategy. Recombinant AAV particles were produced and used to transduce immortalized human myoblasts. Exon 51 skipping efficiency was evaluated by RT-PCR, and dystrophin protein expression was assessed by western blotting.

Results: RT-PCR findings demonstrated effective exon 51 skipping in the treated cells, producing a shortened dystrophin mRNA transcript. Western blot analysis revealed increased expression of a truncated but functional dystrophin protein in AAV-treated myoblasts compared to controls.

Conclusion: These results indicate that the engineered AAV-U7 system effectively induces exon 51 skipping and restores dystrophin expression at the protein level. The LIC-based platform enables rapid generation of personalized exon-skipping vectors and represents a versatile and scalable approach for the development of RNA-based gene therapies for DMD.

Keywords: Dystrophin, gene skipping, mRNA processing.

Citation: Mojarrad M Eslahi A, Tanipur H, Zavar Reza J. **Rescue of Dystrophin Protein Expression by Interfering of mRNA Processing.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2026; 34(3): 10011-23.

¹Department of Medical Genetics, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

²Department of clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09125028742, email: jzavar@gmail.com