

Engineering and production of recombinant bovine pancreatic ribonuclease enzyme (RNase A) as a potential therapeutic

Masoume Vakili-Azghandi 

PhD Student, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Tel. +989354657772. Email: m.vakili2009@gmail.com

Mohammadreza Nassiri 

*Corresponding author: Professor, Recombinant proteins research group, The research institute of biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Tel. +98 51 38795618. Email: nassiry@um.ac.ir

Shahrokh Ghovvati 

Assistant Professor, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran. Tel. +989113313260. Email: Ghovvati@guilan.ac.ir

Ali Javadmanesh 

Assistant Professor, Animal Science Department, Faculty of Agriculture and Stem Cell Biology and Regenerative Medicine Research Group, Research Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Tel. +989113716048. Email: javadmanesh@um.ac.ir

Abstract

Objective

Immunotoxins are one of the most promising ways in therapeutic fields, specially cancer therapy which have a unique toxin-antibody structure, and kill the cancer cell by passing through the cell membrane and entering the target cell. The aim of this study was to engineer and design bovine pancreatic enzyme (RNase A) for to escape from ribonuclease inhibitor (RI) as a toxin segment in designing of immunotoxins used in therapeutic fields.

Materials and Methods

After bioinformatics investigation using PyMol software, engineering and substitution of target amino acid in wild gene coding RNase A sequence (K91A) were performed. The wild type and recombinant proteins in E.coli (BL21(D3) strain) were expressed and refolded, and then approved using SDS-PAGE. The purification of produced proteins was conducted using an immobilized-metal affinity chromatography for His-tagged proteins.

Results

The results showed that the protein concentrations were 3 and 2.2 g/L for wild RNase A and recombinant enzyme. The hydrolysis activity measurement of the produced enzymes, in presence of different concentrations of RI, indicated that recombinant variant had lower sensitivity and higher catalytic activity in comparison with the wild enzyme. The results obtained from enzyme activity of recombinant enzyme compared to the wild enzyme, in presence or absence of RI, demonstrated that the interaction effect between RNase A and RI can be disrupted by manipulation of amino acids involved in this interaction.

Conclusion

In respect to the current results, it was concluded that RNase A enzyme can be used as a promising drug in engineering and production of immunotoxins.

Keywords: Immunotoxin, Enzyme engineering, Ribonuclease inhibitor, RNase A

Paper Type: Research Paper.

Citation: Vakili-Azghandi M, Nassiri M, Ghovvati S, Javadmanesh A (2020) Engineering and production of recombinant bovine pancreatic ribonuclease enzyme (RNase A) as a potential therapeutic. *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (4), 61-78.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (4), 61-78.

Received: November 5, 2020.

DOI: 10.22103/jab.2020.16662.1268

Accepted: November 29, 2020.


Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production,



Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مهندسی و تولید آنزیم نوترکیب ریبونوکلئاز پانکراس گاوی (RNase A) به عنوان یک پتانسیل دارویی

معصومه وکیلی ازغندی 


دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، تلفن: +۹۸۹۳۵۴۶۵۷۷۷۲، ایمیل:

m.vakili2009@gmail.com

محمد رضا نصیری 


* نویسنده مسئول، استاد گروه تحقیقاتی پروتئین‌های نوترکیب، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران،

تلفن: +۹۸ ۵۱ ۳۸۷۹۵۶۱۸، ایمیل: nassiry@um.ac.ir

شاهرخ قوتی 

استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، تلفن: +۹۸۹۱۱۳۳۱۳۲۶۰، ایمیل:

Ghovvati@guilan.ac.ir

علی جوادمنش 

استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و گروه سلول‌های بنیادی و طب بازساختی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه

فردوسی مشهد، مشهد، ایران، تلفن: +۹۸۹۱۱۳۷۱۶۰۴۸، ایمیل: javadmanesh@um.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹ / ۰۸ / ۱۵

چکیده

هدف: ایمنوتوکسین‌ها یکی از امیدبخش‌ترین روش‌ها در حوزه‌های درمانی و به ویژه درمان سرطان می‌باشند که دارای ساختار منحصر به فرد توکسین-آنتی‌بادی هستند و با گذر از غشای سلولی و ورود به داخل سلول هدف باعث از بین رفتن سلول هدف می‌شوند. هدف این پژوهش مهندسی و طراحی آنزیم پانکراس گاوی (RNase A) در جهت فرار از مهارکننده ریبونوکلئازی (RI) به عنوان بخش توکسین در طراحی ایمنوتوکسین‌های مورد استفاده در حوزه‌های درمانی می‌باشد.

مواد و روش: پس از بررسی‌های بیوانفورماتیک با استفاده از نرم افزار PyMol، مهندسی و تعویض آمینواسید هدف در ژن وحشی کد کننده توالی RNase A (K91A) صورت پذیرفت. پروتئین‌های نوع وحشی و نوترکیب در باکتری E.coli سویه BL21(D3) بیان، refold و با استفاده از ژل SDS-PAGE تایید گردیدند. خالص‌سازی پروتئین‌های تولیدی با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی تثبیت شده با یون فلزی برای His-tag انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد غلظت پروتئین‌ها برای آنزیم RNase A وحشی و آنزیم نوترکیب به ترتیب ۳ و ۲/۲ گرم بر لیتر بود. نتایج اندازه‌گیری فعالیت هیدرولازی آنزیم‌های تولیدی در حضور غلظت‌های مختلفی از مهارکننده‌های ریبونوکلئازی نشان داد که واریانت نوترکیب در مقایسه با آنزیم وحشی حساسیت کمتری نسبت به مهارکننده داشته و همچنین این واریانت افزایش فعالیت کاتالیکی را در حضور مهار کننده نسبت به آنزیم وحشی دارا می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیمی آنزیم نوترکیب نسبت به آنزیم وحشی در حضور و عدم حضور ممانعت کننده ریبونوکلئازی نشان دادند که اثر متقابل بین آنزیم RNase A و مهارکننده ریبونوکلئازی را می‌توان با دست‌کاری آمینو اسیدهای درگیر در این برهم‌کنش مختل نمود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان این‌گونه استنباط نمود که آنزیم RNase A دارای قابلیت استفاده به‌عنوان یک داروی امید بخش در مهندسی و تولید ایمونوتوکسین‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ایمونوتوکسین، مهندسی آنزیم، مهارکننده ریبونوکلئازی، RNase A

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: وکیلی ازغندی معصومه، نصیری محمدرضا، قوتی شاهرخ، جوادمنش علی، (۱۳۹۹) مهندسی و تولید آنزیم نوترکیب ریبونوکلئاز پانکراس گاوی (RNase A) به عنوان یک پتانسیل دارویی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۷۸-۶۱.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production,



Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

مطابق با آمار منتشر شده توسط سازمان جهانی بهداشت (WHO 2018)، سرطان پس از بیماری‌های قلبی و عروقی دومین عامل مرگ و میر در سطح جهان محسوب می‌شود که تلاش‌های بسیار گسترده‌ایی در مقابله با آن در حال انجام است (Mohammadabadi and Mozafari 2019). با این وجود علی‌رغم پیشرفت‌های قابل توجه در درمان انواع سرطان، در بسیاری از موارد سیستم ایمنی بیمار در مقابل داروهای موجود مقاومت نشان داده و در نتیجه موجب عدم دریافت پاسخ مناسب به درمان می‌گردد و حتی گاهی با بروز مقاومت، سلول‌های سرطانی از درمان‌های بکار رفته برای رشد سریع‌تر تومور بهره می‌برند (Pucci et al. 2019). علاوه بر این، اکثر ترکیبات درمانی موجود که در حال حاضر برای از بین بردن سلول‌های سرطانی بدخیم

طراحی شده‌اند به دلیل سمیت و عدم توانایی در هدف قرار دادن فقط سلول یا بافت سرطانی، عوارض جانبی شدیدی دارند (Mohammadabadi and Mozafari 2019). بنابراین، در دهه‌های اخیر محققین تلاش کرده‌اند برای مبارزه موفقیت آمیز با سرطان راه‌کارهای هوشمندانه‌ایی انتخاب کنند. از جمله بهترین راه‌کارها برای دفاع هوشمندانه استفاده از داروهای نو ترکیب هوشمند و هدف‌گیری مستقیم و اختصاصی سلول‌های سرطانی می‌باشد. در واقع در این روش با جلوگیری از رسیدن دارو به سلول-های سالم اثر سوء داروهای شیمی درمانی نیز به حداقل رسانده می‌شود و تحت عنوان درمان‌های هدفمند سرطان مطرح می‌شوند (Sun et al. 2018). ایمونوتوکسین‌ها مولکول‌های دو عملکردی دارای ساختار منحصر به فرد توکسین-آنتی‌بادی بوده که با گذر از غشای سلولی و ورود به داخل سلول هدف باعث از بین رفتن آن سلول می‌شوند. در تولید ایمونوتوکسین‌ها از آنتی‌بادی‌ها به‌عنوان حامل^۱ استفاده می‌کنند که توکسین یا داروی مورد نظر را به صورت غیرفعال در جریان خون حمل کرده و به سلول هدف می‌رساند (Akbari et al. 2017). اختصاصیت ایمونوتوکسین‌ها برای انتخاب هدف سلولی خود به دلیل نوع آنتی‌بادی انتخاب شده و سمیت ایجاد شده در القاء مرگ سلولی به سلول هدف، مرتبط با توکسین بکار برده شده می‌باشد. در طی دهه‌های گذشته تعدادی از ایمونوتوکسین‌های گیاهی و باکتریایی قوی در حوزه‌های مختلف درمانی از جمله درمان سرطان بکار برده شده‌اند که متأسفانه به سبب ایجاد پاسخ‌های شدید ایمنی، سمیت ذاتی و غیراختصاصی بودن، استفاده از آن‌ها محدود گشته است. خوشبختانه به‌عنوان روش جایگزین برای توکسین‌های گیاهی و باکتریایی، استفاده از آنزیم‌های خانواده بزرگ RNase A بر مشکل پاسخ‌های شدید ایمنی در بدن انسان و سمیت غیراختصاصی توکسین‌ها غلبه نموده است (Cuchillo et al. 2011). پژوهش‌های اخیر نشان داده است که ریبونوکلازهای خانواده بزرگ RNase A به واسطه هدف قراردادی هوشمند RNAهای داخل سلولی و متوقف نمودن سنتز پروتئین‌ها پس از ورود در سلول هدف و همچنین غلبه بر مشکلات سایر توکسین‌ها مانند ایمونونسیستی بالا و سمیت غیراختصاصی آینده امیدبخشی در حوزه‌های درمانی و به ویژه درمان سرطان پیش‌رو دارند (Jordaan et al. 2018).

ریبونوکلاز پانکراس گاوی یا RNase A در حدود ۶۰ سال پیش شناسایی و از پانکراس گاو خالص‌سازی شد (Findly et al. 1961). این آنزیم به دلیل پایداری بالا، سادگی ساختار و قابل تصفیه بودن به مقدار زیاد به یک مدل متداول در مطالعه پروتئین‌ها تبدیل شد و برای سال‌های متمادی مورد مطالعه دانشمندان قرار گرفت که نتیجه مطالعات آن‌ها دریافت چندین جایزه نوبل بود. با گذشت زمان و بررسی عملکرد این آنزیم در از بین بردن ترانسکریپتوم سلول‌ها، جلوگیری از سنتز پروتئین‌های مورد نیاز آن‌ها و در نتیجه القاء مرگ سلولی اهمیت آن به‌عنوان یک عامل القاء کننده مرگ سلولی روشن گردید (Ardlet et al. 2009). با توجه به اینکه این آنزیم می‌توانست به‌عنوان القاء کننده مرگ سلولی یک کاندید بسیار مناسب برای اتصال به آنتی-بادی‌های متفاوت و تولید داروهای نو ترکیب هوشمند در نظر گرفته شود، با تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بررسی و تحقیق پیرامون آنزیم مذکور اهمیت بیشتری پیدا کرد و مطالعات در این زمینه آغاز گردید (Kimiz-Gebologlu et al. 2018). پس از

¹. Carrier

مطالعات زیادی که در این زمینه صورت گرفت نتایج وجود یک مانع بزرگ برای استفاده از این آنزیم به عنوان عامل سیتوتوکسیک و یا ایمنوریونوکلئاز را نشان داد و آن وجود پروتئین مهارکننده ریونوکلئاز (RI¹) می باشد (Dickson et al. 2005).

مهارکننده ریونوکلئازی میل ترکیبی بالایی در ایجاد پیوند با آنزیم RNase A و در نتیجه غیرفعال کردن این آنزیم دارد، این پروتئین نعل اسبی شکل با وزن مولکولی تقریباً ۵۰ KD حدود ۰/۱ تا ۰/۱ از کل پروتئین‌های درون سیتوپلاسم یک سلول را تشکیل می‌دهد. عمده پیوندهایی که بین آنزیم RNase A و این مهارکننده ریونوکلئازی وجود دارد از نوع پیوندهای هیدروژنی بین آمینواسیدهای پروتئین RI و زنجیره جانبی آمینواسیدهای RNase A می‌باشد (Dickson et al. 2005). اینکه این پروتئین چه وظیفه‌ایی در سلول بر عهده دارد تاکنون دقیقاً مشخص نشده است اما محققان بر این باورند که به عنوان یک عامل دفاعی در برابر RNase‌های بیگانه عمل می‌کند (Ardlet et al. 2009). با این وجود عدم داشتن گیرنده سطح سلولی برای آنزیم RNase A در بدن به عنوان یک ویژگی خاص سبب شده است که با وجود تمام موانع پیش رو هنوز تحقیقات بر روی این آنزیم به عنوان یک ایمنوریونوکلئاز امید بخش ادامه باشد و این آنزیم را نسبت به سایر ایمنوتوکسین‌های مشابه متمایز کند. پژوهشگران امروزه به دنبال این هستند که با استفاده از تکنیک‌های بیوانفورماتیک و هم‌چنین مهندسی پروتئین-آنزیم اقدام به شناسایی، حذف و جایگزینی اسیدآمین‌هایی که سبب افزایش میل ترکیبی بین آنزیم RNase A و مهارکننده ریونوکلئاز (RI) می‌شوند نمایند. یکی از اهداف پژوهش پیش‌رو نیز مهندسی آنزیم ریونوکلئاز پانکراس گاوی، پیدا کردن آمینواسیدهای موثر در ارتباط بین این آنزیم و مهارکننده ریونوکلئازی و جایگزینی آن‌ها جهت فرار از مهارکننده در فضای سیتوزول سلول بود.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، پلاسمیدها، آنزیم‌ها و واکنش‌دهنده‌ها: در این پژوهش از دو سویه JM110 و BL21(DE3) باکتری اشرشیاکلی جهت تهیه و تکثیر و کتورها، تهیه استوک و بیان پروتئین‌های نوترکیب استفاده گردید. هم-چنین از دو وکتور pUC19 و pET21a(+) با توجه به نوع کاربرد آن‌ها به منظور کلونینگ و بیان ژن در باکتری‌ها استفاده شد. هر دو گونه باکتریایی استفاده شده از دانشکده داروسازی دانشگاه سیدنی تهیه شدند و وکتور بیانی pET21a(+) از شرکت Invitrogen استرالیا خریداری شد. گونه‌های باکتریایی در محیط کشت LB اگر (۱ درصد تریپتون، ۰/۵ درصد عصاره مخمر و ۰/۱ کلرید سدیم با pH=7) حاوی ۱۰۰ µg/ml آنتی‌بیوتیک امپی‌سیلین به شکل هوازی کشت داده شدند. آنزیم‌های محدودکننده از شرکت Scientifix (استرالیا، ایالت ویکتوریا) و آنزیم لیگاز از شرکت Genesearch خریداری و در فرایند کلونینگ استفاده شدند. سنتز آغازگرهای طراحی شده به منظور فرایند کلونی PCR و هم‌چنین واریانت‌های آنزیم RNase A

¹ RNase Inhibitor

طراحی شده در وکتور کلونینگ pUC19 توسط شرکت IDT^۳ استرالیا انجام شد. محیط کشت، آگارز، امپی سیلین، واکنش گره‌های تخلیص پروتئین، بافرها و سایر مواد شیمیایی استفاده شده در پژوهش حاضر از شرکت Sigma Aldrich (استرالیا، ایالت نیوساوت ولز، سیدنی) خریداری شدند.

مهندسی و ایجاد موتاسیون در آنزیم ریونوکلئاز پانکراس گاوی (RNase A): به منظور مهندسی

آنزیم RNase A و طراحی آنزیمی با کمترین میل اتصال نسبت به مهارکننده ریونوکلئازی ضمن حفظ فعالیت کاتالیکی، پس از بررسی منابع، توالی آنزیم مورد نظر از پایگاه داده NCBI^۴ استخراج گردید. هم‌چنین ساختارهای پروتئینی مورد نیاز در این پژوهش شامل فایل PDB آنزیم ریونوکلئاز پانکراس گاوی با شماره دسترسی (10.2210/PDB1DFJ/PDB) و فایل PDB مهارکننده ریونوکلئازی با شماره دسترسی (10.2210/PDB2BNH/PDB) از سرور PDB^۵ استخراج گردیدند و تجزیه و تحلیل ساختاری به کمک نرم افزار PyMol نسخه ۱/۸ انجام شد (PyMol, 2016). بر اساس یافته‌های حاصل از بررسی کمپلکس ساختار کریستالی اثر متقابل بین RNase A و ممانعت کننده ریونوکلئازی، اسیدهای آمینه هدف بر اساس فاکتورهای پیش‌رو انتخاب شدند: ۱- اسیدآمینه مورد نظر باید با ممانعت کننده پیوند یونی برقرار کرده باشد (به این دلیل که این پیوند قوی-ترین نوع از پیوندهای شیمیایی می‌باشد)، ۲- اسیدآمینه انتخاب شده باید در لوپ سطحی ساختار آنزیم RNase A قرار گرفته باشد و ۳- فاصله بین دو اسیدآمینه در این ساختار کمپلکس باید کمتر از ۵ آنگسترم باشد. با در نظر گرفتن شرایط مذکور اندازه‌گیری بین اتم‌های N و O در ساختار اثر متقابل بین RNase A و ممانعت کننده ریونوکلئازی (با شماره دسترسی IDFJ) صورت پذیرفت و بر اساس نتایج حاصل از نرم افزار PyMol، از بین آمینواسیدهای کاندید شده، اسیدآمینه لیزین ۹۱ برای جایگزینی با آلانین تحت عنوان واریانت نوترکیب انتخاب شد.

طراحی ساختار وکتور: به منظور طراحی سازه بیانی آنزیم RNase A وحشی و واریانت نوترکیب آن، توالی

نوکلئیک‌اسیدی ژن‌های مذکور داخل وکتور کلونینگ pUC19 بین جایگاه‌های برشی آنزیم‌های XbaI در انتهای ۵' و BamHI در انتهای ۳' جای‌گذاری شدند. جهت بهینه‌سازی بیان و تاخوردگی مناسب آنزیم در پری پلاسم باکتری، سیگنال پیتاید PelB در انتهای ۵' توالی آنزیم قرار گرفت و هم‌چنین توالی His-Tag به منظور سهولت در خالص‌سازی پروتئین‌های تولیدی در انتهای ۳' و جایگاه RBS در بالادست کدون آغاز در ساختار آنزیم‌ها قرار گرفتند. ساختار ژن‌های طراحی شده مطابق شکل ۱ می‌باشد. علاوه بر این، به منظور بهینه نمودن کدون‌های اسیدهای آمینه توالی آنزیمی RNase A و افزایش بیان در سامانه بیانی باکتریایی پس از ویرایش اولیه توالی نوکلئوتیدی، از نرم افزار آنلاین GenScript برای بهینه‌سازی استفاده شد (GenScript, Piscataway, NJ, USA).

1- Integrated DNA Technologies

2- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

3- Protein Data Bank



شکل ۱. طراحی سازه بیانی آنزیم RNase A وحشی و واریانت نوترکیب آن

Figure 1. Designing expression construct of wild type RNase A and recombinant variant

کلونینگ در وکتور بیانی (+) pET21a: رقیق‌سازی ژن‌های سنتز شده در وکتور pUC19 مطابق دستورالعمل

شرکت سنتزکننده انجام شد و در سلول مستعد JM110 به صورت جداگانه ترانسفورم شدند. بخشی از کلونی‌های سفید رنگ حاصل از ترانسفورم که حاوی باکتری‌های نوترکیب بودند و پس از تفکیک کلونی‌های سفید و آبی که در اثر عمل آنزیم بتاگالاکتوزیداز تولید شده‌اند، جهت تهیه استوک کشت مایع داده شدند و پس از مخلوط شدن با میزان مناسب گلیسرول به فریزر ۸۰- منتقل گردیدند. بخش دیگر کلونی‌های بدست آمده به منظور انجام مراحل کلونینگ و بیان برای آنزیم RNase A وحشی و واریانت نوترکیب آن به صورت کشت شبانه، در محیط کشت انتخابی کشت خطی و پس از آن برای مدت ۸ ساعت کشت مایع داده شدند. استخراج پلاسمید وکتورهای مورد نظر توسط کیت Mini-Prep شرکت Invitrogen انجام گردید و حضور قطعات ژنی به روش هضم آنزیمی تایید شدند. پس از هضم دوگانه وکتور بیانی (+) pET21a و هم‌چنین پلاسمیدهای حاوی ژن‌های سنتز شده در وکتور pUC19 توسط آنزیم‌های Xba1 و Bam H1، به منظور تخلیص قطعات ژنی از محلول‌ها و ژل‌ها از آنزیم-های Xba1 و BamH1 از کیت PureLink Quick Gel Extraction PCR شرکت Invitrogen استفاده گردید. قطعات ژنی توسط آنزیم DNA ligase T4 به صورت جداگانه به درون وکتور بیانی وارد شده و پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ژن‌های مورد نظر ساخته شدند. به منظور تکثیر وکتورهای نوترکیب و هم‌چنین تهیه استوک پس از تایید انجام واکنش لیگاسیون، انتقال به باکتری‌های مستعد JM110 صورت گرفت. جهت تایید حضور هر کدام از ژن‌های هدف در پلاسمیدهای نوترکیب کلونی PCR با استفاده از پرایمر T7 بر روی کلونی‌های پدیدار شده در محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک انجام گردید. پلاسمیدهای تایید شده در مرحله بعد به میزبان بیانی BL21 انتقال داده شدند. هم‌چنین وکتور (+) pET21a فاقد قطعات ژنی به صورت جداگانه به میزبان بیانی BL21 به عنوان کنترل منفی در پروسه بیان انتقال داده شد.

بیان و تخلیص پروتئین‌های نوترکیب: کلونی‌های حاوی سازه‌های ژنی و هم‌چنین کنترل منفی ابتدا به صورت

جداگانه بر روی محیط کشت LB اگر حاوی آنتی‌بیوتیک بصورت کشت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. از سوسپانسیون سلولی حاصل به نسبت ۱:۵۰ به درون محیط کشت جدید تلقیح گردید و در انکوباتور با دور ۲۵۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. زمانی که کدورت محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۸ رسید، تلقیح IPTG به‌عنوان القاگر بیان با غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مولار انجام شد و مجدداً با همان شرایط ذکر شده برای مدت ۵ ساعت انکوبه گردیدند. نمونه‌برداری

در زمان‌های ۳، ۵ و ۳۶ ساعت پس از تلقیح انجام شد. به منظور جداسازی توده‌های سلولی از محیط کشت، کلیه نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰۰ rpm برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی با ۵۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (حاوی سدیم دی‌هیدروکلراید ۱۰ میلی‌مولار و اوره ۸ مولار) جهت استخراج پروتئین‌ها از فضای پری پلاسمیک مخلوط شد و وجود پروتئین‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE بررسی شدند. تخلیص پروتئین‌های تایید شده با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی و ماتریکس Ni-NTA agarose شرکت GE Healthcare مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. Refolding پروتئین‌ها و حذف اوره با استفاده از کیسه دیالیز (cut off=10 KD) و بافر (فسفات ۰/۱ میلی‌مولار و گلیسین ۵۰ میلی‌مولار) انجام شد. محاسبه غلظت پروتئین‌های استخراجی بر اساس معادله بیرلامبرت (فرمول ۱)، ضریب جذب آنزیم RNase A و با استفاده از دستگاه UV و روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. هم‌چنین به منظور تایید خلوص، اندازه و وزن مولکولی پروتئین‌های تخلیص شده، محصولات حاصل از ستون کروماتوگرافی با استفاده از روش SDS-PAGE بررسی شدند.

فرمول ۱)

$$\text{Log}(I_0/I) = A$$

$$A = abc$$

که در آن، A مقدار جذب نوری ماده در طول موج مربوطه، a ضریب جذب ماده (گاهی نیز با \square نشان داده می‌شود)، b طول نمونه (ظرف نمونه)، و c غلظت ماده می‌باشد.

ارزیابی فعالیت آنزیمی پروتئین‌های تولیدی: به منظور ارزیابی و مقایسه فعالیت آنزیمی RNase A وحشی و

واریانت نوترکیب آن در حضور و عدم حضور ممانعت کننده ریونوکلئازی از روش Acid-Insoluble RNA Precipitation بر روی RNA مخمر استفاده گردید (Borriello et al. 2011). در این روش ابتدا مخلوطی از آنزیم‌های مورد آزمایش همراه با RNA ۸ mg/ml مخمر (شرکت سیگما) در بافر واکنش (حاوی سدیم کلراید ۱۵۰ میلی‌مولار و تریس اسیدکلریک ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=7.5) به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از گذشت زمان در نظر گرفته شده، توقف واکنش آنزیمی با اضافه کردن اسید پرکلریک ۱۰ درصد حاوی ۰/۲۵ درصد اورانیل استات انجام شد و جهت رسوب دادن rRNA-های هضم نشده کلیه نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. تیفسنجی از مایع رویی برای هر نمونه در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفت. هر یک واحد افزایش در طول موج جذب شده در ۲۶۰ نانومتر در این آزمایش به عنوان یک واحد از فعالیت آنزیمی در نظر گرفته شد. هم‌چنین به منظور بررسی و ارزیابی مقایسه‌ای فعالیت آنزیمی، آنزیم‌های مذکور در حضور ممانعت کننده ریونوکلئازی، یکسری از رقت‌های مولاری به ترتیب با نسبت ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ از ممانعت کننده به آنزیم‌ها تهیه گردید. سپس نمونه‌ها در حضور ۲ میلی‌مولار DTT و در

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه پیش انکوبه شدند. بررسی فعالیت آنزیمی این محصولات پیش انکوبه شده مطابق با مراحل ذکر شده انجام شد. هر نمونه دارای سه تکرار بود و آنالیز داده‌ها با انحراف معیار سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج

مهندسی و ایجاد موتاسیون در آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی (RNase A): پس از گردآوری توالی ژنی

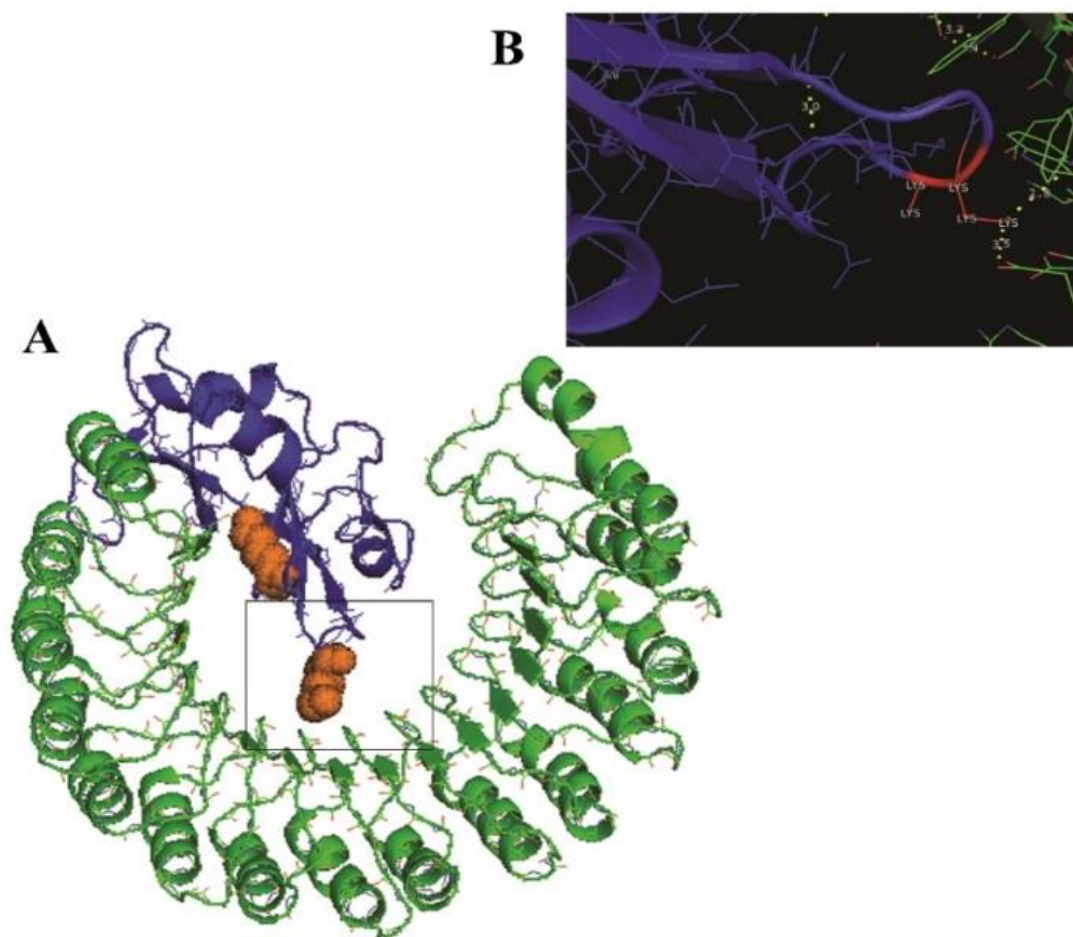
و اطلاعات پروتئینی مورد نظر از پایگاه‌های داده ذکر شده، مهندسی و دست‌ورزی آنزیم RNase A انجام شد. به منظور شناسایی اسیدآمین‌هایی که بیشترین میل ترکیبی را برای اتصال به مهار کننده دارند و به این دلیل که پیوند بین اکسیژن و نیتروژن قوی-ترین نوع از پیوندهای شیمیایی می‌باشد، اتصالات بین اکسیژن و نیتروژن در کریستالوگرافی کمپلکس RNase A-RI با فاصله کمتر از ۵ آنگسترم با استفاده از نرم‌افزار PyMol مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصل از این نرم افزار مجموع ۱۳ آمینواسید در مرحله نخست انتخاب شدند (جدول ۱) و سپس از بین این ۱۳ اسیدآمین ۶ اسیدآمین‌ایی که در جدول با رنگ قرمز مشخص شده‌اند (لیزین ۱، گلوتامیک اسید ۲، اسپارتیک اسید ۳، آرژینین ۳۹، لیزین ۴۱ و لیزین) بر اساس فاصله پیوند (هر چه فاصله بین دو اسیدآمین کمتر باشد پیوند برقرار شده محکم‌تر می‌باشد) و بار الکتریکی (شارژ) آمینواسیدها (پیوند یونی بین دو اسیدآمین با بار مخالف صورت می‌پذیرد) به منظور جایگزینی کاندید شدند. نهایتاً از بین ۶ اسیدآمین کاندید شده، لیزین ۹۱ بدلیل اهمیت این اسیدآمین و تصمیم در ایجاد کمترین میزان تغییرات در ساختار آنزیم، جهت جایگزینی با آلانین انتخاب شد (شکل ۲).

جدول ۱. فهرست اسیدهای آمینه دارای پیوند با فاصله کمتر از ۵ آنگستروم در کمپلکس RI-RNase A (PDB ID: 1DFJ)

Table 1. The list of all amino acids with less than 5 Å distance in RI-RNase A complex (PDB ID: 1DFJ)

فاصله (آنگستروم)	مهار کننده ریبونوکلئاز (RI)	آنزیم ریبونوکلئاز (RNase A)
Distance (Å)	Ribonuclease inhibitor (RI)	Ribonuclease enzyme
3.4	GLN6	LYS31
3.3	GLU397	ARG39
3.2	GLN426	
3.5	GLU283	LYS91
2.8	ASP228	
2.7	TRP259	SER89
2.9	LEU405	ASN67
3.2	TYR433	
3.0	GLU440	LYS1
3.5	ARG453	ASP38
3.2	ASN89	GLN28
3.0	SER456	LYS7
2.5	ASP431	LYS41
2.8		

3.1		
3.5	ARG443	GLU2
2.8	SER456	GLN11
2.7	TRP433	
2.9	GLU436	GLU111



شکل ۲. A: ساختار سه بعدی کمپلکس آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی و مهارکننده ریبونوکلئازی، B:

اسیدآمینه لیزین ۹۱ انتخاب شده برای جایگزینی در کمپلکس RNase A-RI

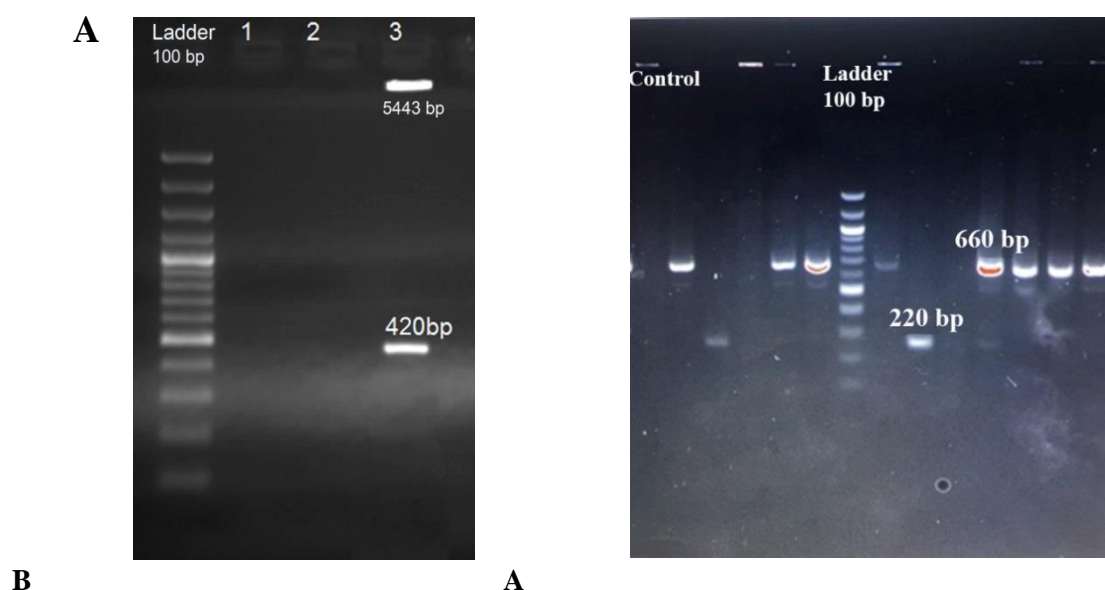
Figure 2. A: Three dimensional structure of RNase A and RI complex, B: Lys91 residue selected for substitution in RI-RNase A complex

کلونینگ، بیان و خالص سازی پروتئین های نو ترکیب: به منظور کلونینگ در وکتور بیانی قطعات ژنی به طور

مشابه و به صورت جداگانه در وکتور بیانی pET-21a(+) بین pel B Leader و His-tag به ترتیب به منظور ترشح پروتئین

بیان شده در فضای پری پلاسمیک و تسهیل خالص سازی پروتئین قرار گرفتند و واکنش لیگاسیون با استفاده از آنزیم T4 انجام

شد. صحت واکنش لیگاسیون و کلون شدن قطعات ژنی در وکتور مورد نظر از طریق انجام کلونی PCR با استفاده از پرایمر یونیورسال T7 و همچنین هضم آنزیمی تایید گردید (شکل ۳). سازه‌های تایید شده در سویه بیانی BL21(DE3) ترانسفورم و با استفاده از القاء به کمک IPTG بیان شدند. باندهای پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۱۴ کیلو دالتون در بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید در جایگاه مورد انتظار مشاهده شدند. پروتئین‌ها به وسیله ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی خالص شده و با استفاده از کیسه دیالیز Refolding آن‌ها انجام شد. نتایج الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE نشان داد که محصولات تخلیص شده عاری از هر گونه ناخالصی پروتئینی می‌باشند. همچنین این نتایج اثبات نمودند که آنزیم‌های خالص‌سازی شده در محدوده وزنی مورد نظر (~ 14 KD) بر روی ژل حرکت می‌نمایند (شکل ۴).



شکل ۳. آنالیز کلونی PCR و هضم آنزیمی جهت تایید حضور ژن هدف در وکتور pET-21a(+)

A: کلونی PCR؛ ستون‌های دارای قطعه ۶۶۰ bp نشان دهنده کلونی‌های حاوی قطعه هدف و ستون‌های دارای قطعه ۲۲۰ bp نشان دهنده کلونی‌های فاقد قطعه هدف می‌باشند، B: هضم آنزیمی: قطعه ۵۴۴۳ bp نشان دهنده وکتور pET-21a(+) و قطعه ۴۲۰ bp نشان دهنده ژن آنزیم RNase A می‌باشد

Figure 3. Colony PCR and enzymatic digestion analysis to confirm the presence of a gene fragments in the construction of the pET2-1a(+) vector

A: Colony PCR; Columns with 660 bp fragments shows colonies target fragment and columns with 220 bp fragments shows colonies without target fragments, B: Enzymatic digestion; 5443 bp fragment shows the pET-21a(+) vector and 420 bp fragment shows RNase A gene

محاسبه غلظت پروتئین‌های استخراجی با استفاده از دستگاه UV انجام شد و میزان آن برای پروتئین‌های RNase A وحشی و نوترکیب به ترتیب ۳ و ۲/۲ گرم بر لیتر محاسبه گردید. بیان آنزیم RNase در سامانه بیانی باکتریایی در تحقیقات مختلف در دامنه متغیر ۰/۴ گرم در لیتر تا ۵ گرم در لیتر گزارش گردیده است، بنابراین به نظر می‌رسد غلظت پروتئین‌های تولیدی در پژوهش حاضر با توجه به اندازه و نوع پروتئین نوترکیب در دامنه مطلوبی می‌باشد زیرا این آنزیم با دارا بودن ۴ باند دی‌سولفیدی به منظور تاخوردن فشار مضاعفی به سلول وارد می‌کند

ارزیابی فعالیت آنزیمی پروتئین‌های تولیدی: فعالیت نوکلئازی RNase A وحشی و واریانت نوترکیب آن با

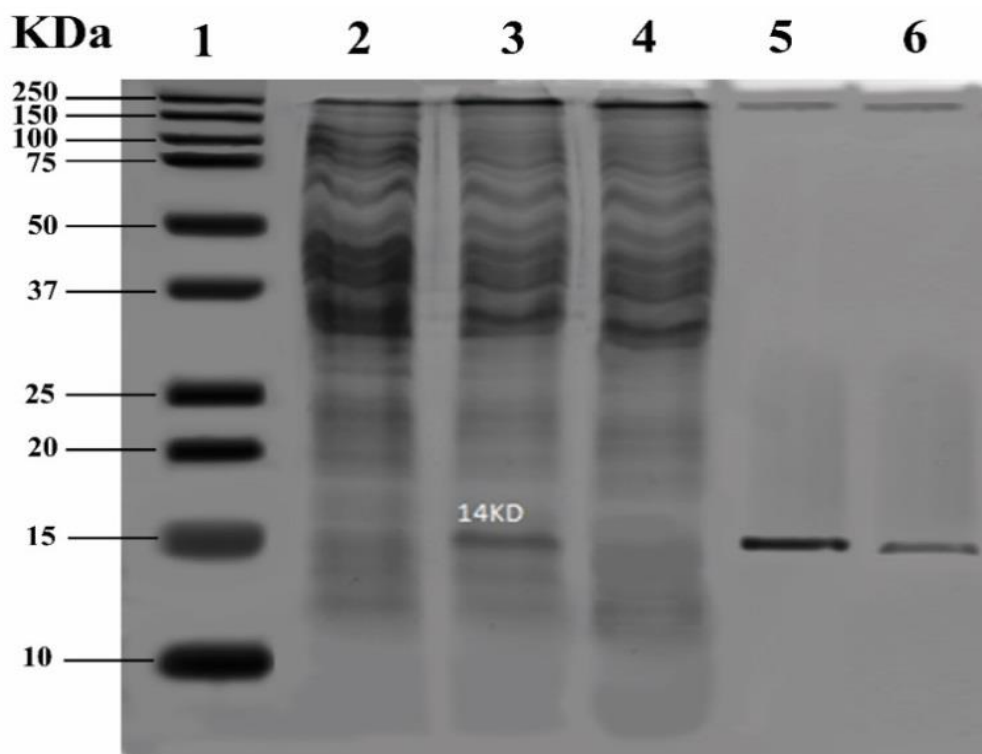
استفاده از روش Acid-insoluble RNA Precipitation انجام شد. نتایج این آزمون نشان داد که آنزیم نوترکیب (حاصل جایگزینی لیزین ۹۱ با آلانین)، ۸۰ درصد فعالیت آنزیمی آنزیم وحشی را دارا می‌باشد. به منظور تشخیص درصد حساسیت RNase A وحشی و واریانت نوترکیب در تماس با مهارکننده ریبونوکلئازی سنجش فعالیت آنزیمی در حضور یکسری از غلظت‌های مختلف مهارکننده به آنزیم در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

در این آزمون آنزیم وحشی به‌عنوان کنترل مثبت بکار برده شد. زیرا تحقیقات گذشته در این زمینه نشان داده بودند که RNase A وحشی در حضور مهارکننده ریبونوکلئازی به‌طور کامل غیرفعال می‌گردد (Gotte et al. 2013). محاسبه درصد مهارکنندگی با استفاده از فرمول شماره ۲ صورت گرفت. نتایج این آزمون نشان داد که واریانت نوترکیب در مقایسه با آنزیم وحشی حساسیت کمتری نسبت به مهارکننده ریبونوکلئازی دارد و این آنزیم افزایش فعالیت کاتالیکی را در حضور مهارکننده نسبت به آنزیم وحشی دارا می‌باشد، همچنین این نتایج نشان داد که در نسبت غلظت مولاری بیشتر از یک فعالیت آنزیمی، آنزیم وحشی بیشتر از ۹۵ درصد مهار شده است و در مقابل واریانت نوترکیب توانایی فرار از اتصال با مهارکننده‌های آنزیمی در نسبت‌های غلظت مولاری بالاتر را دارد (شکل ۵). بطور کلی نتایج این آزمون نشان داد آنزیم نوترکیب دارای میل ترکیبی بسیار کمتری با مهار کننده در مقایسه با آنزیم وحشی می‌باشد و در عین حال ۸۰ درصد فعالیت آنزیمی آنزیم وحشی را در عدم حضور مهارکننده دارا می‌باشد.

فرمول ۲)

(میزان فعالیت آنزیم در عدم حضور مهارکننده/میزان فعالیت آنزیم در حضور مهارکننده) - ۱ × ۱۰۰ = درصد

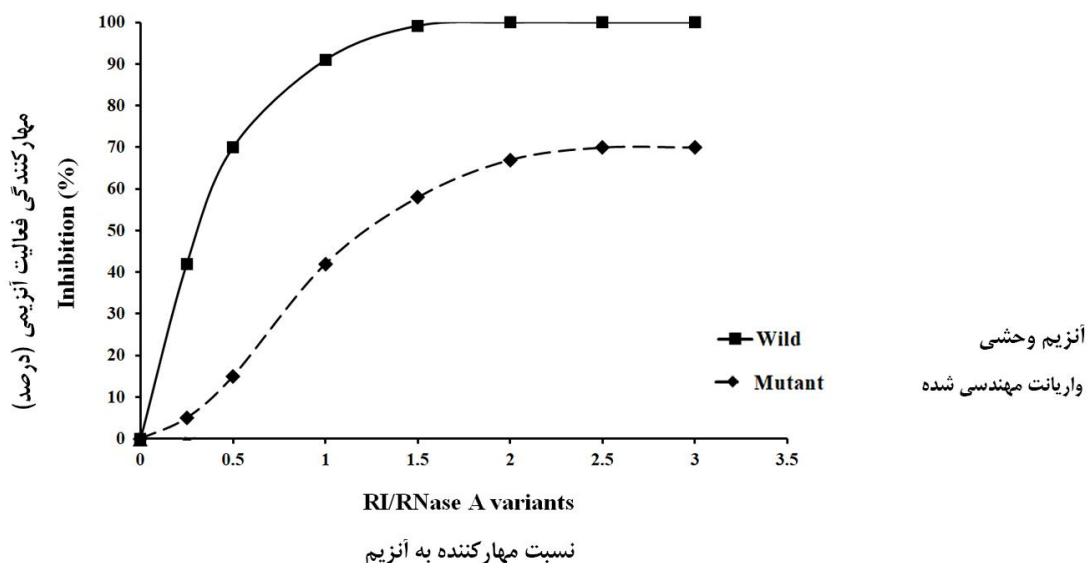
مهارکنندگی فعالیت آنزیمی



شکل ۴. نتایج بیان و تخلیص آنزیم RNase A وحشی و واریانت نوترکیب آن
 ۱: مارکر پروتئینی، ۲: کنترل منفی (مجموع پروتئین تولیدی باکتری BL21(DE3))، ۳: کل پروتئین
 تولیدی باکتری BL21(DE3) حاوی وکتور همراه با قطعه هدف، ۴: محتویات زیرین عبور داده شده از
 ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل، ۵ و ۶: به ترتیب آنزیم‌های خالص‌سازی شده توسط ستون
 کروماتوگرافی تمایلی نیکل علیه His-tag، آنزیم وحشی و نوترکیب

Figure 4. Expression and purification analysis of wild type RNase A and recombinant variant

Lane 1: protein marker ladder, lane 2: negative control (total protein from E.coli BL21),
 line 3: total of protein from E.coli BL21 with target fragment, lane 4: flow true after
 passing the affinity chromatography column, lane 5 and 6: purified enzymes from Nicole
 affinity chromatography column against His-tag, wild type and recombinant variant



شکل ۵. اثر مهارکننده ریبونوکلئازی (RI) بر فعالیت کاتالیزی آنزیم RNase A وحشی و واریانت نوترکیب آن

Figure 5. Effect of the ribonuclease inhibitor (RI) on catalytic activity of wild type RNase A and recombinant variant.

بحث

RNaseها از دسته توکسین‌هایی هستند که در دهه‌های اخیر به منظور تولید ایمونوتوکسین‌هایی تحت عنوان ایمونوریبونوکلئازها بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند. در واقع این آنزیم‌ها و به ویژه آنزیم‌های RNase پانکراتیک انسانی و نشخوارکنندگان (به‌طور ویژه گاو) به دلیل نداشتن گیرنده سطح سلولی و به تبع آن ایجاد حساسیت کمتر و هم‌چنین دارا بودن قدرت القاء مرگ سلولی با استفاده از تخریب ترنسکرپتوم سلول پس از اینترنالیزه شدن، به‌عنوان یک توکسین مهم در طراحی ایمونوتوکسین‌ها مطرح می‌باشند (Jordaan et al. 2018). محققان گزارش کرده‌اند که mRNA به‌عنوان اصلی‌ترین سوبسترا برای آنزیم RNase A شناخته می‌شود با این حال ریز RNAها و Ribosomal RNAها نیز تحت تاثیر این آنزیم قرار می‌گیرند (Gotte et al. 2013). در واقع این آنزیم با نفوذ به سیتوزول سلول و تخریب آن‌ها باعث القاء آپوپتوزیس می‌گردد. مهم‌ترین مسئله برای RNase A به‌عنوان یک فاکتور کشنده قوی، توانایی فرار از مهارکننده ریبونوکلئازی داخل سیتوزول (RI) می‌باشد. از این‌رو در این پژوهش به منظور پیدا کردن اسید آمینه‌هایی که باعث اتصال ریبونوکلئاز پانکراس گاوی به مهارکننده ریبونوکلئازی موجود در سیتوزول می‌شوند با تکیه بر نتایج بیوانفورماتیکی اقدام به جایگزینی اسید آمینه لیزین ۹۱ و ایجاد سویه نوترکیب آنزیم پانکراس گاوی شد. در مطالعه حاضر از الحاق پروتئین هیستیدین (His-tag) در انتهای C ترمینال توالی آمینو-اسیدی پروتئین‌های نوترکیب استفاده شد. شایان ذکر است که His-tag یک توالی ۶ تا ۸ آمینواسیدی است که عموماً به منظور خالص‌سازی پروتئین‌ها نوترکیب در ساختار آن‌ها تعبیه می‌شود و در تحقیقات مختلفی نشان داده شده است که حضور این تگ در

انتهای RNase های پانکراتیک انسانی و حیوانی تاثیر منفی بر فعالیت و خواص فیزیکی شیمیایی آن‌ها نداشته است، ضمن اینکه برای تولید و خالص سازی پروتئین‌های نو ترکیب بسیار معمول و مقرون به صرفه می‌باشد (Schirrmann et al. 2014). نتایج حاصل از تایید بیان پروتئین‌های نو ترکیب بر روی ژل SDS-PAGE نشان داد که پروتئین‌های مورد نظر به خوبی و به دور از هر گونه آلودگی در میزبان بیانی تولید شده‌اند. دلایل راندمان مناسب تولید پروتئین‌ها نو ترکیب را می‌توان به استفاده از اشریشیاکلی به عنوان یک میزبان بیانی مطمئن که اکثر پروتئین‌های متعدد در آن بیان می‌شوند، بهینه سازی مناسب کدون‌ها، انتخاب توالی هدایتگر^۶ مناسب و روش صحیح و بهینه استخراج پروتئین مرتبط دانست (Li et al. 2017). از طرفی استقرار پروتئین‌های بیان شده در فضای پری پلاسمیک یکی از روش‌های متداول برای بیان پروتئین‌های نو ترکیب محلول می‌باشد، اکسیده شدن در این فضا به پروتئین اجازه تشکیل باند دی سولفیدی صحیح، تا خوردگی درست و پایداری بیشتر را می‌دهد (Taherian et al. 2019). نتایج ارزیابی فعالیت آنزیمی آنزیم‌های تولیدی نشان داد که آنزیم نو ترکیب (حاصل جایگزینی لیزین ۹۱ با آلانین) در مقایسه با نوع وحشی حساسیت بسیار کمتری نسبت به مهارکننده ریونوکلئازی (کاهش میل ترکیبی آنزیم مذکور به مهارکننده) داشته و همچنین این نتایج افزایش فعالیت آنزیمی آنزیم مذکور را نشان داد. این افزایش میزان فعالیت آنزیمی را می‌توان به توانایی فرار موفق آنزیم نو ترکیب از مهارکننده ریونوکلئازی مرتبط دانست. مطالعات انجام شده به کمک الگوریتم FADE نشان داد لوپ P4-P5 در ساختار آنزیم RNase A که شامل اسید آمینه‌های ۸۷ تا ۹۶ می‌باشد نقش مهمی در شکل گیری ساختار کمپلکس بین آنزیم RNase A و RI دارد (Ardlet et al. 2009; Cuchillo et al. 2011). اسید آمینه‌های گلايسين ۸۸، سرین ۸۹ و لیزین ۹۱ در این لوپ در برقراری ارتباط بین آنزیم و مهارکننده بسیار موثر بوده و جایگزینی این اسیدهای آمینه باعث افزایش ۴ برابری ثابت تفکیک (Kd value) در ساختار کمپلکس می‌گردد (هرچه مقدار ثابت تفکیک کوچک تر باشد، میل ترکیبی مهارکننده به آنزیم بیشتر است). در این رابطه Rutkoski et al. (2010) گزارش کردند که جایگزینی گلايسين ۸۸ با اسید آمینه آرژنین در این لوپ باعث کاهش ۱۰۰۰۰ برابری میل ترکیبی آنزیم پانکراس گاوی به مهارکننده خوکی و کاهش ۲۵۰ برابری میل ترکیبی آنزیم ریونوکلئاز سمینال گاوی به مهارکننده انسانی شد. این نتایج مطابق با نتایج حاصل از نرم افزار PyMol در این پژوهش، میزان اهمیت اسید آمینه لیزین ۹۱ را در ساختار RNase A -RI تایید می‌کند. در این مطالعه اسید آمینه انتخاب شده جهت جایگزینی با اسید آمینه آلانین تعویض گردید، دلیل این جایگزینی اندازه کوچک اسید آمینه آلانین می‌باشد که بدون تغییر در شکل فضایی آنزیم از اتصال به زنجیره‌های جانبی در ساختار مهار کننده آنزیم نیز جلوگیری می‌نماید (Lee 2008). نتایج سنجش حساسیت در مقابل مهارکننده اثبات نمود که برهم کنش بین آنزیم RNase A وحشی و مهارکننده ریونوکلئازی مطابق با پژوهش‌های پیشین انجام شده با مهندسی ژنتیک و ایجاد جهش در اسید آمینه‌های درگیر در این برهم کنش، تا حدودی مختل می‌گردد (Johnson et al. 2007). به عبارتی دیگر این نتایج اثبات کرد که با استفاده از دست‌ورزی ژنتیکی و تعویض اسیدهای

^۶. Signal peptide

آمینه و ایجاد جهش می‌توان واریانت جدیدی از آنزیم را ایجاد نمود که ضمن حفظ فعالیت کاتالیتیکی و هیدولازی، دارای پایداری ساختمانی بوده و در شرایط آزمایشگاهی در حضور مهارکننده‌ها فعال‌تر از نوع وحشی آن باشد.

نتیجه‌گیری: با استناد به نتایج ارائه شده در پژوهش حاضر با توجه به این مهم که ریبونوکلئاز نوترکیب مشابهت بسیار بالایی با ریبونوکلئاز انسانی داشته و همچنین میل ترکیبی بسیار کمتری در مقایسه با آنزیم وحشی در مقابل مهارکننده ریبونوکلئازی دارد پیش‌بینی می‌گردد آنزیم مذکور ایمونوژنیستی کمتری نسبت به انواع دیگر داروهای کنژوگه شده با توکسین‌های شیمیایی، باکتریایی یا گیاهی برای بیمار ایجاد نمایند. بنابراین، چنین به نظر می‌رسد که می‌توان از این سویه نوترکیب در طراحی و تولید ایمونوتوکسین‌ها و همچنین غلبه بر مشکلات سایر توکسین‌ها به‌عنوان یک داروی امیدبخش در حوزه‌های درمانی استفاده کرد. به دنبال این پژوهش، مطالعات در راستای بررسی اثر آنزیم‌های تولیدی بر سرکوب و القاء هدفمند مرگ سلولی در دست انجام می‌باشد.

سپاسگزاری: این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و با گرنت شماره ۳/۴۴۴۶۹ انجام شد، لذا از کلیه مسوولین پژوهشی دانشگاه برای اعطای فرصت مطالعاتی تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از پروفیسور ویسل کایسر، استاد دپارتمان داروسازی دانشگاه سیدنی، برای در اختیار گذاشتن تجهیزات و مواد آزمایشگاهی سپاسگزاری بعمل می‌آید.

References

- Akbari B, Farajnia S, Ahdi Khosroshahi S et al. (2017) Immunotoxins in cancer therapy: Review and update. *Int Rev Immunol* 36, 207-219.
- Ardelt W, Ardel B, Darzynkiewicz Z (2009) Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy. *Eur J Pharmacol* 625, 181-189.
- Borriello M, Laccetti P, Terrazzano G et al. (2011) A novel fully Human antitumour immunoRNase targeting ErbB2-positive tumours. *Br J Cancer* 104, 1716-1723.
- Cuchillo CM, Nogués MV, Raines RT (2011) Bovine pancreatic ribonuclease: fifty years of the first enzymatic reaction mechanism. *Biochem* 50, 7835-7841.
- Dickson KA, Haigis MC, Raines RT (2005) Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 80, 349-374.
- Findlay D, Herries DG, Mathias AP et al. (1961) The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. *Nature* 190, 781-784.
- Genscript, Piscataway, NJ, USA (http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis).
- Gotte G, Laurents DV, Merlino A et al. (2013) Structural and functional relationships of natural and artificial dimeric bovine ribonucleases: new scaffolds for potential antitumor drugs. *FEBS Lett* 587, 3601-3608.

- Gotte G, Menegazzi M (2019) Biological activities of secretory RNases: Focus on their oligomerization to design antitumor drugs. *Front Immunol* 10, 2626.
- Johnson RJ, McCoy JG, Bingman CA et al. (2007) Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein. *J Mol Biol* 368, 434-449.
- Jordaan S, Akinrinmade OA, Nachreiner T et al. (2018) Updates in the development of immunoRNases for the selective killing of tumor cells. *Biomedicines* 6, 28.
- Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C (2018) Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol Biol Rep* 45, 2935-2940.
- Lee I (2008) Ranpirnase (Onconase), a cytotoxic amphibian ribonuclease, manipulates tumour physiological parameters as a selective killer and a potential enhancer for chemotherapy and radiation in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 8, 813-827.
- Li M, Liu ZS, Liu XL et al. (2017) Clinical targeting recombinant immunotoxins for cancer therapy. *Onco Targets Ther* 10, 3645-3665.
- Mohammadabadi MR, Mozafari MR (2019) Enhanced efficacy and bioavailability of thymoquinone using nanoliposomal dosage form. *J Drug Delivery Sci Technol* 47, 445-453.
- Pucci C, Martinelli C, Ciofani G (2019) Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedalscience* 13, 961.
- Raines RT (2004) Active Site of Ribonuclease A. In: *Artificial Nucleases* (1st edn). Zenkova MA (eds). Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 19-32.
- Rutkoski TJ, Kink JA, Strong LE (2010) Antitumor activity of ribonuclease multimers created by site-specific covalent tethering. *Bioconjug Chem* 21, 1691-1702.
- Schirrmann T, Frenzel A, Linden L et al. (2014) Evaluation of human pancreatic RNase as effector molecule in a therapeutic antibody platform. *MAbs* 6, 367-380.
- Sun M, Sun L, Sun D et al. (2018) Targeted delivery of immuno-RNase may improve cancer therapy. *Cancer Cell Int* 18, 58.
- Taherian E, Mohammadi E, Jahanian-Najafabadi A et al. (2019) Cloning, optimization of periplasmic expression and purification of recombinant granulocyte macrophage-stimulating factor in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Adv Biomed Res* 8, 71.
- PyMol Software (2016) The PyMOL molecular graphics system, Version 1.8 Schrödinger, LLC, NY, USA.
- World Health Organization (2018) Latest global cancer data: International Agency for Research on Cancer. Geneva, Switzerland.