

طراحی، ساخت و ارزیابی بیان پلاسمید نو ترکیب pIRES-Igk/mIL18/Fc با هدف استفاده در مطالعات واکسن

محمد حسن پوری‌ای ولی^۱، آرش رضا معمارنژادیان^۲، سید مهدی سادات^۳، مهدی زوار^۱، سید داوود سیادت^۴،
کریستین هارطونیان^۵، محمدرضا آقاصادقی^{۲*}

- ۱- کارشناس ارشد، گروه هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۳- دکتری تخصصی، گروه هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، گروه هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۵- دکتری تخصصی، بخش ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۹۰/۰۴/۰۴

دریافت مقاله: ۸۹/۱۲/۲۱

چکیده

هدف: اینترلوکین ۱۸ سایتوکاینی است که نقش مهمی در پاسخ سلول‌های T کمکی نوع یک بازی می‌کند و بنابراین پلاسمید بیان کننده آن، به عنوان یک ادجوانت قوی ژنتیکی در زمینه مطالعه واکسن‌های DNA به شمار می‌رود. در این مطالعه پلاسمید جفت بیانی کد کننده اینترلوکین ۱۸، ترشچی (و به صورت متصل با قسمتی از FCγ2a) ساخته شد و بیان این سایتوکین نو ترکیب ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: RNA از سلول‌های تحریک شده طحال موش استخراج و با استفاده از RT-PCR قطعات cDNA متعلق به اینترلوکین ۱۸ موشی (mIL-18) و بخشی از توالی FCγ2a ساخته شد. در ادامه به منظور ساخت قطعه mIL-18/Fc ابتدا قطعات FC و اینترلوکین ۱۸ موشی در پلاسمید pSL1180 وارد شده و سپس این قطعه در پلاسمید pSectag2a به منظور اضافه شدن توالی نشانه کاپای ایمنوگلوبولین (Igk) کلون شد. در نهایت pIRES-Igk/mIL-18/Fc در میان سایت آنزیمی *NheI/XmaI*، پایین دست ناحیه پروموتوری سیستم گالو ویروس، در ناقل pIRES2-EGFP کلون و پلاسمید pIRES-Igk/mIL-18/Fc ساخته شد. سپس این پلاسمید در رده سلولی HEK293T به وسیله محلول ترانسفکشن توربوفکت ترانسفکت شده و بیان آن با روش الایزا ارزیابی شد. **نتایج:** بررسی هضم آنزیمی پلاسمیدهای pSL-mIL-18/Fc، pSL-mIL-18/Fc، pSec-mIL-18/Fc و pIRES-Igk/mIL-18/Fc با استفاده از آنزیم‌های اختصاصی مورد استفاده در کلونینگ، منجر به جداسازی قطعات مورد انتظار شد و سپس درستی ترادف و قالب بیان پلاسمید pIRES-Igk/mIL-18/Fc با روش توالی‌یابی تأیید شد. علاوه بر این بیان و ترشح سایتوکین نو ترکیب در محلول رویی سلول‌های ترانسفکت شده HEK293T در مقایسه با کنترل ترانسفکت تأیید شد.

نتیجه‌گیری: در حالی که پلاسمید pIRES-Igk/mIL-18/Fc قابلیت کلونینگ و بیان آنتی‌ژن مد نظر را داشته، همچنین قابلیت بیان پروتئین اینترلوکین ۱۸ را به عنوان یک ادجوانت قوی ژنتیکی را به همراه دارد. این نتایج در طراحی یک واکسن DNA کارا به منظور ارتقای پاسخ ایمنی سلولی مفید بوده و علاوه بر این هدفی جدید در راستای دستیابی به نسل جدید از واکسن DNA به حساب می‌آید.

کلیدواژگان: اینترلوکین ۱۸، پلاسمید جفت بیانی، ادجوانت ژنی، IRES

*نشانی مکاتبه: تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه هیاتیت و ایدز، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

Email: mrasadeghi@pasteur.ac.ir

۱- مقدمه

اینترلوکین ۱۸ (Interleukin 18: IL-18) یک سایتوکین پیش التهابی و یک فاکتور القا کننده تولید اینترفرون گاما (Interferon gamma: IFN- γ) محسوب می شود که تولید IFN- γ را در سلول های NK (Natural Killer) و CTL (Cytotoxic T Lymphocyte) القا کرده [۱] و همچنین خاصیت سلول کشی وابسته به Fas (Fas-Dependent Cytotoxicity) و پرفورین (Perforin) را در این سلول ها بالا می برد [۲]، از سوی دیگر این سایتوکین نقش اساسی در فعالیت کمکی لنفوسیت ها Th1 (T helper 1) دارد [۲] و بیان GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)، سایتوکین های التهابی همچون TNF (Tumor Necrosis Factor)، IL-13 و کموکین های (Chemokines) چون IL-8 را القا می کند [۲، ۳]. از نظر ساختمانی IL-18 متعلق به خانواده، ابر خانواده IL-1 است و همانند IL-1 β در فرم پیش ساز غیرفعال و غیرترشحی سنتز می شود [۴] خصوصیت بارز این سایتوکین در تحریک سلول های NK و CTL و به دنبال آن افزایش فعالیت کشندگی این سلول ها موجب شده که استفاده از این سایتوکین در تحقیقات تولید واکسن و ایمنی درمانی تومورها بسیار مورد توجه قرار گیرد [۵، ۶]. عملکرد این سایتوکین در دفاع در مقابل بیماری های درون و برون سلولی همچون مایکوباکتریوم (*Mycobacterium*)، لیشرمانیا (*Leishmania*)، توکسوپلازما (*Toxoplasma*)، سالمونلا (*Salmonella*)، یرسینیا (*Yersinia*) و کریپتوکوکوس (*Cryptococcus*) حاکی از نقش محوری این سایتوکین در راه اندازی و تهییج سیستم ایمنی در مواجهه با عوامل بیگانه است [۴، ۵]. بنابراین می توان از این سایتوکین به عنوان یک ادجوانت (Adjuvant) کارآمد در افزایش بهره وری واکسن ها، به خصوص واکسن های DNA، که به تنهایی قدرت ایمنی زایی پایینی دارد، استفاده کرد [۷]. ژن سازنده IL-18 در بازوی بلند کروموزوم ۱۱ قرار داشته و از ۶ (در انسان) یا ۷ (در موش) اگزون تشکیل شده است [۴]. این پروتئین ابتدا به صورت پیش ساز غیرفعال pro-IL-18 با وزن

مولکولی ۲۴ کیلودالتون توسط طیف وسیعی از سلول ها به ویژه سلول های تک هسته ای، ماکروفاژها و سلول های دندریتیک (Dendritic Cells) ساخته می شود که به دنبال شکسته شدن ۳۵ (در موش) یا ۳۶ (در انسان) اسید آمینه ابتدای آمینی pro-IL-18 توسط آنزیم پروتئولیتیک کاسپاز ۱ (Caspase-1) [معروف به آنزیم تغییر دهنده IL-1 β یا ICE (-IL-1 beta)] فرم بالغ و فعال (IL-18 بالغ) با وزن مولکولی حدود ۱۸ کیلودالتون و ۱۵۷ اسید آمینه حاصل می شود [۴]. IL-18 فاقد توالی رهبر (Leader Sequence) بوده و به شکل میکرووزیکول (Mirovesicle) ترشح می شود و برش ناشی از کاسپاز ۱ در تسهیل ترشح فرم بالغ و فعال IL-18، از سیتوزول و غشای سلول نقش مؤثری دارد [۸]. اگرچه استفاده از پلاسمید بیان کننده فرم بالغ IL-18 به عنوان ادجوانت ژنتیکی در کنار DNA واکسن های متعدد گزارش شده است اما نتایج نشان می دهند که بدون پردازش pro-IL-18 توسط کاسپاز ۱ ترشح فرم بالغ IL-18 بسیار ناکارآمد و محدود به مرگ برنامه ریزی شده سلولی (Apoptosis)، مرگ یا پاره شدن سلول است [۹]. به این ترتیب در برخی گزارش ها با هدف افزایش ترشح، پلاسمید حاوی cDNA کاسپاز ۱ هم در کنار پلاسمید بیان کننده pro-IL-18 به حیوان تزریق شده است که افزایش ترشح و متقابلاً پاسخ ایمنی را به دنبال داشته است [۱۰]. استراتژی مورد قبول دیگر اتصال فرم بالغ IL-18 به توالی پپتید نشانه سایر پروتئین های ترشحی مانند هورمون پاراتیروئید [۱۱] یا زنجیره کاپای ایمونوگلوبولین [۱۲] است که ترشح فرم بالغ و فعال IL-18 را موجب می شود. با این روش می توان پلاسمید بیان کننده فرم بالغ IL-18 را به شکل یک ادجوانت مولکولی استفاده کرد و در عین حال از ترشح پروتئین نیز اطمینان داشت. از جمله راه کارهایی که در چند سال اخیر به منظور افزایش نیمه عمر و اثر بخشی ادجوانت های مولکولی در نظر گرفته شده است استفاده از پلاسمیدهایی است که ادجوانت مورد نظر را به صورت نو ترکیب با ناحیه ثابت زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین FC γ 2a بیان می کند [۱۳، ۱۴].

اضافه کردن قطعاتی از FCγ2a و Igk به این ادجوانت، نیمه عمر فعالیت این سایتوکین افزایش یافته و از سوی دیگر قابلیت ترشح به محیط خارج سلولی را پیدا کرده است که هر دو استراتژی در توسعه عملکرد ایمنی‌زایی این سایتوکین نقش مؤثری دارد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- حیوان آزمایشگاهی و رده سلولی

موش‌های BALB/c چهار تا شش هفته‌ای از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. رده سلولی HEK293T و KG-1 (Human Myelomonocytic Leukemia) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌های HEK293T در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, UK Roswell Park) RPMI 1640 در محیط کشت KG-1 (Memorial Institute 1640; Gibco, UK) در شرایط دمایی ۳۷ درجه با CO₂ ۵ درصد کشت داده شدند. از دیگر مواد افزوده شده به هر دو محیط کشت شامل ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Fetal Calf Serum: FCS) (Gibco, UK) و ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین (L-Glutamine) و همچنین ۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Sigma; UK) و ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Sigma; UK) است.

۲-۲- مواد مورد استفاده

کانکاوآلین A (Concanavalin A: Con A) از شرکت (Sigma; UK) که با آب مقطر در غلظت نهایی ۲۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر تهیه و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیت الایزای تشخیصی IL-18 موشی (IL-18: mIL-18) از شرکت (Bender MedSystems; Austria) و همچنین کیت الایزای IFN-γ از شرکت U-CyTech Bioscience (Netherlands) خریداری شد. کیت استخراج مجموع RNA

فرضیه‌های مختلفی برای توجیه این افزایش کارایی مطرح است که طبق مستدل‌ترین آن‌ها وجود IgFc باعث اتصال مولکول نوترکیب به گیرنده‌های Fc در سطح سلول‌های مختلف درگیر در پاسخ ایمنی [مانند لنفوسیت‌های B، T و سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن یا (Antigen-Presenting Cells) APC] شده و تحریک ساخت و ترشح سایتوکین/کموکین‌های مختلف را توسط این سلول‌ها موجب می‌شود [۱۴]. این در حالی است که ادجوانت مولکولی استفاده شده نیز به صورت مستقل فعالیت زیستی خود را اعمال می‌کند و به این ترتیب ادجوانت متصل به FCγ2a اثربخشی بیشتری را نشان خواهد داد.

در اکثر مطالعاتی که از ادجوانت‌های ژنتیکی برای ارتقای پاسخ ایمنی استفاده کرده‌اند، اغلب پلاسمید بیان کننده پروتئین ادجوانت با DNA واکسن بیان کننده آنتی ژن مخلوط شده و به حیوان تزریق شده است. این در حالی است که برخی گزارش‌ها نشان داده‌اند که می‌توان از ناقل‌های جفت بیانی (Bicistronic) نیز برای اثربخشی بهتر ادجوانت‌های ژنی استفاده نمود. از جمله خصوصیات این نوع ناقل‌ها این است که دو ناحیه بیانی مختلف تحت کنترل یک پروموتور ویژه یک mRNA تولید کرده که در آن پروتئین ابتدایی، تحت مکانیسم وابسته به cap تولید شده و پروتئین ثانویه، با کمک توالی ویژه محل داخلی ورود ریبوزوم (Internal Ribosome Entry Site: IRES) تولید می‌شود [۱۵]. مطالعات جدید نشان داده است که اگر ژن بیان کننده آنتی‌ژن و ادجوانت هر دو به وسیله یک پلاسمید بیان شوند، پاسخ ایمنی ایجاد شده به مراتب قوی‌تر خواهد بود [۱۶]. به عبارت دیگر؛ عرضه همزمان آنتی‌ژن و ادجوانت توسط سلول‌های APC، تحریک بهتر لنفوسیت‌ها را به دنبال خواهد داشت [۶].

هدف از پژوهش حاضر طراحی، ساخت و ارزیابی بیان ناقل جفت بیانی است که قابلیت بیان آنتی‌ژن (در این مطالعه به جای آنتی‌ژن، توالی ژنی پروتئین فلورسانس Eukaryotic (Green Florescent Protein: EGFP) قرار داده شده است) و ادجوانت مولکولی IL-18 نوترکیب را دارد به طوری که با

سلولی محلول تریزول (Trizol) از شرکت (Gibco) تهیه و کیت ترانسفکشن Turbofect in vitro transfection reagent از شرکت (Fermentas) خریداری شد.

Oligo dT (Primer) انجام شد.

۲-۴- ساخت سازه Igk/mIL-18/Fc و کلون

کودن آن در پلاسمید pIRES2-EGFP

کلیه برنامه‌های PCR در قالب برنامه مشترک به صورت ۹۴ درجه ۵ دقیقه، ۹۴ درجه ۱ دقیقه، دمای اتصال (Annealing) که با توجه به دمای آغازگرها (جدول ۱) به صورت ۱ دقیقه ۷۲ درجه، ۱ یا ۲ دقیقه (با توجه به طول محصول) در ۳۰ تا ۳۵ چرخه و در نهایت با دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد در ۱۰ دقیقه تنظیم شد.

۲-۳- ساخت cDNA بیان کننده mIL-18

با جداسازی سلول‌های طحالی از موش BALB/c، این سلول‌ها با افزودن ۲۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر کانکوالین A، به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO₂ ۵ درصد کشت داده شدند. سپس تخلیص RNA کل از این سلول‌ها با محلول تریزول طبق برنامه کیت صورت گرفت. سنتز cDNA با آنزیم (Fermentas; USA) MuLV RT و در حضور آغازگر

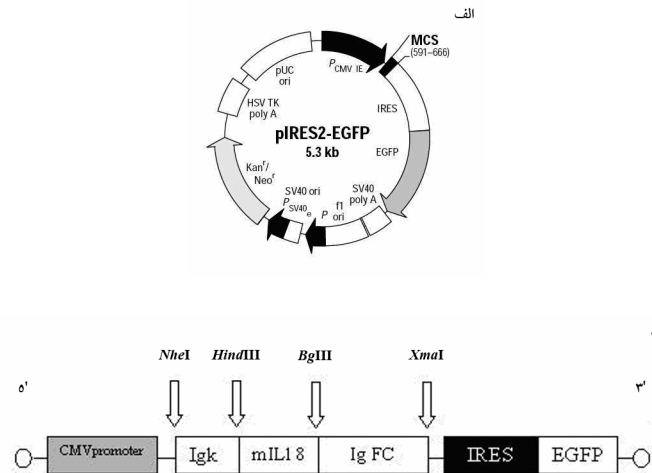
جدول ۱ نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده برای ساخت سازه بیانی

نام آغازگر	توالی	اندازه آغازگر (نوکلئوتید)	دما (درجه سانتی‌گراد)
F-IL-18-Hi	ata aag ctt caa ctt tgg ccg act tc	۲۶	۶۷/۱
R-IL18-Bg	cgc aga tct act ttg atg taa gtt agt gag	۳۰	۶۲/۱
F-Ig-Bg	ata aga tct gag ccc aga ggg cc	۲۳	۶۸/۱
R-Ig-Ec	aga tat ctt ata gcc ccg gag tcc	۲۴	۶۵/۹
F-3F-Nh	agc tag cgc cac cat gga gac	۲۱	۶۷/۲

pSecTag2a کلون شد. در نهایت توالی رهبر Igk روی ناقل pSecTag2a به همراه دو قطعه کلون شده دیگر به صورت سه قطعه Igk/mIL-18/Fc (توالی نهایی توسط دو آغازگر اختصاصی R-3F-Xm و F-3F-Nh با PCR تکثیر شد و سپس سه قطعه تکثیر شده بعد از هضم آنزیمی *NheI/XmaI* در پایین دست پروموتور سیتومگالوویروس (Cytomegalovirus: CMV) پلاسمید pIRES2-EGFP (Clontech) (شکل ۱ الف) کلون شد.

سازه نهایی (pIRES- Igk/mIL-18/Fc) برای توالی‌یابی مستقیم (Direct Sequencing) به آزمایشگاه SeqLab آلمان ارسال شده و پس از قرائت توالی‌ها به وسیله نرم‌افزارهای تخصصی Bioedit و Clustal X، درستی سازه‌ها و ژن‌های کلون شده با انجام آنالیز آنزیمی (شکل ۱) و تعیین توالی تأیید شد.

سنتز توالی مربوط به IL-18 بالغ (Mature IL-18) موشی (۱۵۷ اسید آمینه) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی F-IL18-Hi و R-IL18-Bg (جدول ۱) با انجام PCR روی cDNA سنتز شده به عنوان الگو، صورت گرفت. از طرف دیگر؛ توالی مربوط به قسمتی از ناحیه ثابت زنجیره سنگین IgG2a (IgG2a-Fc) موشی به وسیله آغازگرهای اختصاصی R-Ig-Ec و F-Ig-Bg با انجام PCR بر روی cDNA سنتز شده تکثیر شد. سپس توالی سنتز شده IL-18 بعد از هضم آنزیمی *HindIII/Bg/II* و همچنین توالی ناحیه ثابت زنجیره سنگین IgG2a بعد از هضم آنزیمی *Bg/II/EcoRV*، در کنار هم در ناقل pSL1180 کلون شد. سپس دو قطعه (IL-18-FcIg) با انجام PCR به وسیله دو آغازگر F-IL-18-Hi و R-Ig-Ec تکثیر و سپس محصول PCR، جدید بعد از هضم آنزیمی *EcoRV/HindIII* در ناقل



شکل ۱ الف) نقشه شماتیک ناقل تجاری pIRES2-EGFP (ب) شکل شماتیک از سایت‌های آنزیمی بین قطعات و ترتیب قرارگیری قطعات در سازه بیانی pIRES-Igk/mL18/Fc. پروموتور سیتومگالوویروس، Kan: ژن کدکننده مقاومت به کانامایسین، IRES: مکان ورود ریپوزوم در داخل ژن، EGFP: ژن پروتئین فلورسنت سبز یوکاریوتی، Igk، mL18- IgFC به ترتیب اشاره به توالی نشانه ایمنوگلوبولین کاپا، توالی کوتاه شده IL-18 موشی و قسمتی از زنجیره سنگین IgG2a دارد.

۶-۲- بررسی بیان پروتئین IL-18 نو ترکیب

۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن گذرا، سوپ رویی سلول‌ها به صورت جداگانه جمع‌آوری و با ستون‌های تغلیظ Vivaspin2 (Vivascience; Sigma; UK) سوپ رویی حدود ۱۰ برابر تغلیظ شد. همچنین همه سلول‌های ترانسفکت شده نیز جمع‌آوری و بعد از دوبار شستشو در ۱۰۰ میکرولیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) حل شد. سپس با روش ذوب و انجماد این سلول‌ها را لیز کرده و در نهایت سوپ رویی سلول‌های لیز شده پس از سانتریفوژ در دور ۲۵۰ گرم به مدت ۳ دقیقه جمع‌آوری و در کنار محلول رویی تغلیظ شده سلول‌های ترانسفکت شده، سریال رقت استاندارد (موجود در کیت) و کنترل منفی (سلول ترانسفکت نشده) به صورت دوتایی برای سنجش بیان IL-18 با کیت الایزای تشخیصی IL-18 موشی (Bender MedSystems; Austria) بررسی شد.

۷-۲- بررسی فعالیت پروتئین IL-18 نو ترکیب

سلول‌های KG-1، پس از انجام کشت منظم و رسیدن به

۵-۲- ترانسفکشن سازه pIRES-Igk/mL18/Fc

و ارزیابی بیان

ترانسفکشن گذرای (Transient Transfection) پلاسمید ساخته شده pIRES-Igk/mL18/Fc با استفاده از برنامه کیت Turbofect (Fermentas) انجام شد. به طور خلاصه 2×10^5 سلول HEK293T، ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن گذرا در هر چاهک پلیت ۶ خانه‌ای کشت داده شد. از طرف دیگر؛ ۴ میکروگرم از پلاسمید pIRES-Igk/mL18/Fc با محیط کشت DMEM به حجم نهایی ۴۰۰ میکرولیتر رسانده شد و ۴ میکرولیتر از محلول توربوفاکت (Turbofect) به آن افزوده و بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، این مجموعه، به صورت قطره قطره به سلول‌ها اضافه شد. در نهایت پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، با توجه به حضور ژن EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) در پلاسمید، میزان ترانسفکشن گذرا با میکروسکوپ فلورسانس به صورت کیفی و انجام فلوسایتومتری به صورت کمی ارزیابی شد.

(Netherlands) ارزیابی شد.

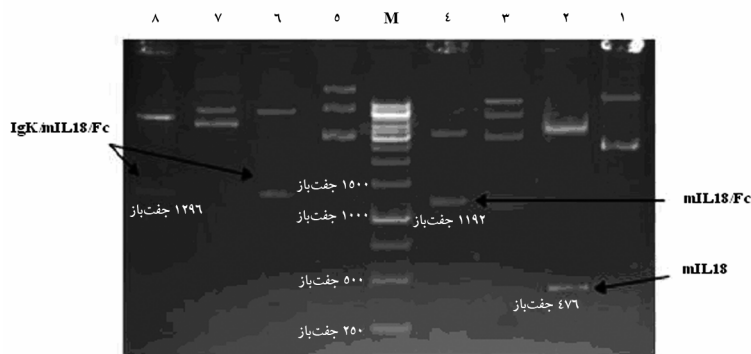
۳- نتایج

۳-۱- طراحی، ساخت و تأیید ناقل نو ترکیب

pIRES-Igk/mIL-18/Fc

سازه نهایی (pIRES-Igk/mIL-18/Fc) با قابلیت بیان و ترشح IL-18/Ig Fc به دنبال چندین مرحله کلونینگ و ساب کلونینگ ساخته شد. درستی پلاسمید نهایی pIRES-Igk/mIL-18/Fc (شکل ۱ ب) با هضم آنزیمی و به دنبال برش با آنزیمهای $HindIII/BglII$ ، $HindIII/EcoRV$ ، $NheI/XmaI$ تأیید شد (شکل ۲). در نهایت با انجام توالی (به صورت دو طرفه با کمک آغازگرهای طراحی شده از روی نقشه ژنی ناقل، در قبل و بعد از توالی کلون شده) درستی توالی کلون شده Igk/mIL-18/Fc با طول ۱۲۹۶ نوکلوتید تأیید شد.

میزان 2×10^6 سلول در هر میلی لیتر، یک بار با محیط RPMI 1640 شسته شده و پس از آن میزان زنده بودن سلول ها و تعداد سلول ها در یک میلی لیتر محیط RPMI 1640 ارزیابی شد. ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی با غلظت 3×10^6 سلول در هر میلی لیتر در پلیت ۹۶ خانه ای به صورت دوتایی (در گروه های مختلف آزمون، کنترل منفی، کنترل مثبت) کشت داده شد و ۱۰۰ میکرو لیتر از سوپ رویی تغلیظ شده سلول ها (۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن گذرا) به آن (گروه آزمون) اضافه شد. به عنوان کنترل مثبت و منفی به ترتیب از IL-18 استاندارد سستیک (۵۰۰ پیکوگرم در هر میلی لیتر) و ۱۰۰ میکرو لیتر سوپ رویی تغلیظ شده سلول های بدون ترانسفکشن، استفاده شد. ۲۴ ساعت پس از انکوبه کردن سلول ها، سوپ رویی سلول ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰ گرم، سانتریفوژ شده و سوپ رویی آن ها جمع آوری شد. در نهایت میزان IFN- γ ترشح شده در سوپ رویی با کیت سنجش IFN- γ (U-CyTech Bioscience;



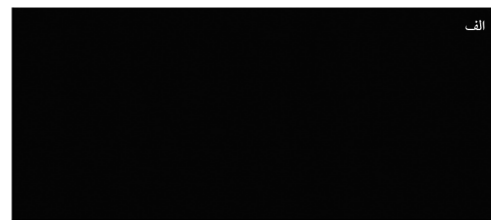
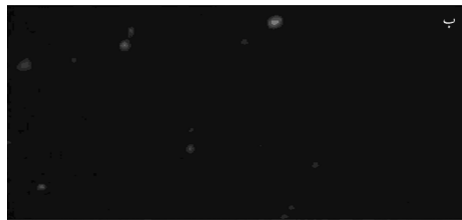
شکل ۲ تأیید کلونینگ قطعات با استفاده از هضم آنزیمی؛ ستون ۱) ناقل اولیه pSL1180-IL-18، ستون ۲) هضم آنزیمی ناقل pSL1180-IL-18، با آنزیمهای $HindIII/XmaI$ ، ستون ۳) ناقل pSL1180-IL-18-Fc، ستون ۴) هضم آنزیمی و تأیید ناقل pSL1180-IL-18-Fc با دو آنزیم $HindIII/XmaI$ ، ستون ۵) ناقل pSec-mIL-18/Fc، ستون ۶) تأیید ناقل pSec-mIL-18/Fc با دو آنزیم $NheI/XmaI$ ، ستون ۷) ناقل نهایی pIRES-Igk/mIL-18/Fc، ستون ۸) تأیید کلونینگ pIRES-Igk/mIL-18/Fc با دو آنزیم $NheI/XmaI$

۳-۲- ترانسفکشن سلول HEK293T با پلاسمید

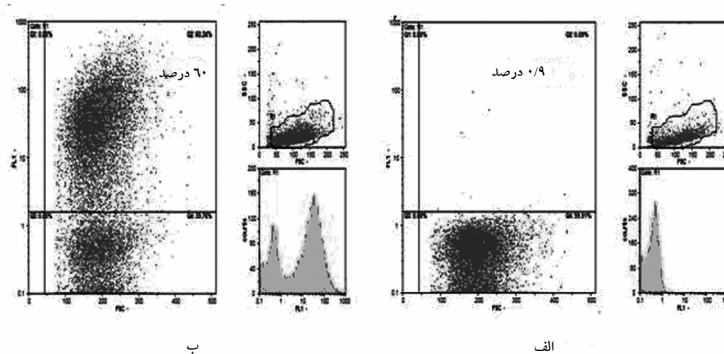
pIRES-Igk/mIL18/Fc

پس از بررسی کیفی با میکروسکوپ فلورسانت (شکل ۳)،

میزان ترانسفکشن گذرای سلول های آزمون (سلول های ترانسفکت شده با ناقل pIRES-EGFP-3F) و کنترل (سلول بدون ترانسفکت) با انجام فلوسایتمتری میزان ۶۰ درصد ترانسفکشن را در سلول های آزمون نشان داد (شکل ۴ نمودار ب).

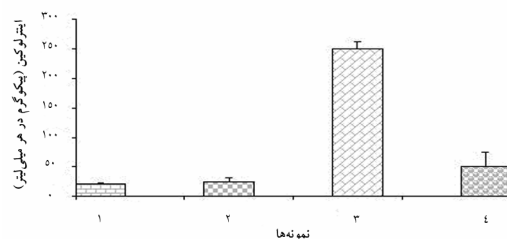


شکل ۳ ارزیابی میزان ترانسفکشن گذرای pIRES-k/mIL-18/Fc در سلول HEK293T با کمک میکروسکوپ فلورسانس؛ الف) سلول ترانسفکت شده با ناقل بدون EGFP (کنترل منفی)، ب) سلول ترانسفکت شده با ناقل pIRES-k/mIL-18/Fc که دارای ژن EGFP است. (بزرگمایی $\times 100$)



شکل ۴ بررسی میزان ترانسفکشن گذرای pIRES-k/mIL18/Fc در سلول HEK293T با کمک فلوسایتومتری؛ الف) سلول کنترل (بدون ترانسفکشن)، ب) سلول ترانسفکت شده با ناقل pIRES-k/mIL18/Fc

۳۲۰ پیکوگرم در هر میلی‌لیتر) و همچنین نمونه کنترل مثبت و منفی نشانگر میزان $\text{IFN-}\gamma$ ۵ پیکوگرم در هر میلی‌لیتر در سوپ رویی سلول‌های آزمون بود که نشان می‌دهد IL-18 نو ترکیب فعال است (نمودار ۲ ستون ۲)



نمودار ۱ بررسی بیان IL-18 به روش الایزا؛ لیازات و سوپ رویی سلول‌ها بعد از گذشت ۴۸ ساعت از ترانسفکشن گذرا، به صورت تکرار دوتایی (Duplicate) از نظر میزان IL-18 ارزیابی شد. ستون ۱) سوپ رویی سلول‌های ترانسفکت نشده (کنترل منفی سلول)، ستون ۲) سوپ رویی سلول‌های ترانسفکت شده با pIRES2-EGFP (کنترل منفی ناقل)، ستون ۳) سوپ رویی سلول‌های ترانسفکت شده با pIRES-Igk/mIL-18/Fc، ستون ۴) لیازات سلول‌های ترانسفکت شده با pIRES-Igk/mIL-18/Fc

۳-۳- بررسی بیان پروتئین IL18 نو ترکیب

ارزیابی میزان IL-18 در سوپ رویی سلول‌های ترانسفکت شده با سازه بیانی به صورت دوتایی در کنار منحنی استاندارد با طیف غلظتی ۳۱ تا ۲۰۰۰ پیکوگرم در هر میلی‌لیتر، غلظتی در حدود ۲۵۰ پیکوگرم در هر میلی‌لیتر از این پروتئین را در سوپ رویی کشت سلول‌ها نشان داد (نمودار ۱ ستون ۳). همچنین بررسی لیازات (Lysate) سلول‌های ترانسفکت شده غلظتی در حدود ۵۰ پیکوگرم در هر میلی‌لیتر از IL-18 در لیازات سلولی نشان داد.

۳-۴- بررسی فعالیت پروتئین IL-18 نو ترکیب

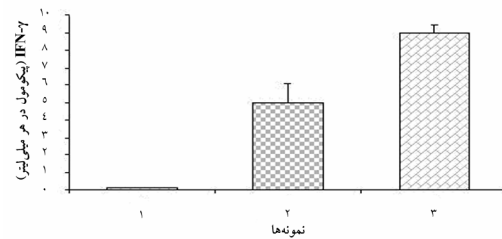
برای سنجش فعالیت IL-18، از ویژگی این سایتوکین در فعال کردن سلول‌های ایمنی و ترشح $\text{IFN-}\gamma$ استفاده شد. ارزیابی میزان $\text{IFN-}\gamma$ در سوپ رویی سلول‌های KG-1 به صورت دوتایی در کنار استاندارد کیت (با طیف غلظتی ۵ تا

برخوردار است. امروز مطالعات زیادی در زمینه به کارگیری سایتوکین و آنتی ژن به طور جداگانه در پلاسمید تک بیانی یا بیان همزمان آن‌ها در قالب ناقل‌های جفت بیانی صورت گرفته است [۱۹، ۲۰].

در این مطالعه فرم کوتاه و فعال IL-18 موشی از ژنوم موش تکثیر داده شد و این توالی در کنار بخشی از توالی Igk و قسمتی از زنجیره سنگین FCγ2a به منظور ایجاد سایتوکینی فعال، ترشحی و با نیمه عمر فعالیت بالا در ناقل جفت بیانی کلون شد. سپس بیان آن در سلول‌های HEK293T با انجام آزمون الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) به تأیید رسید و در نهایت فعالیت این سایتوکین ارزیابی شد.

IL-18 به عنوان یک سایتوکین پیش التهابی و یک محرک فعال تولید IFN-γ همچنین به عنوان یک سایتوکین مهم در تنظیم و تهییج پاسخ‌های ایمنی بسیار مورد توجه است؛ به طوری که امروزه مطالعات زیادی روی این سایتوکین با ماهیت انسانی یا حتی از دیگر منابع حیوانی همچون موش، اردک، سگ، اسب انجام گرفته است [۲۱-۲۴]. IL-18 به صورت یک سایتوکین غیرفعال و فاقد پپتید نشانه تولید می‌شود که تبدیل آن به یک فرم فعال به وسیله فعالیت برشی سیستمین پروتئاز سلولی صورت می‌گیرد. ناگای (Nagai) و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که اگر ۳۵ اسید آمینه از ابتدای فرم غیرفعال برداشته شود، این پروتئین به فرم فعال تبدیل می‌شود [۲۵]. در مطالعه دیگری یانگ (Yang) و همکاران نشان دادند اگر ۵۷ اسید آمینه از فرم غیرفعال برداشته شود، این فرم کوتاه شده فعال نیست [۲۶] نتایج به دست آمده از این تحقیق نیز نشان داد که فرم کوتاه سنتز شده (فاقد ۳۵ اسید آمینه انتهای آمینی) قادر است به خوبی سلول‌های KG-1 را در راستای ترشح IFN-γ تحریک کرده و در مجموع به صورت فعال عمل کند.

از طرف دیگر؛ در چندین مطالعه نشان داده شد که اتصال توالی نشانه به فرم فعال می‌تواند باعث ترشح آن از سلول مولد خود شود [۲۵]. از جمله این توالی‌ها می‌توان به توالی نشانه



نمودار ۲ بررسی فعالیت IL-18 نو ترکیب؛ ۲۴ ساعت پس از انکوبه کردن سلول‌های KG-1، با سوپ رویی سلول‌های ترانسفکت شده (نمونه آزمون) سوپ رویی سلول‌های بدون ترانسفکشن (کنترل منفی) و IL-18 مصنوعی (۵۰۰ پیکوگرم در هر میلی‌لیتر) در پلیت ۹۶ خانه سوپ رویی این سلول‌ها جمع‌آوری شد و در نهایت میزان IFN-γ ترشح شده در سوپ رویی با کیت سنجش IFN-γ ارزیابی شد. ستون ۱) کنترل منفی، ستون ۲) نمونه آزمون، ستون ۳) کنترل مثبت

۴- بحث

بهره‌گیری از واکسن‌های DNA از جدیدترین شیوه‌هایی است که در زمینه واکسیناسیون بر علیه بیماری‌ها و سلول‌های توموری ارایه شده است که با توجه به ایمنی‌زایی این نوع واکسن در راه‌اندازی پاسخ ایمنی سلولی و همورال، هنوز تلاش‌ها برای دستیابی به پاسخ‌های قابل قبول و مطلوب ادامه دارد [۱۷، ۱۸]. از جمله این تلاش‌ها می‌توان به استفاده از پلاسمیدهای جفت بیانی اشاره کرد که در این ناقل‌ها، یک توالی ویژه مکان داخلی ورود ریبوزوم در بین دو ناحیه کد کننده قرار دارد و این توالی ویژه، ناقل جفت بیانی را قادر می‌سازد تا دو یا چند پروتئین مختلف را با استفاده از یک واحد رونویسی و به دنبال آن ساخت یک mRNA بزرگ، تولید کند. از مزایای این ناقل‌ها در زمینه مطالعات ایمنی‌شناسی می‌توان به تحریک قوی و پایدار پاسخ‌های ایمنی در مقایسه با ناقل‌های تک بیانی (Monocistronic) اشاره کرد. همچنین در این نوع ناقل‌ها مشکلاتی که در استفاده همزمان چند ناقل تک بیانی وجود دارد، شامل رقابت بین پروموتورها و حذف یک ناقل از سلول دیده نمی‌شود. از دیگر راه‌کارهای تقویت عملکرد واکسن‌های DNA می‌توان به ادجوانت‌های ژنی اشاره نمود؛ در این راستا استفاده از سایتوکین‌ها از اهمیت ویژه‌ای

میلی‌لیتر از این پروتئین در لیزات سلولی و همچنین بررسی فعالیت این سایتوکین عملکرد موفق توالی نشانه Igk در ترشح فرم فعال IL-18 به اثبات رسید.

ساخت این سازه بیانی به‌عنوان گامی نخست در راستای استفاده از ناقل‌های جفت بیانی در ارتقای سطح پاسخ‌های ایمنی واکسن‌های DNA است که مقایسه اثربخشی این واکسن با انواع دیگر واکسن‌های DNA به تحقیقات بیشتری در این زمینه نیاز دارد.

۵- تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل نتایج بخشی از پروژه تحقیقاتی مصوب انستیتو پاستور ایران (طرح ۴۷۸) بوده که در گروه هپاتیت و ایدز به انجام رسیده است.

IFN- β یا توالی رهبر از ژن پاراتیروئید هورمون انسانی و همچنین زنجیره کاپای ایمونوگلوبولین اشاره کرد [۲۵، ۱۱]. اوساکی (Osaki) و همکاران در تحقیقات خود نشان دادند که اضافه کردن قسمتی از پپتید نشانه هورمون پاراتیروئید انسانی به فرم فعال IL-18 می‌تواند در ترشح این سایتوکین مؤثر باشد؛ به‌طوری که این سایتوکین همچنان فعال بوده و عملکرد خود را در القای سلول‌های ایمنی با تولید IFN- γ همچنان حفظ کند [۲۷]. هوئر (Heuer) و ناگای در مطالعات دیگری به‌ترتیب با اضافه کردن پپتید نشانه IL-11 و IFN- β به فرم فعال و غیرترشحي IL-18، به‌خوبی توانستند فرم ترشحي این سایتوکین را تولید کنند [۲۵، ۲۸]. در مطالعه حاضر نیز با اتصال قسمتی از توالی Igk با فرم فعال IL-18 و به دنبال آن ردیابی ۲۵۰ پیکوگرم در هر میلی‌لیتر، IL-18 در محلول رویی سلول‌ها ترانسفکت شده در مقایسه با میزان ۵۰ پیکوگرم در هر

۶- منابع

- [1] Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 1996; 156(11): 4274-9.
- [2] Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, Tanimoto T, Torigoe K, Fujii M, Ikeda M, Fukuda S, Kurimoto M. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol* 1996; 26(7): 1647-51.
- [3] Netea MG, Kullberg BJ, Verschueren I, Van Der Meer JW. Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1beta. *Eur J Immunol* 2000; 30(10): 3057-60.
- [4] Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods* 1999; 19(1): 121-32.
- [5] Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* 2008; 223: 20-38.
- [6] Barouch DH, Santra S, Tenner-Racz K, Racz P, Kuroda MJ, Schmitz JE, Jackson SS, Lifton MA, Freed DC, Perry HC, Davies ME, Shiver JW, Letvin NL. Potent CD4+ T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF. *J Immunol* 2002, 168(2): 562-8.
- [7] Abdulhaqq SA, Weiner DB. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune

- responses. *Immunol Res* 2008; 42(1-3): 219-32.
- [8] Seki E, Tsutsui H, Nakano H, Tsuji N, Hoshino K, Adachi O, Adachi K, Futatsugi S, Kuida K, Takeuchi O, Okamura H, Fujimoto J, Akira S, Nakanishi K. Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta. *J Immunol* 2001; 166(4): 2651-7.
- [9] O'Donovan LH, McMonagle EL, Taylor S, Argyle DJ, Nicolson L. Bioactivity and secretion of interleukin-18 (IL-18) generated by equine and feline IL-18 expression constructs. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102(4): 421-8.
- [10] Oshikawa K, Shi F, Rakhmilevich AL, Sondel PM, Mahvi DM, Yang NS. Synergistic inhibition of tumor growth in a murine mammary adenocarcinoma model by combinational gene therapy using IL-12, pro-IL-18, and IL-1beta converting enzyme cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(23): 13351-6.
- [11] Osaki T, Hashimoto W, Gambotto A, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H. Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18 (IL-18). *Gene Ther* 1999; 6(5): 808-15.
- [12] Kim SH, Cho D, Kim TS. Induction of in vivo resistance to *Mycobacterium avium* infection by intramuscular injection with DNA encoding interleukin-18. *Immunology* 2001; 102(2): 234-41.
- [13] Barouch DH, Truitt DM, Letvin NL. Expression kinetics of the interleukin-2/immunoglobulin (IL-2/Ig) plasmid cytokine adjuvant. *Vaccine* 2004; 22(23-24): 3092-7.
- [14] Ferrone CR, Perales MA, Goldberg SM, Somberg CJ, Hirschhorn-Cymerman D, Gregor PD, Turk MJ, Ramirez-Montagut T, Gold JS, Houghton AN, Wolchok JD. Adjuvanticity of plasmid DNA encoding cytokines fused to immunoglobulin Fc domains. *Clin Cancer Res* 2006; 12(18): 5511-9.
- [15] Chambard JC, Pognonec P. A reliable way of obtaining stable inducible clones. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(14): 3443-4.
- [16] Chang SY, Lee KC, Ko SY, Ko HJ, Kang CY. Enhanced efficacy of DNA vaccination against Her-2/neu tumor antigen by genetic adjuvants. *Int J Cancer* 2004; 111(1): 86-95.
- [17] Lemieux P. Technological advances to increase immunogenicity of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2002; 1(1): 85-93.
- [18] Wang S, Liu X, Fisher K, Smith JG, Chen F, Tobery TW, Ulmer JB, Evans RK, Caulfield MJ. Enhanced type I immune response to a hepatitis B DNA vaccine by formulation with calcium- or aluminum phosphate. *Vaccine* 2000; 18(13): 1227-35.
- [19] Kim JJ, Trivedi NN, Nottingham LK, Morrison L, Tsai A, Hu Y, Mahalingam S, Dang K, Ahn L, Doyle NK, Wilson DM, Chattergoon MA, Chalian AA, Boyer JD, Agadjanyan MG, Weiner DB. Modulation of amplitude and direction of in vivo immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens. *Eur J Immunol* 1998; 28(3): 1089-103.

- [20] Nimal S, McCormick AL, Thomas MS, Heath AW. An interferon gamma-gp120 fusion delivered as a DNA vaccine induces enhanced priming. *Vaccine* 2005; 23(30): 3984-90.
- [21] Chen HY, Cui BA, Xia PA, Li XS, Hu GZ, Yang MF, Zhang HY, Wang XB, Cao SF, Zhang LX, Kang XT, Tu K. Cloning, in vitro expression and bioactivity of duck interleukin-18. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 123(3-4): 205-14.
- [22] Culhane AC, Hall MD, Rothwell NJ, Luheshi GN. Cloning of rat brain interleukin-18 cDNA. *Mol Psychiatry* 1998; 3(4): 362-6.
- [23] Argyle DJ, McGillivray C, Nicolson L, Onions DE. Cloning, sequencing, and characterization of dog interleukin-18. *Immunogenetics* 1999; 49(6): 541-3.
- [24] Nicolson L, Penha-Goncalves MN, Keanie JL, Logan NA, Argyle DJ, Onions DE. Cloning and sequencing of horse interleukin-12 and interleukin-18 cDNAs. *Immunogenetics* 1999; 50(1-2): 94-7.
- [25] Nagai H, Hara I, Horikawa T, Oka M, Kamidono S, Ichihashi M. Gene transfer of secreted-type modified interleukin-18 gene to B16F10 melanoma cells suppresses in vivo tumor growth through inhibition of tumor vessel formation. *J Invest Dermatol* 2002; 119(3): 541-8.
- [26] Yang YJ, Wang ZY, Chen SH, Ge XR. Cloning and characterization of a new isoform of mouse interleukin-18. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2005; 37(12): 826-34.
- [27] Osaki T, Péron JM, Cai Q, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H. IFN-gamma-inducing factor/IL-18 administration mediates IFN-gamma- and IL-12-independent antitumor effects. *J Immunol* 1998; 160(4): 1742-9.
- [28] Heuer JG, Tucker-McClung C, Hock RA. Neuroblastoma cells expressing mature IL-18, but not proIL-18, induce a strong and immediate antitumor immune response. *J Immunother* 1999; 22(4): 324-35.