NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.11/44 , 2021

Scan online to view this article

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

Shekoufa Jahedian [1], Seyed Mehdi Sadat [2*], Gholam Reza Javadi [1], Azam Bolhassani [2]

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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.7.1]

Corresponding author:
Department of Hepatitis, AIDS and Blood-borne diseases, Pasteur Institute of Iran. Tehran, Iran.
Email: mehdi_sadat@pasteur.ac.ir

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۱ - شماره۴۴ - پاییز ۱۴۰۰
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بررسی ایمنی‌زایی Nef-MPER-V3 ویروس HIV-1 واجد پروتئین نفوذ کننده IMT-P8 در موش BALB/c

شکوفا جاهدیان[1]، سید مهدی سادات[2*]، غلامرضا جوادی[1]، اعظم بوالحسنی[2]

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 ایمونوژنیسیتی IMT-P8-Nef-MPER-V3، ۱۱گروه متفاوت از موش ماده BALB/c با تزریق سه دوز از آنتی‌ژن به‌همراه یا بدون ادجوانت‌های 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 نسبت‌به 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 وتیتر IFN-γ در مقایسه با سایر گروه‌ها داشته و در نتیجه فعالیت Th1 را نشان داد.

نتیجه‌گیری: IMTP8-Nef-MPER-V3 به‌کار گرفته شده به‌همراه HP91 از قابلیت بالایی در تحریک سیستم ایمنی برخوردار بوده و پتانسیل بررسی‌های آتی به‌عنوان یک کاندید واکسن علیه HIV-1 را دارا است.

واژگان کلیدی: HIV-1، واکسن،Nef-MPER-V3، IMT-P8،CPP، 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 به‌دست 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 (۵-۳). در مطالعه‌های واکسن علیه این ویروس، ژن‌های متفاوتی به‌صورت 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.7.1]

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 می-شود. پروتئین Nef بسیار پلی‌مورفیک بوده و در پاتوژنز ویروس نقش مهمی داشته و به‌عنوان یک فاکتور ویرولانس 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 وgp41 تبدیل می‌شود. با مقایسه توالی اسیدهای آمینه gp120 در انواع پریمات‌ها 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 اکتودمین (اسید آمینه‌های ۶۶۰ تا ۶۸۳) به نام MPER در طراحی واکسن مورد توجه قرار گرفته است. ناحیه خارجی مجاور غشاء از gp41 (MPER) 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 V2, V1و 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 (۱۵،۱۴).

علاوه بر انتخاب آنتی‌ژن در طراحی واکسن، انتخاب سیستم انتقال و ارائه آن در *in vivo* حائز اهمیت است. باتوجه به کاهش کارآیی پروتئین‌های درمانی به‌واسطه نفوذپذیری انتخابی غشاهای سلولی، به‌کارگیری پپتیدهای نفوذپذیرکننده سلولی (CPPs) در مطالعه-های 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 پروتیینی 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.7.1]

موش‌ها به ۱۱ گروه پنج‌تایی (جدول ۱) به‌شکل تصادفی تقسیم شدند. تزریق‌ها به‌تعداد سه بار و به‌فاصله سه هفته-ای، به‌صورت زیرجلدی به‌مقدار نهایی۱۰۰میکرولیتر 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.

جدول۱. برنامه ایمنی‌زایی گروه‌های مختلف موشی

گروه	تزریق اول	تزریق یادآور ۱	تزریق یادآور ۲
۱ (کنترل)	PBS[1]	PBS	PBS
۲ (کنترل C/IFA)	CFA[2]	IFA[3]	IFA
۳ (کنترل)	Hsp27[3]	Hsp27	Hsp27
٤ (کنترل)	Hp91[4]	Hp91	Hp91
٥	Nef-MPER-V3	Nef-MPER-V3	Nef-MPER-V3
٦	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

[1]بافر فسفات سالین، [2]ادجوانت کامل و[3] ناقص فروند، [4]ادجوانت پروتئین شوک حرارتی ۲۷، [5]ادجوانت HMGB1-derived peptide91

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 مایع‌رویی، 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 میلی لیتر محیط کامل RPMI اضافه و رسوب سلولی در آن حل شده و درنهایت سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند.

بررسی ایمنی هومورال 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 هپاتیت 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 دمای۳۷°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. درنهایت، پس از شست و شوی نهایی سوبسترای رنگ‌زای TMB (Tehtramethylbenzidine) اضافه شده و درنهایت با به‌کارگیری محلول متوقف کننده (H_2SO_4, 0.5 N)، 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 طیق لیبل مشخص آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG1، IgG2a و IgG2b(Sigma, USA)، 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. درنهایت 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.7.1]

پروتئین نوترکیب Nef-MPER-V3 با غلظت نهایی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در دمای ۳۷°C و در حضور CO_2 ۵٪ به‌مدت 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.

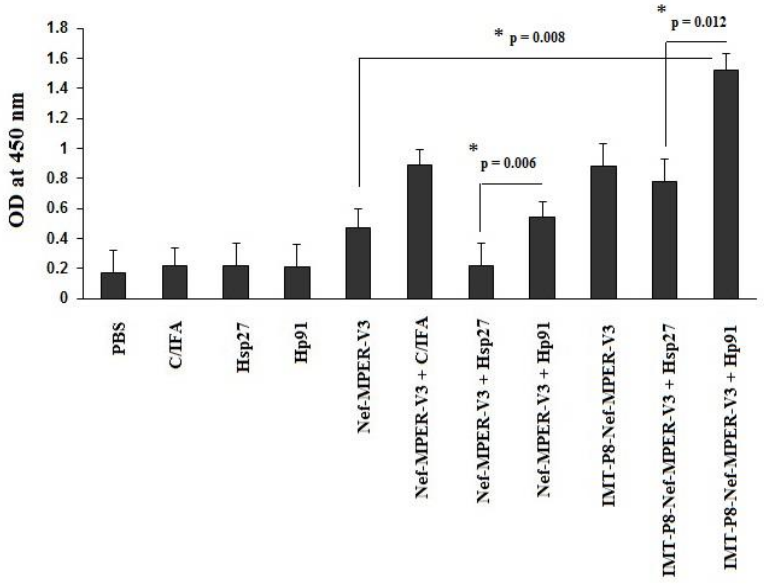
بررسی و تجزیه تحلیل داده‌ها

تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون‌های من ویتنی روی متغیرها شامل مقدار آنتی‌بادی تولید شده و ترشح سایتوکاین‌ها انجام شد. کلیه آزمون‌ها سه بار تکرار شدند و مقدار $p< ۰/۰۵$ از نظر آماری معنادار تلقی شد.

یافته‌ها

پاسخ ایمنی هومورال

در بررسی پاسخ ایمنی هومورال 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 نسبت‌به گروه کنترل، آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن استفاده شده تولید شده است.



شکل ۱. آنالیز پاسخ‌های ایمنی هومورال (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 به‌صورت بار در هر ستون نمایش داده شده است.

درگروه ایمن شده با آنتی ژن IMTP8-Nef-MPER-V3 سطح بالاتری از IgG نسبت‌به گروه واکسینه شده با آنتی‌ژنNef-MPER-V3 مشاهده گردید (p=۰/۰۲) 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 نسبت‌به گروه کنترل بالاتر ارزیابی شد ($p< ۰/۰۵$). 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.

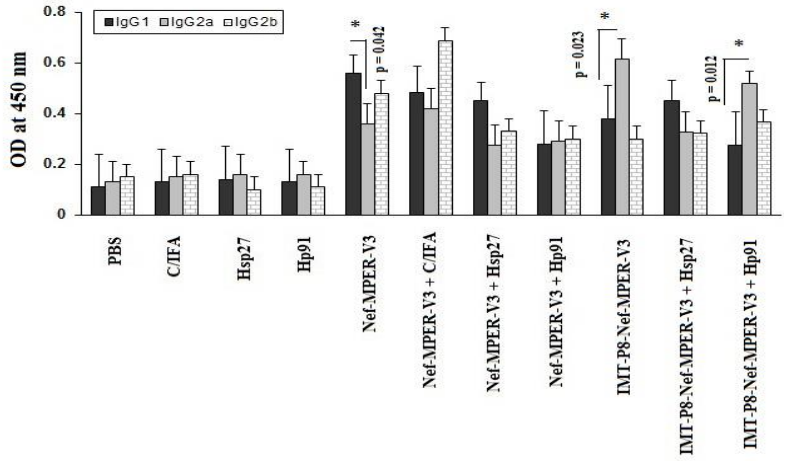
در بررسی ایزوتایپ‌های IgG مشخص گردید که IgG1 در گروه ایمن شده با آنتی‌ژن Nef-MPER-V3 آنتی‌بادی غالب بوده است (p= ۰/۰۰۲) که حاکی از فعالیت غالب Th2 است (شکل۲). اما در گروه ایمن شده با IMTP8-Nef-MPER-V3 ایزو تایپ غالب IgG2a و غالبیت Th1 است. استفاده از ادجوانت Hp91 نیز باعث شیفت ایمنی به‌سمت پاسخ Th1 شده و این در حالی‌ست HSP27 باعث تولید بیش‌تر IgG1 گردیده است ($p< ۰/۰۵$).

ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی و سنجش سایتوکاین

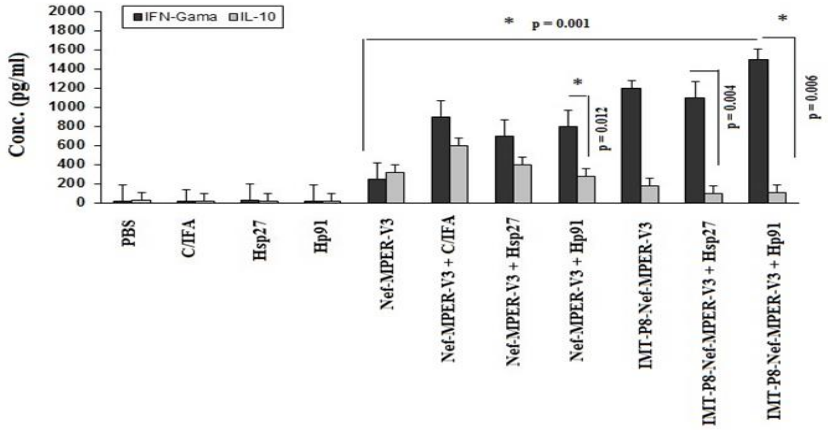
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.7.1]

همان‌گونه که درشکل ۳ مشاهده می‌شود، گروه موشی ایمن شده با IMTP8-Nef-MPER-V3 به‌همراه ادجوانت Hp91 بیش‌ترین مقدار ترشح IFN-γ را داشته‌اند (p=۰/۰۰۶)، اما ترشح IL-10 در حداقل ارزیابی شد. هم‌چنین به‌کارگیری IMT-P8 در فرمولاسیون واکسن کاندید باعث افزایش ترشح این سایتوکاین نسبت‌به گروه‌های 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=۰/۰۰۶).



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 IFN-γ و IL-10 در گروه‌های موشی ایمن شده پس از ایمن‌سازی گروه‌های موشی. سلول‌های طحال به وسیله پروتئین Nef-MPER-V3 با غلظت ۱۰ µM 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<۰/۰۵) است.

بحث

از زمان شناسایی عامل بیماری AIDS، روش‌های درمانی و نیز کاندیداهای 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 ورورد به فاز خفتگی است. به‌همین دلیل مطالعه‌های واکسن علیه این

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.7.1]

ویروس بیش‌تر با تمرکز برروی قسمت‌های حفاظت شده ژنوم و نیز محصول‌های دخیل در عفونت-زایی ویروس متمرکز شده است (۱۹). مطالعه‌های فراوانی در مورد ایمنی‌زایی توالی‌های ویروس HIV-1 صورت گرفته است، به‌گونه‌ای که امروزه می‌توان ادعا نمود بسیاری از اپی-توپ‌های این ویروس مورد شناسایی قرار گرفته است.

براساس مطالعه‌های انجام گرفته بر روی مدل پریمات‌ها، مشخص شد که ناحیه Env به‌عنوان یک فاکتور ضروری برای تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده است که ممکن است عفونت HIV-1 را به‌واسطه مکانیسم‌های غیر خنثی‌کنندگی نیز مهار کند (۲۰). لذا نواحی آنتی‌ژنی مربوط به Env قابلیت تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده، با تولید تیتر بالایی از این آنتی‌بادی‌ها در بدن میزبان قبل از مواجه باعفونت، منجر به مهار ویروس می‌گردد (۲۱). ناحیهMPER (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 رسپتورهای پروتئینی سطح سلول‌های ایمنی نقش دارد، است. V3 جزئی از پنج ناحیه متغیر gp120 است و نقش مهمی در عفونت ویروس ایفا می‌کند (۲۳،۲۲). پروتئین MPER و ناحیه V3 هدف طیف وسیعی از آنتی‌بادی-های خنثی کننده است و به‌عنوان آنتی‌ژن توسط سلول-های ایمنی شناسایی می‌شوند از این‌رو در مطالعه‌های واکسن به‌عنوان یک پروتئین ایده‌ال مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند. تلاش‌های صورت گرفته در جهت طراحی واکسن‌هایی با هدف قرار دادن MPER، منجر به تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده با قدرت و گستره زیادی شدند که اهمیت خلق راهکارهای نوینی برای افزایش کارایی واکسن‌هایی بر پایه این پروتئین و پروتئین‌های مشابه را دو چندان می‌کند (۲۵،۲۴). از سوی دیگر، پروتئین Nef در پاتوژنز ویروس دارای اهمیت بالایی است و متشکل از اپی‌توپ‌های ایمونوژن متعددی در سطح بوده که توسط لنفوسیت مورد شناسایی قرار می-گیرد و پاسخ ایمنی قدرتمندی به آن‌ها داده می‌شود. در افراد آلوده به این ویروس پاسخ‌های سایتوتوکسیک قدرتمندی برعلیه اپی‌توپ‌های محافظت شده در پروتئین Nef ایجاد می‌گرددکه مؤید مناسب بودن آن به‌عنوان کاندید برای طراحی یک واکسن است (۲۶،۸) در این پژوهش از محصول ژن *nef* به‌همراه MPER و V3به-عنوان کاندید واکسن با فرمولاسیون‌های متفاوتی استفاده گردید. بدین‌منظور استفاده از حامل مناسب، شامل ویریون‌های نوترکیب، سلول‌های دندریتیک، ادجوانت‌ها و نانوذرات، کارایی انتقال درون سلولی آنتی‌ژن‌ها و تحریک پاسخ‌های CTL را بهبود می‌بخشد (۲۶-۲۸).

علی‌رغم اینکه ایمنوژنیستی بالای پروتئین‌ها به تنهایی خاصیت ایمونوژنیسیته پایینی دارند ولیکن به‌عنوان کاندید واکسن‌ها در مطالعه‌های گوناگون مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. از سوی دیگر باتوجه‌به نفوذپذیری ضعیف غشاهای سلولی قابلیت انتقال آنتی‌ژن به درون سلول‌ها ضعیف است و از این‌رو با استفاده از پپتیدهای نفوذپذیر کننده سلولی (CPPs) می‌توان بر این ضعف غلبه نمود. این گروه از پپتیدها، سبب عبور پروتئین‌های نوترکیب به‌صورت کارا و با کم‌ترین سمیت در طی چند دقیقه از بین غشاهای سلولی می‌شوند (۲۹). IMT-P8 به‌عنوان یک توالی غنی از آرژنین قابلیت بالایی در برداشت سلولی نشان داده است که دراین تحقیق به‌عنوان CPP انتخابی همراه آنتی‌ژن طراحی شده به‌کار گرفته شد. علاوه‌بر اهمیت CPP، به‌کارگیری ادجوانت مناسب به‌منظور تحریک مداوم سیستم ایمنی حائز اهمیت است. از پروتئین‌های مؤثر دربرانگیختن پاسخ ایمنی علیه عفونت-ها می‌توان از پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) نام برد. این پروتئین‌ها فعال کننده‌های سیستم ایمنی ذاتی هستند و قادر به تحریک تولید سایتوکاین‌های التهابی توسط سیستم مونوسیت، ماکروفاژ و هم‌چنین فعالیت و بلوغ سلول‌های دندریتیک هستند. اتصالHSP ها به کمپلکسهای ویروسی، فعالیت NK Cells و CTL را افزایش می‌دهد. بررسی فرمولاسیون‌های متفاوت در این مطالعه نشان داد که آنتی‌ژن انتخابی Nef-MPER-V3 از قابلیت بالایی در تحریک هر دو بازوی سیستم ایمنی، هومورال و سلولی، برخوردار است. در بررسی Tohidi و همکاران از آنتی‌ژن MPER-V3 جهت بررسی ایمنی-زایی استفاده شد که مشابه با قسمتی از آنتی‌ژن هدف ما در این بررسی بوده است واز آنجا که MPER-V3 به-عنوان کاندید برای ترشح آنتی‌بادی است، در این تحقیق نتایج نشان دهنده القا هر دو ایمنی سلولی و هومورال بوده است که ایمنی هومورال مشابه با بررسی Tohidi به‌دلیل وجود MPER-V3 بوده است (۲۱). در مطالعه حاضر IgG1 به‌عنوان شاخص فعالیت Th2در گروه ایمن شده با آنتی‌ژن Nef-MPER-V3 آنتی‌بادی غالب بوده است (p=۰/۰۰۲) (شکل ۲)، در حالی‌که در گروه ایمن شده با IMTP8-Nef-MPER-V3 ایزوتایپ غالب IgG2a و

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.7.1]

غالبیت Th1 است. بنابراین نقش استفاده از CCP در شیفتینگ ایمنی هومورال مشخص است. از سوی دیگر استفاده از ادجوانت Hp91 نیز باعث شیفت ایمنی به Th1 شده و این در حالی‌ست HSP27 باعث تولید بیش-تر IgG1 گردیده است (p<۰/۰۵).

بررسی سایتوکاین‌ها نشان داد که گروه ایمن شده با IMTP8-Nef-MPER-V3 به‌همراه ادجوانت Hp91 بیش‌ترین مقدار تولید IFNy و حد کمی از ترشح IL-10 را داشته‌اند بنابراین به‌کارگیری IMT-P8 در فرمولاسیون واکسن کاندید باعث افزایش ترشح IFN-γ نسبت‌به گروه‌های فاقد این CPP است. نسبت ترشح IFNy/ IL-10 در گروه IMTP8-Nef- + Hp91 MPER-V3، بالاترین سطح را نشان داد که حاکی از تحریک بالای ایمنی سلولی است (p= ۰/۰۰۶).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۰ انجام شد، توالی ۱۲۰-۱۵۰ پروتئین Nef بر پایه اپی‌توپ‌های حفاظت شده انتخاب و به‌همراه توالی از p24 برای ایمنی‌زایی 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 ازفیوژن پروتئین p24-Nef به‌عنوان آنتی‌ژن استفاده کردند که شاهد افزایش القای پاسخ سایتوتوکسیک و جهت‌گیری 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). هم‌چنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ توسط Gautam و همکاران انجام شد سازه IMT-P8-GFP طراحی و نفوذپذیری آن‌ها 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 سلول‌های مذکور شد (۱۷). در مطالعه حاضر نیز IMT-P8 در فرمولاسیون-های تزریقی باعث ارائه کارای آنتی‌ژن مورد هدف و در نتیجه پاسخ بهتر ایمنی سلولی نسبت‌به گروه‌های دریافت کننده پروتئین فاقد CPP شد. در مطالعه Sabaghzadeh و همکاران، آنتی‌ژن Nef-MPER-V3 با پپتید LDP12 به‌عنوان CPP مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج پژوهش فوق نشان داد که استفاده از این CPP باعث تحریک بیش‌تر ایمنی سلولی نسبت‌به آنتی ژن فاقد آن می‌شود (۳۲). جهت بررسی افزایش قدرت انتقال آنتی‌ژن nef به درون سلول، Kadkhodayan و همکاران از tat به‌عنوان CPP استفاده کردند که نتایج حاکی از میزان انتقال بالای پروتئین nef و در نتیجه میزان بالای 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 آنتی‌ژن در حضور و عدم حضور CPP بیانگر نتایج مشابه بوده است. مشابه یافته-های مطالعه‌های 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 آنتی‌ژن 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 پاسخ‌های ایمنی ذاتی و سلولی آداپتیو است. بنابراین همان‌طور که در نتایج هم مشخص است افزایش ترشح IL-10 در ای غیرمرتبط با IMT-P8، اثری افزایشی در عمل وابسته به ماکروفاژها دارد در حالی‌که کاهش ترشح IL-10 در فرمولاسیون‌های مرتبط با CPP، اثری افزایشی در روند وابسته‌به IFN-γ دارا است. از این‌رو، میزان تاثیر فرمولاسیون در پاسخ ایجاد شده نیز قابل تامل است.

نتیجه‌گیری

براساس دانش کنونی ما، بیان پروتئین فیوژن نوترکیب IMT-P8-Nef-MPER-V3 برای اولین بار گزارش می شود. هم‌چنین، بررسی و مقایسه عملکرد سیستم پپتیدی IMT-P8 با استفاده از ادجوانت‌های Hsp27 و Hp91 به‌منظور افزایش کارآیی واکسن طراحی شده علیه HIV-1 در موش BALB/c مدنظر بوده است. کاندید واکسن پروتئینی Nef-MPER-V3 واجد IMT-P8 پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی مؤثرتری را نسبت-به واکسن‌های پروتئینی NEF-MPER-V3 به‌تنهایی ایجاد نموده و نیز تزریق پروتئین واجد این پپتید انتقال دهنده به‌همراه ادجوانت HP91 موجب افزایش سطح پاسخ‌های سایتوتوکسیک و ایمنی سلولی گردید. بنابراین نتایج این مطالعه بر استفاده مؤثر پپتیدهای انتقال دهنده برای افزایش کارآیی واکسن در کنار انتخاب مناسب آنتی‌ژن و ادجوانت دلالت داشته و نتایج حاصله از قابلیت بالایی برای ارزیابی ایمنی‌زایی در مدل حیوانی مناسب‌تر در مطالعه‌های آتی برخوردار است.

سپاسگزاری

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.7.1]

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

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.7.1]

منابع

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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.7.1]

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., Ebtekar 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.7.1]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.7.1]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-08-30]