Arc

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۱۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸

تولید آزمایشگاهی فرم فعال ایمونوتوکسین هدف‌گذاری شده برعلیه گیرنده فاکتور محرک رشد کلونی گرانولوسیت

مریم قدرتی سیاهمزگی .Ph.D ، محمد علی نصیری خلیلی .Ph.D * ، مهدی زین الدینی .Ph.D، سیروس خدادادی .Ph.D، نسرین زرکار .Ph.D ، نسرین فرامرزی .M.Sc.

- دانشگاه صنعتی مالک اشتر ، تهران ، ایران.

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: manasiri@mut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۲

چکیده

هدف: هدف از مطالعه‌ی حاضر، تولید پروتئین نوترکیب هیبریدی $DT_{389}GCSF$ به فرم فعال محلول در باکتری *E. coli* Bl-21(DE3) ، تخلیص و ارزیابی سمیت سلولی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پروتئین $DT_{389}GCSF$، با دنباله‌ی ۶ هیستیدین در باکتری *E. coli* BL-21(DE3) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به فرم محلول بیان شد. سپس از طریق ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل سفاروز تخلیص شد. در نهایت عملکرد پروتئین نوترکیب خالص شده با استفاده از آزمون MTT بر روی سلول سرطانی HL-60 مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: میزان بیان و خلوص پروتئین $DT_{389}GCSF$ با استفاده از نرم‌افزار Image J، به‌ترتیب در حدود ۱۲ و ۸۰ درصد تخمین زده شد. میزان IC_{50} پس از ۴۸ ساعت قرارگیری پروتئین $DT_{389}GCSF$ در معرض رده‌ی سلولی، در حدود ۰/۰۰۰۱۹±۰/۰۰۰۱۷ مولار بود.

نتیجه‌گیری: با کاهش دما و استفاده از مکانیسم درون سلولی، می‌توان بازتاخوردگی پروتئین هیبریدی $DT_{389}GCSF$ را به شکل مناسب و به فرم فعال مشاهده نمود. در نتیجه در مراحل تولید آزمایشگاهی ایمونوتوکسین‌های مربوطه می‌توان با استفاده از این روش، از مراحل تولید به صورت اینکلوژن‌بادی صرف‌نظر کرد.

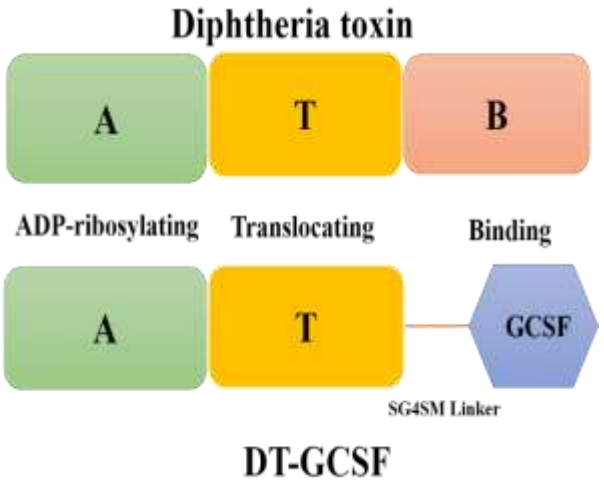
واژگان‌کلیدی: ایمونوتوکسین، فاکتور محرک رشد کلونی گرانولوسیت، بیان، خالص‌سازی، فرم فعال

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان، یک عامل مهم و اساسی مرگ و میر در جهان است. با توجه به مشکلات استفاده از روش‌های مرسوم شیمی‌درمانی و پرتودرمانی از جمله مقاومت سلول‌های سرطانی به برخی داروهای شیمی‌درمانی و دارا بودن عوارض جانبی و سمیت این داروها بر روی بافت‌های سالم، ارائه‌ی راهکارهای جدید برای درمان اختصاصی و موثرتر سرطان ضروری به‌نظر می‌رسد (۱-۳). امروزه استفاده از پروتئین‌های نوترکیب که بتواند بافت‌ها و سلول‌های اختصاصی را ردیابی، شناسایی و نابود کند، مورد توجه محققین می‌باشد. نتیجه تحقیقات صورت گرفته، دستیابی به نوعی پروتئین هیبریدی هوشمند به نام ایمونوتوکسین است. دنیلوکین دیفتیتوکس یا اونتاک ($DT_{389}IL_2$)، اولین ایمونوتوکسین نوترکیب است که در سال ۱۹۹۹، توانست از سازمان غذا و داروی آمریکا تاییدیه دریافت کند. این ایمونوتوکسین با ایده‌برداری از توکسین دیفتری طراحی شده است. که در آن بخش اتصالی توکسین دیفتری حذف و جایگزین آن اینترلوکین ۲ انسانی شده است (۴-۶). در ساختار ایمونوتوکسین $DT_{389}GCSF$ توکسین دیفتری (DT) ناقص (بدون بخش اتصالی) به فاکتور محرک رشد کلونی گرانولوسیت یا G-CSF به روش مهندسی ژنتیک متصل شده است. توکسین دیفتری طبیعی، یک پروتئین تک زنجیره‌ای با ۵۳۵ ریشه‌ی آمینواسیدی می‌باشد که به‌وسیله گونه‌های مولد سم کورینه باکتریوم دیفتریا تولید می‌شود و از نظر ساختاری از سه دمین تشکیل شده است: دمین A (آمینو اسیدهای ۱۹۳-۱) با عملکرد آنزیمی آدنوزین دی‌فسفات ریبوزیل ترانسفرازی، دمین T (آمینواسیدهای ۳۷۸-۲۰۵) با عملکرد تشکیل کانال و کمک به فرآیند انتقال دمین آنزیمی به سیتوزول و دمین B (آمینواسیدهای ۵۳۵-۳۸۶) با عملکرد اتصال به گیرنده می‌باشد (۷-۱۲). در طراحی $DT_{389}GCSF$، دمین B سم دیفتری در بخش انتهای کربوکسیل که محل اتصال توکسین دیفتری به گیرنده سلول است، با G-CSF جایگزین و برای سلول‌های سرطان خون، هدف‌گذاری شده است. $DT_{389}GCSF$ با ۵۷۴ ریشه‌ی آمینواسیدی، از قطعه‌ی توکسین دیفتری با ۳۸۹ ریشه‌ی آمینواسیدی و توالی فاکتور محرک رشد گرانولوسیتی انسانی با ۱۷۴ ریشه‌ی آمینواسیدی تشکیل یافته است که از طریق رابط پپتیدی ۷ آمینواسیدی SerGly4SerMet به‌هم متصل شده‌اند و به‌منظور سهولت در تخلیص، در انتهای ′۵ به ′۳ آن توالی ۶ هیستیدین طراحی شده است (شکل ۱).



شکل ۱: تصویر شماتیک از دمین‌های توکسین دیفتری و ایمونوتوکسین $DT_{389}GCSF$

پروتئین هیبریدی $DT_{389}GCSF$ از جایگاه گیرنده‌ی سیتوکین G-CSF، که عمدتا توسط اندوتلیال و فیبروبلاست‌ها تولید می‌شود و تکثیر و تمایز سلول های خونی را تحریک می‌کند، به سلول‌های سرطانی اتصال می‌یابد (۱۳-۱۵). گیرنده‌ی GCSF به‌همراه اینترلوکین-۳ (IL-3) و فاکتور محرک رشد کلنی ماکروفاژ (GM-CSF) بر روی سطح سلول‌های سرطانی میلوئیدی حاد یا AML (Acute Meyloid Lukemia) به میزان زیادی تولید می‌شوند و در نتیجه این گیرنده‌ها می‌توانند هدفی برای توکسین درمانی سرطان AML باشند (۱۶, ۱۷).

www.SID.ir

Archive of SID

یکی از گلوگاه‌های اصلی در تولید پروتئین‌های نوترکیب با منشا پروکاریوتی، مسئله بازیابی فرم فعال و بازتاخورده آن‌ها در شرایط اینکلوژن‌بادی است. چرا که در سیتوپلاسم باکتری‌ها، پروتئین‌ها به‌دلیل بیان بالا و نیز عدم وجود شرایط لازم برای تاخوردن صحیح به‌صورت اینکلوژن‌بادی در می‌آیند. درنتیجه برای به‌دست آوردن فرم فعال پروتئین، نیاز است که با انتخاب روشی مناسب بازتاخورده شوند. یکی از ساده‌ترین روش‌ها برای به‌حداقل رساندن شکل‌گیری اینکلوژن‌بادی‌ها کاهش دما است. عموما بیان در دمای پایین منجر به افزایش حلالیت و تاخوردن صحیح می‌شود. این امر ناشی از این مسئله است که برهمکنش‌های هیدروفوبیک که تعیین‌کننده اینکلوژن‌بادی‌ها هستند وابسته به دما می‌باشند. از سویی احتمالا کاهش دما سرعت رونویسی، ترجمه و بازتاخوردن را پایین می‌آورد و بنابراین اجازه شکل‌گیری ساختار صحیح را می‌دهد. همچنین در دمای پایین افزایش بیان و فعالیت شماری از چاپرون‌ها در *E. coli* گزارش شده است. همچنین گزارشات نشان می‌دهد که پروتئازهای شوک حرارتی که طی افزایش بیان القا می‌شوند در شرایط دمایی پایین فعالیت کمتری پیدا می‌کنند. بنابراین این مسئله منجر به کاهش قابل توجه تخریب پروتئین نوترکیب می‌شود (۵، ۱۸). براین اساس در مطالعه حاضر، به‌منظور حذف مرحله‌ی بازتاخوردگی پروتئین هیبریدی نوترکیب $DT_{389}GCSF$، در باکتری *E. coli* BL-21(DE3) به‌فرم محلول بیان و سپس از طریق ستون تمایلی نیکل سفاروز تخلیص گردید و عملکرد آن با استفاده از سنجش سمیت $DT_{389}GCSF$ بر روی رده‌ی سلولی لوکمیای انسانی HL-60، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و زیستی مورد استفاده: مواد شیمیایی مورد استفاده شامل پودر آماده محیط کشت LB از شرکت Applichem، ایمیدازول، بیس‌اکریل‌آمید، مرکاپتواتانول، بروموفنل‌بلو، کوماسی‌بلو R250، اسیداستیک‌گلاسیال و متانول از شرکت Merck تهیه گردید. تریس‌باز، ایزوپروپیل-بتا-دی-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG)، آمونیوم‌پرسولفات (APS) و پلی‌اکریل‌آمید از شرکت سیناژن تهیه شد. آمونیوم‌کلرید، سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS)، از شرکت Aldrich-Sigma خریداری شد. فنیل‌متان‌سولفونیل‌فلوراید (PMSF) از شرکت Fluka و رزین Chelating Sepharose Fast Flow از شرکت GE Healthcare Life Sciences و محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین‌گاوی (FBS) و پنی‌سیلین از شرکت Gibco تهیه شد.

باکتری E. coli BL-21(DE3) حاوی پلاسمید pET-$DT_{389}GCSF$ که در تحقیقات قبلی بدست آمده بود، مورد استفاده قرار گرفت (۸، ۱۱). رده‌ی سلولی لوکمیای انسانی HL-60 (PCC No.C217) از انیستیتو پاستور ایران خریداری شد.

بیان و تخلیص پروتئین $DT_{389}GCSF$: به‌میزان ۵۰ میکرولیتر از بانک مربوط به باکتری *E. coli* (BL21)، حاوی وکتور pET-$DT_{389}GCSF$ در ۲۰ میلی‌لیتر محیط LB-Broth حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، در شرایط استریل کشت داده شد. پس از تلقیح، درون شیکر انکوباتور ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب گرماگذاری شد. به‌منظور تازه‌سازی کشت، محیط کشت حاوی باکتری رشد یافته به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB-Broth، حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ، اضافه و تا رسیدن به جذب ۰/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، درون شیکر انکوباتور ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری شد. پس از رشد باکتری و رسیدن به جذب نوری مورد نظر، جهت القا به‌میزان ۲۰۰ میکرولیتر IPTG، ۱ مولار با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به محیط کشت اضافه و در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸، ۲۰۰ درجه‌سانتی‌گراد دور در دقیقه،

www.SID.ir

Archive of SID

گرماگذاری گردید. پس از گذشت ۴ ساعت از القا، محیط کشت، طی سانتریفوژ (۸۰۰۰ دور در دقیقه) به‌مدت ۵ دقیقه از کشت سلولی رسوب‌گیری گردید. برای ارزیابی میزان بیان به‌وسیله روش SDS-PAGE، نمونه‌های قبل از القا و پس از القا برداشت شد. پس از انجام SDS-PAGE، درصد بیان پروتئین توسط نرم‌افزار Image J، مورد بررسی قرار گرفت. این نرم افزار نوعی نرم افزار قدرتمند برای آنالیز تصاویر ژل الکتروفورز از منظر نحوه توزیع باندهای موجود در ژل می‌باشد. میزان بیان پروتئین در آن براساس دانسیته باند ظاهر شده و مقایسه آن با سایر باندها، تخمین زده می‌شود. خالص‌سازی پروتئین به‌جهت داشتن دنباله‌ی هیستیدینی با ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA، انجام گرفت. به‌منظور شکست سلولی به‌روش سونیکاسیون، رسوب سلولی در یخ قرار داده شده و به‌ازای هرگرم رسوب، ۱۰ میلی لیتر بافر تعادل حاوی (ایمیدازول۵۰ میلی مولار، تریس ۲۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۰/۵ مولار، PMSF ۱ میلی مولار در pH 7.8) اضافه و به‌منظور مخلوط شدن کامل و ایجاد سوسپانسیون، از دستگاه هموژنایزر استفاده شد. سلول‌ها در دستگاه سونیکاتور به‌مدت ۱۰ دقیقه، در ۱۰ سیکل، با توان۲۰۰ وات شکسته شدند. سوسپانسیون مذکور، به‌مدت ۲۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ و پس از آن، محیط رویی که حاوی پروتئین محلول بود از رسوب، جداسازی شد. برای آماده‌سازی ستون‌های کروماتوگرافی، ابتدا رزین Chelating Sepharose Fast Flow با سولفات نیکل ۰/۲ مولار شارژ شد. پس از مرحله‌ی عبور پروتئین از ستون، پروتئین اتصال یافته محلول به رزین، با ایجاد شیب غلظت ۵۰ تا ۷۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول از آن جداسازی گردید. در این مرحله نمونه‌های حاوی پروتئین در حجم‌های ۱۵۰۰ میکرولیتر جمع‌آوری شدند. پس از تخلیص اولیه، به‌منظور فرمولاسیون ایمونوتوکسین مربوطه، تعویض بافر با PBS با استفاده از سنتریکون انجام و ایمیدازول از محلول پروتئینی حذف گردید. به‌منظور بررسی میزان بیان و خلوص پروتئین نوترکیب $DT_{389}GCSF$، از ژل ۱۰ درصد SDS-PAGE استفاده شد و رنگ آمیزی با کوماسی بلو R-250 صورت گرفت.

سنجش سمیت سلولی $DT_{389}GCSF$: سنجش سمیت سلولی $DT_{389}GCSF$، از طریق قدرت کشندگی پروتئین در معرض سلول‌های لوکمیای انسانی HL-60 با آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. تست MTT، یک روش رنگ‌سنجی برای سنجش میزان سمیت داروها می‌باشد که اساس آن تشکیل رنگ فورمازان به‌دلیل احیای ترکیب MTT (دی‌متیل‌تیازول– ۲ و ۵ دی‌فنیل‌تترازولیوم بروماید) و یا دیگر نمک‌های تترازولیوم است. با گسستگی حلقه تترازولیوم از طریق آنزیم‌های میتوکندریایی در سلول‌های زنده، بلورهای فورمازان غیرمحلول تشکیل می‌شود که بنفش رنگ می‌باشند. ایجاد این بلورها حاکی از فعال بودن آنزیم‌های زنجیره تنفسی و معیاری برای زنده بودن سلول‌ها است. با اندازه گیری میزان جذب توسط طیف سنجی در طول موج‌های معین، می‌توان درصد سلول‌های زنده مانده را مشخص کرد. کشت سلول‌های HL-60 که از نوع محلول (غیرچسبنده) هستند در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین انجام گرفت. حجم ۱۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی 10^3cell/ml به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. ۲۰ میکرولیتر از مقادیر مختلف $DT_{389}GCSF$ (۶۰۰ و ۴۵۰ و ۳۰۰ و ۶۰ و ۰) میکروگرم به هر چاهک اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد به‌مدت ۸۴ ساعت گرماگذاری شد. پس از ۸۴ ساعت، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PBS) به هر چاهک اضافه گردید و به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سلول‌های زنده به‌واسطه‌ی

www.SID.ir

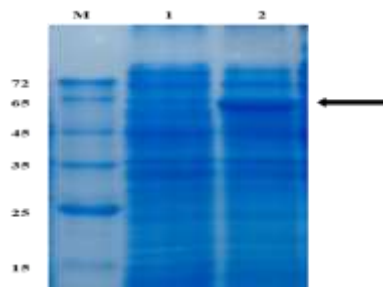
Archive of SID

داشتن آنزیم ردوکتاز میتوکندری فعال، با تترازولیوم معرف MTT واکنش داده و ایجاد کریستال‌های فورمازان کردند. پس از آن پلیت ۹۶ خانه، به‌مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰۰ دور در دقیقه برای ته‌نشینی کریستال‌های فورمازان سانتریفوژ شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت محلول‌رویی جداسازی گردید و ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) به هر چاهک به‌منظور محلول‌سازی بلورهای فورمازان افزوده شد و پس از ۱۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در ۵۷۰ نانومتر در دستگاه الایزا ریدر Spain (State Fax-2100 model) قرائت شد. مقدار رنگ تولید شده و جذب به‌طور مستقیم با تعداد سلول زنده متناسب بود. تمام آزمون‌ها در سه تکرار برای هر غلظت $DT_{389}GCSF$ انجام شد.

نتایج

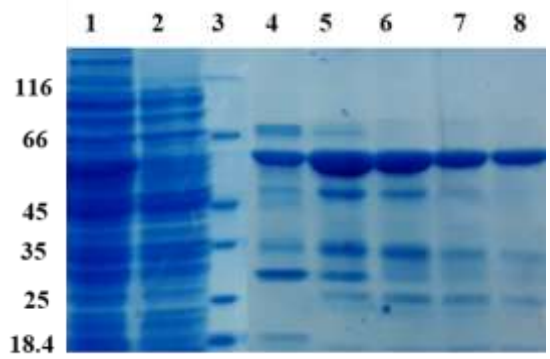
تولید فرم محلول پروتئین $DT_{389}GCSF$

طبق شرایط ذکر شده در قسمت مواد و روش‌ها، میزان بیان پروتئین $DT_{389}GCSF$ با استفاده از ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده‌ی باند ۶۳ ~ کیلودالتونی بیان پروتئین هیبریدی $DT_{389}GCSF$ در زمان ۴ ساعت پس از القا و عدم مشاهده‌ی باند در نمونه‌ی زمان صفر قبل از القا، که در شکل ۲ نشان داده شده است، موید بیان پروتئین است. با استفاده از نرم افزار Image J، بیان ۱۲ درصدی پروتئین هیبریدی $DT_{389}GCSF$، پس از القا محاسبه و تخمین زده شد.



شکل۲: ارزیابی بیان پروتئین $DT_{389}GCSF$ با استفاده از روش SDS-PAGE. M) مارکر وزن مولکولی پروتئینی. ۱) باکتری نوترکیب در زمان صفر القا، ۳) باکتری نوترکیب در زمان ۴ ساعت پس از القا.

ازسوی‌دیگر روش‌های مختلفی جهت خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب وجود دارد که در این پژوهش به‌دلیل برچسب هیستیدینی طراحی شده در ابتدای توالی ایمونوتوکسین، از روش کروماتوگرافی تمایلی نیکل جهت تخلیص فرم محلول $DT_{389}GCSF$ بهره گرفته شد. بررسی میزان خلوص پروتئین $DT_{389}GCSF$، پس از عبور از ستون نیکل-سفاروز، از ژل ۱۰ درصد SDS-PAGE استفاده شد. همان‌طورکه در شکل ۳ مشاهده می‌شود، از چاهک ۵ به سمت چاهک ۸ با افزایش غلظت ایمیدازول، بر خلوص پروتئین افزوده شده است. با استفاده از نرم افزار Image J میزان خلوص نهایی $DT_{389}GCSF$، ۸۰ درصد برآورد شد.



شکل۳: ارزیابی تخلیص پروتئین $DT_{389}GCSF$ با استفاده ازروش SDS-PAGE. ۱) نمونه ورودی به ستون، ۲) نمونه خروجی از ستون، ۳) مارکر وزن مولکولی برحسب کیلودالتون، ۸-۴) نمونه های خروجی از ستون حاوی $DT_{389}GCSF$ از شیب غلظت ۵۰ میلی مولار تا غلظت ۷۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول.

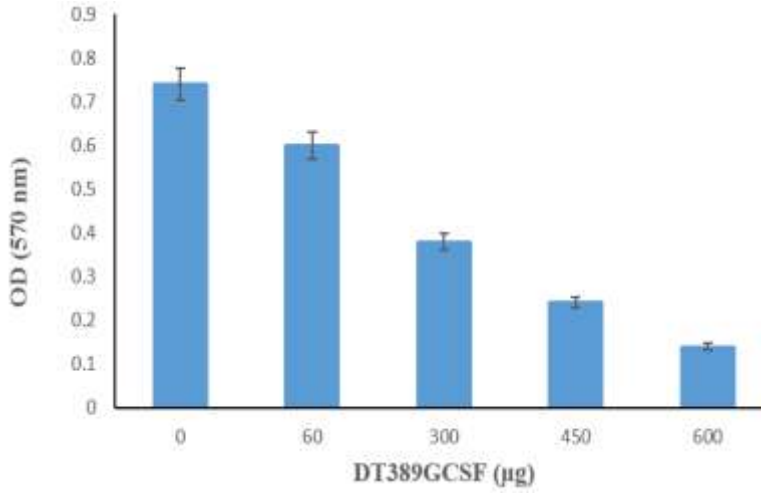
ارزیابی عملکرد فرم محلول پروتئین DT389GCSF

برای بررسی اثر سمیت سلولی $DT_{389}GCSF$ خالص‌شده بر روی سلول‌های لوکمیای انسانی HL-60 که حامل گیرنده‌ی G-CSF هستند، از آزمون MTT استفاده شد. آزمون سنجش‌زیستی در شکل ۴ برحسب میانگین جذب در ۵۷۰ نانومتر برای مقادیر (۶۰۰ و ۴۵۰ و ۳۰۰ و ۶۰ و ۰) میکروگرم $DT_{389}GCSF$ نشان داده شده است. (آزمایشات سه بار تکرار انجام شد.) نتایج بیان‌گر این بود

www.SID.ir

Archive of SID

که ۴۸ ساعت بعد از تیمار تا میزان ۶۰ میکروگرم $DT_{389}GCSF$، تاثیر معنی‌داری بر مرگ سلولی نداشته اما پس از این مقدار، میزان بقای سلولی به صورت وابسته به آن، کاهش داشته و میزان ۶۰۰ میکروگرم از ایمونوتوکسین تولیدی (۶-۱۰ مولار) نسبت به سایر غلظت‌ها، بیشترین سمیت را نشان داده است.



شکل ۴: ارزیابی سمیت سلولی پروتئین $DT_{389}GCSF$ تخلیص شده با استفاده از آزمون MTT. میانگین جذب خوانده شده در ۵۷۰ نانومتر در مقادیر صفر تا ۶۰۰ میکروگرم پروتئین. (آزمایشات با سه بار تکرار انجام شده است).

بحث

ایمونوتوکسین‌تراپی یک راهکار جدید و هوشمند برای مهار و غیرفعال‌سازی سلول‌های سرطانی محسوب می‌شود که می‌تواند برای درمان هدفمند سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار گیرد. پروتئین هیبریدی $DT_{389}GCSF$، محصول فناوری DNA نوترکیب است که در آن G-CSF جایگزین دمین اتصالی توکسین طبیعی دیفتری شده است. براین اساس پروتئین طراحی شده از جایگاه گیرنده‌اش وارد سلول‌های حامل گیرنده‌ی G-CSF شده و به‌طور اختصاصی سبب مرگ سلول‌های سرطانی از جمله سرطان میلوئیدی حاد می‌شود. پروتئین $DT_{389}GCSF$، اولین بار توسط چادویک در سال ۱۹۹۳ مورد مطالعه قرار گرفت. در آن تحقیق، توکسین دیفتری با توالی ناقص ۴۸۶ آمینواسیدی به توالی کامل مربوط به G-CSF، از طریق رابط پپتیدی HATPL متصل شده بود. وزن مولکولی پروتئین $DT_{486}GCSF$، حدود ۷۰ کیلو دالتون بود که در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تولید و پس از خالص‌سازی، در معرض بلاست‌های AML با گیرنده‌ی G-CSF، با غلظت بالای 10^{-6} مولار اثر سمیت نشان داد و سبب مرگ سلولی شد (۱۹). در تحقیق حاضر، پروتئین $DT_{389}GCSF$ با در نظر گرفتن ساختار ایمونوتوکسین تجاری شده‌ی اونتاک (DT389IL-2)، توکسین دیفتری دارای ۳۸۹ ریشه‌ی آمینواسیدی است که از طریق رابط پپتیدی SG4SM به توالی کامل G-CSF اتصال یافته است و وزن مولکولی آن ۶۳ کیلو دالتون می باشد (۸, ۹, ۱۱). طی مطالعه‌ی گذشته توسط گروه تحقیقاتی پژوهش حاضر بر روی پروتئین تلفیقی $DT_{389}GCSF$، پیش بینی ساختاری آن در محیط رایانه با استفاده از نرم افزارهای مرتبط، انجام گرفت. صحت ساختار پروتئین $DT_{389}GCSF$، از نظر خصوصیات صورت بندی و عملکردی، تایید شد (۹). همچنین در تحقیق دیگر، پس از بیان پروتئین $DT_{389}GCSF$ به فرم اینکلوژن بادی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و خالص‌سازی آن از طریق شستشوی ۳ مرحله‌ای با بافر

www.SID.ir

Archive of SID

تریس ۵۰ میلی‌مولار حاوی اوره‌ی ۳ مولار، بازتاخوردگی فرم اینکلوژن‌بادی پروتئین $DT_{389}GCSF$ در حضور سیستئین ۲۵ مولار انجام گرفت. توسط فلوئورسانس نشر ذاتی، طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی، عملکرد نوکلئازی بخش توکسینی و همچنین ارزیابی سمیت با آزمون MTT، پروتئین تولیدی مورد ارزیابی ساختاری و عملکردی قرار گرفت . نتایج بیان‌گر کسب ساختار و عملکرد مناسب $DT_{389}DCSF$ پس از مرحله‌ی بازتاخوردگی بود (۱۰).

یک مرحله‌ی گلوگاهی در طراحی زیست داروها که در باکتری *E. coli* تظاهر می‌یابند، بحث عملکرد پروتئین تولیدی است که البته عملکرد صحیح هر پروتئینی در گروی داشتن ساختار صحیح آن است. در سیتوپلاسم *E. coli* به دلیل این‌که پروتئین‌ها بیان بالایی دارند و شرایط مناسبی برای تاخوردگی صحیح آن‌ها وجود ندارد به‌صورت ذرات نامحلول به‌نام اینکلوژن‌بادی در می‌آیند. به‌دلیل این‌که پروتئین حالت‌های تاخورده‌ی ناصحیح دارد نمی‌تواند فعالیت بیولوژیکی داشته باشد و بازتاخوردگی صحیح پروتئین به‌راحتی میسر نمی‌باشد. در نتیجه ممکن است در طی مراحل بازتاخوردگی با گونه‌های دیگر پروتئین از جمله تجمعات پروتئینی و اشکال غیرطبیعی پروتئین همراه باشد. بنابراین به‌دست‌آوردن پروتئین با تاخوردگی صحیح طی روند بازتاخوردگی در شرایط خارج بدنی (in vitro) مشکل بوده و بازده پایینی دارد (۲۰, ۲۱). در پژوهشی، بازده بازتاخوردگی فرم اینکلوژن‌بادی GCSF به فرم فعال، ۳۰ درصد عنوان شده است (۲۲). همچنین در مطالعه‌ی دیگر، طی انجام مراحل زمان‌بر و طولانی و مشکل و پرهزینه، به‌منظور بازتاخوردگی ایمونوتوکسین $DT_{389}IL2$، میزان زیادی از پروتئین به تجمعات پروتئینی و اشکال غیرفعال پروتئین تبدیل شده بود (۲۳). به‌منظور حذف مراحل زمانبر و پرهزینه‌ی بازتاخوردگی و افزایش بازده تولید پروتئین نوترکیب با ساختار و فعالیت بیولوژیکی صحیح، می‌توان از کشت باکتری در دمای پایین بهره برد. در این روش با پایین آوردن دمای کشت، سرعت بیان پروتئین توسط سلول باکتریایی کاهش یافته به‌گونه‌ای که پروتئین برای تاخوردگی صحیح فرصت پیدا می‌کند (۵, ۸, ۱۸, ۲۴).

به‌همین منظور، در مطالعه‌ی حاضر، پروتئین $DT_{389}GCSF$ در شرایط آزمایشگاهی در سویه‌ی بیانی *E. coli* BL21(DE3) حاوی پلاسمید نوترکیب pET-$DT_{389}GCSF$ در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تحت تاثیر ماده القاگر IPTG، ۱ میلی مولار قرار گرفت. نتایج حاصل از SDS-PAGE، بیان‌گر بیان مناسب (در حدود ۱۲ درصد) ایمونوتوکسین نوترکیب بود. پروتئین نوترکیب بیان شده به‌صورت محلول، به‌دلیل دارا بودن توالی ۶ آمینواسید هیستیدینی در انتهای N-ترمینال، به‌روش کروماتوگرافی تمایلی نیکل تخلیص شد و توسط روش الکتروفورز پلی‌آکریل‌آمید و با استفاده از نرم افزار Image J خلوص تقریبی ۸۰ درصدی پروتئین محاسبه شد. سنجش سمیت ایمونوتوکسین نوترکیب بر روی رده سلولی HL-60 که نوعی سلول لوکمیای انسانی است و حاوی گیرنده‌ی G-CSF است، انجام گرفت و میزان مرگ و میر سلول با آزمون MTT مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. نتایج بیان‌گر این مطلب بود که با افزایش غلظت $DT_{389}GCSF$، میزان جذب در ۵۷۰ نانومتر کاهش یافت. که این امر بیان‌گر کاهش در تعداد سلول‌های زنده می باشد. بررسی داده های حاصل از سنجش زیستی نشان داد که میزان ۶۰۰ میکروگرم بیشترین سمیت را داشته و میزان IC_{50} (غلظت مورد نیاز $DT_{389}GCSF$، برای کشته شدن ۵۰ درصد سلول‌های HL-60) برابر ۰/۰۰۰۱۷±۰/۰۰۰۰۱۹ مولار محاسبه و تخمین زده شد. نتایج حاصله بیان‌گر این مطلب است که فرم محلول این ایمونوتوکسین دارای ساختار صحیح و عملکرد مناسب می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در نتیجه با بیان پروتئین $DT_{389}GCSF$ به‌شکل محلول، می‌توان با رفع مشکلات زیر هزینه‌های تولید را به‌حداقل رساند:

www.SID.ir

Archive of SID

(۱) بازتاخوردگی صحیح فرم غیرفعال اینکلوژن‌بادی پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در پروکاریوت‌ها، به‌راحتی میسر نیست.
(۲) امکان تشکیل گونه‌های دیگر پروتئین از جمله تجمعات پروتئینی (آگریگاسیون) و اشکال غیرفعال پروتئین در طی مراحل بازتاخوردگی وجود دارد.
(۳) مراحل پایین‌دستی بازتاخوردگی و اوره‌زدایی فرم اینکلوژن‌بادی منجر به از دست رفتن مقادیر زیادی از پروتئین طی این مراحل شده و باعث صرف زمان و هزینه زیادی می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند از دانشگاه صنعتی مالک اشتر برای حمایت‌های مالی جهت انجام این پژوهش تشکر نمایند.

منابع

1.Kayastha N, Wolf SP, Locke SC, Samsa GP, El-Jawahri A, LeBlanc TW. The impact of remission status on patients' experiences with acute myeloid leukemia (AML): an exploratory analysis of longitudinal patient-reported outcomes data. Supportive Care in Cancer 2018;26(5):1437-1445.
2. Giles FJ, Keating A, Goldstone AH, Avivi I, Willman CL, Kantarjian HM. Acute myeloid leukemia. ASH Education Program Book 2002;2002(1):73-110.
3. Ma G, Wang Y, Ahmed T, Zaslav A-L, Hogan L, Avila C, et al. Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor Targeting of CD19+ Acute Myeloid Leukemia. Leukemia Research Reports 2018.
4. Zarkar N, Khalili MA, Ahmadpour F, Khodadadi S, Zeinoddini M. In Silico and in Vitro Evaluation of Deamidation Effects on the Stability of the Fusion Toxin DAB389IL-2. Current Proteomics 2019;16(4):307-313.
5. Zarkar N, Khalili MAN, Khodadadi S, Zeinoddini M, Ahmadpour F. Expression and purification of soluble and functional fusion protein DAB389IL-2 into the E. coli strain Rosetta-gami (DE3). Biotechnology and applied biochemistry 2019.

6. Bayat S, Zeinoddini M, Azizi A, Khalili MN. Co-Solvents Effects on the Stability of Recombinant Immunotoxin Denileukin Diftitox: Structure and Function Assessment. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science 2019:1-7.
7. Murphy JR. Mechanism of diphtheria toxin catalytic domain delivery to the eukaryotic cell cytosol and the cellular factors that directly participate in the process. Toxins 2011;3(3):294-308.
8. Moghaddas M, Zeinoddini M, Saeedinia A, Bayat S. Structural and Functional Assessment of Diphtheria Fusion Toxin: DT389GCSF. Journal of Bionanoscience 2018;12(2):240-244.
9. Siahmazgi M, Khalili M, Ahmadpour F, Khodadadi S, Zeinoddini M. In silico design of fusion toxin DT389GCSF and comparison of interaction it with GCSF receptor rather than DT486GCSF. Current computer-aided drug design 2018.
10. Siahmazgi MG, Khalili MAN, Zeinoddini M, Ahmadpour F, Khodadadi S. Purification and Characterization of DT 389 GCSF Fusion Protein: A Unique Immunotoxin Against the Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor Receptor. International Journal of Peptide Research and Therapeutics 2019:1-8.

11. Babavalian E, Zeinoddini M, Saeedinia A, Mohammadi R, Xodadadi N. Design of a recombinant immunotoxin against the human granulocyte-colony stimulating factor receptor. Molecular biology reports 2018:1-5.

12. Donyapoor F, Zeinoddini M, Saeedinia AR. Cloning and Expression of Recombinant Immunotoxin using Diphtheria Toxin and Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF). Cloning 2016;19(110):42-50.

www.SID.ir

Archive of SID

factor, cloning and expression in Escherichia coli. Iranian Journal of Biotechnology 2008;6(4):229-234.

14. Rao DVK, Narasu ML, Rao AKSB. A purification method for improving the process yield and quality of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor expressed in Escherichia coli and its characterization. Biotechnology and applied biochemistry 2008;50(2):77-87.

15. Fallah M, Akbari B, Saeedinia A, Karimi M, Vaez M, Zeinoddini M, et al. Overexpression of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in E. coli. Iranian Journal of Medical Sciences 2015;28(3):131-134.

16. Frankel AE, Powell BL, Hall PD, Case LD, Kreitman RJ. Phase I trial of a novel diphtheria toxin/granulocyte macrophage colony-stimulating factor fusion protein (DT388GMCSF) for refractory or relapsed acute myeloid leukemia. Clinical Cancer Research 2002;8(5):1004-1013.

17. Urieto JO, Liu T, Black JH, Cohen KA, Hall PD, Willingham MC, et al. Expression and purification of the recombinant diphtheria fusion toxin DT388IL3 for phase I clinical trials. Protein expression and purification 2004;33(1):123-133.

18. Rabhi-Essafi I, Sadok A, Khalaf N, Fathallah DM. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon α as a GST-fusion protein in E. coli. Protein Engineering, Design & Selection 2007;20(5):201-209.

19. Chadwick D, Williams D, Niho Y, Murphy J, Minden M. Cytotoxicity of a recombinant diphtheria toxin-granulocyte colony-stimulating factor fusion protein on human leukemic blast cells. Leukemia & lymphoma 1993;11(3-4):249-262.

20. Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. Practical

13. Naghoosi H, Behzadian F, Saeedinia A, Ghorashi SA. Site-directed mutagenesis in human granulocyte-colony stimulating protocols for production of very high yields of recombinant proteins using Escherichia coli. Protein Science 2009;18(5):936-948.

21. Huang C-J, Lin H, Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements. Journal of industrial microbiology & biotechnology 2012;39(3):383-399.

22. Ramya M, Selvarajan E. Purification of human recombinant granulocyte colony stimulating factor from Escherichia coli. African Journal of Biotechnology 2012;11(50):11104-11109.

23. Potala S, Verma RS. Modified DT–IL2 fusion toxin targeting uniquely IL2Rα expressing leukemia cell lines–Construction and characterization. Journal of biotechnology 2010;148(2-3):147-155.

24. Forrer P, Jaussi R. High-level expression of soluble heterologous proteins in the cytoplasm of Escherichia coli by fusion to the bacteriophage lambda head protein D. Gene 1998;224(1-2):45-52.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Autumn 2019; 10(3)

Lab-Scale Production of Biologically Active Form of Immunotoxin Targeted against Granulocyte Colony Stimulating Factor

Ghodrati Siahmazgi M, Nasiri Khalili MA, *, Zeinoddini M, khodadadi S, Zarkar N, Faramarzi N.

- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, MalekAshtar University of Technology, Tehran, Iran

* Email corresponding author: manasiri@mut.ac.ir

Received: 22 Jul.2019 Accepted: 3 Dec.2019

Abstract

Aim: This study aimed to produce recombinant hybrid protein, DT389GCSF, in E. coli BL-21(DE3) in a soluble and active form and to purify it and evaluate its cytotoxicity.

Material and Methods: The protein, His6-tagged DT389GCSF was expressed in E. coli BL-21(DE3) in a soluble form at 28 °C. Then it was purified by affinity chromatography on nickel sepharose column. Finally, the function of purified recombinant protein was evaluated by MTT assay on HL-60 cancer cell line.

Results: The yield of expression and purification of DT389GCSF were determined at about 12 and 80 percent, respectively, using Image J software. The IC50 value upon 48 hours of exposure of DT389GCSF toward cell line was about 0.00017±0.000019 M.

Conclusion: By reducing the temperature and using the intracellular mechanism, the refolding of hybrid protein, DT389GCSF, can be observed in a proper and active form. As a result, in vitro production of relevant immunotoxins, by using this method, the steps of inclusion body production can be neglected.

Keywords: Immunotoxin, Granulocyte Colony Stimulating Factor, Expression, purification, active form

www.SID.ir