

Expression of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis- Inducing Ligand Conjugated to the scFV Region of Anti-CD20 Antibody Using a Small Ubiquitin-related Modifier

Mahsa rasekhian¹, Maryam pourjalili², Omid tavallaei¹

1. Assistant Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran, ORCID ID: 0000-0003-3382-5693

2. Pharm D., students research committee, Kermanshah university of medical sciences, Kermanshah, Iran, ORCID ID: 0000-0003-1930-6205.

3. Assistant Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran, (Corresponding author), Tel: (083) 34266780 , Fax: (083) 34276493, E-mail: o.tavallaei61@gmail.com, ORCID ID: 0000-0001-5268-3016

ABSTRACT

Background and Aim: Conventional treatments have shown little success in cancer treatment. Using antibody fragments conjugated with specific proteins and targeting specific receptors is a new strategy for producing anticancer drugs. Despite the advantages of prokaryotic hosts, protein expression in the form of inclusion bodies (cytoplasmic) has been challenging and leads to subsequent difficulties. Production of proteins as soluble forms will significantly help to solve this problem.

The primary purpose of this study was to clone and express Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) conjugated with anti CD₂₀ single chain fragment variable (scFV) region of anti-CD₂₀ antibody as a soluble protein using a small ubiquitin-related modifier (SUMO) fusion protein system in *E. coli* as a new method for optimal production of anticancer drugs.

Materials and Methods: Appropriate primers for a previously designed DNA sequence encoding the fusion protein were used to amplify the fragment. The amplified fragment was sub-cloned downstream of the SUMO tag in pSUMO vector. Once confirmed by standard methods, the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* strain BL21 (DE₃). Expression was induced by isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside. The expressed proteins were assessed by SDS-PAGE and then isolated by affinity chromatography. Western blotting was used to confirm protein expression.

Results: The results showed the DNA of the recombinant fusion protein was sub-cloned correctly, and the relevant analyses indicated that the expression process was successful. The recombinant fusion protein was confirmed by appropriate analysis.

Conclusion: The production of recombinant proteins in a soluble state in the prokaryotic host *E. coli* can reduce the costs of the downstream process. Production of soluble antiCD₂₀ scFV-TRAIL fusion protein can be considered a proper method to produce recombinant protein in a soluble state in the *E. coli* system and can decrease the cost of downstream processes.

Keywords: Fusion protein, Expression, Purification, Recombinant, Single chain fragment variable, Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

Received: April 18, 2022

Accepted: Aug 16, 2022

How to cite the article: Mahsa rasekhian, Maryam pourjalili, Omid tavallaei . Expression of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis- Inducing Ligand Conjugated to the scFV Region of Anti-CD20 Antibody Using a Small Ubiquitin-related Modifier. *SJKU* 2023;28(4):12-23.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

بیان لیگاند القاء کننده آپوپتوز وابسته به فاکتور نکروز دهنده تومور کنژوگه با ناحیه scFV آنتی‌بادی ضد CD₂₀ با استفاده از ریز مولکول‌های تغییر دهنده وابسته به یوبیکوئیتین

مهسا راسخیان^۱، مریم پور جلیلی^۲، امید تولایی^۳

۱. استادیار زیست فناوری دارویی، گروه فارماکوجنوزی و زیست فناوری دارویی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران، کد ارکید: ۵۶۹۳-۳۳۸۲-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۲. دکتری عمومی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران، کد ارکید: ۶۲۰۵-۱۹۳۰-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۳. استادیار زیست فناوری دارویی، گروه فارماکوجنوزی و زیست فناوری دارویی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران، پست الکترونیک: o.tavallaeei61@gmail.com، تلفن: ۰۹۱۲۷۷۷۶۲۱۳، کد ارکید: ۵۲۶۸-۰۰۰۱-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: درمان‌های مرسوم موفقیت کمی در درمان سرطان نشان داده‌اند. استفاده از قطعات آنتی‌بادی کنژوگه شده با پروتئین‌های خاص و هدفمند کردن آن یک روش نوین در تولید داروهای ضد سرطان است. علیرغم مزایای میزبان‌های پروکاریوتی، بیان پروتئین به شکل اجسام انکلوژیون بادی (سیتوپلاسمی) چالش برانگیز بوده و منجر به سختی‌های بعدی می‌شود. تولید پروتئین به صورت محلول تا حد زیادی به حل این مشکل کمک می‌کند. هدف اصلی این مطالعه شبیه‌سازی و بیان لیگاند القاکننده آپوپتوز مرتبط با فاکتور نکروز دهنده تومور (TRAIL) کنژوگه با قطعه متغیر تک زنجیر آنتی بادی (scFV) ضد CD₂₀ آنتی بادی ضد CD₂₀ به عنوان یک پروتئین محلول با استفاده از تعدیل کننده کوچک وابسته به یوبیکوئیتین بود. سیستم پروتئین فیوژن اصلاح کننده (SUMO) در *E. Coli* به عنوان روشی جدید برای تولید بهینه داروهای ضد سرطان است.

مواد و روش‌ها: پرایمرهای مناسب برای یک توالی DNA از قبل طراحی شده که پروتئین فیوژن را کد می‌کند برای تکثیر قطعه استفاده شد و در پلاسמיד pSUMO در ناحیه پائین دست توالی برجسب ژنی SUMO ساب کلون گردید. پس از تأیید با روش‌های استاندارد، پلاسמיד نوترکیب به سویه *E. Coli* strain BL₂₁ (DE₃) منتقل شد. بیان توسط ایزوپروپیل بتا-دی-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید القا شد. پروتئین‌های بیان شده توسط SDS-PAGE ارزیابی و سپس با کروماتوگرافی میل ترکیبی جداسازی شدند. برای تأیید بیان پروتئین از وسترن بلات استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که DNA پروتئین نوترکیب فیوژن به درستی ساب کلون شده و آنالیزهای مربوطه نشان داد که فرآیند بیان موفقیت‌آمیز بوده است. پروتئین فیوژن نوترکیب با تجزیه و تحلیل مناسب تأیید شد.

نتیجه‌گیری: تولید پروتئین‌های نوترکیب به صورت محلول در میزبان پروکاریوتی *E. coli* می‌تواند هزینه‌های مصروف در فرآیندهای پایین دستی را کاهش دهد و با توجه به نتایج مناسب این تحقیق در تولید پروتئین فیوژن scFV-TRAIL AntiCD₂₀ به صورت محلول می‌توان از روش استفاده شده در این تحقیق به منظور تولید محلول و عملکردی این گونه پروتئین‌های نوترکیب بهره برد.

کلمات کلیدی: پروتئین هم جوش، بیان، تخلیص، نوترکیب، قطعه متغیر تک زنجیر آنتی‌بادی، لیگاند القاکننده آپوپتوز وابسته به فاکتور نکروز دهنده تومور

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۱/۲۹ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۵/۵ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۲۵

مقدمه

سرطان، یکی از کشنده‌ترین بیماری‌ها در سراسر جهان است. درمان‌های رایج سرطان مانند شیمی‌درمانی و اشعه‌درمانی دارای درصد بقاء کمی بوده که علت آن پیشرفت تومور، مقاومت به درمان و عدم اختصاصیت درمان برای تومور است (۱). یکی از روش‌های درمانی سرطان، استفاده از پروتئین‌های مؤثر جهت بلوکه کردن فعالیت‌های تکثیری سلول‌های سرطانی است. در این راستا، پروتئین درمانی معمول، همچنین پروتئین‌های هدف‌گذاری شده و هوشمند مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲).

جایگاه ویژه‌ی ایمنی درمانی در درمان سرطان، در مطالعات امروزی، برکسی پوشیده نیست (۳). لیگاند القاء‌کننده آپوپتوز وابسته به فاکتور نکروز دهنده تومور (Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand, TRAIL) یکی از عوامل مهم سیستم ایمنی است که با القاء آپوپتوز از مسیر خارج سلولی، منجر به مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود (۴). مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) یکی از روش‌های اجرایی است که سیستم ایمنی، برای مقابله با سلول‌های توموری استفاده می‌کند (۵). آپوپتوز یکی از اصلی‌ترین راه‌های حذف سلول‌های ناخواسته است که در بدن موجودات پسرلولی و حتی تک‌سلولی انجام می‌شود (۶). به عنوان مثال مرگ در اثر آپوپتوز در بعضی از سلول‌های جاندار می‌تواند باعث راه اندازی و بلوغ سلول‌های دندرتیک در سیستم ایمنی شود (۷). TRAIL که عضوی از خانواده بزرگ فاکتور نکروز دهنده تومور است، یک پروتئین است که در نقش یک لیگاند ظاهر شده و عملکرد آن، القای فرایند آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است (۸) که به طور انتخابی منجر به آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (۹). اختصاصی بودن القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و عدم تأثیر یا تأثیر بسیار ناچیز آن روی سلول‌های سالم و طیف اثر گسترده آن در

بافت‌های بدن، این مولکول را به یک گزینه بالقوه مفید در درمان سرطان‌های مختلف مطرح ساخته است (۱۰). TRAIL، یک پروتئین غشایی نوع II است که رونویسی آن در انواع مختلف بافت‌های انسانی و بیشتر در طحال، ریه و پروستات تشخیص داده می‌شود (۱۱). این لیگاندها به عنوان پروتئین‌های تریمریک غشایی (Trimeric transmembrane proteins) قابل تقسیم بوده که می‌توانند شکسته شوند و در نتیجه به فرم پروتئین‌های محلول تبدیل گردند (۱۲). علاوه بر این، TRAIL برخلاف اکثر داروهای شیمی‌درمانی، آپوپتوز سلول‌های تومور را به صورت مستقل از p53 درگیر می‌کند (۱۳)، با تمام این توصیفات، استفاده از TRAIL نوترکیب در درمان سرطان با محدودیت‌هایی همراه است (۱۴): ۱- نیمه‌عمر آن در داخل بدن کوتاه است (۱۵)؛ ۲- اثربخشی آن در مقابل تومورها ضعیف است و در برابر تک‌درمانی با استفاده از TRAIL مقاومت وجود دارد (۱۶)؛ ۳- با توجه به بیان رسپتورهای TRAIL در اکثر بافت‌ها لیگاند TRAIL جهت‌گیری خاصی به سمت رسپتورهای جایگاه تومور ندارد و همین عامل دوز مؤثر دارو را در محل کاهش و عوارض جانبی احتمالی را افزایش خواهد داد. تولید TRAIL به فرم کنژوگه شده با ناحیه (single chain Fragment Variable, scFV) آنتی‌بادی علیه آنتی ژن خاص یک تومور، یک راهکار مناسب در برطرف کردن محدودیت‌های مذکور است. استفاده از فرم کنژوگه TRAIL با ناحیه scFV آنتی‌بادی اندازه مولکولی را افزایش داده و با توجه به اینکه فرم فعال TRAIL، فرم تریمر است در مجموع اندازه مولکولی تا حدی افزایش خواهد یافت که امکان دفع از طریق کلیه کاهش یافته و در نتیجه طول اثر آن افزایش می‌یابد. همچنین استفاده از فرم کنژوگه در سطح سلول‌های هدف فرم محلول TRAIL را به فرم غشایی تبدیل کرده که به نوبه خود می‌تواند با تأثیر بر رسپتورهای TRAIL-R2 به صورت اتوکراین و پاراکراین باعث افزایش القاء آپوپتوز در سلول‌های تومور

توالی DNA کد کننده پروتئین همجوش (AntiCD₂₀ scFV-TRAIL) با منشأ انسانی قبلاً از پایگاه داده NCBI استخراج، سنتز و در پلاسمید pET-28a کلون شده بود. با استفاده از واکنش PCR با شرایط ذکر شده در جدول شماره ۱ توالی DNA مورد نظر از پلاسمید نو ترکیب Anti-CD₂₀ scFV-TRAIL/pET-28a تکثیر گردید تا در مرحله بعد به پلاسمید pSUMO-YHRC ساب کلون گردد؛ سپس با استفاده از ژل الکتروفورز صحت اندازه‌ی آن تأیید شد. پرایمرهای لازم برای این منظور مطابق جدول شماره ۲، به گونه‌ای طراحی گردیدند که جایگاه اثر آنزیم BamHI در ناحیه 5' و جایگاه اثر آنزیم XhoI در ناحیه 3' قطعه تکثیر شده وارد شوند، به نحوی که امکان شبیه سازی یک طرفه در مرحله بعد فراهم گردد.

شود. اگر چه این لیگاند در میزبان‌های مختلفی تولید شده است، اما باکتری *E. coli* بهترین میزبان برای تولید آن محسوب می‌شود (۶). با توجه به اینکه یکی از مشکلات تهیه پروتئین‌های نو ترکیب در میزبان‌های پروکاریوتی بیان آن به صورت انکلوژیون بادی است، به نظر می‌رسد تولید این پروتئین‌ها به صورت محلول توسط برجسپ‌های حل کننده می‌تواند تا حد زیادی حلال این مشکلات باشد (۱۷)؛ بنابراین هدف تحقیق حاضر کلونینگ و بیان لیگاند TRAIL به صورت کنژوگه با ناحیه scFv آنتی بادی ضد CD20 به صورت محلول با استفاده از برجسب SUMO در باکتری *E. coli* است.

مواد و روش‌ها

تکثیر قطعه DNA کد کننده پروتئین همجوش

جدول ۱. برنامه دمایی ترمال سایکر به منظور تکثیر قطعه Anti-CD₂₀ scFV-TRAIL

مرحله	دما (سلسیوس)	زمان (دقیقه)	میزان تکرار
پیش دناتوراسیون	۹۴	۱۲	۱
دنا تورا سیون	۹۴	۳۰ ثانیه	
اتصال	۶۸	۳۰ ثانیه	۳۰ دور
طویل شدن	۷۲	۱:۵۰	
طویل شدن نهایی	۷۲	۱۰	۱

جدول ۲. توالی پرایمرهای طراحی شده به منظور تکثیر قطعه Anti-CD₂₀ scFV-TRAIL

نام پرایمر	توالی پرایمر	آنزیم محدود کننده
پیشرو	AAAAGGATCCGGACATCCAGCTGACCCAG	BamHI
معکوس	GGGGGGCTCGAGACCAACCAGGAAC	XhoI

استخراج قطعه DNA تکثیر شده از ژل

پس از انجام PCR، محصولات بر روی ژل آگاروز ۱٪ جداسازی شد. سپس، ژل حاوی باند قطعه مورد نظر برش خورده و DNA از درون ژل با استفاده از کیت استخراج از ژل GF-GC-050 (شرکت Bioneer، کره جنوبی) آزاد شد و در پلاسمید pSUMO در ناحیه پایین دست توالی تگ SUMO، ساب کلون گردید.

برش آنزیمی پلاسمید pSUMO-YHRC و قطعه DNA تکثیر شده:

برای کلون کردن قطعات، پلاسمید و محصول PCR استخراج شده از ژل به صورت مجزا توسط آنزیم‌های *BamHI* و *XhoI* بریده شدند. پلاسمید-pSUMO YHRC به صورت تازه با روش لیز قلیایی از باکتری دارای این پلاسمید استخراج شد و سپس تحت واکنش آنزیمی قرار گرفت. برای اینکه از برش و فعالیت مناسب هر دو آنزیم اطمینان حاصل شود، دو واکنش به طور هم زمان یکی با آنزیم *BamHI* و دیگری با *XhoI* انجام گرفت و نتیجه واکنش‌ها بر روی ژل آگاروز ۱٪ لود شد. واکنش با آنزیم اول به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد. پس از غیرفعال کردن آنزیم اول در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ادامه واکنش با آنزیم دوم به صورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد. محصول PCR استخراج شده از ژل نیز مشابه پلاسمید pSUMO-YHRC تحت واکنش هضم آنزیمی با دو آنزیم *BamHI* و *XhoI* قرار گرفت.

اتصال (Ligation) قطعه تکثیر شده به پلاسمید خطی pSUMO-YHRC:

پس از فراهم شدن قطعه AntiCD20 scFV-TRAIL و پلاسمید خطی pSUMO-YHRC لازم است طی واکنش Ligation این دو مولکول به هم متصل شوند. این واکنش به صورت over night در دمای ۱۶ درجه سلسیوس انجام شد.

تهیه سلول‌های پذیرا و ترانسفورماسیون محصولات واکنش اتصال:

هدف از انجام این مرحله وارد کردن پلاسمید حاوی قطعه مورد نظر به سلول باکتری است. بدین منظور از کشت شبانه باکتری اشیریشیا کلی Top10 در محیط L.B یک نمونه برداشته و یک کشت دو ساعته در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بر روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۸۰ rpm تا رسیدن به کدورت $OD_{600} = 0.4$ تهیه گردید. رسوب به دست آمده از باکتری‌ها پس از سانتریفیوژ به مدت ۷ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس به نسبت ۱ به ۵ با کلسیم کلراید ۰/۱ مولار سرد سوسپانسیون شد. پس از سانتریفیوژ مجدد با شرایط قبلی این بار رسوب به دست آمده با ۱ میلی لیتر کلسیم کلراید ۰/۱ مولار سرد سوسپانسیون گردید و به مدت ۴۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه و سپس رسوب داده شد. رسوب حاصله مجدد با ۱ میلی لیتر کلسیم کلراید سوسپانسیون شد تا سلول‌های پذیرا به دست آیند.

جهت ترانسفورماسیون مقدار ۳ میکرولیتر از پلاسمید نو ترکیب AntiCD20 scFV-TRAIL/ pSUMO-YHRC با غلظت تهیه شده 100 ng/ul ، به سلول‌های پذیرا اضافه و به مدت ۴۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد در ادامه میکروتیوب حاوی باکتری و پلاسمید به درون حمام آب گرم (۴۲ درجه سلسیوس) به مدت ۹۰ ثانیه منتقل گردید. سپس بلافاصله به مدت ۲ دقیقه داخل یخ ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد. در ادامه ۷۰۰ میکرو لیتر محیط کشت LB فاقد آنتی بیوتیک به محتوی میکروتیوب اضافه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه گردید و پس از آن به پلیت‌های به محیط کشت LB-Agar حاوی $100 \mu\text{g/ml}$ کانامایسین انتقال داده و به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد.

در ادامه به منظور تأیید ساب کلون ژن AntiCD20 scFV-TRAIL در پلاسمید pSUMO-YHRC محصول استخراج از کلونی‌های مثبت به وسیله آنزیم‌های *XhoI* و

روش Sanger توسط پرایمر یونیورسال T₇ (ناحیه کلونینگ پلاسمیدهای نوترکیب بیانی) به شرکت Topaz gene سفارش داده شد و نتیجه با توالی مورد انتظار مقایسه گردید.

بیان، خالص سازی و تأیید پروتئین نوترکیب:

پس از تأیید کلونینگ با استفاده از واکنش هضمی و تعیین توالی، پلاسمید نوترکیب به دست آمده به درون سویه *E. coli* BL21(DE₃) ترانسفورم شده و سپس بیان پروتئین همجوش القا گردید.

به منظور خالص سازی پروتئین نوترکیب AntiCD20 scFV-TRAIL از روش کروماتوگرافی میل ترکیبی با استفاده از رزین دارای عامل فعال (Ni-IDA) -Nickle- IminoDiacetic Acid استفاده شد. در این روش توالی His-tag موجود در پروتئین بیان شده با نیکل موجود بر روی رزین برهمکنش داده و بر روی ستون باقی می ماند. در انتها با استفاده از بافر حاوی ۰/۵ میلی مولار ایمیدازول پروتئین نوترکیب از ستون جدا شده و خالص می شود.

به منظور بررسی بیان ژن نوترکیب و نیز بررسی کارایی

خالص سازی پس از کروماتوگرافی، آنالیز Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) انجام شد (۱). به طور خلاصه پس از جمع آوری باکتری پس از القاء بیان و نیز پس از خالص سازی پروتئین نوترکیب و اندازه گیری میزان تام پروتئین با روش برادفورد، نمونه ها، ژل های بالا و پایین و بافرها آماده سازی و با انجام الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین ها با اختلاف پتانسیل ۱۵۰ ولت از یکدیگر جداسازی شد. سپس ژل توسط رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی شد.

در نهایت بیان پروتئین کایمیریک و خالص سازی آن توسط روش Western Blot تأیید گردید (۱۸). بدین منظور ابتدا طی روند الکتروبلاتینگ با دستگاه Semi Dry Blotting (شرکت Apelex، فرانسه) پروتئین های جدا شده در ژل پلی آکریل آمید با استفاده از بافر تریس-گلیسین به کمک

*Bam*HI یک بار به صورت همزمان و یک بار تنها با یک آنزیم برش داده شد.

غربالگری کلونی های به دست آمده با روش Colony PCR

کلونی های موجود با روش Colony PCR از لحاظ وجود یا عدم وجود پلاسمید نوترکیب غربالگری شدند. اساس روش Colony PCR همان انجام PCR بر روی پلاسمیدهای استخراج شده است. در این روش به جای خالص سازی پلاسمید از کلونی های باکتری که پروسه ای وقت گیر است، نمونه های کلونی ها مورد نظر توسط چوب خلال دندان استریل شده به صورت مستقیم به محتویات لوله های واکنش PCR اضافه گردید. سپس در دستگاه Thermal Cycler ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه محتویات واکنش در دمای ۹۴ درجه سلسیوس قرار داده شد تا با لیز باکتری ها محتویات پلاسمیدها در واکنش آزاد شود. سایر شرایط واکنش PCR بر طبق جدول ۱ و با استفاده از پرایمرهای طراحی شده قبلی انجام گردید.

استخراج پلاسمید از کلونی ها:

در این مرحله پلاسمید از درون سلول باکتری های ترانسفورم شده با استفاده از روش Alkaline mini-preparation استخراج گردید. بدین منظور از کیت استخراج پلاسمید شرکت GeNet Bio کره جنوبی استفاده گردید. پس از لیز شدن باکتری، DNA ژنومیک و پروتئین ها تحت شرایط قلیایی دناتوره شده و پس از اسیدی کردن محیط و در حضور سرما رسوب می کنند، درحالی که پلاسمیدها به علت اندازه کوچک و فرم سوپراکویلی که دارند رسوب نمی کنند و می توان آن ها را جدا کرد. صحت قطعه ساب کلون شده به وسیله واکنش هضم آنزیمی تأیید شد.

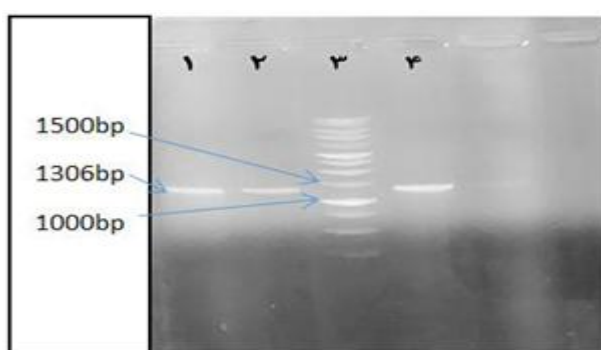
تأیید کلونینگ توسط تعیین توالی

به منظور اطمینان از صحت کلونینگ و برای اینکه به طور دقیق، کلون شدن در قالب مناسب در جایگاه های صحیح ارزیابی شود، تعیین توالی ناحیه کلون شده با استفاده از

یافته‌ها

تکثیر و ساب کلون قطعه DNA کد کننده AntiCD20 تکثیر scFV-TRAIL نتیجه به دست آمده از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ نشان داد که قطعه‌ی مورد نظر به اندازه ۱۳۰۶ جفت باز توسط پرایمرهای طراحی شده به درستی تکثیر شده است (شکل ۱).

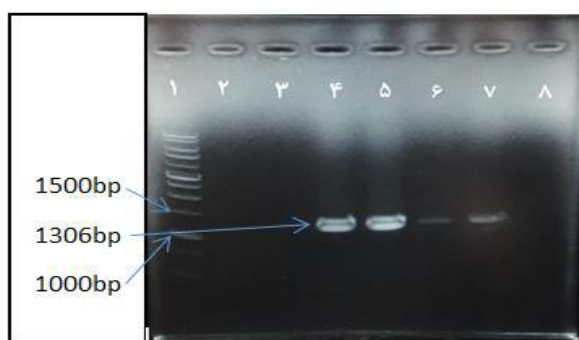
نیروی الکتریکی به غشای نیتروسولوز منتقل شدند. پس از شستشوی غشاء و بلاک کردن نواحی آزاد اتصال بر روی آن، ابتدا غشاء در مجاورت با آنتی بادی اولیه Anti His tag و سپس با آنتی بادی ثانویه ضد IgG موشی کنژوگه با (Horseradish peroxidase, HRP) قرار گرفت و در نهایت با محلول سوبسترای پراکسیداز (Diaminobenzidine, DAB) رنگ آمیزی شد.



شکل ۱. نتایج الکتروفورز محصولات PCR. در ستون های ۱، ۲، ۴ اندازه‌ی قطعه‌ی DNA تکثیر شده به وسیله‌ی PCR، در مقایسه با ستون ۳ (مارکر اندازه‌ی DNA) نشان داده شده است.

۱٪ نشان داد که ۴ مورد از کلونی های انتخابی دارای پلاسمید حاوی قطعه ۱۳۰۶ جفت بازی مورد نظر بودند (شکل ۲).

همچنین پس از ساب کلون کردن قطعه تکثیر شده در پلاسمید pSUMO-YHRC نتایج به دست آمده از الکتروفورز محصولات Colony PCR بر روی ژل آگاروز



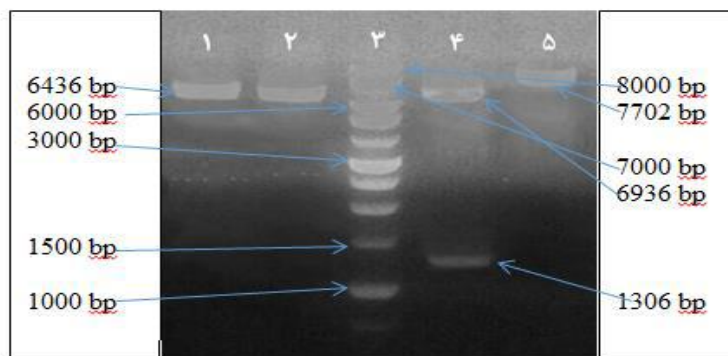
شکل ۲. نتایج الکتروفورز محصولات کلونی PCR. ستون اول شامل مارکر وزنی DNA و ستون های ۲ تا ۸ شامل نتایج کلونی PCRهای مختلف است. واکنش های ۴ تا ۷ نشانگر وجود کلونی نوتر کیب است.

نتایج به دست آمده از روش هضم آنزیمی بر روی پلاسمید نوتر کیب و مقایسه با پلاسمید فاقد نشانگر خروج قطعه

تائید کلونینگ قطعه DNA کد کننده AntiCD20 تکثیر scFV-TRAIL در پلاسمید pSUMO-YHRC

در پلاسمید pSUMO-YHRC است. در نهایت تعیین توالی (Sequencing) ناحیه کلونینگ پلاسمیدهای نو ترکیب نشان داد که توالی صحیح در قالب مناسب کلون شده است. (نتایج نشان داده نشده است).

حدود ۱۳۰۶ جفت بازی از پلاسمید نو ترکیب است. همچنین تفاوت اندازه پلاسمید خطی نو ترکیب (۷۷۰۲ جفت باز) با پلاسمید خطی فاقد پلاسمید (۶۴۳۴ جفت باز) نشان دهنده اختلاف اندازه این دو پلاسمید نیز تأیید کننده کلونینگ DNA کد کننده AntiCD20 scFV-TRAIL

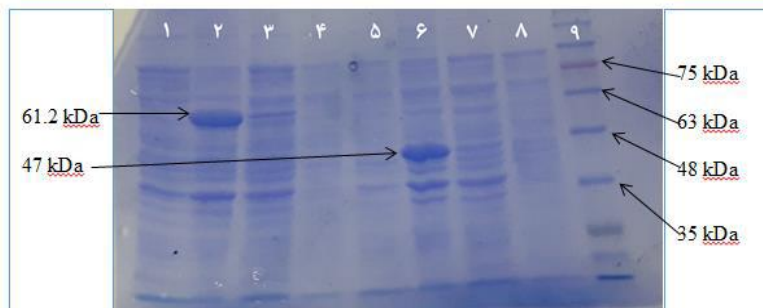


شکل ۳. نتایج الکتروفورز محصولات برش پلاسمید نو ترکیب AntiCD20 scFV-TRAIL/pSUMO-YHRC روی ژل آگاروز ۱٪. از چپ به راست. ستون ۱: پلاسمید pSUMO-YHRC برش خورده با *XhoI*. و ستون ۲: پلاسمید pSUMO-YHRC برش خورده با *BamHI* نشانگر اندازه صحیح پلاسمید بدون قطعه است (حدود ۶۴۳۴ جفت باز). ستون ۳: مارکر وزنی DNA. ستون ۴: پلاسمید برش خورده با *XhoI* و *BamHI* که نشان دهنده خروج قطعه کلون شده از پلاسمید است (حدود ۱۳۰۶ جفت باز). ستون ۵: پلاسمید نو ترکیب AntiCD20 scFV-TRAIL/pSUMO-YHRC برش خورده با *XhoI* که نشانگر اندازه مناسب پلاسمید نو ترکیب است (حدود ۷۷۰۲).

اندکی بالاتر از pET28a است لیکن اختلاف در بیان پروتئین به صورت محلول در سوپرناتانت حاصل از سونیکاسیون در هر دو پلاسمید اختلاف کمی دارد؛ و همچنین با مقایسه باند پروتئین مورد نظر با سایر پروتئین‌های باکتری به نظر می‌رسد که تگ SUMO پروتئین محلول بیشتری تولید کرده است؛ اما در عمل برخلاف انتظار شاهد اختلاف زیاد مورد انتظار، بین پروتئین محلول و اینکلوزیون بادی تولیدی توسط این دو پلاسمید نیستیم.

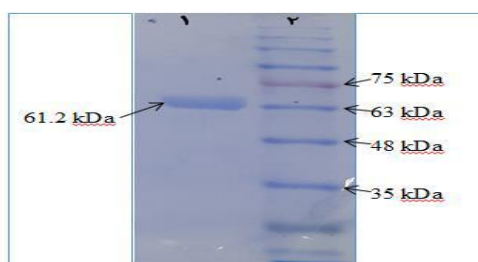
نتایج بیان و خالص سازی پروتئین

نتایج حاصل از بیان پروتئین نو ترکیب AntiCD20 scFV-TRAIL در دو پلاسمید pSUMO-YHRC و pET-28a در شکل شماره ۴ نشان داده شده است. در این شکل بیان پروتئین به شکل محلول و اینکلوزیون بادی توسط دو پلاسمید یاد شده مقایسه شده است. در ابتدا مقایسه بیان پروتئین در سوپرناتانت حاصل از سونیکاسیون توسط پلاسمید حاوی SUMO و اینکلوزیون بادی تولیدی این پلاسمید، مطابق انتظار نشان می‌دهد که این پروتئین به نسبت قابل توجهی محلول شده است و در سوپرناتانت سونیکاسیون با غلظت قابل توجهی وجود دارد؛ اما نکته‌ی جالب توجه در مقایسه‌ی پروتئین بیان شده توسط دو پلاسمید pSUMO-YHRC و pET28a نشان می‌دهد اگرچه پروتئین بیان شده در سوپرناتانت حاصل از سونیکاسیون در زمان و شرایط برابر در pSUMO-YHRC



شکل ۴. آنالیز الکتروفورز SDS-PAGE به منظور ارزیابی بیان AntiCD20 scFV-TRAIL در *E. coli*. ستون ۱: عصاره باکتری حاوی pSUMO-YHRC قبل از بیان، ستون ۲: محلول رویی بعد از سانتریفیوژ باکتری حاوی pSUMO-YHRC لیز شده، ستون ۳: رسوب باکتری حاوی pSUMO-YHRC(pellet). ستون ۴: عصاره باکتری حاوی pSUMO-YHRC قبل از بیان. ستون ۵: عصاره باکتری حاوی pET-28a قبل از بیان. ستون ۶: محلول رویی بعد از سانتریفیوژ باکتری حاوی pET-28a لیز شده. ستون ۷: رسوب باکتری حاوی pET-28a بعد از لیز. ستون ۸: عصاره باکتری حاوی pET-28a قبل از بیان. ستون ۹: مارکر وزنی پروتئین.

خالص سازی پروتئین نو ترکیب AntiCD₂₀ scFV-TRAIL نشان داد این پروتئین نو ترکیب با موفقیت جداسازی شده است (شکل ۵).



شکل ۵. آنالیز الکتروفورز SDS-PAGE به منظور ارزیابی بیان AntiCD20 scFV-TRAIL در *E. coli*. ستون ۱: محصول خالص سازی، ستون ۲: مارکر وزنی پروتئین. تأیید ماهیت آنالیز وسترن بلات نشان داد که پروتئین مورد نظر متشکل از قطعه‌ی AntiCD20 scFV-TRAIL، SUMO و Histag بر اساس نقشه‌ی ژنی پلاسمید و چارچوب خوانش باز آن با اندازه 61.2 kDa بیان شده است (شکل ۶).



شکل ۶. بررسی AntiCD20 scFV-TRAIL تخلیص شده با ایمونوبلاتینگ. AntiCD20 scFV-TRAIL انسانی پس از تخلیص بر روی غشاء نیتروسولوزی منتقل و سپس غشاء ابتدا با آنتی بادی اولیه Anti His tag و سپس با آنتی بادی ثانویه ضد IgG موشی کنژوگه با HRP و محلول سوبسترای پراکسیداز (دی آمینو بنزیدین) رنگ آمیزی شد و یک باند 61.2 kDa مورد تأیید قرار گرفت.

SUMO علاوه بر محلول سازی پروتئین می تواند میزان بیان

پروتئین را افزایش دهد (۱۹).

نتیجه‌ی غیرقابل انتظار در این مورد اختلاف اندک میزان پروتئین های محلول موجود در سوپرناتانت سونیکه ی این دو پلاسمید در مقایسه با یکدیگر است. باید مد نظر داشت که بیان مناسب و محلول سازی پروتئین های نو ترکیب در میزان های پروکاریوتی تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند شرایط محیطی هنگام بیان پروتئین، ماهیت پروتئین، حامل کلونینگ، میزبان باکتریایی قرار دارد (۲۰). Tham و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۰ تأثیر استراتژی کلونینگ را در بیان پروتئین اندولیزین فاژ/استافیلوکوک به صورت محلول توسط حامل pET-28a در باکتری *E. coli* BL₂₁ (DE₃) بررسی کرده است. طبق یافته های مطالعه تغییر جایگاه کلونینگ مربوط به انتهای N-terminal پروتئین از BamHI به NcoI می تواند منجر به افزایش میزان محلولیت و عملکرد پروتئین شود. کلونینگ در جایگاه کلونینگ BamHI منجر به افزودن اسیدهای آمینه اضافه مربوط به His tag و T₇ tag به انتهای N-terminal پروتئین نو ترکیب می شود که می تواند منجر به تا خوردن نامناسب پروتئین شود در حالی که اسیدهای آمینه اضافه در انتهای N-terminal هنگام کلونینگ در جایگاه NcoI وجود ندارد که خود می تواند منجر به ایجاد شرایط بهتر برای تا خوردن مناسب پروتئین باشد. با توجه به اینکه در پلاسمید نو ترکیب AntiCD20 scFV-TRAIL/ pET28a که قبلاً طراحی و کلون شده بود از جایگاه NcoI/XhoI به منظور کلونینگ استفاده شده بود، مطالعه بالا می تواند دلیلی برای تولید محلول پروتئین کثروگه این تحقیق در پلاسمید pET28a ارائه دهد (۲۱). در مجموع می توان گفت که تگ SUMO پروتئین کثروگه این تحقیق را بیشتر به فرم محلول بیان کرده است. مطالعات مختلفی نیز مؤید کارایی این تگ در بیان محلول پروتئین های نو ترکیب است (۲۲ و ۲۳).

ترکیبات پروتئینی نو ترکیب اخیراً برای درمان انواع مختلفی از بیماری‌ها از جمله سرطان، بیماری‌های خود ایمنی و اختلالات ژنتیکی استفاده می‌شود (۱۸). آنالیز SDS-PAGE فراکشن های مختلف میزبان نشان دهنده بیان پروتئین همجوش مورد نظر است به طوری که بعد از القا به وسیله ایزوپروپیل بتا-دی-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (isopropylthio-β-galactoside, IPTG) اندازه باند نسبت به حالتی که القا کننده اضافه نشده بیشتر است. همچنین تک باند مربوط به فراکشن بعد از خالص سازی نشان دهنده این موضوع است که پروتئین مورد نظر خالص شده است. خالص سازی پروتئین کایمیریک نو ترکیب Anti-CD20 scFV-TRAIL توسط کروماتوگرافی تمایلی Ni-IDA صورت گرفت، با اینکه این روش نتایج قابل قبولی از خالص سازی را به ما نشان داد؛ اما مطالعات بیانگر این امر است که الصاق توالی Histag می تواند تأثیر منفی بر اختصاصیت این لیگاند دارد (۱۹).

به منظور استخراج پروتئین محلول از تگ SUMO استفاده شد که توانایی بهبود تا شدن پروتئین و همین طور افزایش بیان و حلالیت پروتئین مورد نظر را داراست. همچنین اندازه نسبتاً کوچک این تگ نسبت تقریباً بالای پروتئین به پپتید تگ را فراهم کند که تأثیر مثبتی روی بازده و فعالیت پروتئین دارد (۱۹). هرچند که این تگ در پلاسمید pSUMO-YHRC وجود داشت که یک پلاسمید با تعداد کمی در باکتری است و ممکن است در شرایط محیطی برابر در مقابل بیان پروتئین به اندازه‌ی pET-28a که یک پلاسمید با تعداد کمی بالا است، کار آمد نباشد اما باند مربوط به پروتئین محلول که همان سوپرناتانت حاصل از سونیکاسیون است نسبت به باند پروتئین حاصل لیز لخته که پروتئین غیر محلول قلمداد می شود، شامل پروتئین بیشتری است و می توان گفت که مطابق با مطالعات دیگر، تگ

استفاده از Solubilizing Tags می‌تواند تا حد زیادی حلال این مشکلات و کاهش هزینه‌های تولید باشد. با توجه به نتایج مناسب این تحقیق در تولید پروتئین همجوش AntiCD20 scFV-TRAIL به صورت محلول می‌توان از روش استفاده شده در این تحقیق به منظور تولید محلول و عملکردی این گونه پروتئین‌های نو ترکیب بهره برد؛ البته نیازمند بررسی‌های بیشتری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه مقطع دکتری عمومی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه است که مورد حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه قرار گرفته است و نویسندگان لازم می‌دانند که از این معاونت کمال قدردانی و تشکر را به عمل بیاورند. بعلاوه هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه، هیچ گونه تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند. این طرح با شماره‌ی IR.KUMS.REC.1397.112 توسط کمیته‌ی اخلاق این دانشگاه تأیید شده است.

در نهایت انتظار می‌رود که به علت حضور پروتئازهای مختلف در محیط شاهد پروتئین‌های شکسته و باندهای چندگانه باشیم؛ اما این مسئله با استفاده از مهارکننده پروتئاز (Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) که منجر به مهار انواع سرین پروتئازها می‌شود تا حد قابل توجهی کنترل شد و از شکسته شدن پروتئین به وسیله آنزیم‌های موجود در محیط سلول جلوگیری شد.

نتیجه‌گیری

استفاده از بخشی از ساختار آنتی‌بادی علیه بیماری‌های مختلف برای کنژوگه شدن با پروتئین‌های خاصی و هدفمند کردن آن به عنوان یک روش نوین در تولید داروهای ضد سرطان است با توجه به اینکه در این رویکرد مشکلاتی همچون تجزیه پروتئین‌های تولیدی، تشکیل فرم نامحلول یا همان اینکلوزیون بادی و مسائلی از این دست وجود دارد، می‌توان با فائق آمدن بر این مسائل این روش را به عنوان یک استراتژی مناسب برای تولید همجوش پروتئین‌ها در درمان انواع سرطان مطرح کرد. به نظر می‌رسد که

منابع

1. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(8):583-92.
2. Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(1):21-39.
3. Baxevanis CN, Perez SA, Papamichail M. Cancer immunotherapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009;46(4):167-89.
4. Held J, Schulze-Osthoff K. Potential and caveats of TRAIL in cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 2001;4(4):243-52.
5. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-71.
6. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
7. Viard-Leveugle I, Gaide O, Jankovic D, Feldmeyer L, Kerl K, Pickard C, et al. TNF- α and IFN- γ are potential inducers of Fas-mediated keratinocyte apoptosis through activation of inducible nitric oxide synthase in toxic epidermal necrolysis. *J Invest Dermatol*. 2013;133(2):489-98.
8. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*. 1996;271(22):12687-90.

9. Tavallaei O, Bandehpour M, Nafissi-Varcheh N, Kazemi B. Production and secretion of TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL/Apo2L) in the Escherichia coli periplasm using PhoA signal peptide. *J Rep Pharm Sci.* 2014;3(1):90–98.
10. Soria JC, Smit E, Khayat D, Besse B, Yang X, Hsu CP, et al. Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28(9):1527-33.
11. Hameed AG, Arnold ND, Chamberlain J, Pickworth JA, Paiva C, Dawson S, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) reverses experimental pulmonary hypertension. *J Exp Med.* 2012; 209(11):1919-35.
12. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001; 23;104(4):487-501.
13. Willms A, Schitteck H, Rahn S, Sosna J, Mert U, Adam D, et al. Impact of p53 status on TRAIL-mediated apoptotic and non-apoptotic signaling in cancer cells. *PLoS One.* 2019; 14(4):e0214847.
14. Zhong HH, Wang HY, Li J, Huang YZ. TRAIL-based gene delivery and therapeutic strategies. *Acta pharmacologica Sinica.* 2019;40(11):1373-85.
15. Herbst RS, Eckhardt SG, Kurzrock R, Ebbinghaus S, O'Dwyer PJ, Gordon MS, et al. Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:2839–2846.
16. T Trivedi R, Mishra DP. Trailing TRAIL resistance: novel targets for TRAIL sensitization in cancer cells. *Front Oncol.* 2015; 5:69.
17. He F. Laemmlisds-page. *Bio-protoc.* 2011; e80-e80. DOI:10.21769/BioProtoc.80.
18. Jensen EC. The basics of western blotting. *Anat Rec.* 2012; 295(3):369-71.
19. Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, Mattern MR. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif.* 2005; 43(1): 1-9.
20. Kaur J, Kumar A, Kaur J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. *Int J Biol Macromol.* 2018;106: 803-822.
21. Tham HY, Song AA, Yusoff K, Tan GH. Effect of different cloning strategies in pet-28a on solubility and functionality of a staphylococcal phage endolysin. *Biotechniques.* 2020;69(3): 161-70.
22. Tarahomjoo S, Bandehpour M, Aghaebrahimian M, Ahangaran S. Soluble Diphtheria Toxin Variant, CRM 197 was Obtained in Escherichia coli at High Productivity Using SUMO Fusion and an Adjusted Expression Strategy. *Protein Pept Lett.* 2022; 29(4): 350-359.
23. halilvand AB, Aminzadeh S, Sanati MH, Mahboudi F. Cytoplasmic soluble Lispro insulin production in Escherichia coli, product yield optimization and physiochemical characterization. *Biochem Eng J.* 2022; 182: 108410.