

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

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

- دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۳۱

چکیده

هدف: هدف از مطالعه‌ی حاضر، تولید پروتئین نوترکیب هیبریدی DT₃₈₉GCSF به فرم فعال محلول در باکتری *E. coli* BL-21(DE3)، تخلیص و ارزیابی سمیت سلولی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پروتئین DT₃₈₉GCSF، 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 DT₃₈₉GCSF با استفاده از نرم‌افزار Image J، به ترتیب در حدود ۱۲ و ۸۰ درصد تخمین زده شد. میزان IC₅₀ پس از ۴۸ ساعت قرارگیری پروتئین DT₃₈₉GCSF در معرض رده‌ی سلولی، در حدود ۰/۰۰۰۱۷±۰/۰۰۰۱۹ مولار بود.

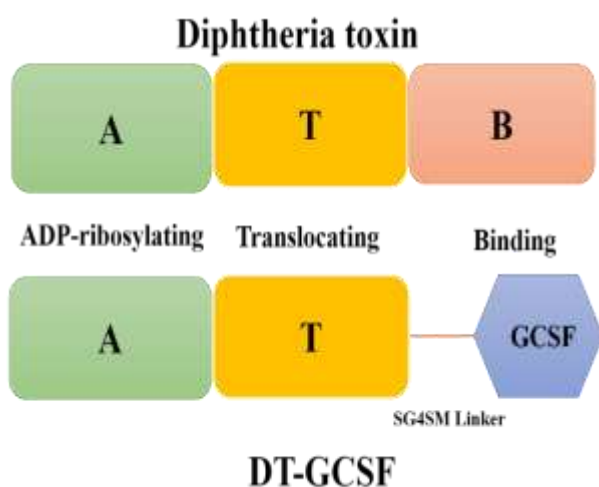
نتیجه‌گیری: با کاهش دما و استفاده از مکانیسم درون سلولی، می‌توان بازتآوردگی پروتئین هیبریدی DT₃₈₉GCSF را به شکل مناسب و به فرم فعال مشاهده نمود. در نتیجه در مراحل تولید آزمایشگاهی ایمونوتوکسین‌های مربوطه می‌توان با استفاده از این روش، از مراحل تولید به صورت اینکلوژن‌بادی صرف‌نظر کرد.

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

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 (DT₃₈₉IL₂)، 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 اتصال توکسین دیفتری حذف و جایگزین آن اینترلوکین ۲ انسانی شده است (۴-۶). در ساختار ایمونوتوکسین DT₃₈₉GCSF توکسین دیفتری (DT) ناقص (بدون بخش اتصال) 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 ۱-۱۹۳) 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 DT₃₈₉GCSF، 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. DT₃₈₉GCSF 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 به هم 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 DT₃₈₉GCSF

پروتئین هیبریدی DT₃₈₉GCSF از جایگاه گیرنده‌ی سیتوکین G-CSF، که عمدتاً توسط اندوتلیال و فیبروبلاست‌ها تولید می‌شود و تکثیر و تمایز سلول‌های 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 Myeloid Leukemia) به میزان زیادی تولید می‌شوند و در نتیجه این گیرنده‌ها می‌توانند هدفی برای توکسین درمانی سرطان AML باشند (۱۶، ۱۷).

مرکاپتواتانول، بروموفنیل بلو، کوماسی بلو R250، اسیداستیک گلاسیال و متانول از شرکت Merck تهیه گردید. تریس باز، ایزوپروپیل-بتا-دی-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG)، آمونیوم پرسولفات (APS) و پلی اکریل آمید از شرکت سیناژن تهیه شد. آمونیوم کلرید، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، از شرکت Aldrich-Sigma خریداری شد. فنیل متان سولفونیل فلوراید (PMSF) از شرکت Fluka و رزین Chelating Sepharose Fast Flow از شرکت GE Healthcare Life Sciences و محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی (FBS) و پنی سیلین از شرکت Gibco تهیه شد.

باکتری *E. coli* BL-21(DE3) حاوی پلاسمید pET-DT₃₈₉GCSF 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 DT₃₈₉GCSF به میزان ۵۰ میکرولیتر از بانک مربوط به باکتری *E. coli* (BL21) حاوی وکتور pET-DT₃₈₉GCSF در ۲۰ میلی لیتر محیط LB-Broth حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، در شرایط استریل کشت داده شد. پس از تلقیح، درون شیکر انکوباتور ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب گرماگذاری شد. به منظور تازه سازی کشت، محیط کشت حاوی باکتری رشد یافته به ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB-Broth، حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، اضافه و تا رسیدن به جذب ۰/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، درون شیکر انکوباتور ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، گرماگذاری شد. پس از رشد باکتری و رسیدن به جذب نوری مورد نظر، جهت القا به میزان ۲۰۰ میکرولیتر IPTG، ۱ مولار با غلظت نهایی ۱ میلی مولار به محیط کشت اضافه و در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸، ۲۰۰ درجه سانتی گراد دور در دقیقه،

یکی از گلوگاه های اصلی در تولید پروتئین های نوترکیب با منشا پروکاریوتی، مسئله بازیابی فرم فعال و بازتاخوردن آنها در شرایط اینکلوزن بادی است. چرا که در سیتوپلاسم باکتری ها، پروتئین ها به دلیل بیان بالا و نیز عدم وجود شرایط لازم برای تاخوردن صحیح به صورت اینکلوزن بادی در می آیند. در نتیجه برای به دست آوردن فرم فعال پروتئین، نیاز است که با انتخاب روشی مناسب بازتاخوردن شوند. یکی از ساده ترین روش ها برای به حداقل رساندن شکل گیری اینکلوزن بادی ها کاهش دما است. عموماً بیان در دمای پایین منجر به افزایش حلالیت و تاخوردن صحیح می شود. این امر ناشی از این مسئله است که برهمکنش های هیدروفوبیک که تعیین کننده اینکلوزن بادی ها هستند وابسته به دما می باشند. از سویی احتمالاً کاهش دما سرعت رونویسی، ترجمه و بازتاخوردن را پایین می آورد و بنابراین اجازه شکل گیری ساختار صحیح را می دهد. همچنین در دمای پایین افزایش بیان و فعالیت شماری از چاپرون ها در *E. coli* گزارش شده است. همچنین گزارشات نشان می دهد که پروتئین های شوک حرارتی که طی افزایش بیان القا می شوند در شرایط دمایی پایین فعالیت کمتری پیدا می کنند. بنابراین این مسئله منجر به کاهش قابل توجه تخریب پروتئین نوترکیب می شود (۵، ۱۸). براین اساس در مطالعه حاضر، به منظور حذف مرحله ی بازتاخوردگی پروتئین هیبریدی نوترکیب DT₃₈₉GCSF، در باکتری *E. coli* BL-21(DE3) به فرم محلول بیان و سپس از طریق ستون تمایلی نیکل سفاروز تخلیص گردید و عملکرد آن با استفاده از سنجش سمیت DT₃₈₉GCSF بر روی ردهی سلولی لوکمیای انسانی HL-60، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

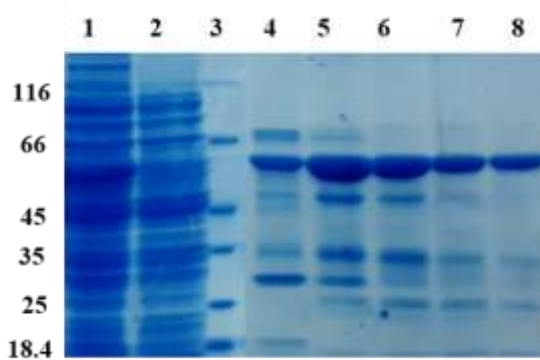
مواد شیمیایی و زیستی مورد استفاده: مواد شیمیایی مورد استفاده شامل پودر آماده محیط کشت LB از شرکت Applichem، ایمیدازول، بیس اکریل آمید،

انجام و ایمیدازول از محلول پروتئینی حذف گردید. به منظور بررسی میزان بیان و خلوص پروتئین نوترکیب DT₃₈₉GCSF، از ژل ۱۰ درصد SDS-PAGE استفاده شد و رنگ آمیزی با کوماسی بلو R-250 صورت گرفت.

سنجش سمیت سلولی DT₃₈₉GCSF سنجش سمیت سلولی DT₃₈₉GCSF، 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 به دلیل احیای ترکیب MTT (دی‌متیل‌تيازول-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 اندازه‌گیری میزان جذب توسط طیف‌سنجی 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 ۱۰^۳ cell/ml به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. ۲۰ میکرولیتر از مقادیر مختلف DT₃₈₉GCSF (۶۰۰ و ۴۵۰ و ۳۰۰ و ۶۰ و ۰) میکروگرم به هر چاهک اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO₂ ۵ درصد به مدت 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 به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سلول‌های زنده به واسطه‌ی

گرماگذاری گردید. پس از گذشت ۴ ساعت از القا، محیط کشت، طی سانتریفوژ (۸۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۵ دقیقه از کشت سلولی رسوب‌گیری گردید. برای ارزیابی میزان بیان به وسیله 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 نرم‌افزار نوعی نرم‌افزار 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 به جهت داشتن دنباله‌ی هیستیدینی با ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA، انجام گرفت. به منظور شکست سلولی به روش سونیکاسیون، رسوب سلولی در یخ قرار داده شده و به‌ازای هر گرم رسوب، ۱۰ میلی‌لیتر بافر تعادل حاوی (ایمیدازول ۵۰ میلی‌مولار، تریس ۲۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۰/۵ مولار، PMSF ۱ میلی‌مولار در pH 7.8) اضافه و به منظور مخلوط شدن کامل و ایجاد سوسپانسیون، از دستگاه هموژنایزر استفاده شد. سلول‌ها در دستگاه سونیکاتور به مدت ۱۰ دقیقه، در ۱۰ سیکل، با توان ۲۰۰ وات شکسته شدند. سوسپانسیون مذکور، به مدت 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، به منظور فرمولاسیون ایمونوتوکسین مربوطه، تعویض بافر با PBS با استفاده از سنتریکون

ازسوی دیگر روش‌های مختلفی جهت خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب وجود دارد که در این پژوهش به دلیل برجسب هیستیدینی طراحی شده در ابتدای توالی ایمونوتوکسین، از روش کروماتوگرافی تمایلی نیکل جهت تخلیص فرم محلول DT₃₈₉GCSF بهره گرفته شد. بررسی میزان خلوص پروتئین DT₃₈₉GCSF، پس از عبور از ستون نیکل-سفاروز، از ژل ۱۰ درصد SDS-PAGE استفاده شد. همان‌طور که 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 DT₃₈₉GCSF، ۸۰ درصد برآورد شد.



شکل ۳: ارزیابی تخلیص پروتئین DT₃₈₉GCSF با استفاده از روش SDS-PAGE. (۱) نمونه ورودی به ستون، (۲) نمونه خروجی از ستون، (۳) مارکر وزن مولکولی برحسب کیلودالتون، (۴-۸) نمونه های خروجی از ستون حاوی DT₃₈₉GCSF از شیب غلظت ۵۰ میلی مولار تا غلظت ۷۰۰ میلی مولار ایمیدازول.

ارزیابی عملکرد فرم محلول پروتئین DT₃₈₉GCSF

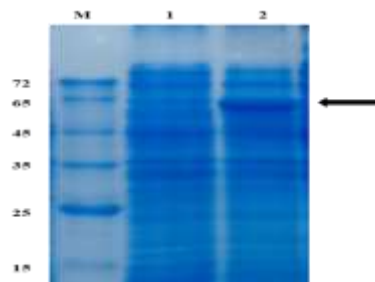
برای بررسی اثر سمیت سلولی DT₃₈₉GCSF خالص‌شده بر روی سلول‌های لوکمیای انسانی HL-60 که حامل گیرنده‌ی G-CSF هستند، از آزمون MTT استفاده شد. آزمون سنجش زیستی در شکل ۴ برحسب میانگین جذب در ۵۷۰ نانومتر برای مقادیر ۶۰۰ و ۴۵۰ و ۳۰۰ و ۶۰ (۰) میکروگرم DT₃₈₉GCSF نشان داده شده است. (آزمایشات سه بار تکرار انجام شد). نتایج بیان‌گر این بود

داشتن آنزیم ردوکتاز میتوکندری فعال، با تترازولیوم معرف MTT واکنش داده و ایجاد کریستال‌های فورمازان کردند. پس از آن پلیت ۹۶ خانه، به مدت 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 الیزا ریدر (State Fax-2100 model) Spain قرائت شد. مقدار رنگ تولید شده و جذب به‌طور مستقیم با تعداد سلول زنده متناسب بود. تمام آزمون‌ها در سه تکرار برای هر غلظت DT₃₈₉GCSF انجام شد.

نتایج

تولید فرم محلول پروتئین DT₃₈₉GCSF

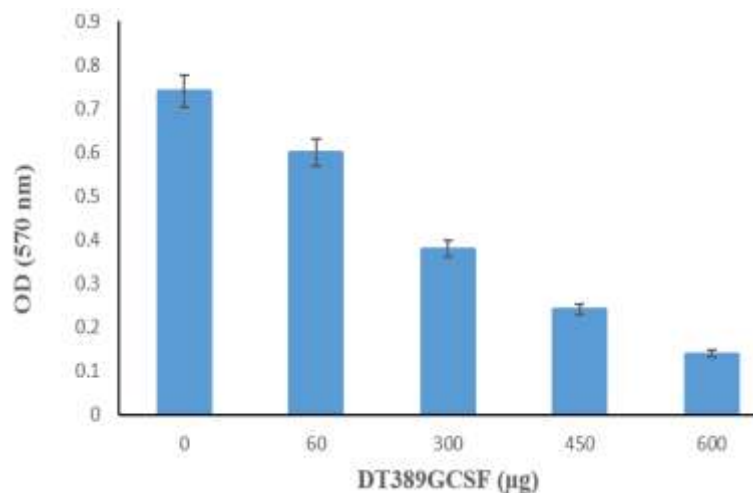
طبق شرایط ذکر شده در قسمت مواد و روش‌ها، میزان بیان پروتئین DT₃₈₉GCSF با استفاده از ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده‌ی باند ۶۳ کیلودالتونی بیان پروتئین هیبریدی DT₃₈₉GCSF در زمان ۴ ساعت پس از القا و عدم مشاهده‌ی باند در نمونه‌ی زمان صفر قبل از القا، که در شکل ۲ نشان داده شده است، موید بیان پروتئین است. با استفاده از نرم افزار Image J، بیان ۱۲ درصدی پروتئین هیبریدی DT₃₈₉GCSF، پس از القا محاسبه و تخمین زده شد.



شکل ۲: ارزیابی بیان پروتئین DT₃₈₉GCSF با استفاده از روش SDS-PAGE. (M) مارکر وزن مولکولی پروتئینی، (۱) باکتری نوترکیب در زمان صفر القا، (۲) باکتری نوترکیب در زمان ۴ ساعت پس از القا.

به آن، کاهش داشته و میزان ۶۰۰ میکروگرم از ایمونوتوکسین تولیدی (۶-۱۰ مولار) نسبت به سایر غلظت‌ها، بیشترین سمیت را نشان داده است.

که ۴۸ ساعت بعد از تیمار تا میزان ۶۰ میکروگرم DT₃₈₉GCSF، تاثیر معنی‌داری بر مرگ سلولی نداشته اما پس از این مقدار، میزان بقای سلولی به صورت وابسته



شکل ۴: ارزیابی سمیت سلولی پروتئین DT₃₈₉GCSF 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

پس از خالص‌سازی، در معرض بلاست‌های AML با گیرنده‌ی G-CSF، با غلظت بالای ۱۰^{-۶} مولار اثر سمیت نشان داد و سبب مرگ سلولی شد (۱۹). در تحقیق حاضر، پروتئین DT₃₈₉GCSF 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 DT₃₈₉GCSF، پیش بینی ساختاری آن در محیط رایانه با استفاده از نرم افزارهای مرتبط، انجام گرفت. صحت ساختار پروتئین DT₃₈₉GCSF، از نظر خصوصیات صورت بندی و عملکردی، تایید شد (۹). همچنین در تحقیق دیگر، پس از بیان پروتئین DT₃₈₉GCSF به فرم اینکلوزن بادی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و خالص‌سازی آن از طریق شستشوی ۳ مرحله‌ای با بافر

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 DT₃₈₉GCSF، محصول فناوری DNA نو ترکیب 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 DT₃₈₉GCSF، 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 DT₄₈₆GCSF، حدود ۷۰ کیلو دالتون بود که در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تولید و

باکتریایی کاهش یافته به گونه‌ای که پروتئین برای تاخوردگی صحیح فرصت پیدا می‌کند (۵، ۸، ۱۸، ۲۴). به همین منظور، در مطالعه‌ی حاضر، پروتئین DT₃₈₉GCSF در شرایط آزمایشگاهی در سویه‌ی بیانی pET-*E. coli* BL21(DE3) حاوی پلاسمید نو ترکیب DT₃₈₉GCSF 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 نو ترکیب بود. پروتئین نو ترکیب بیان شده به صورت محلول، به دلیل دارا بودن توالی ۶ آمینواسید هیستیدینی در انتهای N-ترمینال، به روش 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 نو ترکیب 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 DT₃₈₉GCSF، میزان جذب در ۵۷۰ نانومتر کاهش یافت. که این امر بیان‌گر کاهش در تعداد سلول‌های زنده می‌باشد. بررسی داده‌های حاصل از سنجش زیستی نشان داد که میزان ۶۰۰ میکروگرم بیشترین سمیت را داشته و میزان IC₅₀ (غلظت مورد نیاز DT₃₈₉GCSF، برای کشته شدن ۵۰ درصد سلول‌های HL-60) برابر ۰/۰۰۰۱۷±۰/۰۰۰۱۹ 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 DT₃₈₉GCSF به شکل محلول، می‌توان با رفع مشکلات زیر هزینه‌های تولید را به حداقل رساند:

تریس ۵۰ میلی‌مولار حاوی اوره‌ی ۳ مولار، بازتاخوردگی فرم اینکلوزن‌بادی پروتئین DT₃₈₉GCSF در حضور سیستمین ۲۵ مولار انجام گرفت. توسط فلئورسانس 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 DT₃₈₉GCSF 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 گروهی 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 به صورت ذرات نامحلول به نام اینکلوزن‌بادی در می‌آیند. به دلیل این‌که پروتئین حالت‌های تاخوردگی ناصحیح دارد نمی‌تواند فعالیت بیولوژیکی داشته باشد و بازتاخوردگی صحیح پروتئین به راحتی 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 به دست‌آوردن پروتئین با تاخوردگی صحیح طی روند بازتاخوردگی در شرایط خارج بدنی (*in vitro*) مشکل بوده و بازده پایینی دارد (۲۰). در پژوهشی، بازده بازتاخوردگی فرم اینکلوزن‌بادی GCSF به فرم فعال، ۳۰ درصد عنوان شده است (۲۲). همچنین در مطالعه‌ی دیگر، طی انجام مراحل زمان‌بر و طولانی و مشکل و پرهزینه، به منظور بازتاخوردگی ایمونوتوکسین DT₃₈₉IL2، میزان زیادی از پروتئین به تجمعات پروتئینی و اشکال غیرفعال پروتئین تبدیل شده بود (۲۳). به منظور حذف مراحل زمان‌بر و پرهزینه‌ی بازتاخوردگی و افزایش بازده تولید پروتئین نو ترکیب 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

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.

(۱) بازتاخوردگی صحیح فرم غیرفعال اینکلوزن بادی پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در پروکاریوت‌ها، به راحتی 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 پایین دستی بازتاخوردگی و اوره‌زدایی فرم اینکلوزن بادی 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 بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه صنعتی مالک اشتر برای حمایت‌های مالی جهت انجام این پژوهش تشکر نمایند.

منابع

- 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.
- Giles FJ, Keating A, Goldstone AH, Avivi I, Willman CL, Kantarjian HM. Acute myeloid leukemia. *ASH Education Program Book* 2002;2002(1):73-110.
- 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.
- 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.
- Zarkar N, Khalili MAN, Khodadadi S, Zeinoddini M, Ahmadpour F. Expression and purification of soluble and functional

- 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 IL2 α 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.

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