

ساخت و ارزیابی یک سازه DNA بیان کننده پروتئین Core ویروس هپاتیت C متصل به آنتی ژن S ویروس هپاتیت B به عنوان یک کاندید واکسن

دکتر مریم یزدانیان^۱، دکتر آرش معمارنژادیان^۲، دکتر حسین خان احمد شهرضا^۳،
دکتر حوریه سلیمانجاهی^۴، فاطمه متولی^۵، دکتر فرزین روحوند^۶

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: با وجود این که ویروس هپاتیت C (HCV یا Hepatitis C virus) یکی از عوامل مهم ایجادکننده بیماری های مزمن کبدی می باشد، هنوز واکسن مناسبی برای آن تهیه نشده است. هدف از این مطالعه، ساخت یک سازه DNA بیان کننده توالی Core (aa: 1-122) ویروس هپاتیت C متصل به آنتی ژن S ویروس هپاتیت B (HBsAg یا Hepatitis B surface antigen) و تأیید بیان آن در سلول های یوکاریوتی بود.

روش ها: در ابتدا توالی Core این ویروس با استفاده از پرایمرهای دارای جایگاه برش آنزیمی BamHI/EcoRV از روی وکتور pIVEX2.4a حاوی این ژن تکثیر شد و در وکتور pCDNA3.1 حاوی HBsAg خطی شده با آنزیم های مذکور کلون گردید. ارزیابی و تأیید ساختار نوترکیب به وسیله برش آنزیم های محدودکننده و در نهایت تعیین توالی صورت گرفت. پلاسمید ساخته شده نهایی (pCHCORE) در رده سلولی HEK293T ترانسفکت شد و ارزیابی نهایی بیان توسط تست Western blot بر روی سلول های HEK293T ترانسفکت شده به وسیله آنتی بادی پلی کلونال آنتی HBsAg موشی انجام شد.

یافته ها: توالی ژن (۱-۱۲۲) Core ویروس هپاتیت C با موفقیت تکثیر گردید و نتایج ارزیابی، برش آنزیمی و تعیین توالی تأییدکننده صحت ساختار نوترکیب pCHCORE و کلونینگ انجام شده بود. نتیجه Western blot بیانگر انتقال موفق پلاسمید و بیان ژن هدف در سلول های یوکاریوتی بود.

نتیجه گیری: با توجه به ساخت و بیان موفقیت آمیز ساختار HBS-core در سلول های یوکاریوتی و به دلیل احتمال افزایش پاسخ های ایمنی توسط آنتی ژن HBS به صورت فیوژن با پروتئین Core (بر اساس تحقیقات قبلی)، سازه DNA حاوی ژن Core ویروس هپاتیت C متصل شده به این آنتی ژن، ممکن است باعث القای بیشتر پاسخ های ایمنی علیه پروتئین Core شود و بتواند به عنوان واکسن مؤثر به منظور کنترل عفونت HCV به کار رود.

واژگان کلیدی: ویروس هپاتیت C، پروتئین Core، واکسن DNA، آنتی ژن HBs، پاسخ های سیتوتوکسیک، سلول های لنفوسیتی T

ارجاع: یزدانیان مریم، معمارنژادیان آرش، خان احمد شهرضا حسین، سلیمانجاهی حوریه، متولی فاطمه، روحوند فرزین. ساخت و ارزیابی یک سازه DNA بیان کننده پروتئین Core ویروس هپاتیت C متصل به آنتی ژن S ویروس هپاتیت B به عنوان یک کاندید

واکسن. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۲۶): ۱۶۰-۱۵۰

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی دارویی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲- استادیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری های ارثی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان و بخش تحقیقات BCG مجتمع تولیدی و تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵- کارشناس ارشد، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور، تهران، ایران

۶- دانشیار، بخش ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

مقدمه

عفونت ناشی از ویروس هپاتیت C (HCV) یا (Hepatitis C virus) یکی از بزرگ‌ترین معضلات بهداشت جهانی می‌باشد. در حال حاضر بیش از ۲۰۰ میلیون نفر در جهان به این بیماری مبتلا می‌باشند و این بیماری از نظر شیوع و مرگ و میر بعد از عفونت HIV در رتبه‌ی دوم قرار دارد (۱-۲). عفونت HCV در ۷۰-۸۰ درصد بیماران به صورت مقاوم باقی می‌ماند و در نهایت در ۲۰ درصد موارد باعث بروز سیروز کبدی و کارسینومای هپاتوسلولار (Hepatocellular carcinoma یا HCC) می‌شود. عفونت HCV مهم‌ترین علت پیوند کبد در جهان محسوب می‌شود (۳).

با وجود این آمار تکان دهنده و حجم وسیعی از مطالعات در ۲۰ سال گذشته هنوز واکسن برای پیشگیری و درمان این بیماری به تأیید نرسیده است (۴). مؤثرترین پروتکل درمانی موجود، مجموعه‌ی دارویی ریباویرین و اینترفرون α پگیله، تنها در ۵۰ درصد موارد مؤثر واقع می‌شود. مشکلات فوق ضرورت تحقیقات گسترده برای یافتن راهکارهای جدید برای درمان و پیشگیری این بیماری را نشان می‌دهد (۵).

از آن جا که ژنوم HCV دارای سرعت جهش‌زایی بالایی است، حداقل ۶ ژنوتیپ اصلی و بیش از ۷۰ زیرگونه از این ویروس شناخته شده است (۶، ۱). تنوع ژنتیکی این ویروس، قدرت جهش‌زایی بالای آن و توانایی بارز آن در پنهان شدن از دید سیستم ایمنی، بزرگ‌ترین مشکل در راه تهیه‌ی واکسن برای آن می‌باشد (۵).

HCV دارای RNA تک رشته‌ای مثبت با طول

۹۵۰۰ نوکلئوتید می‌باشد که سه پروتئین ساختاری (E2، E1، Core) و شش پروتئین غیر ساختاری (NS1، NS2، NS3، NS4A، NS4B، NS5) را کد می‌کند (۷).

شواهد متعددی نشان می‌دهد با وجود ترشح آنتی‌بادی طبیعی علیه HCV در مراحل اولیه‌ی بیماری، این امر به تنهایی سبب کنترل بیماری نمی‌شود و بهبود خودبه‌خودی از عفونت با پاسخ سریع و قوی و چند جانبه‌ی سلول‌های CD8 + CTLs (Cytotoxic T lymphocytes) نسبت به چندین اپی‌توپ غالب مربوط به بعضی پروتئین‌های محافظت‌شده‌ی ویروسی و ترشح سایتوکاین‌های نوع Th1 به دنبال فعالیت قوی T-CD4+ helper cells همراه می‌باشد (۸-۹، ۵).

در بین پروتئین‌های ویروس هپاتیت C، پروتئین Core (HCVcp) یکی از محافظت‌شده‌ترین پروتئین‌های ویروس در ژنوتیپ‌های مختلف است و اپی‌توپ‌های منحصر به CTL و B cell متعددی در آن شناسایی شده است (۱۰). همچنین به نظر می‌رسد پاسخ ایمنی سلولی علیه HCVcp در عفونت‌های مزمن کاهش می‌یابد (۱۱). از آن جا که تحقیقات بیانگر آن است که فرم کامل این پروتئین سبب تضعیف پاسخ‌های ایمنی می‌شود، اغلب استفاده از شکل Truncated این پروتئین در فرمولاسیون واکسن به کار گرفته شده است (۱۲).

تاکنون استراتژی‌های متعددی جهت تهیه‌ی واکسن علیه عفونت HCV به کار گرفته شده است. استفاده از Recombinant viral vectorها، استفاده از پپتیدها و پروتئین‌های ساب‌یونیت Recombinant، تهیه‌ی DNA Vaccine از ژن بیان‌کننده‌ی پروتئین‌های

ساختاری و غیر ساختاری به تنهایی و یا همراه با ادجونت مناسب و یا ساخت واکسن‌های چند اپی توپی از جمله‌ی این استراتژی‌ها هستند (۴). یکی از استراتژی‌های مورد توجه برای ایجاد ایمنی مؤثر علیه عوامل عفونی استفاده از DNA vaccine ها می‌باشد. کاربرد این روش مزایای متعددی دارد. ایمنی آن به علت عدم استفاده از ارگانسیم کامل، افزایش بیان اختصاصی آنتی‌ژن کدکننده در میزبان، امکان استفاده از واکسن‌های Multi-valent در یک دوز، امکان نگهداری آن به شکل لیوفیلیزه و در نتیجه تسهیل در انتقال و توزیع آن و مقرون به صرفه بودن آن از مزایای این نوع واکسن‌ها هستند. با این حال مهم‌ترین مزیت این واکسن‌ها تحریک اختصاصی ایمنی سلولی می‌باشد (۱۳-۱۴).

با وجود استفاده از واکسن‌های DNA حاوی آنتی‌ژن‌های مختلف HCV در تحقیقات گذشته، پاسخ‌های ضعیف آن‌ها قادر به تحریک مؤثر پاسخ‌های ایمنی نبوده‌اند. استراتژی‌های متعددی در راستای افزایش کارایی واکسن‌های DNA مورد بررسی قرار گرفته است، مانند کاربرد واکسن DNA به همراه ادجونت‌های مختلف چون نوکلئوتیدهای CpG، لیپوزوم‌ها و ادجونت‌های با ساختار پلیمری، استفاده از رژیم‌های مختلف تزریقی PRIME/boost مانند DNA/protein vector، DNA/live (استفاده از وکتورهای زنده‌ی بیان‌کننده‌ی پروتئین نوترکیب مانند ویروس واکسینیا، گونه‌های سالمونلا و...)، DNA/BCG و اتصال قطعات آنتی‌ژنی به توالی‌های برخی پروتئین‌های ساختاری سایر ویروس‌ها که با استفاده از مکانیسم‌های مختلف قادر به تشدید پاسخ‌های ایمنی می‌باشند (۴). آنتی‌ژن سطحی (HBsAg) و آنتی‌ژن

Core (HBcAg) ویروس هپاتیت B، از جمله پروتئین‌های ایمونوژنیک قوی می‌باشند و تحقیقات نشان می‌دهد ایمنی‌زایی واکسن DNA با پایه‌ی HBsAg تأثیر قابل توجهی در افزایش تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی دارد (۱۷-۱۵). این امر می‌تواند به علت افزایش بیان، پردازش و ارائه‌ی اپی‌توپ‌های مشتق‌شده از این پروتئین و عرضه‌ی اپی‌توپ‌های T helper درون پلی‌پپتید HBsAg باشد (۱۹-۱۷).

در یک مطالعه کاست ژنی بیان‌کننده‌ی فرم کوتاه‌شده‌ی HCVcp متصل به انتهای کربوکسیلیک قسمت‌های متفاوت از پروتئین سطحی ویروس هپاتیت B شامل آنتی‌ژن‌های preS1، preS2 و S ساخته شد و پاسخ‌های ایمنی علیه آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که در صورتی که HCVcp به preS2+S و S (که توانایی ترشح کردن را دارا هستند) متصل باشد، قدرت تحریک بیشتر پاسخ‌های ایمنی را دارد (۲۱-۲۰). به همین دلیل در تحقیق حاضر برای افزایش کارایی کاندید واکسن DNA، یک سازه‌ی ژنی حاوی بخش هیدروفیلیک از پروتئین Core (توالی ۱-۱۲۲) که توانایی آن در تحریک پاسخ‌های ایمنی نشان داده شده است (۲۲)، به صورت متصل به HBsAg ساخته شد و بیان سازه در سلول‌های HEK293T (Human embryonic kidney 293 T cells) بررسی گردید.

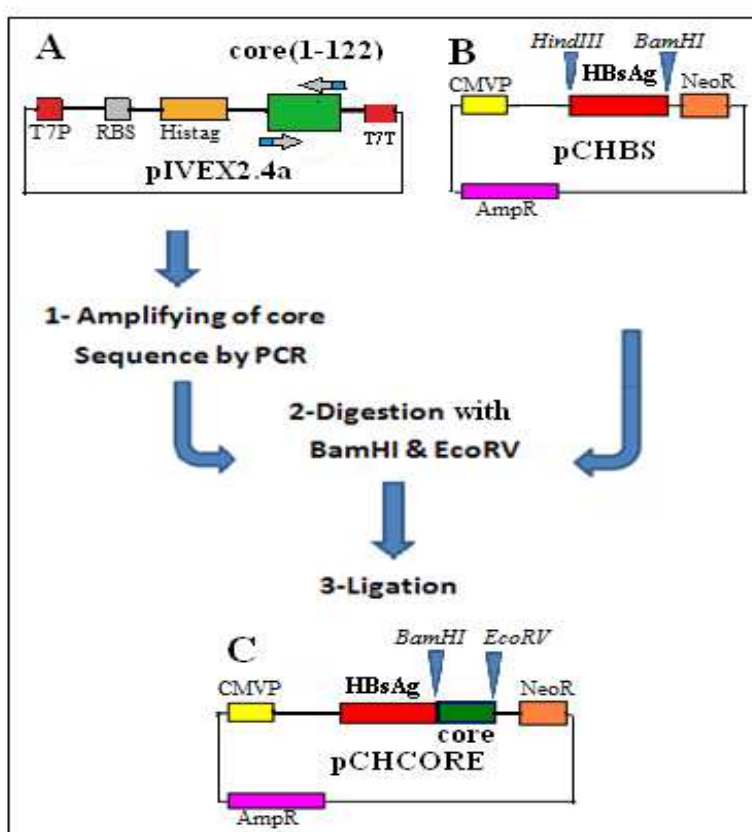
روش‌ها

ساخت سازه‌ی بیانی یوکاریوتی pCHCORE

به منظور ساخت وکتور فوق، قطعه‌ی Core با استفاده از واکنش PCR (Polymerase chain reaction)

سرانجام مرحله پایانی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. قطعه‌ی ژنی تکثیر یافته با استفاده از کیست استخراج از ژل (Qiagen, Germany) pCHBS خالص‌سازی گردید. هم‌زمان وکتور بیانی pCHBS شامل قطعه‌ی HBsAg کلون‌شده در وکتور pCDNA3.1 (۲۳، ۱۹-۱۸)، با استفاده از آنزیم‌های BamHI و EcoRV خطی شد. در نهایت قطعه‌ی ژنی مذکور طی فرایند الحاق (Ligation) و با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase به وکتور مورد نظر وارد گردید (شکل ۱).

تکثیر گردید. برای انجام این تکثیر، ابتدا پرایمر مناسب برای تکثیر قطعه‌ی ژنی با توجه به توالی Core که پیش از این در پلاسמיד Pivex2.4a کلون شده بود (۲۲)، طراحی شد. این طراحی به گونه‌ای بود که سایت‌های برشی BamHI و EcoRV (Fermentas, Germany) در ابتدا و انتهای ژن قرار گرفت (جدول ۱). سپس واکنش PCR در شرایط ۴ دقیقه ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و پس از آن ۳۰ چرخه به ترتیب شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و



شکل ۱. طرح شماتیک کلونینگ قطعه‌ی Core در پلاسמיד pCHBS

(A) وکتور pIVEX2.4a حاوی توالی Core (۱-۱۲۲) که به عنوان الگو جهت تکثیر قطعه‌ی Core (۱-۱۲۲) توسط پرایمرهای RcoreEcoRV و FcoreBamHI استفاده گردید. (B) وکتور بیانی pCHBS که شامل قطعه‌ی HBsAg کلون‌شده در وکتور pCDNA3.1 می‌باشد. (C) پلاسמיד pCHCORE که به دنبال واکنش اتصال بین توالی Core و وکتور هضم‌شده به وسیله‌ی آنزیم‌های BamHI و EcoRV حاصل شده است.

جدول ۱. نام، عملکرد، طول و توالی آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق

آغازگر (پرایمر)	عملکرد	طول (حفت باز)	توالی
FcoreBamHI	تکثیر قطعه‌ی Core	۲۶	TATGGATCCGGCACGATTCCCAAACC
RcoreEcoRV	تکثیر قطعه‌ی Core	۲۹	AAGGATATCTCATTACTTACCCAAATTGC
T7-promoterF	تعیین توالی قطعه‌ی Core	۲۰	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH-R	تعیین توالی قطعه‌ی Core	۱۸	TAGAAGGCACAGTCGAGG

حجم ۴ میلی لیتر به حفرات پلیت ۶ خانه‌ای منتقل شدند. بعد از کشت شبانه، ۳ ساعت پیش از ترانسفکشن با محیط تازه‌ی بدون آنتی‌بیوتیک تعویض محیط شد.

مقدار ۴ میکرولیتر TurboFect transfection reagent به ۴۰۰ میکرولیتر محیط ناقص حاوی ۴ میکروگرم از پلاسמיד نوترکیب pCHCORE اضافه گردید و ۲۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه نگهداری شد. سپس به صورت قطره قطره در نقاط مختلف پلیت ۶ خانه‌ای اضافه گردید.

به منظور بررسی صحت ترانسفکشن، سلول‌های یکی از چاهک‌ها به وسیله‌ی مخلوط پلاسמיד مورد تست و ۱۰ درصد pGFP-N1 (Clontech, USA) به عنوان شاهد مثبت، ترانسفکت شد. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور کشت سلول قرار داده و سپس با محیط کامل، تعویض محیط شد.

پس از ۴۸ ساعت ابتدا بررسی بیان پروتئین GFP (Green fluorescent protein) توسط میکروسکوپ فلوروسانس انجام گردید و سپس سلول‌ها جمع‌آوری شدند و پس از لیز با استفاده از بافر لیز کننده (۰/۱ Tris-Cl) مول (pH = ۷/۸) و Triton X-۱۰۰ پنج درصد (V/V) و سانتیفرژ، مایع رویی جهت انجام تست Western blot در فریزر -۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

به دنبال ترانسفورم کردن محصول واکنش اتصال به درون باکتری‌های مستعد *E. coli* (DH5- α)، کلونی‌های مثبت بر اساس مقاومت به آمپی‌سیلین به وسیله‌ی Colony PCR انتخاب شدند. در ادامه، آنالیز آنزیمی پلاسמיד نوترکیب به وسیله‌ی آنزیم‌های *Sma*I، *Bam*HI/*Eco*RV و *Dra*I انجام گرفت و به ترتیب قطعاتی با طول (۶۴۳۵ و ۳۷۰ حفت باز)، (۵۰۶۰ و ۱۴۱۰ حفت باز) و (۱۲۵۰، ۱۱۴۵ و ۷۱۰ حفت باز) حاصل شد.

نمونه‌ای که در آنالیز آنزیمی الگوی صحیحی را نشان داد، برای تأیید نهایی و تعیین توالی به وسیله‌ی پرایمرهای عمومی *BGH-R* و *T7pomoter-F* در جدول ۱ به شرکت Pishgam Biotech ارسال گردید.

تأیید بیان پروتئین

جهت بررسی بیان پروتئین هدف توسط سازه‌ی نوترکیب pCHCORE از رده‌ی سلولی HEK293T (رده‌ی سلولی کلیه‌ی جنین انسان) که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود، استفاده شد.

این سلول در محیط کامل DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco, Invitrogen, USA) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Biosera, UK) کشت داده شد. به منظور تأیید بیان این پروتئین تعداد $10^5 \times 6$ سلول HEK293T در

پذیرفت. نتایج نشانگر هم‌پوشانی کامل ژن کلون‌شده با ژن مرجع و در حقیقت عدم وجود موتاسیون در آنتی‌ژن مورد نظر و کاست بیان پروتئین بود (شکل ۲ قسمت B).

بررسی ترانسفکشن سلولی pCHCORE و بیان پروتئین (۱-۱۲۲) Core

پیش از تأیید بیان پروتئین در رده‌ی سلولی HEK293T، این سلول‌ها به وسیله‌ی میکروسکوپ فلوروسانس بررسی شدند. رؤیت پروتئین GFP بیان‌شده در این سلول‌ها، مؤید ترانسفکشن احتمالی پلاسמיד pCHCORE به سلول‌های HEK293T می‌باشد، (شکل ۳ قسمت A). هویت پروتئین بیان شده به وسیله‌ی آنالیز وسترن بلات صورت گرفت و وجود باند پروتئینی حدود ۵۰ کیلودالتونی مؤید بیان این فیوژن پروتئین می‌باشد. قابل توجه است که ظهور دو باند متمایز پس از رنگ‌آمیزی DAB نشان‌دهنده‌ی فرم‌های گلیکوزیله و غیر گلیکوزیله‌ی HBsAg می‌باشند (شکل ۳ قسمت B).

بحث

استفاده از واکسن DNA بیان‌کننده‌ی ژن‌های مختلف ویروس هپاتیت C به عنوان واکسن‌های پیشگیری و درمان‌کننده مورد توجه بوده (۲۴) و تعدادی از آن‌ها حتی به مراحل کارآزمایی بالینی نیز رسیده است (۴).

ژن ساختاری Core ویروس هپاتیت C یکی از حفاظت شده‌ترین ژن‌های این ویروس در بین ژنوتایپ‌های مختلف ویروس می‌باشد که همواره به عنوان آنتی‌ژن مناسب در واکسن‌های مختلف علیه ویروس HCV به کار رفته است (۲۵).

ارزیابی بیان پروتئین هدف با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌ها در ژل پلی‌آکرلامید (SDS-PAGE) و Western blot

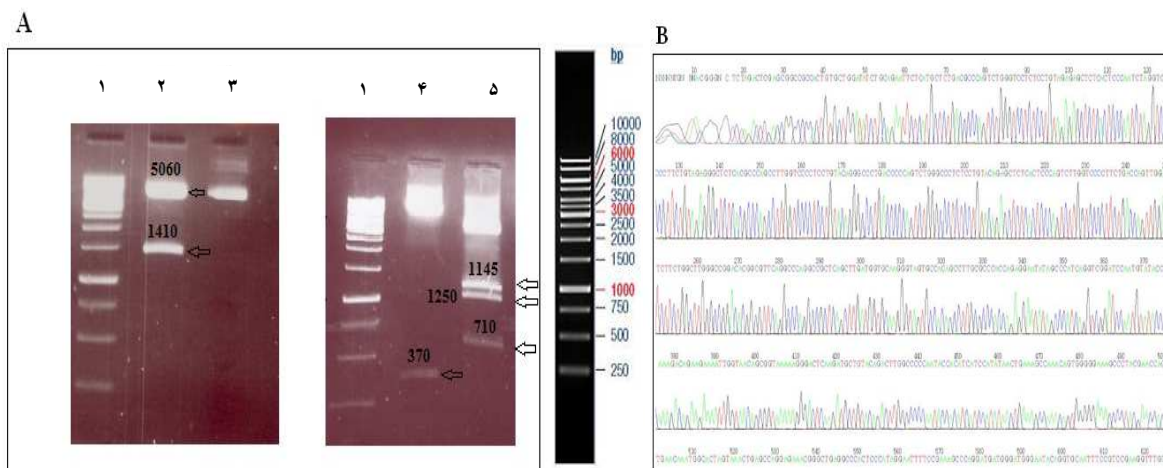
جهت تأیید هویت پروتئین بیان شده به وسیله‌ی آنالیز وسترن بلاتینگ، نمونه‌ی لیز سلولی پس از الکتروفورز روی ژل ۱۵ درصد SDS-PAGE تفکیک شد و به کاغذ PVDF (پلی‌وینیلیدین دیفلوراید) (Roche, Germany) منتقل شد. غشا با BSA (Bovine serum albumin) ۳ درصد بلوکه گردید و پس از شستشو به ترتیب با آنتی‌بادی پلی‌کلونال آنتی HBsAg (رقت ۱ در ۱۰۰۰) و آنتی‌بادی ثانویه‌ی کونژوگه با پراکسیداز Horseradish peroxidase (HRP)- conjugated goat anti-mouse antibody (Qiagen, USA) با رقت ۱ در ۱۰۰۰۰ انکوبه شد و در نهایت جهت مشاهده‌ی باند پروتئین از سوبسترای DAB (Dioaminobenzidine) استفاده گردید.

یافته‌ها

کلون‌سازی ژن Core در سازه‌ی بیانی pCHBS

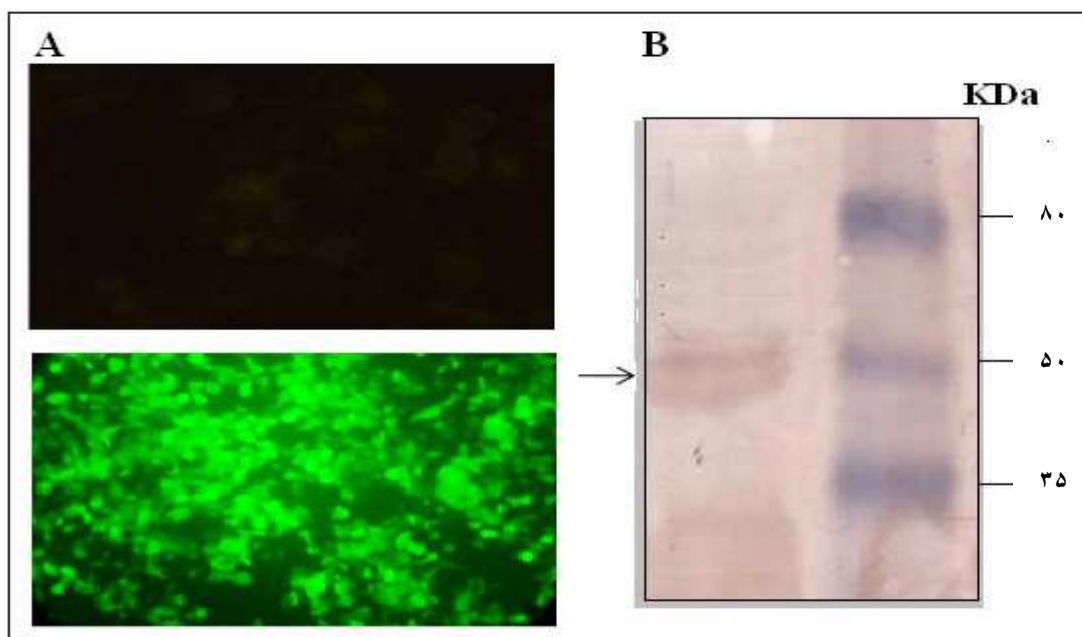
همان‌طور که در شکل ۱ نمایش داده شده است، پس از تکثیر توسط PCR و انجام مراحل برش، توالی استخراج شده‌ی Core (۱-۱۲۲) به درون سازه‌ی بیانی pCHBS کلون شد.

نتایج بررسی به وسیله‌ی برش با آنزیم‌های محدودالایثر BamHI/EcoRV، SmaI و DraI حضور ژن Core (۱-۱۲۲) را تأیید کرد که در شکل ۲ قسمت A ملاحظه می‌شود. همچنین نتایج حاصل از تعیین توالی ژن Core کلون‌شده در سازه‌ی pCHBS به وسیله‌ی نرم‌افزار Chromas بازیابی شد و سپس با ژن Core مرجع با استفاده از نرم‌افزار Bio Edit هم‌ردیفی چندگانه (Multiple alignment) انجام



شکل ۲. تأیید صحت کلونینگ قطعه‌ی Core در وکتور pCHBS با استفاده از:

(A) آنالیز آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pCHCORE با آنزیم‌های محدودالایر و بررسی قطعات حاصل بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد. در این شکل ستون ۱ مارکر، ستون ۲ هضم آنزیمی با SmaI (قطعات ۵۰۶۰ و ۱۴۱۰ جفت باز)، ستون ۳ پلاسمید هضم نشده، ستون ۴ هضم آنزیمی با BamHI/EcoRV (قطعات ۶۴۳۵ و ۳۷۰ جفت باز)، ستون ۵ هضم آنزیمی با DraI (قطعات ۱۱۴۵، ۱۲۵۰، ۷۱۰، ۳۳۶۵ جفت باز) (B) تعیین توالی ژن Core کلون شده در سازه‌ی pCHCORE و تأیید هم خوانی آن با ژن Core و عدم وجود موتاسیون



شکل ۳. بررسی بیان پروتئین نو ترکیب HBsAg + Core درون سلول‌های HEK293T

(A) ردیابی بیان پروتئین GFP ابراز شده توسط پلاسمید pGFP-N1 که به صورت ترانسفکشن همراه با پلاسمید pCHCORE انجام پذیرفت، با مشاهده به وسیله‌ی میکروسکوپ فلورسانس
(B) Western blot: بررسی امکان بیان پروتئین فیوژن هدف توسط آنتی بادی اولیه علیه HBsAg صورت گرفت. ظهور باند با وزن تقریبی ۵۰ کیلو دالتون می‌تواند نشان دهنده‌ی بیان پروتئین Core باشد. ایجاد باند دو تایی به علت وجود فرم گلیکوزیله و غیر گلیکوزیله پروتئین HBsAg بود.

Truncated HBsAg + preS2]، با فرم پروتئین Core و ویروس هپاتیت C ساخته شد و پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی علیه آن بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که بهترین پاسخ‌های ایمنی ایجاد شده مربوط به سازه‌ی حاوی فیوژن پروتئین HBsAg و یا preS2 + HBsAg متصل به پروتئین Core می‌باشد (۳۰، ۲۰). در حقیقت وجود این دو پروتئین سبب آزادسازی پروتئین هدف از سلول می‌شود. این مطلب مؤید آن است که ممکن است که یکی از عوامل افزایش پاسخ‌های ایمنی به دنبال اتصال HBsAg به پروتئین، ترشح پروتئین نو ترکیب از سلول‌های بیان‌کننده‌ی آن باشد. این امر ممکن است سبب افزایش جذب و ارائه‌ی بیشتر آن به وسیله‌ی سلول‌های ارائه‌کننده‌ی آنتی‌ژن (APCs یا Antigen presenting cells) شود (۳۱، ۱۵).

در این مطالعه ژن ساختاری (۱-۱۲۲) Core مربوط به ناحیه‌ی هیدروفوبیک که در مطالعات پیشین به عنوان کاندید مناسب جهت تهیه‌ی واکسن ساب یونیت پروتئینی نتایج امیدبخشی از خود نشان داد (۱۲)، در وکتور بیانی حاوی توالی HBsAg کلون شد. مشاهده‌ی بیان پروتئین GFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس بیانگر انتقال احتمالی سازه‌ی بیانی pCHCORE به درون سلول‌های HEK293T می‌باشد. با توجه به وزن پروتئین HBsAg که حدود ۲۹ کیلودالتون گزارش شده است (۲۳) و وزن پروتئین Core که حدود ۲۱ کیلودالتون می‌باشد (۱۲)، وزن قابل پیش‌بینی برای پروتئین HBsAg-core حدود ۵۰ کیلودالتون است.

ارزیابی بیان ژن با روش Western blot نشان دهنده‌ی باند مورد نظر با وزن پیش‌بینی شده بود.

بدین جهت استفاده از واکسن DNA بیان‌کننده‌ی پروتئین Core نیز در تحقیقات متعددی مورد توجه بوده است (۲۸-۲۶). اما لازم به ذکر است که Zhu و همکاران طی تحقیقی نشان دادند که فرم کامل پروتئین Core و ویروس هپاتیت C می‌تواند باعث سرکوب پاسخ‌های ایمنی شود (۲۹) و بدین جهت استفاده از بخش آمینی پروتئین Core که باعث تحریک بیشتر پاسخ‌های ایمنی می‌شود، در تحقیقات متعددی مورد توجه واقع شده است (۱۲).

از آن جا که تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی نقش مهمی در کنترل عفونت HCV دارد، واکسن‌های DNA می‌تواند جایگاه ویژه‌ای در طراحی واکسن علیه HCV داشته باشد، ولی این واکسن‌ها بر خلاف ناقلین ویروسی به علت توانایی تکثیر و بیان محدود پروتئین موفقیت قابل توجهی نداشته‌اند (۴). کارایی ضعیف این نوع واکسن‌ها به دلایل مختلف، لزوم افزایش اثربخشی آن‌ها را توسط روش‌های متفاوت دو چندان کرده است.

مطالعات متعددی بیانگر آن هستند که از آن جا که HBsAg ایمونوژن قوی می‌باشد، می‌تواند باعث افزایش پاسخ‌های CTL توسط آنتی‌ژن‌های بیگانه شود. اتصال توالی HBsAg به پروتئین (۱-۱۵۴) Core و ویروس هپاتیت C و یا سازه‌ی پلی‌توپی بیان‌کننده‌ی اپی‌توپ‌های مختلف ویروسی، در مطالعات قبلی باعث افزایش قابل توجه پاسخ‌های ایمنی شده است (۲۱).

در یک مطالعه چندین واکسن DNA بیان‌کننده‌ی کایمریک پروتئین‌های متفاوت شامل قطعات با طول‌های مختلف از پروتئین Envelope ویروس هپاتیت B [preS1 + preS2 + HBsAg] envelope،

آینده‌ی واکسن‌درمانی یا پیشگیری کننده در جهت کنترل عفونت HCV با هدف ارتقای ایمنی‌زایی واکسن استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه جهت دریافت درجه‌ی دکترای بیوتکنولوژی دارویی می باشد. بودجه این تحقیق توسط انستیتو پاستور ایران تأمین شد.

وجود باند دو تایی می‌تواند به علت تاخوردگی‌ها (Folding) و تغییرات پس از ترجمه (Posttranslational modification) فیوژن پروتئین HBsAg-core (۱-۱۲۲) باشد که در گزارش‌های مشابه دیگر نیز مشاهده می‌شود (۲۳).

در نهایت با توجه به بیان مناسب سازه‌ی ژنی طراحی شده در سلول‌های یوکاریوتی، این سازه می‌تواند به دلیل اتصال به HBsAg برای مطالعات

References

1. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(2): 107-15.
2. Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int* 2011; 31(Suppl 2): 30-60.
3. Vezali E, Aghemo A, Colombo M. A review of the treatment of chronic hepatitis C virus infection in cirrhosis. *Clin Ther* 2010; 32(13): 2117-38.
4. Roohvand F, Kossari N. Advances in hepatitis C virus vaccines, part two: advances in hepatitis C virus vaccine formulations and modalities. *Expert Opin Ther Pat* 2012; 22(4): 391-415.
5. Roohvand F, Kossari N. Advances in hepatitis C virus vaccines, Part one: Advances in basic knowledge for hepatitis C virus vaccine design. *Expert Opin Ther Pat* 2011; 21(12): 1811-30.
6. Irshad M, Ansari MA, Singh A, Nag P, Raghvendra L, Singh S, et al. HCV-genotypes: a review on their origin, global status, assay system, pathogenicity and response to treatment. *Hepatogastroenterology* 2010; 57(104): 1529-38.
7. Joyce MA, Tyrrell DL. The cell biology of hepatitis C virus. *Microbes Infect* 2010; 12(4): 263-71.
8. Ip PP, Nijman HW, Wilschut J, Daemen T. Therapeutic vaccination against chronic hepatitis C virus infection. *Antiviral Res* 2012; 96(1): 36-50.
9. Grebely J, Matthews GV, Dore GJ. Treatment of acute HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8(5): 265-74.
10. Khaliq S, Jahan S, Pervaiz A. Sequence variability of HCV Core region: important predictors of HCV induced pathogenesis and viral production. *Infect Genet Evol* 2011; 11(3): 543-56.
11. Jahan S, Ashfaq UA, Khaliq S, Samreen B, Afzal N. Dual behavior of HCV Core gene in regulation of apoptosis is important in progression of HCC. *Infect Genet Evol* 2012; 12(2): 236-9.
12. Roohvand F, Aghasadeghi MR, Sadat SM, Budkowska A, Khabiri AR. HCV core protein immunization with Montanide/CpG elicits strong Th1/Th2 and long-lived CTL responses. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354(3): 641-9.
13. Ullah S, Shah MAA, Riaz N. Recent advances in development of DNA vaccines against hepatitis C virus. *Indian Journal of Virology* 2012; 23(3): 253-60.
14. Feinstone SM, Hu DJ, Major ME. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against hepatitis C virus. *Clin Infect Dis* 2012; 55(Suppl 1): S25-S32.
15. Chen D, Edgton K, Gould A, Guo H, Mather M, Haigh O, et al. HBsAg-vectored vaccines simultaneously deliver CTL responses to protective epitopes from multiple viral pathogens. *Virology* 2010; 398(1): 68-78.
16. Olkhanud PB, Mughal M, Ayukawa K, Malchinkhuu E, Bodogai M, Feldman N, et al. DNA immunization with HBsAg-based particles expressing a B cell epitope of amyloid beta-peptide attenuates disease progression and prolongs survival in a mouse model of Alzheimer's disease. *Vaccine* 2012; 30(9): 1650-8.
17. Wang Y, Li DA, Hey Y, Wang F, Guo YJ, Yang F, et al. Proteomic analysis of augmented immune responses in mouse by prime-and-boost

- immunization strategy with DNA vaccine coding HBsAg and rHBsAg protein. *Vaccine* 2007; 25(48): 8146-53.
18. Memarnejadian A, Roohvand F. Fusion of HBsAg and prime/boosting augment Th1 and CTL responses to HCV polytope DNA vaccine. *Cell Immunol* 2010; 261(2): 93-8.
 19. Memarnejadian A, Roohvand F, Arashkia A, Rafati S, Shokrgozar MA. Polytope DNA vaccine development against hepatitis C virus: a streamlined approach from in silico design to in vitro and primary in vivo analyses in BALB/c mice. *Protein Pept Lett* 2009; 16(7): 842-50.
 20. Geissler M, Tokushige K, Wakita T, Zurawski VR, Jr., Wands JR. Differential cellular and humoral immune responses to HCV core and HBV envelope proteins after genetic immunizations using chimeric constructs. *Vaccine* 1998; 16(8): 857-67.
 21. Liao G, Wang Y, Chang J, Bian T, Tan W, Sun M, et al. Hepatitis B virus precore protein augments genetic immunizations of the truncated hepatitis C virus core in BALB/c mice. *Hepatology* 2008; 47(1): 25-34.
 22. Maillard P, Lavergne JP, Siberil S, Faure G, Roohvand F, Petres S, et al. Fcγ receptor-like activity of hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 2004; 279(4): 2430-7.
 23. Arashkia A, Roohvand F, Memarnejadian A, Aghasadeghi MR, Rafati S. Construction of HCV-polytope vaccine candidates harbouring immune-enhancer sequences and primary evaluation of their immunogenicity in BALB/c mice. *Virus Genes* 2010; 40(1): 44-52.
 24. Holmstrom F, Pasetto A, Nahr V, Brass A, Kriegs M, Hildt E, et al. A synthetic codon-optimized hepatitis C virus nonstructural 5A DNA vaccine primes polyfunctional CD8+ T cell responses in wild-type and NS5A-transgenic mice. *J Immunol* 2013; 190(3): 1113-24.
 25. Torresi J, Johnson D, Wedemeyer H. Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *J Hepatol* 2011; 54(6): 1273-85.
 26. Hartoonian C, Ebtekar M, Soleimanjahi H, Karami A, Mahdavi M, Rastgoo N, et al. Effect of immunological adjuvants: GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) and IL-23 (interleukin-23) on immune responses generated against hepatitis C virus core DNA vaccine. *Cytokine* 2009; 46(1): 43-50.
 27. Acosta-Rivero N, Duenas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Morales-Grillo J. HCV core protein-expressing DNA vaccine induces a strong class I-binding peptide DTH response in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314(3): 781-6.
 28. Alvarez-Lajonchere L, Gonzalez M, Alvarez-Oregon JC, Guerra I, Vina A, Acosta-Rivero N, et al. Hepatitis C virus (HCV) core protein enhances the immunogenicity of a co-delivered DNA vaccine encoding HCV structural antigens in mice. *Biotechnol Appl Biochem* 2006; 44(Pt 1): 9-17.
 29. Zhu W, Chang Y, Wu C, Han Q, Pei R, Lu M, et al. The wild-type hepatitis C virus core inhibits initiation of antigen-specific T- and B-cell immune responses in BALB/c mice. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17(7): 1139-47.
 30. Chen D, Gould A, Mather M, Haigh O, Barnes M, Kattenbelt J, et al. HBsAg-vectored DNA vaccines elicit concomitant protective responses to multiple CTL epitopes relevant in human disease [Online]. 2008. Available from: URL: <http://precedings.nature.com/documents/1910/version/1>.
 31. Geissler M, Gesien A, Tokushige K, Wands JR. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J Immunol* 1997; 158(3): 1231-7.

Construction and Evaluation of DNA Vaccine Encoding Fusion Protein of Hepatitis C Virus Core Protein and Hepatitis B Surface Antigen as a Vaccine Candidate

Maryam Yazdanian Pharm D¹, Arash Memarnejadian PhD², Hossein Khanahmad Shahreza PhD³, Hoorieh Soleimanjahi PhD⁴, Fatemeh Motevali MSc⁵, Farzin Roohvand PhD⁶

Original Article

Abstract

Background: While hepatitis C virus (HCV) is the major cause of acute and chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma worldwide, no vaccine against this infection has been proved to date. Cellular immune responses play an important role for eradicating persistent viral infections. Among different vaccine strategies, the use of DNA vaccine has been shown to be a promising approach for enhancing cellular immune responses. In spite of their advantages, DNA-based vaccines might induce weaker antibody and cytotoxic T-lymphocyte responses compared to protein immunization. To overcome this obstacle, several methods such as different immunization regimens, fusion of particle forming units [like hepatitis B surface antigen (HBsAg)] and co-expressing cytokines have been tested. The aim of this study was to design, construct, and evaluate an HBsAg-fused core-based DNA vaccine against HCV infection.

Methods: The HCV core gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned in BamHI/EcoRV sites of pcDNA3.1 containing HBsAg. The constructed plasmid (pCHCORE) was analyzed by restriction enzyme and sequencing analyses and evaluated for the protein expression in HEK293T cell line by western blot analysis with anti-HBsAg polyclonal antibody.

Findings: The correctness of the constructed DNA vaccine was shown by restriction enzyme analysis and sequencing. Western blotting results confirmed the expression of HBsAg-HCV fusion protein with an expected molecular weight in HEK239T cell line.

Conclusion: In accordance with previous studies, the constructed vector (pCHCORE) comprising the fusion of HBsAg to HCV core in pCDNA3 plasmid might be used as a HCV DNA vaccine (due to proper expression in cell lines) to induce augmented cellular immune responses.

Keywords: Hepatitis C virus, H C virus core protein, DNA vaccine, Hepatitis B surface antigen, Cytotoxic T-cell response

Citation: Yazdanian M, Memarnejadian A, Khanahmad Shahreza H, Soleimanjahi H, Motevali F, Roohvand F. **Construction and Evaluation of DNA Vaccine Encoding Fusion Protein of Hepatitis C Virus Core Protein and Hepatitis B Surface Antigen as a Vaccine Candidate.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(226): 150-60

1- PhD Student, Department of Pharmaceutical Chemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Pediatric Inherited Diseases Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan AND BCG Research Center, Department of Research and Production, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Department of Virology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

5- Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran

6- Associate Professor, Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Corresponding Author: Farzin Roohvand PhD, Email: rfarzin@pasteur.ac.ir