Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(90): 46-58

Immunogenicity evaluation of targeted multi-epitopic HIV-I candidate vaccine in Balb/c mice

Rahimi R[1], Mahdavi M[2], Ebtekar M[1*]

1. Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 5 Jul 2014, Accepted: 10 Sep 2014

Abstract

Background: Delivery of antigens directly to dendritic cells enhances the immune responses to the antigen and is an attractive approach for eliciting cellular immune responses against mutagenic pathogens like HIV virus. So the aim of this study is evaluation of immune responses elicited by delivered multi-epitopic HIV-1 $_{tat/pol/gag/env}$ recombinant protein to dendritic cells *in sito* using αDEC-205 mAb.

Materials and Methods: In this study, recombinant protein expressed by pET23a-HIVtop4 plasmid including HIVtop4 sequence ($Gag_{158-186}$, $Pol_{150-190}$, $ENV_{296-323}$, $ENV_{577-610}$, Tat_{1-20} and Tat_{44-61}) in BL21 *E. coli* cells was used as vaccine model. To exploiting dendritic cells' properties for immunization purposes, we conjugated this recombinant protein chemically to anti body against DEC-205 receptor on these cells. Balb/c mice immunized subcutaneously (s.c.) with conjugated multi-epitopic protein or un-conjugated one (as control) simultaneously with Poly I: C as dendritic cell maturation factor. Lymphocyte proliferation was measured by bromo di uridine assay, Cytotoxicity by Grenzyme B production activity, IL-4, IL-17, IFN-γ cytokines production and total antibody by direct and indirect ELISA methods in order.

Results: Immunization by anti DEC-205 conjugated peptide led to a significant increase in the proliferative responses of lymphocytes, production of Gr-B, IFN-γ, IL-4 and IL-17 cytokines and total antibody titer in comparison with the none targeted groups.

Conclusion: It is concluded that targeting of protein antigens to DEC-205+dendritic cells significantly enhances immune responses in compare to non-targeting strategies.

Keywords: DEC-205, Dendritic cell targeting, Multi epitopic recombinant protein**,** Vaccine

*Corresponding Author:
Address: Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: ebtekarm@modares.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۷، شماره ۹ (شماره پیاپی ۹۰)، آذر ۱۳۹۳، ۵۸-۴۶

بررسی ایمنی‌زایی واکسن کاندید هدفمند و چند اپی‌توپی HIV-۱ در موش‌های بالب سی

رقیه رحیمی[۱]، مهدی مهدوی[۲]، معصومه ابتکار[۳*]

۱- دانشجوی دکترای ایمنی شناسی پزشکی، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه ایمنی شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: تحویل مستقیم آنتی‌ژن به سلول‌های دندریتیک موجب تقویت پاسخ‌های ایمنی می‌شود و راهکاری مناسب در مبارزه علیه پاتوژن‌های موتاژنی نظیر HIV می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی پاسخ‌های ایمنی حاصل از تحویل مستقیم پروتئین نوترکیب چنداپی‌توپی tat/pol/gag/env ویروس HIV-۱ با کمک آنتی بادی منوکلونال علیه DEC-۲۰۵ موجود در سطح سلول‌های دندریتیک موش جهت تقویت پاسخ‌های ایمنی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، پروتئین نوترکیب حاصل از بیان پلاسمید pET23a-HIVtop4 حاوی سکانس Tat۱-۲۰، ENV۵۷۷-۶۱۰، Pol۱۵۰-۱۹۰، ENV۲۹۶-۳۲۳، Gag۱۵۸-۱۸۶ و Tat۴۴-۶۱ در سویه اشرشیاکلی BL۲۱ به عنوان واکسن مدل استفاده شد. به منظور به‌کارگیری ویژگی‌های سلول‌های دندریتیک در روند ایمنی زایی، پروتئین نوترکیب به روش شیمیایی به آنتی‌بادی علیه گیرنده DEC-۲۰۵ کونژوگه گردید. موش‌های بالب سی به صورت زیرپوستی با فرم کونژوگه یا غیرکونژوگه (کنترل) پپتید HIVtop۴ به همراه Poly I:C به عنوان عامل بلوغ سلول‌های DC، ایمونیزه شدند. تکثیر سلولی به روش برومو دی یوریدین، پاسخ سیتوتوکسیسیتی با اندازه‌گیری گرآنزیم B، اینترلوکین‌های ۴ و ۷، اینترفرون گاما و آنتی بادی توتال به ترتیب با روش الیزای مستقیم و غیر مستقیم سنجیده شدند.

یافته‌ها: ایمونیزاسیون با پپتید متصل به آنتی بادی علیه DEC-۲۰۵ در مقایسه با گروه‌های کنترل موجب افزایش قابل ملاحظه در پاسخ‌های تکثیری، سیتوتوکسیسیتی، تولید اینترلوکین‌های ۴ و ۷، اینترفرون گاما و نیز تیتر آنتی بادی توتال گردید.

نتیجه‌گیری: تحویل مستقیم آنتی ژن پروتئینی مورد نظر به سلول‌های دندریتیک + DEC-۲۰۵، در مقایسه با گروه‌های کنترل موجب افزایش قابل توجه پاسخ‌های ایمنی می‌شود.

واژگان کلیدی: DEC-۲۰۵، هدف‌گیری سلول دندریتیک، پروتئین چنداپی‌توپی نوترکیب، واکسن

***نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی پزشکی
Email: ebtekarm@modares.ac.ir

مقدمه

ویروس HIV-۱ یکی از اعضای خانواده لنتی ویروس (lentivirus) از رتروویروس‌های حیوانی است که باعث ایجاد سندرم نقص ایمنی اکتسابی، تضعیف شدید سیستم ایمنی و ابتلای فرد به عفونت‌های فرصت طلب و سرطان می‌شود و هنوز واکسن مناسبی علیه آن وجود ندارد(۱). محققین استراتژی‌های متعددی را برای بهبود پاسخ‌های ایمنی واکسن‌های طراحی شده به‌کار برده‌اند. یکی از این راه حل‌ها تقویت توانایی بالقوه سلول دندریتیک (Dendritic Cell-DC) در عرضه آنتی‌ژن به سلول‌های T بکر و آغاز پاسخ‌های ایمنی می‌باشد(۲). از راهکارهای مناسب برای استفاده از خصوصیات بیولوژیک DC در استراتژی واکسیناسیون، ارائه مستقیم (in sito) آنتی‌ژن مورد نظر در واکسن به زیر رده مشخصی از این سلول‌ها است و مزیت این روش که در آن کونژوگه حاصل از اتصال آنتی‌ژن مورد نظر به آنتی‌بادی اختصاصی علیه گیرنده اندوسیتوزی اختصاصی سلول DC، به عنوان واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد، کاهش چشم‌گیر دوز مورد نیاز واکسن و بهبود پاسخ‌های ایمنی به دلیل دسترسی مستقیم سلول DC به آنتی‌ژن می‌باشد(۳). در واقع ارائه اختصاصی (specific targeting) آنتی‌ژن به سلول دندریتیک موجب بهبود تکثیر کلونی در سلول‌های T و در نتیجه بهبود پاسخ‌های ایمنی وابسته به سلول T می‌گردد(۴). در این حالت میزان تحویل آنتی‌ژن به سلول‌های +TCD۸ و +TCD۴ حدود ۱۰۰ مرتبه یا بیشتر افزایش می‌یابد(۵). ارائه آنتی‌ژن واکسن با هدف‌گیری سلول‌های CD۸+ DCs +DEC-۲۰۵ موش که به طور ترجیحی در ناحیه T بافت‌های لنفاوی موش قرار دارند، موجب القای پاسخ‌های T سیتوتوکسیک قوی می‌گردد که در جلوگیری از عفونت‌های ویروسی کمک کننده است و در صورتی که با ادجوانت مناسبی که موجب القای بلوغ در سلول دندریتیک گردد، تزریق شود، پاسخ هومورال مناسبی نیز القا می‌کند. این دسته از سلول‌های دندریتیک توانایی عرضه آنتی‌ژن از هر دو مسیر MHC کلاس I و II را دارند و لذا موجب بهبود تکثیر کلونال سلول‌های لنفوسیتی کشنده و کمکی می‌گردند(۸-۶). گیرنده DEC-۲۰۵ یک گیرنده اندوسیتوزی شامل ۱۰ دومن شبه لکتینی مجزاست و در برداشت و تحویل مولکول‌های حاوی گروه‌های کربوهیدراتی به محل پردازش در درون سلول دندریتیک نقش مهمی دارد(۹). در استراتژی واکسیناسیون بر اساس DC targeting، اساسا نیاز به ادجوانت‌هایی است که بلوغ و فعال‌سازی سلول DC را تقویت (boost) کنند. چون تحویل (Delivery) آنتی‌ژن به سلول DC نابالغ منجر به تولرانس یا بی‌پاسخی به آنتی‌ژن می‌گردد(۱۰). مطالعات نشان داده‌اند، سلول‌های دندریتیکی CD۸+ DEC-۲۰۵+ موجود در طحال موش، گیرنده TLR۳ را به فراوانی بیان می‌کنند(۱۱). Poly I:C به عنوان آنالوگ سنتتیک TLR۳، با ایفای نقش ادجوانتی موجب افزایش مارکرهای بلوغ نظیر CD۸۰ و CD۸۶ بر سطح DC می‌شود(۷). تحویل آنتی‌ژن به DEC-۲۰۵ در سطح سلول DC در حضور Pol I:C به عنوان ادجوانت، به بلوغ سلول دندریتیک و در نتیجه پاسخ‌های لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک (Cytotoxic T Lymphocyte-CTL) و تولید آنتی‌بادی وابسته به سلول Tfh (T follicular helper) ختم می‌شود(۲، ۱۰، ۱۲، ۱۳). در تحقیقات گذشته محققین این مقاله، توالی HIVtop۴ که در انتهای کربوکسیل حاوی دنباله هیستیدین (HIS-tag) است، توسط ابزارهای ایمونوانفورماتیک طراحی و ساخته شد و پس از کلون نمودن در پلاسمید pET23a، بیان آن در سلول‌های اشرشیاکلی (DE3) BL۲۱ بهینه گردید. به دنبال تایید بیان پروتئین توسط وسترن بلات علیه دنباله هیستیدین، تخلیص پروتئین مذکور توسط افنیتی کروماتوگرافی با ستون Ni-NTA انجام گرفت(۱۴). در مطالعه حاضر پپتید نوترکیب تخلیص شده که وزن مولکولی حدود ۲۳ کیلودالتون دارد، به صورت شیمیایی به آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ و آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل متصل گردید. هدف این مطالعه ارزیابی پاسخ‌های ایمنی حاصل از تحویل هدفمند پروتئین نوترکیب tat/pol/gag/env HIV-۱ از طریق آنتی‌بادی اختصاصی علیه DEC-۲۰۵ (کلون

NLDC۱۴۵) به سلول‌های دندریتیک و مقایسه آن با پاسخ‌های ایمنی حاصل از تزریق پروتئین نوترکیب مذکور در حالت غیرکونژوگه به آنتی‌بادی در موش‌های بالب سی (Balb/c) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی برای کونژوگاسیون پروتئین نوترکیب HIVtop۴ تخلیص شده به آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ (Rat anti mouse ۱۴۵ DEC-205; IgG2a, clone NLDC) یا آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل (RTK۲۷۵۸) (Biolegend, USA) از روش تشکیل باز شیف و اکسیداسیون-احیا مطابق با روش استاندارد استفاده گردید(۱۵). به طور خلاصه ابتدا هر دو آنتی‌بادی به کمک ۲-مرکاپتواتانول ۱۰۰ میلی‌مولار (سیگما آلدریچ) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه احیا شدند. پس از دیالیز، آنتی‌بادی‌های منووالان حاصل در گروه‌های کربوهیدرات موجود در انتهای کربوکسیل خود به منظور تولید گروه‌های فعال آلدئیدی با کمک پریودات سدیم اکسیده شد و پریودات اضافی به کمک دیالیز از محیط واکنش حذف گردید. پروتئین HIVtop۴ (۲۳ کیلوداتون) به آنتی‌بادی‌های دستکاری شده اضافه گردید. محلول ۵ مولار سدیم بروهیدرید (سیگما آلدریچ) به عنوان عامل احیا کننده به محیط واکنش اضافه شد تا تشکیل ماده حد واسط باز شیف و در نتیجه فرایند کونژوگاسیون تسهیل شود. دیالیز در بافر PBS انجام گرفت و حذف پروتئین کونژوگه نشده توسط فیلتر آمیکون (cut off۵۰KD) (میلیپوت آلمان) انجام و نتیجه آن توسط SDS-PAGE و وسترن بلات علیه دنباله هیستیدین موجود در ساختار پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفت. در این فرایند کونژوگاسیون نسبت مولی آنتی‌بادی‌ها به پروتئین HIVtop۴ به کار رفته، ۱ به ۶ بود.

حیوانات و روش تزریق: ۲۴ سر موش نژاد خالص Balb/c ماده ۶ تا ۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور (تهران، ایران) خریداری شد. قبل از هر گونه آزمایشی بر روی حیوان، موش‌ها به مدت یک هفته بدون محدودیت دسترسی به آب و غذا و در شرایط دمایی ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه خواب و بیداری مناسب (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد نگهداری شدند و تمامی آزمایشات مطابق پروتکل نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران (با کد اخلاقی۱۸۰۲۲-۱۵۹-۰۱-۹۱) انجام گرفت. موش‌ها به تعداد ۴ موش در هر قفس نگهداری شدند و هر قفس مربوط به یک گروه آزمایشی مجزا بود. در مجموع ۴ گروه موش در مطالعه وجود داشت. گروه اول شامل سه زیر گروه که پروتئین نوترکیب را در فرم غیر کونژوگه و در دوزهای ۲، ۴ و ۸ میکروگرم (به ترتیب زیر گروه اول تا سوم) دریافت کردند، گروه دوم پروتئین ریکامبینانت را در فرم کونژوگه با آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ (NLDC145, Biolegend، آلمان) در دوز ۲ میکروگرم دریافت نمود. گروه سوم پروتئین نوترکیب را در فرم کونژوگه با آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل (BiolegendRTK2758 ،، آلمان) و در دوز ۸ میکروگرم دریافت نمود. به این سه گروه به طور هم‌زمان ۵۰ میکروگرم poly I:C (Invivogen، آلمان) نیز تزریق شد. گروه چهارم به عنوان گروه کنترل ادجوانت، فقط poly I:C به مقدار ۵۰ میکروگرم دریافت نمود. تزریقات به صورت زیرپوستی (SC)، دو بار با فاصله یک هفته از هم و در حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر انجام گرفت و حیوانات در هفته سوم پس از خون‌گیری از ناحیه رترو- اربیتال (Retro-orbital area) چشم، به روش قطع نخاع کشته شدند. سرم نمونه‌های خون با انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت ۹۰ دقیقه و سپس سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ به مدت ده دقیقه تهیه و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری شد.

استخراج سلول‌های طحال موش: یک هفته پس از ایمونیزاسیون نهایی، طحال موش‌ها خارج و پس از له شدن در بافر فسفات استریل حاوی ۲ درصد FBS (سیگما آلدریچ -آلمان)، گلبول‌های قرمز به کمک بافر لیز (۰/۸درصد NH4CL و ۲ درصد Tris-base ، pH۷/۵)

تخریب شدند. تعداد سلول‌های سوسپانسیون تک سلولی حاصل برای تمامی آزمایشات به کمک محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ (آلمان، Gibco) غنی شده با ۱۰ درصد FBS، ۴ میلی مول L- گلوتامین، ۱ میلی مول سدیم پیرووات، ۵۰ میکرومولار ۲- مرکاپتواتانول، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین و همین مقدار پنی‌سیلین (سیگما آلدریچ-آلمان) در تعداد ۲۰×۱۰^{۶} سلول تنظیم شد(۱۶).

سنجش تکثیر لنفوسیت‌ها: یک هفته پس از ایمونیزاسیون نهایی، به هر چاهک از پلیت کشت ۹۶ خانه‌ای مناسب (آلمان، Greiner)، ۳×۱۰^{۵} سلول طحالی در محیط کشت غنی RPMI-۱۶۴۰ اضافه شد و سلول‌ها با ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از پروتئین نوترکیب تحریک شدند. از فیتوهماگلوتینین(Phytohemagylutinin-PHA، آلمان-Gibco) به میزان ۵ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان کنترل مثبت، چاهک‌های تحریک نشده با آنتی‌ژن به عنوان کنترل منفی و محیط کشت کامل فاقد سلول به عنوان بلانک استفاده شد و تمامی آزمایشات ۳ بار تکرار شد. پس از ۷۲ ساعت کشت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نشانگر Brdu (۵-برومو-۲-دزوکسی-یوریدین، آلمان، Roche) به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و کشت تا ۱۸ ساعت آینده ادامه پیدا کرد. پلیت‌ها سانتریفیوژ (۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰g) و محیط کشت کاملا تخلیه و پلیت به طور کامل خشک شد و ۱۰۰ میکرولیتر بافر فیکساسیون/نفوذپذیری به هر چاهک اضافه گردید. پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی علیه Brdu به هر چاهک و انکوباسیون، پلیت‌ها چهار بار شسته شده و محلول TMB(تترامتیل بنزیدین، رازی طب، ایران) در شرایط تاریکی به چاهک‌ها افزوده شد. توقف واکنش با ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ نرمال انجام شد و میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اسپکتروفتومتر الایزا ریدر قرائت گردید. شاخص تحریک (SI) مطابق فرمول جذب نوری چاهک‌های تحریک شده/ جذب نوری چاهک‌های تحریک نشده حساب شد(۱۴).

سنجش پاسخ‌های سیتوتوکسیک در شرایط برون تنی: یک هفته پس از آخرین ایمونیزاسیون، ۲×۱۰^{۶} سلول طحالی در محیط کشت غنی RPMI-۱۶۴۰ به هر چاهک از پلیت کشت ۹۶ خانه‌ای مناسب اضافه شد و سلول‌ها با ۱۰ میکرگرم پپتید نوترکیب تحریک شدند. از PHA به عنوان کنترل مثبت، چاهک‌های تحریک نشده به عنوان کنترل منفی و محیط کشت کامل به عنوان بلانک استفاده شد و تمامی آزمایشات ۳ بار تکرار شد. پس از ۴۸ ساعت کشت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2، مایع رویی تمامی چاهک‌ها در اپندورف جمع‌آوری و با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی از رسوب سلولی با احتیاط جدا شد و در اپندورف مجزایی تا زمان آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۱۶). سنجش میزان گرآنزیم b تولید شده به کمک کیت الایزای تجاری (آمریکا، Mouse Granzyme B, System R&D) مطابق با پروتکل آن اندازه‌گیری و میزان فعالیت سایتوتوکسیسیتی با کسر نتیجه چاهک تحریک نشده از نتیجه چاهک تحریک شده با آنتی‌ژن به دست آمد.

اندازه‌گیری اینتر لوکین ٤ و ۱۷ (Interlukine-IL) و اینترفرون گاما (Interferon-γ -IFN.) به روش الایزا: یک هفته پس از آخرین ایمونیزاسیون، تعداد ۳×۱۰^{۶} سلول طحالی در محیط کشت غنی RPMI-۱۶۴۰ به هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه‌ای ریخته شد و سلول‌ها توسط ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پپتید نوترکیب تحریک شدند. پس از ۷۲ ساعت کشت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2، مایع رویی چاهک‌ها پس از سانتریفیوژ با دور ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه، جمع‌آوری و تا زمان سنجش سایتوکاین‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند(۱۷). سنجش هر یک از سایتوکاین‌ها با استفاده از کیت الایزای تجاری (آمریکا، R&D System, Quantikine) مطابق با پروتکل آن اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری توتال آنتی‌بادی به روش الایزا:

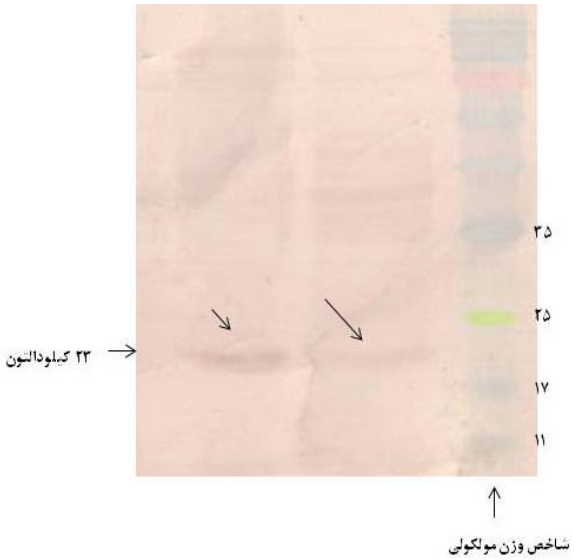
برای سنجش آنتی‌بادی اختصاصی پپتید نوترکیب، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر پپتید مورد نظر در بافر PBS به چاهک‌های پلیت الایزای ۹۶ خانه‌ای اضافه و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس با بافر شستشو (PBS حاوی۰/۰۵ درصد Tween- ۲۰) شستشو داده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با بافر مسدود کننده (PBS حاوی ۵ درصد شیر خشک فاقد چربی) انکوبه شد. پس از شستشوی مجدد به چاهک‌های مورد نظر ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های۱/۱۰ تا ۱/۱۲۸۰ سرم اضافه و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. چاهک‌ها ۵ بار شستشو داده شدند و به آنها ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۱/۱۰۰۰۰ آنتی‌بادی متصل به HRP اختصاصی IgG موش (آلمان، سیگما) اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. چاهک‌ها ۵ بار دیگر شستشو داده شدند و به آنها ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB در تاریکی اضافه شد. واکنش با اسید سولفوریک ۲ نرمال متوقف و شدت جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد(۱۶).

تمامی آزمایشات سه بار تکرار شدند و برای مقایسه بین گروه‌ها از آنالیز آنووای یک طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد و همه داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شد و سطح معنی داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

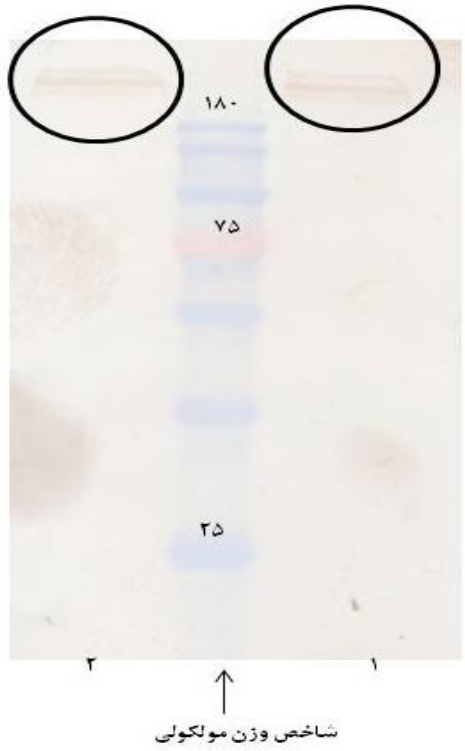
یافته ها

بررسی کونژوگاسیون پروتئین نوترکیب $HIV\text{-}1_{tat/env/pol/gag}$ با آنتی بادی‌های منوکلونال:

نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات در مطالعه قبلی بیان پروتئین HIVtop۴، نشان می‌دهد که پروتئین مذکور در وزن مولکولی ۲۳ کیلودالتون بیان می‌شود(شکل ۱). در مطالعه حاضر پس از کونژوگاسیون پروتئین HIVtop۴ با هر یک از آنتی‌بادی‌ها، نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات علیه دنباله هیستیدین پروتئین نشان داد که اسمیری از کونژوگه پروتئین-آنتی‌بادی در وزن مولکولی بالای ۱۸۰ کیلودالتون تشکیل می‌شود(شکل ۲).



شکل ۱. نتیجه وسترن بلات علیه دنباله هیستیدین موجود در ناحیه کربوکسیل پروتئین HIVtop۴. فلش‌ها محل پروتئین HIVtop۴ را نشان می‌دهند.

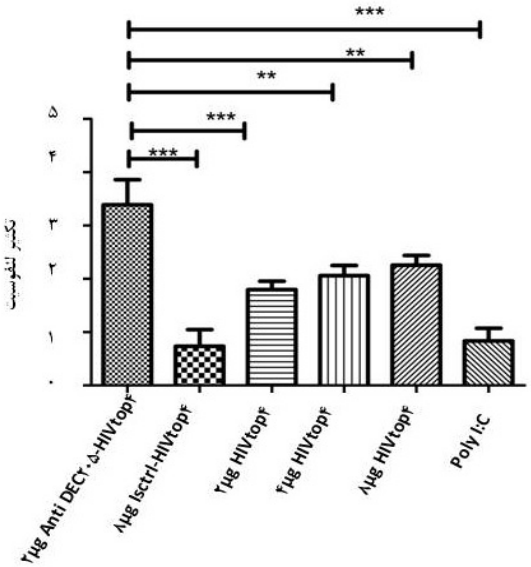


شکل ۲. نتیجه وسترن بلات محصول کونژوگاسیون پروتئین HIVtop۴ به فرم منووالان آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ و ایزوتایپ کنترل RTK۲۷۵۸. وسترن بلات علیه توالی هیستیدین موجود در ساختار پروتئین HIVtop۴ انجام شد.

ردیف ۱ و ۲ به ترتیب مربوط به فرم کونژوگه پروتئین با آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ و ایزوتایپ کنترل RTK۲۷۵۸ می‌باشد و دایره‌ها محل کونژوگه‌ها را نشان می‌دهند.

بررسی پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌ها:

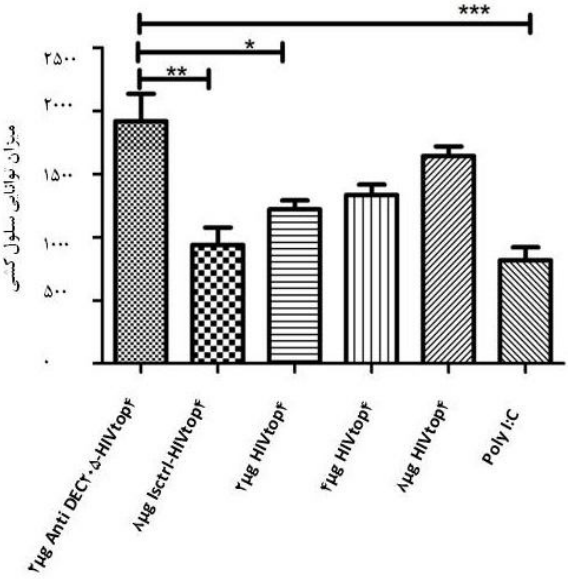
یافته‌ها نشان دادند در ایمن سازی با پروتئین کونژوگه شده به آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ ، پاسخ‌های تکثیری تقویت می‌شود(نمودار ۱). به گونه‌ای که پاسخ‌های تکثیری در حیواناتی که ۲ میکروگرم پروتئین کونژوگه شده به آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ را دریافت کردند، در مقایسه با گروهی که ۲ میکروگرم پروتئین غیرکونژوگه دریافت کرده بود، اختلاف بسیار معنی‌دار($p<۰/۰۰۱$) و با گروه‌هایی که دوزهای ۴ و ۸ میکروگرم از پروتئین غیرکونژوگه را دریافت کرده بودند، اختلاف معنی‌دار بالا ($p<۰/۰۱$) نشان داد. هم‌چنین گروه‌هایی که پپتید متصل به آنتی‌بادی کنترل یا polyI:C تنها دریافت کرده بودند، پاسخ تکثیری نداشتند.



نمودار ۱. مقایسه پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌ها در گروه‌های مختلف با روش Brdu. میزان تکثیر لنفوسیتی به صورت شاخص تحریک (SI) نشان داده شده است و نمودار شامل میانگین±انحراف معیار است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، گروهی که پروتئین کونژوگه با آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ را دریافت کرده پاسخ تکثیری بالاتری نسبت به سایر گروه‌ها نشان داده است. (*، ** و * به ترتیب نشان دهنده $p<۰/۰۵$ ، $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$ می‌باشند). anti DEC۲۰۵-HIVtop۴ : پروتئین کونژوگه با آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵، Isctrl-HIVtop۴: پروتئین HIVtop۴ متصل به آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل.**

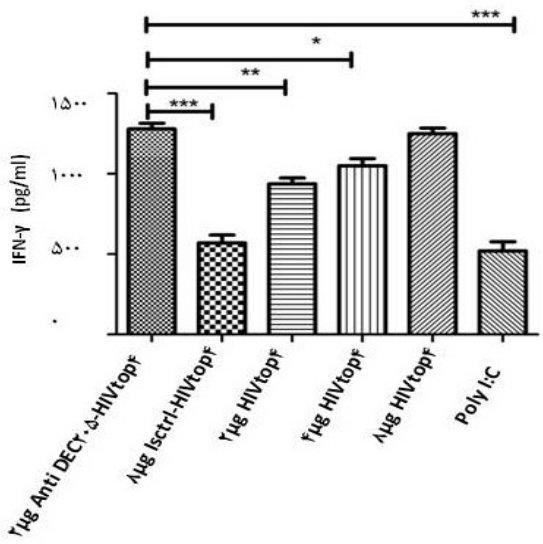
بررسی پاسخ‌های سیتوتوکسیسیتی:

سنجش پاسخ‌های سیتوتوکسیسیتی در این مطالعه به روش الایزای گرآنزیم b انجام گرفت. نتایج نشان داد توانایی سلول‌کشی در گروهی که ۲ میکروگرم پروتئین کونژوگه شده به آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ را دریافت کرده بودند، به صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) نسبت به گروه که دوز ۲ میکروگرم از پروتئین غیرکونژوگه را دریافت کرده بود، بالا بود ولی نسبت به گروه‌هایی که دوزهای ۴ و ۸ میکروگرم از پروتئین غیرکونژوگه را دریافت کرده بودند، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت(نمودار ۲).

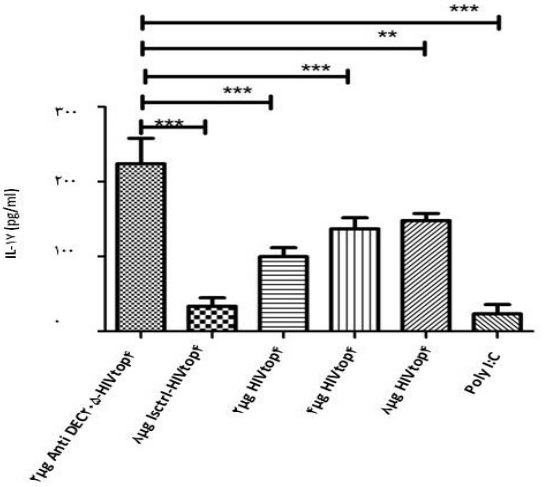


نمودار ۲. بررسی پاسخ‌های سیتوتوکسیسیتی به روش الایزای گرآنزیم b. میزان توانایی سلول‌کشی به صورت شاخص تحریک (SI) نشان داده شده‌اند. ملاحظه می‌شود که میزان سایتوتوکسیسیتی در گروهی که با پروتئین متصل به آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ ایمونیزه شده‌اند، در مقایسه با تمامی گروه‌ها به جز گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۴ و ۸ میکروگرم پپتید، بالاتر است. نتایج به صورت شاخص تحریک (SI) نشان داده شده‌اند و نمودار شامل میانگین±انحراف معیار است. (*، ** و * به ترتیب نشان دهنده $p<۰/۰۵$ ، $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$ می‌باشند). anti DEC۲۰۵-HIVtop۴ : پروتئین کونژوگه با آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ ، Isctrl-HIVtop۴: پروتئین HIVtop۴ متصل به آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل.**

بررسی تولید سایتوکاین‌های اینترفرون گاما، اینترلوکین-۱۷ و اینترلوکین-٤: بررسی میزان تولید هر سه سایتوکاین به روش الایزا انجام گرفت و نتایج نشان داد که میزان تولید IFN- γ در گروهی که پروتئین کونژوگه شده به آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ را دریافت کرده بودند، به صورت بسیار معنی‌داری($p<۰/۰۰۱$) نسبت به گروه‌های دریافت کننده poly I:C یا پپتید متصل به آنتی‌بادی کنترل، به صورت معنی‌دار بالا ($p<۰/۰۱$) نسبت به گروه دریافت کننده دوز ۲میکروگرم پروتئین غیر کونژوگه و به صورت معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) نسبت به گروه دریافت کننده دوز ۴ میکروگرم پروتئین غیر کونژوگه بالا بود، ولی هیچ تفاوت معنی‌داری بین این گروه با گروهی که ۸ میکروگرم از پروتئین غیر کونژوگه دریافت کرده بودند، مشاهده نشد (نمودار ۳- الف). در مورد سایتوکاین IL-۱۷ میزان تولید این سایتوکاین در گروهی که پروتئین کونژوگه شده به آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ را دریافت کرده بودند، به صورت بسیار معنی‌داری($p<۰/۰۰۱$) نسبت به گروهی که دوز ۲ و ۴ میکروگرم از پروتئین غیر کونژوگه دریافت کرده بودند، و هم‌چنین گروه‌های دریافت کننده poly I:C یا پپتید متصل به آنتی‌بادی کنترل بالا بود. میزان تولید این سایتوکاین در گروه مذکور در مقایسه با گروه دریافت کننده دوز ۸ میکروگرم اختلاف معنی‌دار بالا ($p<۰/۰۱$) نشان داد (نمودار ۳-ب). نتایج حاصل از بررسی تولید سایتوکاین IL-۴ اختلاف بسیار معنی‌داری($p<۰/۰۰۱$) بین گروهی که پروتئین کونژوگه شده به آنتی‌بادی علیه ۲۰۵-DEC را دریافت کرده بودند با گروه دریافت کننده دوز ۲ میکروگرم پروتئین غیرکونژوگه و اختلاف معنی‌دار($p<۰/۰۵$) نسبت به گروه دریافت کننده دوز ۴ میکروگرم پروتئین غیر کونژوگه نشان داد ولی اختلاف معنی‌داری با گروه دریافت کننده ۸ میکروگرم پروتئین غیر کونژوگه وجود نداشت (نمودار ۳-ج).

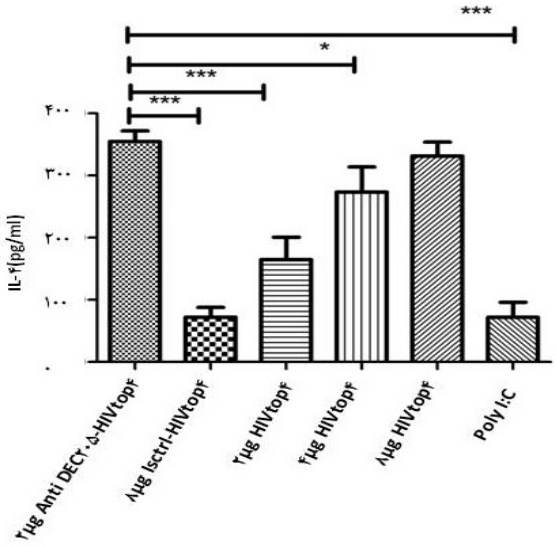


نمودار ۳. الف- بررسی میزان تولید سایتوکاین اینترفرون گاما به روش الایزا. نمودار شامل میانگین±انحراف معیار است. نتایج حاکی است که اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان تولید این سایتوکاین (پیکوگرم در هر میلی‌لیتر) بین گروهی که پروتئین کونژوگه شده به آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ را دریافت کرده بود، نسبت به تمامی گروه‌ها به جز گروهی که با ۸ میکروگرم از پروتئین ایمونیزه شده بود، وجود دارد. (*، ** و * به ترتیب نشان دهنده $p<۰/۰۵$ ، $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$ می‌باشند). anti DEC۲۰۵-HIVtop۴ : پروتئین کونژوگه با آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ ، Isctrl-HIVtop۴: پروتئین HIVtop۴ متصل به آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل.**



نمودار ۳. ب- بررسی میزان تولید سایتوکاین IL-۱۷ به روش الایزا. نمودار شامل میانگین±انحراف معیار است و میزان تولید سایتوکاین بر اساس پیکوگرم در میلی‌لیتر محاسبه شده است. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروهی که پروتئین کونژوگه شده به آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ را دریافت کرده بودند، نسبت به تمامی گروه‌ها وجود دارد. (*، ** و * به ترتیب نشان دهنده $p<۰/۰۵$، $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$**

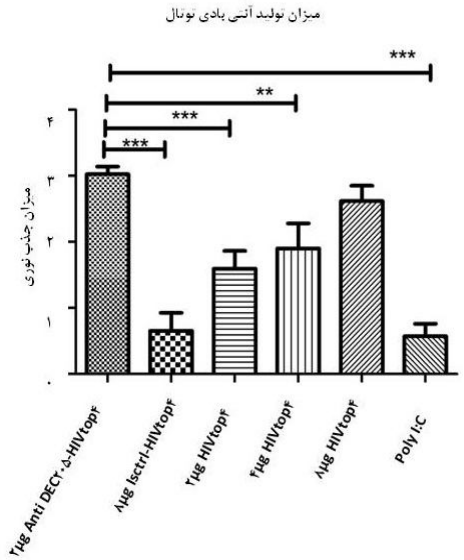
می‌باشند). anti DEC۲۰۵-HIVtop۴ : پروتئین کونژوگه با آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵، Isctrl-HIVtop۴: پروتئین HIVtop۴ متصل به آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل.



نمودار ۳. ج- بررسی میزان تولید سایتوکاین IL-۴ به روش الایزا. نمودار شامل میانگین±انحراف معیار است. . نتایج حاکی است که اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان تولید این سایتوکاین (پیکوگرم در هر میلی‌لیتر) بین گروهی که پروتئین کونژوگه شده به آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ را دریافت کرده بود، نسبت به تمامی گروه‌ها به جز گروهی که با ۸ میکروگرم از پروتئین ایمونیزه شده بود، وجود دارد. (*، ** و * به ترتیب نشان دهنده p<۰/۰۵ ، p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱ می‌باشند). anti DEC۲۰۵-HIVtop۴ : پروتئین کونژوگه با آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ ، Isctrl-HIVtop۴: پروتئین HIVtop۴ متصل به آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل.**

بررسی تولید آنتی‌بادی توتال: سنجش

میزان توتال آنتی‌بادی که به روش الایزا انجام پذیرفت، نشان داد که از لحاظ تولید توتال آنتی‌بادی، اختلاف بسیار معنی‌داری بین گروهی که پروتئین کونژوگه شده به آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ را دریافت کرده بودند با گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۲ و ۴ میکروگرم پروتئین غیرکونژوگه (p<۰/۰۱) وجود داشت ولی اختلاف معنی‌داری با گروه دریافت کننده دوز ۸ میکروگرم پروتئین غیرکونژوگه وجود نداشت. هم‌چنین اختلاف بسیار معنی‌دار(p<۰/۰۰۱) بین این گروه با گروه‌های دریافت کننده poly I:C یا پپتید متصل به آنتی‌بادی کنترل وجود داشت (نمودار ۴).



نمودار ۴. بررسی وضعیت تولید آنتی‌بادی توتال (رقت ۱:۱۰) به روش الایزا. نمودار شامل میانگین±انحراف معیار است. نتایج حاکی است که اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان تولید آنتی‌بادی توتال بین گروهی که پروتئین کونژوگه شده به آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ را دریافت کرده بود، نسبت به تمامی گروه‌ها به جز گروهی که با ۸ میکروگرم از پروتئین ایمونیزه شده بود، وجود دارد. (*، ** و * به ترتیب نشان دهنده p<۰/۰۵ ، p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱ می‌باشند). anti DEC۲۰۵-HIVtop۴ : پروتئین کونژوگه با آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ ، Isctrl-HIVtop۴: پروتئین HIVtop۴ متصل به آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل.**

بحث

با پیدایش بیماری ایدز و شناخت عامل و ساختار ژنتیکی آن تحقیقات گسترده‌ای در زمینه ساخت واکسن موثر ضد ایدز صورت گرفت ولی با وجود تمامی تحقیقات، هنوز واکسن موثری برای HIV وجود ندارد. یکی از راه‌های افزایش عمق پاسخ‌های ایمنی علیه HIV به کارگیری واکسن‌های Epitope-based است که در آن چندین اپی‌توپ (اپی‌توپ‌های conserved و ایمونوژن) پشت سر هم قرار می‌گیرند و هر اپی‌توپ موجب القای پاسخ ایمنی قوی‌تر می‌شود(۱۸). از سوی دیگر از آنجایی که سلول‌های DC نقش مهمی در فعال کردن سایر

سلول‌های ایمنی به عهده دارند، تلاش‌های زیادی برای تقویت توانایی‌های بالقوه این سلول و به کارگیری آن در ایجاد پاسخ‌های ایمنی قوی‌تر انجام گرفته است. در مطالعه حاضر از تلفیق راهکارهای مذکور با به کارگیری واکسن Epitope-based و متصل به آنتی‌بادی اختصاصی گیرنده اندوسیتوزی DEC-۲۰۵ در سطح سلول دندریتیک برای تقویت پاسخ‌های ایمنی استفاده گردید. برای این منظور ابتدا برای تولید فرم منووالان آنتی‌بادی‌های مورد مطالعه، از عامل احیاکننده ملایم MESNA که باعث احیای باندهای دی سولفید بین زنجیره‌های سنگین آنتی‌بادی می‌شود(۱۲)، استفاده گردید. در مرحله بعد از آنجایی که هر دو آنتی‌بادی به دلیل بیان در سیستم یوکاریوتی حاوی گروه‌های کربوهیدرات در ناحیه FC هستند، کونژوگاسیون آنتی‌بادی‌ها به پروتئین ۲۳ کیلودالتونی HIVtop۴ به روش آمیناسیون احیایی و تشکیل باز شیف انجام گرفت. در این روش گروه‌های قند موجود در بخش FC آنتی‌بادی، هدف کونژوگاسیون هستند و بخش فعال آنتی‌بادی (Fab) دست نخورده باقی می‌ماند(۱۵). با توجه به نسبت وزن مولکولی آنتی‌بادی (۱۵۰ کیلودالتون) به پروتئین top۴ (۲۳ کیلودالتون)، در فرایند کونژوگاسیون نسبت ۶ مول پروتئین به ۱ مول آنتی‌بادی به کار رفت و نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات تشکیل اسمیرهایی از کونژوگه پروتئین-آنتی‌بادی را در وزن مولکولی بالای ۱۸۰ کیلودالتون نشان داد.

بررسی پاسخ‌های ایمنی در مطالعه حاضرنشان داد واکسیناسیون با پپتید چند اپی‌توپی HIVtop۴ در فرم کونژوگه با آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ موجود در سطح سلول‌های دندریتیک +CD۸ به همراه Poly I:C در مقایسه با پپتید غیرکونژوگه، موجب القای تکثیر بیشتر در سلول‌های طحالی و نیز پاسخ‌های سیتوتوکسیک قوی‌تر که هر دو نشان‌دهنده سطح ایمنی سلولی می‌باشند، می‌گردد. همان‌طور که در نمودار ۱ ملاحظه می‌شود، تزریق ۲ میکروگرم کونژوگه anti DEC۲۰۵-HIVtop۴ حتی نسبت به ۸ میکروگرم پروتئینHIVtop۴ غیرکونژوگه نیز پاسخ تکثیری بهتری ایجاد کرده است. این در حالی است که تزریق کونژوگه ایزوتایپ کنترل -پروتئین با دوز ۸ میکروگرم و Poly I:C پاسخی ایجاد نکرده است. مطلب اخیر نشان می‌دهد که افزایش پاسخ‌های تکثیری به دلیل تحویل بیشتر آنتی‌ژن HIVtop۴ به سلول‌های دندریتیک به واسطه آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵ موجود در ساختار کونژوگه می‌باشد. مطالعه پاسخ‌های سیتوتوکسیک در نمودار ۲ نشان می‌دهد که تزریق ۲ میکروگرم کونژوگه anti DEC۲۰۵-HIVtop۴ فقط نسبت به ۲ میکروگرم پروتئینHIVtop۴ غیرکونژوگه موجب افزایش پاسخ سیتوتوکسیک شده است. بررسی وضعیت پاسخ سیتوتوکسیک پروتئینHIVtop۴ غیرکونژوگه در این مطالعه نشان دهنده این است که اپی‌توپ‌های به کار رفته در ساختار واکسن به لحاظ القای سیتوتوکسیسیتی بسیار موفق هستند و تلفیق به‌کارگیری پروتئین چنداپی‌توپی به همراه تحویل هدفمند به سلول دندریتیک موجب بهبود نسبی پاسخ‌ها شده است. مطالعات گذشته حاکی از آن هستند که تحویل هدفمند آنتی‌ژن به سلول‌های DC به عنوان مهم‌ترین سلول‌های عرضه آنتی‌ژن، موجب افزایش چشم‌گیر تکثیر لنفوسیت‌ها و بهبود پاسخ‌های ایمنی می‌گردد. با این حال بیولوژی برهم‌کنش سلول T-DC بستگی زیادی به نوع سلول دندریتیک دارد. محققین نشان داده‌اند تحویل اختصاصی آنتی‌ژن به سلول‌های DC از زیررده +CD۸+DEC۲۰۵ موجب افزایش تکثیر کلونال سلول‌های T کشنده و کمکی می‌گردد(۱۹). دلیل این بهبود سطح پاسخ، آن است که با به‌کارگیری سیستم هدفمند ارائه آنتی‌ژن توسط آنتی‌بادی علیه DEC-۲۰۵، عرضه آنتی‌ژن به سلول‌های +TCD۴ افزایش و این سلول‌ها با تولید IL-۲ موردنیاز سلول‌های +T CD۸ موجب بهبود پاسخ‌های سیتوتوکسیک می‌گردند(۲۰).

یکی از فاکتورهای مهم در مقاومت به انواع عفونت‌ها تولید سایتوکاین IFN-γ می‌باشد. بررسی تولید IFN-γ در مطالعه حاضر نشان داد میزان این سایتوکاین در سیستم هدفمند عرضه آنتی‌ژن HIVtop۴ که در آن ۲

میکروگرم کونژوگه anti DEC۲۰۵-HIVtop۴ به کار رفته در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش چشمگیری داشته است. دلیل این امر همان‌طور که از مطالعات گذشته استنباط می‌شود، برداشت آنتی‌ژن توسط سلول دندریتیک +۲۰۵-DEC از طریق این گیرنده اندوسیتوزی است که به دنبال دریافت آنتی‌ژن، فعال شده و سایتوکاین IL-۱۲ تولید می‌کند. سایتوکاین مذکور نیز به عنوان کوفاکتوری برای القای تولید IFN- γ که از شاخص‌های مهم القای پاسخ ایمنی سلولی توسط سلول‌های T است، عمل می‌کند(۱۲، ۱۳). هم‌چنین بررسی تولید سایتوکاین IL-۱۷ در موش‌های مورد آزمون نیز نشان داد، این سایتوکاین که توسط نوعی از سلول‌های +TCD۴ به نام Th۱۷ تولید می‌شود و موجب القای تولید مدیاتورهای پیش التهابی و لذا پاسخ‌های سلولی ضد میکروبی می‌گردد(۲۱)، در گروه موشی که واکسن هدفمند دریافت کردند، به مراتب بیشتر از سایر گروه‌ها تولید می‌شود. از آنجایی که تقویت ایمنی سلولی از پارامترهای مهم مقابله با ویروس HIV می‌باشد(۲۰)، لذا نتیجه‌گیری می‌شود که استراتژی به کار رفته در این مطالعه برای بهبود پاسخ‌های ایمنی سلولی بسیار موثر بوده است.

مطالعات در تحویل هدفمند آنتی‌ژن به واسطه گیرنده DEC-۲۰۵ نشان داده‌اند که این روش ایمونیزاسیون موجب القای سلول‌های +T CD۴ مولد IFN-γ و سلول‌های +T CD۸ می‌گردد اما در مطالعه حاضر مقایسه میزان تولید سایتوکاین IL-۴ به عنوان معیار ایمنی هومورال مؤید این نکته بود که سیستم تزریق هدفمند آنتی‌ژن HIVtop۴ موجب بهبود تولید این سایتوکاین و متعاقبا تقویت پاسخ ایمنی هومورال نیز شده است (نمودار ۳ج). ادامه مطالعه با بررسی تولید آنتی‌بادی توتال نیز یافته مذکور را تایید کرد(نمودار ۴). یافته‌های حاصل از این مطالعه در زمینه تولید سایتوکاین IL-۴ مشابه نتایج سیلویا و همکاران و وانگ و همکاران بود(۲، ۲۲). بنابراین به نظر می‌رسد هدف‌گیری سلول‌های دندریتیک موجب القای سلول‌های T کمکی از هر دو نوع ۱ (مولد IFN-γ) و ۲ (مولد IL-۴) می‌شود. از آنجایی که مطالعات در زمینه طراحی واکسن علیه HIV-۱ بر اهمیت پاسخ‌های هومورال و تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علاوه بر پاسخ‌های ایمنی سلولی تاکید می‌کنند(۲۵-۲۳)، نتیجه‌گیری می‌شود به کارگیری آنتی‌ژن چندایی‌توپی HIVtop-۴ در سیستم تحویل هدفمند به سلول‌های دندریتیک +DEC-۲۰۵ در القای پاسخ‌های ایمنی موفق بوده است.

نتیجه گیری

به طور خلاصه مشاهده گردید تحویل مستقیم آنتی‌ژن پروتئینی مورد نظر به سلول‌های دندریتک +۲۰۵-DEC، در مقایسه با گروه‌های کنترل موجب افزایش قابل توجه پاسخ‌های ایمنی می‌شود.

تشکر قدردانی

بدین وسیله از آقای دکتر کیهان آزادمنش مسوول بخش ویروس‌شناسی انستیتو پاستور به دلیل تامین شرایط مساعد کاری پروژه و جناب آقای پروفسورعلی مصطفایی و آقای شهرام پروانه به دلیل همکاری در انجام پروژه قدردانی می‌شود.

منابع

1. Guyader M, Emerman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. Nature. 1986; 326(6114):662-9.

2. Boscardin SB, Hafalla JC, Masilamani RF, Kamphorst AO, Zebroski HA, Rai U, et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. The Journal of experimental medicine. 2006; 203(3): 599-606.

3. Caminschi I, Shortman K. Boosting antibody responses by targeting antigens to dendritic cells. Trends in immunology. 2012;33(2):71-7.

4. Soares H, Waechter H, Glaichenhaus N, Mougneau E, Yagita H, Mizenina O, et al. A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-γ by an IL-12–independent but CD70-dependent mechanism in vivo. The

Journal of experimental medicine. 2007; 204(5): 1095-106.
5. Bozzacco L, Trumpfheller C, Siegal FP, Mehandru S, Markowitz M, Carrington M, et al. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007;104(4):1289-94.
6. Sato K, Fujita S. Dendritic cells: nature and classification. Allergol Int. 2007;56(3):183-91.
7. Trumpfheller C, Longhi MP, Caskey M, Idoyaga J, Bozzacco L, Keler T, et al. Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity. Journal of internal medicine. 2012;271(2):183-92.
8. Wu L, D'Amico A, Hochrein H, O'Keeffe M, Shortman K, Lucas K. Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. Blood. 2001;98(12):3376-82.
9. Kronin V, Wu L, Gong S, Nussenzweig MC, Shortman K. DEC-205 as a marker of dendritic cells with regulatory effects on CD8 T cell responses. International immunology. 2000; 12(5):731-5.
10. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. The Journal of experimental medicine. 2002;196(12):1627-38.
11. Edwards AD, Diebold SS, Slack E, Tomizawa H, Hemmi H, Kaisho T, et al. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8α+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. European journal of immunology. 2003;33(4):827-33.
12. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S-I, Soares H, et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. The Journal of experimental medicine. 2004;199(6):815-24.
13. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. The Journal of experimental medicine. 2001;194(6):769-80.
14. Samira Arabi MRA, Arash Memarnejadian, Fatemeh Kohram, Haniyeh Aghababa, Nima Khoramabadi, Morteza Taghizadeh, et al. Cloning, Expression and Purification of a Novel Multi-epitopic HIV-1 Vaccine Candidate: A Preliminary Study on Immunoreactivity. Vaccine research. 2014;1(1):10-5.
15. Hermanson GT. Bioconjugate Techniques. 2end edition. Academic Press; 2008.
16. Mahdavi M, Ebtekar M, Khorram Khorshid HR, Azadmanesh K, Hartoonian C, Hassan ZM. ELISPOT analysis of a new CTL based DNA vaccine for HIV-1 using GM-CSF in DNA prime/peptide boost strategy: GM-CSF induced long-lived memory responses. Immunology letters. 2011;140(1):14-20.
17. Tebianian M, Hoseini AZ, Ebrahimi SM, Memarnejadian A, Mokarram AR, Mahdavi M, et al. Cloning, expression, and immunogenicity of novel fusion protein of Mycobacterium tuberculosis based on ESAT-6 and truncated C-terminal fragment of HSP70. Biologicals. 2011; 39(3):143-8.
18. Fuller DH, Shipley T, Allen TM, Fuller JT, Wu MS, Horton H, et al. Immunogenicity of hybrid DNA vaccines expressing hepatitis B core particles carrying human and simian immunodeficiency virus epitopes in mice and rhesus macaques. Virology. 2007;364(2):245-55.
19. Den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8+ but not CD8− dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. The Journal of experimental medicine. 2000;192(12):1685-96.
20. Nchinda G, Amadu D, Trumpfheller C, Mizenina O, Überla K, Steinman RM. Dendritic cell targeted HIV gag protein vaccine provides help to a DNA vaccine including mobilization of protective CD8+ T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010; 107(9): 4281-6.
21. Liang SC, Tan X-Y, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed

by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. The Journal of experimental medicine. 2006; 203(10): 2271-9.
22. Wang B, Kuroiwa JM, He LZ, Charalambous A, Keler T, Steinman RM. The human cancer antigen mesothelin is more efficiently presented to the mouse immune system when targeted to the DEC-205/CD205 receptor on dendritic cells. Ann N Y Acad Sci. 2009.
23. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. Journal of virology. 1994; 68(12): 8056-63.
24. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. The Journal of experimental medicine. 1998;188(12):2205-13.
25. Bevan MJ. Helping the CD8+ T-cell response. Nature Reviews Immunology. 2004; 4(8): 595-602.