بسم الله الرحمن الرحیم

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته ایمنی شناسی پزشکی

عنوان

ارزیابی پاسخ‌های ایمنی علیه DNA واکسن کاندید حاوی چند اپی‌توپ خاص HIV-1 (pol, env, tat, gag) با بکارگیری استراتژی تزریق یادآور پروتئینی متصل به آنتی‌بادی علیه گیرنده DEC-205 سلول‌های دندریتیک و لیگاندهای TLR به عنوان ادجوانت

نگارش

رقیه رحیمی

اساتید راهنما

دکتر معصومه ابتکار

دکتر مهدی مهدوی

استاد مشاور

دکتر سید محمد موذنی

دی ۱۳۹۳

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم رقیه رحیمی رشته **ایمنی شناسی پزشکی** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **ارزیابی پاسخ های ایمنی علیه DNA واکسن کاندید حاوی چند اپی توپ خاص (pol, env, tat, gag) HIV-1 با بکارگیری استراتژی تزریق یادآور پروتئینی متصل به آنتی بادی علیه گیرنده DEC-205 سلولهای دندریتیک و لیگاندهای TLR به عنوان ادجوانت** » در تاریخ **۱۳۹۳/۱۰/۲۱** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنمای اصلی	دکتر معصومه ابتکار	
استاد راهنمای دوم	دکتر مهدی مهدوی	
استاد مشاور	دکتر سید محمد موذنی	
استاد ناظر	دکتر علی اکبر پور فتح اله	
استاد ناظر	دکتر کیهان آزاد منش	
استاد ناظر	دکتر امیر حسن زرنانی	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر احمد زواران حسینی	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می‌باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می‌باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **رقیه رحیمی** دانشجوی رشته **ایمنی شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۸** مقطع **دکتری تخصصی** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته‌های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

نام و نام خانوادگی: رقیه رحیمی

تاریخ و امضا: ۱۳۹۳/۱۰/۲۱

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل رساله **دکتری** نگارنده در رشته **ایمنی شناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۹۳** در دانشکده **علوم پزشکی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **سرکار خانم دکتر معصومه ابتکار و آقای دکتر مهدی مهدوی** و **مشاوره آقای دکتر سید محمد موذنی** از آن دفاع شده است.

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب **رقیه رحیمی** دانشجوی رشته **ایمنی شناسی پزشکی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: رقیه رحیمی

تاریخ و امضا: ۱۳۹۳/۱۰/۲۱

تقدیم :

یاد بعضی نفرات؛

رزق روحم شده است. . . . .

جراتم می بخشد؛ روشنم می دارد.

به "او" که هر گونه خواستم بود. . . اما آن گونه که می خواست نبودم. . .

. . . . "او" که آموخت مرا تا بیاموزم

به پدر و مادر عزیزم. . . .

که الفبای زندگی را از سرچشمه وجودشان آموختم

و با احترام

به خواهران و برادران عزیزم

و با عشق

به همسر مهربانم. . . . سایه سار زندگیم

و به تو که "آشنای" وجودمی. . . .

تشکر و قدردانی

«من لم یشکر المخلوق، لم یشکر الخالق»

اول سپاس خدای را که در سایه رحمتش به کسب علم از دریای بیکران دانش مفتخر هستم.

- سپاس از محضر اساتید ارجمند و بزرگوارم: سرکار خانم دکتر معصومه ابتکار و جناب آقای دکتر مهدی مهدوی که با صبر فراوان راهنما و راهگشای بنده در تمام مسیر پر پیچ و خم رساله حاضر بودند.... به پاس لطف و عنایتتان
- سپاس از محضر استاد بزرگوار: جناب آقای دکتر سید محمد مؤذنی که زحمت مشاوره رساله اینجانب را تقبل فرمودند....به پاس محبت‌های بی‌دریغ‌تان
- سپاس از محضر استاد بزرگوار: جناب آقای دکتر علی مصطفایی، استاد گرانقدری که بی‌هیچ چشم-داشت و در نهایت سعه صدر و سخاوت علمی و اخلاقی در پاره‌ای از مسیر علمی این رساله، بنده را مساعدت فرمودند...به پاس مهر بزرگ و اندیشه نیک‌تان
- سپاس از استاد ارجمند: جناب آقای دکتر کیهان آزادمنش که سخاوتمندانه امکانات آزمایشگاه‌شان را در اختیار اینجانب قرار دادند...به پاس اندیشه بزرگ‌تان
- سپاس از استاد گرانمایه: جناب آقای دکتر معمار نژادیان، انسان فرزانه‌ای که با آرامشی بی‌نظیر یارای من بودند.... به پاس الطاف سرشارتان
- سپاس از مهربان استاد بزرگوار: جناب آقای دکتر گلکار که در این مسیر از هیچ کمک و راهنمایی دریغ نورزیدند.
- سپاس از شخصیت بی‌نظیر: همکار ارجمندم جناب آقای شهرام پروانه که با خلوص نیت آموخته-هایشان را در طبق اخلاص در اختیار این‌جانب گذاشتند... به پاس بزرگواریتان
- سراپای وجودم سرشار است از احترام و سپاس از اساتید بزرگوارم در دانشگاه تربیت مدرس که تمامی آموخته‌هایم را پس از لطف الهی مدیون زحمات بی‌دریغ‌شان هستم، جناب آقای دکتر زواران، جناب آقای دکتر حسن، جناب آقای دکتر پورفتح‌اله.
- سپاس از همکاران گرانقدرم در انستیتو پاستور تهران: همکاران عزیزم در بخش ویروس‌شناسی سرکار خانم دکتر کریستینیه هارطونیان، آقای دکتر اعتمادزاده، آقای دکتر آرش‌کیا، آقای دکتر محجل، آقای دکتر بنی‌اسدی، سرکار خانم دکتر راسخیان، سرکار خانم دکتر زهرا تهرانی، سرکار خانم شاحسینی، سرکار خانم آزاد، سرکار خانم معتمدی، سرکار خانم مقدم، سرکار خانم عدالت و سایر عزیزان بزرگواری که بنده را مساعدت فرمودند. همکاران بی‌نظیرم در بخش ایمنی‌شناسی خصوصا ریاست محترم بخش جناب آقای دکتر نیکنام و کارشناسان محترم بخش و سایر عزیزانی

که بنده را مساعدت فرمودند. همکاران ارجمند بخش میکروب‌شناسی جناب آقای دکتر موسوی، سرکار خانم دکتر شاه‌چراغی، سرکار خانم نیک‌بین، سرکار خانم صداقت و به‌ویژه سرکار خانم شورج. همکاران محترم بخش هپاتیت و ایدز، جناب آقای دکتر آقا صادقی، جناب آقای دکتر سادات، سرکار خانم متولی، جناب آقای عزیزی، سرکارخانم دکتر کرامتی، سرکار خانم دکتر یزدانیان، سرکار خانم دکتر آزاده طباطبایی و سایر عزیزانی که بنده را مساعدت فرمودند. همکاران بزرگوار بخش انگل‌شناسی به‌ویژه جناب آقای دکتر بابایی و کارشناسان محترم این بخش. کارشناسان محترم بخش بیولوژی مولکولی به ویژه جناب آقای مستعان و همچنین استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمدرضا اسدی‌کرم. دوستان عزیزم در بخش بیوتکنولوژی به ویژه جناب آقای دکتر لنگری و سرکار خانم دکتر آرزومند. همکاران محترم بخش هاری خصوصا دوست و استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر آهنگر.

❖ از تمامی همکاران و عزیزانی که در انستیتو پاستور تهران به نحوی در پیشبرد این رساله بنده را مساعدت فرمودند، از صمیم قلب تشکر می‌کنم و اگر نامی از قلم افتاده با تمام وجود عذرخواهی می‌کنم.

❖ همچنین از جناب آقای دکتر فرهودی از اساتید ارجمند انستیتو پاستور کرج که بسیار این بنده را مساعدت فرمودند، سپاس‌گزاری می‌نمایم.

❖ از تمامی دوستان ارجمندم در دانشگاه تربیت مدرس خصوصا کارشناسان محترم گروه سرکار خانم محسنی و جناب آقای نوری و همچنین مسوولین محترم پژوهشی دانشکده جناب آقای موسویان و سرکار خانم دباغ که مشتاقانه در پی رفع نیازهای دانشجویان هستند، و نیز سرکار خانم جرنگی که بسیار پی‌گیر امور این‌جانب بودند، بسیار سپاسگزارم.

❖ از تمامی دوستان، همکاران و هم‌کلاسی‌های ارجمندم که همیشه از الطافشان بهره‌مند بودم، به ویژه جناب آقای دکتر قضاوی کمال تشکر را دارم. از دوستان عزیزم در بخش میکروب‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس به ویژه جناب آقای دکتر نیما خرم‌آبادی و سرکار خانم دکتر احمد رجبی بسیار سپاسگزارم. از دوستان و همکاران عزیزم در بخش ویروس‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس به ویژه جناب آقای دکتر رضوی و نیز کارشناس محترم این بخش سپاسگزارم.

❖ از دوستان عزیزم که در مراحل پایانی رساله، بنده را مساعدت فرمودند جناب آقای دکتر یزدی، سرکار خانم عسگری، جناب آقای کاملی، جناب آقای چوپانی، سرکار خانم اسداللهی و همچنین سرکار خانم شنکایی از بخش فیزیک‌پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، کمال تشکر را دارم.

❖ از دوستان عزیزم سرکار خانم نرگس تهرانی، سرکار خانم ندا عربی و سرکار خانم نازلی جعفر پور به خاطر تمامی مساعدت‌هایشان سپاس‌گزارم.

❖ از دوست بسیار عزیزم سرکار خانم هاجر رجایی به خاطر قلب بزرگ و محبت‌های بی‌دریغشان که هرگز فراموش‌شدنی نیست، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

چکیده:

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

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، به دنبال تحریک (Priming) موش‌های Balb/c با DNA vaccine حاوی سکانس Tat۱-۲۰، ENV۵۷۷-۶۱۰، Pol۱۵۰-۱۹۰، ENV۲۹۶-۳۲۳، Gag۱۵۸-۱۸۶ و Tat۴۴-۶۱، به منظور به‌کارگیری ویژگی‌های سلول‌های دندریتیک در روند ایمنی زایی، پروتئین نوترکیب به روش شیمیایی به آنتی‌بادی علیه گیرنده DEC-205 کونژوگه گردید. در مرحله تزریق یادآور موش‌های Balb/c به صورت داخل پوستی با فرم کونژوگه یا غیرکونژوگه (کنترل) پپتید HIVTOP4 به همراه Poly I:C به عنوان عامل بلوغ سلول‌های دندریتیک، ایمونیزه شدند و پاسخ‌های ایمنی حاصل از این واکسیناسیون با پاسخ‌های ایمنی گروهی از موش‌ها که واکسن پپتیدی مورد نظر را بدون اتصال به آنتی‌بادی مذکور دریافت کرده‌اند، مورد مقایسه قرار گرفتند. تکثیر سلولی به روش برومو دی یوریدین، پاسخ سیتوتوکسیسیتی با اندازه گیری گرآنزیم B، سایتوکاین‌های IL-4، IL-17، IFN-γ و آنتی‌بادی توتال به ترتیب با روش الیزای مستقیم و غیر مستقیم سنجیده شدند.

یافته‌ها: ایمونیزاسیون با پپتید متصل به آنتی‌بادی علیه DEC-205 در مقایسه با گروه‌های کنترل موجب افزایش در پاسخ‌های تکثیری، تولید گرآنزیم B، تیتر آنتی‌بادی توتال و همچنین موجب افزایش سطح تولید سایتوکاین IFN-γ در مقایسه با IL-4 و سطح آنتی‌بادی IgG2a به IgG1 می‌گردد.

نتیجه‌گیری: تحویل مستقیم آنتی‌ژن پروتئینی مورد نظر به سلول‌های دندریتیک + DEC-205، در مقایسه با گروه‌های کنترل موجب افزایش سطح پاسخ‌های ایمنی با تمایل به سمت پاسخ‌های سلولی می‌شود.

واژگان کلیدی: DEC-205 Targeting، هدف‌گیری سلول دندریتیک، Toll like receptor، پروتئین نوترکیب چنداپی‌توپی، واکسن

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ومروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۱-۱. ویروس ایدز، پاتوژنز و تولید واکسن ۲

۱-۱-۲. کشف سلول‌های دندریتیک ۵

۱-۱-۳. خصوصیات سلول‌های دندریتیک نابالغ و بالغ ۶

۱-۱-۴. انواع سلول دندریتیک ۷

۱-۱-۴-۱. Conventional DCs ۸

۱-۱-۴-۱-۱. Migratory DCs ۸

۱-۱-۴-۱-۲. Lymphoid DCs ۸

۱-۱-۴-۲. Non-conventional DCs ۸

۱-۱-۵. هتروژنیسیتی سلول‌های DC موش در ارگان‌های لنفاوی ۸

۱-۱-۶. استراتژی هدف‌گیری سلول‌های دندریتیک در واکسیناسیون ۱۰

۱-۱-۷. گیرنده‌های شبه Toll ۱۴

۱-۱-۸. ادجوانت و طبقه‌بندی آن بر اساس عملکرد ۱۶

۱-۱-۹. لیگاندهای TLRs به عنوان ادجوانت ۱۷

۱-۱-۹-۱. اثر ادجوانتی لیگاندهای TLR3 ..... ۱۸

۱-۱-۱۰. نقش هدف‌گیری سلول‌های دندریتیک درسیستم واکسیناسیون prime-boost ۱۹

۱-۱-۱۱. انواع سیستم‌های بیانی و مزیت اشرشیاکلی ۲۰

۱-۱-۱۲. ناقل‌های پلاسمیدی ۲۲

۱-۱-۱۳. بیان پروتئین نوترکیب ۲۳

۱-۱-۱۴. تخلیص پروتئین نوترکیب ۲۶

۱-۱-۱۵. بیوکونژوگاسیون ۲۸

۱-۱-۱۵-۱. اتصال پروتئین-پروتئین به کمک کربوهیدرات موجود در ساختار پروتئین ۳۶
۱-۲. مروری بر مطالعات گذشته ۳۸

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۴۲

۲-۱. تایید توالی پلاسمید نوترکیب pET23a-HIV$_{tat/pol/gag/env}$ و pCDNA3.1hygro-HIV $_{tat/pol/gag/env}$ ۴۳
۲-۱-۱. هضم آنزیمی وکتور(+) pET23a و pCDNA3.1+Hygro توسط آنزیم های EcoRI و XhoI ۴۳
۲-۱-۲. الکتروفورز نمونه‌های هضم آنزیمی شده ۴۴
۲-۱-۲-۱. مواد مورد نیاز بری تهیه بافر TBE 10X (۱ لیتر) ۴۵
۲-۲. انتقال پلاسمید نوترکیب pET23a-HIV$_{tat/pol/gag/env}$ و pCDNA3.1+hygro-HIV$_{tat/pol/gag/env}$ به باکتری (ترانسفورماسیون) ۴۶
۲-۲-۱. تهیه سلول صلاحیت دار به کمک کلرید کلسیم ۴۶
۲-۲-۱-۱. طرز تهیه محیط کشت LB مایع (برای یک لیتر) ۴۷
۲-۲-۲. مواد و وسایل مورد نیاز برای ترانسفورماسیون ۴۸
۲-۲-۲-۱. طرز تهیه محیط کشت LB آگار (ا لیتر) ۴۹
۲-۳. غربالگری برای تایید ترانسفورماسیون پلاسمیدهای نوترکیب pET23a-HIV$_{tat/pol/gag/env}$ و pCDNA3.1+hygro-HIV$_{tat/pol/gag/env}$در سویه‌های *E.coli* و انتخاب کلونی مناسب از هر مورد ۴۹
۲-۳-۱. استخراج پلاسمید در مقیاس کم ۵۰
۲-۳-۲. استخراج پلاسمید در مقیاس بالا به منظور تهیه DNA vaccine ۵۱
۲-۳-۳. تهیه استوک از کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب برای نگهداری طولانی مدت در ۷۰- Cº ۵۶
۲-۴. بررسی بیان پروتئین (HIV TOP4)HIV$_{tat/pol/gag/env}$ ۵۷
۲-۴-۱. بررسی بیان پروتئین HIV TOP4 به روش SDS-PAGE ۵۸
۲-۴-۲. تایید نهایی بیان پروتئین TOP4 به کمک وسترن بلات ۶۳

۲-۴-۲-۱. انتقال در تانک ۶۳
۲-۴-۲-۲. مسدودسازی غشا ۶۴
۲-۴-۲-۳. تشخیص با آنتی‌بادی ۶۴
۲-۴-۳. بهینه‌سازی بیان پروتئین چند اپی توپی HIV TOP4 ۶۶
۲-۴-۳-۱. بهینه‌سازی زمان مناسب برای القای بیان ۶۶
۲-۴-۳-۲. انتخاب محیط کشت بهینه برای کشت BL21/pET23a-HIVTOP4 ۶۷
۲-۴-۳-۳. انتخاب غلظت بهینه IPTG برای القای بیان BL21/pET23a-HIVTOP4 ۶۸
۲-۴-۳-۴. انتخاب مدت زمان مناسب انکوباسیون به دنبال اثر دادن IPTG برای القای بیان BL21/pET23a-HIVTOP4 ۶۹
۲-۴-۳-۵. تخلیص پروتئین نوترکیب HIVTOP4 به کمک یون‌های نیکل متصل به ماتریکس Ni-NTA ۷۰
۲-۴-۳-۵-۱. تعیین حلالیت پروتئین HIVTOP4 ۷۰
۲-۴-۳-۵-۲. تخلیص پروتئین HIVTOP4 از *E.coli* BL21 تحت شرایط Native ۷۱
۲-۴-۳-۵-۳. دیالیز پروتئین HIVTOP4 تخلیص شده از *E.coli* BL21 ۷۴
۲-۴-۳-۵-۴. تعیین غلظت پروتئین HIVTOP4 به روش برادفورد ۷۵
۲-۴-۳-۵-۵. تعیین غلظت پروتئین HIVTOP4 به کمک نانودراپ در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۷۷
۲-۴-۳-۵-۶. تعیین غلظت پروتئین HIVTOP4 به کمک اسپکتروفتومتر ۸۰
۲-۴-۳-۵-۷. شارژ مجدد ستون Ni-NTA ۸۱
۲-۵. کونژوگاسیون پروتئین HIVTOP4 با آنتی‌بادی علیه DEC-205 و آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل ۸۲
۲-۶. گروه‌بندی و ایمونیزاسیون موش‌های مورد مطالعه ۸۴
۲-۷. بررسی پاسخ‌های ایمنی ۸۶
۲-۷-۱. تخلیص سلول‌های طحال موش ایمن شده ۸۶

۲-۷-۲. بررسی وضعیت تکثیر سلول‌های لنفوسیت در موش‌های ایمن شده به روش الیزا..... ۸۹
۲-۷-۳. بررسی پاسخ‌های سیتوتوکسیک سلول‌های لنفوسیت در موش‌های ایمن شده به روش الیزا..... ۹۲
۲-۷-۳. بررسی الگوی سایتوکاینی..... ۹۶
۲-۷-۳-۱. آماده سازی سوپ سلولی جهت سنجش میزان سایتوکاین‌ها..... ۹۶
۲-۷-۳-۲. اندازه‌گیری اینترفرون گاما، اینتر لوکین ۴ و اینترلوکین ۱۷ به روش الایزا..... ۹۷
۲-۷-۴. بررسی سطح آنتی‌بادی توتال..... ۹۹
۲-۷-۵. بررسی سطح آنتی‌بادی‌های IgG1، IgG2a، IgM..... ۱۰۰
۲-۸. بررسی آماری داده‌ها..... ۱۰۲

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها..... ۱۰۳

۳-۱. هضم آنزیمی وکتور pET23a (+) و pCDNA3.1+Hygro حاوی ساختار HIV-1 tat/pol/gag/env توسط آنزیم‌های EcoRI و XhoI..... ۱۰۴
۳-۲. تهیه سلول‌های مستعد، ترانسفورماسیون پلاسمیدهای نوترکیب pET23a-HIVtat/pol/gag/env وpCDNA3.1+hygro-HIVtat/pol/gag/env در سویه‌های *E.coli* وغربالگری..... ۱۰۷
۳-۳. بررسی کیفیت پلاسمید pCDNA3.1+ hygro/HIVTOP4 به عنوان واکسن DNA..... ۱۰۸
۳-۴. بررسی بیان پروتئینHIVTOP4 در سویه *E.coli* Bl21(DE3) ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب pET23a-HIVtat/pol/gag/env..... ۱۰۹
۳-۵. زمان بهینه برای شروع القای بیان pET23a-HIVTOP4..... ۱۱۰
۳-۶. محیط کشت مناسب برای القای بیان pET23a-HIVTOP4..... ۱۱۱
۳-۷. غلظت مناسب IPTG برای القای بیان pET23a-HIVTOP4..... ۱۱۲
۳-۸. اثر مدت زمان انکوباسیون به دنبال اثر دادن IPTG در القای بیان BL21/pET23a-HIVTOP4..... ۱۱۳
۳-۹. تعیین وضعیت محلول بودن پروتئین HIVTOP4..... ۱۱۴

۳-۱۰. تخلیص پروتئین HIV-TOP4 به کمک رزین Ni-NTA ۱۱۵
۳-۱۱. بررسی وضعیت کونژوگاسیون پروتئین HIVTOP4 به آنتی‌بادی علیه DEC-205 و آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل ۱۱۶
۳-۱۲. بررسی وضعیت رشد سلول‌های طحال موش‌های ایمونیزه شده ۱۱۸
۳-۱۳. بررسی پاسخ‌های تکثیری در موش‌های ایمونیزه شده ۱۱۸
۳-۱۴. بررسی توانایی سلول‌کشی در موش‌های ایمونیزه شده ۱۲۱
۳-۱۵. بررسی تولید سایتوکاین‌های IFN-γ، IL-۴ و IL-۱۷ ۱۲۳
۳-۱۵-۱. بررسی سطح تولید IFN-γ ۱۲۳
۳-۱۵-۲. بررسی سطح تولید IL-4 ۱۲۵
۳-۱۵-۳. مقایسه سطح تولید سایتوکاین‌های IFN-γ وIL-4 ۱۲۶
۳-۱۵-۴. بررسی سطح تولید سایتوکاین IL-17 ۱۲۷
۳-۱۶. بررسی پاسخ‌های ایمنی هومورال ۱۲۹
۳-۱۶-۱. بررسی وضعیت تولید آنتی‌بادی توتال ۱۳۰
۳-۱۶-۲. بررسی سطح تولید آنتی‌بادی IgM ۱۳۱
۳-۱۶-۳. بررسی سطح تولید ایزوتایپ‌های IgG1 و IgG2a ۱۳۲
۳-۱۶-۳-۱. بررسی سطح تولید ایزوتایپ IgG1 ۱۳۲
۳-۱۶-۳-۲. بررسی سطح تولید ایزوتایپ IgG2a ۱۳۴
۳-۱۶-۳-۳. مقایسه سطح تولید ایزوتایپ IgG2a با IgG1 ۱۳۶

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۳۷

۴-۱. بحث ۱۳۸
۴-۱. واکسن کاندید مورد مطالعه ۱۳۹
۴-۱-۱. تهیه واکسن DNA و پروتئین ۱۳۹
۴-۱-۲. انتخاب وکتور مناسب و بهینه‌سازی بیان پروتئین واکسن ۱۴۰

۴-۱-۳. کونژوگاسیون پروتئین نوترکیب با آنتی‌بادی‌های مورد مطالعه ۱۴۱
۴-۲. گروه‌بندی موش‌های مورد مطالعه ۱۴۳
۴-۳. به‌کارگیری لیگاند TLR3 به عنوان ادجوانت ۱۴۴
۴-۴. ارزیابی پاسخ‌های ایمنی ۱۴۵
۴-۴-۱. ازریابی پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌های طحال ۱۴۵
۴-۴-۲. ارزیابی توانایی سلول‌کشی لنفوسیت‌های طحال ۱۴۷
۴-۴-۳. ارزیابی پاسخ‌های تولید سایتوکاین ۱۴۹
۴-۴-۴. ارزیابی پاسخ‌های ایمنی هومورال ۱۵۲
۴-۵. جمع‌بندی یافته‌ها و نتیجه‌گیری ۱۵۴
۴-۶. پیشنهادها ۱۵۵

فهرست منابع و مآخذ ۱۵۷
چکیده انگلیسی ۱۶۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول (۱-۱) انواع سلول‌های دندریتیک موجود در ارگان‌های لنفاوی و غیر لنفاوی موش ۱۰
جدول (۱-۲) هدف‌گیری گیرنده‌های زیرگروه‌های مختلف سلول دندریتیک برای بهبود پاسخ‌های ایمنی ۱۳
جدول (۱-۳) مروری بر واکسن‌ها بر پایه استراتژی هدف‌گیری سلول دندریتیک ۱۴
جدول (۱-۴) میزان pKa اسیدهای آمینه یونیزه شونده ۳۵

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار (۲-۱) گروه‌بندی موش‌های مورد مطالعه ۸۶

نمودار (۳-۱) بررسی پاسخ‌های تکثیری در موش‌های مورد مطالعه ۱۲۰

نمودار (۳-۲) بررسی توانایی سلول‌کشی در موش‌های مورد مطالعه..... ۱۲۲

نمودار (۳-۳) بررسی میزان تولید سایتوکاین اینترفرون گاما به روش الیزا..... ۱۲۴

نمودار (۳-۴) بررسی میزان تولید سایتوکاین اینترلوکین-۴ به روش الیزا ۱۲۶

نمودار (۳-۵) مقایسه سطح تولید سایتوکاین IFN-γ با IL-4 در موش‌های مورد مطالعه ۱۲۷

نمودار (۳-۶) بررسی میزان تولید سایتوکاین اینترلوکین-۱۷ به روش الیزا..... ۱۲۹

نمودار (۳-۷) وضعیت تولید آنتی‌بادی توتال در رقت‌های مختلف بین گروه‌های مورد مطالعه ۱۳۰

نمودار (۳-۸) بررسی سطح تولید آنتی‌بادی IgM در گروه‌های مورد مطالعه ۱۳۲

نمودار (۳-۹) بررسی سطح تولید ایزوتایپ IgG1..... ۱۳۴

نمودار (۳-۱۰) بررسی سطح تولید ایزوتایپ IgG2a..... ۱۳۵

نمودار (۳-۱۱) مقایسه سطح تولید ایزوتایپ IgG2a با IgG1..... ۱۳۶

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل (۱-۱) خصوصیات سلول‌های دندریتیک نابالغ و بالغ ۷

شکل (۱-۲) مفهوم delivery آنتی‌ژن به سلول دندریتیک به صورت in situ ۱۳

شکل (۱-۳) لیگاندهای TLRs و برهم‌کنش آن‌ها با گیرنده‌های Toll ۱۵

شکل (۱-۴) گیرنده‌های Toll شناسایی کننده اسیدهای نوکلئیک و جایگاه آن‌ها ۱۶

شکل (۱-۵) استراتژی تنظیم بیان ژن کلون شده در پلاسمید خانواده pET ۲۴

شکل (۱-۶) ساختار شماتیک و توالی ژنی پلاسمید بیانی pET-23a(+) ۲۵

شکل (۱-۷) کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از رزین Ni-NTA برای جداسازی His-tagged protein ۲۷

شکل (۱-۸) برهم کنش انتهای 6xHis tag از پروتئین با یون‌های نیکل ۲۸

شکل (۱-۹) ساختار شماتیک اسید آمینه ۳۱

شکل (۱-۱۰) رآژین‌هایی نظیر EDC، CDI و... که با گروه‌های کربوکسیل در پروتئین هدف واکنش می‌دهند ۳۱

شکل (۱-۱۱) فرایند آلکیلاسیون و آسیلاسیون ۳۲

شکل (۱-۱۲) مکانیسم آسیلاسیون ۳۲

شکل (۱-۱۳) گروه‌های سولفیدریل در واکنش‌های آلکیلاسیون و آسیلاسیون شرکت می‌کنند ۳۳

شکل (۱-۱۴) گروه جانبی تیروزین تحت تاثیر واکنش های الکتروفیلی و نوکلئوفیلی قرار می‌گیرد ۳۴

شکل (۱-۱۵) منوساکاریدهای رایج در ساختار مولکول‌های بیولوژیک ۳۷

شکل (۱-۱۶) اثر سدیم پریودات بر تشکیل گروه‌های فعال آلدهیدی در ساختار قند ۳۷

شکل (۲-۱) ۷۷

شکل (۲-۲) ۷۸

شکل (۲-۳) ۷۹

شکل (۳-۱) ساختار وکتور pcDNA3.1+/Hygro ۱۰۵

شکل (۳-۲) ساختار وکتور بیانی pET23a(+)..... ۱۰۵
شکل (۳-۳) هضم آنزیمی ساختارهای pET23a+-HIV-1 tat/pol/gag/env (سمت راست) و pCDNA3.1+ Hygro- HIV-1 tat/pol/gag/env (سمت چپ)..... ۱۰۶
شکل (۳-۴) سکانس ژنی HIV-1 tat1-20, 44-61/pol150-190/gag158-186/env 296-323, 577-610.... ۱۰۶
شکل (۳-۵) نتایج حاصل از ترانسفورمیشن پلاسمید به داخل باکتری *E.coli* مستعد شده با روش کلرید کلسیم..... ۱۰۷
شکل (۳-۶) محصول تخلیص پلاسمید pCDNA3.1+ hygro/HIVTOP4 با کمک کیت تخلیص Endo free-giga purification..... ۱۰۸
شکل (۳-۷) بررسی صحت بیان پروتئین توسط سویه BL21(DE3)/pET23a-HIVtat/pol/gag/env..... ۱۰۹
شکل (۳-۸) اثر نقاط زمانی مختلف القای بیان بر شدت بیان پروتئین TOP4. همان‌طور که در شکل ملاحظه می‌شود..... ۱۱۰
شکل (۳-۹) بیان پروتئین TOP4 در محیط‌های کشت مختلف..... ۱۱۱
شکل (۳-۱۰) تاثیر غلظت‌های مختلف IPTG بر میزان بیان پروتئین HIVTOP4..... ۱۱۲
شکل (۳-۱۱) تاثیر مدت زمان انکوباسیون به دنبال القای بیان پروتئین در میزان بیان HIVTOP4..... ۱۱۳
شکل (۳-۱۲) وضعیت بیان پروتئین HIVTOP4..... ۱۱۴
شکل (۳-۱۳) تخلیص پروتئین TOP4 به کمک رزین Ni-NTA..... ۱۱۵
شکل (۳-۱۴) نتیجه SDS-page کونژوگه پروتئین HIV-Top4 به فرم منووالان آنتی‌بادی علیه DEC-205 و آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل RTK2758..... ۱۱۷
شکل (۳-۱۵) نتیجه وسترن بلات از محصول کونژوگاسیون پروتئین TOP4 به آنتی‌بادی علیه DEC-205 و ایزوتایپ کنترل آن..... ۱۱۷
شکل (۳-۱۶) بررسی وضعیت رشد سلول‌های طحالی..... ۱۱۸

فصل اول:

مقدمه ومروری بر مطالعات گذشته