مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۴۹/هفته اول آبان ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۳۰

افزایش ایمنی زایی ساقه‌ی پروتئین هماگلوتینین ویروس انفلوانزا در همراهی با پروتئین شوک حرارتی Leishmania major، گامی در جهت ساخت واکسن واحد

سعیده صادقی نشاط[۱]، دکتر بهرخ فرهمند[۲]، دکتر زهرا کیان‌مهر[۳]، سمیه زمانی[۴]، مریم صالح[۴]، دکتر فاطمه فتوحی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ویروس انفلوانزا می‌تواند در انسان عفونت حاد تنفسی با شدت‌های متفاوت ایجاد کند که حتی در پاره‌ای از موارد، منجر به مرگ می‌شود. واکسن‌های موجود، شناساگر سر متغیر پروتئین هماگلوتینین است و بنا بر این، نیازمند به‌روزرسانی سالانه می‌باشد. به تازگی، تلاش‌های زیادی در جهت ساخت واکسن‌های وسیع‌الطیف بر مبنای آنتی‌ژن‌های حفاظت شده‌ی ویروس انفلوانزا انجام گرفته است. هدف از این مطالعه، ارزیابی ایمنی‌زایی زیرواحد HA2 ویروس انفلوانزای نوع A در مدل موشی بود.

روش‌ها: پروتئین نوترکیب HA2 در باکتری Escherichia coli بیان و استخراج شد و با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل، تخلیص گردید. جهت حذف نمک‌های اضافی و اوره و بازگرداندن پروتئین به شکل اولیه، از روش دیالیز با شیب اوره کمک گرفته شد. موش‌های BALB/c شش تا هشت هفته‌ای، با پروتئین HA2 تنها و یا همراه با ادجوانت‌های $HSP70_{221-604}$ از Leishmania major و یا Freund، به صورت تحت جلدی واکسینه شدند. در ادامه، ایمنی هومورال با آزمایش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) بررسی گردید و در نهایت، موش‌های هر گروه با ویروس PR8 چالش شدند.

یافته‌ها: در موش‌های دریافت کننده‌ی پروتئین HA2، همراه یا بدون ادجوانت، آنتی‌بادی اختصاصی تولید شده بود. موش‌هایی که پروتئین HA2 را همراه با Freund دریافت کرده بودند، آنتی‌بادی اختصاصی با تیتر بالاتری تولید کردند. در حالی که، موش‌های دریافت کننده‌ی HA2 همراه با HSP70، در چالش با ویروس وحشی بهتر محافظت شده بودند.

نتیجه‌گیری: پروتئین‌های شوک حرارتی باعث القای پاسخ آنتی‌بادی شده، ایمنی ذاتی را نیز تحریک می‌کنند. نتایج این پژوهش نشان داد که پروتئین HA2 به تنهایی و یا همراه با HSP70 قادر است، موش‌ها را در برابر چالش با دوز کشنده‌ی ویروس محافظت نماید و می‌تواند، به عنوان یک واکسن واحد در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: ویروس انفلوانزا، هماگلوتینین، HA2، Freund، HSP70، Leishmania major

ارجاع: صادقی نشاط سعیده، فرهمند بهرخ، کیان‌مهر زهرا، زمانی سمیه، صالح مریم، فتوحی فاطمه. **افزایش ایمنی زایی ساقه‌ی پروتئین هماگلوتینین ویروس انفلوانزا در همراهی با پروتئین شوک حرارتی Leishmania major، گامی در جهت ساخت واکسن واحد.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۹): ۱۴۸۶-۱۴۷۵

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲- استادیار، آزمایشگاه تحقیقات انفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- آزمایشگاه تحقیقات انفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- کارشناس ارشد، آزمایشگاه تحقیقات انفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر فاطمه فتوحی
Email: fotouhi@pasteur.ac.ir

مقدمه

ویروس انفلوانزا، یکی از علل عمده‌ی بیماری‌های واگیردار و حاد تنفسی در سراسر جهان است که پستانداران و پرندگان را درگیر می‌کند. این ویروس، از اعضای خانواده‌ی Orthomyxoviridae و دارای غشا و اسید ریبونوکلئیک قطعه قطعه با قطبیت منفی است. تغییرات مداوم آنتی‌ژنی در پروتئین‌های سطحی، این ویروس را قادر می‌سازد تا چندین بار میزبان خود را آلوده کند. بیماری انفلوانزا، سالیانه حدود یک میلیارد نفر از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد که از این میان، ۵۰۰۰۰۰-۳۰۰۰۰۰ مورد منجر به مرگ می‌شود (۱). ۱۰ پاندمی بزرگ در طی ۳۰۰ سال اخیر اتفاق افتاده است که از جمله‌ی آن‌ها، می‌توان به پاندمی‌های سال‌های ۱۹۱۸، ۱۹۵۷، ۱۹۶۸و ۲۰۰۹ اشاره کرد که مرگ‌بارترین آن‌ها در سال ۱۹۱۸ بوده است (۳-۲).

هماگلوتینین، مهم‌ترین پروتئین در عفونت‌زایی ویروس و یک هموتریمر است که توسط قطعه‌ی شماره‌ی چهار اسید ریبونوکلئیک رمزدهی می‌شود وآنتی‌بادی‌های خنثی کننده، اغلب علیه اپی‌توپ‌های آن ساخته می‌شوند. همه‌گیری‌های ویروس انفلوانزا، به واسطه‌ی تغییرات آنتی‌ژنیک این پروتئین رخ می‌دهد (۷-۴، ۱).

هماگلوتینین، ابتدا به صورت یک پروتئین پیش‌ساز (HA0) ساخته و سپس دچار تغییرات پس از ترجمه می‌شود (۸) و در نهایت هر مونومر به دو پلی‌پپتید کوچک‌تر یعنی HA1 و HA2 شکسته می‌شود (۹). زیرواحد HA1 سر گلبولار این پروتئین را تشکیل می‌دهد و بخش ساقه مانند و حفاظت شده‌ی هماگلوتینین HA2 نام دارد که انتهای کربوکسیل این پروتئین، درون غشا جای گرفته و انتهای آمین آن به عنوان پپتید الحاقی شناسایی شده است (۸).

واکسیناسیون، یکی از بهترین راه‌های ایمن کردن جمعیت انسانی در مقابل اپیدمی‌ها و پاندمی‌های ویروس انفلوانزا است (۱۰). به دلیل تغییرات مداوم این ویروس، در حال حاضر واکسن انفلوانزا به صورت هر ساله و بر اساس سویه‌ی در گردش تولید می‌شود (۱۱). امروزه، محققین در تلاشند با تفکیک اجزای ویروس و حذف پروتئین‌های غیر اختصاصی، با تخلیص قسمت‌های آنتی‌ژنیک مشترک بین سویه‌های مختلف ویروس انفلوانزا، به سمت تولید واکسن‌های دایمی و امن‌تری گام بردارندکه تمام سویه‌ها را تحت پوشش قرار دهد.

در پژوهش حاضر، به منظور دستیابی به یک واکسن زیرواحدی مناسب، بخش حفاظت شده‌ی پروتئین هماگلوتینین (HA2) ویروس انفلوانزای A/H1N1 پس از بیان در سیستم پروکاریوت تخلیص گردید و ایمنی‌زایی و حفاظت‌بخشی آن به تنهایی و همراه با دو ادجوانت Freund و پروتئین شوک حرارتی در مدل حیوانی بررسی شد.

پروتئین $HSP70_{221-604}$ از Leishmania major به کار رفته در این پژوهش، از خانواده‌ی پروتئین‌های شوک حرارتی است. این پروتئین‌ها که به شدت حفاظت شده هستند، در همه‌ی ارگانیسم‌های زنده از باکتری تا انسان یافت می‌شوند و به عنوان چاپرون عمل می‌کنند (۱۲). این پروتئین، قادر به تحریک تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی است و می‌تواند سبب رهاسازی کموکاین‌ها توسط مونوسیت‌ها و ماکروفاژها و بلوغ سلول‌های دندریتیک شود (۱۳).

روش‌ها

الف) تولید پروتئین نوترکیب HA2 در باکتری Escherichia coli: پلاسمید بیانی کد کننده‌ی ساقه‌ی پروتئین هماگلوتینین (PET-28a/HA2) که از قبل در آزمایشگاه تحقیقاتی انفلوانزای انستیتو پاستور ایران ساخته و بیان آن تأیید شده بود، تهیه گردید. ابتدا این پلاسمید، در باکتری Escherichia coli Top10 F' تکثیر داده شد. برای بیان پروتئین نوترکیب، سلول‌های باکتری میزبان Escherichia coli BL21-DE3 با به کارگیری روش شوک حرارتی، مستعد شدند و ۵۰۰ نانوگرم پلاسمید نوترکیب PET-28a/HA2 در آن ترانسفورم گردید. باکتری‌های نوترکیب حاصل، در پلیت‌های حاوی LB agar (Luria-bertani) واجد آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد. کلونی‌های حاصل در ارلن‌های یک لیتری حاوی ۲۵۰ سی‌سی محیط کشت LB Broth و آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در گرم‌خانه‌ی شیکردار انکوبه گردیدند.

پس از حصول دانسیته‌ی نوری مناسب، القاگر IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) با غلظت یک میلی‌مولار به باکتری‌ها اضافه شد و شش ساعت بعد، محصول کشت در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. بیان پروتئین نوترکیب HA2 با الکتروفورز تأیید شد.

ب) استخراج پروتئین نوترکیب HA2: پروتئین مورد نظر بعد از آزمون و خطاهای متعدد و بررسی نتایج چندین روش استخراج متفاوت، از سلول Escherichia coli BL21 به روش دناتوره و با استفاده از اوره‌ی ۸ مولار و با به کارگیری بافرهای مختلف استخراج شد. روش به کار گرفته شده به شرح زیر است:

ابتدا رسوب باکتری در بافر LEW (۳۰۰ میلی‌مولار NaCl، ۵۰ میلی‌مولار NaH_2PO_4) حاوی ۵ میلی‌مولار Imidazole و pH ~ ۸ شستشو داده شد و بعد از طی سه مرحله‌ی انجماد و ذوب، ۷ بار به مدت یک دقیقه با قدرت ۸۰ و پالس ۰/۵ سونیکه شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. در مرحله‌ی بعد، رسوب پروتئینی بار دیگر در بافر پیش‌گفته به علاوه‌ی Triton x-۱۰۰ حل شد و دوباره سانتریفیوژ گردید. در مرحله‌ی سوم، جهت خارج کردن پروتئین HA2 از باقی‌مانده‌های سلولی، از بافر LEW حاوی اوره‌ی ۸ مولار استفاده شد. در این مرحله، پس از سونیکاسیون و قبل از سانتریفیوژ، سوسپانسیون حاصل در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرعت ۸۰ دور در دقیقه به مدت یک ساعت انکوبه گردید. مایع رویی حاصل از مرحله‌ی نهایی که حاوی پروتئین HA2 بود، جهت تخلیص با ستون نیکل جمع‌آوری شد. در تمام مراحل، نمونه‌برداری صورت گرفت و نمونه‌ها با الکتروفورز بررسی گردید.

ج) تخلیص پروتئین نوترکیب HA2: تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون‌های Ni-TED 2000 packed (MN, Germany) و با اعمال تغییراتی در دستورالعمل مربوط صورت گرفت. بدین منظور، ابتدا ستون دو بار (هر بار ۳ میلی‌لیتر) با آب مقطر دیونیزه و دو بار (هر بار ۳ ml میلی‌لیتر) با بافر LEW و pH ~ ۸ شستشو داده شد. آن

گاه در چند مرحله، ۹ ml میلی‌لیتر از محصول استخراج بر روی ستون برده شد. به منظور بهره‌گیری از تمامی ظرفیت ستون، مایع خروجی از ستون (Flow through) چندین بار به ستون برگردانده شد. سپس برای حذف پروتئین‌های اضافی، ستون با بهره‌گیری از بافر LEW حاوی اوره (۱۲ میلی‌لیتر) شسته شد. در این مرحله، جهت جداسازی پروتئین HA2 از ستون، بافر LEW حاوی اوره ۸ مولار و Imidazole ۲۵۰ میلی‌مولار به کار گرفته شد و محلول عبوری از ستون در حجم‌های ۲۵۰ میکرولیتری جمع‌آوری شد و با ژل SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ۱۲ درصد بررسی گردید. گفتنی است که در تمامی مراحل، به منظور افزایش کارایی ستون، سرعت عبور بافرها به میزان ۳ قطره در دقیقه تنظیم شد.

در ادامه، به منظور حذف نمک‌های اضافی و جلوگیری از رسوب پروتئین، از روش دیالیز در بافر فسفات با شیب اوره استفاده شد. برای این کار، پروتئین تخلیص شده علیه بافر فسفات واجد اوره‌ی ۴ مولار، ۲ مولار و ۱ مولار، هر کدام به مدت ۱ ساعت و سپس در بافر فسفات فاقد اوره و pH ~ ۸/۵ به مدت یک شب دیالیز گردید. میزان خلوص پروتئین ۲۷ کیلو دالتونی HA2 در نهایت با الکتروفورز روی ژل ۱۲ درصد و غلظت آن با روش Bradford برآورد گردید و تا هنگام تزریق در یخچال نگهداری شد.

د) برنامه‌ی واکسیناسیون: ۲۵ سر موش BALB/c ماده‌ی ۸-۶ هفته‌ای از انستیتو پاستور کرج خریداری و بعد از یک هفته نگهداری در بخش حیوان‌خانه، در ۵ گروه ۵تایی مورد و شاهد تقسیم شدند. واکسیناسیون به صورت تحت جلدی در سه دوز و به میزان هر دوز ۱۵ میکروگرم و در فواصل دو هفته‌ای انجام شد. گروه اول پروتئین HA2، گروه دوم پروتئین HA2 همراه با پروتئین HSP و گروه سوم پروتئین HA2 را همراه با ادجوانت Freund، دو گروه نیز به عنوان شاهد HSP و یا PBS (Phosphate-buffered saline) دریافت کردند. دو هفته بعد از آخرین تزریق، از سینوس اربیتال موش‌ها خون‌گیری شد و سرم آن‌ها جهت بررسی با الایزا جدا گردید.

ه) الایزا: به منظور ارزیابی ایمنی‌زایی پروتئین HA2 به تنهایی و یا همراه با ادجوانت‌های پیش‌گفته، میزان IgG (Immunoglobulin G) سرم‌های جمع‌آوری شده با روش الایزا بررسی گردید. بدین ترتیب که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از پروتئین HA2 رقیق شده با بافر فسفات نمکی (۰/۱ µg/ml میکروگرم بر میلی‌لیتر) با pH ۷/۲ درون هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از شستشو، مسدودسازی چاهک‌ها با BSA (Bovine serum albumin) ۳ درصد انجام گرفت و پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه گذاشته شد. سپس چاهک‌ها شسته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱/۲۰۰۰ مخلوط سرم‌های گروه‌های مختلف موش‌ها (جمع‌آوری شده در هفته‌ی سوم بعد از تزریق آخرین دوز واکسن)، در هر چاهک ریخته شد و پلیت برای ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سرم‌ها در PBS حاوی ۱ درصد BSA رقیق شدند.

در ادامه، بعد از مرحله‌ی شستشوی پلیت، در هر

یک از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی ثانویه (HRP conjugated mouse antibody) با رقت ۱/۵۰۰۰ (رقیق شده با بافر فسفات نمکی حاوی ۱ درصد BSA) ریخته شد و برای ۱ ساعت دیگر درون انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در این مرحله، بعد از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB (3,3′,5,5′-tetra methyl banzidine) به هر چاهک افزوده شد و ۲۰ دقیقه در فضای اتاق و در مکان تاریک گذاشته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ نرمال (به عنوان خاتمه دهنده‌ی واکنش) به محتویات هر چاهک افزوده و میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

و) چالش حیوانات با ویروس کشنده‌ی H1N1: در این پژوهش به منظور چالش موش‌ها از ویروس A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) سازگار شده با موش استفاده شد. قبل از چالش، دوز کشنده‌ی ویروس در مدل موش BALB/c تعیین گردید. بدین منظور، ۴ گروه ۴تایی از موش‌های BALB/c توسط زایلوزین/کتامین نیمه هوشیار شدند و با رقت‌های مختلف (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3} و 10^{-4}) ویروس PR8 به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از طریق بینی تلقیح شدند. موش‌های هر گروه در قفس‌های جداگانه به مدت ۲ هفته زیر هود آزمایشگاهی سطح ۲ ایمنی، نگهداری شدند و روزانه از نظر بروزآثار بیماری و یا مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند.

جهت چالش، تمامی موش های واکسینه شده (مورد و شاهد) دو هفته بعد از تزریق سوم با یک دوز کشنده از ویروس PR8 به روشی که در بالا ذکر شد تلقیح گردیدند و به مدت دو هفته مرگ و میر و کاهش وزن آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

الف) تولید پروتئین نوترکیب HA2: پس از ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب PET-28a/HA2 در سویه‌ی بیانی مستعد شده‌ی BL21 (DE3)، بیان این پروتئین در ارلن‌های حاوی ۲۵۰ سی‌سی محیط کشت مایع LB Broth در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و غلظت ۱ میلی‌مولار از IPTG و در ساعت ششم انجام گرفت. نتایج حاصل از الکتروفورز نشان داد که پروتئین ۲۷ کیلو دالتونی HA2 در تمامی ارلن‌ها به خوبی بیان شده است (شکل ۱– a).

در ادامه، استخراج پروتئین نوترکیب HA2 با روش دناتوره و اوره‌ی ۸ مولار، با بهره‌گیری از بافرهای مختلف و سونیکاسیون انجام گرفت و نتایج حاصل بر روی ژل الکتروفورز برده شد. همان گونه که در ستون هفتم شکل ۱– b مشاهده می‌شود، این پروتئین به مقدار مناسبی استخراج و بسیاری از پروتئین‌های اضافی در مراحل قبلی حذف گردیده است. در مرحله‌ی بعد، برای حذف کامل پروتئین‌های اضافی، از ستون کروماتوگرافی نیکل استفاده شد. همان طور که در شکل ۱–c نشان داده شده پروتئین نوترکیب HA2 به میزان خوبی تخلیص شده است. در نهایت، جهت حذف نمک و اوره به منظور آماده‌سازی پروتئین برای تزریق، نمونه‌ی جمع‌آوری شده در مرحله‌ی قبل، علیه بافر فسفات با شیب اوره دیالیز گردید. بررسی ژل الکتروفورز مربوط نشان داد که پروتئین ۲۷ کیلودالتونی HA2 با درجه‌ی خلوص بیش از ۹۰ درصد تخلیص شده است (شکل ۱– d). همچنین، میزان پروتئین HA2 با آزمایش Bradford سنجیده شد و غلظت نهایی پروتئین تخلیص شده معادل ۰/۵۵ میکروگرم در هر میکرولیتر محاسبه شد.

ب) اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد HA2 به روش الایزا

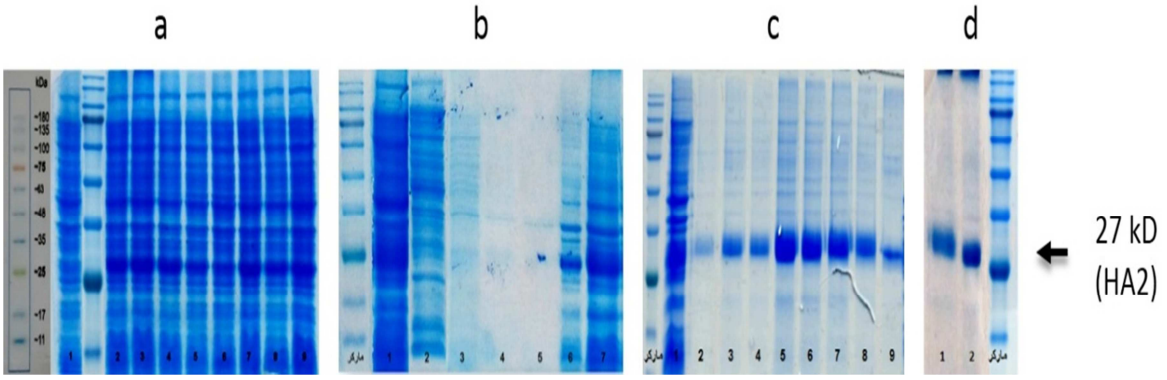
در موش‌های مورد مطالعه: ۲ هفته پس از آخرین دوز واکسن، از تمام حیوانات خون‌گیری به عمل آمد و میزان آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین HA2 با آزمایش الایزا اندازه‌گیری شد. همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، هر سه گروه دریافت کننده‌ی HA2 به تنهایی و یا همراه با ادجوانت های Freund و پروتئین HSP70، دارای پاسخ IgG علیه پروتئین HA2 هستند.

آنالیز مقادیر به دست آمده با آزمون آماری One way ANOVA نشان داد که تولید آنتی‌بادی IgG در هر سه گروه دریافت کننده‌ی واکسن نسبت به گروه‌های شاهد (دریافت کننده‌ی PBS و HSP) تفاوت معنی‌داری ($P < ۰/۰۰۰۱$) دارند. همان طور که در شکل ۲ آمده است، در موش‌های ایمن شده با HA2 به همراه ادجوانت‌های Freund یا پروتئین HSP70، نسبت به موش‌هایی که فقط HA2 دریافت کرده بودند، آنتی‌بادی اختصاصی بیشتری تولید شده بود؛ هر چند این تفاوت معنی‌دار نبود.

ج) چالش حیوانات با ویروس کشنده‌ی H1N1:

قبل از چالش حیوانات واکسینه، دوز کشنده‌ی ویروس در موش‌های BALB/c مطابق روش گفته شده اندازه‌گیری شد. با توجه به این که در رقت $۱۰^{-۳}$ از ویروس PR8، ۱۰۰ درصد حیوان‌ها مرده و در رقت بعدی تمام موش‌ها زنده ماندند، رقت $۱۰^{-۳}$ به عنوان LD90 (رقتی که بتواند بیش از ۹۰ درصد حیوانات را بکشد) در نظر گرفته شد.

۲ هفته بعد از آخرین مرحله‌ی واکسیناسیون، موش‌های هر گروه، ۱۰۰ میکرولیتر از دوز کشنده‌ی ویروس را از طریق بینی دریافت کردند. موش‌ها به مدت ۲ هفته از نظر کاهش وزن و مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج آن در شکل ۳- a و ۳- b آمده است.



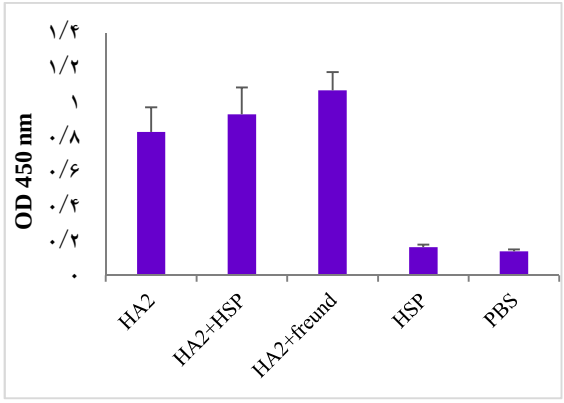
شکل ۱. الکتروفورز نمونه‌ی حاصل از بیان، استخراج و تخلیص پروتئین نوترکیب HA2

a. بیان pET-28a/HA2 در باکتری Escherichia coli سویه‌ی BL21 (DE3)، ستون ۱: نمونه‌ی باکتری قبل از القا با IPTG، ستون‌های ۹-۲: نمونه‌ی باکتری در ارلن‌های ۸-۱، ۶ ساعت بعد از القا با IPTG.

b. الکتروفورز نمونه‌ی حاصل از استخراج پروتئین HA2 از باکتری Escherichia coli سویه‌ی BL21 (DE3). ستون ۱: نمونه‌ی باکتری قبل از استخراج پروتئین HA2، ستون‌های ۵-۲: مراحل شستشوی پروتئین‌های اضافی، ستون‌های ۶ و ۷: محصول نهایی استخراج پروتئین HA2.

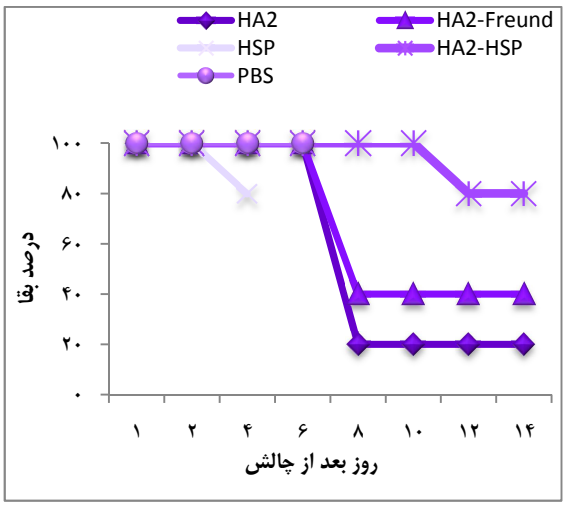
c. الکتروفورز نمونه‌ی حاصل از تخلیص پروتئین HA2 توسط ستون Ni-TED. ستون ۱: نمونه‌ی جمع‌آوری شده از ستون بعد از بارگذاری نمونه، ستون‌های ۹-۲: الوشن حاوی پروتئین تخلیص شده HA2 توسط ستون نیکل.

d. الکتروفورز نمونه‌ی حاصل از دیالیز پروتئین HA2. ستون ۱: پروتئین HA2 تخلیص شده با ستون نیکل قبل از دیالیز، ستون ۲: پروتئین HA2 بعد از دیالیز.



شکل ۲. نتایج مربوط به اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های ویژه‌ی HA2 به روش الایزا. در این روش، رقت ۱/۲۰۰۰ سرم موش‌های مورد مطالعه با یکدیگر مقایسه شده است.

PBS: Phosphate-buffered saline



شکل ۳. نتایج چالش موش‌های واکسینه با ویروس. a. میزان بقا در موش‌های واکسینه شده بعد از چالش با H1N1. b. میزان تغییرات وزنی موش‌های گروه‌های مختلف بعد از چالش با ویروس H1N1

PBS: Phosphate-buffered saline

در این مطالعه، در موش‌های دریافت کننده‌ی HA2 هنگام چالش با ویروس PR8 (H1N1)، ۸۰ درصد مرگ اتفاق افتاد. حال آن که در گروه‌های دریافت کننده‌ی HA2-Freund و HA2-HSP، به ترتیب ۴۰ و ۸۰ درصد موش‌های چالش شده با ویروس زنده ماندند (شکل ۳- a). همچنین، بنا بر شکل ۳- b، موش‌های باقی‌مانده‌ی گروه‌های دریافت کننده‌ی واکسن یک روند رو به بهبود و افزایش وزن را نشان دادند. این در حالی است که در گروه‌های شاهد دریافت کننده‌ی HSP و PBS چالش شده با H1N1، میزان تلفات ۱۰۰ درصد بود.

بحث

هر ساله، اپیدمی‌های انفلوانزا سبب بیماری‌های شدید و مرگ و میر در سراسر جهان می‌گردد (۱). با این حال، هیچ پیشگیری مؤثری علیه عفونت این ویروس تا کنون ایجاد نشده است. جهش‌زایی و نوترتیبی غیر قابل پیش‌بینی ویروس انفلوانزای نوع A و ظهور تنوع‌های جدیدی که از سیستم ایمنی فرار می‌کنند، باعث مقاومت این ویروس در برابر اقدامات پیشگیری کننده و ایجاد اپیدمی‌ها و پاندمی‌های عمومی دوره‌ای می‌شود و جمعیت انسان‌ها را تهدید می‌کند (۱۴).

واکسن‌هایی که امروزه موجود هستند، باعث القای آنتی‌بادی‌هایی علیه نژادهای فصلی دارای مناطق آنتی‌ژنی با شباهت زیاد می‌شوند، اما علیه تنوع‌های جدید ویروس ناکارآمد هستند. بنا بر این، تلاش‌های تحقیقاتی زیادی که در سال‌های اخیر انجام گرفته است، به دنبال یافتن راهی برای تولید یک واکسن واحد هستند که در برابر نژادهای ویروسی دارای زیرنوع‌های مختلف HA حفاظت ایجاد کند و جهت پیش‌گیری از اپیدمی‌ها و حتی پاندمی‌های احتمالی نیز مؤثر واقع شود (۱۴).

یک واکسن انفلوانزای ایده‌آل، واکسنی است که ایمن و دارای قدرت اثرگذاری طولانی و اثر حفاظت‌بخشی در برابر نژادهای مختلف ویروس

باشد. در این زمینه، زیرواحد کوچک هماگلوتینین (HA2) که شامل ساقه و فیوژن پپتید است و از نظر آنتی‌ژنی نسبت به سر کروی مولکول حفاظت شده است، کاندیدای امیدبخشی برای آماده‌سازی واکسن واحد است (۱۴). توالی ناحیه‌ی HA2 دارای ۸۵ درصد همولوژی در میان زیر نوع‌های مختلف ویروس انفلوانزا و ۹۵ درصد همولوژی در میان سویه‌های مختلف یک زیرنوع است و می‌تواند پاسخ‌های ایمنی متقاطع ایجاد کند (۱۵).

چهار منطقه‌ی آنتی‌ژنیک متفاوت در پپتید HA2 شناسایی شده است. آنتی‌بادی‌هایی که سه تا از این مناطق را شناسایی کنند، قادرند به طور گسترده‌ای ایمنی متقاطع ایجاد نمایند. این مناطق، شامل ناحیه‌ی پپتید الحاقی (رزیدوهای ۳۸-۱ از سمت N ترمینال)، ناحیه‌ی اکتودامین HA2 (اسید آمینه‌های ۱۸۵-۲۳ سمت N ترمینال) و قسمت ایمونوژنیک داخلی (رزیدوهای ۱۷۵-۱۲۵) است (۱۷-۱۶). پتانسیل حفاظت‌بخشی این نواحی با روش‌های مختلف توسط گروه‌های تحقیقاتی گوناگونی بررسی و مشاهده شده است که موش‌های واکسینه شده با این نواحی، بعد از چالش با ویروس، بیماری خفیف‌تر و مرگ و میر کمتری خواهند داشت (۲۰-۱۷).

پژوهش‌های صورت گرفته نشان داده است که با وجود پوشیده شدن HA2 توسط HA1 در ویروس طبیعی، هنگام مواجهه‌ی انسان و موش با عفونت انفلوانزا، آنتی‌بادی‌های ضد HA2 نیز تولید می‌شوند (۲۱). Steel و همکاران نشان دادند که با حذف سر گلوبولار HA1، ایمنی‌زایی گلیکوپروتئین HA2 افزایش می‌یابد؛ به طوری که واکسیناسیون موش‌ها با هماگلوتینین فاقد سر، باعث ایجاد آنتی‌بادی‌های واکنش‌گر با چندین زیرنوع HA می‌شود و علیه عفونت ویروس انفلوانزا حفاظت ایجاد می‌کند (۲۲).

همچنین، همراهی ادجوانت Imiquimode باعث افزایش ایمنی‌زایی و حفاظت‌بخشی اسید آمینه‌های ۵۶۰-۳۴۰ پپتید HA2 شد (۲۳). از این رو، می‌توان انتظار داشت که پروتئین HA2 بتواند به عنوان یک هدف اساسی برای تولید واکسن زیرواحدی دارای حفاظت گسترده علیه زیرنوع‌های مختلف ویروس انفلوانزای نوع A، استفاده شود (۲۴).

بنا بر این، در مطالعه‌ی حاضر طراحی واکسن زیرواحدی بر مبنای ناحیه‌ی حفاظت شده‌ی پروتئین هماگلوتینین مد نظر قرار گرفت. پروتئین HA2 از قبل در آزمایشگاه تحقیقاتی انفلوانزا در میزبان باکتریایی بیان و با روش Western blot تأیید شده بود. در تحقیق حاضر، پروتئین HA2 بعد از بیان در مقیاس زیاد، استخراج و تخلیص گردید. به دلیل تشکیل اینکلوژن‌بادی، استخراج به روش دناتوره و با کمک گرفتن از نمک‌های مختلف و اوره‌ی ۸ مولار انجام گرفت. عمل تخلیص پروتئین HA2 که واجد دنباله‌ی هیستیدینی بود، با کمک گرفتن از ستون کروماتوگرافی نیکل انجام شد. به علت نامحلول بودن پروتئین در شرایط بازی، جهت حذف نمک‌های اضافی، از روش دیالیز در شیب اوره‌ی ملایم استفاده شد. دیالیز پروتئین‌ها در شیب اوره‌ی ملایم، باعث کاهش رسوب پروتئین بعد از جداسازی اوره می‌شود و از به هم ریختن ساختار پروتئین جلوگیری می‌نماید. بافر فسفات مورد استفاده فقط حاوی دو نمک Na_2HPO_4 و NaH_2PO_4 است. به دلیل حساسیت پروتئین‌ها به pH، حلالیت HA2 در pHهای ۹-۴، بررسی شد و مشخص گردید این

پروتئین در pH ~ ۸/۵ بیشترین حلالیت را دارد. بنا بر این، جهت دیالیز پروتئین مورد نظر از این pH استفاده گردید.

به منظور ارزیابی ایمنی‌زایی پروتئین تولید شده، از مدل موشی استفاده شد. نتایج ایمن‌سازی موش‌های BALB/c نشان داد که پروتئین نوترکیب HA2 به تنهایی قادر است به خوبی سیستم ایمنی را تحریک کند و القای آنتی‌بادی‌های ویژه را راه‌اندازی نماید.

هدف از واکسیناسیون، ایجاد ایمنی حفاظتی است؛ در برخی از واکسن‌ها به ویژه واکسن‌های پپتیدی، همراهی یک ادجوانت مناسب، باعث افزایش ایمنی می‌شود. ادجوانت‌ها در بسیاری از واکسن‌ها استفاده می‌شوند، اما مکانیسم عمل آن‌ها به طور کامل شناخته نشده است (۲۵). در این پژوهش، میزان تولید آنتی‌بادی اختصاصی و افزایش ایمنی‌زایی پروتئین HA2 با همراه کردن Freund و پروتئین HSP70 به عنوان ادجوانت، بررسی گردید.

ادجوانت Freund یک امولسیون آب در روغن است که آنتی‌ژن را در شکل مایع به کمک یک ماده‌ی امولسیون‌ساز وارد روغن پارافین سبک وزن می‌کند و با ایجاد ذخیره‌ی کوتاه مدت آنتی‌ژن در محل تزریق، تولید مداوم آنتی‌بادی‌های قوی را تحریک می‌کند (۲۷-۲۶). کاربرد این ادجوانت، به دلیل اثرات جانبی زیاد آن، در واکسن‌های انسانی امکان پذیر نیست و در این مطالعه، از این ادجوانت به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

ادجوانت دیگر مورد استفاده در این پژوهش، پروتئین نوترکیب Leishmania major HSP70$_{221-604}$ بود که در بخش انفلوانزای انیستیتو پاستور ایران استخراج و تخلیص شد و برای پژوهش حاضر استفاده گردید. مطالعات نشان داده است که ناحیه‌ی کد کننده‌ی اسید آمینه‌های ۶۰۴-۲۲۱ پروتئین Leishmania major HSP70 در مقایسه با قطعات C و N ترمینال آن باعث القای بهتر پاسخ‌های ایمنی همورال می‌شود (۲۶). پروتئین‌های شوک حرارتی با ارایه کردن آنتی‌ژن از طریق گیرنده‌های CD91 به سلول‌های ارایه کننده‌ی آنتی‌ژن، در کنار عمل MHC-I (Major histocompatibility complex-I) باعث تحریک CD8$^+$ T-Cellها و پاسخ آنتی‌بادی می‌شود. همچنین، HSP می‌تواند از طریق CD40، TLR2 و TLR4 و نیز القای ترشح سایتوکاین، ایمنی ذاتی را تحریک نماید.

نتایج نشان داد میزان آنتی‌بادی اختصاصی تولید شده در موش‌های دریافت کننده‌ی Freund و یا پروتئین HSP70 به عنوان ادجوانت همراه با پروتئین HA2، نسبت به گروه دریافت کننده‌ی HA2، بیشتر بود.

اثر حفاظت‌بخشی پروتئین HA2 تولید شده در این پژوهش به تنهایی و یا در همراهی با ادجوانت‌های Freund و HSP70 در چالش با ویروس کشنده‌ی PR8 مورد ارزیابی قرار گرفت. این ویروس سویه‌ی H1N1 از ویروس انفلوانزا است و اولین بار در سال ۱۹۳۴ میلادی در منطقه‌ی پورتوریکو (Puerto Rico) آمریکا از بیمار مبتلا به انفلوانزا جداسازی شده است. تکثیر بالا در تخم‌مرغ و سلول MDCK (Madin-Darby canine kidney) از مزیت‌های این سویه نسبت به سایر سویه‌ها است. نظر به این که این ویروس‌ها در موش سازگار می‌شوند، بدون ایجاد عوارض بیماری‌زایی در انسان، باعث مرگ و میر در موش می‌شوند. از این رو، در تحقیقات آزمایشگاهی به خصوص در طراحی

واکسن، از سویه‌ی PR8 به عنوان سویه‌ی چالش استفاده می‌گردد.

نتایج نشان داد، گروه‌های موشی واکسینه شده با پروتئین HA2 به تنهایی و یا به همراه ادجوانت‌های Freund و یا HSP70، هنگام رویارویی با دوز کشنده‌ی ویروس H1N1، به ترتیب ۲۰، ۴۰ و ۸۰ درصد بقا داشتند. در حالی که تمام موش‌های گروه‌های شاهد اعم از PBS و یا HSP، در چالش با ویروس از بین رفتند. در ضمن، بررسی‌های وزنی موش‌های چالش شده، یک روند رو به بهبود را در گروه‌های واکسینه شده با HA2 و HA2-HSP نشان می‌دهد.

بنا بر این، می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین نوترکیب HA2 قابلیت ایجاد ایمنی‌زایی در موش BALA/c را دارد و این ایمنی‌زایی، در اثر همراهی با ادجوانت‌های Freund و HSP70 افزایش می‌یابد. همچنین، پروتئین HA2 می‌تواند حیوانات را در مقابل چالش با ویروس کشنده حفاظت نماید. البته، نتایج به دست آمده در این پژوهش، با مطالعات دیگر انجام شده در این راستا همخوانی دارد (۲۸، ۲۳-۲۲، ۱۶، ۱۴). گرچه به کارگیری این پروتئین در راستای تولید واکسن واحد، مستلزم انجام آزمایش‌های مکمل و گسترده‌تری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از پایان‌نامه‌ی سعیده صادقی نشاط دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بوده است و تمامی بودجه‌ی این پژوهش از محل طرح شماره‌ی ۶۱۱ انستیتو پاستور ایران تأمین گردیده است. لازم است از خانم حدیثه شکوهی و کلیه‌ی همکاران آزمایشگاه تحقیقات انفلوانزای انستیتو پاستور ایران که در به ثمر رسیدن این پژوهش ما را یاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Lambert LC, Fauci AS. Influenza vaccines for the future. N Engl J Med 2010; 363(21): 2036-44.
2. Hara K, Shiota M, Kido H, Ohtsu Y, Kashiwagi T, Iwahashi J, et al. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. Genes Cells 2001; 6(2): 87-97.
3. Okuda K, Ihata A, Watabe S, Okada E, Yamakawa T, Hamajima K, et al. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene. Vaccine 2001; 19(27): 3681-91.
4. Kim CS, Epand RF, Leikina E, Epand RM, Chernomordik LV. The final conformation of the complete ectodomain of the HA2 subunit of influenza hemagglutinin can by itself drive low pH-dependent fusion. J Biol Chem 2011; 286(15): 13226-34.
5. Kim JI, Lee I, Park S, Park MS. Surface glycoproteins determine the feature of the 2009 pandemic H1N1 virus. BMB Rep 2012; 45(11): 653-8.
6. Reichert T, Chowell G, Nishiura H, Christensen RA, McCullers JA. Does Glycosylation as a modifier of Original Antigenic Sin explain the case age distribution and unusual toxicity in pandemic novel H1N1 influenza? BMC Infect Dis 2010; 10: 5.
7. Peiris JS, Tu WW, Yen HL. A novel H1N1 virus causes the first pandemic of the 21st century. Eur J Immunol 2009; 39(11): 2946-54.
8. Fujiyoshi Y, Kume NP, Sakata K, Sato SB. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy. EMBO J 1994; 13(2): 318-26.
9. Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. Annu Rev Med 2000; 51: 407-21.
10. Hilleman MR. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. Vaccine 2002; 20(25-26): 3068-87.

11. Ebrahimi SM, Tebianian M. Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines. Virus Genes 2011; 42(1): 1-8.
12. Black RA, Rota PA, Gorodkova N, Klenk HD, Kendal AP. Antibody response to the M2 protein of influenza A virus expressed in insect cells. J Gen Virol 1993; 74 (Pt 1): 143-6.
13. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. Lancet 2003; 362(9397): 1733-45.
14. Stanekova Z, Vareckova E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. Virol J 2010; 7: 351.
15. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J Virol 2005; 79(5): 2814-22.
16. Stanekova Z, Mucha V, Sladkova T, Blaskovicova H, Kostolansky F, Vareckova E. Epitope specificity of anti-HA2 antibodies induced in humans during influenza infection. Influenza Other Respir Viruses 2012; 6(6): 389-95.
17. Vareckova E, Mucha V, Kostolansky F. HA2 glycopolypeptide of influenza A virus and antiviral immunity. Acta Virol 2013; 57(2): 247-56.
18. Horvath A, Toth GK, Gogolak P, Nagy Z, Kurucz I, Pecht I, et al. A hemagglutinin-based multipeptide construct elicits enhanced protective immune response in mice against influenza A virus infection. Immunol Lett 1998; 60(2-3): 127-36.
19. Okuno Y, Matsumoto K, Isegawa Y, Ueda S. Protection against the mouse-adapted A/FM/1/47 strain of influenza A virus in mice by a monoclonal antibody with cross-neutralizing activity among H1 and H2 strains. J Virol 1994; 68(1): 517-20.
20. Sui J, Hwang WC, Perez S, Wei G, Aird D, Chen LM, et al. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. Nat Struct Mol Biol 2009; 16(3): 265-73.
21. Kostolansky F, Mucha V, Slovakova R, Vareckova E. Natural influenza A virus infection of mice elicits strong antibody response to HA2 glycopolypeptide. Acta Virol 2002; 46(4): 229-36.
22. Steel J, Lowen AC, Wang TT, Yondola M, Gao Q, Haye K, et al. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. MBio 2010; 1(1): e00018-10.
23. To KK, Zhang AJ, Chan AS, Li C, Cai JP, Lau CC, et al. Recombinant influenza A virus hemagglutinin HA2 subunit protects mice against influenza A(H7N9) virus infection. Arch Virol 2015; 160(3): 777-86.
24. Kang SM, Song JM, Compans RW. Novel vaccines against influenza viruses. Virus Res 2011; 162(1-2): 31-8.
25. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. Front Immunol 2013; 4: 114.
26. Rafati S, Gholami E, Hassani N, Ghaemimanesh F, Taslimi Y, Taheri T, et al. Leishmania major heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. Vaccine 2007; 25(21): 4159-69.
27. Foumani M, Asadpour L, Azizi Saraji A, Sharifat Salmani A, Aghasadeghi MR. Adjuvants and their mechanisms of action. J Ardabil Univ Med Sci 2012; 12(3): 276-91. [In Persian].
28. Janulikova J, Stanekova Z, Mucha V, Kostolansky F, Vareckova E. Two distinct regions of HA2 glycopolypeptide of influenza virus hemagglutinin elicit cross-protective immunity against influenza. Acta Virol 2012; 56(3): 169-76.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 16.06.2015
Vol. 33, No. 349, 1st Week, November 2015
Accepted: 21.09.2015

Immunogenicity Enhancement of Influenza Virus Stalk Domain Using Leishmania Major Heat Shock Protein, One Step Closer to Universal Vaccine

Saeideh Sadeghi Neshat MSc[1], Behrokh Farahmand PhD[2], Zahra Kianmehr PhD[3], Somayeh Zamani MSc[3], Maryam Saleh MSc[3], Fatemeh Fotouhi PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: Influenza viruses cause acute respiratory infections in humans, which can often be accompanied by pandemics with varying rates of illness and even a fetal end. Current vaccines target the variable globular part of hemagglutinin (HA); so, their effectiveness is limited and they need perpetual updating. To prepare universal vaccine, scientists' effort is focused on conserved antigenic parts of influenza virus such as hemagglutinin stalk domain which is more conserved compare to its globular head. The aim of this study was evaluating the immunogenicity of influenza A (H1N1) HA2 peptide in mouse model.

Methods: To prepare HA2 protein, the expression vector encoding the gene of interest (PET-28a/HA2), was transformed into Escherichia coli BL21-DE3 competent cells. Recombinant HA2 protein was extracted and purified using Ni-TED columns under denaturing conditions, refolded and desalted via step-wise dialysis. The HA2 concentration was determined via using Bradford protein assay. Six-week-old BALB/c mice in different groups were immunized intradermally with HA2 alone or supplemented with Freund or $Lm.HSP70_{221-604}$ as adjuvants. Two groups were injected with HSP70 and phosphate buffered saline (PBS) as negative controls. Humeral immunity in vaccinated mice was measured using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); and finally, mice were challenged with one lethal dose (LD90) of PR8 virus.

Findings: The protein expression, extraction and purification stages were confirmed using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) electrophoresis. The highest antibody response was measured in mice vaccinated with HA2-Freund, as expected. Specific antibody response in group received HA2-HSP70 was of higher titer than HA2 alone. More over HA2-HSP70 group surprisingly showed higher level of protection against lethal H1N1 (PR8) challenge compared to other groups.

Conclusion: It has been proved that HSP70 can induce specific response and innate immunity via stimulating CD8+ T-Cells, CD40, TLR2, TLR4 and cytokine secretion. Our results showed that HA2 alone or supplemented with HSP70 protected mice against lethal influenza challenge and could be considered as a universal vaccine.

Keywords: Influenza virus, Hemagglutinin, HA2 peptide, Freund adjuvant, Leishmania major HSP70

Citation: Sadeghi Neshat S, Farahmand B, Kianmehr Z, Zamani S, Saleh M, Fotouhi F. **Immunogenicity Enhancement of Influenza Virus Stalk Domain Using Leishmania Major Heat Shock Protein, One Step Closer to Universal Vaccine.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(349): 1475-86

1- Department of Biology, School of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3- Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Corresponding Author: Fatemeh Fotouhi PhD, Email: fotouhi@pasteur.ac.ir