

مقاله تحقیقی

توانایی Foxp3- IgG(Fc) در القای پاسخهای همورال علیه سلولهای T تنظیمی

مریم ناصرالاسلامی^۱، ندا موسوی نیری^{۲*}

۱. گروه سلولی مولکولی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: neda.mousaviniri@gmail.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، انستیتو پاستور تهران

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۲۶

چکیده

بنظر می رسد که موفقیت روش های واکسیناسیون به منظور ایمونوتراپی به واسطه شبکه قدرتمندی از اجزای سرکوبگر سیستم ایمنی که سلولهای T تنظیمی نیز یکی از آنها می باشد مختل می شود. در مطالعات پیشین روی ایجاد پاسخ ایمنی علیه سلولهای T تنظیمی بیانگر foxp3 و حذف آنها کار شده است. از آنجایی که این مطالعات نتوانستند به طور کارآمد با حذف نسبی این سلولها بر اثرات مهاری آنها غلبه کنند؛ در مطالعه حاضر سعی شده است که با ساخت واکسنی کارآتر بر علیه سلولهای T تنظیمی نتایج روش های ایمونوتراپی ترکیبی در سرطان بهبود یابد. سازه DNA دارای بخش C از ایمونوگلوبولین G در الحاق به ژن Foxp3 ساخته شد. بیان سازه FOXP3-Fc بعد از ترانسفکت کردن آن به سلولهای HEK با تکنیکهای میکروسکوپ فلئورسنت، فلوسایتومتری و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. این فیوژن پروتئین در سلولهای E. coli BL21 به عنوان میزبان بیان شدند. سازه و پروتئین نوترکیب مطابق آن به موشهای C57BL/6 تزریق شدند و دو هفته پس از آخرین تزریق سطح سرمی آنتی بادی ایمونوگلوبولین G و زیر کلاسهای آن با روش سنجش الیزا مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز بیان سازه DNA با روشهای متعدد، بیان موفق این پروتئین الحاقی را در سلولهای یوکاریوت نشان داد. بعلاوه بیان پروکاریوتیک Foxp3-Fc نیز با انجام آنالیزهای الکتروفورز ژل پلی اکریلامید - سدیم دودسیل سولفات و متعاقباً وسترن بلات مورد تایید قرار گرفت. حضور پروتئین الحاقی نیز بعد از تخلیص با استفاده از آنتی بادی اختصاصی نشان داده شد. برنامه واکسیناسیون بصورت واکسن DNA/پروتئین نوترکیب پاسخهای همورال وابسته به سلولهای T کمکی را در موشهای واکسینه شده القا کند. با توجه به بیان موفق و کارایی واکسیناسیون با واکسن DNA/پروتئین نوترکیب Foxp3-Fc در القا پاسخهای همورال می توان امید داشت که بعنوان واکسنهایی در درمان تومور بکار بسته شوند؛ و به واسطه حذف سلولهای تنظیمی باعث افزایش تاثیر سایر روشهای ایمونوتراپی گردند.

واژه های کلیدی: سلول T تنظیمی، ایمونوتراپی، پاسخ های همورال، FoxP3، Fc

مقدمه

همراهند و در برخی موارد در درمان یا جلوگیری از بازگشت مجدد تومور ناتوانند. بنابراین سایر روش ها همچون ایمونوتراپی پا به عرصه وجود گذاشت (۱،۲).

رژیم های رایج در درمان سرطان همچون شیمی درمانی، پرتو درمانی و جراحی با مشکلات متعددی

واکسیناسیون بر علیه T reg با هدفگیری مولکول FoxP3 اشاره کرد. تاکنون نیز روش های مختلفی در هدف قرار دادن FoxP3 برای سرکوب T reg مورد استفاده قرار گرفته است. از آن جمله می توان به استفاده از لئروزول (تخریب انتقال سیگنال توسط FoxP3)، سلول دندریتیک حاوی mRNA مربوط به FoxP3 و یا حذف این ژن در سلول های T reg بصورت ترانسژنیک اشاره کرد (-12، 3، 7).

ایمنی زای آنتی ژن ها می تواند در الحاق با بخش C^d زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین ها⁵ و تشکیل پروتئین الحاقی آنتی ژن-FC افزایش یابد. پروتئین الحاقی آنتی ژن-FC به گیرنده های در سطح سلول های عرضه کننده آنتی ژن حتی سلول های متصل شده به این ترتیب آنتی ژن هدف این سلول ها قرار می گیرد. الحاق آنتی ژن با FC(Ig) ، علاوه بر اثری که در افزایش تحریک آنتی ژنی دارد مزایای دیگری را نیز به همراه دارد. پروتئین الحاقی کموکاین/سایتوکاین با FC(Ig) اثرات مثبتی چون میل ترکیبی دوگانه، غیرسمی بودن و نیمه عمر طولانی در بدن را بشرط حفظ فعالیت هر دو پروتئین از خود نشان داده است (17-13).

هدف اصلی این مطالعه ساخت وکتورهای نو ترکیب دربردارنده FoxP3-Fc با هدف تولید واکسن DNA و پروتئین نو ترکیب برای تزریق به گروه های مختلف موشی با برنامه تزریقی اولیه و یادآور می باشد که به دنبال آن تاثیر فرایند ایمنی زایی در القای پاسخ های همورال در این مطالعه مورد بررسی قرار می گیرد.

مواد و روش ها

گونه های باکتریایی و وکتورها

ایشیریشیا کلی گونه های اینویترورژن، امریکا و نواژن، امریکا به ترتیب برای کلون سازی و بیان پروتئین نو ترکیب مورد استفاده قرار گرفتند. سلولهای ایشیریشیا کلی حاوی پلاسمیدهای نو ترکیب بصورت هوازی در محیط لوریا برتانی (LB-مرک، آلمان) در دمای

سیستم ایمنی شبکه ای از مکانیسم های بی پاسخی¹ مرکزی و محیطی را برای شناسایی خود از غیر خود راه-اندازی کرده است. یکی از اعضای اصلی این شبکه سلول-های T تنظیمی² CD4+CD25 (T reg) می باشند که وظیفه آنها سرکوب پاسخ های ایمنی می باشد. بنظر می رسد که موفقیت واکسن ها در درمان تومور توسط شبکه قوی از اجزای مھاری سیستم ایمنی از جمله سلولهای T تنظیمی تحت الشعاع قرار می گیرد؛ بنابراین حذف این سلول های تنظیمی بعنوان یک استراتژی برای افزایش کارآیی درمان های توموری بسیار مد نظر قرار گرفته است. در بسیاری از روش های حذف مولکول CD25 بعنوان مارکر سطحی سلول های T reg مورد هدف قرار گرفته اند (3، 4). تنها محصول ژنی اختصاصی شناخته شده که در سلول های T reg موش بیان می شود، Fork head box P3 (FoxP3) است. FoxP3 یک فاکتور درون سلولی است که بیان آن نه تنها در سلول های T CD4+CD25+ بلکه در سلول های T CD8+^{low/-} و همینطور زیر رده هایی از CD8+⁺ T با فعالیت مھاری نیز دیده می شود. بنابراین، هدف قراردادن FoxP3 بجای CD25 مزایای بیشتری را در حذف سلول های سرکوبگر ایمنی در بدن به همراه دارد (3). از آنجایی که FoxP3 یک مولکول درون سلولی می-باشد، بنابراین سلول های T reg بیان کننده FoxP3 از طریق آنتی بادی های مونوکلونال از بین نمی روند. سلول های T سیتوتوکسیک³ CD8+⁺ قادر به شناسایی محصولات درون سلولی بصورت همراه با کمپلکس اصلی سازگاری نسجی کلاس یک⁴ روی سطح سلول هستند. سلول های بیان کننده FoxP3 نیز به همین ترتیب هدف CTL قرار می گیرند (5، 3). بطور کلی محققین برای سرکوب سلول های T reg از روش های متعددی بهره جسته اند که از آن جمله می توان به استفاده از داروهای شیمیایی، آنتی بادی مونوکلونال ضد CD25، ایمونوتوکسین ها (دنیلوکین دیفتیتوکس و LMB-2) و

¹ Tolerance

² Regulatory T cells

³ Cytotoxic T Lymphocyte(CTL)

⁴ Major Histocompatibility Complex I(MHC I)

⁵ Fragment c(Fc)

⁶ Immunoglobulin(Ig)

pET21-FoxP3-IgG2Fc کلون شد. این پلاسمید پروتئین الحاقی T7tag-FoxP3-IgG2Fc را کدهی می-کند.

انتقال پلاسمید^۷ و بیان ژن در سلول های یوکاریوتی

رده سلولی کلیه جنین انسان (HEK293) بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) در محیط کشت DMEM (بایوسرا، آمریکا) حاوی ال-گلوتامین ۲ میلی مولار، ۱۰۰ واحد پنی سیلین در هر میلی لیتر، ۱۰۰ میلی گرم استرپتومایسین در هر میلی لیتر و ۱۰٪ سرم جنین گوساله در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۵٪ دی اکسید کربن نگهداری شد. سازه ژنی pIRES2-EGFP-FoxP3-IgG2Fc بطور موقت به سلول های HEK با کمک کیت پلیفکت (کیژن، آلمان) منتقل شد. ۷۲ ساعت بعد از انتقال، سلول های ناقل^۸ هم از نظر فلوروسنت میکروسکوپی (زایس آکسیوسکوپ، آلمان) و هم از نظر فلوسایتومتری مربوط به رنگ سبز پروتئین GFP در جمعیت سلولی زنده با دستگاه فلوسایتومتر (پارتنک، آلمان) و با نرم افزار فلومکس در مقابل سلول های ترانسفکت نشده بعنوان کنترل منفی مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین برای انجام بررسی وسترن بلات، لیزات این سلول ها بعد از حل شدن در بافر لیز کننده (تریس-کلر ۰/۱ مولار و تریتون X-۱۰۰ نیم درصد حجمی/اجمی) با کمک کروماتوگرافی ژل پلی اکریلامید-سدیم دودسیل سولفات ۱۲٪ تحت شرایط احیا کننده جداسازی، به غشای پلی وینیلین دی فلوراید (PVDF)-آمرشام بایوساینس، آمریکا) با استفاده از دستگاه بلاتینگ (بایو رد-آمریکا) نیمه خشک منتقل، با آلبومین سرم گاوی ۵٪ بلاک شدند. سپس با آنتی بادی بزی ضدزنجیره سنگین ایمونوگلوبولین موشی کونژوگه شده با آنزیم (سیگما، آمریکا)، که به نسبت ۱:۵۰۰۰ در محلول مسدود کننده^۹ حل شده بود، یک ساعت در دمای اتاق

۳۷ درجه سانتی گراد و در حضور ۵۰ میکروگرم کانامایسین یا آمپی سیلین (سیگما، آمریکا) به ازای هر میلی لیتر محیط کشت رشد داده شدند. پلاسمیدهای pIRES2-EGFP و pET21a به ترتیب به عنوان وکتور واکسن DNA و وکتور بیانی در سیستم پروکاریوتی استفاده شدند.

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) ژن الحاقی FoxP3-IgG2Fc

قطعه کوتاه شده FoxP3 دارای ۱۱۱۴ جفت باز (مطابق با اسید آمینه های ۱-۳۶۳) با انجام PCR بر روی پلاسمید از قبل ساخته شده pEGFP-N1-FoxP3 با استفاده از پرایمرهای مستقیم (5' *NheI*-tailed ATATGCTAGCGCCACCATGGCTC3') و معکوس (5' *BglIII*-tailed TACAGATCTGGCGAACATGCGAG3') و آنزیم پلیمرز (*Pfu* (ترمومو، آمریکا) در شرایط دمایی ۹۴ درجه سانتیگراد (۴ دقیقه) و سی چرخه ۹۴ درجه سانتیگراد (۴۰ ثانیه)، ۵۵ درجه (۴۰ ثانیه) و ۷۲ درجه (۶۸ ثانیه) ایجاد شد. برای ساخت سازه pIRES2-EGFP-FoxP3-IgG2Fc که FoxP3-IgG2Fc را کدهی می کند، ژن کوتاه شده FoxP3 بعد از تکثیر با آنزیم های محدودالایتر *NheI/BglIII* هضم و جایگزین قطعه *Igk-IL18* در پلاسمید از پیش ساخته شده pIRES2-EGFP-Igk-IL18-IgG2Fc شد. این پلاسمید علاوه بر پروتئین الحاقی FoxP3-IgG2Fc پروتئین سبز فلوروسنت (EGFP) را نیز جداگانه بیان می کند. به علاوه پلاسمید نو ترکیب pET21-FoxP3-IgG2Fc نیز با انجام PCR روی سازه pIRES2-EGFP-FoxP3-IgG2Fc با استفاده از پرایمرهای مستقیم (5' TGG AATTCGCTCCTCCTTGG3') و معکوس (5' TATAAGCTTTAGCCCCGAGTCC3') و در شرایط دمایی ۹۴ درجه سانتیگراد (۴ دقیقه) و سی چرخه ۹۴ درجه سانتیگراد (۴۰ ثانیه)، ۵۶ درجه (۴۰ ثانیه) و ۷۲ درجه (۲۴۰ ثانیه) ایجاد شد. قطعه *EcoRI-HindIII* FoxP3-IgG2Fc در pET21a برای ایجاد سازه

⁷ Transfection

⁸ Transfected cells

⁹ Block

موش های ماده شش تا هشت هفته ای C57/BL6 خریداری شده از انستیتو پاستور ایران تحت شرایط استاندارد نگهداری و طبق برنامه ایمنی زایی درج شده در جدول ۱ در سه گروه ده تایی واکسینه شدند. موش ها بصورت بصورت عضلانی در ماهیچه کوادریسپت ران پا با ۱۰۰ میکروگرم پلاسمید-pIRES2-EGFP-FoxP3 و pIRES2-EGFP-FoxP3-IgG2Fc در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر (یک میکروگرم در میکرولیتر) با DNA پلاسمیدی و بصورت زیرجلدی در ناحیه پشت گردن با ۳۰ میکروگرم پروتئین ایمونوژن FoxP3-IgG2Fc خالص شده بصورت مخلوط با مقدار هم حجم ادجوانت ناقص فروند (سیگما، امریکا) واکسینه شدند. واکسیناسیون به شکل برنامه تزریقی اولیه/یادآور غیریکنواخت با تزریق یک دوز DNA پلاسمیدی تخلیص شده با کیت تخلیص پلاسمید بدون اندوتوکسین گیگا (کیژن، استرالیا) و بدنبال آن تزریق دو دوز پروتئینی انجام گرفت. گروه های کنترل با-pIRES2-EGFP و BSA واکسینه شدند. دو هفته بعد از آخرین ایمنی زایی خونگیری از چشم موشها انجام شد و سرم جدا شده از آن تا زمان انجام آزمایش در فریزر -۷۰- نگهداری شد.

انجام الیزا برای آنتی بادی اختصاصی و زیرکلاس ها

آزمون الیزا برای تعیین حضور آنتی بادی های ضدFoxP3 در سرم موش های ایمن شده انجام شد. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر پروتئین نوترکیب FoxP3، ۲ میکروگرم در میلی لیتر (رقیق شده در بافر نمکی فسفات) به منظور چسبیدن به پلیتهای میکروتیتر ۹۶ خانه ای (اکستراژن، امریکا) بصورت شبانه در ۴ درجه سانتیگراد انکوبه و بعد از شستشو با بافر نمکی فسفات-تویین ۲۰ و دو ساعت انکوبه با محلول مسدود کننده (بافر نمکی فسفات دارای ۵ درصد آلومین سرم گاوی) دردمای ۳۷ درجه سانتیگراد و شستشو، سرم های موشی (رقیق شده در بافر مسدود کننده) به چاهکها اضافه شد و انکوباسیون یک ساعت دیگر در همین دما ادامه پیدا کرد. پس از شستشوی پلیت ها آنتی بادی

انکوبه شده متعاقبا با معرف دی امینو بنزیدین تتراهیدروکلراید (DAB-سیگما، امریکا). وجود پروتئین مورد نظر در تاریکی بررسی شد. لیزات سلول های غیرناقل^۱ بعنوان کنترل منفی استفاده شد. همین مراحل در مورد تایید بیان پروتئین نوترکیب الحاقی FoxP3-IgG2Fc در میزبان باکتریایی انجام شد.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب Foxp3-IgG2Fc

برای بیان پروتئین الحاقی Foxp3-Fc(IgG) پلاسمید pET21-FoxP3-IgG2Fc به سلول های متعهد شده *E. coli* BL21(DE3) منتقل و در محیط آگار LB کشت داده شدند؛ کلونی های رشد کرده بر روی آگار به محیط مایع LB منتقل و القای بیان پروتئین با IPTG یک میلی مولار بعد از رسیدن به دانسیته نوری انجام شد و رسوب باکتریایی مربوطه از نظر بیان پروتئین با SDS-PAGE و سترن بلات بررسی شد. برای تخلیص پروتئین ژل مربوط به الکتروفورز نمونه ها در محلول سدیم کربنات ۰,۰۸ مولار غوطه ور، سپس با محلول های ایمیدازول-سدیم دودسیل سولفات (ایمیدازول ۲۰۰ میلی مولار و SDS ۰/۱ درصد وزنی/حجمی) پیش تیمار و متعاقبا تیمار با محلول سولفات مس ۲۰۰ میلی مولار صورت گرفت تا زمانی که زمینه ژل کاملا کدر و باندهای پروتئینی بصورت شفاف نمایان شود. در ادامه باند پروتئینی مورد نظر از ژل بریده و در طی یک شب در بافر استخراج پروتئین (کربنات آمونیوم و SDS) با حرکات ملایم روی دستگاه راکر یکنواخت گردید. بعد از سانتریفوژ محلول رویی سوسپانسیون جمع آوری و تغلیظ با فیلترهای تغلیظ ویوا اسپین (سارتوریوس، آلمان) با قطر سه کیلودالتون انجام شد. غلظت پروتئین با استفاده از اسپکتروفوتومتر نانودراپ (ترموساینس، امریکا) و خلوص آن با انجام SDS-PAGE و رنگ آمیزی کوماسی بریلیانت بلو تعیین شد.

گروه های مورد آزمایش، برنامه ایمنی زایی و خونگیری

¹ Non transfected cells 0

برای تعیین زیرکلاس ها، آنتی بادی های بیوتینه شده IgG1، IgG2a، IgG2b، و IgG3 (سیگما، امریکا) ۱:۱۰۰۰ رقیق شده، آنتی بادی کونژوگه شده با HRP و استرپتاویدین و نهایتا سوبسترای تترامتیل بنزیدین مورد استفاده قرار گرفتند. در هر دو سنجش میزان جذب با کمک دستگاه الیزا ریدر و در دانسیته نوری ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

ضد IgG موشی کونژوگه با HRP (سیگما، امریکا) ۱:۱۰۰۰۰ رقیق شده به چاهکها اضافه و بعد از یک ساعت انکوباسیون و شستشو، برای انجام واکنش، سوبسترای تترامتیل بنزیدین به چاهکها اضافه و نیم ساعت در دمای اتاق و شرایط تاریکی انکوبه شد. واکنش با ۱۰۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال متوقف شد.

جدول ۱ - گروه های موشی واکسینه شده، فرمولاسیون و برنامه زمانی ایمنی زایی.

فرمولاسیون و برنامه زمانی ایمنی زایی*	گروه های واکسینه شده
pIRES2-EGFP (0) + BSA (14,28)	I
pIRES2-EGFP-FoxP3 (0) + rFoxP3 (14,28)	II
pIRES2-EGFP-FoxP3-IgG2Fc (0) + r FoxP3-IgG2Fc (14,28)	III

*شماره های داخل پرانتز نشاندهنده روز مربوط به ایمنی زایی حیوان است.

سایز ۷۰۵۸ جفت باز گردید. پس از ترانسفورم شدن این سازه به درون سلول های باکتریایی متعهد شده *E. coli* DH5 α درستی سایز قطعه داخل شده با روش های مختلفی چون کلونی-PCR، هضم آنزیمی و انجام PCR روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی ها ارزیابی شد. واکنش روی پلاسمید pIRES2-EGFP-FoxP3-IgG2Fc بعنوان الگو و با کمک پرایمرهای اختصاصی F2 / R2 به ایجاد قطعه الحاقی FoxP3-IgG2Fc با طول ۱۸۳۰ جفت باز انجامید (تصویر ۲). این محصول با نسبت مولی ۱:۶ درون وکتور Pet21a کلون (تصویر ۲ب) و سپس به سلولهای متعهد شده *E. coli* DH5 α ترانسفورم شد. کلونی های حاصل از رشد آنها به روش های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت نیز صحت ژن الحاقی در پلاسمیدهای pIRES2-EGFP-FoxP3-IgG2Fc و pET21a-Foxp3-IgG2Fc با واکنش های توالی یابی نوکلئوتیدی تایید شد که نتایج آن در کارهای قبلی این گروه آمده است. (۱۸).

آنالیز آماری

اطلاعات جمع شده با کمک روشهای آماری توصیفی خلاصه شدند. آزمون آنالیز واریانس یک طرفه برای مقایسه ارزش میانگینها مورد استفاده قرار گرفت و *p*-value کمتر از 0.05 و 0.001 نشاندهنده معنی داری بود. آنالیز و نمایش اطلاعات با نرم افزارهای SPSS ورژن ۲۰ و گراف پد پریسم صورت گرفت.

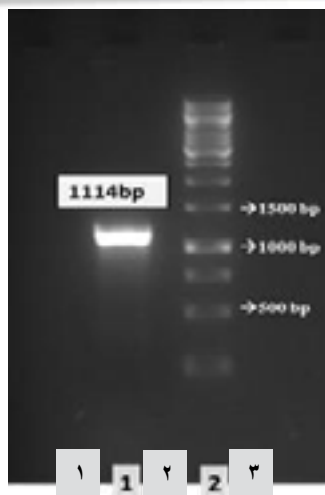
نتایج

تکثیر قطعه *FoxP3-IgG2Fc* و ساخت سازه های

pET21a- و *pIRES2-EGFP-FoxP3-IgG2Fc*

FoxP3-IgG2Fc

قطعه کوتاه شده Foxp3 با انجام PCR در حضور پرایمرهای اختصاصی روی پلاسمید pEGFP-N1-FoxP3 تکثیر و درستی سایز (۱۱۱۴ جفت باز) و تک باند بودن محصول PCR با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد تایید شد (تصویر ۱). Foxp3 در پلاسمید pIRES2-EGFP-Igk-IL18-IgG2Fc کلون و جایگزین قطعه IL18 شد و منجر به ایجاد پلاسمید با



تصویر ۱- الکتروفورز ژل آگارز مربوط به قطعه تکثیر شده با روش PCR. از چپ به راست، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: محصول PCR، ستون ۳: مارکر DNA یک کیلو جفت باز (فرمنتاز).

انجام شده بود نیز باند پروتئینی ۶۹ کیلو دالتون را بعد از رنگ آمیزی کوماسی بلو ظاهر ساخت (شکل ۴).

تخلیص پروتئین نو ترکیب Foxp3-IgG2Fc

تخلیص پروتئین نو ترکیب به روش رنگ آمیزی معکوس با ایمیدازول-سدیم دو دسیل سولفات-روی صورت پذیرفت. بصورت نظری وزن مولکولی پروتئین هدف مطالعه ۶۹ کیلودالتون تخمین زده شده که باند پروتئینی مربوطه نیز به روش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی بزی ضد موشی تصدیق گردید (شکل ۵الف، ب). در مجموع میتوان گفت که با توجه به این یافته ها می توان از پلاسمید pET21-FoxP3-IgG2Fc در یک سیستم شده با هدف بیان و تخلیص پروتئین الحاقی FoxP3-IgG2Fc به منظور استفاده در مطالعات بعدی واکسن و ایمنی زایی حیوانات بهره جست.

پاسخ های ایمنی همورال

تولید آنتی بادی اختصاصی در سرم موشهای ایمن شده در هر سه گروه واکسینه شده (جدول ۱) دو هفته بعد از آخرین تزریق با روش الیزای بهینه شده سنجیده شد. با توجه به نتایج به دست آمده تمامی حیوانات ایمن شده با واکسن های نو ترکیب (گروه II و III) قادر به شکستن

بررسی بیان پروتئینی در سازه های نو ترکیب

پس از تایید صحت وکتور pIRES2-EGFP-FoxP3-IgG2Fc با بررسیهای هضم آنزیمی و واکنشهای تعیین توالی این پلاسمید نو ترکیب به سلول های HEK_293 ترانسفکت شده و توانایی بیان پروتئین GFP در این سلولها تا ۴۰ درصد در مقایسه با سلول های ترانسفکت نشده (کنترل منفی) با میکروسکوپ فلوروسنت تایید گردید (تصویر ۳ الف). بعلاوه بررسی های فلوسایتومتری سلول های ترانسفکت شده در کانال GFP، میانگین شدت فلوروسنت ۴۰ درصدی از خود نشان داد (تصویر ۳ ب و ج). این یافته می تواند موید رونویسی موفق mRNA مربوط به GFP-FoxP3-IgG2Fc باشد که بطور غیر مستقیم نشانگر بیان FoxP3-IgG2Fc می باشد.

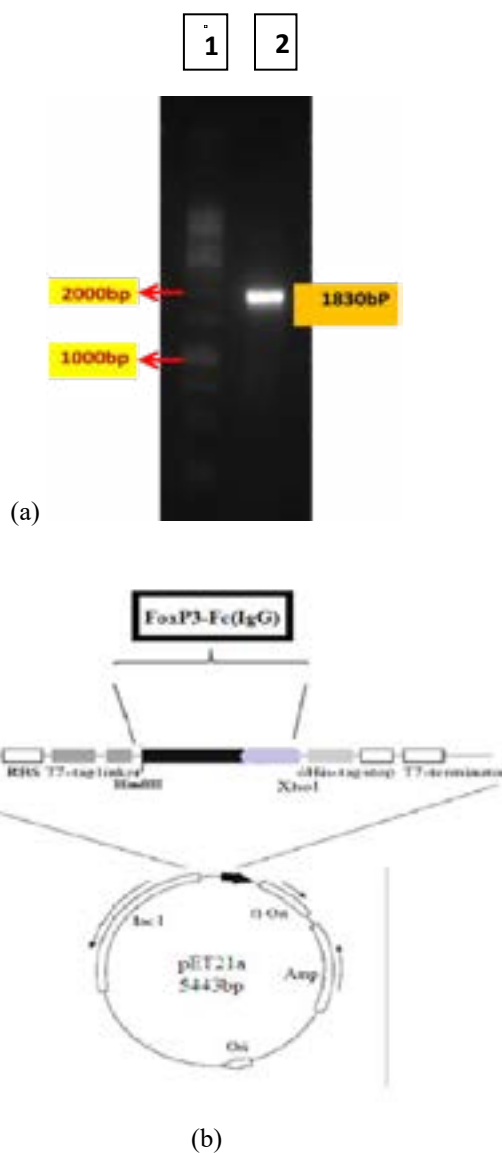
بعلاوه بررسی لیزات سلولهای HEK 293T ترانسفکت شده با pIRES2-EGFP-FoxP3-IgG2Fc به روش وسترن بلات، بیان پروتئین الحاقی FoxP3-IgG2Fc با سایز مطلوب ۶۹ کیلودالتون را در شرایط لوله آزمایش نشان می دهد (شکل ۳د). به همین ترتیب، SDS-PAGE مربوط به لیزات سلولهای *E. coli* BL21 حامل وکتور pET21a-Foxp3-IgG2Fc که القا بیان پروتئین در آنها

تولرانس همورال برای تولید آنتی بادی اختصاصی FoxP3 بودند. همانطور که در تصویر ۶ نشان داده شده است بالاترین تیتراژ آنتی بادی در گروه سوم ایمن شده یعنی گروه واکسینه شده با FoxP3-IgG2Fc مشاهده می شود

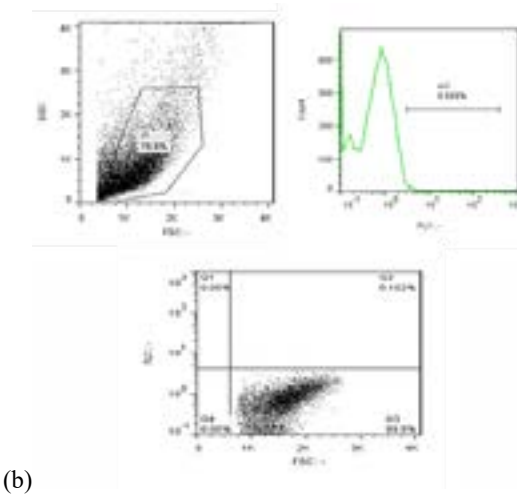
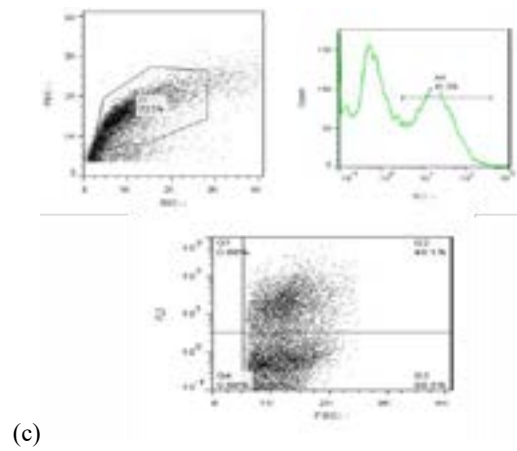
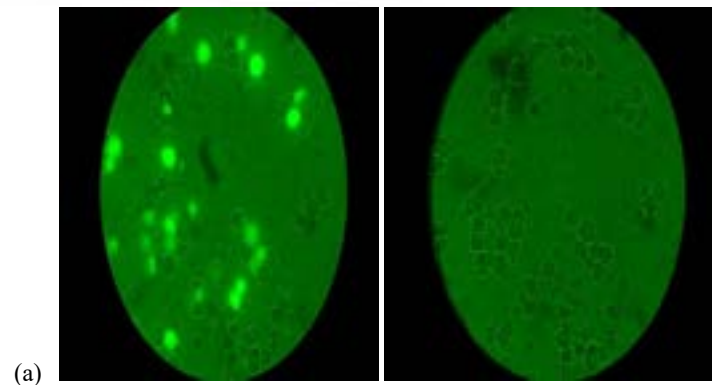
گروه دوم واکسیناسیون نیز در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود ($p\text{-value} = 0.03$).

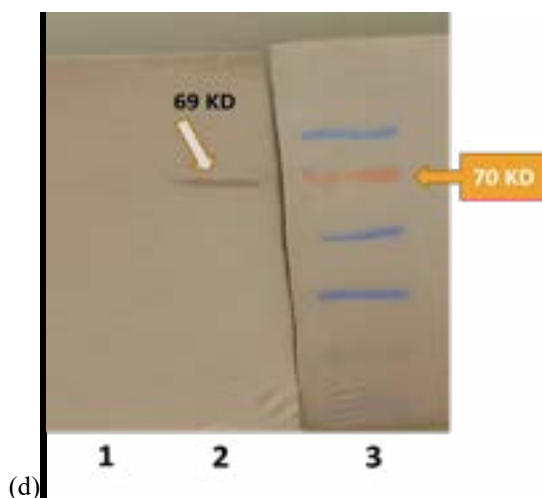
اگرچه تیتراژ آنتی بادی IgG کلی در ($p\text{-value} = 0.004$).

تولرانس همورال برای تولید آنتی بادی اختصاصی FoxP3 بودند. همانطور که در تصویر ۶ نشان داده شده است بالاترین تیتراژ آنتی بادی در گروه سوم ایمن شده یعنی گروه واکسینه شده با FoxP3-IgG2Fc مشاهده می شود

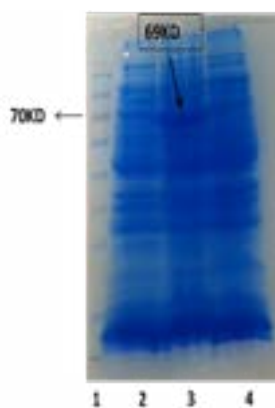


تصویر ۲- (الف) الکتروفورز ژل آگارز قطعه تکثیر شده با . از چپ به راست، ستون ۱: مارکر DNA یک کیلو جفت باز (فرمنتاز) ، ستون ۲: محصول PCR (ب) شکل شماتیک اجزای بیانی در پلاسمید pET21a-Foxp3-IgG2(Fc)

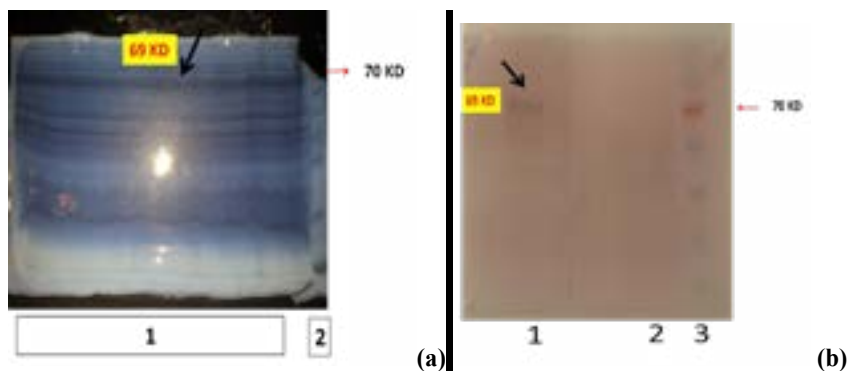




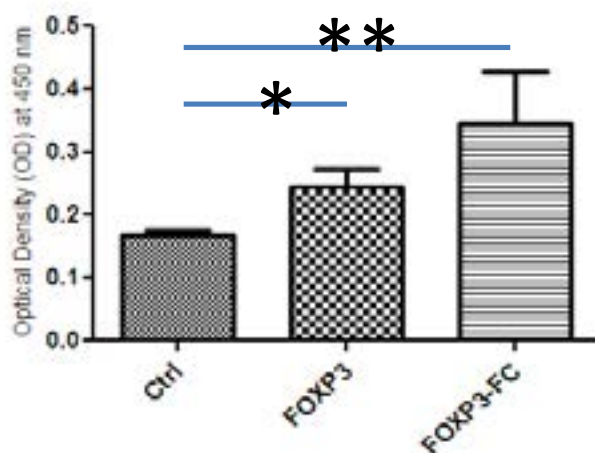
تصویر ۳- (الف) ارزیابی انتقال گذرای پلاسمید pIRES2-EGFP-FoxP3-IgG2Fc در سلولهای HEK 293T در مقایسه با سلولهای غیر ناقل (کنترل منفی) با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت (با بزرگنمایی ۱۰۰) (ب و ج) پلات نقطه ای و هیستوگرام آنالیز فلوسایتمتری از نظر بیان پروتئین GFP به ترتیب در سلولهای غیر ناقل (کنترل منفی) در مقایسه با سلولهای ناقل پلاسمید. (د) ارزیابی بیان پروتئین الحاقی FoxP3-IgG2(Fc) در لیزات سلولهای HEK 293T ناقل پلاسمید pIRES2-EGFP-FoxP3-IgG2Fc با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال anti-Fc(IgG) صورت گرفت. ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: باند مربوط به پروتئین الحاقی مورد نظر با طول ۶۹ کیلودالتون (با فلش مشخص شده)، ستون ۳: مارکر وزن مولکولی پروتئین.



تصویر ۴- (الف) آنالیز SDS-PAGE مربوط به پروتئین نوترکیب Foxp3-IgG2(Fc) با رنگ امیزی کوماسی. از چپ به راست، ستون ۱: مارکر پروتئینی (فرمنتاز)، ستون ۲: لیزات باکتریایی القا نشده با IPTG ، ستون ۳: لیزات باکتریایی القا شده با IPTG (۶۹ کیلودالتون) ، ستون ۴: لیزات باکتریایی خام غیر ناقل (کنترل منفی).



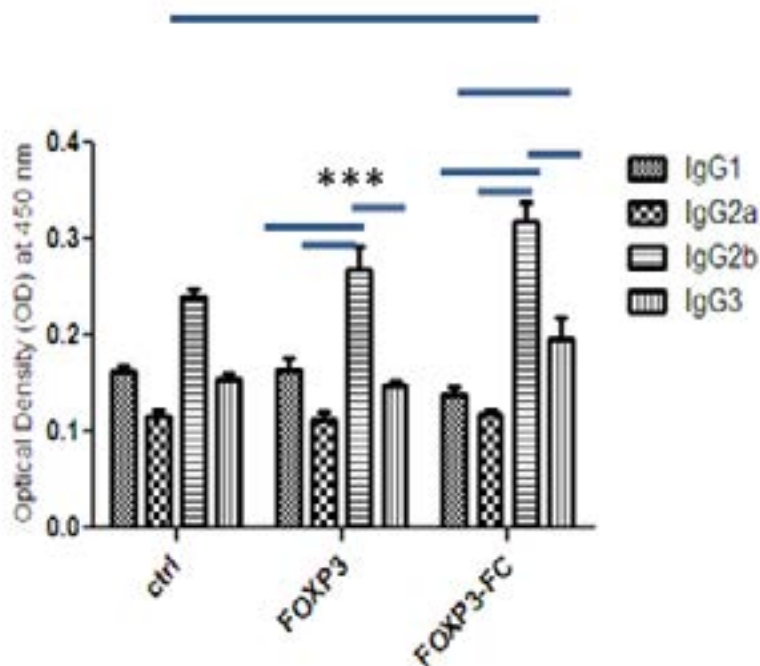
تصویر ۵- (الف) تخلیص rFoxp3-IgG2(Fc) با رنگ آمیزی معکوس ایمیدازول-سدیم دو دسیل سولفات-روی. از چپ به راست، ستون ۱: لیزات باکتریایی ناقل پلاسمید بعد از القا با IPTG که در یک چاهک بزرگ ران شده است وبا فلش مشخص است. ستون ۲: مارکر پروتئینی. (ب) آنالیز وسترن بلات. از چپ به راست ستون ۱: *E.coli* BL21 القا شده حاوی Pet21a-FoxP3-IgG2(Fc) ، ستون ۲: کنترل منفی، ستون ۳: مارکر پروتئینی.



تصویر ۶- نمودار ستونی مقایسه میانگین سطح سرمی IgG توتال در گروههای کنترل و واکسینه شده بر علیه FoxP3 و FoxP3-IgG2(Fc) (Mean±S.D,* P≤0.05, ** P≤0.001).

سطح سرمی را در گروههای دوم و سوم واکسیناسیون در مقایسه با سایر زیرکلاسها در همین گروهها دارد که بررسی آماری حاکی از معنی داری آن می باشد ($p < 0.0001$). اگرچه طبق نتایج سطح سرمی IgG3 نیز در گروه سوم در مقایسه با زیرکلاس IgG2a افزایش یافته است اما این صعود در مقایسه با تیتراژ IgG3 در گروه کنترل معنی معنی دار نمی باشد.

همانطور که می دانیم ارزیابی زیرکلاسهای آنتی بادی می تواند جهت گیری پاسخهای ایمنی را در حیوان واکسینه شده نمایان کند. به همین مقصود سنجش زیر کلاسهای IgG نیز بدنبال سنجش کلی آن صورت پذیرفت و همانطور که در تصویر ۷ نشان داده می شود زیر کلاس IgG2b که یکی از زیر کلاسهای وابسته به پاسخهای سلولی T کمکی یک (Th1) می باشد بالاترین



تصویر ۷ - نمودار ستونی مقایسه میانگین سطح سرمی زیر کلاسه‌های *IgG* تولید شده بر علیه *FoxP3* در گروه‌های مختلف واکنش شده (Mean±S.D, * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.0001$).

بحث

مهمترین ویژگی‌هایی است که می‌تواند در فناوری واکنش DNA اداره شود (۱۹). روش‌های مختلفی از جمله مهندسی واکنش DNA، تحویل همزمان با مولکول‌های سرکوبگر ایمنی، مسیرهای امن تحویل دارو به بدن، برنامه اولیه-یادآور و استراتژی‌هایی برای غلبه بر مکانیسم‌های شبکه‌های سرکوبگر ایمنی که توسط سلول‌های بدخیم برای جلوگیری از عملکرد سلول‌های ایمنی اتخاذ می‌شود، تا کنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۹). در کارآزمایی‌های در حال انجام یا کامل شده با بکارگیری راهکارهای منفرد و ترکیبی برای افزایش کارایی و ایمنی زایی واکنش‌های DNA، امنیت و تحمل پذیر بودن آنها به اثبات رسیده است (۱۹-۲۲).

واکنش‌های DNA به واسطه توسعه سریع و وسیع-شان در بسیاری از کارآزمایی‌های بالینی بشر به منظور واکنش‌های علیه بیماری‌های مختلف از جمله سرطان وارد شده‌اند. نتایج مربوط به مطالعات قبلی در کارآزمایی‌ها نشان داده‌اند که این واکنش‌های از جنبه روش‌های بیان و تحویل آنتی‌ژن تا رسیدن به کارآزمایی قابل قبول در بالین هنوز نیاز به بهبود دارند. از طرفی، برای راه‌اندازی یک ایمنی کارآمد علیه آنتی‌ژن‌های توموری که ایمنی زایی خفیفی دارند نیز استراتژی‌های جدیدتری باید بکار گرفته شود. مهندسی طراحی واکنش‌ها برای دستکاری مسیرهای عرضه و فرآوری آنتی‌ژن‌ها یکی از

های T کمکی را بشکنند. واکسن به ترتیبی که در برنامه واکسیناسیون این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، می تواند هر دو مسیر عرضه آنتی ژن را به راه بیندازد. واکسن می تواند ژن محموله ژنی خود را هم با کمک MHC I به سلول های T سیتوتوکسیک و هم از طریق MHC II به سلول های T کمکی عرضه کند (۲۹-۲۸).

در این مطالعه ژن کوتاه شده FoxP3 در الحاق با IgG2Fc تکثیر و با موفقیت در وکتورهای pIRES2-EGFP و pET21a کلون شد. در ادامه عملکرد اجرایی هر دو سازه نو ترکیب به ترتیب در سیستم های پروکاریوتی و یوکاریوتی بیان پروتئین بررسی شد. بنابراین زمان آن رسیده که با فراتر نهاده و سایر نتایج ایمنی زایی با این سازه ها در بدن موجود زنده و توانایی آنها در القای پاسخ های ایمنی عملکردی علیه سلول های T تنظیمی ارزیابی شود.

به طور خلاصه، وکتورهای کلونینگ و بیانی دربردارنده قطعه FoxP3-IgG2Fc برای استفاده به عنوان واکسن DNA و وکتور تولید کننده پروتئین نو ترکیب ساخته شدند. یافته های ما نشان دادند که FoxP3-IgG2Fc می تواند در *E. coli* BL21 (DE3) و سلول های یوکاریوتی در شرایط آزمایشگاه بیان شوند. بنابراین بنظر می رسد که این سازه ها برای استفاده در طراحی مطالعات تجربی به منظور غلبه بر سلول های T تنظیمی در پاسخ های ایمنی علیه تومور کاربرد داشته باشند. انجام بررسی های تکمیلی در مورد سایر اثرات FoxP3-IgG2Fc به عنوان واکسن علیه سلول های T تنظیمی همچون میزان سلول های T تنظیمی در طحال، ارزیابی لنفوسیت های T سیتوتوکسیک و چالش های تومور می تواند زمینه ای برای مطالعات آینده باشد.

تقدیر و تشکر

از همکاری دانشگاه های علوم پزشکی تهران و تبریز که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند سپاسگزاریم.

سلول های عرضه کننده آنتی ژن برای شروع و کنترل پاسخ های سلول های B و T در مقابل واکسن DNA حیاتی هستند؛ هرچند که تنها کسر کوچکی از مولکول های DNA تزریق شده، توسط سلول های عرضه کننده آنتی ژن در گره های لنفاوی به دام می-افتند (۲۳). حتی زمانی که این مولکول ها به درون سلول های دندریتیک (مهمترین سلول حرفه ای عرضه کننده آنتی ژن) ترانسفکت می شوند، فرآیند پردازش و عرضه آنها به MHC کلاس II مشکل است (۲۴). حتی آنتی ژن های ترشخی نیز به دلیل ناکارآمدی به درون کشیدن آنتی ژن های محلول از راه پینوسیتوز فاز مایع، نمی توانند بطور موثر به MHC کلاس I و II عرضه شوند (۲۵). در این مطالعه با ساختن پروتئین الحاقی آنتی ژن-Fc با هدف تسهیل فرآیند به درون کشیدن با واسطه گیرنده سعی در تسهیل عرضه آنتی ژن با سلول های عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن و افزایش پاسخ های ایمنی داشتیم. اگرچه قبلا نیز تلاش هایی مثل استفاده از مولکول پروتئین ۴ وابسته به سلول سیتوتوکسیک (CTLA4) برای هدف قرار دادن آنتی ژن توسط سلول-های حرفه ای عرضه کننده آنتی ژن به منظور افزایش قدرت واکسن های DNA صورت گرفته بود (۲۶-۲۷)؛ اما طراحی واکسنی که در باره آن صحبت شد ویژگی های منحصر بفردی دارد. این واکسن مسیر اندوسیتوز به واسطه گیرنده را قادر می سازد که بطور موثرتری آنتی ژن های الحاقی را به دام انداخته، در اندوزوم پردازش کرده و توسط سلول های حرفه ای عرضه کننده آنتی ژن به MHC عرضه کند. همانطور که در این مطالعه تشریح شد سازه دربردارنده بخش Fc در الحاق با Foxp3 پلاسمید pIRES-EGFP طراحی شد. بیان سازه با ترانسفکت کردن آن در سلول های HEK بررسی گردید. غیرغم سایر روش های واکسیناسیون فعال بر علیه FoxP3 (۳)، پروتکل واکسیناسیون واکسن DNA /پروتئین نو ترکیب که در مطالعه حاضر بکار بسته شد توانست تولرانس در پاسخ های همورال وابسته به سلول-

منابع مورد استفاده

1. Sheu, B.C., Chang, W.C., Huang, S.C., 2010. New era of regulatory T cells in tumor immunity: insights in cancer immunotherapy. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 109(1):1-3.
2. Zou, W., 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews Immunology*;6(4):295-307.
3. Nair, S., Boczkowski D., Fassnacht, M., Pisetsky, D., Gilboa, E., 2007. Vaccination against the forkhead family transcription factor Foxp3 enhances tumor immunity. *Cancer research*;67(1):371-80.
4. Vergati, M., Schlom, J., Tsang, KY. 2011., The consequence of immune suppressive cells in the use of therapeutic cancer vaccines and their importance in immune monitoring. *Journal of biomedicine & biotechnology* :182413.
5. Beyer, M., Schultze, JL., 2006 Regulatory T cells in cancer. *Blood* ;108(3):804-11.
6. Powell, DJ, Jr., Felipe-Silva, A., Merino, MJ., Ahmadzadeh, M., Allen, T., Levy, C., et al., 2007. Administration of a CD25-directed immunotoxin, LMB-2, to patients with metastatic melanoma induces a selective partial reduction in regulatory T cells in vivo. *Journal of immunology*;179(7):4919-28.
7. Greten, TF., Ormandy, LA., Fikuart, A., Hochst, B., Henschen, S., Horning, M, et al., 2010. Low-dose cyclophosphamide treatment impairs regulatory T cells and unmasks AFP-specific CD4+ T-cell responses in patients with advanced HCC. *Journal of immunotherapy*;33(2):211-8.
8. Curtin, JF., Candolfi, M., Fakhouri, TM., Liu, C., Alden, A., Edwards, M, et al., 2008. Treg depletion inhibits efficacy of cancer immunotherapy: implications for clinical trials. *PloS one*;3(4):e198.r
9. Morse, MA., Hobeika, AC., Osada, T., Serra, D., Niedzwiecki, D., Lyerly, HK., et al., 2008. Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines. *Blood*;112(3):610-8.
10. Generali, D., Bates, G., Berruti, A., Brizzi, MP., Campo, L., Bonardi, S., et al., 2009. Immunomodulation of FOXP3+ regulatory T cells by the aromatase inhibitor letrozole in breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15(51):1046
11. Lahl, K., Sparwasser, T., 2011. In vivo depletion of FoxP3+ Tregs using the DEREK mouse model. *Methods in molecular biology* 707:157-72.
12. Klages, K., Mayer, CT., Lahl, K., Loddenkemper, C., Teng, MW., Ngiow, SF., et al., 2010. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. *Cancer research*;70(20):7788-99.
13. Nimmerjahn, F., Ravetch, JV., 2005. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* ;310(5753):1510-2.
14. Kim, JM., Ashkenazi, A., 2013. Fcγ receptors enable anticancer action of proapoptotic and immune-modulatory antibodies. *The Journal of experimental medicine* ;210(9):1647-51.
15. Thiruppathi, M., Sheng, JR., Li, L., Prabhakar, BS., Meriggioli, MN., Recombinant IgG2a Fc (M045) multimers effectively suppress experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Autoimmun* 2014 Aug;52:64-73.
16. Schuurhuis, DH., Ioan-Facsinay, A., Nagelkerken, B., van Schip, JJ., Sedlik, C., Melief, CJ., et al., 2002. Antigen-antibody immune complexes empower dendritic cells to efficiently prime specific CD8+ CTL responses in vivo. *Journal of immunology*;168(5):2240-6.
17. Schuurhuis, DH., van Montfoort, N., Ioan-Facsinay, A., Jiawan, R., Camps, M., Nouta, J., et al., 2006. Immune complex-loaded dendritic cells are superior to soluble immune complexes as antitumor vaccine. *Journal of immunology*;176(8):4573-80.
18. Mousavi Niri, N., Memarnejadian, A., Hadjati, J., Aghasadeghi, MR., et al. Construction and Production of Foxp3-Fc (IgG) DNA Vaccine/Fusion Protein: Avicenna *J Med Biotechnol.* 2016 Apr-Jun;8(2):57-64.
19. Fioretti, D., Iurescia, S., Fazio, VM., Rinaldi, M ;2010. DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *BioMed Research International.*
20. Abdulhaqq, SA., Weiner, DB., 2008. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunologic research*;42(1-3):219-32.

21. Rice, J., Ottensmeier, CH., Stevenson, FK., 2008. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nature Reviews Cancer*;8(2):108-20.
22. Akbari ,O., Panjwani, N., Garcia ,S.,Tascon ,R., Lowrie ,D.,Stockinger, B., 1999. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *The Journal of experimental medicine*;189.
23. Watts, C., 1997.Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annual review of immunology*;15(1):821-50.
24. You, Z., Huang ,X., Hester ,J., Toh, HC., Chen ,SY., 2001 .Targeting dendritic cells to enhance DNA vaccine potency. *Cancer Res*;61(9):3704-11.
25. Boyle, J., Brady, J., Lew, A., 1998. Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature*;392(6674):408-11.
26. Deliyannis, G., Boyle ,JS., Brady, JL., Brown, LE., Lew, AM., 2000 .A fusion DNA vaccine that targets antigen-presenting cells increases protection from viral challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences*;97(12):6676-80.
27. Niri, NM., Hadjati, J., Sadat, M., Memarnejadian, A., Aghasadeghi, M., Akbarzadeh, A., Zarghami, N., Inducing Humoral Immune Responses Against Regulatory T Cells by Foxp3-Fc(IgG) Fusion Protein. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2015;34(6):381-5.
28. Mousavi Niri, N., Memarnejadian, A., Pilehvar-Soltanahmadi, Y., Agha Sadeghi, M., Mahdavi, M., Kheshtchin, N., Arab, S., et al. Improved Anti-Treg Vaccination Targeting Foxp3 Efficiently Decreases Regulatory T Cells in Mice. *J Immunother*. 2016 Sep;39(7):269-75.