

## شناسایی اپی توپهای سلولهای T CD4<sup>+</sup> در پروتئین ترشحی MPB51 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در موشهای C57BL/6

دکتر علیرضا رفیعی\*، دکتر یوکیدو کویاده\*\*

دریافت: ۸۴/۲/۲۹، پذیرش: ۸۴/۷/۱۱

### چکیده:

**مقدمه و هدف:** سلولهای T کمکی نوع یک (Th1) و لنفوسیت‌های T CD4<sup>+</sup> نقش بسزایی در برقراری حفاظت مقابل عفونت به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارند. واکسیناسیون با MPB51 موجب بروز پاسخهای سلولی Th1 و برقراری حفاظت در مدل‌های حیوانی توبرکلوزیس می‌شود. هدف از این مطالعه شناسایی اپی توپهای غالب لنفوسیت‌های T از مولکول MPB51 در موشهای C57BL/6 می‌باشد.

**روش کار:** DNA کدکننده مولکول MPB51 ابتدا در پلاسمیدهای pCI کلون گردید. پس از ایجاد گلوله‌های ژنی حاوی ذرات طلای پوشیده شده از ژن MPB51، با استفاده از تفنگ ژنی (Gene gun) موشهای نژاد C57BL/6 واکسیناسیون شدند. دو هفته بعد از آخرین ایمن سازی سلولهای طحالی استخراج شد و در پلیتهای کشت سلولی در حضور یا عدم حضور کتابخانه ای از پپتیدهای هم پوشان سنتتیک حاوی توالی کامل مولکول MPB51 در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰٪ FCS کشت داده شد. تولید IFN- $\gamma$  داخل سلولی و سوپ کشت سلولی به ترتیب با روش فلوسیتومتری و ELISA بررسی گردید.

**نتایج:** تعیین نقشه اپی توپهای سلول T طحالی با تحریک مجدد با پپتیدهای ساختگی ۲۰ اسید آمینه ای کل مولکول MPB51، نشان داد که واکسیناسیون DNA باعث ایجاد پاسخ ایمنی در برابر پپتیدهای ۱۹۰-۲۱۷ و ۲۱۰-۲۱۹ می‌شود. آنالیزهای بیشتر با استفاده از حذف دستجات سلولهای T و آنالیز رقت نشان داد اپی توپهای P1۷۱ و P1۹۱ به ترتیب اپی توپ غالب و نیمه غالب سلول T CD4<sup>+</sup> محدود به مولکولهای H2-A<sup>b</sup> محسوب می‌شود.

**نتیجه نهایی:** واکسیناسیون با DNA پلاسمیدی حاوی مولکول MPB51 علاوه بر آنکه موجب ایجاد پاسخهای اختصاصی سلولهای T CD4<sup>+</sup> می‌گردد، روش مناسبی برای شناسایی پپتیدهای ایمونوژن می‌باشد.

**کلید واژه ها:** اپی توپ سلول تی / سل / شناسایی اپی توپ / موش

### مقدمه:

می‌شود. با این حال کارآیی آن تنها در کنترل مننژیت سلی در کودکان به اثبات رسیده است ولی تاثیر آن در بیماری سل بزرگسالان سوال برانگیز می‌باشد (۲). این امر همراه با بروز پاندمی HIV و افزایش مقاومت چند دارویی در سویه های M.tuberculosis نیاز به واکسن های موثرتر را بیشتر می نماید (۳). گرچه مکانیسمهای حفاظتی در مقابل سل هنوز به خوبی شناخته نشده اند ولی پاسخهای ایمنی سلولی نقش موثری برای کنترل عفونت دارند.

سل یکی از مشکلات اصلی بهداشت عمومی در تمامی کشورها به ویژه کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود بطوریکه تخمین زده می‌شود در سراسر جهان در هر دقیقه ۱۵ نفر به بیماری سل مبتلا و ۶ نفر در اثر این بیماری تلف شوند (۱). ابزارهای موجود برای کنترل بیماری ناکافی بوده به طوریکه BCG، تنها واکسن ضد سل می‌باشد که بطور گسترده در بیشتر کشورها استفاده

\* استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران (rafiei1710@gmail.com)

\*\* استاد گروه ایمونولوژی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی دانشگاه هماماتسو، شیزوکا ژاپن

کننده را در موشهای مواجه شده با *M.tuberculosis* دارد (۲۰). مطالعه حاضر به منظور شناسایی اپی توپهای غالب سلول T در موشهای C57BL/6 با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلاسمیدی انجام گردید.

### روش کار:

**حیوان آزمایشگاهی:** موشهای C57BL/c ماده ۸-۶ هفته ای در شرایط عاری 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 واکنش 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.

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 سایتومگال 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 در برگرفته 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 ساخته شد. انتهای کربوکسیل مولکول به صورت پپتید ۱۲ اسید آمینه ای (۲۵۵ تا ۲۶۶) تهیه گردید. پپتیدهای لیوفلیزه در غلظت یک میلی مولار در محلول ۵٪ دی متیل سولفوکساید (DMSO) در محیط کشت RPMI 1640 حل شده و در ۸۰°C نگهداری شد.

**ایمن سازی موشها:** موشها با استفاده از دستگاه تفنگ ژنی با واکنش DNA پلاسمیدی کد کننده مولکول MPB51 ایمن شدند. برای واکنش پلاسمیدی ژنتیکی با دستگاه تفنگ ژنی گاز هلیوم (آزمایشگاههای Bio-Red هرکولز، کالیفرنیا) گلوله های حاوی ذرات طلای پوشیده شده با DNA پلاسمیدی بر اساس دستور العملهای شرکت تولید کننده، تهیه شد. بدین منظور یک میکروگرم DNA

شواهد متقنی وجود دارد که سلولهای CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T کمکی نوع یک (Th<sub>1</sub>) مهمترین سازوکار حفاظتی در سل می باشد (۴). این سلولها عمدتاً از طریق تولید سیتوکاینهای فعال کننده ماکروفاژها نظیر آنترفرون گاما، در پیدایش مقاومت در برابر بیماری موثرند (۵). علاوه بر آن لنفوسیتهای CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T سیتوتوکسیک (CTL) نیز در پیدایش مقاومت در برابر بیماری سهیمند (۶). موشهای فاقد سلولهای CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T حساسیت بیشتری نسبت به *M.tuberculosis* دارند (۷). سلولهای CTL CD<sub>8</sub><sup>+</sup> انسانی آنتی ژنهای لیپیدی و گلیکولیپیدی دیواره سلولی مایکوباکتریوم را در داخل مولکولهای CD<sub>1</sub> (CD1a, b, c) و مولکولهای MHC کلاس Ib عرضه شده بر روی سلولهای دندریتیک شناسایی می نمایند (۸).

طراحی نسل جدید واکنشهای سل نیازمند دانستن نحوه آرایش آنتی ژنی *M.tuberculosis* می باشد. پروتئینهای ترشحی و سطحی دیواره سلولی باکتری باکتری، نقش به سزایی در برانگیختن ایمنی سلولی موثر در مقابل سل دارند (۹). این پروتئینها، آنتی ژنهایی می باشند که قابلیت ایجاد پاسخهای ایمنی حفاظت دهنده را دارند به همین لحاظ توجه زیادی به تهیه واکنشهای DNA از این آنتی ژنها شده است (۱۰). مطالعات انجام شده در مدل موشی عفونت سل نشان میدهد سلولهای خاطره ای موشهای ایمن شده مقادیر قابل توجهی از IFN- $\gamma$  در پاسخ به دو جزء پروتئینی KDa ۱۰-۶ و کمپلکس آنتی ژنی ۸۵ (Ag85) حاصل از فیلتراسیون کشت مایکوباکتریوم تولید می کنند (۱۱). کمپلکس Ag85 (Ag85A, Ag85B, Ag85C) شامل پروتئینهای ترشحی مایکوباکتریوم می باشد که فعالیت مایکولیل ترانسفرازی در ساخت دیواره باکتری و در بیوسنتز فاکتور طنابی شدن، دارند (۱۲،۱۳). کمپلکس Ag85 موجب برانگیختن سلولهای Th<sub>1</sub> و CTL در افراد مبتلا به *M.tuberculosis* و موشهای آلوده به BCG می شوند (۱۴-۱۷). MPB51 یکی از پروتئینهای اصلی ترشحی می باشد که با سه جزء کمپلکس Ag85 واکنش متقاطع داشته (۱۸) و از نظر ساختمانی نیز ۴۳٪ با آنها تشابه دارد (۱۹). نقش فیزیولوژی پروتئین MPB51 هنوز به خوبی مشخص نشده است. نتایج مطالعات انجام شده با واکنش DNA کد کننده MPB51 نشان می دهد که این پروتئین قابلیت ایجاد پاسخهای سلولی و ایمنی حفاظت

حذف دستجات سلولهای CD<sub>4</sub>T یا CD<sub>8</sub>: بمنظور شناسایی نوع سلولهای T پاسخ دهنده به پپتید، دو هفته بعد از آخرین ایمن سازی با روش جابجایی مهره های گردنی موشها کشته شدند و طحال آنها بطور استریل خارج گردید. طحالهای پنج موش در هر گروه با هم جمع آوری شدند. سلولهای طحالی با استفاده از مش استخراج گردید و به تعداد  $1 \times 10^7$  سلول در هر میلی لیتر محیط کشت در حضور آنتی بادی منوکلونال ضد CD<sub>4</sub> موشی (G1K1.5) یا منوکلونال آنتی بادی ضد CD<sub>8</sub>α موشی (۲-۱۸-۱) یا CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T (MAB۳۵) کشت داده شد تا دستجات سلولهای CD<sub>4</sub><sup>+</sup> یا CD<sub>8</sub><sup>+</sup> از جمعیت سلولهای T طحالی موشهای ایمن حذف شوند. بدین منظور سلولهای طحالی موشهای ایمن پس از انتقال در بافرسیتوتوکسیک (محیط کشت RPMI۱۶۴۰ همراه با بافر ۲۵mM هپس (HEPES) و ۳/۰٪ آلبومین سرم گاوی) حاوی آنتی بادی ضد CD<sub>4</sub> یا ضد CD<sub>8</sub> به مدت یک ساعت در ۴ °C انکوبه گردید. سپس کمپلمان خرگوش (سیدرلان، هورنبی، کانادا) به سوسپانسیون سلولی افزوده شد و به مدت یک ساعت در ۳۷ °C انکوبه شد. در نهایت بعد از شستشو، سلولها در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FCS سوسپانسیون شده و برای آزمایشات بعدی بکار رفتند.

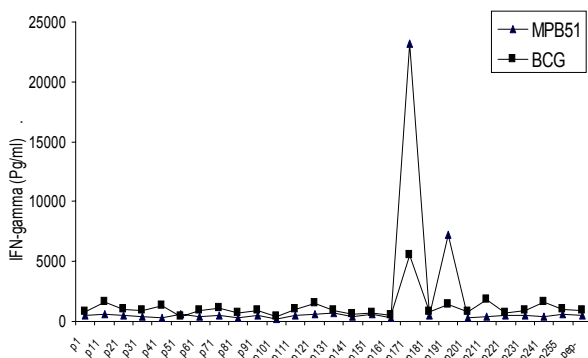
اندازه گیری IFN-γ در داخل سلول: برای شناسایی دسته سلولهای T اختصاصی آنتی ژن، نوع و فنوتیپ سلولهای T و میزان بیان داخل سلولی IFN-γ با استفاده از فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور برای حذف گلبولهای قرمز ابتدا سلولهای طحالی استحصال شده از موشهای ایمن با بافرلیزکننده ACK به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق انکوبه شدند و سپس بعد از دو بار شستشو، به تعداد  $1 \times 10^7$  سلول در میلی لیتر محیط PPMI۱۶۴۰ حاوی ۱۰٪ FCS تنظیم گردید. سلولها به مدت ۵ ساعت در ۳۷ °C 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٪ FCS و ۱٪ آزید سدیدم) شستشو داده و در حضور آنتی بادی ضد CD<sub>8</sub> کونژوگه با FITC و آنتی بادی ضد CD<sub>4</sub> کونژوگه با Cy- chrome به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه گردید. بعد از دو بار شستشو، سلولها با محلول پارا فرمالدئید ۱٪ فیکس شدند. بعد از دوبار شستشو با محلول شستشو، با افزودن

پلاسمیدی روی ۵mg/۰ ذرات طلا چسبانیده شد. موشها هر بار تحت دو شلیک قرار می گرفتند که در هر شلیک ۵mg/۰ ذرات طلا انتقال می یافت. برای ایمن سازی موشها، ابتدا موهای پوست ناحیه شکم تراشیده شد و ناحیه مربوطه با اتانل ۷۰٪ ضد عفونی گردید. سپس لوله تفنگ ژنی را مستقیماً با پوست حیوان تماس داده و آنگاه دستگاه تحت فشار  $40 \text{ Ib/in}^2$  گاز هلیوم شلیک می گشت. موشها چهار بار به فاصله یک هفته در میان با ۲ میکروگرم DNA پلاسمیدی تلقیح شدند.

کشت سلولهای طحالی: دو هفته بعد از آخرین ایمن سازی، با روش قطع نخاع موشها کشته شدند و طحال آنها تحت شرایط استریل جدا گردید. سپس در محیط کشت RPMI1680 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٪ FCS به میزان  $1 \times 10^6$  سلول در هر چاهک پلیتهای ۹۶ چاهگی در حضور ۵μM پپتید در اتمسفر حاوی CO<sub>2</sub> ۵٪ در دمای ۳۷ °C کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد از کشت، مایع روی کشت سلولی جمع آوری و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰ °C - نگهداری شد. غلظت IFN-γ با استفاده از روش الیزای سانویچی (ELISA) اندازه گیری شد.

اندازه گیری IFN-γ در مایع کشت سلولی: برای اندازه گیری IFN-γ پلیتهای ۹۶ چاهگی الیزا با ۲μg آنتی بادی تسخیر کننده (آنتی بادی منوکلونال ضد IFN-γ موشی) در مدت یک شب در ۴ °C پوشانده شدند. بعد از شستشو پلیت با PBS حاوی ۰/۰۵٪ تووین ۲۰، چاهکها با محلول بلوک کننده ACE به مدت ۲ ساعت در ۳۷ °C مسدود گردیدند. بعد از شستشو، نمونه های کشت سلولی و غلظتهای استاندارد IFN-γ به چاهکها افزوده شد و بمدت یک شب در ۴ °C انکوبه گردید. بعد از شستشو، ۵μg/ml از آنتی بادی 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، ۱μg/ml استرپتاویدین کونژوگه با پروکسیداز به پلیتها اضافه گردید و بمدت 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.

MPB51 مقادیر قابل توجهی IFN- $\gamma$  تولید نکردند (داده‌ها نشان داده نشده است). برخلاف تولید مقادیر زیاد IFN- $\gamma$  در موشهای واکسینه شده با DNA، سلولهای طحالی موشهای واکسینه شده با BCG تنها در پاسخ به P171 مقادیر معنی داری IFN- $\gamma$  تولید نمودند.



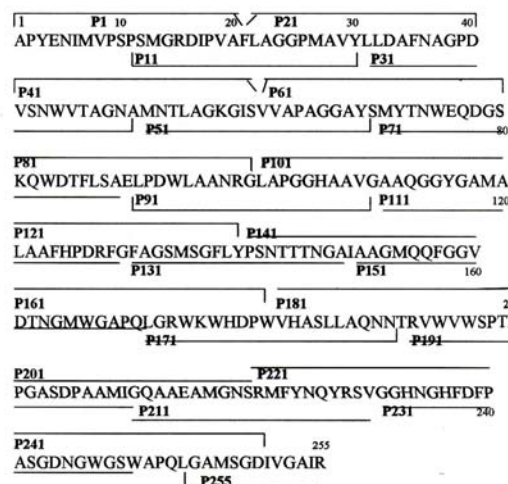
شکل ۲: تولید IFN- $\gamma$  توسط سلولهای طحالی موشهای C57BL/6 ایمن شده با DNA کد کننده MPB51 (ستونهای تیره) یا واکسن BCG (ستونهای سفید) در پاسخ ۵ $\mu$ M از پپتیدهای ۲۰ اسید آمینه ای کل مولکول MPB51 یا محیط کشت تنها (pep<sup>-</sup>). نتایج نشانگر تکرار سه آزمایش مستقل می باشد. همانطور که دیده می شود سلولهای طحالی موشهای ایمن شده با DNA کد کننده MPB51 تنها در برابر پپتیدهای P171 و P191 مقادیر زیادی IFN- $\gamma$  تولید نمودند.

شناسایی اپی توپهای غالب و نیمه غالب Th1 در مولکول MPB21: همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است پپتید P171 و P191 حاوی اپی توپهای سلول T برای موشهای C57BL/6 دارای مولکولهای H-2<sup>b</sup> می باشد. برای تعیین نوع سلولهای T تولید کننده IFN- $\gamma$  آنالیزهای فلوسیتومتری و حذف دستجات لنفوسیتهای T انجام گردید. همان طور که در شکل ۳ دیده می شود حذف CD4<sup>+</sup> T با استفاده از آنتی بادی منوکلونال ضد CD4<sup>+</sup> T و کمپلمان تقریباً موجب از بین رفتن کامل تولید IFN- $\gamma$  در پاسخ به هر دو پپتید P171 و P191 می گردد. با این وجود، حذف سلولهای CD8<sup>+</sup> T با استفاده از آنتی بادی منوکلونال ضد CD8، تاثیر در میزان تولید IFN- $\gamma$  ایجاد نمی نماید. این یافته ها نشان می دهد که هر دو پپتید P171 و P191 شامل اپی توپهای لنفوسیتهای Th1 می باشند. نتایج فوق با استفاده از آنالیز سه رنگی فلوسیتومتری نیز تایید گردید به طوری که تنها سلولهای CD4<sup>+</sup> T قابلیت سنتز IFN- $\gamma$  داخل سلولی را در پاسخ به P171 و همین طور P191 نشان دادند (شکل ۴).

محلول نفوذ پذیر کننده حاوی ساپونین جدار سلولها نفوذ پذیر گردید. آنگاه با افزودن آنتی بادی ضد IFN- $\gamma$  موشی کونژوگه با فیکواریترین و ۲۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی در دمای ۴ °C، سیتوکاین داخل سلولی رنگ آمیزی شد. سرانجام پس از شستشو، سلولها در ۵۰۰  $\mu$ L از بافر FACS سوپاسپانسیون گردیده و با دستگاه فلوسیتومتر دیجیتال EPICS (بکتون- دیکینسون، سانخوزه، کالیفرنیا) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

## نتایج:

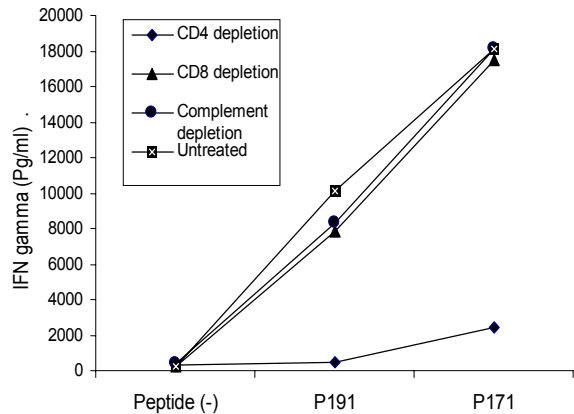
تولید IFN- $\gamma$  در پاسخ به پپتیدهای همپوشان ساختگی مولکول MPB51: سلولهای طحالی موشهای C57BL/6 ایمن شده با واکسن DNA کد کننده مولکول MPB51، با پپتیدهای ۲۰ اسید آمینه ای دارای ۱۰ اسید آمینه هم پوشانی (شکل ۱) تحریک شدند و غلظت IFN- $\gamma$  در سوپ کشت سلولی به وسیله روش ELISA تعیین گردید.



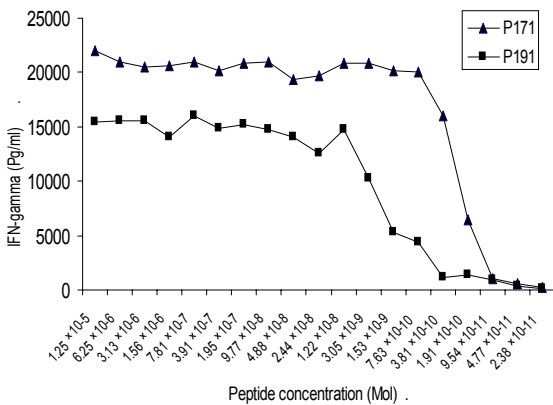
شکل ۱: نمایش شماتیک ۲۶ پپتید ساختگی دارای همپوشانی از مولکول MPB51 باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس. تمام پپتید بصورت مولکولهای ۲۰ اسید آمینه دارای ۱۰ اسید آمینه همپوشانی ساخته شدند تنها انتهای کربوکسیل مولکول بصورت پپتید ۱۲ اسید آمینه ساخته شد.

همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است تنها بعد از تحریک با پپتیدهای P171 (اسید آمینه ۱۷۱ تا ۱۹۰) و P191 (اسید آمینه ۱۹۱ تا ۲۱۰) سلولهای طحالی موشهای C57BL/6 مقادیر قابل توجهی IFN- $\gamma$  تولید کردند. علاوه بر این، پپتید P171 مقدار بیشتری IFN- $\gamma$  نسبت به پپتید P191 ایجاد نمود. همان طور که انتظار می رفت سلولهای T طحالی موشهای بکر (ایمن نشده) در پاسخ به هیچ یک از پپتیدهای کتابخانه پپتیدی مولکول

مولکولهای MHC کلاس دو عرضه می شوند شامل ۳۰-۱۱ اسید آمینه می باشند که نسبت به طول اپی توپهای سلول  $CD8^+$  T بسیار هترورنتر می باشند، تعیین حداقل طول اپی توپهای سلول  $CD4^+$  T انجام نگردید. همان طور که در شکل ۲ و ۳ دیده می شود پپتید P171 میزان بیشتری  $IFN-\gamma$  در مقایسه با P191 در لنفوسیت های T طحالی ایجاد نموده است. به منظور تایید این یافته، سلولهای طحالی موشهای ایمن با رفتهای متوالی از هر دو پپتید تحریک شدند و غلظت  $IFN-\gamma$  در سوپ کشتهای سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. همان طور که در شکل ۵ دیده می شود اختلاف واضحی در میزان تولید  $IFN-\gamma$  بعد از تحریک با پپتیدهای P171 و P191 دیده می شود. این اختلاف در غلظتهای پپتیدی بین  $1/53 \times 10^{-9}$  تا  $3/81 \times 10^{-10}$  مولار به خوبی دیده شد. بر همین اساس می توان نتیجه گرفت که پپتیدهای P171 و P191 به ترتیب اپی توپهای غالب و نیمه غالب برای لنفوسیت های Th1 به شمار می روند.



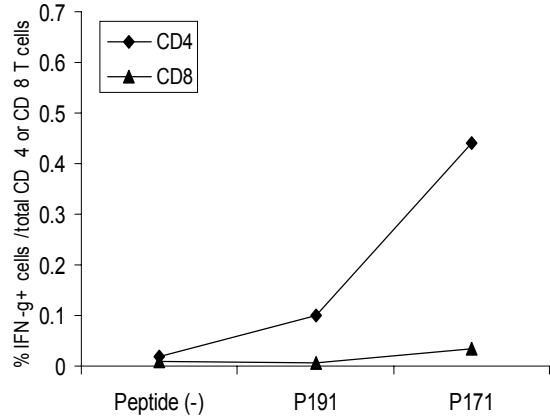
شکل ۳: حذف دستجات سلولهای T با استفاده از آنتی بادیهای منوکلونال ضد  $CD4$  یا  $CD8$  و کمپلمان در پاسخ به پپتید های P171 و P191 مولکول MPB51 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس. همانطور که مشاهده می شود تنها حذف سلولهای  $CD4^+$  T موجب کاهش شدید تولید  $IFN-\gamma$  در پاسخ به پپتید های P171 و P191 می شود حال آنکه هیچ یک از گروه ها در پاسخ به محیط کشت فاقد پپتید (peptide (-)) پاسخ ایجاد نکردند. بنابراین پپتید های P171 و P191. بعنوان اپی توپهای سلولهای  $CD4^+$  T در مولکول MPB51 محسوب می شوند.



شکل ۵: تولید  $IFN-\gamma$  توسط سلولهای T طحالی موشهای ایمن شده با DNA کد کننده MPB51 در پاسخ به رفتهای متوالی از پپتیدهای P171 و P191. همانطور که مشاهده می شود مقادیر مختلفی از  $IFN-\gamma$  در پاسخ به پپتیدهای P171 و P191 در غلظتهای  $1/53 \times 10^{-9}$  تا  $3/81 \times 10^{-10}$  مولار تولید می شود که به ترتیب بیانگر غالب و نیمه غالب بودن اپی توپهای P171 و P191 می باشد.

### بحث:

آگاهی و فهم عمیق از ماهیت پاسخ های ایمنی حفاظت کننده در بیماری سل کمک شایانی به ابداع واکسنهای موثرتری در آینده خواهد نمود. بازوی سلولی



شکل ۴: آنالیز فلوسیتومتری تولید داخل سلولی و نوع سلولهای تولید کننده  $IFN-\gamma$ . درصد سلولهای  $CD4^+$  T یا  $CD8^+$  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 می شود در پاسخ به پپتید های ایمونوژن P171 و P191 مولکول MPB51 تنها سلولهای  $CD4^+$  T مقادیر قابل توجهی  $IFN-\gamma$  تولید می نمایند.

در حالیکه در بررسی فلوسیتومتری در پاسخ به پپتیدهای فوق سلولهای T دو گانه مثبت ( $CD8^+$   $IFN-\gamma^+$ ) شناسایی نشدند. از آنجا که اپی توپهای سلولهای  $CD4^+$  T که توسط

بیشتری پاسخ قوی تولید می نماید (۲۵، ۱۳). بنابراین واکسیناسیون ژنتیکی روش مناسب برای تعیین اپی توپهای سلول T می باشد (۲۵). توالی پپتید ۱۹۱-۱۷۱ P به جز در دو اسید آمینه انتهایی، شباهتی با توالی های متناظر در مولکولهای Ag85A و Ag85B ندارد. با این وجود ۵ اسید آمینه انتهای کربوکسیل پپتید ۲۱۰-۱۹۱ P مولکول MPB51 با اسیدهای آمینه همان توالی در مولکولهای Ag85A و Ag85B یکسان می باشد. این امر نشان می دهد که وجود این ۵ اسید آمینه برای اتصال به مولکولهای H2-A<sup>b</sup> در بقیه توالی مولکول MPB51 تاثیری ندارند. باید توجه داشت که اتصال پپتید به مولکولهای MHC شرط لازم برای اپی توپ سلول T می باشد ولی به تنهایی کافی نیست. عوامل دیگری غیر از میل ترکیبی اتصال به MHC در تعیین اپی توپهای سلول T دخالت دارند. این عوامل عبارتند از: پردازش آنتی ژن، وضعیت انتقال پپتیدها توسط مولکولهای HLA-DM، نحوه پاسخ گنجینه سلولهای T.

یافته های اخیر ثابت نموده است که مولکول MPB51 نظیر مولکول Ag85A، فاقد اپی توپهای محدود به MHC کلاس یک در موشهای C57BL/6 می باشد (۲۸). سایر محققین نیز نشان داده اند که واکسیناسیون با DNA پلاسمیدی کدکننده Ag85A موجب حفاظت موشهای H-2<sup>b</sup> فاقد CD4 نمی شوند ولی از تکثیر باکتریها به میزان زیادی در ریه ها جلوگیری نموده و موجب افزایش مدت بقای موشهای H-2<sup>b</sup> فاقد مولکول بتا دو- میکروگلوبولین می گردد (۲۸). همچنین مولکول MPB51 موجب برانگیختن ایمنی حفاظتی ناشی از سلولهای T CD4<sup>+</sup> در موشهای C57BL/6 می شود. بنابراین شناسایی اپی توپهای سلول T گام ارزشمندی در آشکار ساختن نقش این مولکولها در القای ایمنی حفاظتی در گونه های مختلف حیوانی می باشد.

در موشهای C57BL/6 سطح تولید IFN- $\gamma$  اختصاصی پپتید توسط سلولهای T CD4<sup>+</sup> موشهای ایمن شده با BCG کمتر از سلولهای طحالی موشهای ایمن شده با واکسن DNA پلاسمیدی می باشد. این یافته با گزارشات سایر محققین هم راستا می باشد که نشان دادند در موشهای واکسینه شده با BCG یا آلوده به TB، مقدار تولید IFN- $\gamma$  اختصاصی آنتی ژن Ag85A نسبت به

ایمنی ناشی از سلولهای Th<sub>1</sub> جزء اصلی ایمنی حفاظت دهنده در بیماری سل (۵) محسوب می شود. با این وجود مطالعات انسانی و موشی نشان می دهند که سلولهای CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T نیز نقش به سزایی در برقراری ایمنی در این بیماری دارند (۶-۷). گرچه مکانیسم دقیق ایمنی ناشی از سلولهای T CD<sub>8</sub><sup>+</sup> محدود به MHC کلاس یک به خوبی مشخص نشده است ولی احتمالاً سلولهای CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T با ترشح IFN- $\gamma$  در ایجاد حفاظت سهیمند (۲۱).

مطالعات نشان می دهند کمپلکس Ag85 شامل آنتی ژنهای غالب در پاسخهای سلولهای CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T و CD<sub>4</sub><sup>+</sup> در انسان و موشهای آلوده به M.tuberculosis می باشند (۲۲). واکسیناسیون با DNA پلاسمیدی کدکننده Ag85A یا Ag85B موجب برانگیختن سلولهای CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T و CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T در موش گردیده (۲۲) که این سلولها حفاظت خوبی نیز در برخورد با M.tuberculosis بیماریزا ایجاد نموده اند (۲۳-۲۴). آنتی ژن Ag85A شامل چندین اپی توپ سلول سلول CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T و حداقل یک اپی توپ CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T در موشهای BALB/c می باشد (۲۵). در انسان نیز نقشه اپی توپ سلول T در مولکول Ag85A شناسایی گردیده است (۱۶). به عنوان مثال، اپی توپهای سلول CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T محدود به HLA-A\*0201 از Ag85B شناسایی شده است (۲۶). مولکول MPB51 یکی دیگر از پروتئینهای ترشحی M.tuberculosis می باشد که ۳۷-۴۳ درصد تشابه با جزء میکولیل ترانسفرز کمپلکس Ag85 دارد (۱۸).

در این مطالعه با استفاده از روش واکسیناسیون DNA با تفنگ ژنی و آنالیز بیومتریک با کتابخانه ای از پپتیدهای هم پوشان، اپی توپهای ۱۹۰-۱۷۱ P و ۲۱۰-۱۹۱ P برای سلولهای T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> محدود به مولکولهای H-2 در موشهای C57BL/6 شناسایی گردید. بلحاظ اینکه موشهای C57BL/6 فاقد ژن E $\alpha$  بوده و مولکولهای H2-E را در سطح سلول بیان نمی نمایند (۲۷) بنابراین اپی توپهای فوق به طور قطع در داخل مولکولهای H2-A<sup>b</sup> عرضه می گردند. سلولهای طحالی موشهای C57BL/6 ایمن شده با BCG تنها در پاسخ به پپتید ۱۹۰-۱۷۱ P مقادیر معنی داری IFN- $\gamma$  تولید نمودند. این یافته با مطالعات قبلی همراستا می باشد که واکسیناسیون با DNA کدکننده کمپلکس Ag85 نسبت به واکسیناسیون با BCG یا ابتلاء به M.tuberculosis در برابر اپی توپهای

8. 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.
9. 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; 56:3310-3312.
10. Tian X, Cai H, Zhu YX. Protection of mice with a divalent tuberculosis DNA vaccine encoding antigens Ag85B and MPT64.
11. Andersen P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun* 1994; 62:2536-2544.
12. 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; 276:1420-1422.
13. Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev* 1992; 56:648-661.
14. 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: 575-580.
15. 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; 62:3679-3687.
16. 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; 62:726-728.
17. 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 indiv-

موشهای ایمن شده با DNA بسیار کمتر می باشد (۲۵). از آنجا که واکنش DNA کدکننده MPB51 قابلیت برانگیختن ایمنی حفاظتی در مقابل عفونت با *M.tuberculosis* را در موشهای C57BL/6 داشته (۲۶) و واکنش DNA سلولهای T CD4<sup>+</sup> را القا می نماید که پپتیدهای P1۷۱ و P۱۹۱ را در شیار مولکولهای H<sub>2</sub>-A<sup>b</sup> شناسایی می نمایند، سلولهای CD4<sup>+</sup>T القا شده در اثر واکنش DNA حتی قادر خواهند بود عرضه اندک اپی توپ سلول CD4<sup>+</sup> T را روی سلولهای آلوده به *M.tuberculosis* شناسایی نمایند.

### نتیجه نهایی:

در این مطالعه یک اپی توپ غالب و یک اپی توپ نیمه غالب سلول CD4<sup>+</sup>T محدود به H-2 در موشهای C57BL/6 شناسایی گردید که تصور میشود نقش به سزایی در حفاظت مقابل عفونت *M.tuberculosis* داشته باشند. همچنین مشخص گردید واکسیناسیون ژنتیکی (DNA vaccination) روش با ارزشی برای ایجاد پاسخهای حفاظت دهنده در مقابل عفونت توپر کلوزیس بوده و ابزار مفیدی در جهت مطالعه و شناسایی اپی توپهای اختصاصی دستجات مختلف سلولهای T در گونه های مختلف حیوانی می باشد.

### منابع:

1. Collins HL, Kaufmann SH, Prospects for better tuberculosis vaccines. *Lancet Infect Dis* 2001; 1:21-28.
2. Rodrigues LC, Diwan VK, Wheeler JG. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and military tuberculosis. A meta-analysis. *Int J Epidemiol* 1993; 22: 1154-1158.
3. Pablos-Mendez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance. *N Engl J Med* 1998;338:1641-1649.
4. Kaufmann SH. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 129-134.
5. Kaufmann SH. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol Today* 1988; 9:168-174.
6. Kaufmann SH. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol Today* 1988; 9:168-174.
7. Stenger S., Modlin RL. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2:89-93.

- iduals. *J Immunol* 1995; 154:4665-4674.
18. 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; 65:3680-3685.
  19. Kaufmann SH. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* 2000; 6:955-960.
  20. 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; 71:483-493.
  21. Tascon RE, Stavropoulos E, Lukacs KV, Colston MJ. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8<sup>+</sup> T cells requires the production of gamma interferon. *Infect Immun* 1998; 66:830-834.
  22. 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: 830-833.
  23. 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; 79:251-259.
  24. 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; 2:893-898.
  25. 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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell epitopic repertoire broader than that stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection. *Infect. Immun.* 1998; 66:1527-1533.
  26. 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<sup>+</sup> T cells in HLA-transgenic mice and humans. *J Immunol* 2000; 165:6463-6471.
  27. Mathis DJ, Benoist II C., Williams VE, Kanter M, McDevitt HO. Several mechanisms can account for defective E  $\alpha$  gene expression in different mouse haplotypes. *Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 273-277.
  28. D'Souza S, Denis O, Scorza T, Nzabintwal F, Verschuere H, Huygen K. CD4<sup>+</sup> T cells contain *Mycobacterium tuberculosis* infection in the absence of CD8<sup>+</sup> T cells in mice vaccinated with DNA encoding Ag85A. *Eur J Immunol* 2000; 30:2455-2459.