مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۲۶/هفته چهارم فروردین ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۱۵

ساخت و ارزیابی یک سازه‌ی DNA بیان‌کننده‌ی پروتئین Core ویروس هپاتیت C متصل به آنتی‌ژن S ویروس هپاتیت B به عنوان یک کاندید واکسن

دکتر مریم یزدانیان[۱]، دکتر آرش معمارنژادیان[۲]، دکتر حسین خان‌احمد شهرضا[۳]، دکتر حوریه سلیمانجاهی[۴]، فاطمه متولی[۵]، دکتر فرزین روحوند[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: با وجود این که ویروس هپاتیت C (Hepatitis C virus یا HCV) یکی از عوامل مهم ایجادکننده‌ی بیماری‌های مزمن کبدی می‌باشد، هنوز واکسن مناسبی برای آن تهیه نشده است. هدف از این مطالعه، ساخت یک سازه‌ی بیان‌کننده‌ی توالی Core (aa: 1-122) ویروس هپاتیت C متصل به آنتی‌ژن S ویروس هپاتیت B (HBsAg یا Hepatitis B surface antigen) و تأیید بیان آن در سلول‌های یوکاریوتی بود.

روش‌ها: در ابتدا توالی Core این ویروس با استفاده از پرایمرهای دارای جایگاه برش آنزیمی BamHI/EcoRV از روی وکتور pIVEX2.4a حاوی این ژن تکثیر شد و در وکتور pCDNA3.1 حاوی HBsAg خطی‌شده با آنزیم‌های مذکور کلون گردید. ارزیابی و تأیید ساختار نوترکیب به وسیله‌ی برش آنزیم‌های محدودکننده و در نهایت تعیین توالی صورت گرفت. پلاسمید ساخته‌شده‌ی نهایی (pCHCORE) در رده‌ی سلولی HEK293T ترانسفکت شد و ارزیابی نهایی بیان توسط تست Western blot بر روی سلول‌های HEK293T ترانسفکت شده به وسیله‌ی آنتی‌بادی پلی‌کلونال آنتی HBsAg موشی انجام شد.

یافته‌ها: توالی ژن (۱۲۲-۱) Core ویروس هپاتیت C با موفقیت تکثیر گردید و نتایج ارزیابی، برش آنزیمی و تعیین توالی تأییدکننده‌ی صحت ساختار نوترکیب pCHCORE و کلونینگ انجام شده بود. نتیجه‌ی Western blot بیانگر انتقال موفق پلاسمید و بیان ژن هدف در سلول‌های یوکاریوتی بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به ساخت و بیان موفقیت‌آمیز ساختار HBS-core در سلول‌های یوکاریوتی و به دلیل احتمال افزایش پاسخ‌های ایمنی توسط آنتی‌ژن HBS به صورت فیوژن با پروتئین Core (بر اساس تحقیقات قبلی)، سازه‌ی بیانی حاوی ژن Core ویروس هپاتیت C متصل شده به این آنتی‌ژن، ممکن است باعث القای بیشتر پاسخ‌های ایمنی علیه پروتئین Core شود و بتواند به عنوان واکسن مؤثر به منظور کنترل عفونت HCV به کار رود.

واژگان کلیدی: ویروس هپاتیت C، پروتئین Core، واکسن DNA، آنتی‌ژن HBs، پاسخ‌های سیتوتوکسیک، سلول‌های لنفوسیتی T

ارجاع: یزدانیان مریم، معمارنژادیان آرش، خان احمد شهرضا حسین، سلیمانجاهی حوریه، متولی فاطمه، روحوند فرزین. **ساخت و ارزیابی یک سازه‌ی DNA بیان‌کننده‌ی پروتئین Core ویروس هپاتیت C متصل به آنتی‌ژن S ویروس هپاتیت B به عنوان یک کاندید واکسن.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۲۶): ۱۶۰-۱۵۰

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی دارویی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲- استادیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان و بخش تحقیقات BCG، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- دانشیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵- کارشناس ارشد، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور، تهران، ایران
۶- دانشیار، بخش ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر فرزین روحوند
Email: rfarzin@pasteur.ac.ir

www.SID.ir

مقدمه

عفونت ناشی از ویروس هپاتیت C (HCV یا Hepatitis C virus) یکی از بزرگ‌ترین معضلات بهداشت جهانی می‌باشد. در حال حاضر بیش از ۲۰۰ میلیون نفر در جهان به این بیماری مبتلا می‌باشند و این بیماری از نظر شیوع و مرگ و میر بعد از عفونت HIV در رتبه‌ی دوم قرار دارد (۲-۱). عفونت HCV در ۸۰-۷۰ درصد بیماران به صورت مقاوم باقی می‌ماند و در نهایت در ۲۰ درصد موارد باعث بروز سیروز کبدی و کارسینومای هپاتوسلولار (Hepatocellular carcinoma یا HCC) می‌شود. عفونت HCV مهم‌ترین علت پیوند کبد در جهان محسوب می‌شود (۳).

با وجود این آمار تکان دهنده و حجم وسیعی از مطالعات در ۲۰ سال گذشته هنوز واکسن برای پیشگیری و درمان این بیماری به تأیید نرسیده است (۴). مؤثرترین پروتکل درمانی موجود، مجموعه‌ی دارویی ریباویرین و اینترفرون α پگیله، تنها در ۵۰ درصد موارد مؤثر واقع می‌شود. مشکلات فوق ضرورت تحقیقات گسترده برای یافتن راهکارهای جدید برای درمان و پیشگیری این بیماری را نشان می‌دهد (۵).

از آن جا که ژنوم HCV دارای سرعت جهش‌زایی بالایی است، حداقل ۶ ژنوتیپ اصلی و بیش از ۷۰ زیرگونه از این ویروس شناخته شده است (۶، ۱). تنوع ژنتیکی این ویروس، قدرت جهش‌زایی بالای آن و توانایی بارز آن در پنهان شدن از دید سیستم ایمنی، بزرگ‌ترین مشکل در راه تهیه‌ی واکسن برای آن می‌باشد (۵).

HCV دارای RNA تک رشته‌ای مثبت با طول ۹۵۰۰ نوکلئوتید می‌باشد که سه پروتئین ساختاری (Core، E1، E2) و شش پروتئین غیر ساختاری (NS1، NS2، NS3، NS4A، NS4B و NS5) را کد می‌کند (۷).

شواهد متعددی نشان می‌دهد با وجود ترشح آنتی‌بادی طبیعی علیه HCV در مراحل اولیه‌ی بیماری، این امر به تنهایی سبب کنترل بیماری نمی‌شود و بهبود خودبه‌خودی از عفونت با پاسخ سریع و قوی و چند جانبه‌ی سلول‌های CD8 + CTLs (Cytotoxic T lymphocytes) نسبت به چندین اپی‌توپ غالب مربوط به بعضی پروتئین‌های محافظت‌شده‌ی ویروسی و ترشح سایتوکاین‌های نوع Th1 به دنبال فعالیت قوی T-CD4+ helper cells همراه می‌باشد (۹-۸، ۵).

در بین پروتئین‌های ویروس هپاتیت C، پروتئین Core (HCVcp) یکی از محافظت شده‌ترین پروتئین‌های ویروس در ژنوتیپ‌های مختلف است و اپی‌توپ‌های منحصر به CTL و B cell متعددی در آن شناسایی شده است (۱۰). همچنین به نظر می‌رسد پاسخ ایمنی سلولی علیه HCVcp در عفونت‌های مزمن کاهش می‌یابد (۱۱). از آن جا که تحقیقات بیانگر آن است که فرم کامل این پروتئین سبب تضعیف پاسخ‌های ایمنی می‌شود، اغلب استفاده از شکل Truncated این پروتئین در فرمولاسیون واکسن به کار گرفته شده است (۱۲).

تاکنون استراتژی‌های متعددی جهت تهیه‌ی واکسن علیه عفونت HCV به کار گرفته شده است. استفاده از Recombinant viral vectorها، استفاده از پپتیدها و پروتئین‌های ساب‌یونیت Recombinant، تهیه‌ی DNA Vaccine از ژن بیان‌کننده‌ی پروتئین‌های

Archive of SID
www.SID.ir

ساختاری و غیر ساختاری به تنهایی و یا همراه با ادجونت مناسب و یا ساخت واکسن‌های چند اپی‌توپی از جمله‌ی این استراتژی‌ها هستند (۴). یکی از استراتژی‌های مورد توجه برای ایجاد ایمنی مؤثر علیه عوامل عفونی استفاده از DNA vaccineها می‌باشد. کاربرد این روش مزایای متعددی دارد. ایمنی آن به علت عدم استفاده از ارگانیسم کامل، افزایش بیان اختصاصی آنتی‌ژن کدکننده در میزبان، امکان استفاده از واکسن‌های Multi-valent در یک دوز، امکان نگهداری آن به شکل لیوفیلیزه و در نتیجه تسهیل در انتقال و توزیع آن و مقرون به صرفه بودن آن از مزایای این نوع واکسن‌ها هستند. با این حال مهم‌ترین مزیت این واکسن‌ها تحریک اختصاصی ایمنی سلولی می‌باشد (۱۴-۱۳).

با وجود استفاده از واکسن‌های DNA حاوی آنتی‌ژن‌های مختلف HCV در تحقیقات گذشته، پاسخ‌های ضعیف آن‌ها قادر به تحریک مؤثر پاسخ‌های ایمنی نبوده‌اند. استراتژی‌های متعددی در راستای افزایش کارایی واکسن‌های DNA مورد بررسی قرار گرفته است، مانند کاربرد واکسن DNA به همراه ادجونت‌های مختلف چون نوکلئوتیدهای CpG، لیپوزوم‌ها و ادجونت‌های با ساختار پلیمری، استفاده از رژیم‌های مختلف تزریقی PRIME/boost مانند DNA/protein، vector DNA/live (استفاده از وکتورهای زنده‌ی بیان‌کننده‌ی پروتئین نوترکیب مانند ویروس واکسینیا، گونه‌های سالمونلا و...)، DNA/BCG و اتصال قطعات آنتی‌ژنی به توالی‌های برخی پروتئین‌های ساختاری سایر ویروس‌ها که با استفاده از مکانیسم‌های مختلف قادر به تشدید پاسخ‌های ایمنی می‌باشند (۴). آنتی‌ژن سطحی (HBsAg) و آنتی‌ژن Core (HBcAg) ویروس هپاتیت B، از جمله پروتئین‌های ایمونوژنیک قوی می‌باشند و تحقیقات نشان می‌دهد ایمنی‌زایی واکسن DNA با پایه‌ی HBsAg تأثیر قابل توجهی در افزایش تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی دارد (۱۷-۱۵). این امر می‌تواند به علت افزایش بیان، پردازش و ارائه‌ی اپی‌توپ‌های مشتق‌شده از این پروتئین و عرضه‌ی اپی‌توپ‌های T helper درون پلی‌پپتید HBsAg باشد (۱۹-۱۷).

در یک مطالعه کاست ژنی بیان‌کننده‌ی فرم کوتاه‌شده‌ی HCVcp متصل به انتهای کربوکسیلیک قسمت‌های متفاوت از پروتئین سطحی ویروس هپاتیت B شامل آنتی‌ژن‌های preS1، preS2 و S ساخته شد و پاسخ‌های ایمنی علیه آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که در صورتی‌که HCVcp به preS2+S و S (که توانایی ترشح کردن را دارا هستند) متصل باشد، قدرت تحریک بیشتر پاسخ‌های ایمنی را دارد (۲۱-۲۰). به همین دلیل در تحقیق حاضر برای افزایش کارایی کاندید واکسن DNA، یک سازه‌ی ژنی حاوی بخش هیدروفیلیک از پروتئین Core (توالی ۱۲۲-۱) که توانایی آن در تحریک پاسخ‌های ایمنی نشان داده شده است (۲۲)، به صورت متصل به HBsAg ساخته شد و بیان سازه در سلول‌های HEK293T (Human embryonic kidney 293 T cells) بررسی گردید.

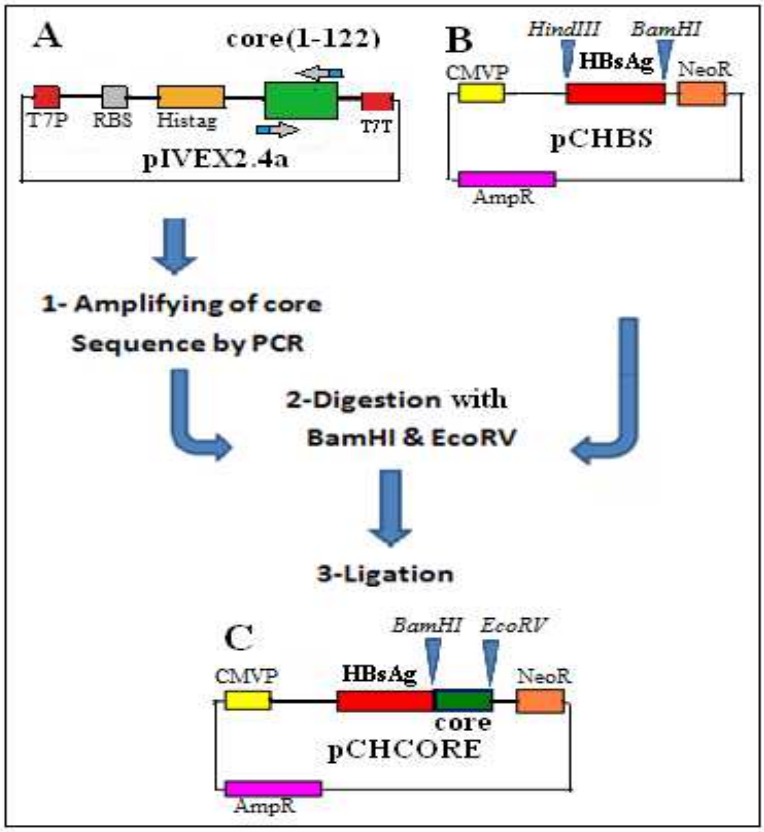
روش‌ها

ساخت سازه‌ی بیانی یوکاریوتی pCHCORE

به منظور ساخت وکتور فوق، قطعه‌ی Core با استفاده از واکنش PCR (Polymerase chain reaction)

Archive of SID
www.SID.ir

تکثیر گردید. برای انجام این تکثیر، ابتدا پرایمر مناسب برای تکثیر قطعه‌ی ژنی با توجه به توالی Core که پیش از این در پلاسمید Pivex2.4a کلون شده بود (۲۲)، طراحی شد. این طراحی به گونه‌ای بود که سایت‌های برشی BamHI و EcoRV (Fermentas, Germany) در ابتدا و انتهای ژن قرار گرفت (جدول ۱). سپس واکنش PCR در شرایط ۴ دقیقه ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و پس از آن ۳۰ چرخه به ترتیب شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و سرانجام مرحله پایانی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. قطعه‌ی ژنی تکثیریافته با استفاده از کیت استخراج از ژل (Qiagen, Germany) خالص‌سازی گردید. هم‌زمان وکتور بیانی pCHBS، شامل قطعه‌ی HBsAg کلون‌شده در وکتور pCDNA3.1 (۲۳، ۱۹-۱۸)، با استفاده از آنزیم‌های BamHI و EcoRV خطی شد. در نهایت قطعه‌ی ژنی مذکور طی فرایند الحاق (Ligation) و با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase به وکتور مورد نظر وارد گردید (شکل ۱).



شکل ۱. طرح شماتیک کلونینگ قطعه‌ی Core در پلاسمید pCHBS

A) وکتور **pIVEX2.4a** حاوی توالی (۱۲۲-۱) **Core** که به عنوان الگو جهت تکثیر قطعه‌ی (۱۲۲-۱) **Core** توسط پرایمرهای **RcoreEcoRV** و **FcoreBamHI** استفاده گردید. **B)** وکتور بیانی **pCHBS** که شامل قطعه‌ی **HBsAg** کلون‌شده در وکتور **pCDNA3.1** می‌باشد. **C)** پلاسمید **pCHCORE** که به دنبال واکنش اتصال بین توالی **Core** و وکتور هضم‌شده به وسیله‌ی آنزیم‌های **BamHI** و **EcoRV** حاصل شده است.

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

جدول ۱. نام، عملکرد، طول و توالی آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق

آغازگر (پرایمر)	عملکرد	طول (جفت باز)	توالی
FcoreBamHI	تکثیر قطعه‌ی Core	۲۶	TATGGATCCGGCACGATTCCCAAACC
RcoreEcoRV	تکثیر قطعه‌ی Core	۲۹	AAGGATATCTCATTACTTACCCAAATTGC
T7-promoterF	تعیین توالی قطعه‌ی Core	۲۰	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH-R	تعیین توالی قطعه‌ی Core	۱۸	TAGAAGGCACAGTCGAGG

به دنبال ترانسفورم کردن محصول واکنش اتصال به درون باکتری‌های مستعد E.coli (DH5-α)، کلونی‌های مثبت بر اساس مقاومت به آمپی‌سیلین به وسیله‌ی Colony PCR انتخاب شدند. در ادامه، آنالیز آنزیمی پلاسمید نوترکیب به وسیله‌ی آنزیم‌های SmaI، BamHI/EcoRV و DraI انجام گرفت و به ترتیب قطعاتی با طول (۶۴۳۵ و ۳۷۰ جفت باز)، (۵۰۶۰ و ۱۴۱۰ جفت باز) و (۱۱۴۵، ۱۲۵۰، ۷۱۰ و ۳۳۶۵ جفت باز) حاصل شد.

نمونه‌ای که در آنالیز آنزیمی الگوی صحیحی را نشان داد، برای تأیید نهایی و تعیین توالی به وسیله‌ی پرایمرهای عمومی BGH-R و T7pomoter-F در جدول ۱ به شرکت Pishgam Biotech ارسال گردید.

تأیید بیان پروتئین

جهت بررسی بیان پروتئین هدف توسط سازه‌ی نوترکیب pCHCORE از رده‌ی سلولی HEK293T (رده‌ی سلولی کلیه‌ی جنین انسان) که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود، استفاده شد.

این سلول در محیط کامل DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco, Invitrogen, USA) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Biosera, UK) کشت داده شد. به منظور تأیید بیان این پروتئین تعداد ۶×۱۰^{۵} سلول HEK293T در حجم ۴ میلی‌لیتر به حفرات پلیت ۶ خانه‌ای منتقل شدند. بعد از کشت شبانه، ۳ ساعت پیش از ترانسفکشن با محیط تازه‌ی بدون آنتی‌بیوتیک تعویض محیط شد.

مقدار ۴ میکرولیتر TurboFect transfection reagent به ۴۰۰ میکرولیتر محیط ناقص حاوی ۴ میکروگرم از پلاسمید نوترکیب pCHCORE اضافه گردید و ۲۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه نگهداری شد. سپس به صورت قطره قطره در نقاط مختلف پلیت ۶ خانه‌ای اضافه گردید.

به منظور بررسی صحت ترانسفکشن، سلول‌های یکی از چاهک‌ها به وسیله‌ی مخلوط پلاسمید مورد تست و ۱۰ درصد pGFP-N1 (Clontech, USA) به عنوان شاهد مثبت، ترانسفکت شد. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور کشت سلول قرار داده و سپس با محیط کامل، تعویض محیط شد.

پس از ۴۸ ساعت ابتدا بررسی بیان پروتئین GFP (Green fluorescent protein) توسط میکروسکوپ فلوئورسانس انجام گردید و سپس سلول‌ها جمع‌آوری شدند و پس از لیز با استفاده از بافر لیز کننده (Tris-Cl ۰/۱ مول (pH = ۷/۸) و Triton X-۱۰۰ پنج درصد (V/V) و سانتریفوژ، مایع رویی جهت انجام تست Western blot در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی بیان پروتئین هدف با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌ها در ژل پلی‌آکریلامید (SDS-PAGE) و Western blot

جهت تأیید هویت پروتئین بیان شده به وسیله‌ی آنالیز وسترن بلاتینگ، نمونه‌ی لیز سلولی پس از الکتروفورز روی ژل ۱۵ درصد SDS-PAGE تفکیک شد و به کاغذ PVDF (پلی‌وینیلیدین دیفلورایید) (Roche, Germany) منتقل شد. غشا با BSA (Bovin serum albumin) ۳ درصد بلوکه گردید و پس از شستشو به ترتیب با آنتی‌بادی پلی‌کلونال آنتی HBsAg (رقت ۱ در ۱۰۰۰) و آنتی‌بادی ثانویه‌ی کونژوگه با پراکسیداز Horseradish peroxidase (HRP)- conjugated goat anti-mouse antibody (Qiagen, USA) با رقت ۱ در ۱۰۰۰۰ انکوبه شد و در نهایت جهت مشاهده‌ی باند پروتئین از سوبسترای DAB (Dioaminobenzidine) استفاده گردید.

یافته‌ها

کلون‌سازی ژن Core در سازه‌ی بیانی pCHBS

همان طور که در شکل ۱ نمایش داده شده است، پس از تکثیر توسط PCR و انجام مراحل برش، توالی استخراج شده‌ی (۱۲۲-۱) Core به درون سازه‌ی بیانی pCHBS کلون شد.

نتایج بررسی به وسیله‌ی برش با آنزیم‌های محدودالاثر BamHI/EcoRV، SmaI و DraI حضور ژن (۱۲۲-۱) Core را تأیید کرد که در شکل ۲ قسمت A ملاحظه می‌شود. همچنین نتایج حاصل از تعیین توالی ژن Core کلون‌شده در سازه‌ی pCHBS به وسیله‌ی نرم‌افزار Chromas بازیابی شد و سپس با ژن Core مرجع با استفاده از نرم‌افزار Bio Edit هم ردیفی چندگانه (Multiple alignment) انجام پذیرفت. نتایج نشانگر هم‌پوشانی کامل ژن کلون‌شده با ژن مرجع و در حقیقت عدم وجود موتاسیون در آنتی‌ژن مورد نظر و کاست بیان پروتئین بود (شکل ۲ قسمت B).

بررسی ترانسفکشن سلولی pCHCORE و بیان پروتئین Core (۱۲۲-۱)

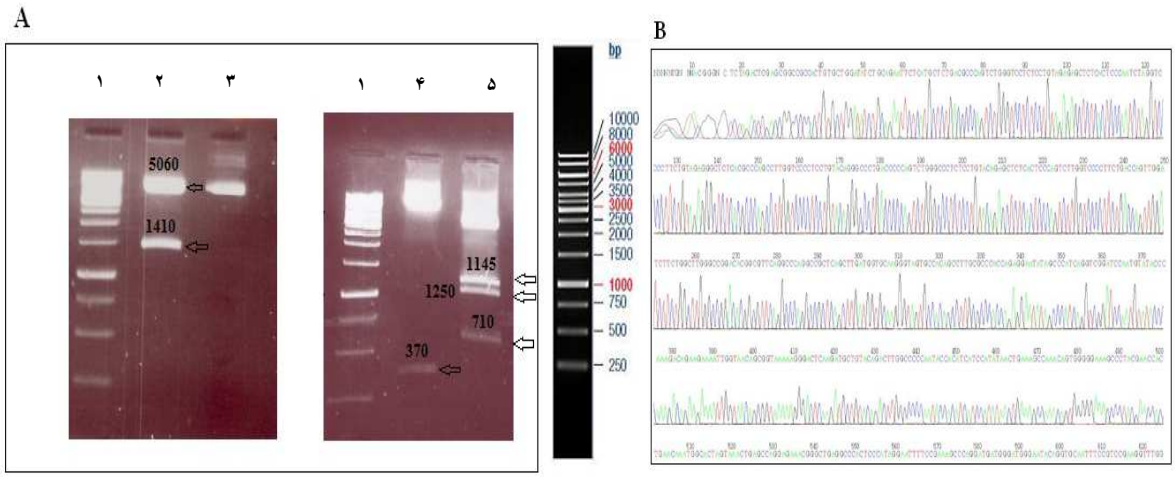
پیش از تأیید بیان پروتئین در رده‌ی سلولی HEK293T، این سلول‌ها به وسیله‌ی میکروسکوپ فلوروسانس بررسی شدند. رؤیت پروتئین GFP بیان‌شده در این سلول‌ها، مؤید ترانسفکشن احتمالی پلاسمید pCHCORE به سلول‌های HEK293T می‌باشد، (شکل ۳ قسمت A). هویت پروتئین بیان شده به وسیله‌ی آنالیز وسترن بلات صورت گرفت و وجود باند پروتئینی حدود ۵۰ کیلودالتونی مؤید بیان این فیوژن پروتئین می‌باشد. قابل توجه است که ظهور دو باند متمایز پس از رنگ‌آمیزی DAB نشان‌دهنده‌ی فرم‌های گلیکوزیله و غیر گلیکوزیله‌ی HBsAg می‌باشند (شکل ۳ قسمت B).

بحث

استفاده از واکسن DNA بیان‌کننده‌ی ژن‌های مختلف ویروس هپاتیت C به عنوان واکسن‌های پیشگیری و درمان‌کننده مورد توجه بوده (۲۴) و تعدادی از آن‌ها حتی به مراحل کارآزمایی بالینی نیز رسیده است (۴).

ژن ساختاری Core ویروس هپاتیت C یکی از حفاظت شده‌ترین ژن‌های این ویروس در بین ژنوتایپ‌های مختلف ویروس می‌باشد که همواره به عنوان آنتی‌ژن مناسب در واکسن‌های مختلف علیه ویروس HCV به کار رفته است (۲۵).

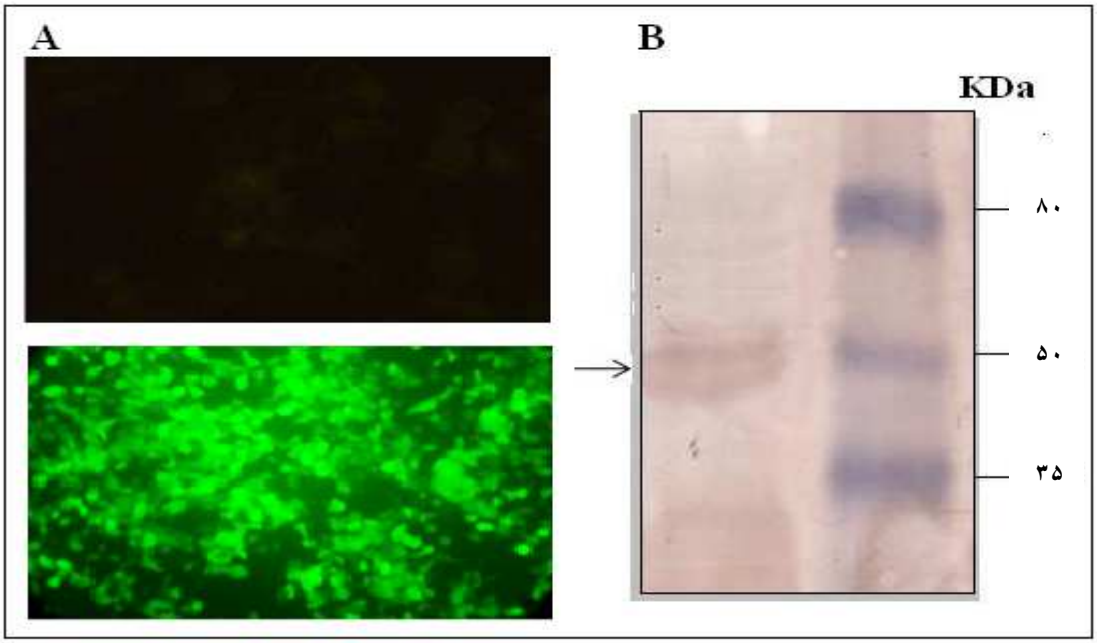
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲. تأیید صحت کلونینگ قطعه‌ی **Core** در وکتور **pCHBS** با استفاده از:

A) آنالیز آنزیمی پلاسمید نوترکیب **pCHCORE** با آنزیم‌های محدودالاثر و بررسی قطعات حاصل بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد. در این شکل ستون ۱ مارکر، ستون ۲ هضم آنزیمی با **SmaI** (قطعات ۵۰۶۰ و ۱۴۱۰ جفت باز)، ستون ۳ پلاسمید هضم‌نشده، ستون ۴ هضم آنزیمی با **BamHI/EcoRV** (قطعات ۶۴۳۵ و ۳۷۰ جفت باز)، ستون ۵ هضم آنزیمی با **DraI** (قطعات ۱۱۴۵، ۱۲۵۰، ۷۱۰، ۳۳۶۵ جفت باز)

B) تعیین توالی ژن **Core** کلون‌شده در سازه‌ی **pCHCORE** و تأیید هم‌خوانی آن با ژن **Core** و عدم وجود موتاسیون



شکل ۳. بررسی بیان **In vitro** فیوژن پروتئین نوترکیب **HBsAg + Core** درون سلول‌های **HEK293T**

A) ردیابی بیان پروتئین **GFP** ابرازشده توسط پلاسمید **pGFP-N1** که به صورت ترانسفکشن همراه با پلاسمید **pCHCORE** انجام پذیرفت، با مشاهده به وسیله‌ی میکروسکوپ فلورسانس

B) Western blot: بررسی امکان بیان پروتئین فیوژن هدف توسط آنتی‌بادی اولیه علیه **HBsAg**، صورت گرفت. ظهور باند با وزن تقریبی ۵۰ کیلودالتون می‌تواند نشان‌دهنده‌ی بیان پروتئین **Core** باشد. ایجاد باند دو تایی به علت وجود فرم گلیکوزیله و غیر گلیکوزیله پروتئین **HBsAg** بود.

www.SID.ir

بدین جهت استفاده از واکسن DNA بیان‌کننده‌ی پروتئین Core نیز در تحقیقات متعددی مورد توجه بوده است (۲۸-۲۶). اما لازم به ذکر است که Zhu و همکاران طی تحقیقی نشان دادند که فرم کامل پروتئین Core ویروس هپاتیت C می‌تواند باعث سرکوب پاسخ‌های ایمنی شود (۲۹) و بدین جهت استفاده از بخش آمینی پروتئین Core که باعث تحریک بیشتر پاسخ‌های ایمنی می‌شود، در تحقیقات متعددی مورد توجه واقع شده است (۱۲).

از آن جا که تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی نقش مهمی در کنترل عفونت HCV دارد، واکسن‌های DNA می‌تواند جایگاه ویژه‌ایی در طراحی واکسن علیه HCV داشته باشد، ولی این واکسن‌ها بر خلاف ناقلین ویروسی به علت توانایی تکثیر و بیان محدود پروتئین موفقیت قابل توجهی نداشته‌اند (۴). کارایی ضعیف این نوع واکسن‌ها به دلایل مختلف، لزوم افزایش اثربخشی آن‌ها را توسط روش‌های متفاوت دو چندان کرده است.

مطالعات متعددی بیانگر آن هستند که از آن جا که HBsAg ایمونوژن قوی می‌باشد، می‌تواند باعث افزایش پاسخ‌های CTL توسط آنتی‌ژن‌های بیگانه شود. اتصال توالی HBsAg به پروتئین (۱۵۴-۱) Core ویروس هپاتیت C و یا سازه‌ی پلی‌توپی بیان‌کننده‌ی اپی‌توپ‌های مختلف ویروسی، در مطالعات قبلی باعث افزایش قابل توجه پاسخ‌های ایمنی شده است (۲۱).

در یک مطالعه چندین واکسن DNA بیان کننده‌ی کایمریک پروتئین‌های متفاوت شامل قطعات با طول‌های مختلف از پروتئین Envelope ویروس هپاتیت B [پروتئین کامل envelope (preS1 + preS2 + HBsAg)، HBsAg + preS2 و HBsAg]، با فرم Truncated پروتئین Core ویروس هپاتیت C ساخته شد و پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی علیه آن بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که بهترین پاسخ‌های ایمنی ایجادشده مربوط به سازه‌ی حاوی فیوژن پروتئین HBsAg و یا preS2 + HBsAg متصل به پروتئین Core می‌باشد (۳۰، ۲۰). در حقیقت وجود این دو پروتئین سبب آزادسازی پروتئین هدف از سلول می‌شود. این مطلب مؤید آن است که ممکن است که یکی از عوامل افزایش پاسخ‌های ایمنی به دنبال اتصال HBsAg به پروتئین، ترشح پروتئین نوترکیب از سلول‌های بیان‌کننده‌ی آن باشد. این امر ممکن است سبب افزایش جذب و ارائه‌ی بیشتر آن به وسیله‌ی سلول‌های ارائه‌کننده‌ی آنتی‌ژن (APCs یا Antigen presenting cells) شود (۳۱، ۱۵).

در این مطالعه ژن ساختاری (۱۲۲-۱) Core مربوط به ناحیه‌ی هیدروفوبیک که در مطالعات پیشین به عنوان کاندید مناسب جهت تهیه‌ی واکسن ساب یونیت پروتئینی نتایج امیدبخشی از خود نشان داد (۱۲)، در وکتور بیانی حاوی توالی HBsAg کلون شد. مشاهده‌ی بیان پروتئین GFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس بیانگر انتقال احتمالی سازه‌ی بیانی pCHCORE به درون سلول‌های HEK293T می‌باشد. با توجه به وزن پروتئین HBsAg که حدود ۲۹ کیلودالتون گزارش شده است (۲۳) و وزن پروتئین Core که حدود ۲۱ کیلودالتون می‌باشد (۱۲)، وزن قابل پیش‌بینی برای پروتئین HBsAg-core حدود ۵۰ کیلودالتون است.

ارزیابی بیان ژن با روش Western blot نشان دهنده‌ی باند مورد نظر با وزن پیش‌بینی‌شده بود.

www.SID.ir
www.mui.ac.ir
Archive of SID

وجود باند دو تایی می‌تواند به علت تاخوردگی‌ها (Folding) و تغییرات پس از ترجمه (Posttranslational modification) فیوژن پروتئین HBsAg-core (۱-۱۲۲) باشد که در گزارش‌های مشابه دیگر نیز مشاهده می‌شود (۲۳).

در نهایت با توجه به بیان مناسب سازه‌ی ژنی طراحی شده در سلول‌های یوکاریوتی، این سازه می‌تواند به دلیل اتصال به HBsAg برای مطالعات آینده‌ی واکسن‌درمانی یا پیشگیری کننده در جهت کنترل عفونت HCV با هدف ارتقای ایمنی‌زایی واکسن استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه جهت دریافت درجه‌ی دکترای بیوتکنولوژی دارویی می باشد. بودجه این تحقیق توسط انستیتو پاستور ایران تأمین شد.

References

1. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. Clin Microbiol Infect 2011; 17(2): 107-15.
2. Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. Liver Int 2011; 31(Suppl 2): 30-60.
3. Vezali E, Aghemo A, Colombo M. A review of the treatment of chronic hepatitis C virus infection in cirrhosis. Clin Ther 2010; 32(13): 2117-38.
4. Roohvand F, Kossari N. Advances in hepatitis C virus vaccines, part two: advances in hepatitis C virus vaccine formulations and modalities. Expert Opin Ther Pat 2012; 22(4): 391-415.
5. Roohvand F, Kossari N. Advances in hepatitis C virus vaccines, Part one: Advances in basic knowledge for hepatitis C virus vaccine design. Expert Opin Ther Pat 2011; 21(12): 1811-30.
6. Irshad M, Ansari MA, Singh A, Nag P, Raghvendra L, Singh S, et al. HCV-genotypes: a review on their origin, global status, assay system, pathogenecity and response to treatment. Hepatogastroenterology 2010; 57(104): 1529-38.
7. Joyce MA, Tyrrell DL. The cell biology of hepatitis C virus. Microbes Infect 2010; 12(4): 263-71.
8. Ip PP, Nijman HW, Wilschut J, Daemen T. Therapeutic vaccination against chronic hepatitis C virus infection. Antiviral Res 2012; 96(1): 36-50.
9. Grebely J, Matthews GV, Dore GJ. Treatment of acute HCV infection. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011; 8(5): 265-74.
10. Khaliq S, Jahan S, Pervaiz A. Sequence variability of HCV Core region: important predictors of HCV induced pathogenesis and viral production. Infect Genet Evol 2011; 11(3): 543-56.
11. Jahan S, Ashfaq UA, Khaliq S, Samreen B, Afzal N. Dual behavior of HCV Core gene in regulation of apoptosis is important in progression of HCC. Infect Genet Evol 2012; 12(2): 236-9.
12. Roohvand F, Aghasadeghi MR, Sadat SM, Budkowska A, Khabiri AR. HCV core protein immunization with Montanide/CpG elicits strong Th1/Th2 and long-lived CTL responses. Biochem Biophys Res Commun 2007; 354(3): 641-9.
13. Ullah S, Shah MAA, Riaz N. Recent advances in development of DNA vaccines against hepatitis C virus. Indian Journal of Virology 2012; 23(3): 253-60.
14. Feinstone SM, Hu DJ, Major ME. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against hepatitis C virus. Clin Infect Dis 2012; 55(Suppl 1): S25-S32.
15. Chen D, Edgtton K, Gould A, Guo H, Mather M, Haigh O, et al. HBsAg-vectored vaccines simultaneously deliver CTL responses to protective epitopes from multiple viral pathogens. Virology 2010; 398(1): 68-78.
16. Olkhanud PB, Mughal M, Ayukawa K, Malchinkhuu E, Bodogai M, Feldman N, et al. DNA immunization with HBsAg-based particles expressing a B cell epitope of amyloid beta-peptide attenuates disease progression and prolongs survival in a mouse model of Alzheimer's disease. Vaccine 2012; 30(9): 1650-8.
17. Wang Y, Li DA, Hey Y, Wang F, Guo YJ, Yang F, et al. Proteomic analysis of augmented immune responses in mouse by prime-and-boost

Archive of SID
www.SID.ir

immunization strategy with DNA vaccine coding HBsAg and rHBsAg protein. Vaccine 2007; 25(48): 8146-53.
18. Memarnejadian A, Roohvand F. Fusion of HBsAg and prime/boosting augment Th1 and CTL responses to HCV polytope DNA vaccine. Cell Immunol 2010; 261(2): 93-8.
19. Memarnejadian A, Roohvand F, Arashkia A, Rafati S, Shokrgozar MA. 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 Pept Lett 2009; 16(7): 842-50.
20. Geissler M, Tokushige K, Wakita T, Zurawski VR, Jr., Wands JR. Differential cellular and humoral immune responses to HCV core and HBV envelope proteins after genetic immunizations using chimeric constructs. Vaccine 1998; 16(8): 857-67.
21. Liao G, Wang Y, Chang J, Bian T, Tan W, Sun M, et al. Hepatitis B virus precore protein augments genetic immunizations of the truncated hepatitis C virus core in BALB/c mice. Hepatology 2008; 47(1): 25-34.
22. Maillard P, Lavergne JP, Siberil S, Faure G, Roohvand F, Petres S, et al. Fcgamma receptor-like activity of hepatitis C virus core protein. J Biol Chem 2004; 279(4): 2430-7.
23. Arashkia A, Roohvand F, Memarnejadian A, Aghasadeghi MR, Rafati S. Construction of HCV-polytope vaccine candidates harbouring immune-enhancer sequences and primary evaluation of their immunogenicity in BALB/c mice. Virus Genes 2010; 40(1): 44-52.
24. Holmstrom F, Pasetto A, Nahr V, Brass A, Kriegs M, Hildt E, et al. A synthetic codon-optimized hepatitis C virus nonstructural 5A DNA vaccine primes polyfunctional CD8+ T cell responses in wild-type and NS5A-transgenic mice. J Immunol 2013; 190(3): 1113-24.
25. Torresi J, Johnson D, Wedemeyer H. Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus. J Hepatol 2011; 54(6): 1273-85.
26. Hartoonian C, Ebtekar M, Soleimanjahi H, Karami A, Mahdavi M, Rastgoo N, et al. Effect of immunological adjuvants: GM-CSF (granulocyte-monocyte colony stimulating factor) and IL-23 (interleukin-23) on immune responses generated against hepatitis C virus core DNA vaccine. Cytokine 2009; 46(1): 43-50.
27. Acosta-Rivero N, Duenas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Morales-Grillo J. HCV core protein-expressing DNA vaccine induces a strong class I-binding peptide DTH response in mice. Biochem Biophys Res Commun 2004; 314(3): 781-6.
28. Alvarez-Lajonchere L, Gonzalez M, Alvarez-Obregon JC, Guerra I, Vina A, Acosta-Rivero N, et al. Hepatitis C virus (HCV) core protein enhances the immunogenicity of a co-delivered DNA vaccine encoding HCV structural antigens in mice. Biotechnol Appl Biochem 2006; 44(Pt 1): 9-17.
29. Zhu W, Chang Y, Wu C, Han Q, Pei R, Lu M, et al. The wild-type hepatitis C virus core inhibits initiation of antigen-specific T- and B-cell immune responses in BALB/c mice. Clin Vaccine Immunol 2010; 17(7): 1139-47.
30. Chen D, Gould A, Mather M, Haigh O, Barnes M, Kattenbelt J, et al. HBsAg-vectored DNA vaccines elicit concomitant protective responses to multiple CTL epitopes relevant in human disease [Online]. 2008. Available from: URL: http://precedings.nature.com/documents/1910/version/1.
31. Geissler M, Gesien A, Tokushige K, Wands JR. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. J Immunol 1997; 158(3): 1231-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School Received: 19.12.2012

Vol. 31, No. 226, 4th Week, April 2013 Accepted: 05.03.2013

Construction and Evaluation of DNA Vaccine Encoding Fusion Protein of Hepatitis C Virus Core Protein and Hepatitis B Surface Antigen as a Vaccine Candidate

Maryam Yazdanian Pharm D[1], Arash Memarnejadian PhD[2], Hossein Khanahmad Shahreza PhD[3], Hoorieh Soleimanjahi PhD[4], Fatemeh Motevali MSc[5], Farzin Roohvand PhD[6]

Original Article

Abstract

Background: While hepatitis C virus (HCV) is the major cause of acute and chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma worldwide, no vaccine against this infection has been proved to date. Cellular immune responses play an important role for eradicating persistent viral infections. Among different vaccine strategies, the use of DNA vaccine has been shown to be a promising approach for enhancing cellular immune responses. In spite of their advantages, DNA-based vaccines might induce weaker antibody and cytotoxic T-lymphocyte responses compared to protein immunization. To overcome this obstacle, several methods such as different immunization regimens, fusion of particle forming units [like hepatitis B surface antigen (HBsAg)] and co-expressing cytokines have been tested. The aim of this study was to design, construct, and evaluate an HBsAg-fused core-based DNA vaccine against HCV infection.

Methods: The HCV core gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned in BamHI/EcoRV sites of pcDNA3.1 containing HBsAg. The constructed plasmid (pCHCORE) was analyzed by restriction enzyme and sequencing analyses and evaluated for the protein expression in HEK293T cell line by western blot analysis with anti-HBsAg polyclonal antibody.

Findings: The correctness of the constructed DNA vaccine was shown by restriction enzyme analysis and sequencing. Western blotting results confirmed the expression of HBsAg-HCV fusion protein with an expected molecular weight in HEK239T cell line.

Conclusion: In accordance with previous studies, the constructed vector (pCHCORE) compromising the fusion of HBsAg to HCV core in pCDNA3 plasmid might be used as a HCV DNA vaccine (due to proper expression in cell lines) to induce augmented cellular immune responses.

Keywords: Hepatitis C virus, H C virus core protein, DNA vaccine, Hepatitis B surface antigen, Cytotoxic T-cell response

Citation: Yazdanian M, Memarnejadian A, Khanahmad Shahreza H, Soleimanjahi H, Motevali F, Roohvand F. **Construction and Evaluation of DNA Vaccine Encoding Fusion Protein of Hepatitis C Virus Core Protein and Hepatitis B Surface Antigen as a Vaccine Candidate.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(226): 150-60

1- PhD Student, Department of Pharmaceutical Chemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Pediatric Inherited Diseases Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan AND BCG Research Center, Department of Research and Production, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4- Associate Professor, Department of Virology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5- Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran
6- Associate Professor, Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Corresponding Author: Farzin Roohvand PhD, Email: rfarzin@pasteur.ac.ir

www.SID.ir