

ارزیابی ایمنی زایی Nef-MPER-V3 ویروس HIV-1 واجد پپتید نفوذپذیر کننده سلولی BALB/c در موش LDP12

نویسندگان:

سحر صباغ زاده^۱، فاطمه روح اله^۲، سید مهدی سادات^{۳*}، اعظم بوالحسنی^۴

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 ۲- استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 ۳- دانشیار بخش هیاتیت، ایدز و ویروس‌ها منتقله از خون، انستیتو پاستور، تهران، ایران
 ۴- استاد بخش هیاتیت، ایدز و ویروس‌ها منتقله از خون، انستیتو پاستور، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.18, No.3, Fall 2020

چکیده:

مقدمه: برخلاف موفقیت‌های به دست آمده در زمینه تولید داروهای ضدویروسی، در حال حاضر هیچ گونه واکسن موثری علیه ویروس HIV شناسایی نشده است. دستیابی به یک واکسن موثر بر علیه این ویروس، نیازمند پاسخ ایمنی قوی همورال و سلولی است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی ایمنی زایی پروتئین نوترکیب LDP12-Nef-MPER-V3 در موش BALB/c در راستای القای پاسخ‌های موثر بود.

روش کار: در مطالعه حاضر، به منظور ایمنی زایی از ۵۵ موش ماده در ۱۱ گروه پنج تایی استفاده شد. تزریق‌ها سه مرتبه با فاصله زمانی سه هفته به صورت زیر جلدی انجام شد. دو هفته بعد از آخرین تزریق، پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی به ترتیب در سرم و سلول‌های طحال موش‌ها با استفاده از روش الایزا سنجیده شد. در نهایت داده‌ها با آزمون من-وینینی یو ارزیابی شدند.

یافته‌ها: اگرچه میزان ترشح آنتی‌بادی اختصاصی با تیتراسیون‌های مختلف در تمامی گروه‌های اصلی مشاهده شده است، ولی تیتراژ آنتی‌بادی در گروه‌های دریافت کننده آنتی‌ژن واجد پپتید LDP12 به همراه ادجوانت نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ($p=0.045$). همچنین، ایزوتایپ غالب در گروه ایمن شده با LDP12 به همراه Hsp27 از نوع IgG2a (شاخص تحریک پاسخ Th1) بود.

نتیجه‌گیری: داده‌های پژوهش حاضر بیانگر قابلیت القای تحریک سیستم ایمنی توسط رژیم تزریقی LDP12-Nef-MPER-V3 به همراه ادجوانت Hp91 است که امکان دستیابی به یک واکسن موثر بر علیه HIV را فراهم می‌کند.

واژگان کلیدی: واکسن، HIV-1، LDP12، ایمنی‌زایی، BALB/c، Nef-MPER-V3

Pars J Med Sci 2020;18(3):32-42

مقدمه:

چالش خطرناک امری حیاتی است [۱]. برخلاف موفقیت‌هایی که در زمینه تولید و مصرف داروهای ضدویروسی مشاهده می‌شود، در حال حاضر هیچ گونه واکسن موثری علیه ویروس HIV شناسایی نشده است. پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی برای مقابله با عفونت این ویروس ضروری هستند. با این حال، به نظر می‌رسد القای پاسخ‌های ایمنی همورال علیه ویروس مذکور مقداری زمان‌بر باشد [۲]. بنابراین، در راستای طراحی واکسنی کارآمد باید

یکی از مسائل جدال‌برانگیز دنیای امروز و یکی از الویت‌های بهداشت جهانی، مواجهه با عفونت ویروس HIV است. براساس یافته‌های سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۸، نزدیک به ۳۷/۹ میلیون نفر آلوده به این ویروس بوده‌اند که ۱/۵ میلیون نفر از آن‌ها کودک بوده‌اند. امروزه تمام کشورها با خطر اپیدمی این بیماری به عنوان چهارمین عامل مرگ و میر در دنیا روبه‌رو هستند. از این رو، دستیابی به واکسنی موثر برای مقابله با این

* نویسنده مسئول، نشانی: خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش هیاتیت، ایدز و ویروس‌های منتقله از خون، تهران، ایران.

پست الکترونیک: Mehdi_sadat@pasteur.ac.ir

تلفن تماس: ۰۲۱-۶۶۹۶۲۹۱ کد پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۲۴

اصلاح: ۱۳۹۹/۰۸/۰۸

دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۲

می‌شود و همچنین می‌توانند به عنوان اهداف جدید برای داروهای ضدایدز مورد استفاده قرار گیرند. علاوه بر این، چهار عنصر ساختاری حفاظت شده روی لوپ قرار دارند که الگویی برای تولید واکنش القا کننده آنتی‌بادی‌های cross-reactive protective ایجاد می‌کنند [۲۹]. از طرف دیگر، پپتید MPER بیست و چهار اسید آمینه حفاظت شده سمت انتهایی کربوکسیلی در اکتودومین gp41 است که شامل اپی توپ های شناسایی شده توسط ۳ تا HIV-1 broadly neutralizing monoclonal antibodies Z13, 4E10, 2F5 هستند [۳۰ و ۳۱]. این پپتید در انتقال ویروس از طریق فیوژن سلول به سلول و فیوژن ویروس به سلول نقش دارد. همچنین دیده شده است که تحریک آنتی‌بادی‌های مخاطی علیه Env می‌تواند انتقال مخاطی HIV-1 را مهار کند. به علاوه نشان داده شده است که اتصال HIV-1 به سلول‌های اپی تلیال با استفاده از یک رسپتور جایگزین صورت می‌گیرد که این برهمکنش ویروس- رسپتور توسط یک اپی توپ حفاظت شده روی gp41 مدیریت می‌شود. از آن جایی که واکنش HIV-1 MPER برای تحریک آنتی‌بادی‌های پیشگیرانه در نواحی مخاطی استفاده می‌شود، این مطالعات توانایی این واکنش را تایید می‌کند [۲۵].

دخالتهای سلول‌های T در جهت القای سلول‌های B به منظور تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده علیه HIV-1 امری ضروری است. واکنش‌های با زیرواحدهای پروتئینی معمولاً در القای پاسخ‌های ایمنی مرتبط با سلول‌های T چندان کارآمد نیستند. بنابراین، ترکیب ایمونوژن‌های Env با مولکول‌های تحریک کننده می‌تواند روشی جایگزین برای اعمال فعالیت و هدف گذاری سلول‌های B به شمار رود [۳۲]. با توجه به تولید و بررسی کارآمدی پپتید نفوذپذیر کننده سلولی LDP12 حاوی آنتی‌ژن‌های Nef-MPER-V3، هدف مطالعه حاضر بررسی ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب Nef-MPER-V3 حاوی LDP12 در مدل موشی BALB/c بوده است.

روش کار:

گروه‌های آزمون و برنامه ایمن سازی

مراحل ساخت و تایید پروتئین نوترکیب LDP12-Nef-MPER-V3 در مطالعه پیشین به طور کامل شرح داده شده است [۳۳]. به طور خلاصه، وکتور بیانی (+) pET-28a حاوی ژن مذکور در سیستم بیانی Rossetta (DE3) بیان و پروتئین نوترکیب با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شد. پروتئین نوترکیب یاد شده از بخش هیپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران تهیه شد [۳۴]. در مطالعه حاضر، به منظور ایمنی زایی توسط آنتی‌ژن اختصاصی، ۵۵ سر موش ماده با سن ۸-۶ هفته و میانگین وزنی ۲۰ کیلوگرم

به دنبال روش‌هایی برای تحریک موثر پاسخ‌های ایمنی هومورال بود. همچنین توجه به آنتی‌بادی‌های خنثی کننده در این مسیر بسیار حائز اهمیت است. از سوی دیگر، با توجه به کم شدن کارآمدی پروتئین‌های درمانی به واسطه نفوذپذیری انتخابی غشاهای سلولی، استفاده از پپتیدهای نفوذپذیر کننده سلولی (CPPs) رواج یافته است [۳]. انتقال کارآمد چندین پروتئین با استفاده از پپتیدهای نفوذپذیر کننده سلولی از میان غشای دولایه به داخل سلول گزارش شده است و شکل‌گیری اتصالاتی غیرکوالان بین محموله و پپتید نفوذپذیر کننده می‌تواند بر بسیاری از محدودیت‌های انتقال از جمله جذب اولیه کمپلکس نوترکیب به داخل وزیکول‌های اندوزومال فائق آید [۴]. در بین پپتیدهای نفوذپذیر کننده سلولی، به نظر می‌رسد که پپتیدی ۱۲ آمینواسیدی متشکل از ناحیه ای غنی از اسید آمینه لیزین و مشتق شده از کپسید پاپیلوما ویروس انسانی تحت عنوان LDP12، یکی از موثرترین پپتیدهای حمل کننده پروتئین‌های درمانی به داخل سلول‌های یوکاریوت باشد [۵، ۶]. از طرف دیگر، یکی از موثرترین کاندیدهای واکنش در القای سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی، استفاده از آنتی‌ژن Nef است. این آنتی‌ژن یک پروتئین ویروسی غیرساختاری ۲۹۶ اسید آمینه ای است که اثری مثبت روی همانندسازی ویروس داشته و در بسیاری از عملکردهای ویروسی از جمله تنظیم پایین دستی رسپتور CD4 [۷-۱۰] و مولکول‌های MHC I [۱۱ و ۱۲] به منظور تنظیم آستانه فعالیت سلول‌های T و ماکروفاژها [۱۳-۱۶] و همچنین ایجاد تغییر در مسیرهای سیگنالینگ و فعالیت سلولی به منظور القای عفونت‌زایی ویریون و آپوپتوز [۱۶-۱۸] نقشی کلیدی دارد. عملکردهای این آنتی‌ژن را می‌توان به چهار دسته کلی تقسیم‌بندی کرد: ۱- ایجاد ارتباط بین پروتئین‌های سلولی و ماشین اندوسیتوز، ۲- فعال سازی سلول‌های آلوده و رسپتورهای مهارشده، ۳- دخالت در انتقال ویروسی و ۴- در نهایت افزایش عفونت‌زایی ویروس [۱۹ و ۲۰]. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که کمپلکس تراپمیری پروتئین‌های Env ویروس HIV به علت دارا بودن توان بالقوه برای تحریک آنتی‌بادی‌های خنثی کننده از اهمیت بالایی برخوردار است [۲۴-۲۱]. از بین این پروتئین‌ها، پپتیدهای MPER و V3 برای امتزاج غشاهای ویروسی و سلولی ضروری هستند [۲۵-۲۷]. لوپ V3 ناحیه‌ای حفاظت شده روی انولوپ گلیکوپروتئین gp120 است که برهمکنش انولوپ گلیکوپروتئین gp120 با Cd4 میزبان، اولین مرحله ورود سلولی ویروس است که باعث می‌شود V3 لوپ در معرض قرار گرفته به کموکاین رسپتورهای CCR5 یا CXCR4 روی میزبان متصل شده و اکثر سلول‌های T کمکی را آلوده کند [۲۸]. بازآرایی‌های ساختاری اسید آمینه‌های تشکیل دهنده لوپ توسط ویروس برای فرار از اثر آنتی‌بادی‌های خنثی کننده استفاده

پلیت‌ها به مدت یک ساعت در 37°C انکوبه شده و پس از سه بار شستشو با بافر PBS-T، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی Goat-Anti mouse IgG-HRP به عنوان آنتی‌بادی ثانویه (با رقت ۱/۱۰۰۰۰) به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها به مدت یک ساعت دیگر در 37°C انکوبه شدند. در نهایت، پس از شستشوی نهایی با افزودن سوبسترای کروموژن TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) و ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (H_2SO_4 , 0.5 N) واکنش متوقف و میزان جذب نوری هر نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر به وسیله قرائتگر الیزا خوانده شد.

تعیین زیرکلاس‌های IgG

به منظور تعیین زیرکلاس‌های IgG مشابه آزمون قبلی، سرم موشی در رقت معین (۱:۲۰۰۰) افزوده و پس از شستشو، به هر چاهک به ترتیب آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG1 (Sigma, USA)، IgG2a، IgG2b در دمای اتاق و به مدت ۳۰ دقیقه و پس از آن آنتی‌بادی Goat Anti-Mouse IgG-HRP (با رقت ۱:۱۰۰۰۰) افزوده شد. در نهایت میزان جذب نوری هر نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط قرائتگر الیزا خوانده شد.

ارزیابی ترشح سایتوکاین‌های IFN- γ و IL-10

به منظور سنجش سایتوکاین‌های اینترلوکین ۱۰ (IL-10) و اینترفرون گاما (IFN- γ)، سلول‌های طحال موش‌ها به صورت مجزا در پلیت‌های کشت سلولی ۲۴ خانه‌ای به تعداد 2×10^6 در یک میلی‌لیتر محیط RPMI-1640 کامل کشت داده شدند. سلول‌های مذکور با استفاده از پپتیدهای Nef، MPER و V3 با غلظت نهایی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در دمای 37°C و در حضور ۵٪ CO_2 به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. سپس سوپ رویی کشت سلول‌ها جمع‌آوری و با استفاده از کیت‌های IFN- γ و IL-10 موشی (MabTech, Sweden) و براساس پروتکل شرکت سازنده سنجش شدند.

بررسی و تجزیه تحلیل داده‌ها

تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون‌های من‌ویتنی روی متغیرهای مقدار آنتی‌بادی تولیدی و ترشح سایتوکاین‌ها انجام شد. کلیه آزمون‌ها سه بار تکرار شدند. مقدار $p < 0.05$ معنادار آماری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

ایجاد پاسخ همورال اختصاصی

در مطالعه ایمنی همورال از طریق تعیین تیتراژ تولید آنتی‌بادی کل و ایزوتوپ‌های IgG، در تمامی گروه‌های اصلی نسبت به گروه

بر اساس آیین نامه اخلاق کار با حیوانات و پس از تایید در کمیته اخلاق پزشکی انستیتو پاستور ایران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران (IR.IAU.PS.REC.1398.004)، بررسی شدند. موش‌ها به ۱۱ گروه پنج تایی تقسیم شدند. تزریق‌ها سه بار با فاصله سه هفته‌ای و به صورت زیر جلدی به مقدار نهایی ۱۰۰ میکرولیتر به ازای هر موش انجام گرفت (جدول ۱). در برنامه ایمنی زایی، میزان پروتئین تزریقی ۵ میکروگرم به ازای هر موش در هر تزریق و میزان ۱۰ میکروگرم از ادجوانت‌های HSP27 و HP91 بود. همچنین برای آماده‌سازی آنتی‌ژن با مخلوط ادجوانت فرزند نسبت ۱:۱ استفاده شد و سپس مخلوط ادجوانت با آنتی‌ژن از طریق ورتکس کردن همگن‌سازی شد. دو هفته پس از آخرین تزریق، خون‌گیری از سینوس چشمی موش‌ها انجام و سرم‌ها در شرایط -20°C درجه سانتیگراد برای انجام آزمون‌های نهایی نگهداری شدند.

جداسازی و تخلیص سلول‌های طحال موش‌ها

جداسازی سلول‌های طحال بر اساس پروتکل‌های موجود با اندکی اصلاح در راستای بهینه‌سازی انجام شد. موش‌های ایمن شده پس از بی‌هوشی با قطع نخاع شان کشته و پس از غوطه‌وری در الکل ۷۰ درصد، طحال آن‌ها در شرایط استریل جداسازی شد. بافت طحال پس از هموژن شدن در محلول بافر PBS IX به مدت ۵ دقیقه در دمای 4°C و دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل، ۱۰ میلی‌لیتر بافر لیز کننده گلبول قرمز اضافه شد. سپس به مخلوط پس از ۵ دقیقه انکوبه شدن در دمای 4°C و در تاریکی، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI (RPMI-1640, Sigma, Aldrich) برای خنثی‌سازی اثر بافر لیزکننده اضافه شد و پس از چند بار سرو ته کردن فالكون‌ها مطابق شرایط قبل، سانتریفیوژ انجام شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب باقی مانده، ۱ میلی‌لیتر محیط کامل RPMI اضافه و رسوب سلولی در آن حل شد و بار دیگر به ظرف یخ انتقال داده شدند. در نهایت سلول‌ها با استفاده از لام نتوبار شمارش شدند [۳۵].

بررسی القای پاسخ همورال (IgG) به روش الیزا

به منظور بررسی میزان تولید آنتی‌بادی اختصاصی ضد Nef-MPER-V3، ابتدا کف پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مخصوص الیزا (Nunk, Denmark) توسط پروتئین نوترکیب با غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و براساس پروتکل استاندارد [۳۵] پوشانده شد و پس از شست و شو و بلاک کردن با ۱٪ BSA، سرم موش‌ها به نسبت ۱/۱۰۰۰ توسط بافر رقیق‌کننده آنتی‌بادی، رقیق شده و به عنوان اولین آنتی‌بادی به پلیت‌ها افزوده شد. سپس

که در شکل ۳ دیده می‌شود، در گروه ایمن شده با LDP12-Nef-MPER-V3 به همراه ادجوانت Hp91 افزایش چشمگیر ترشح IFN- γ نسبت به سایر گروه‌ها دیده شده است (۱۱۰ pg/ml). این میزان ترشح در مقایسه با گروه کنترل (Nef-MPER-V3) تفاوت معناداری در ترشح سایتوکاین به میزان $p=0.005$ را نشان داده است. در مقابل، در گروه ایمن شده با پروتئین حاوی LDP12 به همراه ادجوانت Hsp27 میزان تولید سایتوکاین IFN- γ نیز افزایش چشمگیری داشته، ولی در مقایسه با گروه ایمن شده با ادجوانت Hp91 از شدت کمتری برخوردار است ($p=0.034$). در مقایسه با بیان و تولید IFN- γ در گروه‌هایی که میزان ترشح این سایتوکاین بالا بود، میزان تولید IL-10 (شاخص پاسخ Th2 و ایمنی هومورال) پایین بوده است. همچنین در مورد گروه با بالاترین میزان پاسخ سلولی (LDP12-Nef-MPER-V3+Hp91)، میزان ترشح سایتوکاین IL-10 به پایین‌ترین میزان خود یعنی حدود ۱۰۰ pg/ml رسیده، در حالی که نسبت ترشح IFN- γ /IL-10 در این گروه به حدود ۱۱ می‌رسد ($P=0.006$). داده‌های حاصل نشان دادند که با وجود تولید آنتی‌بادی، میزان تحریک پاسخ ایمنی سلولی به مراتب بیشتر از ایمنی هومورال بوده است (شکل ۳).

کنترل، تولید آنتی‌بادی اختصاصی با تیتراسیون‌های مختلف مشاهده شد. میزان تولید آنتی‌بادی کل در گروه‌هایی که پپتید نفوذپذیر کننده سلولی LDP12 دریافت کرده و با ادجوانت ایمن شده بودند نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ($P<0.042$). در بین فرمولاسیون‌های دارای آنتی‌ژن حاوی پپتید نفوذکننده، فرمول حاوی ادجوانت Hp91 بیشترین میزان اختلاف معنادار با سایر فرمولاسیون‌های حاوی ادجوانت Hsp27 دارا بود (شکل ۱). همچنین، ایزوتایپ غالب در گروه ایمن شده با LDP12 به همراه ادجوانت Hsp27 از نوع IgG2a (شاخص تحریک پاسخ Th1) و بعد از آن ایزوتایپ IgG1 بود ($P=0.003$). در مقابل، در گروهی که آنتی‌ژن به تنهایی و بدون پپتید نفوذپذیر کننده سلولی ولی همراه با ادجوانت Hsp27 تزریق شده بود، میزان IgG1 (شاخص تحریک پاسخ Th2) افزایش یافته و اختلاف معناداری از نظر تیتراژ با میزان IgG2b ($p=0.002$) در همین گروه داشت (شکل ۲).

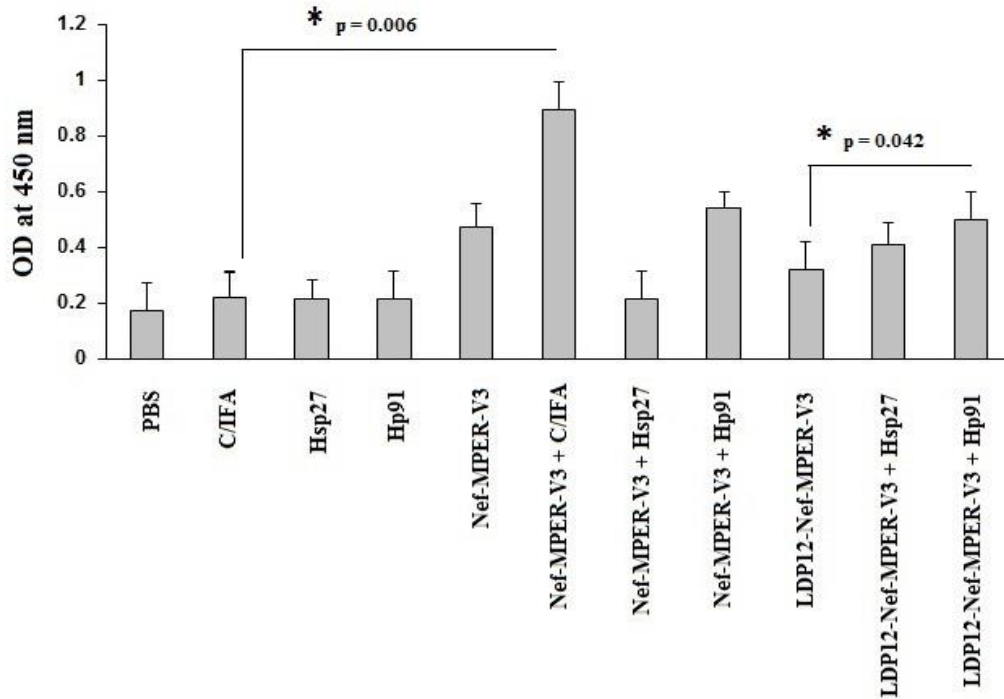
تولید سایتوکاین‌های اختصاصی IFN- γ و IL-10

در بررسی میزان تولید سایتوکاین‌ها، میزان ترشح و تولید IFN- γ وابسته به میزان القای پاسخ ایمنی سلولی (پاسخ تحریک Th1) و ایزوتایپ‌های مرتبط از جمله IgG2a و IgG2b دارد. همان گونه

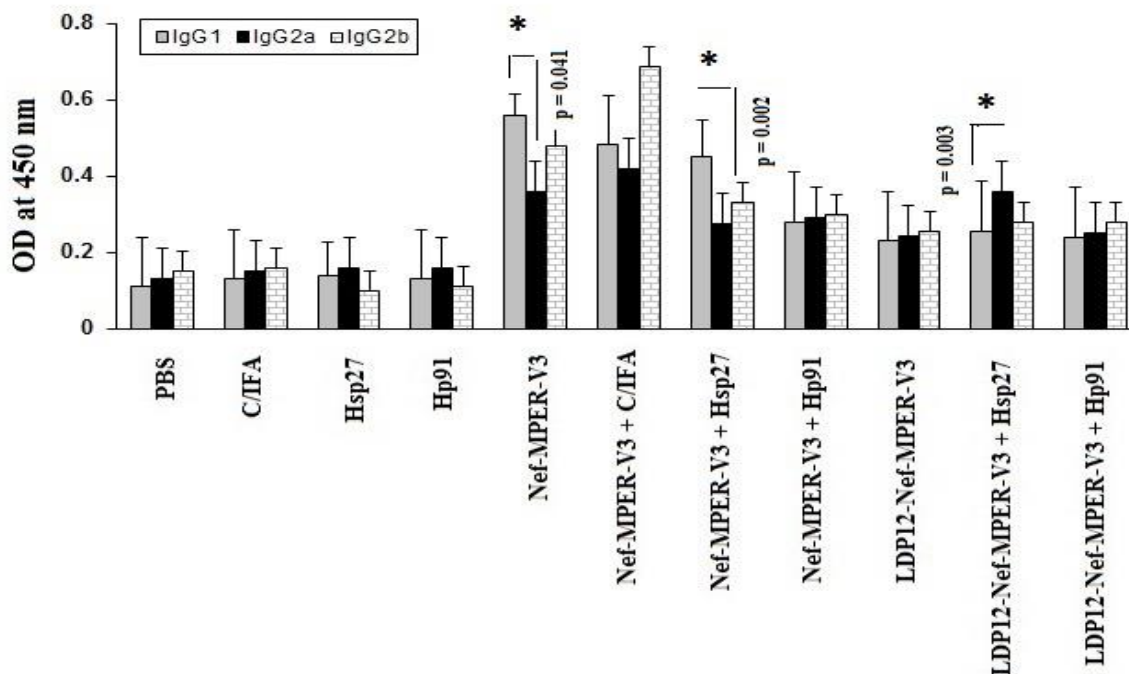
جدول ۱: برنامه ایمن سازی گروه‌های مختلف موشی

| نام گروه | تزریق اول | تزریق دوم (یادآور ۱) | تزریق سوم (یادآور ۲) |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| کنترل (PBS*) | PBS | PBS | PBS |
| کنترل (C/IFA**) | فروند کامل (CFA) | فروند ناقص (IFA) | فروند ناقص (IFA) |
| کنترل Hsp27*** | Hsp27 | Hsp27 | Hsp27 |
| کنترل Hp91**** | Hp91 | Hp91 | Hp91 |
| Nef-MPER-V3 | Nef-MPER-V3 | Nef-MPER-V3 | Nef-MPER-V3 |
| Nef-MPER-V3+C/IFA | Nef-MPER-V3+CFA | Nef-MPER-V3+IFA | Nef-MPER-V3+IFA |
| Nef-MPER-V3+Hsp27 | Nef-MPER-V3+Hsp27 | Nef-MPER-V3+Hsp27 | Nef-MPER-V3+Hsp27 |
| Nef-MPER-V3+Hp91 | Nef-MPER-V3+Hp91 | Nef-MPER-V3+Hp91 | Nef-MPER-V3+Hp91 |
| LDP12-Nef-MPER-V3 | LDP12-Nef-MPER-V3 | LDP12-Nef-MPER-V3 | LDP12-Nef-MPER-V3 |
| LDP12-Nef-MPER-V3+Hsp27 | LDP12-Nef-MPER-V3+Hsp27 | LDP12-Nef-MPER-V3+Hsp27 | LDP12-Nef-MPER-V3+Hsp27 |
| LDP12-Nef-MPER-V3+Hp91 | LDP12-Nef-MPER-V3+Hp91 | LDP12-Nef-MPER-V3+Hp91 | LDP12-Nef-MPER-V3+Hp91 |

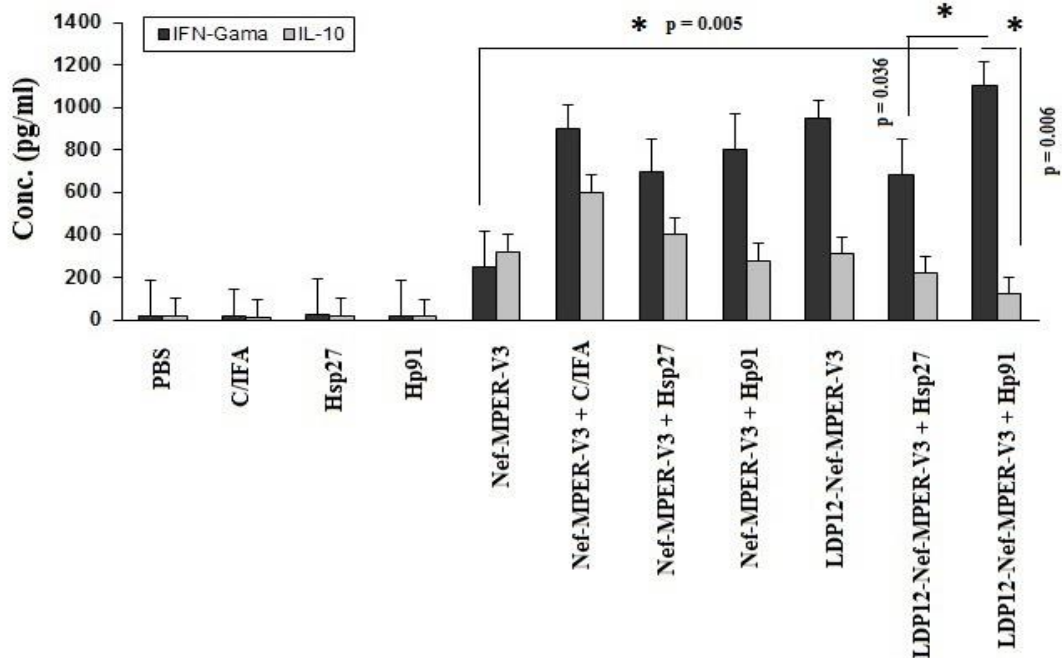
* بافر فسفات سالین، ادجوانت، ** کامل و ناقص فروند، *** ادجوانت پروتئین شوک حرارتی ۲۷، **** ادجوانت ۹۱ peptide derived HMGB1



شکل ۱: آنالیز Total IgG (پاسخ همورال) در گروه های موشی ایمن شده با فرمولاسیون های مختلف به روش الیزا. میزان جذب نوری (O.D) در ۴۵۰ نانومتر از سرم های موش های ایمن شده با رقت ۱:۱۰۰۰ که با حروف اختصاصی نمایش داده شده است (رجوع به جدول ۱) مورد سنجش قرار گرفتند. تمامی تست ها بصورت تکرار سه تایی و با در نظر گرفتن SD (انحراف معیار) نمایش داده شده اند. علامت * بیانگر اختلاف معنادار ($p < 0.05$) می باشد.



شکل ۲: تعیین ایزوتایپ های اختصاصی IgG در گروه های موشی ایمن شده با فرمولاسیون های مختلف به روش الیزا. میزان جذب نوری (O.D) در ۴۵۰ نانومتر از سرم های موش های ایمن شده با رقت ۱:۱۰۰۰ که با حروف اختصاصی نمایش داده شده است (رجوع به جدول ۱) مورد سنجش قرار گرفتند. تمامی تست ها بصورت تکرار سه تایی و با در نظر گرفتن SD (انحراف معیار) نمایش داده شده اند. علامت * بیانگر اختلاف معنادار ($p < 0.05$) می باشد.



شکل ۳: بررسی میزان ترشح سایتوکاین های $IFN-\gamma$ و IL-10 در گروه های موشی ایمن شده. پس از ایمن سازی گروه های موشی، سلول های طحال به وسیله پروتئین NEF-MPER-V3 با غلظت $10 \mu M$ تحریک و به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. ارزیابی سایتوکاین ها بر اساس کیت اختصاصی و بر حسب pg/ml در سوپ کشت سلولی با تکرار سه تایی نمایش داده شده است. علامت * بیانگر اختلاف معنادار ($p < 0.05$) می باشد.

آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده فراهم شود. وجود تیترا بالای از این آنتی‌بادی‌ها در بدن میزبان قبل از مواجهه با ویروس منجر به مهار ویروس و عفونت می‌شود [۳۹]. با توجه به نفوذپذیری ضعیف غشاهای سلولی و خاصیت ایمونونسیسته پایین پروتئین‌های نوترکیب درمانی به تنهایی، استفاده از پپتیدهای نفوذپذیر کننده سلولی (CPPs) می‌تواند موثر واقع شود. این گروه از پپتیدها سبب عبور پروتئین‌های نوترکیب درمانی به صورت کارآمد در عرض چند دقیقه و با کمترین سمیت از بین غشاهای سلولی می‌شوند [۴۰]. در این میان، در اثبات توانایی پپتید نفوذپذیر کننده LDP12 می‌توان به مطالعات متفاوتی اشاره کرد. توانایی این پپتید ۱۲ آمینواسیدی و مشتق شده از پروتئین L1 کپسید پاپیلوماویروس انسانی در انتقال محموله پروتئینی LDP12-FITC به درون لومن رحمی موش [۵] و همچنین انتقال پروتئین نوترکیب LDP12-EGFP-LC3 به درون رده سلولی HeLa و بلاستوسیت‌های موشی از طریق اندوسیتوز و بدون نیاز به رسپتورها و ترانسپورترها اثبات شده است [۴۱]. از سوی دیگر، گزینش اپی‌توپ‌های موثر تحت عنوان واکسن می‌تواند در راستای کنترل عفونت مفید واقع شود. بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که ایمونوژن‌های پلی‌اپی‌توپیک می‌توانند هر دو پاسخ‌های ایمنی $TCD4+$ و $TCD8+$ را علیه ویروس HIV القا کنند. همچنین در گروه‌های موشی ایمن شده با آنتی‌ژن‌های پلی‌اپی‌توپیک، میزان

بحث:

از آن جایی که کارآمدی استفاده از پروتئین‌های نوترکیب درمانی به واسطه محدودیت در نفوذپذیری غشاهای سلولی تحت تاثیر قرار می‌گیرد، کاربرد پپتیدهای نفوذپذیر کننده سلولی در حال افزایش است. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر پپتید نفوذپذیر کننده سلولی LDP12 بر انتقال موثر پروتئین نوترکیب Nef-MPER-V3 به داخل سلول‌های یوکاریوت و بررسی ایمنی‌زایی آن در مدل موشی BALB/c با هدف تحریک پاسخ‌های ایمنی قوی و تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده انجام شد. با وجود موفقیت‌هایی که درمان‌های ضد رتروویروسی نشان داده‌اند، تا کنون هیچ گونه واکسن پیشگیری کننده و یا درمان موثری علیه این بیماری ساخته نشده است [۳۶].

در سال ۲۰۱۱ پژوهشگران دریافتند که هم پاسخ‌های ایمنی آنتی‌بادی و هم پاسخ‌های ایمنی سلولی در مناطق موکوسی برای پیشگیری از ابتلا به عفونت HIV ضروری هستند [۳۷]. بر اساس مطالعات انجام شده روی پریمات‌ها مشخص شد که Env فاکتوری ضروری برای تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه هر دو تیپ HIV-1 و HIV-2 است که ممکن است عفونت HIV-1 را از طریق سازوکارهای غیر خنثی‌کنندگی نیز مهار کند [۳۸]. بنابراین، به نظر می‌رسد در پژوهش‌های مرتبط با واکسن HIV-1 باید روی تولید مناطق ایمونوژن از Env متمرکز شده تا توانایی تولید

نوع IgG1، IgG2a و نیز IgM به همراه سایتوکاین‌های γ -IFN و IL-2 می‌باشند که این نتایج در درجه اول پاسخ Th1 را نشان می‌دهند [۴۹]. بنابراین، به نظر می‌رسد پاسخ‌های TCD4+ در عفونت مزمن HIV بسیار با اهمیت‌تر هستند و تنها در حضور پاسخ TCD4+ است که پاسخ TCD8+ ایجاد می‌شود [۵۰]. در راستای سنجش میزان آنتی‌بادی‌های اختصاصی سرمی (IgG1, IgG2) به عنوان شاخص تحریک ایمنی هومورال و میزان سایتوکاین‌های γ -IFN و IL-10 به عنوان شاخص تحریک ایمنی سلولی مشخص شد که تولید واکسن کاندید Nef-MPER-V3 در القای تیترا قابل قبولی از آنتی‌بادی‌ها و نیز القای پاسخ‌های سلولی موثر واقع شده است. IgG1 و IgG2 به ترتیب مشخص کننده پاسخ‌های Th2 و Th1 بوده و ساب تایپ‌های 2a و 2b حاصل سوئچینگ پاسخ Th1 هستند. تحلیل و بررسی شکل ۱ بیان می‌کند که تیترا آنتی‌بادی تولیدی در صورت استفاده از کاندید واکسن Nef-MPER-V3 افزایش چشمگیری داشته و در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان داده است. همچنین در راستای نتایج، مشخص شد که تیمار مدل حیوانی با کاندید واکسن مورد نظر که فرمولاسیون آن به همراه ادجوانت فروند بوده، پاسخ بهتری نسبت به سایر گروه‌ها داشته است. از طرفی، تایید شد در بین کاندید واکسن‌ها با فرمولاسیون LDP12 بالاترین تیترا آنتی‌بادی متعلق به گروه موشی بود که با ادجوانت Hsp27 ایمن شده بودند.

نتایج به دست آمده از ارزیابی نسبت آنتی‌بادی‌های اختصاصی نشان می‌دهد در گروه‌هایی که تزریق Nef-MPER-V3 و Nef- نشان می‌دهند در ترتیب بالاترین میزان تیترا آنتی‌بادی از نوع IgG1 بوده و از آن جایی که این تایپ آنتی‌بادی حاصل تحریک و فعالیت Th2 است، بنابراین، نمایانگر القای ایمنی هومورال است. همچنین در گروه‌های دریافت کننده آنتی‌ژن نو ترکیب مذکور که با پپتید نفوذپذیر کننده سلولی همراه شده بودند، بیشترین میزان تیترا آنتی‌بادی مربوط به IgG2 است، بنابراین، کاندید واکسن‌هایی که با LDP12 فرموله شده‌اند، قابلیت القای همزمان پاسخ ایمنی سلولی را دارند.

در این میان، میزان بیان سایتوکاین γ -IFN به عنوان شاخص پاسخ Th1 و فعالیت ایمنی سلولی و میزان بیان سایتوکاین IL-10 به عنوان شاخص پاسخ Th2 و فعالیت ایمنی هومورال ارزیابی شدند [۳۹]. نتایج شکل ۳ نشان می‌دهد که در تحریک پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌های T، واکسن کاندید Nef-LDP12-MPER-V3 بالاترین میزان γ -IFN را با تیترا بالاتر از 1100 pg/ml نسبت به سایر گروه‌ها تولید کرده است. همچنین بالاترین مقدار IL-10 نسبت به γ -IFN زمانی اتفاق افتاده است که از آنتی‌ژن Nef-MPER-V3 به تنهایی استفاده شده است.

سایتوکاین‌های γ -IFN و IL-2 ترشح شده از لنفوسیت‌های T افزایش چشمگیری داشته است [۴۲].

در این مطالعه اهداف آنتی‌ژنیک نواحی Nef، MPER، V3 و مد نظر بود. ناتوانی در تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده علیه HIV-1 یکی از موانع اصلی پیش روی ساخت واکسن‌های کارآمد است [۴۳]. در سال ۲۰۰۷ لی و همکاران با بررسی سرم افراد مبتلا به HIV-1، وجود آنتی‌بادی‌های خنثی کننده را علیه ناحیه حفاظت شده، عملکردی و متصل شونده به CD4 در منطقه gp120 نشان دادند که قادر به خنثی‌سازی ویروس‌های مقاوم به IgG1 b12 (مونوکلونال آنتی‌بادی علیه ناحیه متصل شونده به CD4) بودند. چندین ناحیه عملکردی و حفاظت شده از پروتئین Env به عنوان اهدافی بالقوه برای آنتی‌بادی‌های خنثی کننده معرفی شدند. این اهداف شامل نواحی متصل شونده به رسپتور CD4 و کموکاین رسپتورها است که هم روی منطقه gp120 HIV-1 و هم روی ناحیه‌ای از HIV-1 gp41 قرار دارند. این ناحیه شامل ۲۰ تا ۳۰ اسید آمینه‌ای به شدت حفاظت شده بوده و در فیوزن ویروس به سلول هدف نقش به سزایی دارد. این ناحیه از gp41، MPER نامیده می‌شود و سه نوع مونوکلونال آنتی‌بادی 2F5، Z13 و 4E10 علیه آن شناخته شده است [۴۴]. آنتی‌بادی‌های ذکر شده علیه این ناحیه هیدروفوبیک از gp41 دارای واکنشی متقابل با بخش‌های لیپیدی غشاهای سلولی انسانی بوده که این فرضیه را قوت می‌بخشد که سلول‌های B ترشح کننده این آنتی‌بادی‌ها از نوع خود واکنشی بوده و در حین تمایزات از بین می‌روند. بنابراین، واقعیتی را نمایان می‌سازد که اپی‌توپ‌های حفاظت شده درون این ناحیه از Env ایمونوژنیک هستند [۴۵]. از طرف دیگر، دو نوع مونوکلونال آنتی‌بادی خنثی کننده نیز علیه ناحیه gp120 به نام‌های 2G12 و IgG1 b12 شناسایی شده است [۴۶]. از آن جایی که لوپ V3 در تروپیسیم بافتی HIV، القای Syncytia و خنثی کنندگی آنتی‌بادی‌ای دخالت داشته و حاوی اپی‌توپ‌های سلول‌های B و نیز CTL می‌باشد، انتظار می‌رود که میزان anti-V3 در گروه‌های موشی BALB/c و C57/BL6 افزایش قابل توجهی داشته باشد [۴۶]. لوپ ذکر شده تحت عنوان تعیین کننده اصلی خنثی کنندگی (PND) نیز نامیده می‌شود. این بدان دلیل است که حذف آن، فعال‌سازی آنتی‌بادی‌های خنثی کننده را مهار می‌کند [۴۷]. مطالعات نشان داده‌اند که تمام آنتی‌بادی‌های ذکر شده بالاترین میزان خنثی کنندگی را داشته و همچنین دارای اتصال برگشت‌ناپذیر هستند [۳۹]. از طرفی دیگر، مطالعات *in vitro* و *in vivo* نشان دادند که Nef برای تولید واکسن‌های درمانی HIV هدفی بسیار موثر است [۴۸]. در راستای مطالعات ویگز و همکاران در سال ۱۹۹۷ و با بررسی ایزوتایپ‌های آنتی‌بادی می‌توان گفت که پاسخ‌های آنتی‌بادی‌ای علیه Nef از

نتیجه گیری:

نتایج پژوهش حاضر بیانگر آن است که آنتی ژن LDP12-Nef-MPER-V3 قابلیت تحریک سیستم همورال و سلولی را در موش‌های ایمن شده، چه به تنهایی و چه به صورت فرموله شده با ادجوانت‌ها دارد. همچنین در فرمولاسیون‌های مختلف مورد ارزیابی، استفاده از ادجوانت Hp91 در افزایش تحریک ایمنی سلولی در موش‌ها موثر بوده و این امیدواری وجود دارد تا با استفاده از فرمولاسیون‌های دیگر و مطالعات گسترده‌تر در مدل‌های حیوانی دیگر به یک واکسن موثر بر علیه HIV دست یافت.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل بخشی از رساله دکتری تخصصی مورد حمایت مالی طرح پژوهشی ۸۳۲ انسیتیتو پاستور ایران است.

تعارض منافع:

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

تزریق فرمولاسیون مذکور، تیترا سیتوکاین IL-10 را به حدود بالاتر از ۳۰۰ pg/ml رسانده و از آن جایی که IL-10 سیتوکاینی است که توسط سلول‌های Th2، CD4+، مونوسیت‌ها و ماست سل‌های فعال شده تولید می‌شود، بنابراین، فرمولاسیون Nef-MPER-V3 به سمت القای ایمنی همورال گرایش دارد. همچنین استفاده از ادجوانت‌های فروند، Hsp27 و Hp91 نیز در ایجاد نوع پاسخ‌های ایمنی اثر متفاوتی داشتند، به گونه‌ای که Hp91 و سپس فروند قابلیت ایمنی‌زایی بالاتری را نشان دادند که بیانگر ارزیابی تفاوت اثر ادجوانت‌ها می‌تواند عامل مهمی در فرمولاسیون واکسن‌ها باشد.

در مطالعه حاضر نیز تزریق آنتی‌ژن هدف همراه با پپتید نفوذپذیر کننده سلولی، توانایی بالاتری در تحریک IFN- γ نشان داد. تولید این سیتوکاین نمایانگر تحریک فعالیت ماکروفاژها در هر دو گروه پاسخ‌های ایمنی ذاتی و سلولی آدپتیو است. بنابراین، همان طور مشخص است افزایش ترشح IL-10 در فرمولاسیون‌های غیرمرتبط با LDP12، اثری افزایشی در عمل وابسته به ماکروفاژها دارد، در حالی که کاهش ترشح IL-10 در فرمولاسیون‌های مرتبط با LDP12، اثری افزایشی در روند وابسته به IFN- γ دارا می‌باشد. از این رو، میزان تاثیر فرمولاسیون در پاسخ ایجاد شده نیز قابل تامل است.

References:

- UNAIDS, 2019. Global HIV & AIDS statistics. <http://www.unaids.org/en/resources/factsheet>.
- Burton DR, Mascola JR. Antibody responses to envelope glycoproteins in HIV-1 infection. *Nat Immunol*. 2015; 16(6): 571-576.
- Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 2001; 19: 1173-1176.
- Bolhassani A, Jafarzade BS, Mardani G. *In vitro* and *in vivo* delivery of therapeutic proteins using cell penetrating peptides. *Pept*. 2016; 16: 1-46.
- Lee JE, Lim HJ. LDP12, a novel cell-permeable peptide derived from L1 capsid protein of the human papillomavirus. *Mol Biol Rep*. 2012; 39:1079-1086.
- Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, Wagner D, Phung P, Goss JL, et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Sci*. 2009; 326 (5950): 285-9.
- Lai RPJ, Yan J, Heeney J, McClure MO, Goettlinger H, Luban J, et al. Nef Decreases HIV-1 Sensitivity to Neutralizing Antibodies that Target the Membrane-proximal External Region of TMgp41. *PLoS Pathog*. 2011; 7(12): 1-15.
- Garcia JV, Miller AD. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nat*. 1991; 350: 508-511.
- Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membraneproximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*. 1994; 76(5): 853-864.
- Piguet V, Gu F, Foti M, Demareux N, Gruenberg J, Carpentier JL, et al. Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. *Cell*. 1999; 97(1): 63-73.
- Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med*. 1996; 2(3): 338-342.
- Blagoveshchenskaya AD, Thomas L, Feliciangeli SF, Hung CH, Thomas G. HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell*. 2002; 111(6): 853-866.
- Baur AS, Sawai ET, Dazin P, Fantl WJ, Cheng-Mayer C, Peterlin BM. HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity*. 1994; 1(5): 373-384.
- Schrager JA, Marsh JW. HIV-1 Nef increases T cell activation in a stimulus-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(14): 8167-8172.
- Alexander L, Du Z, Rosenzweig M, Jung JU, Desrosiers RC. A role for natural simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type1 nef alleles in lymphocyte activation. *J Virol*. 1997; 71(8): 6094-6099.
- Simmons A, Aluvihare V, McMichael A. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating

- single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity*. 2001; 14(6): 763-777.
17. Foster JL, Garcia JV. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology*. 2008 ;84(5):1-13.
 18. Geyer M, Fackler OT, Peterlin BM. Structure-function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep*. 2001; 2(7): 580-85.
 19. Laguette, N. Bregnard, Ch. Benichou, S. Basmaciogullari, S. Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Mol aspects Med*. 2010; 31(5):418-433.
 20. Lindwasser, OW. Chaudhuri, R. Bonifacino, JS. Mechanisms of CD4 downregulation by the Nef and Vpu proteins of primate immunodeficiency viruses. *Curr Mol Med*. 2007; 7(2):171-184.
 21. Visciano ML, Diomede L, Tagliamonte M, Tornesello ML, Asti V, Bomsel M, et al. Generation of HIV-1 virus-like particles expressing different HIV-1 glycoproteins. *Vaccine*. 2011; 29(31): 4903-12.
 22. Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, Wagner D, Phung P, Goss JL, et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target *Sci*. 2009; 326 (5950): 285-9.
 23. Gorny MK, Williams C, Volsky B, Revesz K, Wang XH, Burda S, et al. Cross-clade neutralizing activity of human anti-V3 monoclonal antibodies derived from the cells of individuals infected with non-B clades of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol*. 2006; 80 (14):6865-72.
 24. Corti D, Langedijk JP, Hinz A, Seaman MS, Vanzetta F, Fernandez-Rodriguez BM, et al. Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS One*. 2010; 5(1): e8805.
 25. Montero M, Houten NEV, Wang X, Scott JK. The Membrane-Proximal External Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope: Dominant Site of Antibody Neutralization and Target for Vaccine Design. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008; 72(1): 54-84.
 26. Munoz-Barroso I, Salzwedel K, Hunter E, Blumenthal R. Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J. Virol*. 1999; 73(7): 6089-6092.
 27. Salzwedel K, West JT, Hunter E. A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J. Virol*. 1999; 73(3): 2469-2480.
 28. Sirois, S. Sing, T. Chou, KC. HIV-1 gp120 V3 loop for structure-based drug design. *Curr Protein Pept Sc*. 2005; 6(5): 413-422.
 29. M.Andrianov, A. V, Anishchenko, I. V. Tuzikov, A. Discovery of novel promising targets for anti-AIDS drug developments by computer modeling: application to the HIV-1 gh120 V3 loop. *J. Chem. Inf. Model*. 2011; 51(10):2760-67.
 30. Zwick, MB. Jensen, R. Church, S. et al. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. *J. Virol*. 2005; 79(2):1252-1261.
 31. Zwick, MB. Labrijin, AF. Wang, M. et al. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J. Virol*. 2001; 75(22):10892-10905.
 32. Van Gils MJ, Sanders RW. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1: Templates for a vaccine. *Virology*. 2013; 435(1):46-56.
 33. Sabaghzadeh S, Sadat SM, Rohollah F, Bolhassani A. Effective delivery of Nef-MPER-V3 fusion protein using LDP12 cell penetrating peptide for development of preventive/therapeutic HIV-1 vaccine. *Protein Peptide Lett*. 2020 May 4. doi: 10.2174/092986652766620050412140.
 34. Faghieh A, Sadat SM, Bolhassani A, Irani SH. Cloning, Optimization of Expression Condition and Purification of the Recombinant HIV-1 Nef- MPER-V3 Protein in Prokaryotic Expression System. *Pars J. Med. Sci*. 2019; 17(2):46-53.
 35. Sadat SM, Zabihollahi R, Javadi F, Vahabpour R, Siadat SD, Azadmanesh K, et al. Immunological evaluation of recombinant HIV1 virions with novel adjuvants in BALB/c mice model. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2011; 21(84):13-21.
 36. Gray EG, Laher F, Lazarus E, Ensoli B, Corey L. Approaches to preventative and therapeutic HIV vaccines. *Curr Opin Virol*. 2016; 17: 104-109.
 37. Walker BD, Ahmed R, Plotkin S. Moving ahead an HIV vaccine: use both arms to beat HIV. *Nat Med*. 2011; 17: 1194-5.
 38. Excler JL, Robb ML, Kim JH. Prospects for a globally effective HIV-1 vaccine. *Vacc*. 2015; 33: 1-9.
 39. Tohidi F, Sadat SM, Bolhassani A, Yaghoobi R. Immunological Evaluation of HIV-1 VLP Harboring M^{MPER-V3} in BALB/c Mice Model. *Patho Res*. 2018; 21(2): 95-100.
 40. Guo Z, Peng H, Kang J, Sun D. Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications. *Biomed Rep*. 2016; 4(5): 528-34.
 41. Kwon S, Kwak A, Shin H, Choi S, Kim S, Lim HJ. Application of a novel cell-permeable peptide-driven protein delivery in mouse blastocysts. *Reproduction*. 2013; 146: 145-153.
 42. Reguzova A, Antonets D, Karpenko L, Ilyichev A, Maksyutov R, Bazhan S. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 Poly-T cell-epitope immunogens. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0116412.
 43. Haynes BF, Montefiori DC. Aiming to induce broadly reactive neutralizing antibody responses with HIV-1 vaccine candidates. *Expert Rev Vaccines*. 2006; 5(4): 579-95.
 44. Li Y, Migueles SA, Welcher B, Svehla K, Phogat A, Louder MK, et al. Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nat Med*. 2007; 13(9): 1032-1034.
 45. Stamatatos L, Morris L, Burton DR, Mascola JR. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine?. *Nat Med*. 2009; 15(8): 866-70.
 46. Fomsgaard A, Nielsen HV, Bryder K, Nielsen C, Machuka R, Bruun L, et al. Improved humoral and cellular immune responses against the gp120 V3 loop of HIV-1 following genetic immunization with a

- chimeric DNA vaccine encoding the V3 inserted into the Hepatitis B surface antigen. *Scand. J. Immunol.* 1998; 47: 289-295.
47. Sirois S, Touaibia M, Chou KC, Roy R. Glycosylation of HIV-1 gp120 V3 Loop: Towards the Rational Design of a Synthetic Carbohydrate Vaccine. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14: 3232-3242.
48. Kestler HWd, Ringler DJ, Mori K, et al. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell.* 1991; 65(4): 651-62.
49. Svanholm C, Lowenadler B, Wigzell H. Amplification of T-cell and antibody responses in DNA-based immunization with HIV-1 Nef by co-injection with a GM-CSF expression vector. *Scand. J. Immunol.* 1997; 46: 298-303.
50. Cosma A, Nagaraj R, Bühler S, Hinkula J, Busch DH, Sutter G, et al. Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals. *Vacc.* 2003; 22: 21-29.

Immunological Assessment of HIV-1 Nef-MPER-V3 Harboring LDP12 Penetrating Peptide in BALB/c Mice

Sahar Sabaghzadeh¹, Fatemeh Rohollah¹, Seyed Mehdi Sadat^{2*}, Azam Bolhassani²

Received: 2020.08.12

Revised: 2020.10.29

Accepted: 2020.12.14

1. Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Hepatitis, AIDS and Blood borne diseases, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.18, No.3, Fall 2020

Pars J Med Sci 2020;18(3):32-42

Abstract:

Introduction:

In spite of the improvements in developing antiretroviral treatments, there are no approved HIV vaccines. To achieve an effective vaccine against HIV-1 requires induction of strong humoral and cellular immune responses, so developing an effectual vaccine is required. The aim of this study was the immunological assessment of HIV-1 Nef-MPER-V3 harboring LDP12 penetrating peptide in BALB/c mice in order to induce effective immune responses.

Materials & Methods:

In the current study, presenting 55 female mice were utilized for immunization with LDP12-Nef-MPER-V3. The mice were divided into 11 groups with 5 mice each group. Immunizations were performed three times at three week intervals and subcutaneously in a volume of 100 µl per mouse. Two weeks after final injection, humoral and cellular immune responses were evaluated in blood serum and splenocytes respectively, by using ELISA method. Finally, the data analysis was performed, using Mann-Whitney u test.

Results:

Although the level of total antibody production was observed in all main groups with different titrations, but the antibody level was higher in the mice groups that injected with the LDP12 antigen with adjuvants immunity than in the control group ($p=0.045$). Also, IgG2a was the predominant isotype (Th1-biased response) in mice immunized group that had LDP12 antigen with Hsp27 adjuvant.

Conclusion:

The data indicated that the high immune system stimulating capabilities of LDP12-Nef-MPER-V3 injection regime accompanied by Hp91 adjuvant, which provides the potential for an efficient HIV vaccine.

Keywords: Vaccine, HIV-1, LDP12, Immunization, BALB/c, Nef-MPER-V3

* Corresponding author Email: mehdi_sadat@pasteur.ac.ir