



Scan online to view this article

Immunological Evaluation of HIV-1 Nef-MPER-V3 Harboring IMT-P8 Penetrating Peptide in BALB/c Mice

Shekoufa Jahedian¹, Seyed Mehdi Sadat^{2*}, Gholam Reza Javadi¹,
Azam Bolhassani²

1. Department of Biology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Hepatitis, AIDS and Blood-borne diseases, Pasteur Institute of Iran. Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background: Immunodeficiency virus-1 (HIV-1) is a global health problem and it has affected more than 75 million individuals since the epidemic started. Various approaches have been investigated to some up with a preventive or therapeutic formulation against this virus. However, none of them has been achieved. The aim of the study was the immunological evaluation of HIV-1 Nef-MPER-V3 harboring IMT-P8 penetrating peptide in BALB/c mice to induce effective immune responses.

Materials and Methods: In current study, to evaluate of the antigen immunogenicity of IMT-P8-Nef-MPER-V3, 11 different groups of female BALB/c mice were immunized with three doses of the antigen with or without Hsp27 and Hp91 adjuvants formulation. The immune responses were assessed using IgG ELISA assay and its isotype determination. IL-10 and IFN- γ were also evaluated by sandwich ELISA.

Results: The data showed that the recombinant protein developed different levels of humoral and cellular responses. IMTP8-Nef-MPER-V3+Hp91 groups reached highest IgG2a, and elicited strong IFN- γ production towards a Th1 response compared to the other groups. Cytokine assay indicated that the immunized mice with the antigen formulation containing IMT-P8 CPP applied with Hp91 has a high potency in immune induction.

Conclusion: These results demonstrated that application of IMTP8-Nef-MPER-V3 combining the adjuvant-formulated (Hp91) provides strong responses which must be considered as an effective formulation towards a potential HIV vaccine candidate.

Keywords: HIV-1, Vaccine, Nef-MPER-V3, CPP, IMT-P8, Iau Science.

Corresponding author:

Department of Hepatitis, AIDS and Blood-borne diseases, Pasteur Institute of Iran. Tehran, Iran.

Email: mehdi_sadat@pasteur.ac.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

بررسی ایمنی‌زایی Nef-MPER-V3 و ویروس HIV-1 واجد پروتئین نفوذ کننده IMT-P8 در موش BALB/c شکوفای جاهدیان^۱، سید مهدی سادات^{۲*}، غلامرضا جوادی^۱، اعظم بوالحسنی^۲

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. بخش هپاتیت، ایدز و ویروس‌های منتقله از خون، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: ویروس HIV-1 یک معضل بهداشت جهانی است که از زمان پیدایش تاکنون بیش از ۷۵ میلیون نفر را آلوده کرده است. مطالعه‌های فراوانی برای دستیابی به یک واکسن پیشگیرانه و درمانی علیه این ویروس انجام شده است. با این حال هیچ‌یک مؤثر نبوده‌اند. هدف مطالعه حاضر بررسی ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب IMT-P8-Nef-MPER-V3 در مدل موشی BALB/c در جهت القای پاسخ‌های ایمنی مؤثر بوده است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، برای سنجش ایمنوژنیسیته IMT-P8-Nef-MPER-V3، ۱۱ گروه متفاوت از موش ماده BALB/c با تزریق سه دوز از آنتی‌ژن به همراه یا بدون ادجوانته‌های Hsp27 و Hp91 ایمن شدند. پاسخ ایمنی با اندازه‌گیری IgG و نیز تعیین ایزوتایپ‌های آن با روش الایزا انجام گرفت. ترشح سایتوکاین‌های IL-10 و اینترفرون گاما نیز با ساندویچ الایزا ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین نوترکیب مورد استفاده در این مطالعه در همه گروه‌ها نسبت به کنترل‌های مطالعه باعث ایجاد پاسخ ایمنی همورل و سلولی شده است. در این میان، گروه ایمن شده با IMT-P8-Nef-MPER-V3+Hp91 بالاترین میزان تولید IgG2a و تیتر IFN- γ در مقایسه با سایر گروه‌ها داشته و در نتیجه فعالیت Th1 را نشان داد.

نتیجه‌گیری: IMT-P8-Nef-MPER-V3 به کار گرفته شده به همراه HP91 از قابلیت بالایی در تحریک سیستم ایمنی برخوردار بوده و پتانسیل بررسی‌های آتی به عنوان یک کاندید واکسن علیه HIV-1 را دارا است.

واژگان کلیدی: HIV-1، واکسن، Nef-MPER-V3، CPP، IMT-P8، Iau Science.

مقدمه

مبارزه با عفونت HIV-1 بعد از گذشت حدود ۴۰ سال همچنان چالش برانگیز مانده است. براساس آخرین اعلام پایگاه UNAIDS در سال ۲۰۲۰، تعداد ۷۵/۷ میلیون نفر از آغاز اپیدمی این بیماری تاکنون درگیر شده‌اند و در سال ۲۰۱۹ تعداد مبتلایان جدید حدود ۱/۷ میلیون نفر بوده است (۱). علی‌رغم تلاش‌های زیادی که در زمینه

تولید داروهای ضدویروسی به دست آمده است، هیچ‌گونه واکسن مؤثری جهت پیشگیری و یا درمان ویروس HIV-1 شناسایی نشده است (۲). واکسن کارآمد می‌بایست قابلیت برانگیختن هر دو بازوی ایمنی همورال و سلولی را داشته باشد. همچنین تحریک تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده در این مسیر بسیار حائز اهمیت است (۳-۵). در مطالعه‌های واکسن علیه این ویروس، ژن‌های متفاوتی به صورت تنها و یا به شکل مولتی آنتی ژن مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

نویسنده مسئول:

بخش هپاتیت، ایدز و ویروس‌های منتقله از خون، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

پست الکترونیکی: Mehdi_sadat@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۳

یکی از مهم‌ترین ژن‌های موجود در ویروس HIV-1 ژن *nef* است که به‌وفور در طی فاز اولیه از سیکل همانندسازی ویروس به‌صورت حفاظت شده تکثیر می‌شود. پروتئین *Nef* بسیار پلی‌مورفیک بوده و در پاتوژن ویروس نقش مهمی داشته و به‌عنوان یک فاکتور ویروانس برای پیشرفت بیماری ایدز محسوب می‌گردد (۶). این پروتئین هم‌چنین باعث کاهش بیان *CD4*، *MHCI* و *MHCII* و درنهایت کاهش پاسخ سیستم ایمنی می‌شود. بنابراین القای پاسخ ایمنی بر ضد پروتئین *Nef* می‌تواند تا حدی عفونت ویروسی را مهار کند و کاندید مناسبی برای تهیه واکسن ضد HIV باشد (۸،۷).

از سوی دیگر، ژن *env* مسئول ساخت گلیکوپروتئین سطحی ویروس (*gp160*) است که توسط پروتئاز سلول میزبان به دو زیرواحد *gp120* و *gp41* تبدیل می‌شود. با مقایسه توالی اسیدهای آمینه *gp120* در انواع پرمات‌ها مشخص شده است که در این گلیکوپروتئین ۵ ناحیه ثابت (*C1-C5*) و ۵ ناحیه متغیر (*V1-V5*) وجود دارد که هر دوی این مناطق به شدت گلیکوزیله هستند. متغیر بودن و گلیکوزیلاسیون *gp120* مهم‌ترین عامل فرار ویروس از سیستم ایمنی است (۱۰،۹). هم‌چنین ناحیه ۲۴ آمینواسیدی اکتودومین (اسید آمینه‌های ۶۶۰ تا ۶۸۳) به نام *MPER* در طراحی واکسن مورد توجه قرار گرفته است. ناحیه خارجی مجاور غشاء از (*MPER*) *gp41* به-میزان بالایی حفظ شده است و به‌عنوان بخش ضروری ماشین فیوژن سلولی مطرح شده است. آنتی‌بادی‌های خنثی کننده *F52* و *E104* برای تشخیص اپی‌توپ‌های خطی در دومین *MPER* شناسایی شده‌اند (۱۱). *gp120* شامل زیر واحدهای *V1*، *V2* و *V3* است (۱۳،۱۲). *V3* سومین منطقه متغیر از *gp120* است و دارای ۳۵ آمینواسید است که در انتخاب کورسپتورهای *CXCR4* و *CCR5*، اتصال ویروس و ورود آن به داخل سلول نقش دارد. منطقه لوپ *V3* برای ایجاد عفونت ضروری است چون این بخش از ویروس است که به رسپتورهای پروتئینی سلول‌های ایمنی میزبان متصل می‌شود و عفونت ایجاد می‌کند (۱۴،۱۵).

علاوه بر انتخاب آنتی‌ژن در طراحی واکسن، انتخاب سیستم انتقال و ارائه آن در *in vivo* حائز اهمیت است. با توجه به کاهش کارایی پروتئین‌های درمانی به‌واسطه نفوذپذیری انتخابی غشاهای سلولی، به‌کارگیری پپتیدهای نفوذپذیرکننده سلولی (CPPs) در مطالعه‌های واکسن علیه HIV-1 مطرح شده است (۱۱). پپتیدهای نفوذپذیر

کننده سلولی به‌کار گرفته می‌شوند تا انتقال کارآمد چندین پروتئین از میان غشای دولایه به‌داخل سلول امکان‌پذیر شده و شکل‌گیری پیوندهای غیرکوالان بین آنتی‌ژن هدف و پپتید نفوذپذیرکننده می‌تواند بر بسیاری از ممانعت‌های انتقال از جمله ورود کمپلکس نوترکیب به-داخل وزیکول‌های اندوزومال چیره گردد (۱۶). *IMT-P8* به‌عنوان یک پپتید نفوذ کننده سلولی جدید معرفی شده است که به‌صورت بالقوه برای مقاصد درمانی و حمل و ورود پروتئین‌ها و پپتیدها به‌درون سلول استفاده می‌گردد. *P8* یک پپتید نفوذی (CPP) جدید است و پتانسیل تحویل محموله پپتیدی و پروتئینی را به‌داخل سلول انسانی دارد. می‌توان فیوژن *IMT-P8-GFP* را تهیه کرد و ورود آن را به‌سلول مورد بررسی قرار داد. ارزیابی‌ها نشان داده است که *IMT-8* به‌عنوان یک CPP قادر به حمل پروتئین فلورسنت سبز به سلول‌های مختلف است و از طرفی میزان برداشت بالایی را توسط سلول دارد (۱۷).

از سوی دیگر، واکسن‌های پروتئینی با وجود قابلیت بالای برانگیختن پاسخ‌های ایمنی، نیاز به ادجوانت به‌منظور ایجاد پاسخ‌ها به‌شکل قوی‌تر و برای مدت بیش‌تری دارد. یکی از انواع ادجوانت‌های مورد استفاده، خانواده پروتئینی *HSP* (Heat Shock Proteins) ها هستند که جزء ادجوانت‌های مناسب برای القای پاسخ‌های ایمنی سلولی و آنتی‌بادی‌های خاص برعلیه عفونت‌ها هستند. لذا، برای افزایش نفوذپذیری پروتئین‌های انتخابی در این مطالعه، از سیستم انتقالی *IMT-P8* و از *Hp91* و *Hsp27* به‌عنوان ادجوانت جهت ایمنی‌زایی هرچه بیش‌تر استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مراحل ساخت و تأیید پروتئین نوترکیب-*IMT-P8-Nef* *MPER-V3* در مطالعه پیشین به‌طور کامل شرح داده شده است (۱۸). به‌طور خلاصه، وکتور بیانی (+) *pET-28a* حاوی ژن هدف در سیستم بیانی *Rossetta (DE3)* بیان و پروتئین نوترکیب با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی تخلیص و با وسترن بلات تأیید شد. در مطالعه حاضر، به‌منظور بررسی ایمنی‌زایی توسط آنتی‌ژن مورد نظر، ۵۵ موش ماده با سن ۶-۸ هفته و میانگین وزنی ۲۰ گرم بر اساس آیین‌نامه اخلاق کار با حیوانات و پس از تأیید در کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران (IR.PII.REC.1396.16)، استفاده شد.

گروه‌های موشی و ایمنی‌زایی

موش‌ها به ۱۱ گروه پنج‌تایی (جدول ۱) به‌شکل تصادفی تقسیم شدند. تزریق‌ها به‌تعداد سه بار و به‌فاصله سه هفته- ای، به‌صورت زیرجلدی به‌مقدار نهایی ۱۰۰ میکرولیتر حاوی ۵ میکروگرم آنتی‌ژن و میزان ۱۰ میکروگرم از ادجوانت- های Hsp27 و Hp91 صورت گرفت. برای آماده‌سازی آنتی‌ژن با مخلوط ادجوانت فروند (به‌عنوان کنترل

استاندارد) نسبت ۱:۱ استفاده شد و سپس مخلوط ادجوانت با آنتی‌ژن از طریق ورتکس کردن همگن‌سازی شد. دو هفته پس از آخرین تزریق، خون‌گیری از سینوس چشمی موش‌ها انجام و سرم‌ها در شرایط ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمون‌های نهایی نگهداری شدند.

جدول ۱. برنامه ایمنی‌زایی گروه‌های مختلف موشی

گروه	تزریق اول	تزریق یادآور ۱	تزریق یادآور ۲
۱ (کنترل)	PBS ^۱	PBS	PBS
۲ (کنترل C/IFA)	CFA ^۱	IFA ^۱	IFA
۳ (کنترل)	Hsp27 ^۲	Hsp27	Hsp27
۴ (کنترل)	Hp91 ^۳	Hp91	Hp91
۵	Nef-MPER-V3	Nef-MPER-V3	Nef-MPER-V3
۶	Nef-MPER-V3 + CFA	Nef-MPER-V3 + IFA	Nef-MPER-V3 + IFA
۷	Nef-MPER-V3 + Hsp27	Nef-MPER-V3 + Hsp27	Nef-MPER-V3 + Hsp27
۹	IMT-P8-Nef-MPER-V3	IMT-P8-Nef-MPER-V3	IMT-P8-Nef-MPER-V3
۱۰	IMT-P8-Nef-MPER-V3 + Hsp27	IMT-P8-Nef-MPER-V3 + Hsp27	IMT-P8-Nef-MPER-V3 + Hsp27
۱۱	IMT-P8-Nef-MPER-V3 + Hp91	IMT-P8-Nef-MPER-V3 + Hp91	IMT-P8-Nef-MPER-V3 + Hp91

^۱ بافر فسفات سالین، ^۲ ادجوانت کامل و ^۳ ناقص فروند، ^۴ ادجوانت پروتئین شوک حرارتی ۲۷، ^۵ ادجوانت peptide91 HMGB1-derived

جداسازی طحال موش‌های ایمن شده

موش‌های ایمن شده پس از بی‌هوشی، نخاعی شده و در الکل ۷۰٪ غوطه‌ور شده و پس از آن طحال آن‌ها در شرایط استریل جداسازی شد. سلول‌های طحال پس از هموژن شدن، در محلول بافر PBS 1X به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C و دور ۲۵۰g سانتریفیوژ شدند. پس از حذف مایع رویی، بافر لیز کننده گلبول قرمز به رسوب سلولی اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C و در تاریکی انکوبه شد. ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI (RPMI-1640, Sigma, Aldrich) برای خنثی‌سازی اثر بافر لیزکننده اضافه شد و سانتریفیوژ مجدد انجام شد. پس از حذف مایع رویی به رسوب باقی مانده، ۱ میلی‌لیتر محیط کامل RPMI اضافه و رسوب سلولی در آن حل شده و در نهایت سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند.

بررسی ایمنی همورال به روش الایزا

به‌منظور بررسی آنتی‌بادی اختصاصی علیه Nef-MPER-V3، ابتدا کف پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای الایزا (Nunk, Denmark) توسط پروتئین نوترکیب مذکور (تهیه شده از بخش هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران) با غلظت ۳ میگروگرم بر میلی‌لیتر پوشانده شد و پس از طی مراحل شست و شو و نیز بلاک کردن با ۱٪ BSA، سرم موش‌ها با رقت ۱/۱۰۰۰ توسط بافر رقیق کننده آنتی‌بادی تهیه شد و به‌عنوان اولین آنتی‌بادی به پلیت‌ها اضافه گردید. سپس پلیت‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شده و پس از سه بار شستشو با بافر PBS-T، ۱۰۰

میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه Anti-mouse IgG-HRP Goat- با رقت ۱/۱۰۰۰۰ به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها به‌مدت یک ساعت دیگر در ۳۷°C انکوبه شدند. در نهایت، پس از شست و شوی نهایی سوبسترای رنگ‌زای TMB (Tetramethylbenzidine) اضافه شده و در نهایت با به‌کارگیری محلول متوقف کننده (H₂SO₄)، میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر به- وسیله الایزا ریدر خوانده شد.

تعیین ایزوتایپ‌های IgG

به‌منظور تعیین زیرکلاس‌های IgG طبق مرحله فوق الذکر، سرم‌های موشی با رقت ۱/۲۰۰۰ آماده شده و پس از افزودن به چاهک‌های معین و طی مراحل شست و شو و بلاک، به هر چاهک طبق لیل مشخص آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG1، IgG2a، IgG2b و (Sigma, USA) IgG2b، با رقت ۱/۲۰۰۰ افزوده گردید. مرحله انکوباسیون در دمای اتاق و به‌مدت ۳۰ دقیقه انجام شد و پس از آن آنتی‌بادی Goat Anti-Mouse IgG- HRP با رقت ۱/۱۰۰۰۰ افزوده شد. در نهایت میزان جذب نوری هر نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

ارزیابی ترشح سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-10

به‌منظور سنجش سایتوکاین‌های اینترلوکین ۱۰ (IL-10) و اینترفرون گاما (IFN-γ)، سلول‌های طحال موش‌ها به- صورت مجزا در پلیت‌های کشت سلولی ۲۴ خانه‌ای به- تعداد ۲×۱۰^۶ در هر میلی‌لیتر محیط RMPI-1640 کامل کشت داده شدند. سلول‌های مذکور با افزودن

سایتوکاین‌ها انجام شد. کلیه آزمون‌ها سه بار تکرار شدند و مقدار $p < 0.05$ از نظر آماری معنادار تلقی شد.

یافته‌ها

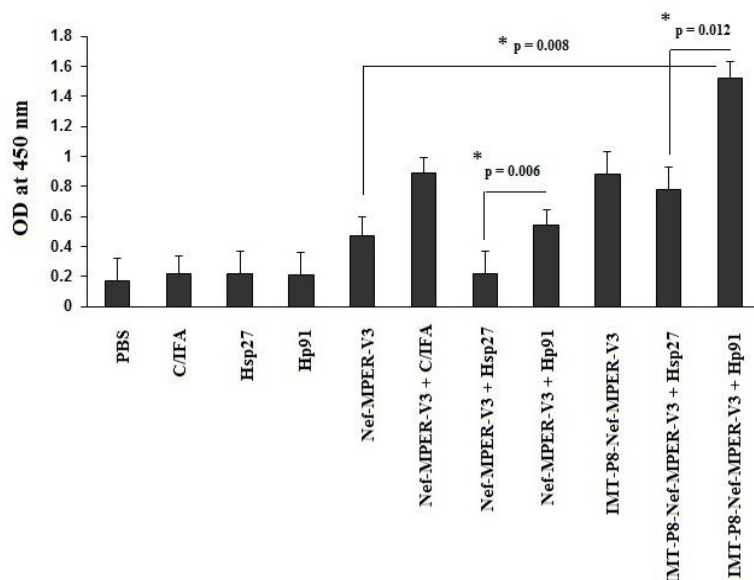
پاسخ ایمنی همورال

در بررسی پاسخ ایمنی همورال که از طریق تیتر تولید آنتی‌بادی کلی IgG (شکل ۱) و نیز تعیین ایزوتوپ‌های (شکل ۲) آن انجام شد مشخص گردید که در تمامی گروه‌های اصلی نسبت به گروه کنترل، آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن استفاده شده تولید شده است.

پروتئین نوترکیب Nef-MPER-V3 با غلظت نهایی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در دمای 37°C و در حضور CO_2 ۵٪ به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. سپس سوپ رویی کشت سلول‌ها جمع‌آوری و با استفاده از کیت‌های IFN- γ و IL-10 موشی (MabTech, Sweden) مقادیر سایتوکاین‌های مذکور براساس پروتکل شرکت سازنده سنجش شدند.

بررسی و تجزیه تحلیل داده‌ها

تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون‌های من ویتنی روی متغیرها شامل مقدار آنتی‌بادی تولید شده و ترشح



شکل ۱. آنالیز پاسخ‌های ایمنی همورال (Total IgG) در گروه‌های مختلف ایمن شده به روش الایزا. میزان تیتر IgG دو هفته پس از آخرین تزریق در رقت سرمی ۱:۱۰۰۰ گروه‌های مختلف نمایش داده شده است. علامت ستاره بیانگر اختلاف معنادار است و میزان SD به صورت بار در هر ستون نمایش داده شده است.

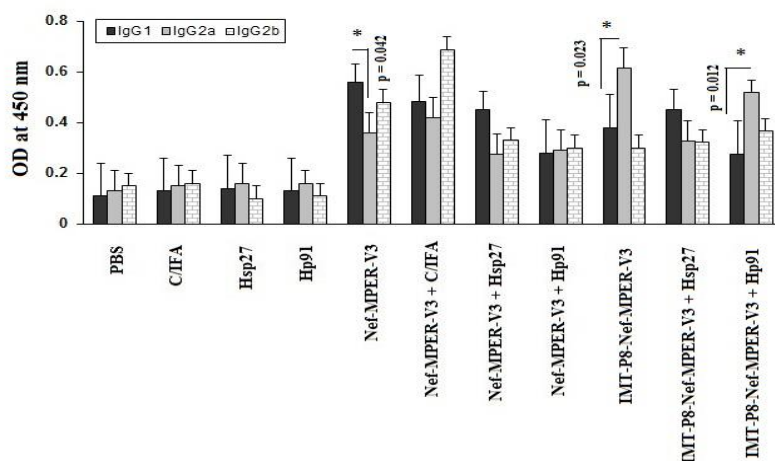
در بررسی ایزوتایپ‌های IgG مشخص گردید که IgG1 در گروه ایمن شده با آنتی‌ژن Nef-MPER-V3 آنتی-بادی غالب بوده است ($p = 0.002$) که حاکی از فعالیت غالب $\text{Th}2$ است (شکل ۲). اما در گروه ایمن شده با IMTP8-Nef-MPER-V3 ایزو تایپ غالب IgG2a و غالبیت $\text{Th}1$ است. استفاده از ادجوانت Hp91 نیز باعث شیفت ایمنی به سمت پاسخ $\text{Th}1$ شده و این در حالی-ست HSP27 باعث تولید بیشتر IgG1 گردیده است ($p < 0.05$).

ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی و سنجش سایتوکاین

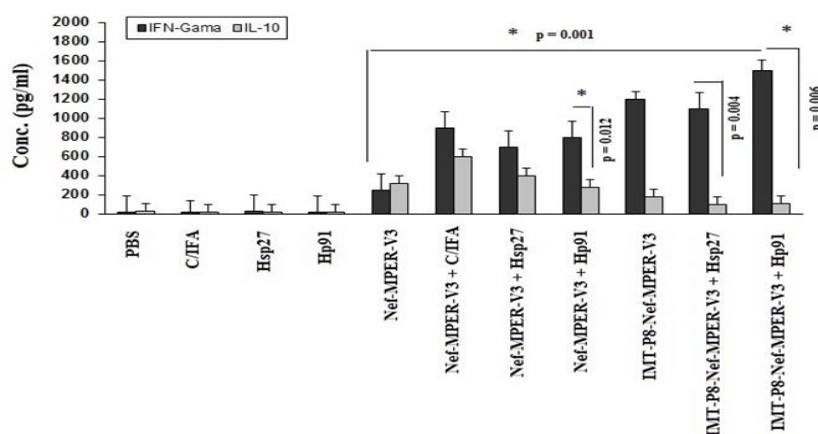
در گروه ایمن شده با آنتی ژن IMTP8-Nef-MPER-V3 سطح بالاتری از IgG نسبت به گروه واکسینه شده با آنتی‌ژن Nef-MPER-V3 مشاهده گردید ($p = 0.02$) که این مورد ناشی از نقش مؤثر سیستم‌های انتقالی در افزایش کارایی انتقال پروتئین است. سطح تیتر تولید آنتی‌بادی توتال در گروه‌هایی که پپتید نفوذپذیر کننده سلولی IMTP8 را دریافت کرده و با ادجوانت ایمن شده بودند نسبت به گروه کنترل بالاتر ارزیابی شد ($p < 0.05$). در بین فرمولاسیون‌های دارای آنتی‌ژن حاوی پپتید نفوذپذیر کننده، فرمول حاوی ادجوانت Hp91 بیش‌ترین سطح اختلاف معنادار را با سایر فرمولاسیون‌های حاوی ادجوانت Hsp27 را نشان داد.

همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، گروه موشی ایمن شده با IMTP8-Nef-MPER-V3 به همراه ادجوانت Hp91 بیش‌ترین مقدار ترشح $\text{IFN-}\gamma$ را داشته‌اند ($p=0/006$)، اما ترشح IL-10 در حداقل ارزیابی شد. همچنین به‌کارگیری IMT-P8 در فرمولاسیون واکسن کاندید باعث افزایش ترشح این

سایتوکاین نسبت به گروه‌های فاقد این CPP است. نسبت ترشح $\text{IFN-}\gamma$ / IL-10 در گروه Hp91 + IMTP8-Nef-MPER-V3، بالاترین سطح را نشان داد که حاکی از تحریک بالای ایمنی سلولی است ($p=0/006$).



شکل ۲. آنالیز ایزوتایپ های IgG در گروه‌های مختلف ایمن شده موشی. تعیین ایزوتایپ‌ها با رقت ۱:۲۰۰۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر نمایش داده شده است. علامت ستاره بیانگر اختلاف معنادار است و میزان SD به‌صورت بار در هر ستون نمایش داده شده است.



شکل ۳. بررسی میزان ترشح سایتوکاین‌های $\text{IFN-}\gamma$ و IL-10 در گروه‌های موشی ایمن شده پس از ایمن‌سازی گروه‌های موشی. سلول‌های طحال به وسیله پروتئین Nef-MPER-V3 با غلظت $10 \mu\text{M}$ تحریک و به‌مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. ارزیابی سایتوکاین‌ها براساس کیت اختصاصی و برحسب pg/ml در سوپ کشت سلولی با تکرار سه‌تایی نمایش داده شده است. علامت ستاره بیانگر اختلاف معنادار ($p<0/05$) است.

بحث

از زمان شناسایی عامل بیماری AIDS، روش‌های درمانی و نیز کاندیدهای واکسن متفاوتی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. علی‌رغم پیشرفت قابل توجه در روش‌های درمانی HAART (highly active antiretroviral

therapy) در مدیریت پیشرفت بیماری، در تولید واکسن پیشگیرانه یا درمانی توفیقی حاصل نشده است. این موضوع ناشی از ای منحصر به‌فرد ویروس HIV-1 شامل جهش‌های متعدد، پروتئین‌های دخیل در فرار از سیستم ایمنی میزبان و قدرت درج در ژنوم میزبان و ورود به فاز خفگی است. به‌همین دلیل مطالعه‌های واکسن علیه این

گردید. بدین منظور استفاده از حامل مناسب، شامل ویروئین های نوترکیب، سلول های دندریتیک، ادجوانتها و نانوذرات، کارایی انتقال درون سلولی آنتی ژن ها و تحریک پاسخ های CTL را بهبود می بخشد (۲۶-۲۸).

علی رغم اینکه ایمونوژنیستی بالای پروتئین ها به تنهایی خاصیت ایمونوژنیسته پایینی دارند ولیکن به عنوان کاندید واکسن ها در مطالعه های گوناگون مورد ارزیابی قرار می گیرند. از سوی دیگر باتوجه به نفوذپذیری ضعیف غشاهای سلولی قابلیت انتقال آنتی ژن به درون سلول ها ضعیف است و از این رو با استفاده از پپتیدهای نفوذپذیر کننده سلولی (CPPs) می توان بر این ضعف غلبه نمود. این گروه از پپتیدها، سبب عبور پروتئین های نوترکیب به صورت کارا و با کمترین سمیت در طی چند دقیقه از بین غشاهای سلولی می شوند (۲۹). IMT-P8 به عنوان یک توالی غنی از آرژنین قابلیت بالایی در برداشت سلولی نشان داده است که دراین تحقیق به عنوان CPP انتخابی همراه آنتی ژن طراحی شده به کار گرفته شد. علاوه بر اهمیت CPP، به کارگیری ادجوانت مناسب به منظور

تحریک مداوم سیستم ایمنی حائز اهمیت است. از پروتئین های مؤثر دربرانگیختن پاسخ ایمنی علیه عفونت-ها می توان از پروتئین های شوک حرارتی (HSP) نام برد. این پروتئین ها فعال کننده های سیستم ایمنی ذاتی هستند و قادر به تحریک تولید سایتوکاین های التهابی توسط سیستم مونوسیت، ماکروفاژ و هم چنین فعالیت و بلوغ سلول های دندریتیک هستند. اتصال HSP ها به کمپلکسهای ویروسی، فعالیت NK Cells و CTL را افزایش می دهد. بررسی فرمولاسیون های متفاوت در این مطالعه نشان داد که آنتی ژن انتخابی Nef-MPER-V3 از قابلیت بالایی در تحریک هر دو بازوی سیستم ایمنی، همورال و سلولی، برخوردار است. در بررسی Tohidi و همکاران از آنتی ژن MPER-V3 جهت بررسی ایمنی-زایی استفاده شد که مشابه با قسمتی از آنتی ژن هدف ما در این بررسی بوده است واز آنجا که MPER-V3 به-عنوان کاندید برای ترشح آنتی بادی است، در این تحقیق نتایج نشان دهنده القا هر دو ایمنی سلولی و همورال بوده است که ایمنی همورال مشابه با بررسی Tohidi به دلیل وجود MPER-V3 بوده است (۲۱). در مطالعه حاضر IgG1 به عنوان شاخص فعالیت Th2 در گروه ایمن شده با آنتی ژن Nef-MPER-V3 آنتی بادی غالب بوده است ($p=0.002$) (شکل ۲)، در حالی که در گروه ایمن شده با IgG2a IMTP8-Nef-MPER-V3 ایزوتایپ غالب

ویروس بیش تر با تمرکز بر روی قسمت های حفاظت شده ژنوم و نیز محصول های دخیل در عفونت-زایی ویروس متمرکز شده است (۱۹). مطالعه های فراوانی در مورد ایمنی زایی توالی های ویروس HIV-1 صورت گرفته است، به گونه ای که امروزه می توان ادعا نمود بسیاری از اپی-توپ های این ویروس مورد شناسایی قرار گرفته است.

براساس مطالعه های انجام گرفته بر روی مدل پریمات ها، مشخص شد که ناحیه Env به عنوان یک فاکتور ضروری برای تولید آنتی بادی های خنثی کننده است که ممکن است عفونت HIV-1 را به واسطه مکانیسم های غیر خنثی کنندگی نیز مهار کند (۲۰). لذا نواحی آنتی ژنی مربوط به Env قابلیت تولید آنتی بادی های خنثی کننده، با تولید تیترا بالایی از این آنتی بادی ها در بدن میزبان قبل از مواجهه با عفونت، منجر به مهار ویروس می گردد (۲۱). ناحیه MPER (Membranc Proximal External Region) جزئی از پروتئین gp41 است که گلیکوپروتئین درون غشایی ویروس است و پروتئین gp120 گلیکوپروتئین سطحی پوشش ویروس است و دارای ناحیه لوپ V3 که در اتصال ویروس به رستپورهای پروتئینی سطح سلول های ایمنی نقش دارد، است. V3 جزئی از پنج ناحیه متغیر gp120 است و نقش مهمی در عفونت ویروس ایفا می کند (۲۲، ۲۳). پروتئین MPER و ناحیه V3 هدف طیف وسیعی از آنتی بادی های خنثی کننده است و به عنوان آنتی ژن توسط سلول های ایمنی شناسایی می شوند از این رو در مطالعه های واکسن به عنوان یک پروتئین ایده آل مورد توجه محققان قرار گرفته اند. تلاش های صورت گرفته در جهت طراحی واکسن هایی با هدف قرار دادن MPER، منجر به تولید آنتی بادی های خنثی کننده با قدرت و گستره زیادی شدند که اهمیت خلق راهکارهای نوینی برای افزایش کارایی واکسن هایی بر پایه این پروتئین و پروتئین های مشابه را دو چندان می کند (۲۴، ۲۵). از سوی دیگر، پروتئین Nef در پاتوژن ویروس دارای اهمیت بالایی است و متشکل از اپی-توپ های ایمونوژن متعددی در سطح بوده که توسط لنفوسیت مورد شناسایی قرار می-گیرد و پاسخ ایمنی قدرتمندی به آن ها داده می شود. در افراد آلوده به این ویروس پاسخ های سایتوتوکسیک قدرتمندی بر علیه اپی-توپ های محافظت شده در پروتئین Nef ایجاد می گردد که مؤید مناسب بودن آن به عنوان کاندید برای طراحی یک واکسن است (۲۶، ۸) در این پژوهش از محصول ژن nef به همراه MPER و V3 به-عنوان کاندید واکسن با فرمولاسیون های متفاوتی استفاده

غالبیت Th1 است. بنابراین نقش استفاده از CCP در شیفتینگ ایمنی همورال مشخص است. از سوی دیگر استفاده از ادجوانت Hp91 نیز باعث شیفت ایمنی به Th1 شده و این در حالی است HSP27 باعث تولید بیش-تر IgG1 گردیده است ($p < 0.05$).

بررسی سایتوکاین ها نشان داد که گروه ایمن شده با IMTP8-Nef-MPER-V3 به همراه ادجوانت Hp91 بیشترین مقدار تولید IFN γ و حد کمی از ترشح IL-10 را داشته اند بنابراین به کارگیری IMT-P8 در فرمولاسیون واکسن کاندید باعث افزایش ترشح IFN γ نسبت به گروه های فاقد این CPP است. نسبت ترشح IFN γ / IL-10 در گروه Hp91 + IMTP8-Nef-MPER-V3 بالاترین سطح را نشان داد که حاکی از تحریک بالای ایمنی سلولی است ($p = 0.006$).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۲۰ انجام شد، توالی ۱۲۰-۱۵۰ پروتئین Nef بر پایه اپی توپ های حفاظت شده انتخاب و به همراه توالی از p24 برای ایمنی زایی موش BALB/c مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه فوق مشابه نتایج این مطالعه حضور قطعه Nef باعث تحریک خوب ایمنی سلولی با فعالیت CTL ها و ترشح IFN γ در فرمولاسیون پروتئین ادجوانت شده با M720 شد (۳۰). Mahdavi و همکاران از فیوژن پروتئین p24-Nef به عنوان آنتی ژن استفاده کردند که شاهد افزایش القای پاسخ سایتوتوکسیک و جهت گیری آن به Th1 و در نتیجه القای پاسخ ایمنی سلولی بودند. مشابه تحقیق حاضر، استفاده از پروتئین nef منجر به فعال شدن IFN γ و CTL شده است (۳۱). هم چنین در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۶ توسط Gautam و همکاران انجام شد سازه IMT-P8-GFP طراحی و نفوذپذیری آن ها به پوست موش بعد از تزریق topical مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان داد که IMT-P8 باعث ورود موفق پروتئین GFP به درون سلول های مذکور شد (۱۷). در مطالعه حاضر نیز IMT-P8 در فرمولاسیون های تزریقی باعث ارائه کارای آنتی ژن مورد هدف و در نتیجه پاسخ بهتر ایمنی سلولی نسبت به گروه های دریافت کننده پروتئین فاقد CPP شد. در مطالعه Sabaghzadeh و همکاران، آنتی ژن Nef-MPER-V3 با پپتید LDP12 به عنوان CPP مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج پژوهش فوق نشان داد که استفاده از این CPP باعث تحریک بیش تر ایمنی سلولی نسبت به آنتی ژن فاقد آن می شود (۳۲). جهت بررسی افزایش قدرت انتقال

آنتی ژن nef به درون سلول، Kadkhodayan و همکاران از tat به عنوان CPP استفاده کردند که نتایج حاکی از میزان انتقال بالای پروتئین nef و در نتیجه میزان جذب درون سلولی ژن Tat-nef در مقایسه با اتصال ژن بدون استفاده از CPP بوده است (۳۳) که در مطالعه حاضر هم مقایسه میزان جذب آنتی ژن در حضور و عدم حضور CPP بیانگر نتایج مشابه بوده است. مشابه یافته های مطالعه های ذکر شده، حضور CPP باعث افزایش ترشح IFN γ شد. تولید این سایتوکاین شاخص تحریک فعالیت ماکروفاژها در پاسخ سلولی است. در مطالعه حاضر نیز تزریق آنتی ژن هدف همراه با پپتید IMT-P8، توانایی بالاتری در تحریک IFN γ نشان داد. تولید این سایتوکاین نمایانگر تحریک فعالیت ماکروفاژها در هر دو گروه پاسخ های ایمنی ذاتی و سلولی آدپتیو است. بنابراین همان طور که در نتایج هم مشخص است افزایش ترشح IL-10 در ای غیر مرتبط با IMT-P8، اثری افزایشی در عمل وابسته به ماکروفاژها دارد در حالی که کاهش ترشح IL-10 در فرمولاسیون های مرتبط با CPP، اثری افزایشی در روند وابسته به IFN γ دارا است. از این رو، میزان تاثیر فرمولاسیون در پاسخ ایجاد شده نیز قابل تامل است.

نتیجه گیری

بر اساس دانش کنونی ما، بیان پروتئین فیوژن نو ترکیب IMT-P8-Nef-MPER-V3 برای اولین بار گزارش می شود. هم چنین، بررسی و مقایسه عملکرد سیستم پپتیدی IMT-P8 با استفاده از ادجوانت های Hsp27 و Hp91 به منظور افزایش کارایی واکسن طراحی شده علیه HIV-1 در موش BALB/c مدنظر بوده است. کاندید واکسن پروتئینی Nef-MPER-V3 واجد IMT-P8 پاسخ های ایمنی همورال و سلولی مؤثرتری را نسبت به واکسن های پروتئینی NEF-MPER-V3 به تنهایی ایجاد نموده و نیز تزریق پروتئین واجد این پپتید انتقال دهنده به همراه ادجوانت Hp91 موجب افزایش سطح پاسخ های سایتوتوکسیک و ایمنی سلولی گردید. بنابراین نتایج این مطالعه بر استفاده مؤثر پپتیدهای انتقال دهنده برای افزایش کارایی واکسن در کنار انتخاب مناسب آنتی ژن و ادجوانت دلالت داشته و نتایج حاصله از قابلیت بالایی برای ارزیابی ایمنی زایی در مدل حیوانی مناسب تر در مطالعه های آتی برخوردار است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از رساله دکتری تخصصی بوده که از حمایت مالی طرح پژوهشی ۹۸۳ انستیتو پاستور ایران برخوردار بوده است .

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

1. Global HIV & AIDS statistics — 2020 fact sheet [Internet]. UNAIDS. 2020 [cited 2020/12/20]. Available from: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.
2. Shin SY. Recent update in HIV vaccine development. *Clin Exp Vaccine Res*. 2016;5(1):6-11.
3. Koff WC. A shot at AIDS. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;42:147-51.
4. Korber B, Fischer W. T cell-based strategies for HIV-1 vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2020;16(3):713-22.
5. Mona SL, Amitis R, Seyed Mehdi S. Updated Studies on the Development of HIV Therapeutic Vaccine. *Current HIV research*. 2019;17(2):75-84.
6. Basmaciogullari S, Pizzato M. The activity of Nef on HIV-1 infectivity. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:232-.
7. Cullen BR. HIV-1 Nef protein: An invitation to a kill. *Nature Medicine*. 1999;5(9):985-6.
8. Foster JL, Garcia JV. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology*. 2008;5(1):84.
9. Veillette M, Desormeaux A, Medjahed H, Gharsallah NE, Coutu M, Baalwa J, et al. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol*. 2014;88(5):2633-44.
10. Liu S, Kondo N, Long Y, Xiao D, Iwamoto A, Matsuda Z. Membrane topology analysis of HIV-1 envelope glycoprotein gp41. *Retrovirology*. 2010;7(1):100.
11. Fatemeh N, Azam B, Seyed Mehdi S, Shiva I. Delivery of HIV-1 Polyepitope Constructs Using Cationic and Amphipathic Cell Penetrating Peptides into Mammalian Cells. *Current HIV research*. 2019;17(6):408-28.
12. Etemad B, Fellows A, Kwambana B, Kamat A, Feng Y, Lee S, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 V1-to-V5 Envelope Variants from the Chronic Phase of Infection Use CCR5 and Fuse More Efficiently than Those from Early after Infection. *Journal of Virology*. 2009;83(19):9694-708.
13. Ruprecht CR, Krarup A, Reynell L, Mann AM, Brandenberg OF, Berlinger L, et al. MPER-specific antibodies induce gp120 shedding and irreversibly neutralize HIV-1. *J Exp Med*. 2011;208(3):439-54.
14. de Taeye SW, de la Peña AT, Vecchione A, Scutigliani E, Sliepen K, Burger JA, et al. Stabilization of the gp120 V3 loop through hydrophobic interactions reduces the immunodominant V3-directed non-neutralizing response to HIV-1 envelope trimers. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(5):1688-701.
15. Garcia-Perez J, Staropoli I, Azoulay S, Heinrich J-T, Cascajero A, Colin P, et al. A single-residue change in the HIV-1 V3 loop associated with maraviroc resistance impairs CCR5 binding affinity while increasing replicative capacity. *Retrovirology*. 2015;12(1):50.
16. Sabaghzadeh S, Sadat SM, Rohollah F, Bolhassani A. Effective Delivery of Nef-MPER-V3 Fusion Protein Using LDP12 Cell Penetrating Peptide for Development of Preventive/Therapeutic HIV-1 Vaccine. *Protein and peptide letters*. 2020;27(11):1151-8.
17. Gautam A, Nanda JS, Samuel JS, Kumari M, Priyanka P, Bedi G, et al. Topical Delivery of Protein and Peptide Using Novel Cell Penetrating Peptide IMT-P8. *Scientific Reports*. 2016;6(1):26278.

18. Jahedian S, Sadat SM, Javadi GR, Bolhassani A. Production and Evaluation of the Properties of HIV-1-Nef-MPER-V3 Fusion Protein Harboring IMT-P8 Cell Penetrating Peptide. *Current HIV research*. 2020;18(5):315-23.
19. Mona SL, Seyed Mehdi S, Amitis R. HIV-1 Immune evasion: The main obstacle toward a successful vaccine. *Archives of Asthma, Allergy and Immunology*. 2018;2(1):013-5.
20. Excler JL, Robb ML, Kim JH. Prospects for a globally effective HIV-1 vaccine. *Vacc*. 2015; 33: 1-9.
21. Tohidi F, Sadat SM, Bolhassani A, Yaghobi R. Immunological Evaluation of HIV-1 VLP Harboring ^{MPER-V3} in BALB/c Mice Model. *Patho Res*. 2018; 21(2): 95-100.
22. Rajarapu GJJOP, Biology E. Genes and Genome of HIV-1. 2013:1-7.
23. Chiou SH, Freed EO, Panganiban AT, Kenealy WR. Studies on the role of the V3 loop in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein function. *AIDS research and human retroviruses*. 1992;8(9):1611-8.
24. Carravilla P, Chojnacki J, Rujas E, Insausti S, Largo E, Waithe D, et al. Molecular recognition of the native HIV-1 MPER revealed by STED microscopy of single virions. *Nature Communications*. 2019;10(1):78.
25. Wang Y, Kaur P, Sun Z-YJ, Elbahnasawy MA, Hayati Z, Qiao Z-S, et al. Topological analysis of the gp41 MPER on lipid bilayers relevant to the metastable HIV-1 envelope prefusion state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(45):22556-66.
26. Mona SL, Seyed Mehdi S, Azam B, Mohammad Hassan P, Golnaz B, Amitis R. In Silico Design and Immunologic Evaluation of HIV-1 p24-Nef Fusion Protein to Approach a Therapeutic Vaccine Candidate. *Current HIV research*. 2018;16(5):322-37.
27. Mona SL, Sadat SM, Bolhassani A, Ramezani A. A Shot at Dendritic Cell-Based Vaccine Strategy against HIV-1. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*. 2020;7(4):89-92.
28. Mona SL, Mohammad Hassan P, Seyed Mehdi S, Amitis R. Production of Recombinant HIV-1 p24-Nef Protein in Two Forms as Potential Candidate Vaccines in Three Vehicles. *Current Drug Delivery*. 2020;17(5):387-95.
29. Guo Z, Peng H, Kang J, Sun D. Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications. *Biomed Rep*. 2016; 4(5): 528-34.
30. Larijani MS, Sadat SM, Bolhassani A, Khodaie A, Pouriayevali MH, Ramezani A. HIV-1 p24-nef DNA Vaccine plus Protein Boost Expands T-Cell Responses in BALB/c. *Current drug delivery*. 2020.
31. Mahdavi M., Ebtakar M. Zuhair MH, Faezi S., Hamidreza Khorram Khorshid HK., Taghizadeh M, et al. An HIV-1 Mini Vaccine Induced Long-lived Cellular and Humoral Immune Responses. *Int J Mol Cell Med*, 2015, 4(4) 218.
32. Sabaghzadeh S, Rohollah F, Sadat SM, Bolhassani A. Immunological Evaluation of HIV-1 Nef-MPER-V3 Harboring LDP12 Penetrating Peptide in BALB/c Mice. *jumsjmj*. 2020;18(3):32-42.
33. Kadkhodayan S. Bolhassani A. Sadat SM, Irani S. Fotouhi F. The Efficiency of Tat Cell Penetrating Peptide for Intracellular Uptake of HIV-1 Nef Expressed in E. coli and Mammalian Cell. *Cur Drug Deliv* 2017, 14(4): 536.

