

بررسی ساختار ایمونوژنیسیته پروتئین نو ترکیب HIV به دست آمده از ویروس gp41-p24

فاطمه روح‌الله^۱، قادر خلیلی^۲، سروش سرداری^۳، معصومه توسلی خیری^۴،

عارف امیرخانی^۵، طاهر نژادستاری^۶، فریدون مهبودی^۳

^۱ دانشجوی دکتری زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^۲ مربی، هیئت علمی بخش ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران

^۳ استادیار، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

^۴ استادیار، بخش آنفلانزا، انستیتو پاستور ایران

^۵ دانشیار، بخش اپیدمیولوژی، انستیتو پاستور ایران

^۶ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

سابقه و هدف: پروتئینهای نو ترکیب به دست آمده از ویروس HIV می‌توانند به عنوان یک ایمونوژن و تحریک‌کننده سیستم ایمنی باشند. از مهمترین آنها می‌توان به پروتئینهای داخلی (gag) و سطحی ویروس (Env) اشاره کرد. در این تحقیق به بررسی ساختار ایمونوژنیسیته پروتئین نو ترکیب gp41-p24 به دست آمده از ویروس HIV می‌پردازیم.

روش بررسی: در مطالعه تجربی حاضر، پروتئین نو ترکیب gp41-p24 که قبلاً توسط روشهای کلونینگ تهیه گردیده و به حالت Unfold نگهداری می‌شد با روشهای رقیق‌سازی پروتئین از حالت Unfold به حالت Refold در آمد. وزن مولکولی و غلظت پروتئینها با روشهای الکتروفورز و اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. Refolding پروتئین با استفاده از الکتروفورز با ژل Native و دستگاه CD (Circular Dichroism) بر اساس تغییرات ساختار دوم پروتئین ارزیابی شد. فعالیت ایمنی و ساختار ایمونوژنیسیته این دو پروتئین با استفاده از تست الایزا و وسترن بلات بر اساس نوع پروتئین و میزان جذب نوری (OD) ثبت شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که وزن مولکولی این دو پروتئین ۳۲ کیلودالتون می‌باشد و از خلوص کامل برخوردارند. Refolding پروتئین از طریق ژل Native مشاهده شد. در این پروتئین افزایش ساختارهای Helix و Beta و کاهش ساختار Random (درمقایسه با پروتئین Unfold) پدیدار گردید. همچنین واکنش ایمنی در پروتئین استاندارد و Refold شده با آنتی‌بادهای موجود در سرم بیماران کنترل مثبت HIV مشاهده گردید و با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه اختلاف معنی‌داری بر حسب نوع پروتئین مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: تحقیقات نشان داد که پروتئین نو ترکیب gp41-p24 به دست آمده از ویروس HIV بعد از Refolding دارای فعالیت ایمونوژنی می‌باشد و از آن می‌توان به عنوان یک ایمونوژن در ایمونیزاسیون و تحریک سیستم ایمنی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: پروتئین نو ترکیب، ایمونوژنیسیته، gp41-p24، ویروس HIV

مقدمه

یکی از مهمترین بیماریهای واگیرداری که در سرتاسر جهان باعث افزایش روز افزون مرگ و میر می‌شود، بیماری ایدز است

(۱). این بیماری توسط یکی از اعضای خانواده لنتی ویروسها به نام HIV (Human Immunodeficiency Virus) ایجاد می‌شود (۲). این ویروس دارای پروتئینهای ویژه از جمله پروتئینهای پوششی، ماتریکسی، کپسیدی و نوکلئوپروتئینها می‌باشد و دو سروتیپ مختلف HIV-1 و HIV-2 از این ویروس شناسایی شده است. این دو سروتیپ از لحاظ پروتئینهای داخلی gag که شامل پروتئینهای p7، p17، p24

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی سلولی و

مولکولی، فاطمه روح‌الله (email: panirohollah@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۷/۲۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۹/۲۰

و p6 است به هم شباهت دارند ولی از لحاظ پروتئینهای پوششی gp120 و gp41 و همچنین سکانسهای ژنی حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد اختلاف دارند (۳).

Env از دسته پروتئینهای سطحی ویروس است که نقش مهمی در اتصال و ورود ویروس به داخل سلول میزبان دارد، همچنین gag از پروتئینهای داخلی ویروس می باشد (۴،۵). در بین پروتئینهای gag پروتئین p24 از جمله پروتئینهایی است که اولین پاسخهای آنتی بادی علیه آن ایجاد می شود و gp41 نیز قادر به تحریک سیستم ایمنی می باشد (۵). در تحقیقات انجام شده حضور برخی از سکانسهای ایمونوژنیک پروتئین gp41 به همراه سایر پروتئینهای به دست آمده از ویروسهای مختلف نظیر ویروس آنفلانزا، هرپس ویروسها و پاپیلوویروسها مشاهده شده است. از جمله این پروتئینهای نوترکیب می توان به پروتئین نوترکیب gp41-HA به دست آمده از سکانسهای ایمونوژنیک gp41 ویروس HIV-1 و سکانسهای ویژه ای از پروتئین همگلوتینین ویروس HA2 آنفلانزا اشاره کرد (۶). پروتئین نوترکیب gp120-HSV از سکانسهای gp120 ویروس HIV-1 و بخشی از سکانسهای هرپس ویروس تهیه شده است (۶،۷). همچنین پروتئین نوترکیب p24-Hsp71 از سکانسهای ایمونوژنیک p24 و پروتئینهای شوک حرارتی Hsp71 تهیه شده است (۸).

در تحقیقات انجام شده به بررسی ساختارهای ایمونوژنیسیته و همچنین به نقش هر یک از این پروتئینهای نوترکیب به عنوان ایمونوژن و تحریک کننده سیستم ایمنی اشاره شده است که این بررسیها در فازهای تحقیقاتی مختلف می باشند (۹). در این تحقیق به مطالعه ساختار ایمونوژنیسیته پروتئین نوترکیب gp41-p24 به دست آمده از ویروس HIV می پردازیم که این پروتئین نیز از نوترکیبی بین سکانسهای ایمونوژن gp41 و p24 با روشهای کلونینگ به دست آمده است (۱۰،۱۱).

مواد و روشها

تعیین غلظت پروتئین: در مطالعه تجربی حاضر میزان غلظت نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و با روش بردفورد اندازه گیری شد. داخل کوت دستگاه ۵۰ میکرولیتر پروتئین با ۹۵۰ میکرولیتر محلول بردفورد ریخته شد (درمقابل بلانک) و میزان شدت جذب نور ثبت گردید.

Refolding پروتئین نوترکیب gp41-p24: پروتئین با استفاده از بافر هپس ۲۰ میلی مولار رقیق شد و با کیسه دیالیز (Cut off ۱۰ کیلودالتون) تغییرات بافری و حذف اوره انجام شد.

مقدار اوره از ۸ مولار به ۰/۱ مولار رسید و میزان تغییرات اوره توسط کیت (من) ارزیابی شد و توسط لوله های سنتری پرپ و سانتریفوژ غلظت پروتئین مجدداً به مقدار اولیه رسید.

تعیین وزن مولکولی: نمونه ها با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ به همراه یک مارکر پروتئینی با جریانی بین ۲۵-۲۲ میلی آمپر Run شد. رنگ آمیزی ژل توسط کوماسی بلو و شستشوی آن توسط الکل ۶۰ درصد انجام گرفت.

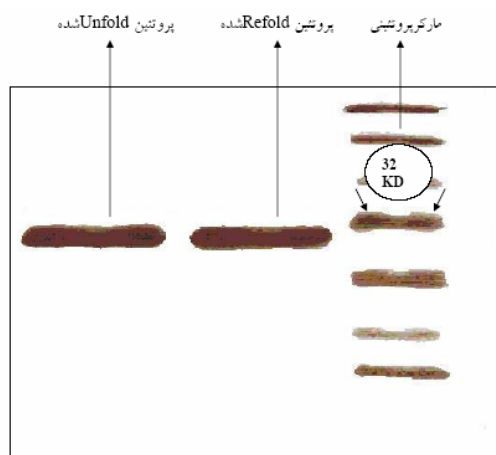
بررسی ساختار دوم پروتئین: نمونه های قبل از Refolding و بعد از Refolding داخل لوله های میکروکون (با Cutoff ۱۰ کیلودالتون) قرار داده شد و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ سانتریفوژ شدند. محلول منتقل شده به تیوب پائین خالی شد و روی نمونه ها ۳۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه ریخته شد و مجدداً با همان شرایط سانتریفوژ گردید. تیوب حاوی فیلتر بطور واژگون روی تیوب دوم قرار داده شد و دوباره با همان شرایط سانتریفوژ انجام شد و تمام محتویات داخل تیوب فیلتردار به تیوب دوم منتقل گردید به این طریق یک تعویض بافر در پروتئینهای مورد آزمایش انجام شد.

غلظت هر دو پروتئین (قبل از Refolding و بعد از Refolding) با روش بردفورد اندازه گیری شد و با دستگاه CD ساختار دوم این دو پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. محاسبه میزان ساختار دوم توسط Jang deta basse انجام شد.

بررسی واکنش/ایمنی پروتئین:

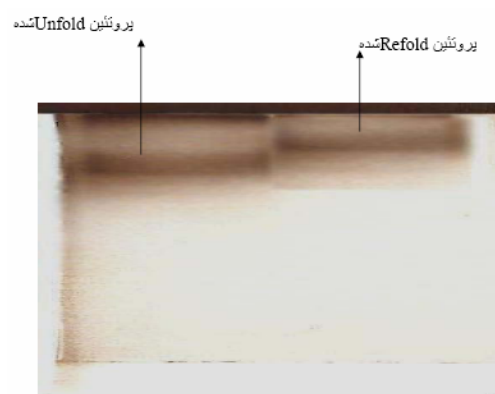
الایزا: پروتئین gp41-p24 به غلظت ۱۰ μg/ml به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر، کف پلیتهای الایزا کت شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز قرار داده شد. بعد از خالی کردن محتویات داخل چاهکها و شستشو با Washing buffer (۳ بار) مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر بلاکینگ در هر چاهک ریخته شد و در ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز قرار داده شد. محتویات داخل چاهکها خالی گردید و بعد از شستشو (۳ الی ۴ بار) با Washing buffer به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. داخل چاهکهای میکروپلیت، سرم کنترل مثبت (مربوط به کیت تشخیصی HIV که با sample dilution مربوط به کیت به مقدار ۱ به ۱۰۰ رقیق شده بود) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر ریخته شد. چندین استاندارد با غلظتهای مختلف در کنار استریپهای پروتئین مورد نظر طراحی شد که یکی از آنها مربوط به پروتئین استاندارد کیت تشخیصی HIV بود سپس به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و 1.5ml از آنتی بادی کونژوگه رقیق شده با کونژوگه dilution (رق ۱ به ۱۰۰۰) به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در داخل هر چاهک

وزن مولکولی پروتئین مورد نظر ۳۲ کیلودالتون بوده و دارای خلوص می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- وزن مولکولی پروتئین Refold و Unfold شده روی ژل الکتروفورز در مقایسه با یک مارکر پروتئینی. وزن مولکولی این دو پروتئین ۳۲ کیلودالتون می‌باشد و دارای خلوص می‌باشند

با بررسی‌های انجام شده توسط ژل Native مشخص شد که Refolding پروتئین مورد نظر به خوبی انجام گرفته است (شکل ۲).



شکل ۲- موقعیت قرارگیری پروتئین Refold و Unfold شده روی ژل Native. پروتئین Refold شده در مقایسه با Unfold شده در موقعیت بالاتری قرار دارد

همچنین در بررسی‌هایی که روی ساختار دوم پروتئین‌ها انجام گرفت مشخص شد که در پروتئین‌های Refold شده میزان ساختارهای Helix و Beta در مقایسه با پروتئین Unfold شده به مراتب افزایش یافته و میزان ساختارهای Random در آنها به مراتب کاهش یافته است. با بررسی‌های انجام شده توسط تست الایزا مشخص شد که پروتئین Refold شده در مقایسه

ریخته شد و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از ۴ بار شستشو با Washing buffer به هر کدام از چاهکها ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا کروموژن (TMB) اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در جای تاریک قرار داده شد و توسط اسید سولفوریک ۲ نرمال واکنش متوقف گردید و با دستگاه ELISA Reader با طول موج ۴۵۰ نانومتر میزان جذب نوری (OD) ثبت شد.

وسترن بلات: پروتئین gp41-p24 ری‌فولد شده و پروتئین استاندارد gp41-p24 مربوط به کیت HIV به ترتیب به عنوان نمونه و کنترل مثبت توسط الکتروفورز با ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲٪ Run شد. ژل به همراه مقداری کاغذ نیتروسولوزی و فیلتر در داخل محلول ترانسفر به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. با استفاده از روش وسترن بلات نیمه خشک و با جریان میلی آمپر نمونه‌ها از روی ژل به کاغذ نیتروسولوزی انتقال داده شد. با قرار دادن ژل داخل رنگ کوماسی بلو میزان انتقال نمونه‌ها به غشاء نیتروسولوزی مشخص شد. بعد از رنگ آمیزی غشاء نیتروسولوز با محلول پانسو S باندهای مربوط به انتقال پروتئین از روی ژل به کاغذ مشخص گردید بعد از شستشوی محلول پانسو S از روی کاغذ، غشاء نیتروسولوز داخل بافر بلاکینگ (Skim milk) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز قرار داده شد. بعد از خارج کردن غشاء نیتروسولوز از بافر بلاکینگ و شستشو با Washing buffer (۲ بار) سرم کنترل مثبت مربوط به کیت HIV (به مقداری که سطح روی کاغذ را بپوشاند) ریخته شد و به مدت ۱ تا ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آرامی shake شد. بعد از ۴ بار شستشو آنتی‌بادی دوم کونژوگه اضافه شد و به مدت ۱ تا ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آرامی shake شد. بعد از اضافه کردن سوبسترا کروموژن (DAB) به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی باندها روی کاغذ نیتروسولوزی آشکار گردید.

داده‌های مربوط به الایزا با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و تست Tukey مورد تحلیل قرار گرفتند. ملاک معنی‌دار بودن تفاوت‌های مشاهده شده از نظر آماری با $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

با بررسی‌های انجام شده مشخص شد که غلظت پروتئین unfold ۳/۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بوده و در پروتئین Refold شده بعد از مراحل رقیق‌سازی و تغییرات بافری این غلظت توسط روش تغلیظ پروتئین با سنتری پرب مجدداً به همان غلظت اولیه برگشته است. همچنین مشخص شد که

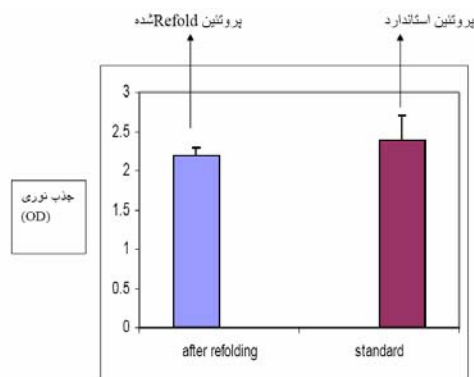
ویروس HIV انجام شد. مطالعات دیگر در مورد سایر سکانسهای پروتئینی gp41 و p24 است (۱،۲). مطالعات انجام شده سایر محققین بر روی پروتئینهای نو ترکیبی چون gp41-HA (۲)، Gcn4-gp41 (۴)، p24-Hsp71 (۳) و rHsv-gp120 (۱۱) گزارش شده است. همچنین تعیین غلظت پروتئین با دستگاه اسپکتروفوتومتری با روش بردفورد در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است. درحالیکه در سایر تحقیقات این ارزیابی توسط روشهای چون لوری و جذب در ۲۸۰ نانومتر (UV) انجام گرفته است (۴،۲). همچنین بررسی وزن مولکولی و خلوص پروتئین با استفاده از الکتروفورز در این مطالعه و در تحقیقات دیگر مشابه یکدیگر گزارش شده است (۳،۴). بررسیهای انجام شده در مورد روش Refolding این پروتئین دقیقاً مشابه با روشها و نتایجی است که در تحقیقات مختلف بر روی پروتئینهایی چون انسولین (۵)، Gcn4-gp41 و سایر پروتئینها انجام شده است (۶،۵). نتایج بدست آمده از ساختار دوم این پروتئین و سایر پروتئینهای نو ترکیب توسط دستگاه CD و ارزیابی ساختارهای چون مارپیچ آلفا، صفحه بتا و پیچهای Random در تحقیقات دیگر گزارش نشده است. همچنین بررسی عملکرد ایمونوژنیسیته این پروتئین و نتایج حاصل از فعالیت ایمنی آن در شرایط *In vitro* با روشهای الایزا و وسترن بلات مشابه تحقیقات انجام شده بر روی سایر پروتئینهای نو ترکیب می باشد (۷-۹)، با این تفاوت که بررسی عملکرد ایمونوژنیسیته این پروتئین نو ترکیب در هیچ تحقیقی گزارش نشده است.

باتوجه به عملکرد ایمنی این پروتئین می توان در تحقیقات آینده از این پروتئین به عنوان یک ایمونوژن در ایمونیزاسیون و تحریک سیستم ایمنی استفاده کرد.

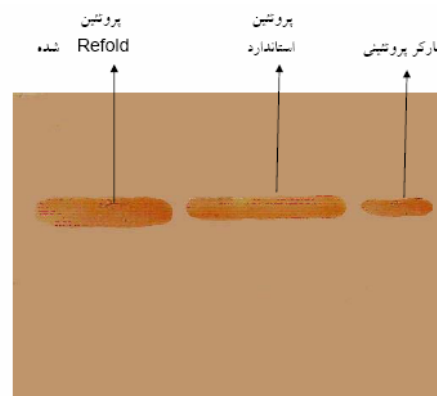
تشکر و قدردانی

با تشکر از همکاران بخش بیوتکنولوژی، آنفلانزا، اپیدمیولوژی، ایمونولوژی و مدیریت حقوقی انیستیتو پاستور تهران و بخش بیوتکنولوژی انیستیتو پاستور کرج و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران و علوم تحقیقات تهران.

با استاندارد قابلیت واکنش ایمنی با آنتی بادیهای موجود در سرم بیماران کنترل مثبت HIV را دارد (نمودار ۱). نتایج به دست آمده از وسترن بلات نیز این مطلب را تأیید می کند (شکل ۳).



نمودار ۱- میانگین و انحراف معیار ایمونوژن بودن پروتئین نو ترکیب gp41-p24 ری فولد شده در مقایسه با استاندارد (پروتئین gp41-p24 نو ترکیب موجود در کیت های تشخیصی HIV)



شکل ۳- موقعیت قرارگیری پروتئین Refold شده در مقایسه با پروتئین استاندارد و مارکر پروتئینی روی غشاء نیتروسلولز در پاسخ به آنتی بادیهای موجود در سرم بیماران کنترل مثبت HIV

بحث

در این تحقیق، بررسی ارزیابی ساختار ایمونوژنیسیته پروتئین نو ترکیب gp41-p24 به دست آمده از سکانسهای ایمونوژنیک

REFERENCES

1. Feredon M, Nickolaeva A, Alexander C, Ahmade A, Samade A, Farzaneh B, et al. Serological screening assay of human immunodeficiency virus typ1 antibodies based on recombinant protein p24-gp41 as a fusion protein expressed in Escherichia coli. *Biotechnohogy* 2006;19:4281-89.
2. Nicholas J, Pamela A, Danil W, Winfried W, Marian R, et al. Immunization of mice with recombinant gp41 in a systemic prime/mucosal boost protocol induces HIV-1 specific serum IgG and secretory IgA antibodies. *Vaccine* 2001;19:3990-4001.
3. Ivan S, Robert D, Damian F, Stephen J. Vaccines and vaccine strategies against HIV. *Current Drug Targets* 2004;5:71-88.
4. Winfried W, Lesley J, Andrea D, Tom L, John J. Assembly of a rod-shaped chimera of a trimeric GCN4 zipper and the HIV-1 ectodomain expressed in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6065-69.
5. Taegeum K, Natasha B, William H. Co-immunization with an HIV-1 Tat transduction peptide-rotavirus enterotoxin fusion protein stimulates aTh1 mucosal immune response in mice. *Vaccine* 2004;22:431-38.
6. Yingying L, Shibo J, Jinyue H, Wanghua G, Shabo S, Nancy M. N36 a synthetic N-terminal heptad repeat domain of the HIV-1 envelope protein gp41, is an activator of human phagocytes. *Clin Immunol* 2002;96:236-42.
7. Hagan D, Gozzoli M, Barackman J, Singh M, Kazzaz J, Higgins K, et al. Microparticles in MF59, apotent adjuvant combination for arecombinant protein vaccine against HIV-1. *Vaccine* 2000;18:1793-801.
8. Lawrence D, Anthony D, Huacheng W, Heather S, Leslie J, Boux L, Mizzen A, et al. Priming of CD8+ CTL effector cells in mice by immunization with a stress protein-influenza virus nucleoprotein fusion molecule. *Vaccine* 1999;17:373-83.
9. Huiyan C, Richard R, Michael K, Michael P, Xia J, et al. Establishment of an alternative intracellular cytokine staining assay for HIV/AIDS clinical studies. *Virological Methods* 2005;123:131-40.
10. Geoffrey J, Lawrence C, Gira B, Mahendra M, Rayhahn H, Thomas J, Matthew S, et al. HIV-1MN recombinant glycoprotein 160 vaccine-induced cellular and humoral immunity boosted by HIV-1MN recombinant glycoprotein 120 vaccine. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1999;15:115-32.
11. Patricia L, Linda S, David C, Miroslawa B, Ruth W, Phillip D, et al. Comparison vaccine strategies using recombinant env-gag-pol MVA with or without an oligomeric Env protein boost in the SHIV rhesus macaque model. *Virology* 2002;294:270-81.