Archive of SID

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2011; 14(57): 69-78

Cloning of human IFN-λ1 (IL-29) from monocyte derived DCs and its expression in HEK 293 T

Amir-Kalvangh P[1], Ebtekar M[*1], Azadmanesh K[2], Hartoonian C[3], Mahdavi M[1]

1. Dept. of Immunology, Tarbiat Modares University, Faculty of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Dept. of Pharmacology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Dept. of Virology, Pasteur Institute, Iran

Accepted 22 Sep 2010, Received 26 May 2010

Abstract

***Background*:** Type III Interferon (IFN) is a novel member of the interferon family, which contains three ligands: IFN-λ1 (IL-29), IFN-λ2 (IL-28A) and IFN-λ3 (IL-28B).These three ligands use the same unique heterodimeric receptor composed of CRF2-12 (IFN-λ-R1/IL-28Ra) and CRF2-4 (IL10-R-b) chains which are completely different from type I & type II IFN receptors. IFNsλ exhibit several features such as antiviral activity, antiproliferative activity, immunomodulatory activity and in vivo antitumour activity. In this work we aimed to clone the ogene of IFN-λ1 obtained from dendritic cells and assess protein production in eukaryotic expression vector.

Materials and methods: in thid experimental study, total RNA was extracted from monocyte derived dendritic cells stimulated with 100 ng/ml of LPS. cDNA was synthesized from total RNA .Then cDNA of IFN-λ1 was amplified by PCR with specific primers and cloned into the PTZ57R/Tvector in the E.coli (DH5α). This was subsequently subcloned into plasmid pcDNA3.1+, using KpnI and BamHI restriction endonucleases. After tranfection into HEK293 T, expression of protein was tested by sandwich-ELISA method.

Results: The DNA sequence of the insert was identical to the published sequences encoding IFN-λ1 in GeneBank. It was demonstrated that IFN-λ1 gene was markedly transcribed in transfected cells. Expression of IFN-λ1 in HEK293 T cells was confirmed by sandwich ELISA.

Conclusion: Successful cloning and expression IFN-λ1 can be the first step for more production and further investigation about other activities of this cytokine and provides grounds for research on obtaining new therapeutic approaches for cancer, viral, autoimmune and allergic disease and designing more effective vaccines.

Key words: Interferon Lambda 1, Cloning, Expression, PCR

*Corresponding author:
Address: Dept of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: ebtekarm@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 14، شماره 4 (شماره پیاپی 57)، مهر و آبان 1390، 78-69

کلونینگ اینترفرون لامبدا-1 (اینترکولین-29) انسانی از سلول های دندریتیک مشتق از مونوسیت و بیان آن در سلول های HEK293T یوکاریوتی

پریسا امیرکلوانق[1]، معصومه ابتکار[1*]، کیهان آزاد منش[2]، کریستینه هارطونیان[3]، مهدی مهدوی[1]

1. گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
2. گروه ویروس شناسی، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
3. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 89/3/5، تاریخ پذیرش: 89/6/31

چکیده

زمینه و هدف: اینترفرون‌های نوع سه دارای سه لیگاند می باشند: IFN-λ1(IL-29)، IFN-λ2(IL-28A) و IFN-λ3(IL-28B) که این سه لیگاند، گیرنده هترودایمر منحصر به فرد یکسانی را بکار می برند که از زنجیره‌های IFN-λ-R1/IL-CRF2-12 (28Ra) و CRF2-4(IL10-R-b) تشکیل یافته است. اینترفرون‌های لامبدا چندین خصوصیت از جمله فعالیت‌های ضد ویروسی، ضد تکثیری، ایمونومدولاتوری و فعالیت ضد توموری در in vivo را نشان می دهند. هدف این مطالعه کلون کردن ژن IFN-λ1 بدست آمده از سلول‌های دندریتیک و بررسی تولید پروتئین آن در حامل بیانی یوکاریوتی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، RNA تام از سلول‌های دندریتیک مشتق شده از مونوسیت تحریک شده با صد ng/ml از LPS استخراج گردید. cDNA از RNA کل سنتز شد. سپس cDNA مربوط به IFN-λ1 با پرایمرهای اختصاصی توسط PCR تکثیر و در داخل حامل PTZ57R/T در اشرشیاکلی سویه DH5α کلون شد. سپس با استفاده از اندونوکلئازهای محدودالاثر KpnI و BamHI به داخل پلاسمید pcDNA3.1+ ساب کلون شد. بعد از انتقال به HEK293T، بیان پروتئین توسط روش ELISA ساندویچی تایید شد.

نتایج: توالی DNA وارد شده مشابه با توالی کد کننده IFN-λ1 موجود در Gene Bank بود. ژن IFN-λ1 در سلول های ترانسفکت شده رونویسی و بیان آن در سلول های HEk293T توسط الیزای ساندویچی تأئید گردید.

نتیجه گیری: کلونینگ و بیان موفق IFN-λ1 می‌تواند نخستین گام برای تولید و تحقیقات بیشتر درباره فعالیت‌های این سایتوکاین و فراهم آوردن زمینه های تحقیقاتی برای کسب روش‌های درمانی جدید برای سرطان، عفونت های ویروسی، بیماری‌های خود ایمنی و آلرژی و طراحی واکسن‌های مؤثرتر بکار رود.

واژگان کلیدی: اینترفرون لامبدا 1، کلونینگ، بیان، PCR

* **نویسنده مسئول**: گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
Email: ebtekarm@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اینترفرون لامبدا-1 (Interferon-λ1- IFN-λ1) انسانی یکی از اعضای خانواده اینترفرون‌های نوع سه یا اینترفرون های لامبدا می باشد که به تازگی کشف شده اند. اینترفرون لامبدا-2 (IFN-λ2) و اینترفرون لامبدا- 3 (IFN-λ3) دو عضو دیگر این خانواده محسوب می شوند. این اینترفرون‌ها به ترتیب اینترکولین 29 (IL-29)، اینترکولین 28 A (IL-28A) و اینترکولین 28 B (IL-28B) نیز نامیده می‌شوند (1). هر سه عضو این خانواده بر روی کروموزوم شماره 19(q13.13) قرار گرفته اند. ساختار ژنومی این اینترفرون‌ها به اینترکولین10 (IL-10) و سایتوکاین‌های مرتبط با IL-10 شباهت دارند و بر خلاف اینترفرون‌های نوع یک که فاقد اینترون می باشند، ژن‌های این خانواده دارای چندین اگزون از جمله 5 اگزون برای IFN-λ1 و 6 اگزون برای IFN-λ2 و IFN-λ3 هستند (2). اما در سطح اسیدآمینه ای، بیشتر به اینترفرون‌های نوع یک شباهت دارند (3). IFN-λ1 با IFN-λ2، 80 درصد و IFN-λ2 با IFN-λ3 حدود 98 درصد هومولوژی دارند (2). ژنIFN-λ1 انسانی، پروتئینی با طول 200 اسید آمینه را کد می کند که پپتید نشانه‌ای به طول 22 اسید آمینه دارد. اینترفرون‌های نوع سه یک گیرنده هترودایمر مشترک دارند که از دو زیر واحد تشکیل شده است. یکی از آنها به نام IFNLR1 می‌باشد که اختصاصی این خانواده است و دیگری IL-10-R-b است که ما بین سایتوکاین‌های IL-10، IL-22 و IL-26 مشترک می باشد (4). آگونیست‌های گیرنده‌های شبه TOLL شماره 3، 4، 7، 8 و 9 (TLR-Toll Like receptor) قادر به القای IFN-λ از سلول‌های دندرتیک پلاسماسیتوئیدی می‌باشند (5). سلول‌های دندریتیک انسانی مشتق از مونوسیت نیز پس از تحریک TLR ها با لیپوپلی ساکارید (Lipopolysaccharide- LPS) یا RNA دو رشته ای قادر به تولید هم‌زمان IFN-β و IFN-λ هستند و تحریک TLR3 با RNA دو رشته ای موجب آغاز تولید آنها از (Peripheral Blood Mononuclear Cells-PBMC) سلول‌های تک هسته ای خون محیطی می گردد (1). مطالعات مولکولی نشان داده است که مکانیسم تولید IFN-λ مشابه با اینترفرون‌های نوع یک می‌باشد (6). اینترفرون‌های نوع سه موجب فعال شدن مسیر JAK/STAT شده و منجر به فسفریله شدن تیروزین STAT1، STAT2، STAT3 و STAT4 می شوند (7، 8).

تحقیقات گسترده بروی عملکرد این سایتوکاین‌ها آغاز شده است و تاکنون اثرات ضد ویروسی، ضد توموری و ایمونومدولاتوری نظیر افزایش بیان مولکول های مجموعه اصلی سازگاری بافتی کلاس I (Major Histocompatibility Complex-MHC) و اثر بروی سلول های دندریتیک گزارش شده است (9-11). در راستای کارهای تحقیقاتی در مورد این خانواده اینترفرونی جدید، هم اکنون آزمایشات بالینی برای درمان هپاتیت C نیز توسط شرکت‌های دارویی بزرگ از جمله زیموژنتیک در حال انجام می باشد و نتایج حاکی از وارد شدن این اینترفرون‌ها به مرحله دوم آزمایشات بالینی می باشد. بنابراین هدف از این مطالعه، کلون کردن cDNA مربوط به IFN-λ1 انسانی ازسلول‌های دندریتیک در حال بلوغ مشتق از مونوسیت‌های خون محیطی جدا شده از یک داوطلب سالم ایرانی و تحریک شده با LPS، و ساخت پلاسمید بیانی نوترکیب یوکاریوتی و تایید بیان این سازه ژنتیکی در سیستم یوکاریوتی برای استفاده در مطالعات تحقیقاتی و همچنین نخستین گام برای ساخت این دارو در میهن عزیزمان می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، انواع توالی های mRNA مربوط به ژن IFN-λ1 انسانی از بانک ژن گرفته شد و در نرم افزار غیر آنلاین (Mega4)، تطبیق چند گانه (Multiple Alignment) صورت گرفت و در نهایت ref mRNA با شماره پذیرش NM-172140.1 انتخاب و پرایمر رفت با

www.SID.ir

Archive of SID

توالی 5´ATG GCT GCA GCT TGG ACC GTG 3´G و پرایمر برگشت با توالی 5´TCA GGT GGA CTC AGG GTG GGT TGA 3´ و با استفاده از نرم افزار غیر آنلاین (Gene runner) طراحی گردید و اختصاصیت آن برای ژن IFN-λ1 انسانی توسط nblast و Primerblast تایید شد.

برای تهیه سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت‌های خون محیطی، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) با استفاده از سانتریفوژ گرادیان با فایکول Lymphosep-Lymphozyte از خون محیطی یک فرد سالم ایرانی جدا گردید. مونوسیت ها توسط CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec,MACS، آلمان) به روش انتخاب مثبت جداسازی و فلوسیتومتری گردید. مابقی سلول‌ها به تعداد یک میلیون سلول در هر میلی لیتر در هر خانه از پلیت های چهار خانه‌ای حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت RPMI1640، 10 FBS درصد، 100 واحد بین المللی پنی سیلین در هر میلی‌لیتر، 100 میلی‌گرم استرپتومایسین در هر میلی‌لیتر و 0/5 میلی مولار L-گلوتامین، سایتوکاین‌های rhGM-CSF (30 نانوگرم در هر میلی لیتر) و rhIL-4 (20 نانوگرم در هر میلی لیتر) (R&D system، آمریکا)، ریخته و به مدت سه روز کشت داده شد. پس از سه روز، نیمی از محیط کشت برداشته شده و دوباره محیط کشت تازه به همراه سایتوکاین‌ها افزوده شد. در روز پنجم، سلول‌ها جهت فلوسیتومتری، با استفاده از PBS حاوی 2 میلی مولار EDTA جمع آوری شدند. به یکی از پلیت ها در روز پنجم LPS (100 نانوگرم در هر میلی لیتر) به عنوان عامل تحریک بلوغ سلول‌های دندریتیک و همچنین القای بیان IFN-λ1 اضافه شد و پس از 3 ساعت انکوباسیون در 37 درجه سانتی گراد و فشار 5 درصد CO2، جهت فلوسیتومتری، جمع آوری شدند. پلیت LPS زده نشده به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. یکی از پلیت های LPS زده شده نیز تا روز هفتم در 37 درجه سانتی گراد و فشار 5 درصد CO2، انکوبه گردید و در روز هفتم جهت فلوسیتومتری جمع آوری شدند.

جهت فلوسیتومتری مونوسیت ها با Anti-h CD14 Phycoerythrin (BD Biosciences، آمریکا)، سلول‌های جمع آوری شده در روزهای پنجم، سه ساعت بعد از تحریک باLPS و نیز روز هفتم با FITC Mouse Anti-Human CD1a (BD Biosciences، آمریکا) و Anti-h CD83 Phycoerythrin (R&D system، آمریکا) طبق روش بیان شده از سوی شرکت، رنگ آمیزی شدند و به همراه ایزوتیپ کنترل‌های مربوطه توسط دستگاه فلوسیتومتری PARTEC در انستیتو پاستور ایران فلوسیتومتری گردید.

برای انجام واکنش RT-PCR، RNAتام سلولی (Total RNA) از سلول‌های روز پنجم که سه ساعت با LPS تحریک شده بودند، توسط واکنش‌گر کیازول (QIAGEN، آلمان) استخراج گردید و برای حذف بقایای DNA ژنومی با آنزیم DNase I تیمار شد و به منظور حذف کامل خود آنزیم DNase I، از کیت RNeasy (QIAGEN، آلمان) استفاده گردید. برای بررسی RNA استخراج شده از لحاظ کیفی، الکتروفورز بر روی ژل آگارز 0/8 درصد انجام شد و غلظت آن با استفاده از دستگاه پیکودراپ مورد سنجش قرار گرفت. از کیت First strand cDNA synthesis (Fermentas،آمریکا) و پرایمر الیگو dT برای سنتز cDNA استفاده شد. صحت سنتز cDNA با استفاده از تکثیر یک ژن House keeping نظیر گلیسرآلدئید فسفات دهیدروژناز(GAPDH) انجام شد. PCR برای تکثیر ژن IFN-λ1 انسانی در حجم 25 میکرولیتر انجام شد. غلظت عوامل PCR شامل 500 نانوگرم از cDNA سنتز شده به عنوان الگو، 10پیکوگرم از هر پرایمر ، 10 میلی مولار از دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات، 0/5 میکرولیتر از DMSO 4 درصد، یک واحد از آنزیم Pfu DNA polymerase (Fermentas، آمریکا) و بافر منیزیم دار PCR با غلظت

www.SID.ir

Archive of SID

X 10 می باشد. محصول PCR روی ژل آگارز 1درصد آغشته به اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و در زیر نور UV باند حدود 600 جفت بازی در کنار نشانگر 100 جفت بازی مشاهده و توسط تیغ استریل از روی ژل بریده شد. با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification (Roche آمریکا) قطعه مورد نظر از ژل جدا شده و تصفیه شد.

کلونینگ ژن IFN-λ1 در پلاسمید بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1+:

در ابتدا از روش T/A-cloning (Fermentas، آمریکا) به منظور تولید پلاسمید نوترکیب IFN-λ1 - pTZ57R/T استفاده شد و برای ترانسفورم کردن، ابتدا باکتری مستعد (Competent) از سویه DH5α باکتری اشرشیاکلی (انستیتو پاستور ایران) به روش کلرید کلسیم تهیه و پلا سمید نوترکیب ساخته شده به درون باکتری مستعد با روش شوک حرارتی ترانسفورم شد و بر روی محیط کشت جامد LB (Luria Bertani) حاوی آنتی بیوتیک آمپی-سیلین کشت داده شد. جداسازی کلون‌های رشدکرده حاوی پلاسمید نوترکیب از کلون‌های رشدکرده که حاوی پلاسمید فاقد ژن بودند، توسط Colony PCR صورت گرفت و یکی از کلون‌هایی که حاوی ژن بود به درون محیط آبگوشت LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین تلقیح شد و به مدت 16 ساعت در انکوباتور شیکردار با200 دور در دقیقه قرار گرفت. پس از تکثیر و استخراج پلاسمید با استفاده از Gene JETTM plasmid miniprep kit Fermentas)، آمریکا)، پلاسمید نوترکیب استخراج شده جهت تعیین توالی ژن وارد شده در آن به شرکت Seqlab (گوتینگن، آلمان) ارسال گردید. به منظور خروج ژن از پلاسمید نوترکیب و داخل نمودن آن به پلاسمید pc DNA 3.1+ با جهت گیری صحیح، هضم پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم های محدودگر KpnI و BamHI صورت گرفت و محصول هضم الکتروفورز شد. باند مربوط به ژن که حدود 600 جفت باز بود، از ژل بریده و تخلیص شد. سپس توسط آنزیم T4 DNA Ligase به پلاسمید pcDNA 3.1+ که از قبل با آنزیم های محدودگر KpnI و BamHI هضم شده بود، وارد شد. محصول تولید شده بار دیگر به باکتری اشرشیا کلی سویه DH5-α ترانسفورم شده و کلونی های حاوی پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1+/IFN-λ1 با colony PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن غربال شدند.

انتقال (Transfection) پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1+/IFN-λ1 به رده سلولی HEK293 T:

به منظور بیان ژن در سیستم یوکاریوتی، پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1+/IFN-λ1 با استفاده از واکنشگر پلی فکت (QIAGEN ،آلمان) به سلول های HEK293T منتقل شد. روش ترانسفکشن به این ترتیب بود که در ابتدا 103×350 سلول در هر خانه از پلیت 6 خانه ای کشت داده شد و در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه گردید. در روز بعد مطابق دستورالعمل واکنشگر، 100 میکروگرم از پلاسمید با 20 میکرولیتر از پلی فکت مخلوط شده و پس از انکوباسیون در دمای اتاق برای 10 دقیقه، به سلول ها اضافه شد و دوباره در 37 درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از 36 و 72 ساعت، سوپ سلولی به جهت بررسی حضور پروتئین IFN-λ1 بیان شده و ترشح شده در محیط کشت، جمع آوری گردید و تا انجام آنالیز های بعدی در فریزر 70- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

بررسی بیان و ترشح IFN-λ1 توسط سلول های HEK293 T ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1+/IFN-λ1 به روش Sandwich ELISA (Capture ELISA):

از کیت تجاری human IFNλ-1 Duoset ELISA (R&D system، آمریکا) برای بررسی بیان IFN-λ1 در سوپ سلولی ترانسفکت شده استفاده شد. تغییرات

www.SID.ir

Archive of SID

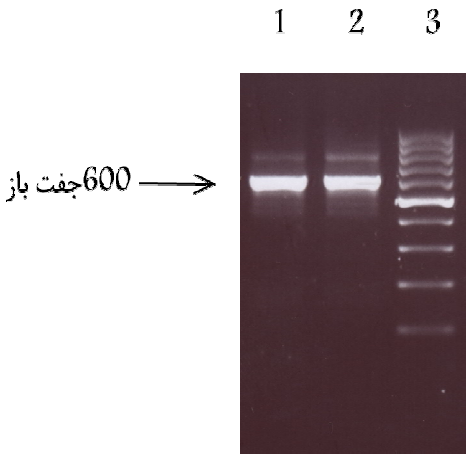
مختصری در دستورالعمل کیت به لحاظ افزایش دقت نتیجه نهایی اعمال شد. پس از اتصال آنتی بادی لایه اول در حفره های پلیت 96 خانه ای و انکوباسیون آن به مدت یک شب، عمل مسدود سازی حفره ها انجام شد.100 میکرولیتر از سوپ سلولی به حفرات مربوطه افزوده شد و به مدت 2 ساعت انکوبه شد. پس از شستشو با بافر شستشو، آنتی بادی شناساگر(detection antibody) کونژوگه با بیوتین به حفرات افزوده شده و 2 ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. استرپتآویدین متصل به آنزیم (Horseradish peroxidase)HRP پس از شستشوی حفرات به آنها اضافه شده و در تاریکی به مدت 20 دقیقه انکوبه شد. در پی شستشو، تترامتیل بنزیدین(TMB) به حفرات اضافه شده و به دور از نور به مدت 20 دقیقه انکوبه شد. واکنش آنزیمی به-وسیله اسیدسولفوریک 2 نرمال متوقف شده و تغییر رنگ سوبسترا در طول موج 450 نانومتر توسط دستگاه ELISA reader قرائت شد.

نتایج

نتایج فلوسیتومتری مونوسیت‌ها با Anti-h CD14 Phycoerythrin، نشان دهنده خلوص بالای 97 درصد بود (نمودار1) و کاهش مارکر CD1a و افزایش مارکر CD83 در روند بلوغ سلول‌های مونوسیت به سلول‌های دندریتیک، نشان دهنده فنوتیپ صحیح سلول‌های دندریتیک در حال تمایز بود (نمودار 2) و همچنین بیانگر منبع ژنی IFN-λ1 از سلول‌های دندریتیک در حال تمایز بود.

اندازه قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با DNA مارکر 100 جفت بازی حدود 600 جفت باز بود (شکل 1) و نتیجه مقایسه انجام شده بین ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسمید pTZ57R/T کلون گردیده بود، با ترادف ارائه شده برای ژن IFN-λ1 انسانی ثبت شده در بانک ژن یکسان بود.

از سوپ رویی سلول‌های HEK293T ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیبpcDNA3.1+/IFN-λ1 درساعت‌های 36 و72، تست الایزا به صورت تکرار سه تایی به همراه سوپ سلول‌های ترانسفکت نشده وسوپ سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA3.1+ انجام شد که نتایج زیر به دست آمد (نمودار 3). جذب در نمونه 36 ساعته 0/031±0/256، نمونه 72 ساعته 0/023±0/542، نمونه پلاسمید خالی 0/012±0/049 و نمونه ترانسفکت نشده 0/013±0/044بود. نتایج نشان داد که در مقایسه با نمونه پلاسمید خالی و نمونه ترانسفکت نشده، نمونه 36 و 72 ساعته تفاوت معنی داری دارند ($p<0/05$).



شکل 1. نتایج PCR، ستون1 و 2: محصول PCR حاوی باند 600 جفت بازی ، ستون3: DNA مارکر (100جفت بازی)

نتایج Sandwich ELISA بر روی پروتئین IFN-λ1 بیان شده نیز نشان دهنده بیان معنی دار IFN-λ1 در سلول-های ترانسفکت شده HEK293T پس از 36 و 72 ساعت از کشت در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت نشده و ترانسفکت شده با وکتور خالی می باشند ($P<0/05$).

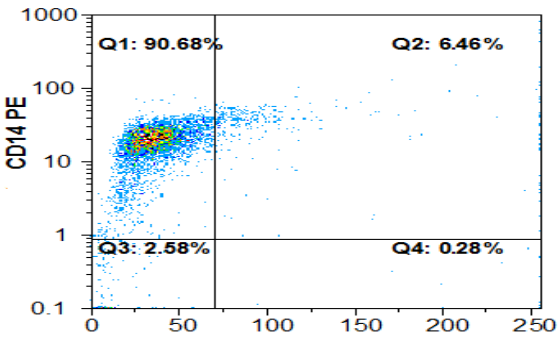
بحث

اینترفرون‌ها از جمله مدیاتورهای دارای اهمیت در سیستم ایمنی محسوب می شوند که در سه دهه اخیر جهت

www.SID.ir

Archive of SID

مصارف دارویی توانسته اند مجوز (Food and Drug Administration) FDA را کسب کنند. از آن جمله می توان از IFN-α2b برای لوسمی سلول های موئی شکل، IFN-β برای مولتیپل اسکلروزیس و IFN-γ برای بیماری گرانولوماتوزیس مزمن و چندین اینترفرون دیگر نام برد (12). هم اکنون در کشور خودمان نیز IFN-α2b (با نام تجاری پگ اینترون) برای درمان هپاتیت‌های C،B و درمان برخی بدخیمی‌ها و همچنین IFN-β1a (با نام تجاری آونکس) برای درمان مولتیپل اسکلروزیس مورد مصرف واقع می شود، اما با وجود کاربردهای وسیع اینترفرون‌ها در درمان بیماری‌ها، اثرات جانبی متعددی گزارش شده است (13).



نمودار1. فلوسیتومتری نقطه‌ای مونوسیت‌های رنگ آمیزی شده با CD14-PE (روز صفر کشت).

با کشف اینترفرون‌های نوع سه و نشان دادن بیان محدودتر گیرنده این اینترفرون‌ها بر روی سلول‌ها، نسبت به اینترفرون‌های نوع یک و دو (14) امیدهای نوینی برای تولید جایگزین‌هایی با عوارض جانبی کمتر پیش روی محققان قرار گرفت و تلاش‌های زیادی برای یافتن فعالیت‌های این سایتوکاین‌های جدید آغاز گردید و نشان داده شد که IFN-λ موجب القای حفاظت ضد ویروسی در سلول‌های HT29، A549 و HaCaT می‌شود (4).

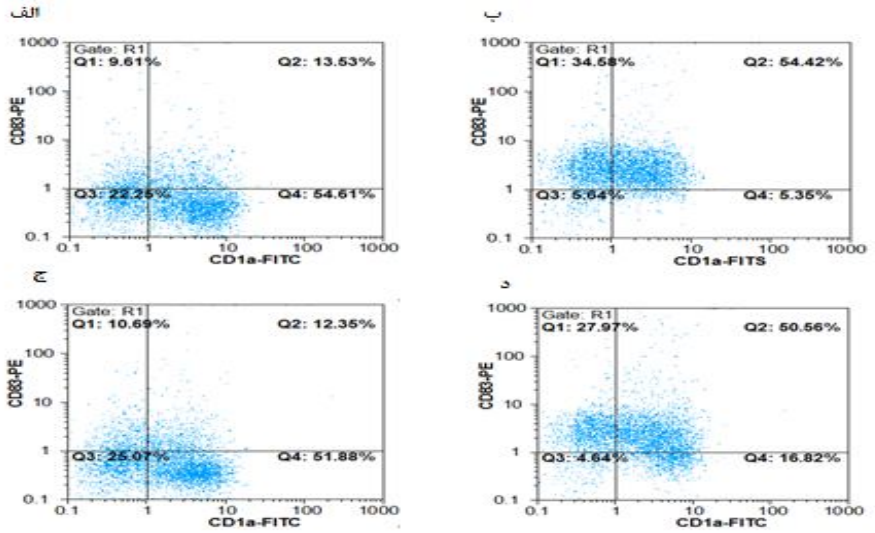
IFN-λ1 و IFN-λ2 قادر به حفاظت سلول‌های HepG2 از اثرات سیتوپاتوژنیک القا شده توسط EMCV می‌باشند (1). IFN-λ خاصیت ضد ویروسی در مقابل IAV (Influenza A virus) از خود نشان می دهد (15). IFN-λ تکثیر ویروس هپاتیت B را در دودمان سلول‌های تمایز یافته کبدی موش بدون نیاز به IFNα/β و یا IFN-γ مهار کرده و همچنین تکثیر ژنومی ویروس هپاتیت C را در رده سلولهای Huh7 کبدی انسان بلوکه می کند (9). علاوه بر خاصیت ضد ویروسی، خاصیت‌های ضدتوموری و ایمنومدولاتوری زیادی نیز برای آنها به اثبات رسیده است، از جمله اینکه بیان IFN-λ در دودمان سلول‌های توموری به طور واضحی تشکیل تومورهای متاستاتیک را در شرایط invitro مهار می‌کند و همچنین در کبد موجب افزایش سلول‌های NK/NKT می گردد (10).

IFN-λ روی رده سلولی گلیوبلاستومای LN319 خاصیت ضد تکثیری وابسته به دوز داشته است (16). در مطالعه گسترده‌ای اثر IFN-λ1 پگیله شده بروی بدخیمی‌هایی نظیر برخی نئوپلازی‌های سلول‌های B، مدل سرطانی ملانـــوما با رده B16.F10، مدل تیموما EG.7 و رده سلولی سرطانی کلیه RENCA مشاهده شد (17).

سلول‌های دندریتیک تیمار شده با IFN-λ در واکنش مختلط لنفوسیتی (Mixed Leukocyte Reaction) MLR، باعث القای تکثیر سلول‌های تنظیمی T CD4+CD25+Foxp3+ می شود، در نتیجه IFN-λ قادر به تولید DC تولوروژنیک می‌باشد (18). IFN-λ فعالیت سلول‌های کمکی T را تغییر می دهد و باعث کاهش IL-13 می شود درحالی که بر میزان IFN-γ تغییر مشخصی ایجاد نمی‌کند و در نتیجه IFN-λ در تعدیل تکامل Th1 و Th2 نقش دارد (19).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار 2. فلوسیتومتری نقطه‌ای سلول‌های دندریتیک رنگ آمیزی شده با CD1a-FITC و CD83-PE در زمان های مختلف. الف: روز پنجم کشت: CD1a=%68/24 وCD83=%23/24، ب: روز هفتم کشت: CD1a=%59/78 وCD83=%89/00، ج: سه ساعت بدون تحریک با LPS در روز پنجم: CD1a=%64/23 وCD83=%23/04 ، د: سه ساعت پس از تحریک با LPS در روز پنجم: CD1a=%67/38 وCD83=%78/53.

پائول شپرد و همکارانش با استفاده از پلیمرهای سنتتیک RNA دو رشته‌ای Poly(I) و Poly(C) توانستند، cDNA های ژن‌های این خانواده را در PBMC ها تحریک کنند و cDNA های ژن‌های این خانواده را کلون کنند (1) و همچنین کوتنکو و همکارانش پس از تکثیر DNA ژنومیک این خانواده و ترانسفکشن آن، توانستند cDNA آنها را از روی mRNA استخراج شده به دست آورند و آنها را در وکتورهای مناسب کلون کنند (4). بنابراین با توجه به فعالیت های متعدد این سایتوکاین‌ها، یافتن روشی مناسب برای کلونینگ و بیان صحیح آنها در میهن عزیزمان با هدف استفاده دارویی در آینده امری ضروری به نظر می رسد و از آنجایی که مطالعات قبلی نشان داده بود که فعالیت ضد توموری و ضد ویروسی IFN-λ1 بیشتر از دیگر اعضای این خانواده می باشد، IFN-λ1 جهت کلونینگ و بیان انتخاب شد (16). به دلیل اینکه ژن IFN-λ1 دارای اینترون می باشد، از mRNA جهت کلونینگ استفاده گردید. یکی از القاگرهای مناسب mRNA IFN-λ1 در سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت، LPS می باشد (15). لازم به ذکر است که بیشترین میزان القای mRNA مربوط به این ژن 3 ساعت بعد از تحریک با LPS در روز پنجم فرایند تولید سلول‌های دندریتیک می باشد که از لحاظ تکنیکی حائز اهمیت می باشد (15). با توجه به این مطلب که درصد نوکلئوتیدهای گوانین و سیتوزین این ژن حدود 63 درصد می باشد، جهت تکثیر مناسب cDNA در واکنش PCR از بافرهای مخصوص حاوی DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 4 درصد استفاده شد. بررسی‌های درصد این نوکلئوتیدها در اعضای دیگر این خانواده دلالت بر غنی بودن آنها داشت بنابراین پیشنهاد می شود جهت تکثیر هر یک از اعضای این خانواده از بافرهای مخصوص استفاده گردد. روش‌های به کار رفته در این تحقیق منجر به کلونینگ و بیان پروتئینی صحیح IFN-λ1 به میزان قابل قبول گردید و مقایسه توالی آن با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی ژنومی حاکی از شباهت کامل بود. واکنش مناسب با آنتی بادی‌های اختصاصی IFN-λ1 در تست الیزا، تا حدودی نشان دهنده صحت توالی اسیدهای آمینه آن

www.SID.ir

Archive of SID

بود. ما معتقد هستیم که روش‌های مشابه با آنچه در این تحقیق بکار رفته ممکن است برای تولید اعضای دیگر این خانواده مفید باشد. در خصوص کارایی این مولکول مطالعات تکمیلی در دست اقدام است.

نتیجه گیری

محصول نهایی این مطالعه چه به صورت وکتور بیانی حامل ژن IFN-λ1 و چه به صورت پروتئین می تواند در کارهای تحقیقاتی و روش‌های درمانی بعدی نظیر عفونت‌های ویروسی، تومورها و یا به عنوان ایمنومدولاتور مورد استفاده قرار گیرد و همچنین این وکتور توانایی بیان در سیستم پروکاریوتی را به منظور بدست آوردن میزان بالایی از پروتئین دارا می باشد.

تشکر و قدردانی

این گزارش حاصل پایان نامه دوره کارشناسی ارشد ایمنی شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و طرح تحقیقاتی شماره 442 مصوب انستیتو پاستور ایران می باشد که بدین وسیله از زحمات همه همکاران محترم آن انستیتو و شورای محترم پژوهشی تشکر و قدردانی می نماییم

منابع

1.Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, E.Whitmore T, et al. IL-28 IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. Nature Immunology 2003;4(1):63-68

2.Lasfar A, Lewis-Antes A, Smirnov SV, Anantha S, Abushahba W, Tian B, et al . Characterization of the Mouse IFN-L Ligand-Receptor System: IFN-Ls Exhibit Antitumor Activity against B16 Melanoma. Cancer Res 2006; 66(8):4468-77.

3.Uze G, Monneron D. IL-28 and IL-29: Newcomers to the interferon family. Biochimie 2007; 89:729-34.

4.Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN-λs mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. Nature Immunology 2003;4(1):60-77.

5.Yang K, Puel A, Zhang S, Eidenschenk C, Ku C-L, Casrouge A, et al. Human TLR-7-,-8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. Immunity 2005; 23:465-78.

6.Levy DE, Marie I, Prakash A. Ringing the interferon alarm: differential regulation of gene expression at the interface between innate and adaptive immunity. Curr Opin Immunol 2003; 15: 52-8.

7.Dumoutier L, Lejeune D, Hor S, Fickenscher H, Renauld JC. Cloning of a new type II cytokine receptor activating signal transducer and activator of transcription (STAT)1, STAT2 and STAT3. Biochem J 2003; 370: 391-6.

8.Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, Sommereyns C, Kotenko SV, Renauld JC. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. J Biol Chem 2004; 279:32269-74.

9.Robek MD, Boyd BS, Chisari FV. Lambda Interferon Inhibits Hepatitis B and C Virus Replication. J virol 2005; 79(6):3851-4.

10.Sato A, Ohtsuki M, Hata M, Kobayashi E, Murakami2 T. Antitumor Activity of IFN-_λ in Murine Tumor Models1.J Immunol 2006; 176: 7686-94.

11.Jordan W, Eskdale J, Boniotto M, Rodia M, Kellner D, Gallagher G. Modulation of the human cytokine response by interferon lambda-1 (IFN-l1/IL-29). Genes and Immunity 2007; 8:13-20.

12.Wishart D. DrugBank database. [cited 2010 June 11]. Available from: http://www.drugbank.ca/drugs.htm

13.Dusheiko G. Side Effects of Alpha Interferon in Chronic Hepatitis C. Hepatology 1997; (1) 26:112-21.

www.SID.ir

Archive of SID

14..Kotenko SV, Donnelly RP, (Ed) AM. Type III interferons: The interferon lambda family. The Interferons, Wiley-VCH, Weinheim 2006:141-63.

15.Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. Eur J Immunol 2004; 34:796-805.

16.Meager A, Visvalingam K, Dilger P, Bryan D, Wadhwa M. Biological activity of nterleukins-28 and -29: Comparison with type I interferons Cytokine Growth Factor Rev 2005;31:109-18.

17.Doyle, Inventor Use of IL-28 and IL-29 to treat cancer and autoimmune disease patent US7, 351,689 B2. 2008

18.Mennechet JDF, Uze G.Interferon-Lambda-treated dendritic cells specifically induce proliferation of FOXP3-expressing suppressor T cells. Blood 2006 107 (11): 4417-23.

19.Jordan W, Eskdale J, Srinivas S, Pekarek V, Kelner D, Rodia M, et al. Human interferon lambda-1 (IFN-l1/IL-29) modulates the Th1/Th2 response. Genes and Immunity 2007; 8:254-61

.

www.SID.ir