

القای سلول‌های دندریتیک تولروژن موشی با تنظیم کاهشی ملکول کمک تحریکی CD40 با استفاده از وکتور لنتی ویروس

عزیز محمودزاده^۱، دکتر علی اکبر پورفتح‌اله^۲، دکتر محمد حسین کریمی^۳، دکتر سید محمد موذنی^۲

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی علوم پزشکی، گروه ایمنی شناسی pourfa@modares.ac.ir

دریافت: ۹۳/۲/۲۴ پذیرش: ۹۳/۴/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: نقش مهم ملکول‌های کمک تحریکی در پاسخ‌های ایمنولوژیک به روشنی مشخص شده است. با گسترش روش‌های نوین در ایمنی شناسی ملکولی، ممانعت از سیگنال‌های کمک تحریکی برای القای تولرانس به‌عنوان یکی از استراتژی‌های جدید در آمده است. *RNA* مداخله‌گر (*RNA Interference*) یکی از روش‌های جدید است که می‌تواند به‌صورت اختصاصی و موثر بیان ژن هدف را کاهش دهد. **روش بررسی:** در این مطالعه ما با استفاده از سیستم لنتی ویرال بیان ژن *CD40* سلول‌های دندریتیک را مورد هدف قرار دادیم. توالی *Short Hairpin RNA* قادر است بیان ژن *CD40* را در سلول‌های دندریتیک موشی کاهش دهد. **یافته‌ها:** نتایج به‌دست آمده موید آنست که بیان *mRNA* ژن *CD40* در گروه دریافت‌کننده‌ی لنتی ویرال *shRNACD40* ۶۴ برابر و بیان پروتئین *CD40* در سطح سلول‌های دندریتیک نیز ۳۱ درصد کاهش پیدا کرده ($P < 0/0001$) و سلول دندریتیک نیز در مواجهه با سلول‌های *T* قادر به تحریک آن‌ها نمی‌باشد. **بحث:** این مطالعه نشان می‌دهد کاهش بیان ملکول *CD40* موجب به‌وجود آمدن سلول‌های دندریتیک تولروژن و جلوگیری از پاسخ ایمنولوژیک *Th1* می‌شود. جلوگیری از پاسخ *Th1* موجب سوق دادن پاسخ‌های ایمنولوژیک به *Th2* خواهد گردید، که این نوع پاسخ‌ها می‌تواند در بیماری‌های خودایمنی از جمله آرتریت روماتوئید و دیابت نوع یک موثر واقع گردد. **واژگان کلیدی:** ژن *CD40*، لنتی وکتور، سلول‌های دندریتیک موش

مقدمه

تمرکز اصلی ایمنولوژی بر روی آنتی ژن و لنفوسیت بوده است، اما این دو جز برای ایجاد ایمنی‌زایی کافی نمی‌باشد، بلکه قسمت سوم نیز که عرضه‌کننده‌ی آنتی ژن است برای شروع پاسخ‌های ایمنولوژیک لازم و ضروری است (۱). برای فعال شدن کامل لنفوسیت *T* به‌وسیله‌ی سلول دندریتیک وجود سه نوع سیگنال لازم و ضروری می‌باشد. ابتدا عرضه‌ی آنتی ژن به گیرنده‌ی سلول *T* در کنار کمپلکس سازگاری نسجی کلاس دو بر روی سلول دندریتیک که موجب پاسخ سلول *T* و افزایش بیان ملکول *CD154* (لیگاند *CD40*) در سطح این سلول خواهد گردید. این فرایند فعال شدن موجب

۱- دانشجوی دوره دکترای ایمنی شناسی، گروه ایمنی شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- دکترای تخصصی ایمنی شناسی، استاد دانشگاه تربیت مدرس

۳- دکترای تخصصی ایمنی شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات پیوند، بیمارستان نمازی

افزایش بیان دیگر مولکول‌های کمک تحریکی مثل CD80 و CD86 در سطح سلول دندریتیک خواهد شد که به‌عنوان سیگنال دوم است. سیگنال سوم نیز سیتوکاین‌های محلول هستند که موجب القای تمایز سلول T به فنوتیپ Th1 می‌شوند (۲-۴). در غیاب مولکول‌های کمک تحریکی بر روی سلول دندریتیک سلول T دچار تمایز به سمت Th2، تمایز به سمت سلول T تنظیمی و یا آپاتوز خواهد گردید (۵). CD40 یک پروتئین درون غشایی و متعلق به خانواده‌ی گیرنده‌ی فاکتور نکروز توموری می‌باشد که با بالغ شدن سلول دندریتیک بیان می‌شود. امروزه با ممانعت از اندرکنش بین CD40 - CD40 L موجب القای سلول‌های دندریتیک تولروژن می‌شوند. در واقع ممانعت از بیان ملکول‌هایی نظیر CD40، CD80 و CD86 نه تنها موجب جلوگیری از پاسخ سلول T خواهد گردید، بلکه موجب به‌وجود آمدن سلول‌های T تنظیمی نیز می‌شود. جلوگیری از پاسخ سلول T و تولید سلول T تنظیمی در بیماری‌های خود ایمنی مانند آرتریت، و دیابت نوع یک بسیار حایز اهمیت می‌باشد (۶-۹). روش‌های خاموش کردن ژن مثل siRNA (Synthetic Small Interfering RNAs) و shRNA (Short Hairpin RNA) از روش‌های بسیار موثر برای کاهش بیان اختصاصی ژن هدف و القای تعدیل ایمنی در سلول‌های دندریتیک می‌باشند (۱۰ و ۱۱).

روش بررسی

تولید و تخلیص سلول‌های دندریتیک: در این مطالعه سلول‌های دندریتیک از سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش DBA (Dilute, Brown and non Agouti) با روش اینابا و همکاران (۱۲) با کمی تغییرات تولید گردیدند. به‌طور خلاصه سلول‌های مغز استخوان موش پس از فلش شدن فمور به تعداد 8×10^5 در هر میلی‌لیتر محیط کشت RPMI- 1640 همراه با ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین، U/ml

۱۰۰ پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله (همگی از شرکت گیکو، امریکا) و سیتوکاین‌های GM-CSF به مقدار ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و IL-4 به مقدار ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر (شرکت پیروتک، امریکا) در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. همگی پلیت‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 منتقل و پس از ۹۶ ساعت (روز چهارم) سلول‌های غیر چسبیده با پیتاژ آرام از دیگر سلول‌ها جدا سازی گردیدند. مجدداً این سلول‌ها در محیط کشت مذکور با نصف غلظت سیتوکاینی کشت داده شدند. در روز ششم این سلول‌ها برای بالغ شدن به مدت ۸ تا ۱۰ ساعت در معرض لیپولی ساکارید (سیگما، امریکا) با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفتند. ارزیابی درصد زنده بودن در تمام مراحل با استفاده از تریپان بلو ۰/۰۴ درصد صورت گرفت.

فلوسیتومتری سلول‌های دندریتیک تخلیص شده:

پس از قرار گرفتن سلول‌های دندریتیک در معرض لیپولی ساکارید میزان خلوص این سلول‌ها با استفاده از آنتی‌بادی علیه CD11c (شرکت BD، امریکا) به روش زیر مورد سنجش قرار گرفت. ابتدا سلول‌ها با روش پیتاژ آرام از سلول‌های دیگر جدا سازی شدند. سپس 2×10^5 سلول تخلیص شده در ۵۰ میکرولیتر PBS و به مدت ۴۵ دقیقه و بر روی یخ در معرض آنتی‌بادی ضد موشی CD11c قرار گرفتند. ایزوتیپ کنترل CD11c (شرکت BD، امریکا) نیز تهیه و مانند نمونه آزمون رنگ آمیزی شدند. پس از آن این سلول‌ها با استفاده از بافر PBS دو درصد سرم جنینی گوساله مورد شستشو قرار گرفته، با فرمالدئید دو درصد فیکس و با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری قرائت شدند.

تولید وکتور لنتی ویرال: برای تولید لنتی ویرال وکتور از روش مورد استفاده در شرکت بن یاخته استفاده شد که به صورت خلاصه به شرح ذیل است (۱۳).

چاهک‌ها اضافه می‌نماییم. یک چاهک نیز به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته می‌شود. بعد از ۲۴ ساعت یک میلی‌لیتر محیط به هر یک از چاهک‌ها اضافه نموده و پس از گذشت ۷۲ ساعت میزان بیان GFP (Green Fluorescent Protein) توسط میکروسکوپ اینورت فلوئورسانس مورد بررسی قرار گرفت. در صورت مثبت بودن بیان GFP برای تعیین تیتراژ یا تعداد ویروس‌ها سلول‌ها پس از ترپسینه شدن در لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری جمع‌آوری شده و برای قرائت به بخش فلوسیتومتری منتقل شدند. با استفاده از فلوسیتومتری بهترین غلظت از بین غلظت‌های مذکور انتخاب و تعداد ذرات ویروسی تعیین گردید.

ترانسداکشن لنتی ویروس به سلول‌های دندریتیک: پس از ساخته شدن ذره ویروسی و تعیین تیتراژ آن ترانسداکشن آن‌ها به سلول‌های دندریتیک به‌صورت ذیل صورت گرفت. تعداد 5×10^4 سلول دندریتیک مشتق شده از مغز استخوان موش را در یک پتری دیش ۱۰ سانتی‌متری ریخته و بر روی آن‌ها تعداد 10×10^6 TU/ml ذره ویروسی و پلی برن $(1 \mu\text{g}/\lambda)$ ریخته و به مدت ۶ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از آن یک میلی‌لیتر محیط تازه به آن اضافه و ۴۸ ساعت انکوبه گردید.

اندازه‌گیری کاهش پروتئین و mRNA CD40: برای تعیین میزان کاهش پروتئین CD40 در سطح سلول‌های دندریتیک فلوسیتومتری دو رنگی صورت گرفت. بدین صورت که بعد از گذشت ۴۸ ساعت 2×10^5 سلول دندریتیک در ۵۰ میکرولیتر PBS ریخته شده و به مدت ۳۰ دقیقه و بر روی یخ در معرض آنتی‌بادی ضد موشی CD11c (شرکت BD، امریکا) قرار گرفت، پس از آن آنتی‌بادی ضد موشی دوم علیه CD40 (شرکت BD، امریکا) به لوله‌ها اضافه و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند. ایزوتیپ کنترل‌های CD11c و CD40 (شرکت BD، امریکا) نیز تهیه و مانند نمونه‌ها آزمون رنگ‌آمیزی شدند. سپس این سلول‌ها با

تخلیص DNA: ابتدا ۲۰ میکرولیتر از سه پلاسמיד psPAX2، shRNA CD40 و pMD2G جداگانه و به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در ۵ میلی‌لیتر LB (Loural Broth) با غلظت ۲۵ گرم بر لیتر کشت داده شده، سپس با استفاده از کیت تخلیص DNA شرکت Macherey- Nagel(MN) مورد تخلیص قرار گرفت. پس از آن غلظت DNA به‌دست آمده و نسبت‌های DNA/RNA و DNA/ Protein با بیوفتومتر قرائت گردید.

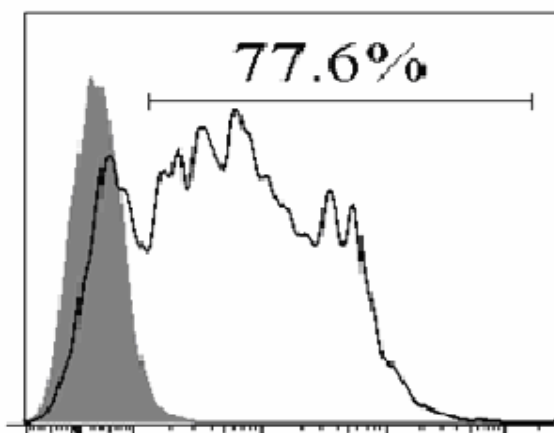
تولید لنتی وکتور: تولید لنتی وکتور با استفاده از رده‌ی سلولی HEK-293 T (Huamn Embryonic Kidney 293) به‌صورت ذیل انجام گردید. ابتدا 5×10^6 سلول HEK-293T در پلیت‌های ۱۰ سانتی‌متری و ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله و آنتی‌بیوتیک ۱X پنی‌سیلین - استرپتومایسین و ۲ میلی‌مول گلوتامین کشت داده شدند. سپس ترانسفکشن با استفاده از ۲۱ میکروگرم پلاسמיד shRNA CD40، ۲۱ میکروگرم psPAX2 و ۱۰/۵ میکروگرم pMD2G و با استفاده از کلسیم - فسفات صورت گرفت. پس از گذشت ۱۴ تا ۱۶ ساعت محیط جدید به پلیت‌های مورد نظر اضافه و در ساعات ۴۸ و ۷۲ جمع‌آوری و مورد تغلیظ قرار گرفت. برای تغلیظ ابتدا محیط جمع‌آوری شده از فیلتر ۰/۴ میلی متر عبور داده شد و سپس به تیوپ مخصوص دستگاه اولتراسانتریفوژ انتقال و به مدت ۹۰ دقیقه در ۲۰۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. پس از پایان سانتریفوژ، محیط رویی به آرامی خارج گردیده و ۲۰۰ میکرولیتر PBS سرد به رسوب ویروس‌ها اضافه کرده در PBS حل گردید.

تیتراسیون ویروسی: برای تعیین تیتراژ ویروسی ابتدا 6×10^4 سلول HEK-293 T در ۲۵۰ میکرولیتر محیط کشت کامل را به هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای اضافه نموده، سپس از ویروس تغلیظ شده مقادیر ۱، ۴، ۱۶ و ۳۲ میکرولیتر را به هر یک از

موش‌های Balb/C با استفاده از روش نایلون ول، تخلیص و میزان خلوص آن‌ها توسط آنتی‌بادی CD3 (شرکت BD، امریکا) تعیین گردید که در حدود ۹۰ درصد بود. از طرف دیگر نیز سلول‌های دندریتیک از مغز استخوان موش DBA جدا سازی گردیده و به مدت ۴۸ ساعت در معرض پکیج ویروسی قرار گرفت تا بیان ژن CD40 در آن‌ها کاهش یابد. سپس تعداد 10^5 سلول T و 10^4 سلول دندریتیک در حجم ۲۰۰ میکرولیتر و در پلیت ۹۶ خانه‌ای با همدیگر مجاور شده و پس از گذشت ۷۲ ساعت رنگ MTT با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه و مجدداً به مدت ۳ تا ۵ ساعت دیگر نیز انکوبه گردیدند. بعد از گذشت مدت زمان مذکور محلول MTT خارج و ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی‌متیل سولفوکساید اضافه و در ۵۴۰ نانومتر قرائت شدند.

یافته‌ها

برای تعیین خلوص سلول‌های دندریتیک مشتق از مغز استخوان موش آنتی‌بادی هامستر ضد موشی CD11c کوئزوگه شده با PE (Phycoerythrin) مورد استفاده قرار گرفت. این آزمون به صورت دو تایی انجام شد و در هر دو بار درصد خلوص به دست آمده بالاتر از ۷۵ درصد بود (شکل ۱).



شکل ۱: درصد خلوص سلول‌های دندریتیک مشتق از مغز استخوان در رنگ آمیزی با آنتی بادی CD11c کاهش پروتئین CD40 در سطح سلول دندریتیک

استفاده از بافر PBS دو درصد با سرم جنینی گوساله مورد شستشو قرار گرفته و با فرمالدئید دو درصد فیکس و با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری قرائت شدند. همچنین برای تعیین میزان کاهش CD40 در سطح mRNA ابتدا با استفاده از نرم افزار اولیگو ۶،۱ پرایمر ژن‌های CD40 و GAPDH (به عنوان کنترل داخلی) طراحی و بلاست و جهت سنتز به شرکت ماکروژن (Macrogen کره جنوبی) سفارش داده شد. پرایمرهای طراحی شده و موقعیت آن‌ها در mRNA در زیر آمده است. پس از دریافت پرایمرهای مذکور تست Real time PCR برای نمونه‌های مورد مطالعه صورت گرفت که به طور خلاصه به شرح ذیل است: ابتدا با استفاده از مینی کیت کپازن RNA تام از سلول‌های دندریتیک جداسازی گردید، سپس خلوص و یکپارچگی RNA تخلیص شده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر و الکتروفورز بر روی آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از آن یک میکروگرم از نمونه RNA تخلیص شده برای ساخت cDNA به وسیله‌ی روش شرکت اینویترژن (Invitrogen امریکا) مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد تست کمی Real Time PCR با استفاده از کیت سوپر میکس سایبر گرین بر روی نمونه‌ها انجام پذیرفت.

CD40: 156 bp

Forward 5'- ACTGTGAACCCAATCAAGG-3' mRNA : 317 - 354

Reverse 5'- TCTCCATAACTCCAAAGCC-3' mRNA : 454 - 472

GAPDH: 124 bp

Forward 5' - GACTTCAACAGCAACTCCAC-3' mRNA: 1504-1524

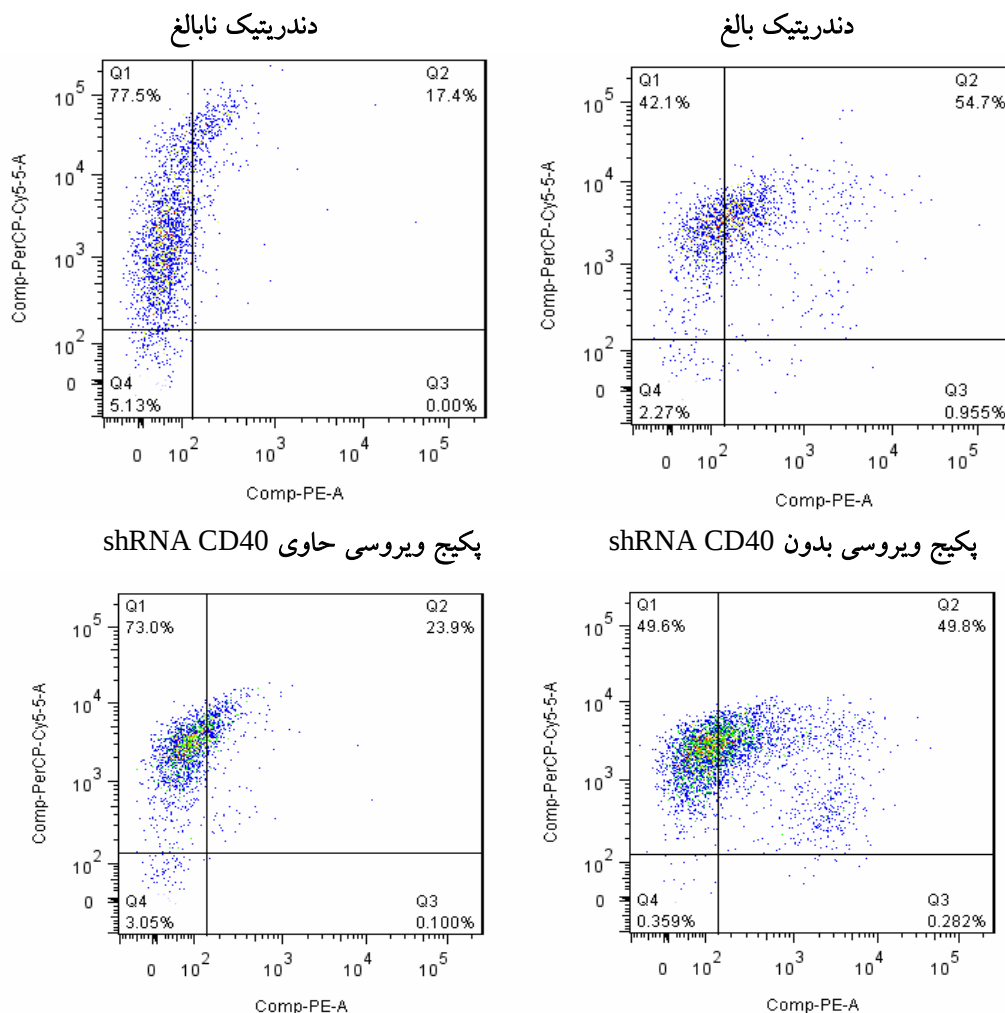
Reverse 5' - ATCCACCACCTGTTGTGTA -3' mRNA : 1609 - 1628

آزمون واکنش مختلط لنفوسیتی (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR): در مطالعه‌ی حاضر برای بررسی

عملکرد سلول‌های دندریتیک تولروژن القا شده با آنتی سنس علیه ملکول CD40 آزمون واکنش مختلط لنفوسیتی مورد استفاده قرار گرفت. انجام آزمون فوق به طور خلاصه به صورت ذیل انجام پذیرفت: ابتدا سلول‌های T از گره لنفاوی

CD40 در گروه دریافت‌کننده پکیج ویروسی حاوی shRNA CD40 نسبت به گروه سلول دندرتیک بالغ و گروه دریافت‌کننده پکیج ویروسی بدون shRNA CD40 دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشد ($P < 0/0001$). این تفاوت حاصل دو بار تکرار و مقایسه می‌انگین آن‌ها با استفاده از آزمون آنوا و توکی انجام گردید.

برای بررسی اثر shRNA در کاهش میزان پروتئین CD40 در سطح سلول‌های دندرتیک، این سلول‌ها با پکیج ویروسی حاوی shRNA CD40 و بدون shRNA CD40 مورد مواجهه قرار گرفتند. پس از گذشت ۴۸ ساعت سلول‌های دندرتیک به صورت دو رنگی رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری قرائت شدند. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود میزان بیان پروتئین سطحی



شکل ۲: مقایسه‌ی بیان ملکول سطحی CD40 در سلول‌های دندرتیک بالغ، نابالغ و سلول‌های مواجهه یافته با پکیج ویروسی بدون shRNA CD40 و پکیج ویروسی حاوی shRNA CD40

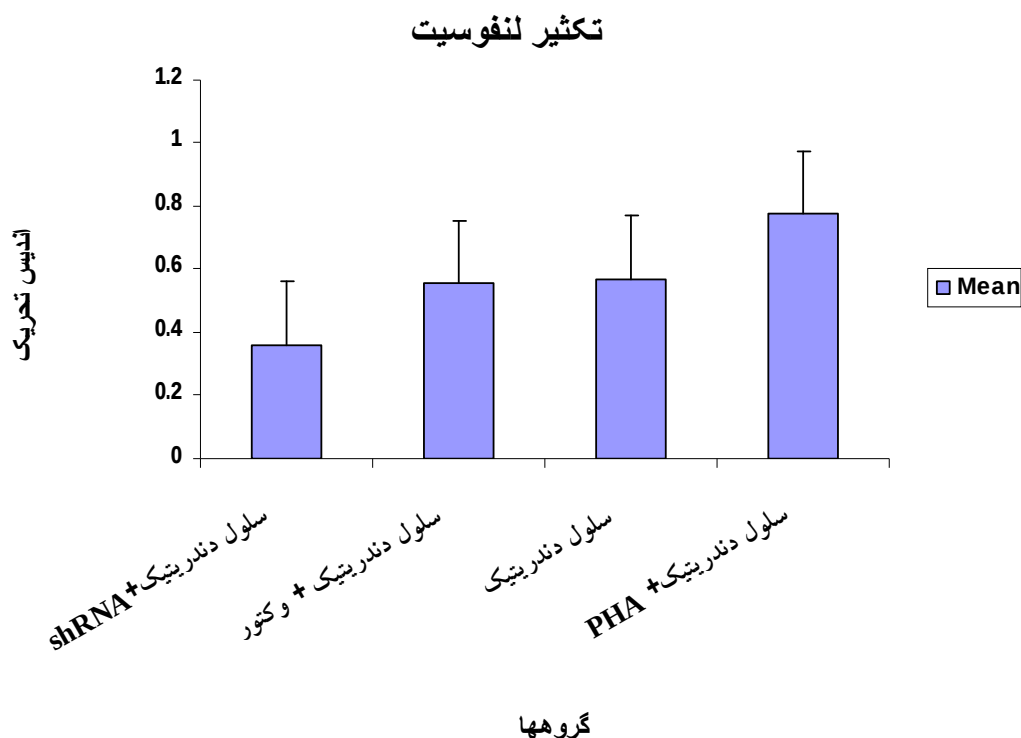
برای بررسی میزان کاهش بیان ژن از شاخص CT و جهت نرمال سازی از متد $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Method Pffsfl) استفاده

کاهش بیان mRNA CD40: برای بررسی کاهش بیان CD40 در سطح ژن از Real Time PCR استفاده گردید.

گردید. در Real Time PCR انجام شده بررسی C_T در مورد گروه دریافت کننده‌ی پکیج ویروسی حاوی shRNACD40 نشان دهنده‌ی کاهش بیان mRNA ژن CD40 به میزان ۶۴ برابر می‌باشد. در حالی‌که در گروه دریافت کننده‌ی پکیج ویروسی بدون shRNACD40 بیان mRNA ژن CD40 فقط چهار برابر کاهش پیدا کرده است. بررسی نتایج آماری با استفاده از آزمون آنوا و توکی نشان می‌دهد که میزان کاهش بیان mRNA در گروه دریافت کننده‌ی پکیج ویروسی حاوی shRNACD40 نسبت به گروه دریافت کننده‌ی پکیج ویروسی بدون shRNACD40 دارای تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد ($P<0/0001$).

آزمون واکنش مختلط لنفوسیتی (MLR): برای انجام آزمون واکنش مختلط ابتدا نسبت مناسب از سلول دندریتیک

و سلول T را به‌دست آوردیم، سپس سلول‌های دندریتیک، سلول‌های دندریتیک مواجهه یافته با پکیج ویروسی حاوی shRNACD40 و پکیج ویروسی بدون shRNACD40 مجاورت سلول‌های T قرار گرفتند. همچنین از فیتوهمگلوتنین با غلظت پنج میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. بررسی میانگین حاصل از سه بار تکرار با استفاده از آزمون آنوا و توکی تفاوت معناداری را بین گروه دریافت کننده پکیج ویروسی حاوی shRNACD40 با گروه دریافت کننده پکیج ویروسی بدون shRNACD40، سلول دندریتیک و کنترل مثبت نشان داد ($P<0/001$). در حالی‌که در گروه‌های سلول دندریتیک، گروه دریافت کننده‌ی پکیج ویروسی بدون shRNACD40 تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P=0/8$).



شکل ۳. نمودار تکثیر لنفوسیتی، سلول‌های دندریتیک دریافت کننده پکیج ویروسی حاوی *shRNACD40* باعث ممانعت از تکثیر آلوژنیک سلول T می‌شوند. تکثیر با استفاده از روش *MTT* مورد ارزیابی قرار گرفته است.

بحث

یکی از مهم‌ترین معیارها در تولید سلول دندریتیک از هر منبعی میزان خلوص و درصد زنده بودن سلول‌ها می‌باشد که برای مراحل بعدی بسیار مهم می‌باشد. درصد زنده بودن سلول‌های دندریتیک و خلوص این سلول‌ها در کل مطالعه به ترتیب با استفاده از تریپان بلو و آنتی‌بادی علیه *CD11c* انجام پذیرفت که نتایج حاصل به ترتیب بیش از ۹۰ و ۷۵ درصد بود. این نتایج با نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی مولر و همکاران (۱۴)، گالن و همکاران (۱۵)، هاسه و همکاران (۱۶) و هریری و همکاران (۱۷) مشابه بود. نتایج مطالعه‌ی ما در مورد کاهش بیان ملکول *CD40* در سطح سلول‌های دندریتیک با استفاده از فلوسیتومتری در گروه دریافت کننده‌ی پکیج ویروسی حاوی *shRNACD40* نسبت به سلول دندریتیک بالغ ۳۱ درصد و نسبت به گروه دریافت کننده‌ی پکیج ویروسی بدون *shRNACD40* ۲۶ درصد کاهش نشان داد که از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار بود ($P < 0/0001$). این نتایج با نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی ژنگ و همکاران (۸)، کریمی و همکاران (۱۸)، می و همکاران (۱۹) مشابهت دارد که در این مطالعات کاهش ملکول *CD40* از ۲۵ تا ۴۵ درصد گزارش شده است. توانایی وکتور لتی برای کاهش بیان *mRNA* *CD40* با استفاده از روش کمی *Real Time PCR* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه‌ی ما نشان داد که بیان *mRNA* *CD40* در گروه دریافت کننده‌ی پکیج ویروسی حاوی *shRNACD40* ۶۴ برابر کاهش یافته است در حالی که این کاهش در گروه دریافت کننده‌ی پکیج ویروسی بدون *shRNACD40* فقط ۴ برابر بود که از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار بودند ($P < 0/0001$). تفاوت‌های مشابهی در مطالعه‌ی کریمی و همکاران (۱۸)

برای ژن *CD40*، می و همکاران (۱۹) برای ژن *CD40* در رت و جانث و همکاران (۲۰) برای ژن *MAPK1* گزارش شده است. نتایج به دست آمده از فلوسیتومتری و *Real Time PCR* کمی نشان می‌دهد که ملکول آنتی‌سنس قادر است با *mRNA* اندرکنش داده و به طور موثر موجب کاهش ملکول *CD40* در سطح ژن و پروتئین گردد. همان‌طور که در مقدمه اشاره شد کاهش بیان ملکول‌های کمک تحریکی بر روی سلول دندریتیک موجب به وجود آمدن سلول تولروژن خواهد گردید که اندرکنش این نوع سلول‌ها با سلول T موجب تمایز سلول T به سمت *Th2*، آنرژ، سلول T تنظیمی و یا آپاتوز می‌شود (۵). نتایج مطالعه‌ی ما نشان می‌دهد که کاهش بیان ملکول *CD40* به عنوان یک ملکول کمک تحریکی سبب ایجاد سلول دندریتیک تولروژن گردیده است، به طوری که مجاورت این نوع سلول‌ها در گروه دریافت کننده پکیج ویروسی حاوی *shRNACD40* موجب جلوگیری از تکثیر سلول T گردید. مطالعات متعددی در این زمینه وجود دارد که موید نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی ما می‌باشد، از جمله مطالعه‌ی جیانوکاکیس و توراکو در سال ۲۰۱۲ (۲۱)، جیانوکاکیس در سال ۲۰۱۳ (۲۲)، مطالعه‌ی لی و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۲۳) که نشان می‌دهد استفاده از آنتی‌سنس می‌تواند موجب مهار پاسخ تکثیری لنفوسیت T در هنگام مجاورت با سلول دندریتیک تولروژن گردیده و پاسخ‌ها را به سمت *Th2* سوق دهد. ایجاد این نوع پاسخ‌ها در بیماران خود ایمنی از جمله دیابت نوع یک بسیار مهم تلقی می‌گردد.

نتیجه گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که تنظیم کاهشی ملکول کمک تحریکی *CD40* در سطح سلول‌های دندریتیک با استفاده از *shRNA* موجب القای سلول‌های دندریتیک

علوم پزشکی شیراز انجام شده است؛ که از زحمات آقای دکتر محمد حسین کریمی تقدیر و تشکر می‌گردد. از جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی و کارکنان مرکز بن یاخته به‌ویژه جناب آقای دکتر محسن خراشادی بابت کمک به پکیج ویروس تقدیر و قدردانی می‌شود. همچنین از سرکار خانم محسنی بابت انجام فلوسیتومتری و جناب آقای دکتر سعید دانشمندی به خاطر کمک در تمام مراحل انجام پروژه تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

- 1- Groux H, Fournier N, Cottrez F. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells. *Sem in Immunol*. 2004; 16: 99-106.
- 2- Kanako L, Reizis L, Reizis B. Dendritic Cells: Arbiters of Immunity and Immunological Tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 4: a007401. Available from: www.cshperspectives.org.
- 3- Morel PA. Dendritic cell subsets in type1diabetes :friend or foe? *Frontiers in Immunol*. 2013; 4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/972865>.
- 4- Machen J, Harnaha JO, Lakomy R, Styche A, Trucco M, Giannoukakis N. Antisense oligonucleotides down-regulating costimulation confer diabetes-preventive properties to nonobese diabetic mouse dendritic cells. *The J Immunol*. 2004; 173: 4331-41.

تولروژن می‌شود، که یکی از کاربردهای این نوع سلول‌ها در درمان بیماری‌های خود ایمنی از جمله دیابت نوع یک می‌باشد. بنابراین ما نیز در مطالعات آتی از این سلول‌های تولروژن برای درمان بیماری دیابت نوع یک در مدل موشی بهره خواهیم برد.

تقدیر و تشکر

این مقاله از رساله‌ی مصوب در گروه ایمنی‌شناسی پزشکی دانشکده‌ی علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس استخراج شده است. بخشی از بودجه این پروژه با حمایت مالی مرکز تحقیقات پیوند بیمارستان شهید نمازی دانشگاه

- 5- Maldonado R, Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol*. 2010; 108: 111-165.
- 6- Peters AL, Stunz LL, Bishop GA. CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. *Sem Immunol*. 2009; 21: 293-300.
- 7- Li L, Wang H, Wang B. Anergic cells generated by blocking CD28 and CD40 costimulatory pathways in vitro ameliorate collagen induced arthritis. *Cell Immunol* . 2008; 254: 39-45.
- 8- Zheng X, Suzuki M, Zhang Z, et al. RNAi-mediated CD40-CD154 interruption promotes tolerance in autoimmune arthritis. *Arth Res & Ther*. 2010; 12: R13.
- 9- Pletinckx K, Dohler A, Pavlovic V, Lutz M.B. Role of dendritic cells maturity/ costimulation for generation, homeostasis and suppressive activity of regulatory T cells. *Fronties in Immunol*. 2011; 2: 7-22.

- 10- Gavrilov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: Principles, challenges and strategies. *Yale J Biol Med*. 2012; 85(2): 187-200.
- 11- Manjunath N, Wu H, Subramanya S, Shankar P. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Delivery Rev*. 2009; 61: 732-45.
- 12- Inaba K, Inaba M, Romani M, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with GM-CSF. *J Exp Med*. 1992; 176: 1693-702.
- 13- Virus packaging protocol. Stem Cell Biotechnology Research Center protocol, Iran. 2013. Available from: www.stemcellstech.com/index.php/fa/.
- 14- Muller G, Muller A, Jonuleit H. Fetal calf serum –free generation of functionally active murine dendritic cells suitable for invivo therapeutic approaches. *J Inv Dermatol*. 2000; 114: 142-8.
- 15- Marin-Gallen S, Clemente-Casares X, Planas R, et al. Dendritic cells pulsed with antigen-specific apoptotic bodies prevent experimental type 1 diabetes. *Clin and Exp Immunol*. 2009; 160: 207-14.
- 16- Hasse C, Ejrnaes M, Juedes AE, Wolf T. Immunomodulatory dendritic cells require autologous serum to circumvent nonspecific immunosuppressive activity in vivo. *Blood*. 2005; 106: 4225-33.
- 17- Feili-Hariri M, Dong X, Alber SM, Watkins SC, Salter RD, Morel PA. Immunotherapy of NOD mice with bone marrow–derived dendritic cells. *Diabetes*. 1999; 48: 2300-08.
- 18- Karimi MH, Ebadi P, Pourfathollah AA, et al. Immune modulation through RNA interference-mediated silencing of CD40 in dendritic cells. *Cellular Immunol*. 2009; 259: 74-81.
- 19- Mei S, Jin-Dong LI, Rui J, et al. Construction and characterization of lentiviral shRNA expression vector targeting rat CD40 gene in dendritic cells. *Chem Res*. 2009; 25(5): 666-72.
- 20- Jantsch J, Turza N, Volke M, et al. Small interfering RNA (siRNA) delivery into murine bone marrow-derived dendritic cells by electroporation. *J of Immunological Methods*. 2008; 337: 71-7.
- 21- Giannoukakis N, Trucco M. Dendritic cell therapy for type 1 diabetes suppression. *Immunother*. 2012; 4(10): 1-12.
- 22- Giannoukakis N. Tolerogenic dendritic cells for type 1 diabetes. *Immunother*. 2013; 5(6): 1-3.
- 23- Lee CN, Lew AM, Wu L. The potential role of dendritic cells in the therapy of Type1 diabetes. *Immunother*. 2013; 5(6): 591-606.

Induction of Tolerogenic Murine Dendritic Cells by Downregulating the Co-stimulatory Molecule of CD40 Using Lentivirus Vector

Mahmoodzadeh A¹, Pourfatollah AA¹, Karimi MH², Moazzeni SM¹

¹Dept. of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Transplantation Research Center, Nemazee Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Correspond Author: Pourfatollah AA, Dept. of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

E-mail: Pourfa@modares.ac.ir

Received: 14 May 2014

Accepted: 13 Jul 2014

Background and Objective: The important role of co-stimulatory molecules in immunological responses has been clearly demonstrated. With the development of new methods in molecular immunology, preventing the co-stimulatory signals in order to induce tolerance has emerged as a novel strategy. RNA interference is a new method that can specifically and effectively reduce target gene expression.

Materials and Methods: In this study, we used a lentiviral system to target the expression of CD40 gene in dendritic cells. ShRNA sequence is able to reduce the expression of CD40 gene on murine dendritic cells.

Results: Our results indicate 64-fold decreased expression of CD40 mRNA in the group receiving lentiviral shRNACD40 as well as 31% decrease in expression of CD40 protein on the surface of dendritic cells ($p < 0.0001$). Also, dendritic cells cannot stimulate T cells upon contact with them.

Conclusion: This study indicates that a decrease in expression of CD40 molecule induces tolerogenic dendritic cells and prevents Th1 immunological response. Prevention of Th1 response would shift the immunological responses to Th2 response, and this type of response can be effective in autoimmune diseases including rheumatoid arthritis and type I diabetes.

Keywords: CD40 Gene, Lentiviral vector, Murine Dendritic Cells