

تحقیقی

شناسایی اپی توپ‌های سلول T مربوط به آنتی‌ژن MPB51 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

در موش‌های BALB/c

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های T کمکی نوع یک (Th1) و لنفوسیت‌های CD8+ T نقش به‌سزایی در برقراری حفاظت مقابل عفونت با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارند. MPB51 یکی از پروتئین‌های ترشحی مایکوباکتریوم می‌باشد که باعث تحریک پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی در طی عفونت با باسیل‌های سل می‌گردد. هدف از این مطالعه شناسایی اپی توپ‌های غالب لنفوسیت‌های T از مولکول MPB51 در موش‌های BALB/c می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی از تیرماه ۱۳۸۱ لغایت اسفند ماه ۱۳۸۱ انجام گردید. DNA کدکننده مولکول MPB51 ابتدا در پلاسמיד‌های pCI کلون گردید. پس از ایجاد گلوله‌های ژنی حاوی ذرات طلا پوشیده شده از ژن MPB51، با استفاده از تفنگ ژنی (Gene gun) موش‌های سفید نژاد BALB/c مورد واکسیناسیون قرار گرفتند. دو هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی سلول‌های طحالی استخراج شد و در حضور یا عدم حضور مجموعه‌ای از پپتیدهای هم‌پوشان سنتتیک توالی کامل مولکول MPB51 در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد FCS کشت داده شد. تولید IFN- γ داخل سلول و سوپ کشت سلولی به ترتیب با روش فلوسیتومتری و ELISA بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که واکسیناسیون DNA باعث ایجاد پاسخ ایمنی قوی تنها در برابر پپتید حاوی اسید آمینه ۴۰-۲۱ می‌شود. آنالیزهای بیشتر با استفاده از الگوریتم‌های کامپیوتری امکان شناسایی اپی توپ نه‌اسید آمینه‌ای ۳۲-۲۴ را به‌عنوان اپی توپ غالب سلول CD8+ T فراهم نمود.

نتیجه‌گیری: این تحقیق مشخص ساخت کمپلکس MHC کلاس یک - پپتید (P24-32/H2-Dtl) توسط سلول‌های T سیتوتوکسیک (CTL) تولید کننده IFN- γ شناسایی می‌گردد. با استفاده از روش حذف دستجات لنفوسیت‌های T مشاهده شد لنفوسیت‌های CD8+ T تنها سلول‌های پاسخگو در برابر پپتید ایمونوژن ۳۲-۲۴ در موش‌های BALB/c می‌باشند. نتایج به دست آمده از این تحقیق علاوه بر آنکه به شناخت مکانیسم‌های پاسخ‌های ایمنی سلولی در برابر توبرکلوزیس کمک می‌نماید، در طراحی واکسن موثرتری در مقابل عفونت M.tuberculosis نیز مفید خواهد بود.

کلید واژه‌ها: اپی توپ سلول T - توبرکلوزیس - MPB51 - واکسن ژنتیکی

دکتر علیرضا رفیعی
استادیار ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

دکتر یوکیدو کوپاد
استاد ایمونولوژی و بیولوژی سلولی
دانشکده پزشکی دانشگاه امامت‌سوس، ژاپن

نویسنده مسؤول: دکتر علیرضا رفیعی

پست الکترونیکی: rafiei1710@gmail.com

نشانی ساری، بلوار خزر، میدان خزر، دانشکده پزشکی

ساری، گروه ایمونولوژی و میکروپوشناسی

تلفن: ۳۲۴۹۰۴۳ و نامبر: ۰۶-۳۲۴۷۱-۱۵۱

وصول مقاله: ۸۴/۲/۲۴

اصلاح نهایی: ۸۴/۴/۱۵

پذیرش مقاله: ۸۴/۴/۲۵

مقدمه

ایمنی سلولی نقش موثری برای کنترل عفونت دارند. شواهد متقنی وجود دارد که سلول‌های CD4+ T کمکی نوع یک (Th1) عمدتاً از طریق تولید سیتوکاین‌های فعال کننده ماکروفاژها نظیر انترفرون گاما، در پیدایش مقاومت در برابر بیماری موثرند. علاوه بر آن لنفوسیت‌های CD8+ T سیتوتوکسیک (CTL) نیز در پیدایش مقاومت در برابر بیماری سهیمند (۳). موش‌های فاقد سلول‌های CD8+ T حساسیت بیشتری نسبت به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارند (۴). سلول‌های CD8+ CTL انسانی آنتی ژن‌های لیپیدی و گلیکولیپیدی دیواره سلولی مایکوباکتریوم را در داخل مولکول‌های CD1 (a, b, c) و مولکول‌های MHC کلاس Ib عرضه شده بر روی سلول‌های دندریتیک شناسایی می‌نمایند (۵).

طراحی نسل جدید واکسن‌های TB نیازمند دانستن نحوه

سل یک بیماری بازپدید می‌باشد که یکی از مشکلات اصلی بهداشت عمومی در تمامی کشورها به ویژه کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عمدتاً از طریق تنفسی انتقال می‌یابد و باعث بروز بیماری در ۱۰-۵ درصد افراد آلوده می‌گردد، به طوری که سالیانه ۳ میلیون نفر در اثر ابتلا به این بیماری جان می‌سپارند. ابزارهای موجود برای کنترل بیماری ناکافی بوده، به طوری که میزان حفاظت ناشی از تنها واکسن موجود، واکسن BCG، بین ۸۵-۰ درصد در مطالعات مختلف گزارش شده است (۱). این امر همراه با بروز پاندمی HIV و افزایش مقاومت چند دارویی در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیاز به واکسن‌های موثرتر را بیشتر می‌نماید (۲). گرچه مکانیسم‌های حفاظتی در مقابل سل هنوز به خوبی شناخته نشده‌اند، ولی پاسخ‌های

پرایمر جلو:

5'- CCTCTAGAATGGCCCATACGAGAACCTGA-3'

پرایمر عقب:

5'- CAGGCTCTAGACATCGGCACCTGGCTAGC-3'

فرآورده PCR با استفاده از آنزیم محدود کننده XbaI برش داده شد و در جایگاه XbaI واقع در پایین دست ناحیه پیش برنده/ تشدید کننده ویروس سائیتومگال موجود در پلاسمید pCI کلون گردید. صحت توالی نوکلئوتیدها با استفاده از دستگاه تعیین توالی DNA (DNA sequencing) (ABI PRISM 310) تعیین شد.

پپتیدها: پپتیدها دربرگیرنده تمام توالی ۲۶۶ اسید آمینه مولکول MPB51 باکتری مایکوباکتریوم به صورت توالی های ۲۰ اسید آمینه ای دارای ۱۰ ریشه هم پوشان به جز برای انتهای کربوکسیل مولکول ساخته شد. انتهای کربوکسیل مولکول به صورت پپتید ۱۲ اسید آمینه ای (۲۵۵ تا ۲۶۶) تهیه گردید. برای شناسایی قابلیت عرضه اپی توپ های سلول های CD8+T موجود در کتابخانه پپتیدهای ۲۰ اسید آمینه ای مولکول MPB51 توسط مولکول های MHC کلاس یک، از نرم افزارهای پیش بینی کننده اپی توپ نظیر SYFPEITHI و بخش آنالیز مولکولی و بیوانفورماتیک (BIMAS) وبسایت پیش گویی کننده میزان اتصال پپتید به HLA استفاده گردید.

http://bimas.dert.nih.gov/cgi-bin/mobio/ken_parker_conboform

پپتیدهای لیوفلیزه در غلظت یک میلی مولار در محلول ۵درصد دی متیل سولفو کساید (DMSO) در محیط کشت RPMI 1640 حل شده و در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

ایمن سازی موش ها: موش ها با استفاده از دستگاه تفنگ ژنی با واکسن DNA پلاسمیدی کد کننده مولکول MPB51 ایمن شدند. برای واکسیناسیون ژنتیکی با دستگاه تفنگ ژنی گاز هلیوم (آزمایشگاه های Bio-Red هر کولز، کالیفرنیا) گلوله های حاوی ذرات طلای پوشیده شده با DNA پلاسمیدی براساس دستورالعمل های شرکت تولید کننده تهیه شد. بدین منظور یک میکرو گرم DNA پلاسمیدی روی ۰/۵ میلی گرم ذرات طلا چسبانیده شد. موش ها هر بار تحت دو شلیک قرار می گرفتند که در هر شلیک ۰/۵ میلی گرم ذرات طلا انتقال می یافت. برای ایمن سازی موش ها، ابتدا موهای پوست ناحیه شکم تراشیده شد و سپس ناحیه مربرطه با اتانل ۷۰درصد ضد عفونی گردید. سپس لوله تفنگ ژنی را مستقیماً

آرایش آنتی ژنی مایکوباکتریوم توپر کلوزیس می باشد. پروتئین های ترشحي و سطحی نقش به سزایی در برانگیختن ایمنی سلولی موثر در مقابل TB دارند (۶). مطالعات انجام شده در مدل موشی عفونت TB نشان می دهد، سلول های خاطرهای موش های ایمن شده مقادیر قابل توجهی از IFN- γ در پاسخ به دو جزء پروتئینی ۱۰-۶ KDa و کمپلکس آنتی ژن ۸۵ حاصل از فیلتراسیون کشت مایکوباکتریوم تولید می کنند (۷). کمپلکس آنتی ژن ۸۵ (شامل Ag85C و Ag85 A و Ag85 B از پروتئین های ترشحي مایکوباکتریوم می باشد که فعالیت مایکولیل ترانسفرازی در ساخت دیواره باکتری و در بیوسنتز فاکتور طنابی شدن دارد (۹۸). کمپلکس Ag85 موجب برانگیختن سلول های Th1 و CTL در افراد سالم مبتلا به مایکوباکتریوم توپر کلوزیس و موش های آلوده به BCG می شوند (۱۳-۱۰). MPB51 یکی از پروتئین های اصلی ترشحي می باشد که با سه جزء کمپلکس Ag85 واکنش متقاطع داشته (۱۴) و از نظر ساختمانی نیز ۴۳ درصد با آنها تشابه دارد (۱۵). نقش فیزیولوژی پروتئین MPB51 هنوز به خوبی مشخص نشده است. نتایج مطالعات انجام شده با واکسن DNA کد کننده MPB51 نشان می دهد که این پروتئین قابلیت ایجاد پاسخ های سلولی و ایمنی حفاظت کننده را در موش های مواجه شده با مایکوباکتریوم توپر کلوزیس دارد (۱۶). مطالعه حاضر به منظور شناسایی اپی توپ های غالب سلول T در موش های BALB/c با استفاده از روش واکسیناسیون ژنتیکی انجام گردید.

روش بررسی

این مطالعه تجربی از تیرماه ۱۳۸۱ لغایت اسفند ماه ۱۳۸۱ انجام گردید.

حیوان آزمایشگاهی: موش های BALB/c ماده ۸-۶ هفته ای در شرایط عادی از پاتوژن در انستیتو حیوانات آزمایشگاهی دانشکده پزشکی دانشگاه هماماتسو نگهداری شدند و در تمام مدت مطالعه آب و غذای اتوکلاو شده به میزان کافی دریافت می نمودند.

ساخت واکسن DNA پلاسمیدی حاوی ژن MPB51: DNA کد کننده مولکول کامل MPB51 از پلاسمید pMB49 با استفاده از جفت پرایمرهای زیر توسط روش واکنش زنجیره پلیمرازی (PCR) تکثیر یافت.

سلول‌های CD4+T یا CD8+ با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD4 موشی (G1K1.5) یا منوکلونال آنتی‌بادی ضد CD8 α موشی (۲-۱۸-۳۵ MAb) از جمعیت سلول‌های T طحالی موش‌های ایمن حذف شدند. بدین منظور تعداد 1×10^7 سلول طحالی موش‌های ایمن پس از انتقال در بافر سیتوکسیک (محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ همراه با بافر ۲۵mM هپس (HEPES) و ۳/۰ درصد آلبومین سرم گاوی) حاوی آنتی‌بادی ضد CD4 یا ضد CD8 به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس کمپلمان خرگوش (سیدرلان، هورنبی، کانادا) به سوسپانسیون سلولی افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت بعد از شستشو، سلول‌ها در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FCS سوسپانسیون شده و در حضور مجموعه‌ای از پپتیدهای مولکول MPB51 به طور جداگانه کشت داده شدند.

اندازه‌گیری IFN- γ در داخل سلول: برای شناسایی دسته سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن، نوع و فنوتیپ سلول‌های T و میزان بیان داخل سلولی IFN- γ با استفاده از فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور برای حذف گلبول‌های قرمز ابتدا سلول‌های طحالی استحصال شده از موش‌های ایمن با بافر لیزکننده ACK به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق انکوبه شدند و سپس بعد از دو بار شستشو، به تعداد 1×10^7 سلول در میلی‌لیتر محیط PPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FCS تنظیم گردید. سلول‌ها به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور یا عدم حضور پپتیدهای سنتتیک با محلول حاوی بریفلدین A (Brefeldin A) کشت داده شدند. آنگاه سلول‌ها را دو بار با بافر FACS (محلول PBS حاوی ۱ درصد FCS و ۱/۰ درصد آزیدسدم) شستشو داده و در حضور آنتی‌بادی ضد CD8 کونژوگه با FITC و آنتی‌بادی ضد CD4 کونژوگه با Cy-chrome به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه گردید. بعد از دو بار شستشو، سلول‌ها با محلول پارافرمالدئید ۱ درصد فیکس شدند. بعد از دوبار شستشو با محلول شستشو، با افزودن محلول نفوذپذیرکننده حاوی ساپونین جدار سلول‌ها نفوذپذیر گردید. آنگاه با افزودن آنتی‌بادی ضد IFN- γ موشی کونژوگه با فیکوارترین و ۲۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سیتوکاین داخل سلولی رنگ آمیزی شد. سرانجام پس از شستشو، سلول‌ها در $500 \mu\text{L}$ از بافر FACS سوپاسپانسیون

با پوست حیوان تماس داده و آنگاه دستگاه تحت فشار ۴۰۰Ib/In2 گاز هلیوم شلیک می‌گشت. موش‌ها چهار بار به فاصله یک هفته در میان با ۲ میکروگرم DNA پلاسمیدی تلقیح شدند.

کشت سلول‌های طحالی: دو هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی، با روش قطع نخاع موش‌ها کشته شدند و طحال آنها تحت شرایط استریل جدا گردید. سپس در محیط کشت RPMI 1680 سلول‌های طحالی با استفاده از مش (Mesh) استخراج گردید و سوسپانسیون سلول‌های طحالی موش‌های ایمن شده با واکسن DNA در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FCS به میزان 1×10^6 سلول در هر چاهک پلیت‌های ۹۶ چاهگی در حضور $5 \mu\text{M}$ پپتید در اتمسفر حاوی CO2 ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد از کشت، مایع روی کشت سلولی جمع‌آوری و تا زمان آزمایش در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت IFN- γ با استفاده از روش الیزای ساندریجی (ELISA) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری IFN- γ در مایع کشت سلولی: برای اندازه‌گیری IFN- γ پلیت‌های ۹۶ چاهگی الیزا با $2 \mu\text{g}$ آنتی‌بادی تسخیرکننده (آنتی‌بادی منوکلونال ضد IFN- γ موشی) در مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پوشانده شدند. بعد از شستشو پلیت با PBS حاوی ۰/۰۵ درصد تووین ۲۰، چاهک‌ها با محلول بلوک‌کننده ACE به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مسدود گردیدند. بعد از شستشو، نمونه‌های کشت سلولی و غلظت‌های استاندارد IFN- γ به چاهک‌ها افزوده شد و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از شستشو، $0.5 \mu\text{g/ml}$ از آنتی‌بادی منوکلونال ضد IFN- γ موشی کونژوگه با بیونین به پلیت اضافه گردید و در شرایط آزمایشگاه به مدت یک ساعت انکوبه شد. بعد از شستشو، $0.1 \mu\text{g/ml}$ استرپتاویدین کونژوگه با پروکسیداز به پلیت‌ها اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. بعد از شستشو، استرپتاویدین کونژوگه با پروکسیداز باند شده با استفاده از TMB شناسایی گردید و مقدار جذب محلول در طول موج ۴۰۵nm با دستگاه میکروپلیت ریدر EZS-ABC تعیین گردید.

حذف دستجات سلول‌های CD4T یا CD8: به منظور شناسایی نوع سلول‌های T پاسخ دهنده به پپتید، دستجات

mann-whitney و آزمون kruskal-wallis استفاده شد. اختلافات بیشتر از ۹۵ درصد دامنه اطمینان در تمام آزمایشات با مقدار $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار بود. برای آنالیز داده‌ها از نسخه دهم نرم افزار SPSS استفاده شد.

یافته‌ها

تولید IFN- γ در پاسخ به پپتیدهای هم‌پوشان ساختگی

مولکول MPB51

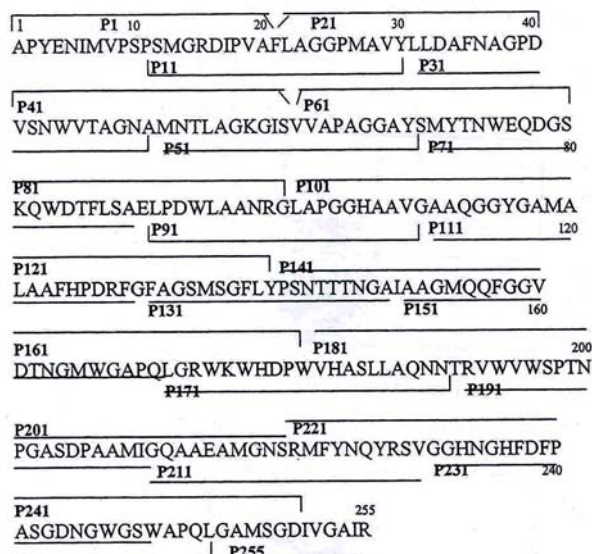
سلول‌های طحالی موش‌های BALB/c ایمن شده با واکسن DNA کدکننده مولکول MPB51، با پپتیدهای ۲۰ اسید آمینه‌ای دارای ۱۰ اسید آمینه هم‌پوشان (شکل یک) تحریک شدند و غلظت IFN- γ در سوپ کشت سلولی به وسیله روش ELISA تعیین گردید.

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، مقادیر قابل توجهی IFN- γ بعد از تحریک با پپتید P21 (اسید آمینه ۲۱ تا ۴۰) در موش‌های BALB/c تولید گردید. همان‌طور که انتظار می‌رفت، سلول‌های T طحالی موش‌های بکر (ایمن نشده) در پاسخ به هیچ یک از پپتیدهای کتابخانه پپتیدی مولکول MPB51 مقادیر قابل توجهی IFN- γ تولید نکردند.

شناسایی اپی‌توپ ۹ اسید آمینه سلول‌های CD8+T در پپتید

P21 مولکول MPB51

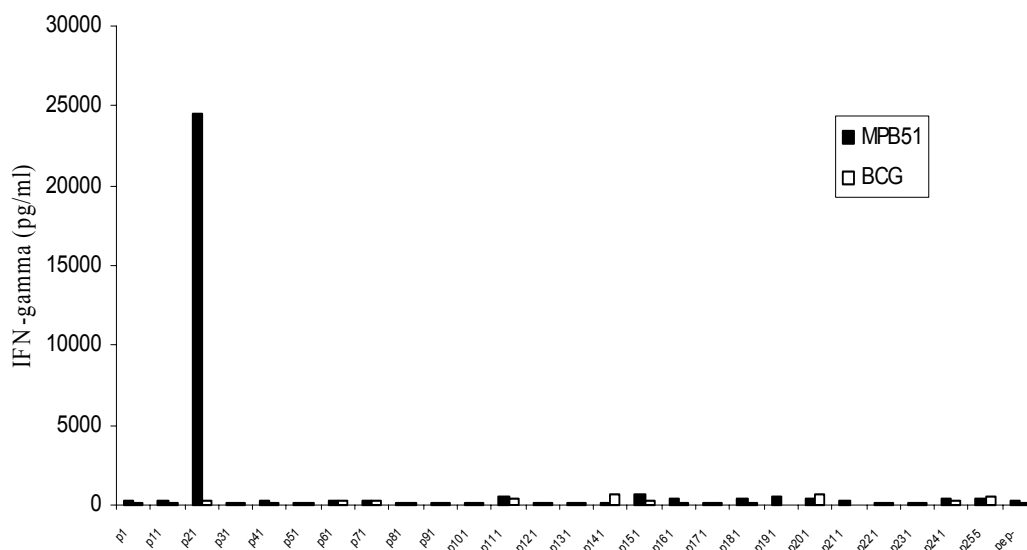
بررسی نوع لئوسیت‌های T تولید کننده IFN- γ با استفاده از فلوسیتومتری سه رنگ نشان داد که تنها مولکول‌های



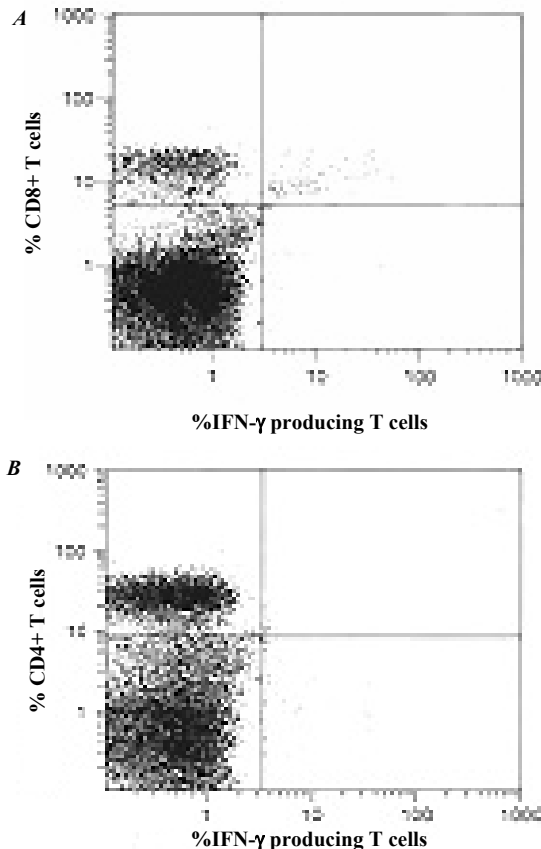
شکل ۱: نمایش شماتیک ۲۶ پپتید ساختگی دارای هم‌پوشانی از مولکول MPB51 باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس. تمام پپتیدها به صورت مولکول‌های ۲۰ اسید آمینه‌ای دارای ۱۰ اسید آمینه هم‌پوشانی ساخته شده‌اند. تنها انتهای کربوکسیل مولکول به صورت پپتید ۱۲ اسید آمینه‌ای ساخته شد.

گردیده و با دستگاه فلوسیتومتر دیجیتال EPICS (بکتون-دیکینسون، سانخوزه، کالیفرنیا) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

آنالیز آماری: داده‌ها حاصل سه بار آزمایش در شرایط یکسان می‌باشد. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون یک‌طرفه

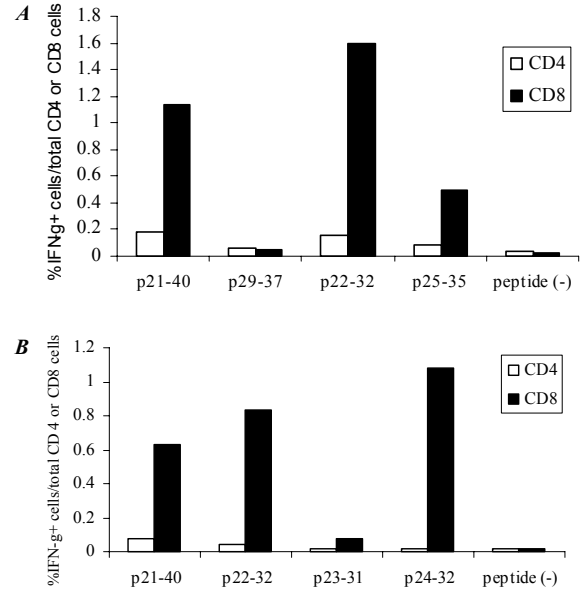


شکل ۲: تولید IFN- γ توسط سلول‌های طحالی موش‌های BALB/c ایمن شده با DNA کدکننده MPB51 (ستون‌های تیره) یا واکسن BCG (ستون‌های سفید) در پاسخ ۵ μ M از پپتیدهای ۲۰ اسید آمینه‌ای کل مولکول MPB51 یا محیط کشت تنها (pep). نتایج نشانگر تکرار سه آزمایش مستقل می‌باشد.



شکل ۳: نمودار فلوسیتومتری سلول‌های $CD8+ T$ تولید کننده $IFN-\gamma$ در پاسخ به پپتید ۳۲-۲۴ در بین سلول‌های طحالی موش‌های ایمن شده با واکسن DNA همان‌طور که مشاهده می‌شود پس از تحریک لنفوسیت‌های طحالی با پپتید ۳۲-۲۴. فقط در سلول‌های $CD8+ T$ تولید داخل سلولی $IFN-\gamma$ افزایش یافته است (نمودار A). در حالی که در سلول‌های $CD4+ T$ پس از تحریک با پپتید ۳۲-۲۴ هیچ‌گونه $IFN-\gamma$ تولید نشده است (نمودار B).

پپتید ۳۵-۲۵ توانایی اندکی در تحریک سلول‌های ایمنی طحال نشان داد که ممکن است ناشی از اشتراک ۸ اسید آمینه با پپتیدهای ۱۱ اسید آمینه‌ای ۳۲-۲۲ و ۳۵-۲۵ باشد. به همین منظور در مرحله بعد دو پپتید ۹ اسید آمینه‌ای ۳۱-۲۳ و ۳۲-۲۴ که از نظر تئوری بیشترین اتصال پایدار را به مولکول‌های H2 نشان می‌دادند، انتخاب شدند. همان‌طور که در شکل (۳B) نشان داده شده است، تنها ۳۲-۲۴ و نه ۳۱-۲۳، قابلیت تحریک شدید بیان $IFN-\gamma$ را در داخل سلول‌های $CD8+ T$ ایمن دارد. بنابراین پپتید ۹ اسید آمینه‌ای ۳۲-۲۴ یک اپی‌توپ مخصوص لنفوسیت‌های $CD8+ T$ در مولکول MPB51 برای موش‌های BALB/c محسوب می‌شود. با استفاده از رنگ‌آمیزی داخل سلولی $IFN-\gamma$ ، لنفوسیت‌های $CD8+ T$ اختصاصی ۳۲-۲۴ در بین سلول‌های ایمنی طحال شناسایی شدند (شکل ۴A).



شکل ۴: شناسایی اپی‌توپ سلول T در مولکول MPB51 درصد سلول‌های $CD8+ T$ یا $CD4+ T$ تولید کننده $IFN-\gamma$ را بعد از ۴ ساعت تحریک با پپتیدهای مختلف یا محیط کشت تنها (پپتید (-) نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در پپتید P21-40، تنها پپتید ۳۲-۲۲ به عنوان اپی‌توپ سلول $CD8+ T$ می‌باشد (شکل A). پپتید ۹ اسید آمینه‌ای P24-32 یک اپی‌توپ سلول $CD8+ T$ در مولکول MPB51 محسوب می‌شود (شکل B).

$CD8+ T$ و نه سلول‌های $CD4+ T$ در پاسخ به ۲۱ تولید $IFN-\gamma$ می‌نمایند (شکل ۳).

از آنجا که اپی‌توپ‌های سلول‌های $CD8+ T$ که توسط مولکول‌های MHC کلاس یک عرضه می‌شوند شامل ۸-۱۱ اسید آمینه می‌باشند، در این مرحله سعی شد اپی‌توپ سلول $CD8+ T$ دقیقاً شناسایی گردد. به لحاظ این که اپی‌توپ‌های غالب عمدتاً میل ترکیبی زیادی برای اتصال به مولکول‌های MHC دارند، با استفاده از برنامه‌های کامپیوتر مخصوص پیش‌بینی اپی‌توپ (Epitope prediction) نظیر SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) پپتیدهای ۱۰-۹ اسید آمینه‌ای حاصل از پپتید ۲۱ با قابلیت عرضه توسط مولکول‌های H-2 برآورد گردید. بدین منظور پپتیدهای ۳۲-۲۲، ۳۵-۲۵ و ۳۷-۲۹ که به ترتیب شامل پنج اپی‌توپ با قابلیت اتصال به مولکول‌های H2 کلاس Ia، دو اپی‌توپ قابل اتصال به H2-Ld و پپتید ۳۷-۲۹ با رتبه بالای اتصال به H2-Kd پس از انتخاب، ساخته شده و برای تحریک لنفوسیت‌های طحالی موش‌های ایمن به کار رفتند. نتایج فلوسیتومتری نشان داد که در بین سه پپتید فوق تنها ۳۲-۲۲ قابلیت زیادی در تحریک تولید $IFN-\gamma$ توسط سلول‌های $CD8+ T$ دارند (شکل ۳A).

بحث

آگاهی و فهم عمیق از ماهیت پاسخ‌های ایمنی حفاظت کننده در بیماری سل کمک شایانی به ابداع واکسن‌های موثرتری در آینده خواهد نمود. بازوی سلولی ایمنی ناشی از سلول‌های Th1 جزء اصلی ایمنی حفاظت دهنده در بیماری سل (۳) محسوب می‌شود. با این وجود مطالعات انسانی و موشی نشان می‌دهند که سلول‌های CD8+T نیز نقش به‌سزایی در برقراری ایمنی در این بیماری دارند (۴۳). گرچه مکانیسم دقیق ایمنی ناشی از سلول‌های CD8+T محدود به MHC کلاس یک به خوبی مشخص نشده است، ولی احتمالاً سلول‌های CD8+T با ترشح IFN- γ در ایجاد حفاظت سهیمند (۱۷).

مطالعات نشان می‌دهند که کمپلکس Ag85 شامل آنتی‌ژن‌های غالب در پاسخ‌های سلول‌های CD8+T و CD4+T در انسان و موش‌های آلوده به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشند (۱۸). واکسیناسیون با DNA پلاسمیدی کدکننده Ag85A یا Ag85B موجب برانگیختن سلول‌های CD4+ T و CD8+ T در موش گردیده (۱۸) که این سلول‌ها حفاظت خوبی نیز در برخورد با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بیماری‌زا ایجاد نموده‌اند (۱۹ و ۲۰). آنتی‌ژن Ag85A شامل چندین اپی‌توپ سلول CD4+ T و حداقل یک اپی‌توپ CD8+ T در موش‌های BALB/c می‌باشد (۲۱). در انسان نیز نقشه اپی‌توپ سلول T در مولکول Ag85A شناسایی گردیده است (۲۲ و ۲۳). به عنوان مثال، اپی‌توپ‌های سلول CD8+T محدود به HLA-A*0201 از Ag85B شناسایی شده است (۲۳). مولکول MPB51 یکی دیگر از پروتئین‌های ترشحی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد که ۳۷-۴۳ درصد تشابه با جزء مایکولیل ترانسفرز کمپلکس Ag85 دارد (۲۴ و ۲۵).

در این مطالعه با استفاده از روش واکسیناسیون DNA با تفنگ ژنی و آنالیز بیومتریک با کتابخانه‌ای از پپتیدهای هم‌پوشان، اپی‌توپ ۹ اسیدآمینوای ۳۲-۲۴ سلول CD8+T محدود به مولکول‌های H-2 در موش‌های BALB/c شناسایی گردید. همان‌طور که قبلاً گزارش شده است واکسیناسیون DNA ابزار موثری برای شناسایی اپی‌توپ‌های سلول T محسوب می‌شود (۲۱). تولید IFN- γ در سلول‌های طحالی موش‌های ایمن شده با DNA پلاسمیدی نسبت به سلول‌های موش‌های ایمن شده با BCG افزایش داشت. علاوه بر آن الگاریتم کامپیوتری ابزار مفیدی در شناسایی حداقل

اپی‌توپ‌ها برای تعیین نقشه اپی‌تویی (epitope mapping) می‌باشد (۲۵). در واقع پپتید ۳۲-۲۴ p که در این مطالعه به عنوان اپی‌توپ سلول CD8+T شناسایی گردید، دارای رتبه بالایی (۴۰۰) برای اتصال به مولکول H2-Dd می‌باشد. با این وجود، عوامل دیگری غیر از میل ترکیبی اتصال به MHC در تعیین اپی‌توپ‌های سلول T دخالت دارند. این عوامل عبارتند از پردازش آنتی‌ژن (شکستن ترجیحی توسط کمپلکس پروتئین‌ها)، وضعیت انتقال پپتیدها توسط مولکول‌های TAP و نحوه پاسخ گنجینه سلول‌های T. برای مثال پپتید ۳۷-۲۳ P از پپتید ۴۰-۲۱ P که با استفاده از روش آنالیز بیومتریک توسط نرم‌افزار BIMAS رتبه بالایی (۱۲۰) برای اتصال به مولکول‌های H2-Kd دارد، در عمل قادر به تحریک تولید IFN- γ در سلول‌های طحالی موش‌های BALB/c ایمن نبود.

آنالیز سه رنگی فلوسیتومتری نشان داد که پپتید ۳۲-۲۴ CD8+T قابلیت القای ساخت IFN- γ را در داخل سلول‌های CD8+T دارد. این یافته نشان می‌دهد که پپتید ۳۲-۲۴ یک اپی‌توپ سلول CD8+T در موش‌های BALB/c محسوب می‌شود. علاوه بر این نتایج ما نشان می‌دهد که کمپلکس H2-Dd-پپتید ۳۲-۲۴ p توسط سلول‌های CD8+T تولید کننده IFN- γ شناسایی می‌شود و این سلول‌ها فعالیت سیتوتوکسیک در برخورد با سلول عرضه کننده پپتید را نشان می‌دهند (یافته‌های منتشر نشده).

در موش‌های BALB/c سطح تولید IFN- γ اختصاصی پپتید توسط سلول‌های CD8+T موش‌های ایمن شده با BCG کمتر از حد قابل شناسایی می‌باشد. این یافته با گزارشات سایر محققین هم‌راستا می‌باشد که نشان دادند در موش‌های BALB/c واکسینه شده با BCG یا آلوده به TB، مقدار تولید IFN- γ اختصاصی آنتی‌ژن Ag85A نسبت به موش‌های ایمن شده با DNA بسیار کمتر می‌باشد (۲۱ و ۲۶). از آنجا که واکسن DNA کدکننده MPB51 قابلیت برانگیختن ایمنی حفاظتی در مقابل عفونت با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را در موش‌های BALB/c داشته (۲۲) و واکسن DNA سلول‌های CD8+ T را القا می‌نماید که پپتید ۳۲-۲۴ را در شیار مولکول‌های H2-Dd شناسایی می‌نمایند، سلول‌های CD8+T القا شده در اثر واکسن DNA در موش‌های BALB/c، حتی قادر خواهند بود عرضه اندک اپی‌توپ سلول CD8+ T را روی سلول‌های آلوده به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی نمایند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه یک اپی‌توپ سلول CTL CD8+ محدود H-2 در موش‌های BALB/c شناسایی گردید که تصور می‌شود، نقش به‌سزایی در حفاظت مقابل عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس داشته باشد. همچنین مشخص

گردید واکسیناسیون ژنتیکی (DNA vaccination) روش باارزشی برای ایجاد پاسخ‌های حفاظت دهنده در مقابل عفونت توبرکلوزیس بوده و ابزار مفیدی در جهت مطالعه و شناسایی اپی‌توپ‌های اختصاصی دستجات مختلف سلول‌های T در گونه‌های مختلف حیوانی می‌باشد.

References

- 1) Sterne JA, Rodrigues LC, Guedes IN. Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2(3):200-7.
- 2) Pablos-Mendez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med.* 1998 Jun 4;338(23):1641-9.
- 3) Kaufmann SH. CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol Today.* 1988; 9(6):168-74.
- 4) Stenger S, Modlin RL. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Microbiol.* 1999; 2(1):89-93.
- 5) Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17:297-329.
- 6) Orme IM. Induction of nonspecific acquired resistance and delayed-type hypersensitivity, but not specific acquired resistance in mice inoculated with killed mycobacterial vaccines. *Infect Immun.* 1988; 56(12):3310-2.
- 7) Andersen P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun.* 1994; 62(6):2536-44.
- 8) Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science.* 1997; 276(5317):1420-2.
- 9) Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev.* 1992; 56(4):648-61.
- 10) Graff-Dubois S, Faure O, Gross DA, Alves P, Scardino A, Chouaib S, et al. Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted epitope shared by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol.* 2002; 169(1):575-80.
- 11) Launois P, DeLeys R, Niang MN, Drowart A, Andrien M, Dierckx P, et al. T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy. *Infect Immun.* 1994; 62(9):3679-87.
- 12) Munk ME, De Bruyn J, Gras H, Kaufmann SH. The *Mycobacterium bovis* 32-kilodalton protein antigen induces human cytotoxic T-cell responses. *Infect Immun.* 1994; 62(2):726-8.
- 13) Silver RF, Wallis RS, Ellner JJ. Mapping of T cell epitopes of the 30-kDa alpha antigen of *Mycobacterium bovis* strain bacillus Calmette-Guerin in purified protein derivative (PPD)-positive individuals. *J Immunol.* 1995; 154(9):4665-74.
- 14) Ohara N, Ohara-Wada N, Kitaura H, Nishiyama T, Matsumoto S, Yamada T. Analysis of the genes encoding the antigen 85 complex and MPT51 from *Mycobacterium avium*. *Infect Immun.* 1997; 65(9):3680-5.
- 15) Kaufmann SH. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med.* 2000; 6(9):955-60.
- 16) D'Souza S, Rosseels V, Romano M, Tanghe A, Denis O, Jurion F, et al. Mapping of murine Th1 helper T-Cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2003; 71(1):483-93.
- 17) Tascon RE, Stavropoulos E, Lukaacs KV, Colston MJ. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8+ T cells requires the production of gamma interferon. *Infect Immun.* 1998; 66(2):830-4.
- 18) Lozes E, Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, et al. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. *Vaccine.* 1997; 15(8):830-3.
- 19) Baldwin SL, D'Souza CD, Orme IM, Liu MA, Huygen K, Denis O, et al. Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines encoding secreted and non-secreted forms of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A. *Tuber Lung Dis.* 1999; 79(4):251-9.
- 20) Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, Deck RR, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med.* 1996; 2(8):893-8.
- 21) Denis O, Tanghe A, Palfliet K, Jurion F, van den Berg TP, Vanonckelen A, et al. Vaccination with plasmid DNA encoding mycobacterial antigen 85A stimulates a CD4+ and CD8+ T-cell epitope repertoire broader than that stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection. *Infect Immun.* 1998; 66(4):1527-33.
- 22) D'Souza S, Rosseels V, Romano M, Tanghe A, Denis O, Jurion F, et al. Mapping of murine Th1 helper T-Cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and

Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2003; 71(1):483-93.

23) Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KL, Drijfhout JW, D'Souza S, Necker A, et al. Identification of major epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* AG85B that are recognized by HLA-A*0201-restricted CD8+ T cells in HLA-transgenic mice and humans. *J Immunol*. 2000; 165(11):6463-71.

24) Al-Attayah R, Shaban FA, Wiker HG, Oftung F, Mustafa AS. Synthetic peptides identify promiscuous human Th1 cell epitopes of the secreted mycobacterial

antigen MPB70. *Infect Immun*. 2003; 71(4):1953-60.

25) Shams H, Klucar P, Weis SE, Lalvani A, Moonan PK, Safi H, et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide that is recognized by human CD4+ and CD8+ T cells in the context of multiple HLA alleles. *J Immunol*. 2004; 173(3):1966-77.

26) Romano M, Denis O, D'Souza S, Wang XM, Ottenhoff TH, Brulet JM, Huygen K. Induction of in vivo functional Db-restricted cytolytic T cell activity against a putative phosphate transport receptor of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2004; 172(11):6913-21.