



Expression of the Recombinant Hsp20-Nef Protein for Evaluation of its Immunogenicity against HIV-1 Nef using Indirect ELISA

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Rostami B.¹ PhD,
Irani Sh.¹ PhD,
Bolhassani A.^{*2} PhD,
Ahangari Cohan R.³ PhD

How to cite this article

Rostami B, Irani Sh, Bolhassani A, Ahangari Cohan R. Expression of the Recombinant Hsp20-Nef Protein for Evaluation of its Immunogenicity against HIV-1 Nef using Indirect ELISA Pathobiology Research. 2019; 22(3):134-140.

ABSTRACT

Aims Nef protein has been considered as an attractive target for the development of therapeutic HIV-1 vaccine. Furthermore, strong immunological properties of heat shock proteins (HSPs) led to their use as an immunomodulator or antigen carrier for subunit vaccine candidates. In the current study, the generation of Hsp20-Nef fusion protein was performed in *E. coli* expression system, and its immunogenicity was evaluated in BALB/c mice.

Materials and Methods At first, expression of Hsp20-Nef recombinant protein was studied in *E. coli* BL21 and Rosetta strains by SDS-PAGE and western blotting using anti-Nef monoclonal antibody. Then, the recombinant protein was purified by a reverse staining method. Finally, its potency was evaluated to elicit antibody response against HIV-1 Nef antigen using indirect ELISA in mice.

Findings Our data showed a clear band of ~1230bp related to Hsp20-Nef fusion on agarose gel indicating the correct gene cloning in pET28a vector. The expression of Hsp20-Nef protein was confirmed as a clear band of ~47 kDa in SDS-PAGE and western blotting. In the immunological assay, the Hsp20-Nef protein and also the Nef protein emulsified with Freund's adjuvant significantly enhanced the level of total IgG as compared to other groups. Moreover, the immunogenicity of Hsp20-Nef was higher than Freund's adjuvant/Nef in protein regimens ($p < 0.05$).

Conclusion The Hsp20-Nef fusion protein was effectively expressed in *E. coli* prokaryotic system and significantly induced antibody response against HIV-1 Nef antigen.

Keywords HIV; Nef; Hsp20; Prokaryotic System; Immunogenicity

¹Biology Department, Sciences & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Hepatitis & AIDS Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

³Pilot Nano-Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: No. 69, Pasteur Institute of Iran, Pasteur Street, Tehran, Iran.
Postal Code: 1316943551
Phone: +98 (21) 66953311
Fax: +98 (21) 66465132
a_bolhassani@pasteur.ac.ir

Article History

Received: September 17, 2018
Accepted: February 7, 2019
ePublished: August 21, 2019

CITATION LINKS

[1] Small heat shock protein 27: An effective adjuvant for enhancement of HIV-1 Nef antigen-specific immunity [2] HIV-1 prophylactic vaccines: State of the art [3] How can improve DNA vaccine modalities as a therapeutic approach against HIV infections? [4] HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: A brief overview [5] AIDS/HIV, molecular and cell biology [6] Biology of the HIV Nef protein [7] Structure-function relationships in HIV-1 Nef [8] HIV vaccines: A brief overview [9] Heat-shock proteins as activators of the innate immune system [10] Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant [11] Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology [12] Zinc/Imidazole procedure for visualization of proteins in gels by negative staining [13] Evaluation of knowledge and attitude of non-medical students about AIDS [14] Cloning, expression and purification of the recombinant HIV-1 Tat-Nef fusion protein in prokaryotic expression system [15] Peptide-based synthetic vaccines [16] Conservation of Babesia bovis small heat shock protein (Hsp20) among strains and definition of T helper cell epitopes recognized by cattle with diverse major histocompatibility complex class II haplotypes [17] Effect of HSP90 adjuvant on immunogenicity of HbsAg in BALB/c mice [18] Direct association of heat shock protein 20 (HSPB6) with phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in human hepatocellular carcinoma: Regulation of the PI3K activity

بیان پروتئین نو ترکیب Hsp20-Nef به منظور ارزیابی ایمنوژنیسیته آن در مقابل HIV-1 Nef توسط الایزای غیرمستقیم

بهاره رستمی PhD

گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

شیوا ایرانی PhD

گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

اعظم بوالحسنی PhD

بخش هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

رضا آهنگری کهن PhD

بخش نانوبیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: پروتئین Nef به عنوان هدف جذاب برای توسعه واکسن درمانی HIV-1 در نظر گرفته شده است. به علاوه، خواص ایمنی‌زایی قوی پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) منجر به استفاده از آنها به عنوان ایمونومدولاتور و حامل آنتی‌ژنی برای طراحی واکسن‌های ساب‌یونیتی شد. در مطالعه اخیر، بیان پروتئین فیوژن Hsp20-Nef در سیستم بیانی/شرشیا کلی (*E. coli*) انجام شد و بررسی ایمنوژنیسیته آن در موش‌های بालب/سی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در ابتدا، بیان پروتئین نو ترکیب Hsp20-Nef در سویه‌های باکتری/شرشیا کلی BL21 و Rosetta توسط SDS-PAGE و وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد Nef بررسی شد. سپس، تخلیص پروتئین نو ترکیب توسط تکنیک رنگ‌آمیزی معکوس انجام شد. در نهایت، توانایی آن برای القای پاسخ آنتی‌بادی در مقابل آنتی‌ژن HIV-1 Nef با استفاده از ELISA غیرمستقیم ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج ما باند واضح حدود ۱۲۳۰ جفت‌باز مرتبط با فیوژن Hsp20-Nef روی ژل آگارز نشان داد که نشانگر کلونینگ صحیح ژن در وکتور pET28a بود. بیان پروتئین Hsp20-Nef به صورت باند واضح حدود ۴۷ کیلودالتون در SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید شد. در سنجش ایمنولوژیکی، پروتئین Hsp20-Nef و نیز پروتئین Nef امولسیفیه شده با ادجوانت فروند به طور مهمی سطح IgG تام را در مقایسه با گروه‌های دیگر افزایش دادند. به علاوه، ایمنوژنیسیته Hsp20-Nef بالاتر از Freund's adjuvant در رژیم‌های پروتئینی بود ($p < 0.05$).
نتیجه‌گیری: پروتئین فیوژن Hsp20-Nef به طور موثری در سیستم پروکاریوتی *E. coli* بیان شد و به طور مهمی پاسخ آنتی‌بادی را در مقابل آنتی‌ژن HIV-1 Nef القا کرد.

کلیدواژه‌ها: ویروس HIV، Nef، Hsp20، سیستم پروکاریوتی، ایمنوژنیسیته

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۸

*نویسنده مسئول: a_bolhasani@pasteur.ac.ir

مقدمه

ویروس HIV (عامل بیماری ایدز) موجب نقص سیستم ایمنی بدن انسان شده و باعث ازدست‌دادن تدریجی سلول‌های CD4 T، اختلال در عملکرد سلول‌های CD8 T و نیز تعدادی از سلول‌های کشنده طبیعی (NK) می‌شود و در نتیجه تهدید جدی برای سلامت انسان است [1, 2]. براساس آمار سازمان بهداشت جهانی، با وجود تلاش‌های بسیاری که برای ساخت واکسن صورت گرفته اما امروزه ایدز جزء ده عامل کشنده اول در جهان است و در حال حاضر، آینده واکسن برعلیه ویروس HIV در پرده‌ای از ابهام قرار دارد [3]. محققان، ویروس HIV را براساس تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی به دو گروه HIV-1 و HIV-2 تقسیم‌بندی کرده‌اند که شایع‌ترین نوع آن HIV-1 است که عامل ایجاد بیماری ایدز در انسان است [4]. ژنوم ویروس HIV، ۹ ژن را کد می‌کند که این ژن‌ها به کمک فرآیندهای برش RNA حداقل ۱۵ پروتئین اختصاصی را به وجود می‌آورند. سه ژن اصلی شامل ژن‌های *gag*، *pol* و *env* هستند که اطلاعات لازم

برای تولید پروتئین‌های ساختاری، آنزیمی و پروتئین‌های پوششی ویروس را دارند. شش ژن دیگر شامل *vpr*، *vif*، *tat*، *rev* و *nef* ژن‌های تنظیمی و کمکی هستند که کدکننده پروتئین‌های کنترل‌کننده عفونت‌زایی ویروس و تولید کپی‌های جدید ویروس و در نتیجه بروز بیماری ایدز هستند [5]. در میان ژن‌های کمکی، ژن *nef* پروتئین ۲۷ تا ۳۵ کیلودالتونی را کد می‌کند که به‌وفور طی فاز اولیه از سیکل همانندسازی ویروس به‌صورت حفاظت‌شده یافت می‌شود و موجب کاهش بیان یا مهار فعالیت سلول‌های CD4 T و CD8 و نیز مولکول‌های MHC I & II می‌شود. این پروتئین، موجب ایجاد مکانیزم مهمی برای فرار ویروس از سلول‌های CD8 و عدم شناسایی توسط سلول‌های CD4 می‌شود [6]. 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 [7]. از خصوصیات ویروس HIV جهش‌های فراوانی است که در ژنوم آن رخ می‌دهد و موجب تغییر آنتی‌ژن‌های سطحی آن و در نهایت غیرموثر شدن آنتی‌بادی‌ها و پاسخ ایمنی می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد که با به‌کارگیری توالی‌های ثابت پروتئین‌های حیاتی و با استفاده از ادجوانت موثر برای پاسخ‌دهی هرچه بیشتر سیستم ایمنی بتوان به یک واکسن موثر دسترسی پیدا کرد. در واکسن‌های پروتئینی، پروتئین خالص‌شده فاقد اجزای میکروبی هستند که بتوانند پاسخ ایمنی انسانی را تحریک کنند؛ بنابراین، پژوهشگران در حال جست‌وجو برای یافتن ادجوانت‌هایی هستند که بتوانند پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی موثر را تحریک و پاسخ خاطره‌ای مناسبی را ایجاد نمایند [8]. یکی از انواع ادجوانت‌ها، خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) هستند که جزء ادجوانت‌های مناسب برای القای پاسخ‌های ایمنی سلولی و آنتی‌بادی‌های خاص برعلیه عفونت‌ها هستند که اخیراً عملکرد خارج سلولی این پروتئین‌ها توجه محققان را به خود جلب کرده است. این پروتئین‌ها، فعال‌کننده سیستم ایمنی ذاتی هستند و قادر به تحریک سایتوکاین‌های التهابی توسط سیستم منوسیت-ماکروفاژ و همچنین فعالیت و بلوغ سلول‌های دندریتیک هستند [9]. به علاوه، پروتئین‌های شوک حرارتی خارج سلولی با سلول‌های ارایه‌کننده آنتی‌ژن (APC) برهم‌کنش داده و با عملکرد ادجوانتی باعث تحریک سیستم ایمنی اکتسابی فرد می‌شوند [10, 11]. در این تحقیق، از پروتئین شوک حرارتی کوچک Hsp20 یا HspB6 با وزن مولکولی ۲۰ کیلودالتون به عنوان ادجوانت به‌صورت کوژوگه با پروتئین Nef استفاده شد و ایمنوژنیسیته آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سنتز و تأیید صحت فیوژن Hsp20-Nef در داخل وکتور بیان پروکاریوتی

در ابتدا، توالی کامل ژن *Nef* از ویروس HIV-1 (HIV-1 pNL4-3, Accession No: AF324493.2) و Hsp20 موشی (Accession No: NM_001012401) با استفاده از بانک‌های اطلاعات ژنی به دست آمد. سپس، سنتز فیوژن Hsp20-Nef در وکتور pET28a توسط شرکت بایوماتیک کانادا صورت گرفت. ژن Hsp20 در سایت آنزیمی *NheI/HindIII* و به دنبال آن ژن *Nef* در سایت *EcoRI/SalI* طراحی شد. پس از دریافت وکتور حاوی قطعه فیوژن مربوطه، تکثیر پلاسمید در باکتری/شرشیا کلی (*E. coli*) سویه DH5α انجام و تهیه استوک کلون باکتری حامل

سدیم دودسیل سولفات است، قرار گرفت و پس از سانتریفوژ، خارج شدن پروتئین از ژل به اتمام رسید. در پایان برای تغلیظ پروتئین به دست آمده از ستون های مخصوص آمیکون با فیلتر ۳/۵ میکرون استفاده و الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ برای تایید خالص سازی پروتئین انجام شد. آلودگی با اندوتوکسین کمتر از ۰/۵ EU در هر میلی گرم پروتئین بود که توسط تست LAL به دست آمد (QCL-1000, Lonza). نهایتاً، میزان پروتئین تخلیص شده با اسپکتروفتومتری نانودراپ براساس استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA) تعیین شد.

ایمنی زایی موش و ارزیابی ایمونوژنیسیته توسط تعیین میزان تام IgG

موش های بالغ/سی ماده ۶ تا ۸ هفته (۳ عدد در هر گروه) از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش های نگهداری شده تحت شرایط استاندارد از نظر اخلاق پزشکی در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ به طریق زیرپوستی در کف پا با پروتئین های نوترکیب Nef و Hsp20-Nef (۱۰ میکروگرم) ایمونیزه شدند. لازم به ذکر است که پروتئین نوترکیب Nef سابقاً در بخش هیپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران توسط گروه ما تهیه شده بود^[۱]. این پروتئین ها به صورت امولسیون در ادجوانت فروند به نسبت حجمی ۵۰:۵۰ مورد استفاده قرار گرفتند. گروه های کنترل، گروه تزریق شده با PBS1X و ادجوانت فروند بود (جدول ۱). سه هفته پس از سومین تزریق، سرم های مخلوط شده از نمونه های خونی هر گروه تهیه شدند. سطوح total IgG ویژه Nef در سرم ها توسط تکنیک الایزا غیرمستقیم (سوبسترای مورد استفاده TMB یا ۳، ۳'، ۵'، ۵'-تترامتیل بنزیدین؛ سیگما؛ ایالات متحده) سنجش شدند. به طور خلاصه، یک پلیت الایزا ۹۶ چاهکی (گرینر؛ آلمان) برای ۱۶ تا ۱۸ ساعت در ۴°C با ۱۰۰ میکرولیتر آنتی ژن Nef (۵ میکروگرم/میلی لیتر) رقیق شده در PBS1X (pH=۷/۲) کوت شد. سپس پلیت با بافر شست و شو (توئین ۰/۵٪ در PBS) شسته و با بافر بلاکینگ برای ۲ ساعت در ۳۷°C (BSA ۱٪ در PBS) انکوبه شد. سرم های مخلوط شده برای هر گروه با رقت ۱:۵۰ در بافر رقیق سازی (توئین ۰/۵٪ در بافر بلاکینگ) رقیق شدند (به عنوان آنتی بادی اول) و به چاهک ها اضافه و برای ۲ ساعت در ۳۷°C انکوبه شدند. بعد از شست و شو با بافر شست و شو، پلیت با آنتی بادی ضد total IgG موشی کوئزوگه با پراکسیداز (رقت ۱:۱۰۰۰۰ حجمی/حجمی) در بافر رقیق کننده به عنوان آنتی بادی ثانویه؛ سیگما؛ ایالات متحده) برای ۲ ساعت در ۳۷°C انکوبه شد. پس از شست و شوی پلیت ها با بافر شست و شو، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB (سیگما؛ ایالات متحده) اضافه، پس از ۱۵ دقیقه، واکنش با اسیدسولفوریک یک مولار متوقف شد و جذب در ۴۵۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱) برنامه ایمنی زایی موش

گروه	Modality	اولین تزریق	دومین تزریق	سومین تزریق
G1	پروتئین / پروتئین / پروتئین	*rNef+complete Freund's adjuvant (CFA)	rNef+incomplete Freund's adjuvant (IFA)	rNef+incomplete Freund's adjuvant (IFA)
G2	پروتئین / پروتئین / پروتئین	rHsp20-Nef	rHsp20-Nef	rHsp20-Nef
G3	کنترل	PBS	PBS	PBS
G4	کنترل	CFA	IFA	IFA

*r: Recombinant

فیوژن صورت گرفت. پلاسمید نوترکیب pET-Hsp20-Nef با استفاده از کیت استخراج DNA در مقیاس زیاد (مگا کیت؛ کیاژن؛ آلمان) تهیه شد و توسط هضم آنزیمی NheI/SalI (فرمنتاز؛ ایالات متحده) تایید گشت. الکتروفورز محصول هضم شده با آنزیم های محدود اثر روی ژل ۱٪ صورت گرفت. به علاوه، به منظور صحت توالی مورد نظر، فیوژن Hsp20-Nef توسط شرکت پیشگام تعیین توالی شد.

بیان پروتئین فیوژن نوترکیب Hsp20-Nef

ابتدا ترنسفورماسیون باکتری *E. coli* سویه های Rosetta و BL21 توسط پلاسمید نوترکیب Hsp20-Nef صورت گرفت. سپس دو کلون رشد یافته از هر دو سویه باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط LB Broth (سیگما؛ ایالات متحده) حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شدند و به مدت یک شبانه روز در انکوباتور شیکردار و دمای ۳۷°C انکوبه شدند. در روز بعد، ۵۰۰ میکرولیتر از باکتری های کشت داده شده به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مغذی باکتری Ty2x اضافه و در انکوباتور شیکردار ۳۷°C با حرکت دورانی انکوبه شد. القای بیان پروتئین پس از رسیدن جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۷ تا ۰/۸ توسط ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (IPTG؛ سیگما؛ ایالات متحده) یک میلی مولار صورت گرفت. رسوب نمونه های قبل از القا و بعد از القا (در مدت زمان های ۲، ۴ و ۱۶ ساعت) برای به دست آوردن زمان اپتیمم بیان پروتئین نوترکیب توسط الکتروفورز SDS-PAGE ارزیابی شدند. به علاوه، تایید پروتئین نوترکیب Hsp20-Nef توسط روش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی منوکلونال ضد Nef (Abcam) کوئزوگه به پراکسیداز انجام شد. به طور خلاصه، آنالیز SDS-PAGE نمونه های قبل از القا، بعد از القا و تخلیص شده (به صورت ذکر شده در بخش بعد) انجام شد. پس از آن، تهیه ساندویچ بلات صورت گرفت و انتقال باندها از ژل به کاغذ نیتروسولز تحت الکتروفورز در بافر وسترن بلات و به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. پس از آشکارسازی باندها با رنگ غیراختصاصی پانسواس، کاغذ نیتروسولز به مدت یک شبانه روز در بافر بلاکینگ انکوبه شد. سپس، آنتی بادی ضد Nef با نسبت ۱:۱۰۰۰۰ (حجمی/حجمی) اضافه شد. پس از شست و شو، از سوبسترای ۳'، ۳'-دی آمینو بنزیدین (DAB؛ سیگما؛ ایالات متحده) به منظور آشکارسازی باند مورد نظر روی کاغذ نیتروسولز استفاده شد. نهایتاً آب مقطر به عنوان متوقف کننده به کار رفت.

خالص سازی پروتئین فیوژن نوترکیب Hsp20-Nef با استفاده از روش رنگ آمیزی معکوس

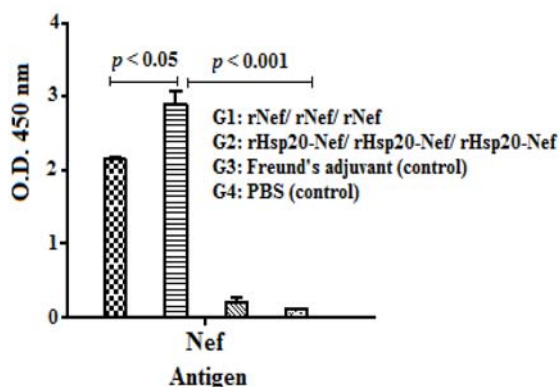
خالص سازی پروتئین فیوژن با استفاده از روش رنگ آمیزی معکوس صورت گرفت^[۱۲]. به این ترتیب که پس از تایید بیان پروتئین، رسوب های جمع آوری شده پس از القا با بافر لیزکننده تریس/سدیم کلرید (مرک؛ آلمان) و سونیکیشن کاملاً لیز شدند. پس از سانتریفوژ، مایع فوقانی (سوپرناتانت) با بافر نمونه مخلوط شده و پس از جوشاندن به مدت ۵ دقیقه، برای SDS-PAGE مورد استفاده قرار گرفت. پس از اتمام عمل الکتروفورز، ژل مربوطه به ترتیب به مدت ۵ دقیقه در محلول کربنات سدیم (بافر ۱؛ مرک؛ آلمان)، به مدت ۱۵ دقیقه در محلول حاوی ایمیدازول و سدیم دودسیل سولفات (بافر ۲؛ مرک؛ آلمان) و در نهایت به مدت ۲ دقیقه در محلول حاوی سولفات روی (بافر ۳؛ مرک؛ آلمان) قرار گرفت. پس از ظاهر شدن باند مربوط به پروتئین مورد نظر که باندی شفاف و بی رنگ است، باند از ژل جدا شده و در محلول آخر (بافر ۴) که محلول استخراج پروتئین از ژل است و حاوی آمونیوم کربنات و

تفاوت‌های بین گروه‌های کنترل و تست در بررسی ایمنولوژیکی توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه (نرم‌افزار 5 Graph-pad Prism) انجام شد.

یافته‌ها

بیان، تخلیص و تایید پروتئین فیوژن نوترکیب Hsp20-Nef

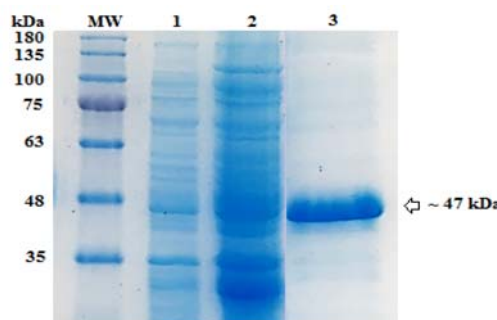
در ابتدا، حضور فیوژن Hsp20-Nef توسط هضم آنزیمی NheI/SalI به صورت یک باند واضح حدود ۱۲۳۰ جفت‌باز روی ژل آگارز تایید شد. آنالیز توالی فیوژن توسط شرکت پیشگام صورت گرفت که پس از مقایسه با توالی‌های بانک ژن، صحت توالی مورد نظر تایید شد. پس از تایید پلاسمید pET-Hsp20-Nef، ترنسفورم سویه‌های بیانی باکتری BL21 و Rosetta با پلاسمید نوترکیب به منظور آنالیز بیان پروتئین نوترکیب Hsp20-Nef انجام شد. در حقیقت، پس از کشت کلون‌های رشدیافته روی پلیت، القای بیان پروتئین با استفاده از القاکننده IPTG صورت گرفت. نتایج نشان دادند که بیان پروتئین نوترکیب تنها در سویه Rosetta در دمای ۳۷°C و ۴ ساعت پس از القا صورت گرفت. حضور باند حدود ۴۷ کیلوالتون روی ژل SDS-PAGE تاییدکننده بیان پروتئین فیوژن نوترکیب بود. تخلیص پروتئین نوترکیب توسط روش رنگ‌آمیزی معکوس به صورت ذکر شده در بخش روش‌ها صورت گرفت (شکل ۱). هویت پروتئین نوترکیب Hsp20-Nef توسط آن‌تی‌بادی ضد Nef در وسترن بلات آشکار شد (شکل ۲). پروتئین نوترکیب Hsp20-Nef یک رنج غلظت بین ۰/۶ و ۸/۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر توسط اسپکتروفتومتری نانودراپ نشان داد.



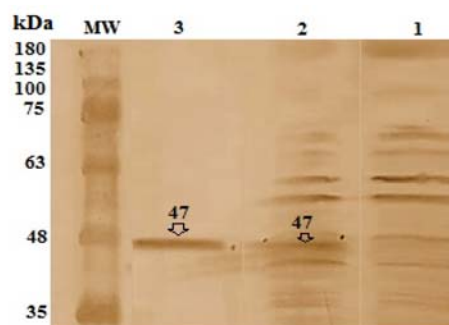
نمودار ۱ ارزیابی پاسخ‌های آن‌تی‌بادی (total IgG، رقت ۱:۱۰۰۰۰) در مقابل آن‌تیژن Nef در رژیم‌های مختلف: سرم موش‌ها از نمونه‌های خونی هر گروه (تعداد: ۳ نفر) سه هفته پس از آخرین تزریق تهیه شدند. رقت ۱:۵۰ برای سرم‌ها استفاده شد. نتایج به صورت میانگین جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر (مرتبط با سوبسترای TMB) ± انحراف معیار نشان داده شدند.

بحث

ایدز بیماری مهلک و خطرناکی است که براساس آمار سازمان بهداشت جهانی یکی از کشنده‌ترین بیماری‌های قرن حاضر است [13]. بنابراین انتظار می‌رود که یک واکسن موثر و کارآ بتواند پاندمی ایجاد شده از این بیماری را مهار نماید. یکی از پروتئین‌های مهم ویروس HIV-1، پروتئین Nef است که به عنوان کاندید واکسن تحقیقات زیادی روی آن صورت گرفته است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که پروتئین Nef (اسید آمینه ۱۰۲-۱۱۷) از ویروس HIV برای افزایش تکثیر ویروس به منظور پیشرفت هرچه بیشتر به سمت بیماری ایدز لازم است [14]. شواهد نشان می‌دهد که برخی از اپی‌توپ‌های Nef ایمنوژن و حفاظتی بوده و بیشترین سطح پاسخ‌های سایتوتوکسیسیته بر علیه این توالی‌ها است و در نتیجه می‌تواند کاندید مناسبی برای واکسن‌ها باشد. از انواع واکسن‌های مورد بحث در زمینه HIV، واکسن‌های پروتئینی هستند که به منظور افزایش نفوذپذیری آن‌تیژن و همچنین القای پاسخ‌های ایمنی موثر، از یک ادجوانت به همراه آن‌تیژن مورد نظر استفاده می‌شود [15]. یکی از انواع ادجوانت‌ها پروتئین‌های شوک حرارتی هستند که گروهی از پروتئین‌های حفاظت شده هستند که در پاسخ به شرایط استرسی در سلول‌ها بیان می‌شوند. پروتئین‌های شوک حرارتی که براساس وزن مولکولی خود بین ۱۲ تا ۴۳ کیلوالتون وزن دارند به پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک معروف هستند و دارای ناحیه بسیار حفاظت شده در ناحیه C ترمینال خود هستند که شامل ۸۰ تا ۱۰۰ آمینو اسید بوده و به دومین آلفا کریستالین معروف هستند. پروتئین Hsp20 یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های



شکل ۱ بیان و تخلیص پروتئین فیوژن نوترکیب Hsp20-Nef در سیستم بیان *E. coli* توسط آنالیز SDS-PAGE؛ ستون ۱) قبل از القا، ستون ۲) بعد از القا و ستون ۳) پروتئین تخلیص شده توسط رنگ‌آمیزی معکوس؛ علامت MW، مارکر وزن مولکولی (۱۰-۱۸۰ کیلوالتون؛ فرمنتاز؛ ایالات متحده) است.



شکل ۲ تایید بیان و تخلیص پروتئین فیوژن نوترکیب Hsp20-Nef در سیستم بیان *E. coli* توسط آنالیز وسترن بلات؛ ستون ۱) قبل از القا، ستون ۲) بعد از القا و ستون ۳) پروتئین تخلیص شده توسط رنگ‌آمیزی معکوس؛ علامت MW، مارکر وزن مولکولی (۱۰-۱۸۰ کیلوالتون؛ فرمنتاز؛ ایالات متحده) است.

دو روش طبیعی و دنا توره خالص سازی نشد بنابراین از یک روش کارای رنگ آمیزی معکوس استفاده شد. نهایتاً، پاسخ آنتی بادی توتال IgG در مقابل ساختار پروتئین نوترکیب تزریق شده به موش نشانگر کارایی Hsp20 در القای پاسخ آنتی بادی ضد آنتی ژن Nef بود.

از محدودیت های مطالعه حاضر، مدل حیوانی است که در ایران وجود ندارد. پیشنهاد می شود که بررسی ایزوتایپ های آنتی بادی و پاسخ های ایمنی سلولی در آینده صورت گیرد.

نتیجه گیری

پروتئین فیوژن نوترکیب Hsp20-Nef در سیستم بیانی /شرشیا کلی به طور موفقیت آمیزی بیان شد که توسط تکنیک های SDS-PAGE و وسترن بلات تایید شد. به علاوه، بررسی ایمونوژنیسیته پروتئین فیوژن نوترکیب Hsp20-Nef در مقایسه با پروتئین Nef تفاوت معنی داری را نشان داد. نتایج حاکی از میزان بالای تولید total IgG در موش های ایمونیزه شده با Hsp20-Nef بود که پیشنهادکننده توانایی ادجوانتی Hsp20 در موش های بآلب/سی است. به منظور ارزیابی بیشتر نقش ادجوانتی Hsp20، آزمایش های مرتبط با تعیین ایزوتایپ های IgG و نیز پاسخ های ایمنی سلولی در حال بررسی است.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از همکاران محترم بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران به ویژه خانم سپیده شهبازی به خاطر کمک های کارشناسانه در این پروژه تشکر و قدردانی می شود.

تأییدیه اخلاقی: تأیید آزمایش های حیوانی از کمیته اخلاق پزشکی انستیتو پاستور ایران اخذ شده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می دارند هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: بهاره رستمی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ شیوا ایرانی (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۱۵٪)؛ اعظم بوالحسنی (نویسنده سوم)، روش شناس/تحلیلگر آماری (۳۰٪)؛ رضا آهنگری کهن (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۵٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر تحت حمایت مالی انستیتو پاستور ایران بوده است.

منابع

- 1- Milani A, Bolhassani A, Shahbazi S, Motevalli F, Sadat SM, Soleymani S. Small heat shock protein 27: An effective adjuvant for enhancement of HIV-1 Nef antigen-specific immunity. *Immunol Lett.* 2017;191:16-22.
- 2- Lelièvre JD, Lévy Y. HIV-1 prophylactic vaccines: State of the art. *J Virus Erad.* 2016;2(1):5-11.
- 3- Habibzadeh N, Bolhassani A, Vahabpour R, Sadat SM. How can improve DNA vaccine modalities as a therapeutic approach against HIV infections?. *J AIDS Clin Res.* 2015;6(4):1000440.
- 4- Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: A brief overview. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità.* 2010;46(1):5-14.
- 5- Lever AML. AIDS/HIV, molecular and cell biology. *Rev Cell Biol Mol Med.* 2006 Sep.
- 6- Das SR, Jameel S. Biology of the HIV Nef protein.

شوگ حرارتی کوچک است که دارای ناحیه حفاظت شده آلفا کریستالین و همچنین صفحات چین خورده بتا (β -sheet) در شکل فضایی خود است. اعتقاد بر این است که خانواده پروتئین های شوگ حرارتی کوچک به همراه آنتی ژن، توانایی سیستم ایمنی اکتسابی را افزایش می دهند. با توجه به مطالعات انجام شده درباره ایمنی زا بودن Hsp20، این پروتئین به عنوان آنتی ژن در تحریک سلول های T و B و نیز تولید سایتوکاین های نظیر اینترفرون گاما می تواند نقش موثری را ایفا کند [16]. در یک مطالعه مربوط به پروتئین های شوگ حرارتی، زیر واحد بتای Hsp90 نوترکیب انسانی به همراه پروتئین نوترکیب HBsAg ویروس هپاتیت B به موش ها تزریق شد. نتایج حاصل از بررسی پاسخ های ایمنی نشان داد که اختلاف معنی داری در سطوح total IgG و IgG2a بین گروه های کنترل و گروه پروتئین/ادجوانت طراحی شده وجود دارد [17]. در این بررسی نیز با توجه به نقش مهم پروتئین Nef به عنوان کاندید واکسن و نیز اهمیت پروتئین های شوگ حرارتی به عنوان ادجوانت، بیان و تخلیص پروتئین Nef کونژوگ شده به Hsp20 در سیستم بیان پروکاریوتی به منظور ارزیابی ایمونوژنیسیته آن در مقایسه با پروتئین نوترکیب Nef صورت گرفت. در این تحقیق، از باکتری /شرشیا کلی به دلیل تولید زیاد محصول و ارزان بودن برای تولید پروتئین نوترکیب استفاده شد. تأیید بیان پروتئین با حضور باند ۴۷ کیلودالتون روی ژل SDS-PAGE و نیز آشکار شدن آن توسط آنتی بادی ضد Nef در وسترن بلات صورت گرفت. نتایج ایمنی زایی در موش بآلب/سی نشان داد که سطح تولید total IgG در پروتئین Nef کونژوگ شده با Hsp20 در مقایسه با پروتئین Nef به طور معنی داری افزایش یافته است. داده های به دست آمده نشانگر ایمونوژنیسیته بالاتر Hsp20 در مقایسه با ادجوانت تجاری فروند در مقابل آنتی ژن Nef است. مطالعه سابق ما روی بررسی ایمونوژنیسیته Hsp27 کونژوگ به Nef نیز نشان داد که پروتئین شوگ حرارتی کوچک Hsp27 توانست تولید total IgG را در مقابل آنتی ژن Nef افزایش دهد [1]. بررسی حاضر شباهت Hsp20 را با Hsp27 از نظر سطح پاسخ آنتی بادی تولید شده نشان می دهد. بررسی ها نشان دادند که پروتئین شوگ حرارتی ۲۰ (HspB6) به طور ثابت در بافت های گوناگون با عملکردهای متفاوت بیان می شود [18]. برای مثال، گزارش ها نشان دادند که سطوح بیان Hsp20 در سلول های کارسینومای هپاتوسلولار انسان (HCC) به طور معکوس با پیشرفت HCC ارتباط دارد. در حقیقت، Hsp20 رشد سلول های HCC را از طریق مسیرهای سیگنالینگ پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (MAPK) و AKT مهار می کند [18]. یک مطالعه نشان داد که هر دو ناحیه N-ترمینال (آمینواسیدهای ۱-۱۰۵) و C-ترمینال (اسید آمینه ۱۷۷-۴۸) پروتئین Hsp20 در گاو ها ایمونوژن بودند [16]. نتایج ما نشان داد که یک ساختار پروتئینی بیان کننده ژن HIV Nef فیوز شده به Hsp20 توانست به طور مهمی پاسخ آنتی بادی را در مقایسه با گروه های کنترل (PBS و ادجوانت) و نیز گروه ایمونیزه شده با Nef/ادجوانت فروند افزایش دهد که پیشنهادکننده توانایی ادجوانتی Hsp20 در موش های بآلب/سی است.

به طور کلی، در این مطالعه، طراحی، ساخت و بیان پروتئین نوترکیب کونژوگ Hsp20-Nef صورت گرفت و بهترین شرایط بیان از نظر زمان انکوباسیون پس از القای IPTG با (۴ ساعت) و نوع سویه باکتری (رزتا) تعیین شد. پروتئین نوترکیب مورد نظر با روش کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از رزین Ni-NTA توسط هر

[Persian]

14- Kadhodayan S, Irani Sh, Sadat SM, Fotouhi F, Bolhassani A. Cloning, expression and purification of the recombinant HIV-1 Tat-Nef fusion protein in prokaryotic expression system. *Arak Med Univ J*. 2016;19(4):60-8.

[Persian]

15- Skwarczynski M, Toth I. Peptide-based synthetic vaccines. *Chem Sci*. 2016;7(2):842-54.

16- Norimine J, Mosqueda J, Palmer GH, Lewin HA, Brown WC. Conservation of *Babesia bovis* small heat shock protein (Hsp20) among strains and definition of T helper cell epitopes recognized by cattle with diverse major histocompatibility complex class II haplotypes. *Infect Immun*. 2004;72(2):1096-106.

17- Bandehpour M, Sharifnia Z, Mosaffa N, Kazemi B, Seyed N, Soleimani Darani M. Effect of HSP90 adjuvant on immunogenicity of HbsAg in BALB/c mice. *Res Med*. 2013;37(2):80-4. [Persian]

18- Matsushima-Nishiwaki R, Kumada T, Nagasawa T, Suzuki M, Yasuda E, Okuda S, al. Direct association of heat shock protein 20 (HSPB6) with phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in human hepatocellular carcinoma: Regulation of the PI3K activity. *PLoS One*. 2013;8(11):e78440.

Indian J Med Res. 2005;121(4):315-32.

7- Geyer M, Fackler OT, Matija Peterlin B. Structure-function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep*. 2001;2(7):580-5.

8- Lema D, Garcia A, De Sanctis JB. HIV vaccines: A brief overview. *Scand J Immunol*. 2014;80(1):1-11.

9- Wallin RP, Lundqvist A, Moré SH, Von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol*. 2002;23(3):130-5.

10- Wan T, Zhou X, Chen G, An H, Chen T, Zhang W, et al. Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. *Blood*. 2004;103(5):1747-54.

11- Bakthisaran R, Tangirala R, Mohan Rao C. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics*. 2015;1854(4):291-319.

12- Simpson RJ. Zinc/Imidazole procedure for visualization of proteins in gels by negative staining. *CSH Protoc*. 2007;2007:pdb.prot4701.

13- Alipour Z, Eskandari N, Mokhah S. Evaluation of knowledge and attitude of non-medical students about AIDS. *J Holist Nurs Midwifery*. 2016;26(79):10-20.