تولید مونوکلونال آنتی بادی علیه پروتئین سطحی شماره 2 مروزوئیت(*MSP-2*) و بررسی ایمنی زایی دومن های مختلف این مولکول

افرا خسروی[1]، **اقباله اسدالهی**[2]، **پل او نیل**[3]

1- استادیار، گروه ایمونولوزی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
2- کارشناس ارشد شیمی دارویی، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
3- رییس دپارتمان شیمی دارویی، دانشکده شیمی، دانشگاه لیورپول

یافته / دوره یازدهم / شماره 1 / بهار 88 / مسلسل 39

چکیده

دریافت مقاله: 87/12/12، ***پذیرش مقاله***: 88/3/12

Ø مقدمه: مولکول سطحی شماره 2 مروزئیت **(MSP-2)** پلاسمودیوم فالسیپاروم یکی از کاندیداهای واکسن علیه مالاریا است و نتایج مطالعات مختلف بیانگر ایمنی زا بودن قسمت متغیر این مولکول است. مونوکلونال آنتی بادی علیه **MSP-2** روشی مطمئن و قطعی برای تایید این ایمنی زایی است.

Ø مواد و روش ها: انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم در محیط کشت حاوی **RPMI 1640** کشت داده شد و آنتی ژنهای شیزونت بصورت خام استخراج و به موش تزریق و طحال موش خارج گردید. لنفوسیت های **B** استخراج شده و فیوژن با سلول های **NS-1** صورت گرفته و مونوکلونال آنتی بادی علیه **MSP-2** تولید گردید.

Ø یافته ها: تعدادی مونوکلونال آنتی بادی علیه **MSP-2** ساخته شده همگی تائید کننده ایمنی زایی بلوک های متغیر مولکول **MSP-2** بوده و نتایج آزمایشات بررسی ایمنی زایی مولکول **MSP-2**، با استفاده از سرم بیماران مبتلا به مالاریا را تائید نمود.

Ø بحث و نتیجه گیری: تولید مونوکلونال آنتی بادی علیه آنتی ژنهای سطحی مروزوئیت در پلاسمودیوم فالسیپاروم مانند سایر آنتی ژنها یکی از روشهای قابل اعتماد بخصوص در ارزیابی کیفی آنتی ژن و نیز در تایید ایمنی زایی آن است و در مطالعه حاضر این روش به درستی آنتی ژن **MSP-2** را مورد ارزیابی قرار داد.

Ø واژه های کلیدی: MSP-2، ایمنی زایی، پلاسمودیوم فالسیپاروم، مالاریا

آدرس مکاتبه: ایلام، بان گنجاب،معاونت آموزشی و پژوهشی، مدیریت پژوهش و اطلاع رسانی

پست الکترونیک: afrakhosravi@yahoo.co.uk

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-09-20]

مقدمه

مالاریا عمده ترین انگل بیماری زای انسان است که علت مرگ و میر بیش از 1/5 میلیون نفر سالیانه بخصوص در بچه های خردسال کشورهای آفریقایی است (4و3و2و1). تولید واکسن مالاریا به دلایل مختلفی تا کنون با مانع روبرو شده است که از آن جمله می توان به موارد زیر اشاره کرد (5، 6، 7، 9، 13، 17).

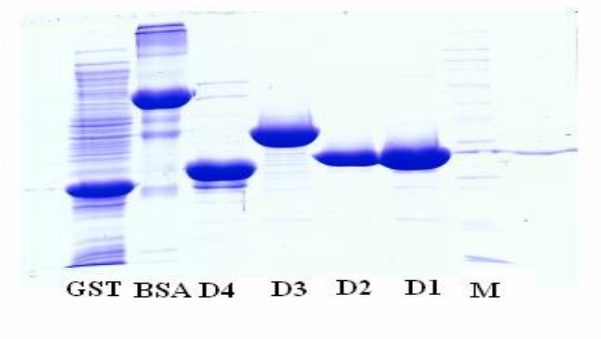
- پیچیده بودن سیر تکامل انگل مالاریا به گونه ای که چندین فرم انگل با آنتی ژن هایی که به سیستم های ایمنی مختلف حساسیت های متفاوتی دارند موجب گوناگونی آنتی ژنتیکی در این انگل شده است.

- داشتن استراتژی های زیرکانه توسط انگل که بواسطه آنها از سیستم ایمنی فرار می کند.

- مشکل ارائه آنتی ژن های کاندید برای واکسن و نیز مشکل ادجونت های همراه این آنتی ژنها.

علائم کلینیکی و نیز پاتولوژی مالاریا مربوط به مرحله داخل اریتروسیتی انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم است. MSP-2 یکی از آنتی ژنهای عمده مروزوئیت است که به دلیل اینکه در سطح مروزوئیت قرار دارد برای تحریک سیستم ایمنی کاندید مناسبی است (8، 9، 10، 11، 12، 13).

مطالعات مختلفی بیان می کند که مونوکلونال آنتی بادی علیه MSP-2 تهاجم مروزوئیت ها را به اریتروسیت متوقف می کند (14، 15، 16، 17) همچنین سرم افراد مبتلا به مالاریا موجب شناسایی این پروتئین سطحی شده لذا احتمال وجود خاصیت محافظت کنندگی (protective) ناشی از IgG علیه MSP-2 مطرح می گردد (19و18). با توجه به مسائل فوق MSP-2 به عنوان یکی از کاندیداهای اصلی واکسن علیه مالاریا مطرح گردیده است. مطالعه حاضر درصدد بوده تا با ایجاد مونوکلونال آنتی بادی علیه دومنهای مختلف چهار گانه MSP-2 (شکل 1)، دومن اصلی ایمن زا (Immunodominant part) را در این آنتی ژن شناسایی نماید.



شکل 1. دومن های مختلف MSP-2 در SDS PAGE. دومن 1 برابر 129 جفت باز، دومن 2 برابر 195، دومن 3 برابر 276 و دومن 4 برابر 219 جفت بازی است.

مواد و روش ها

الف) کشت انگل مالاریا

ابتدا سویه A4 انگل مالاریا از مخزن سلولی پروفسور مارسل هامل از دانشکده طب لیورپول اخذ و پس از Retrieve کردن با استفاده از روش Diggs و همکاران 1979 (20) در محیط in vitro طبق روش اصلاح شده، Trager و Jensen ، 1976 کشت داده شد (22). گلبول های قرمز انگل دار در محیط کشت حاوی RPMI1640 و در درجه حرارت 37 درجه سانتیگراد زیر لایه ای از گاز 3 درصد CO_2، 1 درصد اکسیژن و 96 درصد نیتروژن کشت داده شدند. برای نگهداری پارازیتمی بین 15-5 درصد، از گروه خونی O هر 48 ساعت خون تازه شسته شده به محیط کشت اضافه گردید. پس از بدست آمدن پارازیتمی بالاتر از 50 درصد آنتی ژن شیزونت خام پس از Syncronize کردن به کمک پلاسمینوژن تهیه و پس از شستن با PBS، عصاره خام شیزونت (Crude extract) تهیه و در 20 - درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-09-20]

ب) ایمنی زایی موش:

موش بالب سی (Balb-c) نر برای تزریق داخل پوستی انتخاب گردید.. 25 میکروگرم آنتی ژن شیزونت به نسبت یک به یک با ادجونت کامل فروندز به صورت زیر جلدی به موش تزریق شد. تزریقات بعدی آنتی ژن با ادجونت ناقص فروندز صورت گرفت و به فاصله 14 روز پس از تزریق اول و سه بار تکرار گردید.

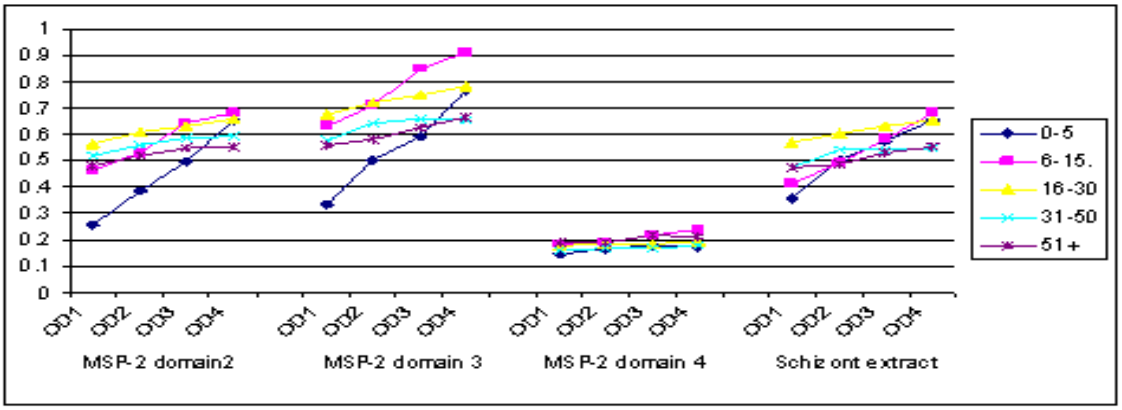
ج) فیوژن:

موش ها پس از جداسازی خون و سرم، طبق اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی کشته شده و طحال موش ها جدا گردید و در شرایط استریل سلول های B لنفوسیت جدا شده و ضمن شمارش سلولها به نسبت مورد نظر با سلول های NS-1 (سل لاین) مخلوط و فیوژن طبق روش اصلاح شده Kohler, (1975) انجام گردید، سپس سلولهای فیوژن شده در محیط Iscove's کشت داده شدند (16و21).

یافته ها

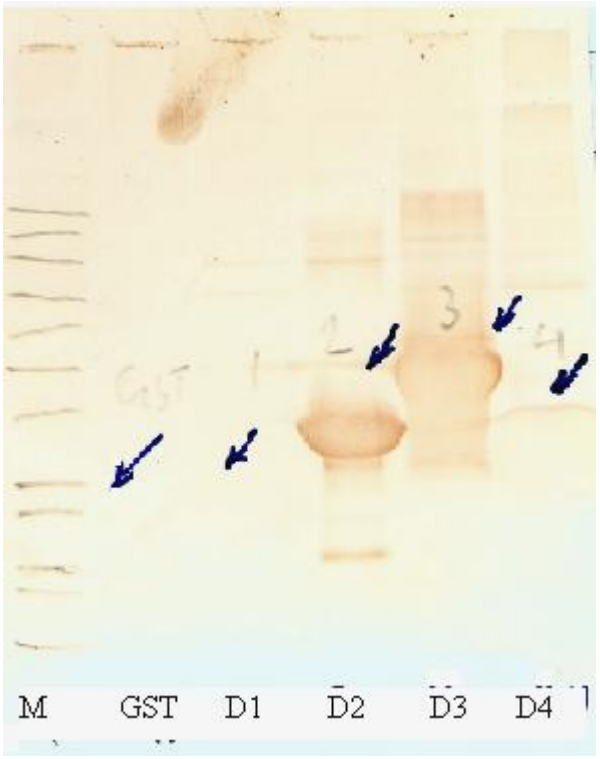
آزمایش ELISA برای تشخیص ایمنی ایجاد شده در خون بیماران مبتلا به مالاریا در منطقه آندمیک گامبیا با استفاده از نمونه های سرم گردآوری شده مشخص کرد که دومن دوم و سوم مولکول MSP-2 بیشترین ایمنی زایی را از خود نشان می دهد(شکل 2). این دو دومن قسمت های متغیر مولکول MSP-2 را تشکیل می دهند و دومن های اول و چهارم قسمت ثابت آنتی ژن هستند که کمترین ایمنی زایی را نشان دادند (شکل 2).

با انجام Western Blott قسمت اصلی واکنش دهنده با سرم افراد مالاریایی سرم موش ایمن شده و نیز پلی کلونال آنتی بادی ضد مالاریا نیز نشان دهنده ایمونوژن بودن این بخش مولکول فوق بود (شکل 3). مونوکلونال آنتی بادی در تشخیص آنتی ژن های مورد نظر بصورت کاملا اختصاصی عمل نموده و وسترن بلات یکی از معتبرترین تست های موجود برای تشخیص قطعی واکنش سیستم ایمنی علیه یک آنتی ژن خاص است. در مطالعه حاضر نتایج نه تنها نشان دهنده فعالیت گروههای B لنفوسیت مختلف در ایجاد مونوکلونال آنتی بادی علیه MSP-2 بود بلکه نتایج ELISA را در تشخیص ایمونوژن بودن بلوک های دوم و سوم مولکول سطحی شماره 2 مروزئیت انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم به خوبی تایید نموده و کاندیدا بودن این مولکول و قسمت های متغیر آن را مورد تاکید مجدد قرار داده است.



شکل شماره 2- پاسخ های آنتی بادی به دومن های مختلف MSP-2 و آنتی ژن خام شیزونت در سنین مختلف

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-09-20]



شکل شماره 3- بررسی دومن های مختلف MSP-2 در تکنیک وسترن بلات با استفاده ار مونوکلونال آنتی بادی ساخته شده علیه این مولکول

بحث و نتیجه گیری

قسمت متغیر مولکول MSP-2 (شکل 1) قسمت اصلی ایمنی زای مولکول بوده و واکنش های ایمنی همورال بخصوص IgG علیه این دو دومن (دومن دوم و سوم) مولکول براه افتاده است. همانگونه که سرم ایمنی موش و نیز آنتی بادی پلی کلونال علیه انگل مالاریا نیز این واقعیت را به خوبی تایید می کنند. مونوکلونال آنتی بادی ساخته شده علیه MSP-2 بیشترین واکنش را به این قسمت مولکول نشان می دهد. پیشنهاد می شود مطالعات بیشتر برای بررسی قدرت Protective مولکول MSP-2 طراحی و اجراء گردد. ضمنا استفاده از مونوکلونال آنتی بادی در تشخیص ایمنی زایی آنتی ژن کاری ضروری و کمک کننده است.

تشکر و قدردانی: بدینوسیله از مساعدتها و همکاری معاونت محترم آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام و تمامی کسانی که در انجام این طرح ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی میگردد.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-09-20]

References

1. UNICEF. Malaria Prevention and Treatment; 2000
2. English M, Newton CRJC. Malaria: Pathogenicity and disease. Chem Immunol 2002; 80:5069
3. WHO. WHO Expert Committee on Malaria. World Health Organ Tech Rep Ser 2000; 892: i-v, 1-74
4. Warrell DA. Cerebral malaria: clinical features, pathophysiology and treatment. Ann Trop Med Parasitol 1997; 91:875-884
5. Baruch DI, Rogerson SJ, Cooke BM. Asexual blood stages of malaria antigens: cytoadherence. Chem Immunol 2002; 80:144-162
6. Warrell DA, Turner GDH, Francis N. Essential Malariology (Ed. Warrell D. A.and Gilles H.M). Pathology and Pathophysiology of human malaria. Fourth edition. Arnold, London; 2002:236-251
7. Deans JA, Alderson T, Thomas AW, Mitchell GH, Lennox ES, Cohen S. Rat monoclonal antibodies which inhibit the in vitro multiplication of Plasmodium knowlesi. Clin Exp Immunol 1982; 49: 297-309
8. Pinder J, Fowler R, Bannister L, Dluzewski A, Mitchell GH. Motile systems in malaria merozoites: how is the red blood cell invaded? Parasitol Today 2000; 16: 240-245
9. Blackman MJ, Scott-Finnigan TJ, Shai S, Holder AA. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. J Exp Med 1994; 180: 389-393
10. Thomas AW, Carr DA, Carter JM, Lyon JA. Sequence comparison of allelic forms of the Plasmodium falciparum merozoite surface antigen MSA2. Mol Biochem Parasitol 1990; 43: 211-220
11. Fenton B, Clark JT, Khan CM, Robinson JV, Walliker D, Ridley R, et al. Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite Plasmodium falciparum. Mol Cell Biol 1991; 11: 963-974
12. Smythe JA, Peterson MG, Coppel RL, Saul AJ, Kemp DJ, Anders RF. Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of Plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasitol 1990; 39: 227-234
13. Weisman S, Wang L, Billman-Jacobe H, Nhan DH, Richie TL, Coppel RL. Antibody responses to infections with strains of Plasmodium falciparum expressing diverse forms of merozoite surface protein 2. Infect Immun 2001; 69: 959-967
14. Metzger WG, Okenu DM, Cavanagh DR, Robinson JV, Bojang KA, Weiss HA, et al. Serum IgG3 to the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. Parasite Immunol 2003; 25:307-312
15. Ekala MT, Jouin H, Lekoulou F, Mercereau-Puijalon O, Ntoumi F. Allelic family-specific humoral responses to merozoite surface protein 2 (MSP2) in

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-09-20]

Gabonese residents with Plasmodium falciparum infections. Clin Exp Immunol 2002; 129: 326-331

16. Kohler G, Millstein C. Continous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256: 425-497
17. Gale J. In vitro immunisation and other factors influencing the production of monoclonal antibodies [Master of Science]. Liverpool: University of Liverpool, 1987
18. Irion A. Molecular diversity and Immunological properties of the P.falciparum Merozoite Surface Protein-2(MSP-2), 2000
19. Lougovskoi AA, Okoyeh NJ, Chauhan VS. Mice immunised with synthetic peptide from N-terminal conserved region of merozoite surface antigen-2 of human malaria parasite Plasmodium falciparum can control infection induced by Plasmodium yoelii yoelii 265BY strain. Vaccine 1999; 18: 920-930
20. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. J Parasitol 1979; 65: 418-420
21. Margos G, Maier WA, Seitz HM. Experiments on cryopreservation of Plasmodium falciparum. Trop Med Parasitol 1992; 43: 13-16
22. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science 1976; 193: 673-675

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-09-20]