مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۵ شماره ۶ ، پاییز ۱۳۹۰، صفحات۲۸-۱۸

طراحی و ساخت BCG نوترکیب ترشح کننده پلی‌توپ‌های ویروس هپاتیت c به‌عنوان کاندیدای واکسن

سید عطاالله سادات شاندیز[۱] ،مریم یزدانیان[۲]، محمد رضا آقاصادقی[۲]، حسین خان احمد[۴]، آرش معمارنژادیان[۲]، فاطمه متولی[۳]، طیبه سهرابی[۴]، فرزین روحوند[2*]

۱)گروه زیست شناسی، موسسه آموزش عالی خاتم تهران
۲) گروه هپاتیت وایدز، انستیتو پاستور ایران
3) بانک ژن نوترکیب ایران،انستیتو پاستور ایران
٤) بخش تحقیقات BCG، مجتمع تولیدی-تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران
آدرس نویسنده رابط: گروه هپاتیت وایدز،بانک ژن نوترکیب ایران، انستیتو پاستور ایران
تلفن:۶۶۹۶۹۲۹۱- ۰۲۱ rfarzin@pasteur.ac.ir

چکیده:

زمینه واهداف: بیماری کبدی مرتبط با عفونت مزمن ویروس هپاتیت c (HCV)، از مشکلات عمده بهداشت جهانی است. ولی هنوز واکسن تایید شده علیه HCV وجود ندارد. مشخص شده است که پاسخ‌های ایمنی سلولی، به خصوص پاسخ‌های CTL نقش ویژه‌ای در درمان عفونت با این ویروس دارند. نظر به اینکه واکسن BCG توانایی تحریک پاسخ ایمنی سلولی را بخوبی دارد، لذا در تحقیق حاضر تلاش بر این بود که با ساخت کاندیدای واکسن BCG نوترکیب (recombinant BCG=rBCG) ترشح کننده اپی توپ‌های ایمنودامیننت HCV پاسخ ایمنی مناسب علیه آنها ایجاد شود.

روش بررسی: قطعات ژنی HBsAg و پنج اپی توپ غالب شامل $NS3_{1406-1415}$ $core_{132-142}$, $E2_{405-414}$, $E2_{614-622}$, و $core_{39-48}$ به قطعه ژنی حاوی پروموتر Hsp60 و α antigen signal sequence از طریق SOEing PCR متصل، وتکثیر شدند. سپس قطعات ساخته شده شامل ترادف HSP-αS-HPOL در شاتل وکتور pVN2 کلون شد. پلاسمید نهایی(pHSP-αS-HPOL) با روش الکتروپوریشن وارد BCG گردید. BCG نوترکیب در محیط کشت لونشتاین جانسون حاوی کانامایسین انکوبه شد.

یافته ها: سازه نهایی از طریق هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید شد. پس از گذشت ٤ هفته، کلنی های نخودی رنگ ومقاوم به کانامایسین BCG نوترکیب در سطح محیط کشت لونشتاین جانسون نمایان شدند. تایید پلاسمید در BCGنوترکیب حاصل حاکی از موفقیت آمیز بودن الکتروپوریشن بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که امکان ساخت rBCG مورد نظر پس از ساخت پلاسمید نهایی pHSP-αS-HPOL و ترانسفکت آن به BCG وجود دارد. کلنی‌های rBCG از نظر امکان ترشح پروتئین نوترکیب مورد نظر قابل بررسی می‌باشند.

کلیدواژه‌ها: هپاتیتc، الکتروپوریشن ، BCG نوترکیب

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه:

عفونت ویروس هپاتیت c (HCV) یکی از مشکلات عمده بهداشتی جهان به‌شمار می آید. این ویروس در سال ۱۹۸۹ شناخته شد. در حال حاضر قریب به ۲۰۰-۱۷۰ میلیون نفر در دنیا به آن آلوده‌اند (حدود ۳ درصد جمعیت جهان)(۱). برای HCV تاکنون هیچ واکسن تایید شده‌ای تهیه نشده است. در حال حاضر از ترکیب دارویی آلفا اینترفرون پگیله (PEG-IFNα) و ریباویرین برای درمان عفونت مزمن HCV استفاده می شود. این درمان تنها در نیمی از موارد موفقیت آمیز است. در موارد موفق نیز به‌دلیل مشکلاتی از قبیل گران بودن دارو، نیاز به‌درمان طولانی مدت و اثرات جانبی، دوره درمان عملاً کامل نمی شود(۲). عفونت با ویروس هپاتیت c یکی از دلایل اصلی ابتلا به هپاتیت مزمن، سیروز کبدی و نیز کارسینوم هپاتوسلولاراست(۳).

بیشتر مبتلایان به عفونت حاد فاقد علائم بالینی‌اند. علاوه بر این، سیستم ایمنی بزرگسالان در ۸۰-۵۰درصد موارد قادر به حذف ویروس نیست و بیماری به شکل مزمن تبدیل می شود(٤). مطالعات مختلف نشان می‌دهد لنفوسیت‌های Tسایتوتوکسیک(Cytotoxic T-CTL Lymphocytes;)نقش مهمی را در دفاع علیه حذف ویروس، از طریق کشتن مستقیم سلول‌های آلوده و پاکسازی عفونت در بدو شروع، ایفا می کنند(۵). یکی از مهمترین دلایل پایداری ویروس مربوط به تنوع ژنتیکی آن است. دلیل آن فقدان عملکرد تصحیح کنندگی آنزیم پلی مراز ویروسی است که منجر به پیدایش تنوع فراوان در توالی ژنوم ویروس در طول دوره اولیه عفونت می شود. توانایی بالای HCV در موتاسیون و تغییر سریع در اپی‌توپ‌های آنتی ژنیک آن، می تواند دلیلی بر عدم پیشرفت پاسخ‌های ایمنی کارا علیه ویروس و فرار آن از سیستم ایمنی گردد(٦). با این وجود در حال حاضر واکسن‌های متفاوتی از جمله؛ واکسن‌های وکتوری ، واکسن‌های پروتئینی نوترکیب، پروتئین‌های ساب یونیت، ذرات شبه ویروس، واکسن‌های DNA بیان کننده پروتئین های ساختاری و غیر ساختاری علیه ویروس، در مراحل آزمایش‌های بالینی برروی انسان و شامپانزه قرار دارند (۹-۷). در این میان واکسن های چند اپی توپی(Multi-epitope or polytope or epitope based) با متمرکز نمودن پاسخ ایمنی بر اپی‌توپ‌های محافظت شده و یا مهم ویروس (۱۰و۱۱) پتانسیل خوبی جهت تحریک سیستم ایمنی علیه چندین اپی توپ منحصر به سلول‌های +CD8 و یا +CD4 به-طور همزمان و کاملاً اختصاصی را دارا هستند(۱۲و۱۳). همچنین امروزه به منظور تحریک کارایی سیستم ایمنی و ماندگاری پاسخ، استفاده از ارگانیسم‌های زنده به عنوان وکتورهای واکسن رایج شده است. در این میان باسیل کالمت-گرین (Bacillus BCG Calmette-Guerin,) که از واکسن‌های پر مصرف و رایج موجود برای پیشگیری از بیماری سل در سراسر دنیا به شمار می رود از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (١٤). طی دو دهه گذشته توسعه سیستم های ژنتیکی مایکوباکتریوم‌ها شامل وکتورهای شاتل مختلف، سیستم‌های بیان و ترشح آنتی ژن های بیگانه و راهکارهای (استراتژی‌های) ترانسفورماسیون BCGسرآغازی برای استفاده از BCG به عنوان واکسن نوترکیب در بیان آنتی‌ژن‌های خارجی است(۱۵ و١٦). اخیراً از BCG جهت بیان پروتئین‌های باکتریائی، انگلی و ویروسی استفاده شده است (۱۷). در بین آنتی‌ژن‌های مختلف HCV که تاکنون به‌عنوان واکسن استفاده شده‌اند؛ پروتئین core به علت حفاظت شدگی آن در بین ژنوتیپ‌های مختلف ویروس و دخالت دربیماری زایی (۱۸)، پروتئین E2، به علت شرکت در اتصال به گیرنده موجود بر سطح سلول‌های کبدی (۱۹) و پروتئین NS3 به دلیل ارتباط پاسخ ایمنی ایجاد شده با پاکسازی ویروس در طول عفونت حاد (۲۰) مورد توجه بوده‌اند. همچنین بر روی بیان آنتی ژن‌های core ، E2، NS3 ، NS4 و NS5A ویروس به صورت اپی توپ و یا آنتی‌ژن کامل، به-

Archive of SID

www.SID.ir

منظور تحریک کارایی سیستم ایمنی، بررسی‌هایی در BCG انجام شده‌است(22،21). در مطالعه حاضر سعی شد BCG نوترکیبی با توانائی ترشح پروتئین چنداپی توپی، متشکل از اپی توپ‌های انتخابی از آنتی-ژن‌های مذکور ساخته شود. برای این منظور شاتل وکتور مایکوباکتریال بینی–ترشحی که پروتئین چند اپی توپی متصل به آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت بی (HBsAg) را تحت تاثیر پروموتر heat shock protein(hsp)60، به محیط ترشح می کند، ساخته شد و با روش الکتروپوریشن به BCG ارائه گردید تا بتواند توانایی تحریک پاسخ‌های ایمنی علیه اپی توپ-های HCV را داشته باشد.

مواد و روش‌ها:

انتخاب اپی‌توپ‌ها: با توجه به گزارش‌های قبلی در بانک اطلاعاتی HCV (http:// HCV immunology database) و نیز بررسی‌های مبتنی بر برنامه‌های ایمینوانفورماتیک، توالی پلی‌توپ مرکب از پنج اپی توپ ایمنودامیننت برگرفته از آنتی‌ژن‌های core ،E2 و NS3 ویروس هپاتیت c طراحی شدند(۲۳و۲٤). با توجه به اهمیت پاسخ‌های CTL (T cytotoxic) در پاکسازی HCV، اپی‌توپ‌های مذکور همگی جزء اپی‌توپ‌های وابسته به CTL هستند. همچنین برای جلوگیری از پدیده غلبه ایمنولوژیکی حتی المقدور سعی شده که این اپی توپ ها دارای تمایل یکسان برای MHC موشی(H2d) و انسانی (HLA-A2) باشند. همچنین با استفاده از الگوریتم پیش بینی اتصال پپتید به HLA و نیز پردازش پروتئازوم (http://paproc.de) سعی شد که در حد فاصل بین اپی‌توپ‌های مجاور تا آنجا که ممکن است اپی-توپ اضافی (Junctional)ایجاد نشود. به این ترتیب سه اپی توپ انسانی انتخاب شده از نواحی E2، NS3 وcore در کنار دو اپی‌توپ موشی core وE2 قرار گرفتند. اپی-توپ‌های انسانی عبارت بودند از: C132 (متعلق به ناحیه ۱٤۰-۱۳۲ پروتئین core)(۲٦،25)، E614 (متعلق به ناحیه ٦۲۲-٦۱٤ پروتئین E2) (۱۸و۲۰).و N1406 (متعلق به ناحیه ۱٤۱۵-۱٤۰٦ پروتئین NS3)(۲۷و۲۸).اپی‌توپ غالب موشی E405 (متعلق به ناحیه ٤۱٤-٤۰۵ پروتئین E2 و محدود به سیستم MHC موشی H-2d)و C39 (متعلق به ناحیه ٤۸-۳۹ پروتئین core) نیز به‌منظور فراهم نمودن امکان بررسی ایمنی ایجاد شده در موش BALB/c مورد استفاده قرار گرفتند (۲۹). بنابراین توالی پلی توپ متشکل از چهار اپی توپCore132-E614-NS1406-E405 (CE6NE4) که براساس آنالیزهای ایمونوانفورماتیک و پتانسیل استفاده در واکسن قبلا ساخته شده بودند (۲٤) انتخاب و اپی توپ ایمنودامیننت Core ۳۹-٤۸ که وابسته به CTL و قابل عرضه توسط MHC کلاس یک موشی می باشد(۲۳) برای ایجاد امکان بررسی بهتر ایمنی زائی در موش BALB/c به انتهای کربوکسیل این پلی-توپ افزوده شد. سپس با در نظر گرفتن فراوانی کدون های انسانی توالی اسید آمینه‌ای پلی‌توپ به توالی نوکلئوتیدی متناظر ترجمه معکوس شد.

سویه‌های باکتری، وکتورها و پرایمرها: سویه‌های باکتری استفاده شده در این مطالعه*E. coli* TOP10F' و *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173-P2 (دریافت شده از بخش BCG وبانک ژن نوترکیب انستیتو پاستور ایران)بودند. وکتورهای مورد استفاده pcHPOL1 (دارای ژن HBsAg)(٤۱)، pUC18 ، pTZ57R/T (Fermentas) و pVN2 (تهیه شده از انستیتو پاستور پاریس) بودند. جدول۱ پرایمر های مورد استفاده را نشان می دهد که با استفاده از نرم افزار Gene Runner و توالی ژن های مورد نظر در NCBI طراحی شد و برای تکثیر توالی پروموتر *hsp60*، سیگنال ترشحی آلفا آنتی‌ژن(αS) و توالی پلی‌توپ از سازه سنتزی (ساخته شده توسط شرکت Gene Cust فرانسه) مورد استفاده قرار گرفتند.

کلونینگ و ساخت پلاسمید: توالی نوکلئوتیدی پلی‌توپ حاوی ۵ اپی توپ به طول ۱۵۰ جفت باز و توالی hsp60-αS به‌طول حدود۵۰۰ جفت باز که شامل ناحیه پروموتر hsp60 وسیگنال ترشحی آلفا آنتی‌ژن مایکوباکتریوم بودند به‌صورت سنتتیک ساخته شد. اتصال ژن سازنده HBsAg به انتهای'۵ توالی پلی‌توپ با روش SOEing PCR و به‌دنبال تکثیر هر دو قطعه پلی‌توپ و HBsAg به‌منظور ایجاد ناحیه مشترک (Overlap) بین آنها صورت گرفت. برای این منظور جفت پرایمر PF HBsAgو PR HBsAg (جدول۱) جهت تکثیر

Archive of SID

www.SID.ir

HBsAg-S از روی پلاسمید الگوی pcHPOL1 (۲۳) و جفت پرایمر PF Poly ,PR Poly (جدول۱) جهت تکثیر قطعه پلی توپ ساخته شده استفاده شدند. محصول این دو واکنش با آنزیم *pfu* DNA *polymerase* (Fermentase) ، dNTP و اعمال یک سیکل حرارتی ۹٤ ، ۵۸ و۷۲ درجه سانتی گراد به تعداد ۳۰ سیکل به یکدیگر متصل شد و قطعه HBsAg-Polytopeدر سایت برش *HindIII* و*NdeI* در پلاسمید pUC18 کلون شد. قطعه ژنی پروموتر hsp60-αS نیز با استفاده از جفت پرایمرهای PF hsp60-ss و PR hsp60-ss (جدول۱) از روی الگوی سنتتیک تکثیر شد و به ترتیب در وکتور pTZ57R/T کلون و سپس در جایگاه‌های آنزیمی *Hind*III و *Sal*I وکتور pUC18 ساب کلون شدند.

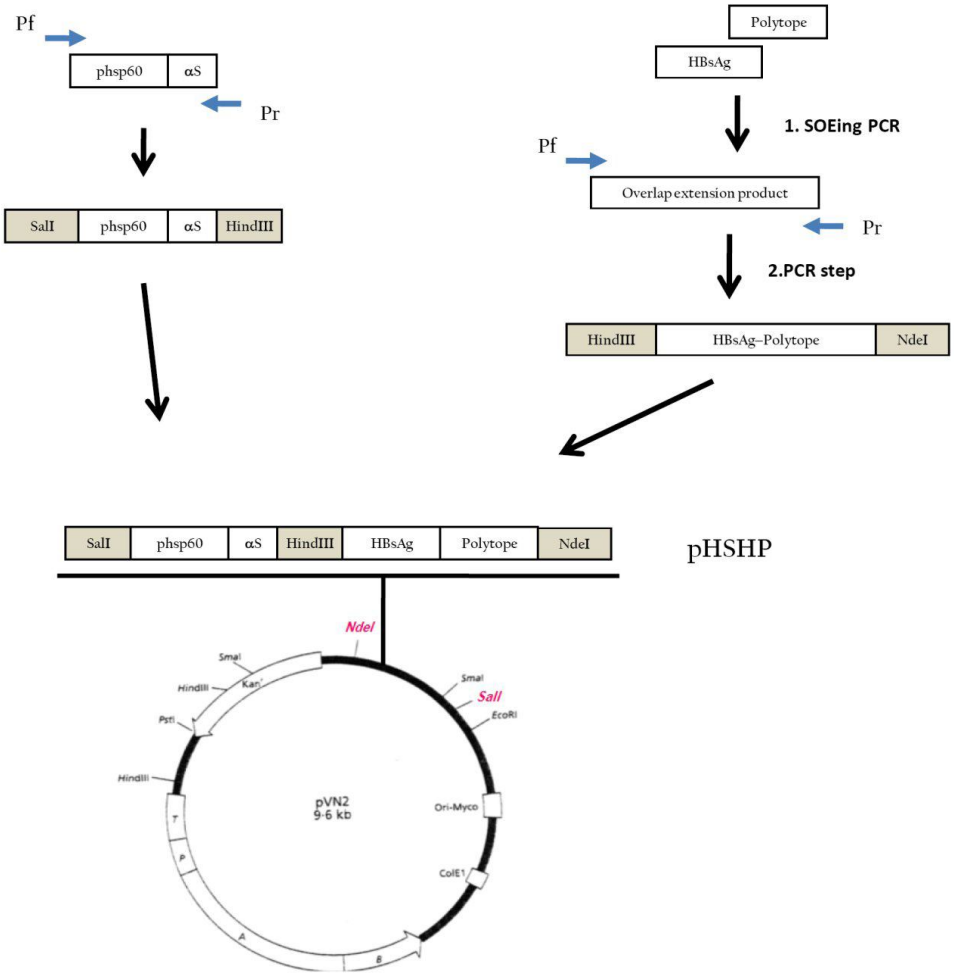
جدول۱: فهرست توالی پرایمر های استفاده شده

آغازگر	توالی در جهت '۵ به '۳	کاربرد
PF HBsAg	TTA**AAGCTT**GAGAACATCACATCAGGATTCC *Hind*III	تکثیر قطعه ژنی HBsAg از روی پلاسمید pcHPOL1
PR HBsAg	ATCAGGTCAATGTATACCCAAAGACAGAAG	
PF hsp60-ss	AAT**GTCGAC**AATGGTGACCACAACGACG *Sal*I	تکثیر قطعه Phsp60-ss از روی سازه سنتزی
PR hsp60-ss	AAT**AAGCTT**CGCGCCCGCGGTTGCC *Hind*III	
PF Polytop	TCTTCTGTCTTTGGGTATACATTGACCTG	تکثیر قطعه ژنی پنج اپی توپی از روی سازه سنتزی
PR Polytop	ATTA**CATATG**TTTAGGCCCGCACGC *Nde*I	

جداسازی سازه ژنی HSP-αS- HBsAg-PoLytope از وکتور pUC18 و کلونینگ آن در جایگاه‌های آنزیمی *Nde*I و *Sal*I شاتل وکتور pVN2 منجر به ساخت پلاسمید pHSHP شد(شکل۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱ : نمایش شماتیک از مراحل ساخت شاتل پلاسمید pHSHP کدکننده پلی‌توپ‌های CTL متصل به ژن HBsAg. مراحل تکثیر و اتصال قطعات ژنی مربوط به polytope وHBsAg با روش SOEing PCR . تکثیر دو قطعه فوق به‌منظور ایجاد ناحیه مشترک بین آنها با توجه به توالی پرایمرهای مربوطه صورت گرفت. سپس با اعمال سیکل حرارتی نواحی همپوشان همانند سازی شدند. مرحله PCR قطعه حاصل تکثیر شد و توالی برش آنزیم در دو سر آن اضافه شد. قطعات ژنی phsp60-αS نیز به وسیله پرایمرهای مربوطه تکثیر شد و توالی‌های لازم برای برش آنزیمی بروی آن ایجاد شد. در نهایت توالی پلی‌توپ به‌صورت متصل به ژن HBsAg و آلفا آنتی‌ژن تحت کنترل پروموتر hsp60 در جایگاه‌های آنزیمی *SalI* و *NdeI* شاتل وکتور اشریشیاکلی- مایکوباکتریوم pVN2 کلون شد. این وکتور دارای ژن مقاومت به کانامایسین، مبداء همانندسازی اشریشیاکلی Ori ColE1 و مبدا همانندسازی مایکوباکتریوم Ori M(PAL5000) جهت تکثیر و همانندسازی در هردو سیستم اشریشیا کلی و مایکوباکتریوم را دارد.

www.SID.ir

کشتBCG: به ۵ میلی لیتر از محیط broth - Middlebrook 7H9 واجد ٪۱۰ OADC و٪ ۰/۰۵ Tween80 به اندازه یک حلقه فیلدوپلاتین از سویه BCG (pasteur1173P2) اضافه شد، پس از ورتکس به مدت ۷ روز در انکوباتور شیکر دار rpm ۱۰۰ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. سپس ۱۰ میلی لیتر از محیط 7H9 واجد OADC و Tween80 به محیط قبلی اضافه شد و به مدت یک هفته در انکوباتور شیکر دار در دمای۳۷ درجه سانتی گراد با دور rpm ۱۰۰ قرار داده شد. پس از ۲ هفته از Scale up نهایی، حجم محیط کشت به ۳۰۰ میلی لیتر رسانده شد و طی ١٤ تا ۲۸ روز در انکوباتور شیکر دار با دور rpm ۱۰۰ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا زمانی که در طول موج٦۰۰ نانومتر OD حدود ۰/۵ تا ۱ داشته باشد(۹).

ساخت سلول‌های مستعد و الکتروپوریشن BCG: ٢٤ ساعت قبل از برداشت(Harvest)سلول‌های BCG، ۰/۱ حجم محیط کشت، گلیسین ۲ مولار اتوکلاو شده به آن اضافه شد. سپس ۱۰دقیقه با دور rpm ٤۰۰۰ سانتریفوژ شد. در این مرحله سلول‌ها با مقادیر ۵۰، ۲۵ و ۱۵ میلی لیتر محلول گلیسرول ٪۱۰ شستشو داده شدند. در نهایت سلول‌ها در یک میلی لیتر از این محلول حل شدند. مقدار **۱ میکروگرم** از پلاسمید عاری از نمک pHSHP (**۵ میکرولیتر**) به ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون BCG اضافه شد و به کووت با قطر ۰/۲ سانتی متر انتقال داده شد. یک پالس الکتریکی با ولتاژ ۲۵۰۰ ، شدت جریان ۲۵ میکروفاراد و مقاومت ۱۰۰۰ اهم توسط دستگاه الکتروپوریشن Gene Pulser XcellTM (Bio Rad) به سوسپانسیون اعمال شد. سپس سوسپانسیون به یک لوله استریل حاوی ۵ میلی لیتر محیط مایع 7H9 غنی شده با OADC و Tween80 منتقل شد و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از آن، سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ٤۰۰۰ سانتریفوژ شدند و بعد از انتقال به محیط لونشتاین جانسن حاوی ۲۰ **میکروگرم** در میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین به مدت ٤ هفته در انکوباتور۳۷°C سانتی گراد قرار داده شدند(۱۵).

الکترواکشن بین rBCG و *E.coli*:

روش‌های متعددی برای آماده سازی DNA پلاسمیدی از سویه‌های مایکوباکتریوم وجود دارد. به دلیل تعداد نسخه کم وکتورهای مایکوباکتریوم ممکن است بازده آن برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی کم باشد. بنابراین، اغلب پیشنهاد می شود که پلاسمیدها از مایکوباکتریوم‌ها به *E. coli* ترانسفورم و سپس تخلیص شوند. یک روش ساده، الکترواکشن از مایکوباکتریوم به *E.coli* است(٤۲). برای این منظور به اندازه یک حلقه فیلدوپلاتین کلنی rBCG از محیط لونشتاین جانسن که پیش از این کشت داده شده برداشت شد و با ۲۰ میکرولیتر گلیسرول ٪۱۰ سرد مخلوط شد. پس از ورتکس و ۱۰ دقیقه انکوباسیون برروی یخ، ۰/٤ میلی لیتر از باکتری *E. coli* مستعد شده به آن اضافه شد و پس از مخلوط نمودن کامل مجددا به‌مدت ۱۰ دقیقه بروی یخ قرار داده شد. سوسپانسیون حاصل به کوت۰/۲ سانتی متر منتقل شد و یک پالس الکتریکی با ولتاژ ۲/۵ کیلو ولت ، ٤۵ میکروفاراد و مقاومت ۲۰۰ اهم بر آن اعمال شد. سلول‌ها با رعایت شرایط استریل به ml ۵ از محیط مایع LB (Luria-bertani medium) منتقل شد و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. به‌دنبال سانتریفوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه با دورrpm۳۰۰۰ رسوب حاصل بروی محیط کشت LB آگارحاوی آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت ۲۰ µg/ml پخش شد و به مدت ١٦ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. کلنی‌های حاصل از نظر دارا بودن پلاسمید بررسی شدند(43).

یافته‌ها:

طراحی، ساخت و تائید شاتل وکتور نوترکیب pHSHP:پلاسمید بیانی Expression pHSHP vector با قابلیت بیان و ترشح توالی پلی‌توپ CE6NE4C متصل به HBsAg در سلول‌های BCG ، به‌دنبال مراحل تناوبی کلونینگ ساخته شد. این پلاسمید دارای مبدا همانندسازی Ori ColE1 ، ژن مقاومت به کانامایسین و مبدا همانندسازی مایکوباکتریومی Ori M (PAL5000) جهت تکثیر و همانند سازی در هر دو میزبان اشرشیاکلی و مایکوباکتریوم بویس می باشد. وکتور حاصلpHSHP نامگذاری شد(شکل۱).صحت کلونینگ

Archive of SID

www.SID.ir

قطعات در پلاسمید بیانیpHSHP با روش Colony PCR و هضم آنزیمی و به‌دنبال برش با آنزیم‌های *Nde*I و *Sal*I تائید شد(شکل‌های ۲و۳). درنهایت با روش‌های تعیین توالی صحت قطعه کلون شده hsp60-αS- polytope-HBsAg تائید شد.

ترانسفورماسیون BCG با پلاسمید pHSHP : به‌دنبال الکتروپوریشن سلول‌های مستعد BCG در مجاورت پلاسمید pHSHP پس از گذشت ٤ هفته، کلنی‌های نخودی رنگ درشت و تیپیک BCG برروی محیط لونشتاین جانسن حاوی ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر کانامایسین ظاهر شدند. رشد این کلنی‌ها در حضور کانامایسین دلیلی بر ترانسفورم شدن آنها با پلاسمید pHSHP بود. با این وجود به‌منظور تایید نهائی ورود پلاسمید به سلول‌های BCG ، از روش الکترونداکشن و انتقال پلاسمید به سلول‌های *E.coli* استفاده شد. پس از انجام الکترونداکشن از rBCG به *E.coli* و غربالگری کلنی‌های حاصل از رشد *E. coli* نوترکیب حاوی پلاسمید بر محیط دارای کانامایسین پلاسمید pHSHP از کلنی‌های رشد کرده تخلیص و با هضم آنزیمی تائید شدند. نتایج نشان داد که پلاسمید pHSHP از سلول‌های rBCG به سلول‌های *E.coli* وارد شده است.

بحث:

ویروس‌های مرتبط با بیماری هپاتیت (به‌ویژه هپاتیت‌های B و C) به دلیل فراگیری جهانی به طور وسیع تحت مطالعه و تحقیق هستند. برخلاف هپاتیت‌های B و A؛ نبود واکسن پیشگیری کننده علیه HCV، عوارض کشنده بالا ، پاسخ نامناسب به درمان و گسترش روز افزون، این ویروس را به یک معضل بهداشتی جهانی تبدیل نموده است. دلایل مختلف؛ از جمله پایداری ویروس به علت تنوع ژنتیکی آن، عدم وجود سیستم کشت سلول کارآمد جهت تکثیر ویروس، و فقدان اطلاعات کافی در مورد ایمونولوژی مرتبط با حفاظت ویروس، می توانند موانع تولید واکسن پیشگیری کننده علیه هپاتیت c باشد(۲۵). در سال‌های اخیر واکسن‌های مختلفی طراحی و ساخته شده است، اما هیچ کدام مجوز استفاده برای واکسیناسیون را نداشتند. بنابراین، تلاش برای دستیابی هرچه سریع‌تر به درمان‌های موثر برضد هپاتیت c مزمن از ضروریات غیر قابل انکار می باشد(۲۶). در مطالعات متعدد نقش کلیدی لنفوسیت‌های سایتوتوکسیک T (CTL)در دفاع علیه عفونت‌های ویروسی به خصوص ویروس‌های غیر سایتوپاتیک، مانند HCV نشان داده شده است(۲۷). همچنین در مرحله حاد آلودگی ویروسی، پاسخ همه جانبه، قوی و پایدار سلول‌های T +CD4+,CD8 به آنتی‌ژن-های ویروس در بیمارانی که از عفونت پاک شده‌اند دیده می شود(۲۸).موفقیت در بکارگیری از راهکار واکسن‌های چند اپی‌توپی در القاء پاسخ ایمنی سلولی ایجاد شده در ارتباط با پاتوژن هایی با موتاسیون زیاد ، همچون برخی عفونت‌های ویروسی به خوبی نشان داده شده است(۲۹). علاوه بر این، کنار هم قرار گیری توالی نوکلئوتیدی سازنده در یک ساختار ساده، نه تنها در برانگیختن هم زمان پاسخ ایمنی علیه چندین اپی‌توپ نامتغییر و مهم پاتوژن موثر است، بلکه می تواند در حذف نواحی نا خواسته سرکوب کننده ایمنی به خصوص در مورد تضعیف عملکرد برخی از سلول‌های ایمنی نیز موثر باشد(۳۰). با این وجود توسعه این نوع واکسن‌ها نیازمند یافتن راه حل‌های مناسب در جهت افزایش بیان برای توالی‌های مصنوعی و افزایش ایمنی زایی آنها است. علاوه بر این، ناپایداری و بیان کم پروتئین در نتیجه فقدان ساختمان‌های دوم و سوم پروتئین-های چنداپی‌توپی یکی از مشکلات پیش رو در طراحی این نوع واکسن هاست که می تواند بر ایمنوژنیسیته آنها تاثیر گذار باشد(۳۲). از سویی دیگر جزئیات مربوط به نحوه اثر و برش پروتئازوم در درون سلول و تاثیر اسیدآمینه مجاور بر پردازش یک اپی‌توپ هنوز به طور کامل مشخص نشده است (۳۱). بکارگیری HBsAg به-عنوان پروتئین ارتقاء دهنده پاسخ ایمنی به‌صورت فیوژن با پپتیدهای هدف واکسن یکی از تمهیداتی بود که در این نطالعه اتخاذ شد. گزارش ها نشان می دهند اتصال توالی-های هترولوگ به این پروتئین نه تنها باعث افزایش پاسخ ایمنی، در نتیجه عرضه و جذب ذرات هیبرید توسط سلول‌های APC حرفه‌ای می شود، بلکه پایداری و حفظ ایمونوژنیسیته توالی آنتی‌ژن افزوده شده را نیز به دنبال دارد(۳۸). این پروتئین توانائی سرهم شدن (assembling) و تشکیل خود بخود ذرات شبه ویروسی

Archive of SID

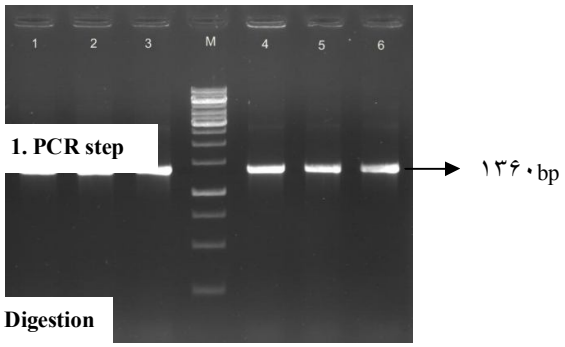
www.SID.ir

را بدون دخالت نوکلئوکپسید ویروس هپاتیت B با کمک لیپیدهای سلول دارد. HBsAg با داشتن ذخیره غنی از اپی‌توپ‌های کمکی (Th) و نیز مجوز استفاده برای واکسیناسیون جهانی علیه بیماری هپاتیت B می تواند گزینه مناسبی برای انتقال و عرضه اپی‌توپ‌های خارجی به سیستم ایمنی باشد(۳۹). امروزه استراتژی های متنوعی در ساخت واکسن‌های نوترکیب بر علیه HCV گزارش شده است (۲۷). ولی هر کدام به نوبه خود دارای مزایا و معایبی هستند. بر پایه بررسی‌های اخیر در مکانیسم‌های کنترلی عفونت ویروسی، توانایی یک واکسن را در القاء پاسخ آنتی‌بادی‌های خنثی کننده در جهت جلوگیری از گسترش ویروس، و پاسخ همه جانبه و قوی ایمنی سلولی میزبانی اعم از+CD4,+CD8 در پاکسازی ویروس امری ضروری می داند(28). از این رو انتخاب یک وکتور مطلوب به منظور تحریک کامل سیستم ایمنی در جهت بیان پایدار اپی‌توپ‌های HCV بسیار حائز اهمیت است. در بین وکتورهای باکتریایی، وکتورهای BCG کارایی بهتری دارند. زیرا توانایی تکثیر *in vivo* در ماکروفاژ به‌عنوان میکروارگانیسم داخل سلولی را دارند. واکسن BCG با دارا بودن خاصیت ادجوانتی بالای خود توانایی فعال سازی هر دو پاسخ ایمنی هومورال و ایمنی وابسته به سلول را دارد. علاوه بر این، درمان بالینی اینتراوزیکال با BCG به‌عنوان یک عامل ضد توموری در درمان سرطان سطحی توموری و ملانومای بدخیم به طور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گرفته است(۳٤و۳۵). از مزایای دیگر آن می توان به استفاده ارزان، بالا بودن گنجایش برای قطعات بزرگ DNA و پایداری در گرما اشاره نمود(۳۷) در سال ۲۰۰۳ اولین گزارش مربوط به بیان پروتئین‌های ویروس HCV در BCG توسط Uno- furuta و همکارانش انجام شد که نتایج حاصل حاکی از بیان افزایشی سایتوکین‌ها و تحریک پاسخ ایمنی سلولی به وسیله این واکسن در حیوانات آزمایشگاهی بود(۳٦). گزارش دوم در سال ۲۰۰۸ به وسیله H.Wei و همکاران ارائه شد. بدین صورت که ایمنی زایی BCG نوترکیب ترشح کننده آنتی-ژن Core بریده شده (truncated)، توالی mimotope از ناحیه E2 و شش اپی‌توپ پروتئین‌های غیر ساختاری حفاظت شده و ایمنودامیننت ویروس، منجر به تحریک هر دو پاسخ ایمنی هومورال و سلولی در موش‌های تراریخته شد(۳۷) در مطالعه حاضر نه تنها اپی‌توپ‌های ایمونودامیننت و حفاظت شده مربوط به مناطق Core، E2و NS3 ویروس انتخاب شدند، بلکه بکارگیری ژن HBsAg به عنوان پروتئین ارتقاء دهنده پاسخ ایمنی در کنار این پلی‌توپ یکی از راهکارهایی است که برای اولین بار در BCG انجام شد. برتری استفاده از پروموتر *hsp60*درطراحی و ساخت وکتور شاتل مایکوباکتریومی نه تنها در افزایش بیان ژن‌های خارجی، بلکه در حفاظت پروتئین بیان شده از هیدرولیز توسط پروتئازها و تشدید پاسخ ایمنی ایجاد شده در زمان تجمع زیاد پروتئین‌های بیان شده در فاگوزوم، موثراست. همچنین وجود سیگنال پپتید قبل از توالی پروتئین مورد نظر می تواند باعث ترشح هدایت شده و حفظ پاسخ ایمنی مفید علیه آن شود. به-علاوه، در بررسی‌های مختلف بیان سطح بالایی از آنتی‌ژن-های ویروسی و باکتریایی تحت کنترل پروموتر *hsp60*نشان داده شده است. بنابراین از این حیث یکی از مورد استفاده ترین پروموترهای موجود در شاتل وکتورهای مایکوباکتریایی به‌شمار می رود(٤۰). تائید وجود این شاتل وکتور در BCG با انجام روش الکترونداکشن به *E.coli* دلیلی بر صحت عمل الکتروپوریشن و ترانسفورم شدن سلول‌های BCG می باشد. با این وجود بررسی بیان پلی‌توپ در محیط کشت BCG ترانسفورم شده با روش‌های SDS-PAGE و وسترن قبل از انجام تحقیقات مربوط به ایمنی‌زائی این باکتری‌ها در حیوان ضروری به‌نظر می رسد.

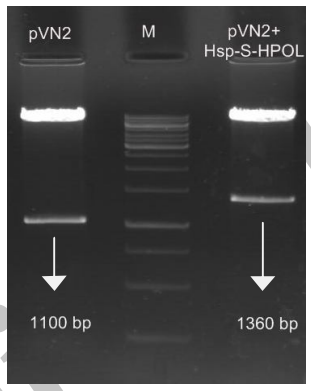
در ادامه این مطالعه و به‌دنبال ساخت rBCG دارای پلاسمید بیان کننده پلی توپ HCV، بررسی بیان و ترشح polytope-HBsAg به محیط کشت و آنالیز ایمنی‌زایی این واکسن اقداماتی هستند که مورد توجه خواهند بود.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲: تایید کلونینگ قطعه نهایی در وکتور pHSHP با روش Colony PCR.
باندهای ۱ تا ٦ مربوط به کلون‌های مثبت حاوی قطعه ۱۳٦۰ جفت بازی HSP-S-HPOL
M) مارکر وزن مولکولی ۱kb



شکل۳: تایید کلونینگ قطعه نهایی HSP-αS-HPOL در وکتور pVN2 با استفاده از آنالیز آنزیمی.
باند سمت راست واکنش هضم آنزیمی با *NdeI* و *SalI* برای تایید قطعه نهایی HSP-S-HPOL
باند سمت چپ ایجاد قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی در نتیجه هضم آنزیمی *NdeI* و *SalI* بروی وکتور pVN2

M) مارکر وزن مولکولی ۱kb

نتیجه گیری:

در این مطالعه نتایج حاصل از بررسی پلاسمید از طریق الکترونداکشن پس از ساخت شاتل وکتور نهایی pHSHP و ترانسفکت آن به BCG نشان داد که امکان ساخت BCG نوترکیب ترشح کننده پلی‌توپ‌های HCV وجود دارد. کلنی‌های حاصل قابلیت بررسی از نظر امکان ترشح پروتئین نوترکیب مورد نظر را دارا است.

تقدیر و تشکر:

این مقاله حاصل بخشی از نتایج پایان نامه دکتری تخصصی(phD)مصوب شورای آموزشی انستیتو پاستور ایران می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست مراجع:

1.Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection.*Nat Rev Immunol* 2005; **5**:215-29.

2.Houghton M, Sergio A. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus*, Nature* 2006;**436**:961-966.

3. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *New Engl J Med* 2001; **345**:41-52.

4. Pawlotsky J.M, Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease, *Trends Microbiol.* 2004; **12**:96-102.

5. Inchauspe G, Bach G,Martin P,Bonnefoy JY, Vaccination Against Hepatits B and C: Towards Therapeutic Aplication, *Informa Healthcare* 2009; **28**:7-19.

6.Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder J.C, *et al* The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies, *Science* 2000; **288**: 339-344.

7.Nelson Acosta-Rivero, Santiago Due~nas-Carrera. HCV core protein-expressing DNA vaccine induces a strong class I-binding peptide DTH response in mice. *Bioch Bio Res Comm* 2004; **314** :781–786.

8. Yu Ch, Chiang BL, A new insight into Hepatitis C vaccine Development, *J Biomed Biotech,* 2010,doi:**10**.1155.

9. Chen JY, Fan Li, Development of hepatitis C virus vaccine using hepatitis B core antigen as immunocarrier.*World J Gastroenterol* 2006 **12**: 7774-7778

10.Sette A. Fiks J. Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Curr opin immunol* 2003; **15**:461-70.

11.Yuanding Chen, Xinyu Xiong. Immunoreactivity of HCV/HBV epitopes displayed in an epitopepresenting system. *Molecular Immunology* 2006; **43**:436–442.

12.Tine JA, Firat H, Payne A, Russo G, Davis SW, Tartaglia J, *et al*. Enhanced multiepitope-based vaccines elicit CD8+cytotoxic T cells against both immunodominant and cryptic epitopes. *Vaccine* 2005; **23**:1085– 1091

13.Yuanding Chen , Xinyu Xiong. Immunoreactivity of HCV/HBV epitopes displayed in an epitope-presenting system. *Molecular Immunology* 2006; **43**:436–442.

14.Rezende CA, De Moraes MT, De Souza Matos DC, McIntoch D, Armoa GR. Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens. *J Virol Methods* 2005;**125**:1–9.

15.Cho SN, Hwang JH, Park S, Chong Y, Kim SK, Song CY,*et al.* Factors Affecting Transformation Efficiency of BCG with a *Mycobacterium-Escherichia* coli Shuttle Vector pYUB18 by Electroporation, *Yonsei medical J* 1998; **39**:141-147.

16. Dennehy M, Williamson AL, Factors influencing the immune response to foreign antigen expressed in recombinant BCG, *vaccines* 2005; **23** :1209-1224.

17. Bastos RG, Borsuk S,Seixas F, Dellagostin OA, Recombinant Mycobacterium bovis BCG, *vaccine* 2009 ;**27**: 6495-6503.

18.Hahn YS. Subversion of immune responses by hepatitis C virus: immunomodulatory strategies beyond evasion? *Curr Opin Immunol* 2003; **15**:443-9.

19.Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; **282**:938-41.

20. Lechman M, Liang TJ. Vaccine development for hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2000; **20**:211-26.

21. Wei SH, Yin W, An QX, Lei YF, Hu XB, Yang J, et al. A novel hepatitis C virus vaccine approach using recombinant Bacillus Calmette–Guerin expressing multi-epitope antigen. *Arch Virol* 2008;**153**:1021–9.

22.Jin H, Xiao W, Xiao C, Yu Y, Kang Y, Du X, et al. Protective immune responses against foot-andmouth disease virus by vaccination with a DNA vaccine ex-pressing virus-like particles. *Viral Immunol* 2007; **20**:429-440.

23. GJ Hu, RY-H Wang ,D.S.Han, H J Alter, J.W.K Shih, Characterization of the humoral and cellular immune responses against hepatitis C virus core induced by DNA- based immunization,*Vaccine* 1999; **17**:3160-3170.

24. Memarnejadian A, Roohvand F ,Fusion of HBsAg and prime/boosting augment Th1 and CTL responses to HCV polytope DNA vaccine, *Cellular immunology* 2010;**261**:93-98

25.Davis GL, Albright JE, Cook SF, Rosenberg DM Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transp* 2003; **l9**:331–338

26.Yu H, Huang H, Xiang J, Babiuk LA, den Hurk S. Dendritic cells pulsed with hepatitis C virus NS3 protein induce immune responses and protection from infection with

Archive of SID

www.SID.ir

recombinant vaccinia virus expressing NS3. *J Gen Virol* 2006;**87**:1–10

27.Stoll-Keler F, Barth H , Fafi-Kremer S, Zeisel M, Baumert T, Development of hepatitis C virus vaccines: challenges and progress,*Expert Rev.vaccines* 2009;**8**: 333-345.

28. Irshad M, Khushboo I,Singh Sh, Hepatitis C Viruse(HCV): A Review of Immunological Aspects, *Informa Healthcare* 2008;**27**:497-517.

29.Woodberry T, Gardner J, Mateo L, Immunogenecity of a Human Immunodeficiency Virus(HIV) Polytope Vaccine Containing Multiple HLA A2 HIV CD8+ Cytotoxic T-Cell Epitopes. *J virol* ,1999; **73**:5320-5325.

30.Yao ZQ, Eisen-Vandervelde A, Waggoner SN, Cale EM, Hahn YS. Direct binding of hepatitis C virus core to gC1qR on CD4+ and CD8+ T cells leads to impaired activation of Lck and Akt. *J Virol* 2004; **78**:6409-6419.

31.Suhrbier A. Polytope vaccines for the co delivery of multiple CD8 T-cell epitopes. *Expert Rev Vaccines* 2002;**1**: 207-213.

32.Thomson SA, Elliott SL, Sherritt MA, Sproat KW, Coupar BE, Scalzo AA, et al. Recombinant polyepitope vaccines for the delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol*. 1996; **157**: 822-826.

33.Sallberg M,Frelin L, Weiland O, DNA vaccine therepy for chronic hepatitis C viruse infection:immune control of a moving target, *Expert opinion* 2009; **9**:805-815.

34.Mastrangelo MJ, Baker AR, Katz HR. Cutaneous melanomain cancer in cancer. In: Devita Jr VT, editor. Principles and practice in oncology. 2nd ed. Philadelphia: *J.B. Lippincott*; 1985. p 1371–442.

35. Morales A, Nickel JC. Immunotherapy for superficial bladder cancer. A developmental and clinical overview. *Urol Clin North Am* 1992;**19**:549–56.

36.Uno-Furuta S, Matsuo K, Tamaki S, Takamura S, Kamei A, Kuromatsu I, *et al* Immunization with recombinant Calmette-Guerin bacillus (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCVspecific cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine* 2003; **21**:3149–3156.

37.A.D. Groot, H. Sbai, C.S. Aubin, J. McMurray, W. Martin, Immuno-informatics: Mining genomes for vaccine components, *Immunol Cell Biol*. 2002; **80**:255-69.

38.N. Himoudi, J.D. Abraham, A. Fournillier, Y.C. Lone, A. Joubert, A.O. De Beeck, D. *et al*.Comparative vaccine studies in HLA-A2.1-transgenic mice reveal a clustered organization of epitopes presented in hepatitis C virus natural infection, *J. Virol* 2002 ;**76**:12735-46.

39.Baez-Astua A, Herraez-Hernandez E, Garbi N, HA, Juarez V, Zur HH, *et al*. Low-dose adenovirus Pa-solli vaccine encoding chimeric hepatitis B virus surface human papillomavirus type 16 E7 proteins induces anti-gen-enhanced E7-specific antibody and cytotoxic T-cell re-sponses. *J Virol* 2005; **79**: 12807-12817.

40.Bao L, Chen W, Zhang H. Virulence, immunogenicity, and protective efficacy of two recombinant Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin strains expressing the antigen ESAT6 from Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 2003;**71**:1656–1661.

41. Memarnejadian A, Roohvand F ,Arashkia A, Rafati, S, Shokrgozar, M. A, Polytope DNA Vaccine Development Against Hepatitis C Virus: A Streamlined Approach from *In Silico* Design to *In Vitro* and Primary *In Vivo* Analyses in BALB/c Mice, *Protein & Peptide Letters* 2009;**16**: 435-446.

۴۲.Baulard A, Jourdan C, Mercentier A, loncht C, rapid mycobacterial plasmid analysis by electroduction between mycobacterium spp and *Esherichia coli* ,*Nucleic acids Res* 1992; **20**: 4105.

43.transfering plasmid DNA between differed bacterial species with electroporation *Nucleic Acids Res* 1990 ;**18**: 6165.

Archive of SID

www.SID.ir