Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 19(110): 42-50

Cloning and Expression of Recombinant Immunotoxin using Diphtheria Toxin and Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF)

Fatemeh Donyapoor[1], Mehdi Zeinoddini[2]*, Ali Reza Saeedinia[3]

1- MSc in Molecular Biotechnology, Department of Sciences and Biotechnology, Malek- Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.
2- Associate Professor, PhD in Biochemistry, Department of Sciences and Biotechnology, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.
3- Assistant Professor, PhD in Genetics, Department of Sciences and Biotechnology, Malek- Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

Received: 25 Jan 2015, Accepted: 1 Jun 2016

Abstract

Background: Immunotoxin (IT) is a directed toxin containing two distinct sections (immune and toxin parts) covalently bond using specific chemical or peptide linkers. The aim of this study is to produce a recombinant and hybrid protein containing diphtheria toxin (DT) and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF).

Materials and Methods: According to the structure of the first commercial recombinant immunotoxin (Ontak, hybrid protein containing DT fused interlukine2), gene encoding of DT and G-CSF was amplified using specific primers and plasmid template of pET-IDZ3 (pET21 harboring the gene encoding ontak immunotoxine) and pET-GCSF (pET23 harboring G-CSF), respectively. The DT-GCSF fusion protein produced using soeing PCR and specific primers. Finally, pET-DT-GCSF construction prepared using subcloning of DT-GCSF into pET21a(+) and confirmed by sequencing, SDS-PAGE and western blot technique.

Results: Gene encoding of DT-GCSF inserted into *NdeI/EcoRI* site of pET21 and the construction of strain producing DT-GCSF recombinant immunotoxin was confirmed using customary methods.

Conclusion: The cytokine fusion protein, DT-GCSF, could be used for the inhibition of G-CSF receptor bearing cancer cells.

Keywords: Immunotoxin, Diphtheria toxin, Granulocyt colony stimulating factor, Protein expression

*Corresponding Author:
Address: Department of Sciences and Biotechnology,Malek- Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.
Email: zeinoddini@modares.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۵ (شماره پیاپی ۱۱۰)،مرداد ۱۳۹۵، ۵۰-۴۲

همسانه سازی و بیان ایمونوتوکسین نوترکیب با استفاده از توکسین دیفتری و فاکتور محرک رشد کلنی گرانولوسیت

فاطمه دنیاپور[۱]، مهدی زین الدینی[۲*]، علیرضا سعیدی نیا[۳]

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی مولکولی، گروه علوم و فن‌آوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

۲- دانشیار، دکترای تخصصی بیوشیمی، گروه علوم و فن‌آوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

۳- استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک، گروه علوم و فن‌آوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: ایمونوتوکسین یک توکسین هدف‌مند است که از اتصال دو بخش مجزا (بخش ایمنی و بخش توکسینی) با واسط شیمیایی یا پپتیدی اختصاصی تشکیل می‌شود. هدف اصلی تحقیق حاضر تولید پروتئین هیبریدی و نوترکیب مشتمل بر توکسین دیفتری و فاکتور محرک رشد کلنی گرانولوسیتی است.

مواد و روش ها: با توجه به ساختار اولین ایمنوتوکسین تجاری نوترکیب (اونتاک، پروتئین هیبریدی شامل توکسین دیفتری و اینترلوکین ۲)، ژن به رمزدرآورنده توکسین دیفتری (DT) و فاکتور محرک رشد کلنی گرانولوسیت (G-CSF) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و قالب پلاسمیدی pET-IDZ3 (پلاسمید pET21 حاوی ژن رمز کننده ایمونوتوکسین اونتاک) و pET-GCSF (پلاسمید pET23 حاوی ژن رمز کننده G-CSF) تکثیر یافت. سپس اتصال دو قطعه ژنی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و در طی روش Soeing PCR انجام شد. در ادامه، قطعه ژنی هیبریدی درون وکتور pET21a (+) منتقل گردید تا سازه ژنی pET-DT-GCSF به دست آید. ساخت این سازه ژنی از طریق توالی یابی، SDS-PAGE و وسترن بلات مورد تأیید قرار گرفت.

یافته‌ها: ژن به رمز درآورنده ایمونوتوکسین نوترکیب بین جایگاه‌های آنزیمی *EcoRI* و *NdeI* درون وکتور (+) pET21a به صورت صحیح کلون گردید و تولید سویه مولد ایمونوتوکسین نوترکیب DT-GCSF با استفاده از روش‌های مرسوم مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: سیتوکین هیبرید پروتئین، DT-GCSF، می‌تواند در راستای مقابله با سلول‌های سرطانی و مهار آن‌ها که در سطح سلولی آن‌ها گیرنده‌های G-CSF زیاد بیان می‌شوند، مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ایمونوتوکسین، توکسین دیفتری، فاکتور محرک رشد کلنی گرانولوسیت، بیان پروتئین

***نویسنده مسئول:** ایران، تهران، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، گروه علوم و فن آوری زیستی

Email:zeinoddini@modares.ac.ir

مقدمه

یکی از روش‌های درمانی سرطان، استفاده از پروتئین‌های موثر جهت بلوکه کردن فعالیت‌های تکثیری سلول‌های سرطانی است. در این راستا هم پروتئین درمانی معمول و هم پروتئین‌های هدف گذاری شده و هوشمند مورد استفاده قرار می‌گیرند. توکسین درمانی سرطان از طریق داروهای اختصاصی که به نام ایمونوتوکسین خوانده می‌شوند، از روش‌های درمانی نوینی است که مورد توجه متخصصان ساخت دارو قرار گرفته است. امروزه مقاومت سرطان‌ها نسبت به برخی داروهای شیمی درمانی، سبب توجه ویژه دانشمندان به این ترکیبات شده است(۴-۱). استراتژی جدید، بیوتراپی تومورهای خاص با استفاده از مهندسی ژنتیک و در اثر تولید پروتئین‌های هیبریدی مشتمل بر توکسین‌های مهار کننده سنتز پروتئین و گیرنده‌های سلولی موجود بر روی سطح سلول‌های سرطانی می‌باشد. به بیان دیگر در ساختار این پروتئین‌های هیبریدی (ایمونوتوکسین)، یک بخش ایمنی طراحی می‌گردد که هدف آن شناسایی گیرنده‌های موجود بر روی سطح سلول سرطانی است. بخش دوم آن یک توکسین است که در اثر نفوذ در سلول سرطانی، سبب مرگ برنامه‌ریزی شده آن می‌گردد(۸-۵). در بیشتر ایمونوتوکسین‌های نوترکیب امروزی از دو توکسین دیفتری (DT) و اگزوتوکسین A سودوموناس (ETA) در سطح آزمایشات بالینی استفاده می‌شود. زیرا این توکسین‌های باکتریایی راحت‌تر از توکسین‌های گیاهی در اشرشیا کلی تولید می‌شوند و فعالیت بیشتری را از خود نشان می‌دهند. از طرف دیگر ورود توکسین به داخل اندوزوم‌ها متضمن رسیدن توکسین به اهداف سیتوزولی خود نیست، بلکه پدیده انتقال از غشاء و رها شدن توکسین از اندوزوم نیز امری مهم تلقی می‌شود. DT و ETA به طور ذاتی دارای دومین‌های انتقال از غشاء می‌باشند، این در حالی است که این دومین‌ها در بسیاری از توکسین‌های دیگریافت نمی‌شوند(۹، ۱۰). در این میان، توکسین دیفتری یکی از قوی ترین وکارآمدترین توکسین‌های شناخته شده در طبیعت می‌باشد که می‌تواند برای سلول‌های یوکاریوت بسیار سمی باشد. این توکسین از گونه باکتریایی کورینه باکتریوم دیفتریا تولید می‌شود. آنالیزهای ژنتیکی وکریستالوگرافی با استفاده از اشعه X ، نشان دهنده سه دومین عملکردی مجزا در ساختار این توکسین می‌باشد(۱۱). این پلی پپتید ۵۳۵ اسید آمینه‌ای بعد از اتصال به گیرنده‌های سطحی خود در سطح سلول هدف، از طریق اندوسیتوز به همراه گیرنده خود در یک پوشش کلاترینی وارد سلول می‌شود. سپس تحت مسیر پروتئولیتیک و با انجام فعالیت ADP ریبوزیلاسیون و با غیر فعال سازی فاکتور طویل کننده سنتز پروتئین (EF-2) مانع طویل سازی mRNA و در نتیجه مهار سنتز پروتئین می‌گردد که در نهایت به مرگ سلولی می‌انجامد(۱۲). از سوی دیگر، فاکتور محرک رشد کلنی گرانولوسیتی (G-CSF) یک محرک مستعد برای رشد سلول‌های پیش ساز خونی طبیعی و سرطانی است که گیرنده آن به همراه گیرنده اینترلوکین ۳ (IL-3) و فاکتور محرک رشد کلنی ماکروفاژ-گرانولوسیت (GM-CSF) بر روی سطح سلول‌های سرطان خون لوکمیا (AML) به میزان زیادی تولید می‌شود. در نتیجه این گیرنده‌ها می‌توانند هدفی برای توکسین درمانی سرطان AML باشند(۱۳، ۱۴).

هدف تحقیق حاضر، طراحی، همسانه سازی و بیان ایمونوتوکسین نوترکیب متشکل از توکسین دیفتری (DT) و فاکتور محرک رشد کلنی گرانولوسیتی انسانی (G-CSF) است تا در مطالعات آتی با بهینه سازی شرایط بیانی و تولید مطلوب آن، بررسی ساختاری – عملکردی ایمونوتوکسین DT-GCSF صورت گیرد.

مواد و روش‌ها

طراحی و ساخت سازه ژنی pET- DT-GCSF

در این پژوهش از پلاسمیدهای pET-IDZ3 و pET-GCSF استفاده شد. پلاسمید pET-IDZ3، پلاسمید pET21 حاوی ژن رمز کننده ایمونوتوکسین اونتاک است که از ترکیب دو ژن توکسین دیفتری ناقص (فاقد دومین اتصالی به گیرنده‌های خود در سطح سلول گیرنده) و

اینترلوکین ۲ تشکیل شده است(۱۵). پلاسمید pET-GCSF نیز پلاسمید pET23 حاوی ژن رمز کننده فاکتور محرک رشد کلنی-گرانولوسیت است(۱۶). هر دو پلاسمید تأمین کننده دو جز تشکیل دهنده ایمونوتوکسین نوترکیب (توکسین دیفتری ناقص وفاکتور محرک رشد کلنی-گرانولوسیت) می‌باشند. به منظور تکثیر ژن مورد نظر و نیز افزودن سایت‌های برشی آنزیم‌های محدود کننده، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد.

طراحی پرایمر به منظور تکثیر ژن توکسین دیفتری ناقص

در راستای تکثیر ژن توکسین دیفتری ناقص موجود در قطعه‌ی ژن IDZ3 که در پلاسمید pET-IDZ3 همسانه سازی شده بود، جایگاه برش *NdeI* در پرایمر بالادست، طراحی شد. هم‌چنین به منظور خارج کردن ژن توکسین دیفتری از قطعه ژنی IDZ3 ، پرایمرهای بالادست و پایین دست به گونه‌ای طراحی شدند که ژن اینترلوکین ۲ از آن حذف گشته و فقط ژن توکسین دیفتری ناقص (که فاقد دومین اتصالی می‌باشد) قابل تکثیر باشد. بنابراین، پرایمر پایین دست به گونه‌ای طراحی شد که قابلیت شناسایی انتهای ژن توکسین دیفتری ناقص را داشته باشد، به این ترتیب اینترلوکین ۲ قابل حذف می‌باشد. در پرایمر پایین دست توالی آمینو اسید هیستیدین به عنوان واسط پپتیدی تعبیه گشت(جدول ۱).

جدول ۱. ترادف پرایمرهای طراحی شده به منظور تکثیر ژن DT ناقص.(جایگاه برش آنزیم *NdeI* بـه صـورت رنگـی ابتـدای پرایمـر بالادست و ترادف مورد نظر برای انجام Soeing PCR که حاوی ترادف لینکر هیستیدین است به صورت زیر خط، ابتدای پرایمر پـایین دست نشان داده شده است).

نام پرایمر	ترادف	اندازه
F-DT192	5′-GAGT**CATATG**CATCATCATCATCACCACGGTGCTGACGACGTTG-3′	44 bp
R-DT192	5′- GGTGT**ATG**CGTTTTGTGACCCGGAGAGTAAGC -3′	32bp

طراحی پرایمر به منظور تکثیر ژن فاکتور محرک رشد کلنی-گرانولوسیت

به منظور تکثیر ژن G-CSF موجود در پلاسمید pET-GCSF ، باتوجه به این که ژن مربوط به فاکتور محرک رشد کلنی-گرانولوسیت در c- ترمینال ایمونوتوکسین قرار می‌گیرد، جایگاه برش آنزیمی *XhoI* در پرایمر پایین دست تعبیه شد(جدول ۲).

بعد از تکثیر قطعات، هر دو قطعه ژنی توسط آنزیم‌های *XhoI* و *NdeI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفته و سپس توسط ژل آگارز و کیت مربوطه تخلیص شدند.

جدول ۲. ترادف پرایمرهای طراحی شده به منظور تکثیر ژن G-CSF .(جایگاه برش آنزیم *XhoI* به صورت رنگی ابتدای پرایمـر پـایین دست و ترادف مورد نظر برای انجام Soeing PCR که حاوی ترادف لینکر هیستیدین است به صورت زیر خط، ابتدای پرایمر بالا دسـت نشان داده شده است).

نام پرایمر	ترادف	اندازه
F-GF192	5′- TCACAAAACG**CAT**ACACCCCTAGGCCCTGCCAGCTC -3′	36 bp
R-GF192	5′- CAGTG**CTCGAG**TTAGGGCTGGGCAAGGTGGCGTAG -3′	35 bp

انتخاب پرایمر مناسب جهت اتصال دو ژن DT و GCSF با استفاده از soeing PCR

با قرار گرفتن جایگاه برش آنزیمی *NdeI* در ابتدای ژن DT و *XhoI* در انتهای ژن G-CSF، ایمونوتوکسین نوترکیب DT-GCSF حاوی دو جایگاه برش آنزیمی *NdeI* و *XhoI* به ترتیب در ابتدا و انتهای ژن می‌باشد. جایگاه برش *NdeI* درپرایمر بالادست و جایگاه برش *XhoI* در پرایمر پایین دست طراحی شد(جدول ۳).

جدول ۳. ترادف پرایمرهای طراحی شده به منظور تکثیر ژن DT-GCSF. (جایگاه برش آنزیم هـای *NdeI* و *XhoI* بـه صـورت رنگـی ابتدای پرایمرهای بالا دست و پایین دست نشان داده شده است).

نام پرایمر	ترادف	اندازه
F-DT192	5/-GAGT**CATATG**CATCATCATCATCACCACGGTGCTGACGACGTTG-3/	44bp
R-GF192	5/- CAGTG**CTCGAG**TTAGGGCTGGGCAAGGTGGCGTAG -3/	35 bp

همسانه سازی ژن به رمز درآورنده DT-GCSF درون پلاسمید pET21a(+)

برای این منظور، ابتدا PCR با آنزیم پلی‌مراز Taq (شرکت فرمنتاس) صورت گرفت. با توجه به عدم قابلیت تصحیح آنزیم Taq، در ادامه کار PCR با آنزیم پلی‌مراز Pfu (شرکت بیونیر) انجام شد. هم‌چنین به منظور همسانه سازی ژن به رمز درآورنده DT-GCSF درون پلاسمید pET21a(+) ، هضم آنزیمی محصول PCR توسط دو آنزیم *NdeI* و *XhoI* (شرکت فرمنتاس) صورت گرفت و دو انتهای چسبنده در ژن ایجاد شد. پلاسمید نیز توسط این دو آنزیم خطی شده و انتهای چسبنده در دو طرف آن ایجاد گشت. پس از تخلیص ژن رمز کننده ایمونوتوکسین از روی ژل آگارز، قطعه مورد نظر در یک واکنش توسط آنزیم T4 لیگاز (شرکت فرمنتاس) به داخل پلاسمید بیانی انتقال یافت تا پلاسمید pET-DT-GCSF به دست آید. دو روند زیر جهت تأیید کلون انجام شد:

۱- هضم دو آنزیمی پلاسمید pET- DT-GCSF با استفاده از دو آنزیم *NdeI* و *XhoI* که بر اساس نقشه‌ی پلاسمیدی pET- DT-GCSF محصول این هضم آنزیمی، قطعه هیبریدی DT-GCSF با اندازه ۱۷۰۸ می‌باشد.

۲- تعیین ترادف ژنی با استفاده از پرایمرهای عمومی T7

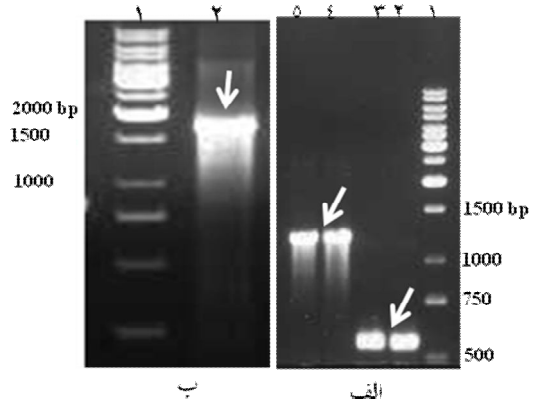
ارزیابی بیان قطعه ی هیبریدی

پس از ساخت سازه ژنی pET- DT-GCSF ، پلاسمید مربوطه به درون باکتری مستعد شده BL21(DE3) (با استفاده از کلریدکلسیم) انتقال یافت. در ادامه باکتری نوترکیب تولیدی در محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین رشد داده شد و القای بیان در OD۰/۷ با یک میلی‌مولار از IPTG (شرکت فرمنتاس) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انجام شد. در نهایت بررسی بیان پروتئین هیبریدی به منظور تایید و صحت طراحی و همسانه سازی ایمونوتوکسین نوترکیب به کمک روش SDS-PAGE و وسترن بلات انجام شد.

یافته‌ها

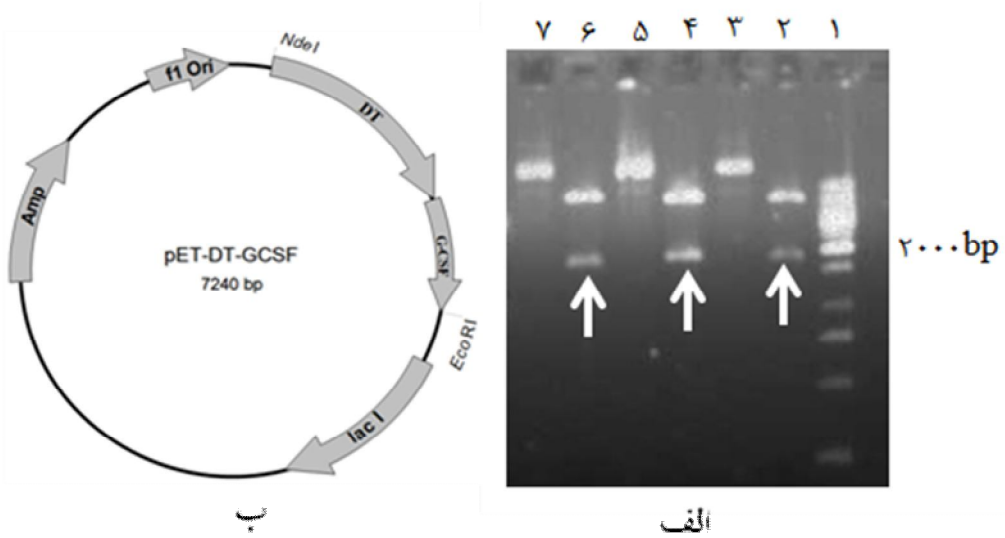
همسانه سازی و تولید سازه ژنی pET- DT-GCSF

پس از انجام واکنش PCR بر روی پلاسمیدهای pET-IDZ3 و pET-GCSF به منظور دست یابی به توالی ژنی DT و GCSF، PCR به ترتیب با استفاده از پرایمرهای F-DT192 ، R-DT192 ، F-GF192 و R-GF192 و آنزیم پلی‌مراز Pfu انجام شد و محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. تکثیر باند حدوداً ۱۱۶۷ جفت بازی و ۵۳۸ جفت بازی به ترتیب تأیید کننده تکثیر توالی‌های DT و G-CSF می‌باشد(شکل ۱، الف). با الحاق این دو قطعه ژنی توسط واکنش soeing PCR و با استفاده از پرایمرهای F-DT192 و R-GF192 و آنزیم پلی‌مراز Pfu، حضور باندی در حدود ۱۷۰۸جفت بازی بر روی ژل آگارز ۱ درصد تأیید کننده ی تکثیر توالی الحاقی جدید می‌باشد(شکل ۱، ب).



شکل ۱. الف- نتیجه الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آنزیم Pfu. ۱- نشان‌گر وزنیDNA (۱ کیلو بازی) ،۲ و ۳- قطعه تکثیر یافته G-CSF ، ۴ و ۵- قطعه تکثیر یافته DT. ب- نتیجه الکتروفورز محصول soeing PCR توسط آنزیم Pfu . ۱- نشان‌گر وزنیDNA (۱ کیلو بازی)، ۲-قطعه تکثیر یافته DT-GCSF.

به منظور زیرهمسانه سازی ژن به رمز درآورنده ایمونوتوکسین نوترکیب درون پلاسمید pET21، محصول soeing PCR و پلاسمید پایه pET21، با دو آنزیم محدودگر *NdeI* و *XhoI* برش و با آنزیم T4 لیگاز کلون گردید. در این مرحله سه کلونی انتخاب شد و به منظور تأیید کلون‌های حاصله، هضم دو آنزیم پلاسمید-pET-DT GCSF با استفاده از آنزیم‌های *XhoI* و *NdeI* که دارای جایگاه برش درون پلاسمید pET21 بوده ولی بر روی توالی ژن کلون شده جایگاه ندارند، انجام شد(شکل ۲، الف).

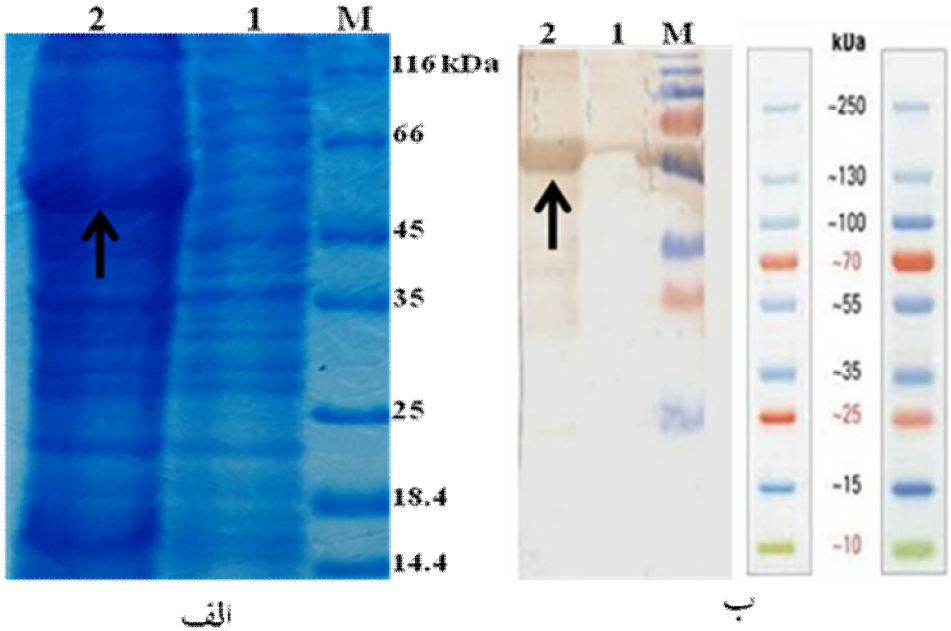


شکل۲. الف- نتیجه الکتروفورز استخراج پلاسمید از کلنی‌های حاصل از اتصال و هضم دوآنزیمی آن‌ها با آنزیم های NdeI و XhoI. ۱ - نشان‌گر وزنیDNA (۱Kbp).۲، ۴ و ۶-به ترتیب هضم دوآنزیمی کلنی های اول ، دوم و سوم . ۳، ۵ و ۷- پلاسمید های هضم نشده حاصل کلنی های اول، دوم و سوم. ب- نقشه پلاسمیدی pET-DT-GCSF .

بر اساس نقشه پلاسمید pET-DT-GCSF (شکل ۲، ب) خروج قطعه حدود ۱۷۰۸جفت بازی از هر سه کلون، نشانه‌ای بر تایید همسانه سازی می‌باشد(مجموع قطعه کلون شده حدود ۱۷۰۸جفت بازی و بدنه وکتور حدود۵۴۴۳ جفت بازی برش خورده می‌باشد). در نهایت نیز پلاسمید مربوطه به شرکت ژن فن‌آوران جهت انجام تعیین ترادف ژنی منتقل گردید که نتایج به دست آمده صحت سازه ژنی pET-DT-GCSF را نشان داد (نتایج ارائه نشده است).

بیان پروتئین هیبریدیDT-GCSF

بعد از تأیید مولکولی سازه ژنی ساخته شده، پلاسمید pET-DT-GCSF به درون باکتری BL21(DE3) انتقال یافته و القا شد. بررسی بیان پروتئین در زمان‌های صفر و ۴ ساعت بعد از القا با استفاده از SDS-PAGE صورت گرفت که مشاهده باند حدود ۶۴ کیلو دالتونی تایید کننده بیان مناسب ایمونوتوکسین نوترکیب DT-GCSF می‌باشد(شکل۳، الف). با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی برعلیه دنباله هیستیدین و وسترن بلات، تولید پروتئین هیبریدی مورد تایید نهایی قرار گرفت(شکل۳، ب).



شکل۳. بررسی بیان پروتئین DT-GCSF با استفاده از روشSDS-PAGE (الف) و وسترن بلات (ب). باکتری نوترکیب قبل از القاء (۱) و ۴ ساعت پس از القاء (۲)، نشان‌گر پروتئینی (M).

بحث

تکثیر، تمایز و زنده ماندن سلول‌های خون‌ساز، تحت اثر یک مجموعه پروتئینی تحت عنوان فاکتور محرک کلنی (CSF) می‌باشد. از مهم‌ترین تیپ‌های CSF می‌توان به M-CSF (ماکروفاژ) ، G-CSF (گرانولوسیت) ،GM-CSF (گرانولوسیت-ماکروفاژ) و IL-3 (اینترلوکین ۳) اشاره نمود که هر یک واجد اثر تحریکی منحصر به فرد بر روی سلول‌های اجدادی مغز قرمز استخوان می‌باشد. هم‌چنین گیرنده‌های این نوع سیتوکین‌ها به مقدار زیادی برروی سطح سلول‌های سرطانی مرتبط با خون نیز بیان می‌شوند. به طوری که در انواع لوکمیا نظیر ANL ، ALL و AML بیان این گیرنده‌ها مشاهده می‌شود(۱۹-۱۷). در خصوص برخی دیگر از سرطان‌ها نظیر سرطان مثانه و روده بزرگ نیز بیان گیرنده G-CSF بر روی سطح سلول سرطانی گزارش شده است(۲۲-۲۰). براین اساس، گیرنده‌های مذکور هدفی را برای شناسایی سلول‌های سرطانی در پیش روی محققان و تولید کنندگان دارویی فراهم می‌سازند و ایمونوتوکسین‌های زیادی بر اساس سیتوکین‌ها در حال تحقیق و توسعه می‌باشند(۱۰، ۲۳، ۲۴).

از سوی دیگر، توکسین دیفتری با داشتن یک جایگاه برش برای آنزیم پروتئاز فیورین و نیز دارا بودن مکانیسم انتقال دومین آنزیمی (C) به سیتوزول و سمیت نسبتاً بالا، یکی از مهم‌ترین گزینه‌ها برای استفاده در ساخت ایمونوتوکسین‌ها می‌باشد. با جایگزین کردن دومین R (گیرندگی) این توکسین با لیگاندهای هدف گیری مختلف، ایمونوتوکسین‌های متعددی ساخته شده‌اند. کارآمدترین این ایمونوتوکسین‌ها حاوی ۳۸۸ آمینواسید انتهای N-ترمینال توکسین دیفتری (یعنی دومین‌های آنزیمی، C و انتقالی، T) هستند. این قطعه از توکسین دیفتری (که به نام DAB_{389} نیز خوانده می‌شود)، علاوه بر داشتن دو دومین C و T، توالی بین دومین T و R را نیز دارد که می‌تواند به عنوان یک واسط عمل کرده و قسمت هدف‌گیری ایمونوتوکسین را از بقیه مولکول جدا نگه دارد و موجب می‌شود این قسمت آزادی عمل بیشتری در اتصال به گیرنده‌اش داشته باشد. هم‌چنین جایگاهی برای عملکرد پروتئاز فیورین یوکاریوتی فراهم می‌سازد. فیورین یک سرین پروتئاز وابسته به کلسیم می‌باشد که بین غشای اندوزوم‌ها، ترانس گلژی و غشای سلولی جا به جا می‌شود. این پروتئاز در شکستن و فعال

کردن پیش سازهای بسیاری از پروتئین‌های سلولی نقش دارد و می‌تواند توالی‌های غنی از آرژینین را شناسایی کرده و بشکند(۲۵، ۲۶). بنابراین، با توجه به این که مسیر ورود ایمونوتوکسین‌ها به داخل سلول‌ها از طریق اتصال به سطح سلول وسپس ورود به اندوزوم می‌باشد، قسمت توکسینی ایمونوتوکسین باید از قسمت هدف‌گیری جدا شود تا بتواند فعال گردد، در نتیجه قرار گرفتن یک واسط پپتیدی قابل شکستن توسط فیورین، مابین دو بخش ایمونوتوکسینی، می‌تواند موجب این اتفاق شود.

در تحقیق حاضر با در نظر گرفتن ساختار ایمونوتوکسین تجاری شده دینلوکین دیفتیتوکس یا اونتاک (DT_{389}-IL2)، پروتئین هیبریدی DT_{389}-GCSF طراحی گردید. ایمونوتوکسین مورد نظر یک فیوژن پروتئین است که از دو بخش شامل توکسین دیفتری (که از آمینواسید متیونین آغاز شده و به ترئونین ۳۸۸ختم می‌شود، DAB_{389}) و فاکتور محرک رشد کلنی-گرانولوسیت انسانی (که از آمینواسید ترئونین آغاز شده و به پرولین ۱۷۴ ختم می‌شود) تشکیل شده است. این دو قطعه ژنی توسط یک آمینواسید هیستیدینی به عنوان واسط پپتیدی به همدیگر اتصال یافته‌اند که مشابه ایمنوتوکسین اونتاک است. علیرغم آن که یک واسط پپتیدی مناسب برای ایمونوتوکسین‌ها باید در داخل سلول قابل شکستن باشد، نباید قبل از ورود به سلول شکسته شود و نیز باید بتواند دو بخش ایمونوتوکسین را از هم جدا نگه‌دارد تا در عملکرد دو جزء پروتئینی تداخل ایجاد نشود. از این رو، هیستیدین در این قسمت نقش واسط را دارد تا دو جزء پروتئینی از هم جدا مانده و تاخوردگی بر روی همدیگر نداشته باشند، با این وجود برش توسط پروتئاز فیورین و بر مبنای ترادف موجود در DAB_{389} (مشابه ایمونوتوکسین اونتاک) صورت می‌گیرد(۲۷، ۲۸).

نتیجه گیری

استفاده از سیتوکین‌ها در طراحی ایمونوتوکسین‌ها از استراتژی‌های جدیدی است که سبب افزایش کاربرد ایمونوتوکسین‌ها در درمان سرطان‌های مختلف شده است. چراکه با هدف‌گذاری سلول‌های سرطانی حاوی گیرنده‌های این سیتوکین‌ها، امکان مرگ سلولی منطقه‌ای را برای آن فراهم می‌کند. در تحقیق حاضر، به منظور کنترل سرطان‌هایی که در آن سطح گیرنده‌های G-CSF بر روی آن‌ها افزایش می‌یابد، یک ایمونوتوکسین مناسب -DT_{389}) (GCSF طراحی گردید که می‌تواند راه‌کارهای جدیدی را برای توسعه داروهای هوش‌مند و هدف‌مند به منظور مقابله با سلول‌های سرطانی فراهم نماید.

تشکر و قدردانی

طرح فوق در پژوهشکده علوم و فن‌آوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر انجام گرفته است و بودجه آزمایشات فوق توسط این دانشگاه تأمین شده است. بدین وسیله نویسندگان از زحمات مسئولان این دانشگاه تشکر و سپاس گزاری می نمایند.

منابع

1. Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. Nature Reviews Drug Discovery. 2008; 7(1):21-39.
2. Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin treatment of cancer*. Annu Rev Med. 2007; 58: 221-37.
3. Pennell CA, Erickson HA. Designing immunotoxins for cancer therapy. Immunologic research. 2002; 25(2):177-91.
4. Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin therapy of cancer. Nature Reviews Cancer. 2006; 6(7):559-65.
5. Kawakami K, Nakajima O, Morishita R, Nagai R. Targeted anticancer immunotoxins and cytotoxic agents with direct killing moieties. The Scientific World Journal. 2006; 6: 781-90.
6. Kreitman R. Recombinant toxins for the treatment of cancer. Current opinion in molecular therapeutics. 2003; 5(1):44-51.
7. Bachran C, Sutherland M, Bachran D, Fuchs H. Patents on immunotoxins and chimeric toxins for the treatment of cancer. Recent patents on drug delivery & formulation. 2007; 1(2): 105-15.

8. Kawakami K, Aggarwal BB, Puri RK. Cytotoxins and immunotoxins for cancer therapy, clinical applications. CRC Press; 2005.
9. Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy. The AAPS journal. 2006; 8(3): E532-E51.
10. Kreitman RJ, Pastan I. Recombinant toxins containing human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and either pseudomonas exotoxin or diphtheria toxin kill gastrointestinal cancer and leukemia cells. Blood. 1997; 90(1):252-9.
11. Choe S, Bennett MJ, Fujii G, Curmi PM, Kantardjieff KA, Collier RJ, et al. The crystal structure of diphtheria toxin. 1992; 357:216-22.
12. 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.
13. Christopher MJ, Rao M, Liu F, Woloszynek JR, Link DC. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. The Journal of experimental medicine. 2011; 208(2):251-60.
14. 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):1004-13.
15. Amraei M, Zeinoddini M, Soleimani M, Saeedinia AR. Cloning, expression, purification and toxicity assessment of diphtheria toxin-interleukin 2 fusion protein. J. Police Med. 2015; 4 (2) :105-13. (Persian)
16. 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):131-4.
17. Horita H, Frankel AE, Thorburn A. Acute myeloid leukemia-targeted toxin activates both apoptotic and necroptotic death mechanisms. PLoS ONE. 2008; 3(12):e3909-10.
18. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. Blood. 1991; 78(11):2791-808.
19. Park LS, Waldron PE, Friend D, Sassenfeld HM, Price V, Anderson D, et al. Interleukin-3, GM-CSF, and G-CSF receptor expression on cell lines and primary leukemia cells: receptor heterogeneity and relationship to growth factor responsiveness. Blood. 1989; 74(1):56-65.
20. Testa U, Riccioni R, Diverio D, Rossini A, Coco FL, Peschle C. Interleukin-3 receptor in acute leukemia. Leukemia. 2004; 18(2):219-26.
21. Tachibana M, Miyakawa A, Uchida A, Murai M, Eguchi K, Nakamura K, et al. Granulocyte colony-stimulating factor receptor expression on human transitional cell carcinoma of the bladder. British journal of cancer. 1997; 75(10): 1489-90.
22. Yang X, Liu F, Xu Z, Chen C, Wu X, Li G, et al. Expression of granulocyte colony stimulating factor receptor in human colorectal cancer. Postgraduate medical journal. 2005; 81(955): 333-7.
23. Roudkenar MH, Bouzari S, Kuwahara Y, Roushandeh AM, Oloomi M, Fukumoto M. Recombinant hybrid protein, Shiga toxin and granulocyte macrophage colony stimulating factor effectively induce apoptosis of colon cancer cells. World journal of gastroenterology. 2006; 12(15):2341-4.
24. Black J, McCubrey J, Willingham M, Ramage J, Hogge D, Frankel A. Diphtheria toxin-interleukin-3 fusion protein (DT388IL3) prolongs disease-free survival of leukemic immunocompromised mice. Leukemia. 2003; 17(1):155-9.
25. Mitamura T, Umata T, Nakano F, Shishido Y, Toyoda T, Itai A, et al. Structure-function analysis of the diphtheria toxin receptor toxin binding site by site-directed mutagenesis. Journal of Biological Chemistry. 1997; 272(43): 27084-90.
26. Tsuneoka M, Nakayama K, Hatsuzawa K, Komada M, Kitamura N, Mekada E. Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. Journal of Biological Chemistry. 1993; 268(35):26461-5.
27. Manoukian G, Hagemeister F. Denileukin diftitox: a novel immunotoxin. Expert opinion on biological therapy. 2009; 9(11):1445-51.
28. Kaminetzky D, Hymes KB. Denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. Biologics. 2008; 2(4):717-24.