مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال دهم ● شماره ۱ ● صفحات ۱ تا ۹ ● بهار ۱۳۹۱

بررسی توانایی پروتئین نوترکیب core+1 ویروس هپاتیت C برای القای پاسخ‌های ایمنی در ترکیب با ادجوانت‌های مختلف

*فهیمه باغبانی آرانی[۱]، فرزین روحوند[۲]، محمد رضا آقا صادقی[۳]، سید مهدی سادات[۳]، فاطمه متولی[۴]، آرش معمار نژادیان[۳]، صفیه امینی[۳]

تاریخ اعلام وصول: ۹۰/۸/۲ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۹۰/۱۰/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: ژنوم ویروس هپاتیت C در بر گیرنده یک قاب خواندن طویل و کد کننده نوعی پلی پروتئین است که در نهایت این پلی پروتئین برش خورده و به ۱۰ پروتئین ویروسی تبدیل می‌شود. مطالعات اخیر نوعی پروتئین جدید با نام core+۱ را گزارش کردند که با یک شیفت ریبوزومی ۱+ در داخل سکانس مولد پروتئین کپسید ویروس (core)، ساخته می‌شود. ویژگی‌هایی مانند تخریب سیستم ایمنی، مهار آپاپتوز و حضور آنتی بادی ضد core+۱ در بیماران کبدی نشان دهنده نقش این پروتئین در پاتوژنز HCV و توانایی به کارگیری این پروتئین در توسعه واکسن علیه HCV است. بدین منظور پروتئین core+۱ در *E.coli* تولید و سپس ویژگی‌های ایمونولوژیکی آن بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: توالی نوکلئوتیدی مربوط به core+۱ با روش PCR تکثیر و در وکتور PET ۲۴-a به منظور بیان پروتئین نوترکیب در باکتری *E.coli* کلون گردید. پروتئین بیان شده در شرایط دناتوره کننده تخلیص شده و سپس با روش SDS-PAGE و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. ایمنی زایی core+۱ در ترکیب با ادجوانت‌های فروند (C/IFA)، مانتانید ISA ۲۰۶ و IMS ۱۳۱۲، پلورونیک اسید (F۱۲۷) و imiquimod (IMIQ) در موش‌های Balb/c ارزیابی شده و با روش الایزا، پاسخ ایمنی هومورال بررسی گردید. این مطالعه برگرفته از پایان نامه دانشجویی می‌باشد.

یافته‌ها: پروتئین core+۱ به میزان ۵mg/l تولید و سپس آنتی ژنیسیته این پروتئین با وسترن بلات تائید گردید. همه فرمولاسیون‌های ادجوانتی به طور معنی‌داری پاسخ آنتی بادی علیه core+۱ را در موش‌های ایمن شده نشان داده و C/IFA و ISA۲۰۶ بالاترین تیتر آنتی بادی را داشتند. گروه‌های ISA ۲۰۶ و IMS ۱۳۱۲ هر دو پاسخ Th۱/Th۲ را نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که core+۱ در ترکیب با ادجوانت‌های مختلف می‌تواند پروفایل متفاوتی از پاسخ‌های ایمنی (Th۱/Th۲) را ایجاد کند. بنابراین این پروتئین می‌تواند به عنوان ترکیبی از واکسن HCV مدنظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: core+۱، هپاتیت C، ادجوانت، بیان، Balb/c

مقدمه

ویروس هپاتیتC (HCV) به عنوان یک عامل مهم هپاتیت ویروسی مزمن با فراوانی حدود ۴ برابر HIV (۱)، حدود ۱۳۰ میلیون نفر را در سراسر دنیا آلوده ساخته است (۲) که از بین این افراد حدود ۵۰-۵۸٪ به هپاتیت مزمن دچار می‌شوند و پس از چند دهه به عوارضی چون سیروز و کارسینوم هپاتوسلولار مبتلا می‌گردند (۳).

۱- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی (*نویسنده مسئول)
تلفن: ۰۹۱۲۶۰۲۲۷۸۶ آدرس الکترونیک: fbarani58@yahoo.com
۲- استادیار، ایران، تهران، گروه هپاتیت و ایدز و بانک ژن نوترکیب ایران، انستیتو پاستور ایران
۳- استادیار، ایران، تهران، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران
۴- پژوهشگر، ایران، تهران، گروه هپاتیت و ایدز و بانک ژن نوترکیب ایران، انستیتو پاستور ایران

www.SID.ir

بر خلاف شمار زیاد افراد مبتلا، هنوز هیچ گونه واکسن مؤثری علیه HCV وجود نداشته و مؤثرترین درمان ضدویروسی موجود (ترکیبی ازINF-γ و ریباویرین) تنها درکمتر از ۵۰ درصد بیماران مؤثر می‌باشد (۴). قابلیت بالای جهش زایی و در نتیجه تغییرات آنتی‌ژنی این ویروس معضل بزرگی جهت درمان و طراحی واکسن برای چنین ویروسی است. این در حالی است که یافته‌های موجود نشان می‌دهند که ایجاد یک پاسخ ایمنی سریع و قوی توسط Th۱ و Th۲ به همراه پاسخ‌های ایمنی سلولی نسبت به پروتئین‌های HCV، باعث کاهش و محدودیت تکثیر ویروس تا پاک‌سازی نهایی آن از بدن میزبان آلوده شده می‌شود. (۵–۶). ویروس هپاتیت C با یک ژنوم RNA تک رشته‌ای مثبت، پلی پروتئینی حاوی ۳۰۰۰ اسید آمینه را تولید می‌کند که این پلی‌پروتئین پس از هضم با پروتئازها ده پروتئین بالغ را ایجاد می‌کند (۷). آنالیزهای بیوانفورماتیک پیشنهاد می‌کند که HCV دارای یک قاب خواندن متناوب (ARF) است که با سکانس پروتئین core در frame۱+ هم پوشانی دارد (۸) و شواهد متعددی نیز بیان ORF ۱+core را در طی عفونت HCV تائید می‌کند (۹، ۱۰). اگر چه نقش این پروتئین جدید (که با نام‌های ۱+core و پروتئین F شناخته می‌شود) در پاتوژنز HCV به خوبی شناخته نشده، اما شواهد زیادی بیانگر وجود پاسخ‌های ایمنی هومورال (۱۰–۱۷) و سلولار (۱۶، ۱۸) بر علیه پروتئین ۱+core در بیماران HCV می‌باشد. این نتایج علاوه بر این‌که مؤید بیان این پروتئین در طی پاتوژنز HCV است، نشان دهنده قدرت ایمنی زایی و القا پاسخ ایمنی در بیماران است. ژن ۱+core در بین ساب تایپ‌های مختلف HCV حفاظت شده می‌باشد (۱۹)، بنابراین اپیتوپ‌های موجود در این ژن کمتر در معرض جهش‌های فراری قرار می‌گیرند. در نتیجه ۱+core می‌تواند به عنوان یک آنتی‌ژن مهم به منظور القاپاسخ‌های ایمنی در واکسن HCV در نظر گرفته شود. از طرفی تولید آنتی‌بادی مونوکلونال در مقابل پروتئین ۱+coreنیز یکی از اهداف مهم در مطالعات ایمونولوژیکی این پروتئین می‌باشد. به ویژه که وجود واکنش متقاطع آنتی‌بادی‌های ضد ۱+core در بین ساب تایپ‌های متفاوت HCV (۱۶، ۱۸، ۲۰) استفاده از یک آنتی‌بادی مونوکلونال را در مورد تمامی ژنوتایپ‌های HCV امکان پذیر می‌کند.

یکی از چالش‌های بزرگ در تولید آنتی‌بادی مونوکلونال و تکنولوژی واکسن با استفاده از آنتی‌ژن‌های نوترکیب، توسعه یک ادجوانت ایمن و مؤثر است که بتواند پاسخ ایمنی در مقابل آنتی‌ژن را افزایش دهد. علاوه بر آن اغلب لازم است که ترکیب آنتی‌ژن – ادجوانت بتوانند به طور اختصاصی پاسخ ایمنی جهت داری (به‌طور مثال پاسخ هومورال در مقابل سلولار) را ایجاد کنند. که در این موارد باید تاثیر ترکیب هر آنتی‌ژنی با ادجوانت‌های مختلف در ایجاد پاسخ‌های ایمنی Th۱/Th۲ را ارزیابی گردد. مانتانیدها گروهی از ادجوانت‌های جدید هستند که با عرضه مؤثر آنتی‌ژن به سلول‌های ایمنی عمل می‌کنند. برخی از گروه‌های مانتانیدها مانند ISA۲۰۶ و IMS ۱۳۱۲ در مدل‌های حیوانی استفاده شده و اثرهای مثبت آن‌ها در برخی از واکسن‌های مورد استفاده در دامپزشکی نشان داده شده است (۲۱، ۲۳). ادجوانت‌های فروند نیز به طور مؤثری پاسخ‌های B و T cell را ایجاد می‌کنند (۲۴). هر چند این ترکیب‌ها انواع اثرهای جانبی ناخواسته را ایجاد می‌کنند، اما به عنوان یک ادجوانت استاندارد به طور وسیعی استفاده می‌شوند. Pluronic F۱۲۷ (F۱۲۷) نوعی ترکیب سازگار با انسان است که به‌طور وسیعی در صنعت داروسازی استفاده می‌شود (۲۵). از قبل نیز استفاده آن به عنوان یک نوع ادجوانت جهت افزایش پاسخ ایمنی نشان داده شده است (۲۶). Imiquimod ادجوانت پیشنهادی دیگری است که در حال حاضر برای درمان موضعی زگیل استفاده می‌گردد. این مولکول از طریق میانکنش با toll-like receptors (TLRs) روی پاسخ ایمنی تاثیر می‌گذارد (۲۷–۳۱) و تولید سایتوکاین‌های مرتبط با پاسخ Th۱ را القا و پاسخ‌های IgG۲a را افزایش می‌دهد (۲۷–۲۸، ۳۰). نشان داده شده که Imiquimod در یک فرمولاسیون واکسن زمانی که همراه با آنتی‌ژن تجوبز می‌شود قادر است پاسخ‌های ایمنی را افزایش دهد (۲۷–۳۲).

در مطالعه حاضر، ضمن معرفی یک سیستم بیان و تخلیص موثر برای حداکثر خلوص، بررسی دقیقی بر اثر ادجوانت‌های جدید در میزان ایمنی زایی این پروتئین انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

تولید پروتئین ۱+core نوترکیب

در این مطالعه از سازه ژنی $pIVEX_{۲/۳}$-HCV_{CP} که در بر دارنده توالی ژن core ویروس هپاتیت C (ژنوتایپ ۱b) می‌باشد به عنوان الگوی PCR جهت سنتز و تکثیر ژن ۱+coreاستفاده شد. به منظور تغییر چهار

Archive of SID
www.SID.ir

چوب خواندن و سنتز ۱+core از روی ژن core، طراحی پرایمرها به نحوی صورت پذیرفت که از نوکلئوتید شماره ۳۰ ژن core به بعد چارچوب خواندن به صورت ۱+ تغییر می‌کند. به عبارتی در این مطالعه ژن پروتئین ۱+core با طول ۱۵۰ اسید آمینه (اسیدآمینه ۱۱-۱۶۱) تکثیر گردید. محصول PCR حاصل از تکثیر ژن ۱+core در سایت برشی *Bam*HI و *Xho*I در وکتور بیانی pET-۲۴a کلون گردید (شکل ۱ A). پس از تائید سازه ژنی با روش هضم آنزیمی و تعیین توالی، سازه نوترکیب به منظور آنالیز بیان پروتئین به باکتری *E.coli* BL۲۱ (DE۳) ترانسفورم گردید. باکتری‌های ترانسفورم شده پس از رشد در محیط LB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین و رسیدن به جذب نوری ۰/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، با IPTG القا گردید و سه ساعت پس از القا بیان باکتری با روش SDS-PAGE بررسی گردید. پس از تائید بیان، پروتئین ۱+core نوترکیب با روش وسترن بلات در آزمایش‌های جداگانه‌ای با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد دنباله هیستیدینی، آنتی‌بادی پلی کلونال موشی ضد یکی از اپیتوپ‌های پروتئین ۱+core و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد پروتئین core تائید گردید.

به منظور ایمن سازی موش‌ها، پروتئین بیان شده به روش افینیتی کروماتوگرافی و با استفاده از ستون NI-NTA-Agarose (Qiagen) (نیکل- نیتریلوتری استیک اسید) و در شرایط دناتوره در اوره تخلیص گردید و در نهایت با استفاده از روش دیالیز در بافر refolding، اوره حذف گردید. درنهایت پس از دو بار تخلیص پروتئین با استفاده از اولترافیلتراسیون و از طریق تغلیظ کننده (VIVa Spin Viva Science-Germany)، پروتئین حاصله تغلیظ گردید. درجه خلوص، انسجام و وزن مولکولی دقیق پروتئین نوترکیب ۱+core توسط SELDI-TOF اسپکتروفتومتری جرمی با استفاده از NPI Chip Array با توجه به پروتکل شرکت سازنده، مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها توسط Protein Chip software نسخه (Chifehergen Biosystem) ۳,۲,۱ آنالیز شد و در نهایت بخش پروتئینی با خلوص بالای ۸۵٪ برای ایمنی سازی مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین سطح اندوتوکسین از تست Chromogen QCL-۱۰۰۰ استفاده شد.

فرمولاسیون آنتی‌ژن و ادجوانت‌ها

در این مطالعه ادجوانت‌های زیر مورد استفاده قرار گرفتند؛

Montanide ISA 206 (Seppic, France)

Montanide IMS 1312 (Seppic, France)

Freund adjuvants (C/IFA) (Sigma, USA)

Pluronic F127 (Sigma, USA)

Imiquimod (Aldrara.3M)

در تمامی تزریق‌ها دوز آنتی‌ژن ۱+core، ۲۵ میکروگرم برای هر موش بود و امولسیون ادجوانت و آنتی‌ژن طبق دستورالعمل شرکت سازنده ادجوانت تهیه گردید. به طوری که ادجوانت‌های مانتانید و فروند با نسبت حجمی ۵۰/۵۰ با آنتی‌ژن مخلوط گردیدند. سپس مخلوط حاصله کاملا مخلوط شده تا یک امولسیون شیری رنگ و پایدار به دست آمد. برای Pluronic F۱۲۷ ابتدا یک استوک ۱۶٪ (w/w) در PBS در روی یخ تهیه و سپس با آنتی‌ژن با نسبت حجمی ۵۰/۵۰ مخلوط گردید تا در آخر ادجوانت به صورت محلول ۸٪ تزریق گردید. Imiquimod به صورت کرم‌های ۵٪ در بسته‌های ۱۲/۵ میلی گرمی در دسترس قرار می‌گیرد که برای هر موش یک دهم یک بسته، یعنی حدود ۱/۲۵ میلی گرم Imiquimod استفاده شد. این ادجوانت بلافاصله پس از تزریق آنتی‌ژن، به محل تزریق به مدت یک دقیقه مالیده می‌شود تا جذب پوست گردد.

ایمن‌سازی موش‌ها

۴۲ سر موش ماده Balb/c شش تا هشت هفته‌ای از بخش حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه پاستور کرج تهیه شد و در تمامی مراحل، کارهای انجام شده بر روی حیوانات فوق مطابق با قوانین توصیه شده کار با حیوانات آزمایشگاهی بود. موش‌ها به طور تصادفی در ۷ گروه تقسیم شدند به طوری که در هر گروه ۶ عدد موش قرار داده شد. در ۵ گروه آنتی‌ژن به همرا ادجوانت تزریق شد. یک گروه آنتی‌ژن را به تنهایی و بدون ادجوانت دریافت کردند و به یک گروه نیز تنها PBS تزریق گردید. به منظور انجام این مطالعه به موش‌ها سه بار به فاصله سه هفته، آنتی‌ژن به همراه ادجوانت مربوطه در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر به‌صورت زیر پوستی به قاعده دم، تزریق گردید. سه هفته پس از آخرین تزریق از سینوس چشم موش‌ها خونگیری شده و سرم آنها جداسازی شد و در ۷۰- درجه نگهداری شد تا بعد جهت آنالیز آنتی‌بادی‌ها استفاده گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی پاسخ‌های توتال آنتی‌بادی علیه پروتئین core+۱

پاسخ آنتی‌بادی موش‌های ایمن شده با core+۱ به‌وسیله الایزا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به طور خلاصه پروتئین تخلیص شده به میزان ۱ µg/ml به عنوان مولکول پوشاننده در کف پلیت‌های الیزا ۹۶ خانه‌ای (Nunc Denmark) مورد استفاده قرار گرفت. بعد از شستشو و مراحل بلوکه کردن، چاهک‌ها با سرم‌های موشی که به صورت سریالی رقیق شده بودند، پر شده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °c انکوبه شدند. بعد از شستشو، آنتی‌بادی ثانویه Goat Anti Mouse IgG-HRP اضافه و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انکوبه شد. در آخر با اضافه نمودن TMB (Tetrametyhl Benzidine, Sigma) و پس از افزودن محلول متوقف کننده در طول موج ۴۵۰nm جذب نوری چاهک‌ها قرائت شد. تمامی آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام پذیرفت.

بررسی ایزوتایپ آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین core+۱

برای تعیین ایزوتایپ‌ها و ساب کلاس‌های IgG نیز از روش الایزا استفاده گردید. در این مرحله از آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG_1 و IgG_{2a} موشی و در نهایت Anti Goat IgG-HRP برای تعیین ساب کلاس آنتی‌بادی‌ها گردید. در تمامی آزمایش‌ها میزان cut-off به مقدار دو برابر میانگین جذب کنترل منفی (سرم موشهای ایمن نشده) در نظر گرفته شد و هر نمونه سه بار مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی آماری

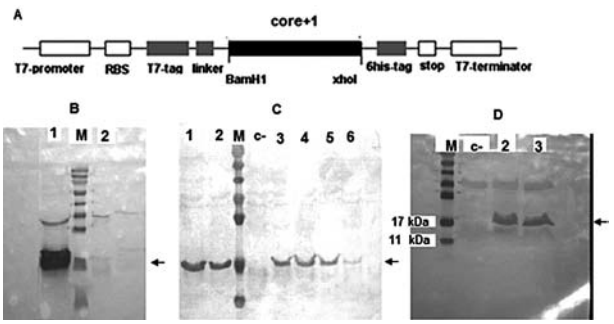
تفاوت‌های معنی‌دار آماری در مورد تیتر آنتی‌بادی اختصاصی و ایزوتایپ آنتی‌بادی‌های تولید شده در گروه‌های مختلف موشی، بوسیله آزمون‌های غیر پارامتریک Mann–Whitney (در مورد مقایسه دو گروه) و یا Kruskal–Wallis (در مورد مقایسه بیشتر از دو گروه) بررسی و ارزیابی شد. در تمامی آزمایش‌های $P< ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

خصوصیات پروتئین core+۱ بیان شده در *E.coli*

پس از تکثیر ژن core+۱، وارد کردن آن در وکتور pET۲۴a، با موفقیت انجام شده و صحت سازه ژنی با روش تعیین توالی و هضم آنزیمی تائید شد. آنالیز بیان نشان داد که این پروتئین در میزبان *E.coli* BL۲۱ (DE۳) به خوبی بیان می‌گردد. پس از تخلیص موفق core+۱، با استفاده از آنالیز دانسیتومتری (Lab work software,UK) باند ۱۸/۳ کیلودالتونی بر روی ژل SDS-PAGE با درجه خلوص ۸۵٪ مشاهده می‌گردد. در نهایت میزان پروتئین به دست آمده حدود ۵ mg در یک لیتر از محیط کشت باکتری بود. بررسی وسترن بلات با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد دنباله هیستیدینی و آنتی‌بادی پلی کلونال موشی ضد یکی از اپیتوپ‌های core+۱، صحت پروتئین و دارا بودن ویژگی آنتی‌ژنیسیته core+۱ را تائید می‌کند. همچنین وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد پروتئین core، بر روی core+۱ و نیز پروتئین core تخلیص شده که در مطالعه قبلی ما تولید شده بود (۳۳) نشان داد که این آنتی‌بادی با core واکنش می‌دهد در حالی که core+۱ را نمی‌شناسد (شکل ۱ B و C و D).

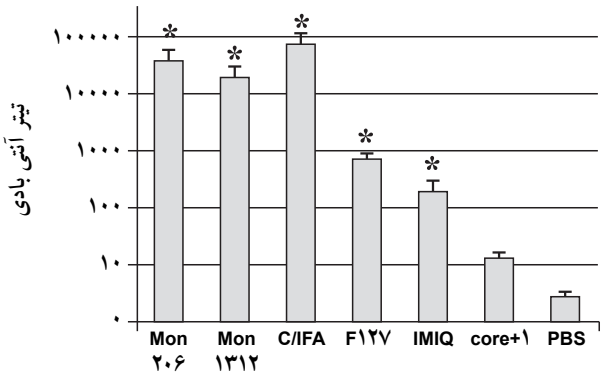
پاسخ آنتی‌بادی علیه core+۱ در فرمولاسیون ادجوانتی مختلف سه هفته پس از آخرین مرحله ایمن‌سازی، تیتر آنتی‌بادی توتال بر علیه core+۱ در موش‌های ایمن شده با این پروتئین به همراه ادجوانت‌های مختلف و همچنین گروه‌های کنترل منفی، با روش الایزا انجام پذیرفت. همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است همه گروه‌های ادجوانتی مورد مطالعه پاسخ anti-IgG core+۱ را در مقایسه با گروه کنترل (PBS) به طور معنی‌داری افزایش داده‌اند ($P=۰/۰۰۱$).



شکل ۱- کلونینگ و بیان core+۱

A: تصویر شماتیک وکتور بیانی pET۲۴a شامل ژن core+۱. B: بررسی پروتئین core+۱ با وسترن بلات به‌وسیله آنتی بادی مونوکلونال آنتی core. چاهک ۱ پروتئین core تخلیص شده و چاهک ۲ پروتئین core+۱ تخلیص شده. C: بررسی پروتئین core+۱ با وسترن بلات بوسیله آنتی بادی مونوکلونال آنتی his-tag۶. چاهک ۱-۶ نشان‌دهنده پروتئین core+۱ از کلونی‌های مختلف باکتری که core+۱ را بیان کرده‌اند. D: بررسی پروتئین core+۱ با وسترن بلات به‌وسیله سرم موشی که از قبل توسط یکی از پپتیدهای اپیتوپی core+۱ ایمن شده است. چاهک ۲، ۳ پروتئین core+۱، c- کنترل منفی (پلاسمید بدون ژن core+۱) و M مارکر پروتئینی

Archive of SID
www.SID.ir

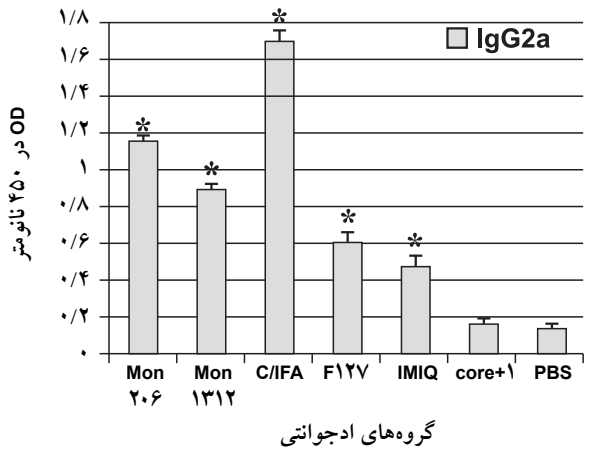


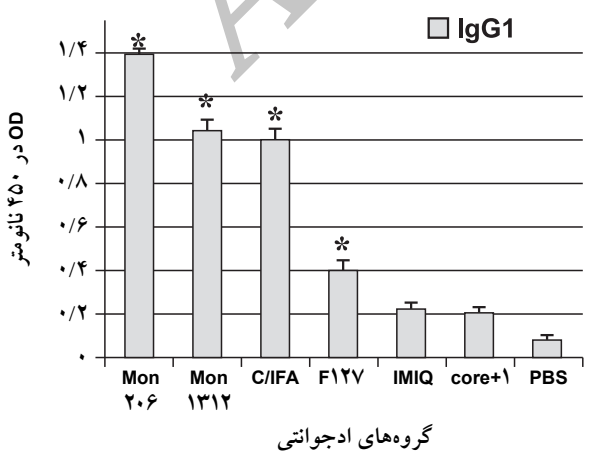
شکل ۲- آنالیز پاسخ آنتی بادی توتال در موش‌های Balb/c تزریق شده با پروتئین core+۱ نوترکیب در فرمولاسیون ادجوانتی مختلف با استفاده از روش الایزا. نتایج به صورت میانگین تیتر آنتی بادی (log۱۰) در هر گروه (شامل ۶ موش) ± خطای استاندارد، نشان داده شده است.
***تفاوت معنی‌دار پاسخ هومورال در هر گروه نسبت به گروه کنترل منفی (PBS) را نشان می‌دهد. شکل ۳ ایزوتایپ آنتی بادی‌های سرمی در موش‌های ایمن شده با core+۱ در فرمولاسیون‌های مختلف ادجوانتی، توسط روش الایزا و با استفاده از آنتی سرم‌های ویژه ساب کلاس تعیین گردید. نتایج به صورت میانگین میزان جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر ± خطای استاندارد، نشان داده شده است.**
***تفاوت معنی‌دار ایزوتایپ‌ها در هر گروه نسبت به گروه کنترل منفی را نشان می‌دهد.**

سطح آنتی‌بادی‌های anti- IgG core+۱ به طور مشخصی در گروه‌های ادجوانت‌های مانتانید و C/IFA نسبت به بقیه گروه‌ها بالاتر بود، در حالی که پاسخ هومورال ضعیفی در دو گروه F۱۲V و Imiquimod مشاهده گردید. به عبارتی پروتئین core+۱ همراه ادجوانت‌های C/IFA و مانتانید ISA۲۰۶ ایمونوژنیسیته بسیار بالایی دارد. Imiquimod و F۱۲V نیز ادجوانت به نسبت ضعیفی در القا پاسخ هومورال بر علیه core+۱ می‌باشد. پاسخ گروه مانتانید IMS ۱۳۱۲ نیز اگر چه کمتر از ادجوانت فروند C/IFA و مانتانید ISA۲۰۶ است، اما قابل توجه می‌باشد.

ایزوتایپ آنتی‌بادی‌های علیه پروتئین core+۱ در فرمولاسیون ادجوانتی مختلف

همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده است ادجوانت‌های مختلف در ترکیب با پروتئین core+۱، ایزوتایپ‌های متفاوتی از آنتی‌بادی‌های ضد core+۱ را در موش‌های ایمن شده ایجاد می‌کنند. همه گروه‌های ادجوانتی پاسخ آنتی‌بادی IgG۱ بالاتر از گروه کنترل منفی داشتند در حالی که گروه Imiquimod تفاوت معنی‌داری را نسبت به کنترل منفی نشان نمی‌دهد (P= ۰/۷). همچنین تولید آنتی‌بادی‌ها با ایزوتایپ IgG۲a در همه گروه‌ها دیده می‌شود، اما بالاترین میزان IgG۲a در گروه C/IFA مشاهده می‌گردد. در گروه‌های C/IFA، F۱۲V و Imiquimod نسبت آنتی‌بادی‌های IgG۱/IgG۲a کمتر از یک بود که نشان می‌دهد در این گروه‌ها جهت‌گیری پاسخ‌های ایمنی به سمت پاسخ Th۱ می‌باشد. از طرف دیگر در گروه‌های ادجوانتی مانتانید ISA۲۰۶ و IMS۱۳۱۲ ایزوتایپ IgG۱ غالب می‌باشد اما هم چنان پاسخ IgG۲a هم مشاهده می‌گردد که نشان می‌دهد مخلوطی از پاسخ‌های Th۱ و Th۲ توسط این دو ادجوانت در موش‌های ایمن شده ایجاد می‌گردند.





شکل ۳- ایزوتایپ آنتی بادی‌های سرمی در موش‌های ایمن شده با core+۱ در فرمولاسیون‌های مختلف ادجوانتی، توسط روش الایزا و با استفاده از آنتی سرم‌های ویژه ساب کلاس تعیین گردید. نتایج به صورت میانگین میزان جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر ± خطای استاندارد، نشان داده شده است.
***تفاوت معنی‌دار ایزوتایپ‌ها در هر گروه نسبت به گروه کنترل منفی را نشان می‌دهد.**

Archive of SID
www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

core+۱ یا پروتئین F، نوعی پروتئین جدید و حفاظت شده ویروس هپاتیت C می‌باشد که توالی کد کننده آن با توالی پروتئین core این ویروس هم پوشانی دارد. بنابراین توسعه و تولید آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی که بتواند core+۱ را از پروتئین core متمایز کند، به منظور استفاده در تشخیص و تحقیق‌ها حائز اهمیت می‌باشد. چندین مطالعه نشان داده‌اند که آنتی‌بادی‌های ضد core+۱ در برخی افراد مبتلا به هپاتیت C وجود دارد (۸–۹، ۲۰، ۳۴). همچنین پاسخ ایمنی سلولی برعلیه این پروتئین نیز در بیماران گزارش شده است (۱۸). بنابراین این پروتئین می‌تواند به عنوان یک کاندید واکسن برای HCV مد نظر قرار گیرد.

یک چالش بزرگ در تولید آنتی‌بادی مونوکلونال و تکنولوژی واکسن با استفاده از آنتی‌ژن‌های نوترکیب، توسعه یک ادجوانت ایمن و مؤثر است که بتواند پاسخ ایمنی در مقابل آنتی‌ژن را افزایش دهد. علاوه بر آن اغلب لازم است که ترکیب آنتی‌ژن – ادجوانت بتوانند به طور اختصاصی پاسخ ایمنی جهت داری (مثلا پاسخ هومورال در مقابل سلولار) ایجاد کنند. بنابراین برای دستیابی به یک پاسخ ایمنی دلخواه و با توجه به عدم وجود یک ادجوانت عمومی ثابت، لازم است اثرهای ترکیب هر آنتی‌ژن با ادجوانت‌های مختلف در ایجاد پاسخ‌های ایمنی Th۱/Th۲ ارزیابی گردد. بنابراین در این مطالعه ما تلاش کردیم که پروتئین core+۱ را در یک سیستم پروکاریوتی تولید و تخلیص کنیم و سپس میزان ایمنی زایی آنتی‌ژن نوترکیب core+۱ تولید شده را در ترکیب با ادجوانت‌های مختلف در مدل موشی Balb/c مورد بررسی قرار دهیم.

در این مطالعه نه تنها ژن core+۱ با موفقیت کلون و بیان گردید بلکه با بهینه کردن پارامترهای بیان، ما توانستیم مقدار ۵ mg پروتئین core+۱ (اسید آمینه ۱۱–۱۶۱) را در یک لیتر محیط کشت باکتری تولید کنیم. در حالی که قبلا در یک مطالعه با بهینه‌سازی بیان پروتئین ARFP/S (اسید آمینه ۸۵–۱۴۲ و ۸۵–۱۶۰) در سیستم پروکاریوتی *E.coli*، تنها ۱ mg پروتئین در یک لیتر محیط کشت باکتری به دست آمد (۳۵). به نظر می‌رسد این تفاوت میزان بیان می‌تواند به دلیل تفاوت در شرایط بیان بهینه شده، متفاوت بودن طول core+۱های بیان شده و یا حتی تفاوت توالی ژنی آن‌ها باشد.

بررسی وسترن بلات با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد دنباله هیستیدینی و آنتی‌بادی پلی کلونال موشی ضد یکی از اپیتوپ‌های core+۱، صحت پروتئین و دارا بودن ویژگی آنتی‌ژنیسیته پروتئین core+۱ را تائید می‌کند. همچنین وسترن بلات با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد پروتئین core با پروتئین core+۱ تخلیص شده و نیز پروتئین core تخلیص شده نشان داد که این آنتی‌بادی با core واکنش می‌دهد در حالی که core+۱ را نمی‌شناسد. (شکل ۱ B) این نتایج علاوه بر اینکه مؤید خاصیت آنتی‌ژنیک پروتئین است عدم واکنش متقاطع این پروتئین را نشان می‌دهدو به عبارتی با بکارگیری این پروتئین به عنوان ابزار تشخیصی، نه تنها خطایی از لحاظ واکنش متقاطع با پروتئین core پیش نمی‌آید بلکه به خوبی می‌تواند توسط آنتی‌بادی‌های اختصاصی از core متمایز گردد.

در بررسی ایمنی‌زایی پروتئین core+۱ نوترکیب، ادجوانت‌های فروند، ISA۲۰۶ و IMS ۱۳۱۲ توانستند پاسخ ایمنی هومورال بسیار قوی را در موش‌های Balb/c ایجاد کنند. (شکل ۲) مطالعات قبلی نیز قدرت زیاد ادجوانت‌های مانتانید ISA۲۰۶ (۳۶–۳۷) و IMS ۱۳۱۲ (۳۸) را در افزایش پاسخ هومورال نشان داده‌اند. با توجه به اثرهای جانبی زیاد ادجوانت‌های فروند، نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کند که این دو ادجوانت مانتانیدی می‌توانند جایگزین مناسبی برای ادجوانت فروند در بررسی‌های ایمونولوژیک به ویژه تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال باشد.

پاسخ ایمنی Th۱ مرتبط با ایمنی سلولار بوده و با ایزوتایپ IgG۲a در آنتی‌بادی‌ها مشخص می‌گردد. در مقابل تولید آنتی‌بادی‌هایی با ایزوتایپ IgG۱ از شاخصه‌های پاسخ Th۲ بوده که مرتبط با پاسخ‌های هومورال است. در این مطالعه هنگامی که ایزوتایپ IgGها مورد بررسی قرار گرفت. (شکل ۳) مشخص گردید که سرم‌های حاصل از موش‌های تیمار شده با پروتئین core+۱ در ترکیب با ادجوانت‌های فروند (C/IFA)، F۱۲۷ و Imiquimod دارای آنتی‌بادی‌هایی با ایزوتایپ غالب IgG۲a بوده و نسبت IgG۲a/IgG۱ در آن‌ها کمتر از یک می‌باشد که این مشاهده‌ها پیشنهاد می‌کند که این سه ادجوانت پاسخ ایمنی را بیشتر به سمت Th۱ هدایت می‌کنند. این نتایج‌ها به شکل واضحی نشان می‌دهد که C/IFA پاسخ ایمنی Th۱ را ایجاد می‌کند. این نتیجه در توافق با مشاهدات قبلی است که C/IFA را به عنوان یک محرک پاسخ ایمنی Th۱ معرفی می‌کنند (۳۹–۴۰).

توانایی Pluronic F۱۲۷ به عنوان یک نوع ادجوانت جهت افزایش

Archive of SID
www.SID.ir

پاسخ ایمنی از قبل نشان داده شده است (۲۶-۴۱).Spiter و همکاران نشان دادند که Pluronic F۱۲۷ در ترکیب با یک پپتید آنتی‌ژنتیک از *Leishmania major* می‌تواند پاسخ Th۱ را ایجاد کند (۴۱). همچنین Pluronic F۱۲۷ اثرهای ادجوانتی روی افزایش پاسخ ایمنی در مقابل توکسوئید کزاز را دارا می‌باشد (۴۲). همچنین مطالعه دیگری که توسط روحوند و همکاران (۳۴) بر روی آنتی‌ژن core هپاتیت C به همراه Pluronic F۱۲۷ انجام پذیرفت نشان داد که Pluronic F۱۲۷ ادجوانتی توانا در القا پاسخ‌های آنتی‌بادی anti-core با الگوی ایزوتایپی مرتبط با جهت‌گیری پاسخ ایمنی به سمت Th۱ است. این نتایج مشابه یافته‌های حاصل از مطالعه ما بر روی پروتئین core+۱ می‌باشد که نشان می‌دهد core+۱ در ترکیب با این ادجوانت می‌تواند پاسخ‌های ایمنی را تحریک کند اما به نظر می‌رسد که این توانایی بیشتر مرتبط با القای پاسخ هومورال باشد.

Imiquimod به عنوان یک داروی ضد ویروسی دارای تائیدیه سازمان دارو و غذا (FDA) آمریکا است که دارای اثرهای تغییر دهنده پاسخ‌های ایمنی نیز می‌باشد، می‌تواند به عنوان یک ادجوانت ایمن و مؤثر در تهیه و توسعه واکسن‌های انسانی مد نظر قرار گیرد. نشان داده شده است که تجویز سیستمیک و موضعی Imiquimod و آنالوگ شیمیایی آن (resiquimod) توانسته پاسخ سلولار مؤثری را در تحقیق‌های مربوط به واکسن HIV (۴۳) و همچنین پروتئین تخلیص شده OVA در مدل موشی ایجاد کند (۳۲). در مطالعه حاضر، موش‌هایی که به صورت موضعی با Imiquimod تیمار شده بودند و سپس به آن‌ها آنتی‌ژن core+۱ تزریق شده بود، توانستند آنتی‌بادی با ایزوتایپ IgG۲a را ایجاد کنند. این نتایج تائید می‌کند که Imiquimod پاسخ ایمنی از نوع Th۱ را ایجاد می‌کند. پیشنهاد شده که در تجویز موضعی، Imiquimod سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن (APC) را به اپیدرم پوست فرا خوانده (۴۴) و در نتیجه آنتی‌ژن تزریق شده به طور مؤثری توسط این سلول‌ها شناسایی می‌شوند. این فرایند خود باعث عرضه مؤثرتر آنتی‌ژن تزریق شده به سیستم ایمنی و پاسخ ایمنی قوی‌تر می‌گردد. همچنین نشان داده شده که Imiquimod به TLRهای موجود در سطح سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن (APC) بویژه دندریتیک سل‌ها (DC) متصل و در پی این اتصال APCها فعال شده و سایتوکاین‌ها ترشح می‌گردند (۴۵-۴۶) و از این طریق پاسخ ایمنی قوی ایجاد می‌گردد. از آن جایی که پاکسازی عفونت ویروس هپاتیت C در پی یک پاسخ ایمنی سلولار قوی، سریع و اختصاصی رخ می‌دهد، ما پیشنهاد می‌کنیم که Imiquimod به عنوان یک ادجوانت Th۱ در تحقیق‌های مربوط به واکسن HCV به ویژه در ترکیب با آنتی‌ژن core+۱ مورد استفاده قرار گیرد.

مطالعه حاضر مشخص کرد که مانتانید ISA۲۰۶ و مانتانید IMS ۱۳۱۲ ادجوانت‌های مؤثری در افزایش پاسخ‌های ایمنی القا شده توسط پروتئین core+۱ در موش‌های Balb/c هستند و این توانایی بر اساس نتایج پاسخ توتال آنتی‌بادی و ایزوتایپ آنتی‌بادی‌ها قابل مشاهده و استناد می‌باشد. موش‌های ایمن شده با پروتئین core+۱ فرموله شده با مانتانید ISA۲۰۶ و مانتانید IMS ۱۳۱۲ نه تنها پاسخ Th۲ قوی (آنتی‌بادی IgG۱) ایجاد می‌کنند بلکه پاسخ Th۱ نیز با سطح بالای آنتی‌بادی IgG۲a قابل مشاهده است که پیشنهاد می‌کند که ادجوانت‌های ISA۲۰۶ و IMS ۱۳۱۲ مخلوطی از پاسخ‌های Th۱ و Th۲ با غالبیت پاسخ Th۱ ایجاد می‌کنند. این نتایج، مشاهده‌های قبلی را که بر روی کاندید واکسن *Trichinella spiralis* (۳۷) و *Schistosoma japonicum* (۳۸) انجام شده تائید می‌کند. به طوری که در این مطالعات هم پاسخ Th۱ و هم Th۲ توسط این ادجوانت‌ها در مدل موشی ایجاد گردیده است (۳۷-۳۸). در مقابل برخی مطالعات گزارش کرده‌اند که ادجوانت مانتانید ISA۲۰۶ (۳۹) و مانتانید IMS ۱۳۱۲ (۴۷) پاسخ Th۲ را در مدل‌های موشی (۳۹، ۴۷) و گوسفند (۴۸) ایجاد می‌کنند. این تناقضات احتمالا به دلیل تفاوت در ماهیت و نوع آنتی‌ژن‌های مورد مطالعه و یا مدل حیوانی مورد استفاده می‌باشد.

در مطالعه حاضر ما با به‌کارگیری سیستم بیانی IPTG-القایی در *E.coli* به عنوان یک روش کاربردی و آسان، مقدار بالایی از پروتئین core+۱ را تولید وسپس خالص سازی کردیم و اطلاعات مهمی در مورد آنتی‌ژنیسیته پروتئین core+۱ ارائه کردیم. این مطالعه یک گزارش اولیه پیرامون به‌کارگیری ادجوانت‌های مختلف در فرمولاسیون با آنتی‌ژن core+۱ ویروس هپاتیت C به منظور تولید آنتی‌بادی مونوکلونال و اهداف توسعه واکسن HCV می‌باشد. ما نشان دادیم که core+۱ نوترکیب در ترکیب با هر ادجوانت، آنتی‌بادی‌هایی با ایزوتایپ خاص تولید را تولید می‌کند. به عبارتی core+۱ در ترکیب با ادجوانت‌های مختلف پاسخ‌های ایمنی متفاوتی را در موش‌های Balb/c ایجاد می‌کند.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1- Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C. Science 1999; 285(5424): 26-30.
2- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. World J Gastroenterol 2007; 13(17): 2436-41.
3- Pawlotsky JM. Hepatitis: HCV variability, the immune system and resistance to antiviral drugs. Nature reviews Gastroenterol Hepatol 2009; 6(7): 383-5.
4- Moradpour D, Brass V, Gosert R, Wolk B, Blum HE. Hepatitis C: molecular virology and antiviral targets. Trends Mol Med 2002; 8(10): 476-82.
5- Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. Annu Rev Immunol 2007; 25: 71-99.
6- Rehermann B. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nat Rev Immunol. 2005;5: 215–29.
7- Schulze J, Schmitz H, Borowski E, Borowski P. The proteins of the Hepatitis C virus: their features and interactions with intracellular protein phosphorylation. Arch Virol. 2003;148 (7): 1247-67.
8- Xu Z, Choi J, Yen T, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. The EMBO J. 2001;20 (14): 3840-8.
9- Walewski J, Keller T, Stump D, Branch A. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. RNA. 2001;7 (05): 710-21.
10- Walewski JL, Keller TR, Branch AD. HCV patients have antibodies against a novel protein encoded in a second reading frame. Hepatology. 1998;28: 278.
11- Ma H, Lin T, Li H, Iguchi-Ariga S, Ariga H, Chuang Y. Hepatitis C virus ARFP protein interacts with cellular MM-1 protein and enhances the gene trans-activation activity of c-Myc. J Biomed Sci 2008;15 (4): 417-25.
12- Shao S, Wu W, Bian Z, Yu J, Zhao P, Zhao L. Hepatitis C virus F protein inhibits cell apoptosis by activation of intracellular NF B pathway. Hepatol Res. 2009;39(3): 282-9.
13- Shao W, Jie L, Gao C, Qi S. Hepatitis C Virus F Protein Up-Regulates c-myc and Down-Regulates p53 in Human Hepatoma HepG 2 Cells. Intervirology 2007;50(5): 341-6.
14- Huang Y, Cheng J, Zhang S, Wang L, Guo J, Liu Y. Screening of hepatocyte proteins binding to F protein of hepatitis C virus by yeast two-hybrid system. World J Gastroenterol. 2005;11(36): 5659.
15- Gao D, Zhang X, Hou G, Jin G, Deng Q, Kong X. Assessment of Specific Antibodies to F Protein in Serum Samples from Chinese Hepatitis C Patients Treated with Interferon plus Ribavarin. J Clin Microbiol 2008;46(11):3746-51.
16- Troesch M, Jalbert E, Canobio S, Boulassel M, Routy J, Bernard N. Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. AIDS 2005; 19(8): 775-84.
17- Cohen M, Bachmatov L, Ben-Ari Z, Rotman Y, Tur-Kaspa R, Zemel R. Development of specific antibodies to an ARF protein in treated patients with chronic HCV infection. Dig Dis Sc 2007;52 (9): 2427-32.
18- Bain C, Parroche P, Lavergne J, Duverger B, Vieux C, Dubois V. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. J Virol 2004; 78(19): 10460-9.
19- Christie C, Chapman RW, Rosenberg WM. Immune selection and genetic sequence variation in core and envelope regions of hepatitis C virus. Hepatology 1999;30:1037–44.
20- Pradel F, Rajoharison A, Berland J, Khouri V, Perret M, Van Roosmalen M, et al. Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. Hepatology 2004;40 (4): 900-9.
21- Barnett PV, Williams L, Doel TR. International bank for foot–andmonth disease vaccine assessment of Montanide ISA25 and ISA206, two commercially available oil adjuvants. Vaccine 1996;14 (13): 1187–98.
22- Patil PK, Ramkrishnan C, Hugar B, Mishra LD, Natarajan C. Immuno response of goats against foot and mouth disease quadravalent vaccine: comparison of double oil emulsion and aluminium hydroxide gel vaccines in eliciting immunity. Vaccine 2002;20: 2781–9.
23- Cauchard SC, Ballet J, Taouji S. Foal IgG and opsonizing anti-Rhodococcus equi antibodies after immunization of pregnant mares with a proactive VapA candidate vaccine. Vet Microbiol 2004;104: 73–81.
24- Toth LA, Dunlap AW, Olson GA, Hessler JR. An evaluation of distress following intraperitoneal immunization with Freund's adjuvant in mice. Lab Anim Sci. 1989;39: 122-6.
25- Schmolka IR. A comparison of block copolymer surfactant gels. JAm Oil Chem Soc 1997;68 206–9.
26- Spitzer N JA, Lippert D, Olafson RW. Long-term protection of mice against Leishmania major with a synthetic peptide vaccine. Vaccine 1999;17 (11–12): 1298–300.
27- Wagner TL, Couture AM, Gibson SJ, Miller RL, Smith, RM eaR-ai. Modulation of TH1 and TH2 cytokine production with the immune response modifiers. Cell Immunol 1999;191: 10–9.
28- Tomai MA, Stanczak TL, Tygrett LT, Waldschmidt TJ. The immune response modifiers imiquimod and R-848 are potent activators of B lymphocytes. Cell Immunol 2000;203: 55–65.
29- Gibson SJ, Riter TR, Gleason RM, Rogers LM, Fuller, AE. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. Cell Immunol 2001;218: 74–86.
30- Doxsee CL, Reiter MJ, Gibson SJ, Vasilakos JP, Kedl RM. The immune response modifier and Toll-like receptor

Archive of SID
www.SID.ir

7 agonist S-27609 selectively induces IL-12 and TNF-alpha production in CD11c+CD11b+CD8- dendritic cells. J Immunol 2003;171:1156–63.

31- Schwarz ST, Manolova V, Didierlaurent A, Sirard JC, Rothlisberger P. Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. Eur J Immunol 2003;33:1465–70.

32- Johnston CB. Topical imiquimod is a potent adjuvant to a weakly-immunogenic protein prototype vaccine. Vaccine 2006; 24:1958–65.

33- Roohvand F, Aghasadeghi M, Sadat S, Budkowska A, Khabiri A. HCV core protein immunization with Montanide/ CpG elicits strong Th1/Th2 and long-lived CTL responses. Biochemical and biophysical research communications. 2007;354 (3): 641-9.

34- Varaklioti A, Vassilaki N, Georgopoulou U, Mavromara P. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. J Biol Chem 2002;277 (20): 17713.

35- Boumlic A., Nominé Y., Charbonnier S., Dalagiorgou G., Vassilaki N., Kieffer B., Travé G., Mavromara P., Orfanoudakis G. Prevalence of intrinsic disorder in the hepatitis C virus ARFP/Core+ 1/S protein. FEBS J 2010;277(3): 774-89.

36- Halassy SM, Bouche FB, Putz M, Claude P. Muller R, Habjanec L, Tomasic J. Immunogenicity of peptides of measles virus origin and influence of adjuvants. Vaccine 2006; 24:185–94.

37- Jing Yang YG, Yaping Y, Junfei W, Shaohua W, Shijuan C, Jin P, Qiang L, Xinping Zh. Trichinella spiralis: Immune response and protective immunity elicited by recombinant paramyosin formulated with different adjuvants. Exp Parasitol 2010; 124(4): 403-8.

38- Xindong X, Sun W, Zhang Q, Zhang J, Xiangyang X. A Schistosoma japonicum chimeric protein with a novel adjuvant induced a polarized Th1 immune response and protection against liver egg burdens. BMC Infect Dis 2009; 9:54.

39- Habjanec BH, Tomašić J. Immunomodulatory activity of novel adjuvant formulations based on Montanide ISA oil-based adjuvants and peptidoglycan monomer. Int Immunopharmacol. 2008; 8(5): 717-24.

40- Chang DJ, Savary JR, Jensen FC. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant Adv Drug Deliv Rev 1998;32: 173-86.

41- Claire M. Coeshott SLS, Verderber E, Samaniego A, Blonder GJR, Westerink J. Pluronic® F127-based systemic vaccine delivery systems. Vaccine 2004;22: 2396–405.

42- Westerink SLS, Srivastava N, Blonder J, Coeshott C, Rosentha GJ. ProJuvantTM (Pluronic 127/chitosan) enhances the immuneresponse to intranasally administered tetanus toxoid. Vaccine. 2002;20: 711–23.

43- Otero SAC, Felber B, Laddy D, Pavlakis G, Boyer GD, Weiner DB. Resiquimod is a modest adjuvant for HIV-1 gag-based genetic immunization in a mouse model. Vaccine 2004 22: 1782–90.

44- Zuber AB, Engström G, Zuber B, Ljungberg K, Fredriksson M, Benthin R, Isaguliants MG, Sandström E, Hinkula E, Wahren B. Topical delivery of imiquimod to a mouse model as a novel adjuvant for human immunodeficiency virus (HIV) DNA. Vaccine 2004;22: 1791–8.

45- Hemmi H KT, Takeuchi O. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. Nat Immunol 2002;3 (2): 196–200.

46- Jurk M HF, Vollmer J. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. Nat Immunol 2002;3 (6): 499.

47- Deville AdP, Aucouturier J, Laine´-Prade MC, Boireau P, Valle´e I. Influence of adjuvant formulation on the induced protection of mice immunized with total soluble antigen of Trichinella spiralis. Vet Parasitol 2005;132: 75–80.

48- Cox SJ AN, Statham RJ, Barnett PV. Longevity of antibody and cytokine responses following vaccination with high potency emergency FMD vaccines. Vaccine 2003;21: 1336-47.

Archive of SID

www.SID.ir

Study the capacity of recombinant HCV core+1 protein to induce immune responses in combination with different adjuvants

*Baghbani-arani F; MSc[1], Roohvand F; PhD[2], Aghasadeghi MR; [3], Sadat SN; [3]
Motevalli F; [4], Memarnejadian A; [3], Amini S; [3]

Received: 24 Oct 2011 Accepted: 10 Jan 2012

Archive of SID

Abstract

Background: Hepatitis C virus (HCV) genome contains a large open reading frame coding for a polyprotein that is cleaved into ten proteins. Recently, a new protein, named core+1, has been described to be expressed through a ribosomal frame shift within the capsid-encoding sequence. To address these possibilities, core+1 was produced in *E.coli* and the purified protein was evaluated for the immunological properties.

Material and Methods: The core+1corresponding nucleotide sequence was created by PCR-based induction of a +1 frame shift mutation within the core gene template. The amplicon was cloned into the pET-24a vector and expressed in *E.coli* host. The expressed protein was purified under denaturing condition and after refolding steps was characterized by SDS-PAGE and Western Blotting. The immunization potential of core+1 with various adjuvant (Freunds (C/IFA), Montanide ISA 206 and IMS 1312, pluronic acid (F127) and imiquimod (IMIQ) was assessed in Balb/c mice. ELISA-based assays were used to analyze the humoral immune responses.

Results: The yield of *E.coli*-derived core+1 was 5 mg/ L of culture media and antigenicity of this protein was confirmed by western blotting. All the core+1/adjuvant formulations significantly developed the anti-core+1 IgG responses in the immunized mice but C/IFA and ISA206 elicited the highest antibody titers. ISA 206 and IMS 1312 formulation of core+1 induced strong Th1/Th2 responses.

Conclusions: Our results indicated that core+1 formulation with various adjuvants may elicit the different immune response profiles (Th1/Th2). Thus core+1 might be a potential component of future HCV vaccine too.

Keywords: Core+1, HCV, Adjuvant, Expression, Balb/c

1- (*Corresponding Author) Researcher, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Department of Biology, PhD Student, Tehran, Iran. Tel: +98-09126022786 E-mail: fbarani58@yahoo.com
2- Assistant Professor (Ph.D), Hepatitis and AIDS Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3- Assistant Professor (Ph.D), Hepatitis and AIDS Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4- Researcher (MSc), Hepatitis and AIDS Department., Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

www.SID.ir