مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۵۵/هفته سوم آذر ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۱

بهینه‌سازی تولید یک آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه علیه گیرنده‌ی لپتین و CD4 انسانی و بررسی خواص آن

لیلا ممجدی[۱]، دکتر سید حمید زرکش اصفهانی[۲]، دکتر محمد ربانی[۲]، دکتر رحمان امامزاده[۳]، فروزان صفری[۱]، دکتر آرش بابایی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: نقص در لپتین و یا گیرنده‌ی آن، اثر محافظتی در ابتلا به بیماری‌های خودایمن دارد؛ اما از آن جایی که لپتین روی سلول‌های بسیاری دارای گیرنده است، مسدود کردن همه‌ی آن‌ها عواقبی را به دنبال خواهد داشت. بنا بر این، آنتاگونیست لپتین در فرم قطعه‌ای آنتی‌بادی با ویژگی دوگانه (taFv) علیه CD4 و گیرنده‌ی لپتین ObR، از طریق هدف قرار دادن ObR فقط بر روی سلول‌های T، دارای پتانسیل درمانی برای چنین بیماری‌هایی است. این پژوهش با هدف افزایش بیان taFv مذکور انجام شد.

روش‌ها: قطعه‌ی ژنی taFv، از وکتور pAB1 به وکتور pET32a ساب‌کلون شد. واکنش PCR (Polymerase chain reaction) به منظور تأیید ورود قطعه انجام گرفت. تأیید تولید پروتئین با روش‌های Dot blot، SDS PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) و Western blot انجام گرفت. تأثیر شرایط مختلف محیطی شامل محیط کشت، سویه‌ی باکتریایی، دما و غلظت IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) بر روی بیان از طریق ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) آزمایش شد. در نهایت، خاصیت زیستی پروتئین تولید شده به روش فلوسایتومتری بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج PCR، حضور taFv را در پلاسمیدهای ساب‌کلون شده تأیید کرد. آزمایش‌های Dot blot، به وضوح افزایش بیان پروتئین را در مقایسه با وکتور قبلی و آزمایش ELISA، محیط سوربیتول‌دار، دمای ۱۸ °C، سویه‌ی E. coli BL21 (Escherichia coli) و غلظت IPTG mM ۰/۰۵ را مناسب‌تر از سایر سطوح برای بیان پروتئین نشان داد. فلوسایتومتری قابلیت اتصال taFv تولید شده به حدود ۲۰ درصد از لنفوسیت‌ها را نشان داد.

نتیجه‌گیری: امکان تولید taFv به صورت نوترکیب با قابلیت اتصال به مولکول CD4 روی لنفوسیت‌های انسان وجود دارد. همچنین، با بهینه‌سازی شرایط تولید، امکان افزایش تولید آن فراهم می‌شود.

واژگان کلیدی: لپتین، بیماری‌های خودایمن، بهینه‌سازی، آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه

ارجاع: ممجدی لیلا، زرکش اصفهانی سید حمید، ربانی محمد، امامزاده رحمان، صفری فروزان، بابایی آرش. **بهینه‌سازی تولید یک آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه علیه گیرنده‌ی لپتین و CD4 انسانی و بررسی خواص آن.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۵): ۱۷۴۰-۱۷۵۱

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سید حمید زرکش اصفهانی
Email: s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

مقدمه

لپتین هورمونی غیر گلیکوزیله با ۱۶۷ اسید آمینه (۱)، دارای ساختاری استوانه‌مانند، متشکل از ۴ زنجیره‌ی آلفای آنتی‌پارالل با اتصالات عرضی است، که نقش کلیدی در جذب و مصرف انرژی و یا به بیان دیگر، اشتها و متابولیسم دارد (۲). در پی غذا خوردن، سطح لپتین سرم افزایش می‌یابد که منجر به ارسال علامتی به سیستم اعصاب مرکزی (CNS یا Central nervous system)، مبنی بر کافی بودن انرژی می‌گردد که به دنبال آن، پاسخ به صورت کاهش اشتها و افزایش مصرف انرژی داده می‌شود تا از چاقی جلوگیری گردد (۳).

لپتین روی غدد آدرنال، هیپوفیز و هیپوتالاموس اثر می‌گذارد و یک هورمون چند منظوره است. علایم‌دهی گیرنده‌ی لپتین، نقش اساسی در رگ‌زایی، تومورزایی، میزان انسولین خون و دیابت نوع II، تشکیل استخوان، فشار خون، بلوغ جنسی و باروری بازی می‌کند (۳).

به طور عمده، از آدیپوسیت‌ها (بافت سفید چربی)، به تناسب حجم چربی بدن (۴، ۲)، و به میزان بسیار کمتر از سلول‌های اپی‌تلیال معده، اپی‌تلیال پستان، عضلات اسکلتی و جفت ترشح می‌شود. بیان لپتین، تحت تأثیر هورمون‌هاست. انسولین، ترشح لپتین را در طول تغذیه تحریک می‌کند؛ در حالی که در گرسنگی کاهش انسولین با کاهش لپتین همراه است. تستوسترون بیان لپتین را مهار می‌کند، اما هورمون‌های جنسی استروئیدی منجر به افزایش لپتین می‌گردند. میزان لپتین سرمی با میزان چربی ذخیره شده در بدن ارتباط مستقیم دارد (۵). گیرنده‌ی لپتین (ObR) با ژن db بیان می‌شود و ۶ ایزوفرم از آن وجود دارد (۶، ۲).

اختلال در بیان ژن لپتین (ob) یا اختلال در گیرنده‌ی آن (db) و یا نقص در مسیرهای پیام‌رسانی درون سلولی، پیامدهایی نظیر اشتیاق پایدار به غذا و چاقی مفرط را در پی دارد (۷). از جمله اثرات مهم لپتین، اثر آن روی سیستم ایمنی است. موش‌های ob/ob یا db/db (که به ترتیب دچار نقص در تولید هورمون و یا گیرنده‌ی آن می‌باشند)، نه تنها چاق هستند، بلکه در عملکرد فعالیت‌های جنسی، سطح هورمونی، ترمیم زخم، ساختمان استخوانی و عملکرد سیستم ایمنی هم، غیر طبیعی می‌باشند (۸). همچنین، متحمل آتروفی تیموس و کاهش تعداد لنفوسیت‌ها هستند (۹). این موش‌ها دچار نقص در ایمنی سلولی و هومورال هستند (۱۰).

موش‌های دچار نقص لپتین، به القای دو نوع EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis) فعال و اکتسابی (مدل حیوانی بیماری مولتیپل اسکلروزیس) مقاومت دارند که این مقاومت با تجویز لپتین قابل برگشت است و می‌توان آن‌ها را بدین طریق حساس نمود. در این بازگشت، پاسخ‌های نوع Th_2 (T helper$_2$) به Th_1 و IgG_1 (Immunoglobulin G_1) به IgG_{2a} سوئیچ می‌شود. سلول‌های T، $CD4^+$ موش که تحت تأثیر آنتاگونیست‌های لپتین قرار گرفتند، یک کاهش حساسیت نسبت به پپتید عامل القای EAE از خود نشان دادند (۱۱). در نتیجه، با ایجاد آنتاگونیستی برای ممانعت از عمل لپتین بر سلول‌ها، تا حد زیادی می‌توان بیماری‌های خود ایمن را از بین برد. این کار با ایجاد Ab (Antibody) کامل یا مشتقات آن مثل ScFv علیه لپتین، گیرنده‌اش و یا مسیر داخل سلولی

(JAK2 و فسفوتیروزین کیناز)، امکان پذیر است که البته به کار بردن Ab علیه مورد آخر، با توجه به گستردگی مسیر JAK/STAT (Janus kinase/ Signal transducer and activator of transcription) باعث اختلالات عمده در عملکرد سلول می‌شود (۱۲).

آنتی‌بادی‌ها، به خصوص در فرم‌های مهندسی شده، ابزارهای قدرتمندی برای شناسایی، تشخیص و درمان هستند (۱۳).

از معایب تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری‌ها، فقدان سیستم‌های قندگذاری و عدم وجود سیستم‌های تولید و ترشح مشابه سلول‌های پستانداران است. کوچک کردن Ab، تنها از طریق تولید قسمت‌های عملکردی آن (یا تولید قسمت‌های Variable سنگین و سبک) تا حدی این مشکل را برطرف می‌کند؛ یعنی به جای تولید آنتی‌بادی کامل، قطعات Ab مثل Fab، ScFv، SdAb (Nanobody) تولید شود. ScFv از اتصال دومین‌های متغیر زنجیره‌ی سنگین و سبک (V_H و V_L)، با پپتید قابل انعطاف تشکیل شده است. این قطعات، ضمن حفظ خاصیت اتصال به آنتی‌ژن (Ag یا Antigen) می‌توانند به سهولت در سلول‌های باکتری تولید شوند (۱۴) و چون گلیکوزیلاسیون Abها در زنجیره‌ی ثابت سنگین (C_H یا $Chain_{Heavy}$) انجام می‌شود، تولید قطعات مزبور نیاز به گلیکوزیلاسیون هم ندارد (۱۵).

از آن جایی که لپتین هورمون چند منظوره و دارای نقش‌های متعدد است، به منظور مسدود کردن گیرنده‌ی لپتین فقط بر روی لنفوسیت‌های T، قطعه‌ای آنتی‌بادی (taFv یا scFv یا Tandem single chain fragment variable) با اختصاصیت دوگانه از طریق اتصال دو scFv به کمک پپتید حد واصل طراحی شده است. جایگاه اتصال یک سمت از این آنتی‌بادی، گیرنده‌ی هورمون لپتین است که به عنوان آنتاگونیست گیرنده عمل می‌کند و سمت دیگر، قادر به اتصال به CD4 لنفوسیت‌های انسانی می‌باشد. با اتصال این taFv هم‌زمان به دو جایگاه پیش‌گفته، هدف اصلی که مسدود کردن گیرنده‌ی لپتین فقط بر روی لنفوسیت‌های T است، صورت می‌گیرد (۱۶). هدف از این مطالعه، افزایش تولید taFv بود.

روش‌ها

برای دست‌یابی به بیان مناسب که هدف این مطالعه بود، قطعه‌ی taFv از وکتور pAB1 (دارای اپران و پروموتر lac و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین) همراه قطعه‌ی pel B (توالی رهبر که باعث هدایت پروتئین به فضای پری‌پلاسمی می‌شود) به وکتور pET32a انتقال داده شد. وکتور pET32a، دارای پروموتر T7، اپران lac، دنباله‌ی His (به منظور ردیابی پروتئین توسط آنتی‌بادی و خالص‌سازی)، دنباله‌ی Trx (به منظور محلول ساختن پروتئین) و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بود. به منظور ساب‌کلون، هر دو وکتور مبدأ (pAB1) و هدف (pET32a) با آنزیم‌های NotI و HindIII در واکنش Double digest بریده شد و پس از استخراج از ژل قطعه‌ی taFv (همراه با قطعه‌ی pel B چسبیده به آن)، واکنش الحاق بین قطعه و وکتور هدف با کمک آنزیم DNA لیگاز T4 صورت گرفت.

همچنین، برای بررسی خود الحاقی وکتور هدف، انکوباسیون وکتور هدف و آنزیم DNA لیگاز T4، بدون قطعه‌ی taFv، نیز انجام شد. سلول‌های

E. coli TOP 10 (Escherichia coli) بـا روش $CaCl_2$ و شـوک حرارتـی (بـر اسـاس پروتکـل Sambrook) مستعد پذیرفتن پلاسمید شـدند. سـپس، با محصول واکنش الحاق و خود الحاقی، ترانسفورم و در محـیط LB (Luria broth) آگـار حـاوی ۱۰۰ µg/mg آمپی‌سیلین کشـت داده شـدند. بـر روی محصول واکنش الحاق، پس از اسـتخراج پلاسـمید (از طریق کیت شرکت فرمنتاز)، به منظـور تأییـد دریافـت قطعـه‌ی taFv، بـا کمـک پرایمرهـای عمـومی pET (پرایمرهای T7) واکنش Polymerase chain reaction (PCR) انجام شد.

غلظـت مـواد موجـود در واکـنش PCR شـامل ۲/۵ µl بـافر 10X PCR، ۰/۷۵ µl MgCl2، ۰/۵ µl dNTP (Deoxynucleoside triphosphate)، Forward primer و Reverse primer هـر کـدام ۰/۵ µl، ۰/۲ µl آنزیم pET32a دارای قطعه‌ی taFv و آب ۱۸/۲۵ µl بـود کـه تحـت برنامـه‌ی ۹۵ °C در ۳ دقیقـه، ۹۵ °C در ۱ دقیقـه، ۵۷ °C در ۱ دقیقـه، ۷۲ °C در ۲/۴ دقیقـه، ۷۲ °C در ۳ دقیقـه و در ۳۰ چرخه انجام گرفت. بررسی محصول نهـایی PCR از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز، رنگ‌آمیزی بـا اتیدیوم برمایـد و مشـاهده‌ی آن بـا نشـانگر ۱ kb در دستگاه Gel documentation انجام شد.

پـس از تأییـد ایجـاد پلاسـمید نوترکیـب حـاوی قطعه‌ی taFv، شرایط برای بیـان آمـاده شـد. بـه ایـن ترتیب که چند کلونی از باکتری‌هـای E. coli BL21، JM109 و Origami ترانسـفورم شـده بـا پلاسـمید نوترکیـب، در ۵ ml محـیط LB مـایع حـاوی ۱۰۰ µg/mg آمپی‌سیلین، در دمای ۳۷ °C و انکوباتور شیکردار کشت شـبانه داده شـدند. سـپس ۱۵۰ µl از این محیط به ۱۵ ml محیط کشت جدید (نسبت ۱ بـه ۱۰۰)، حـاوی ۱۰۰ µg/ml آمپـی‌سـیلین اضـافه و در دمای ۳۷ °C و انکوباتور Shakerدار با دور ۱۸۰ rpm تا زمانی که OD (Optical density) به ۰/۸–۶ (ابتدای مرحلـه‌ی لگـاریتمی) برسـد، انکوبـه و سـپس ۱ mM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) اضافه و در دمای ۲۳ °C و انکوباتور شیکردار بـا دور ۱۸۰ rpm، بـه مـدت ۲۰–۱۸ سـاعت بـار دیگـر انکوبه شد.

به منظور بررسی حضور پروتئین، اقدام بـه جداسـازی عصاره‌های پری‌پلاسم و سیتوپلاسم شد. برای دست‌یـابی به عصاره‌ی پری‌پلاسم، از شیب سوکروز یعنی بـافر ۱x و $\frac{1}{5}$x TES (۲۰ درصـد Sucrose، ۱ mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)، ۲۰ mM Tris-HCl) و برای دست‌یابی بـه عصـاره‌ی سیتوپلاسـمی از امـواج اولتراسوند (Hielscher, Germany)، استفاده شد.

بـه منظـور بررسـی حضـور پـروتئین بـه کمـک آنتـی‌بـادی Anti-His tag (Sigma-Aldrich)، از عصاره‌های پری‌پلاسم و سیتوپلاسم استخراج شده در SDS PAGE اسـتفاده شـد و پـس از آن، Dot blot (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) و Western blot نیز انجام گرفت.

برای مشـخص کـردن تـأثیر شـرایط محیطـی، ۱۸ آزمایش طراحی شده توسط نرم‌افزار Minitab ۱۶، بـا سه بار تکرار انجام شد. سپس نمونه‌هـا بـا اسـتفاده از روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).

به منظور خالص‌سـازی از سـویه‌ای کـه بیشـترین تولید را داشـت، E. coli BL21، ۲۰۰ ml در شـرایط

هـوادهی بـالا کشـت و عصـاره‌هـای پـری‌پلاسـم و سیتوپلاسم باکتری‌ها پس از استحصال، طبق پروتکـل شرکت اینویتروژن از ستون نیکل عبور داده شد.

خاصیت زیسـتی، از طریـق بررسـی اتصـال taFv خالص شده به CD4 سـطح لنفوسـیت‌هـا بـه کمـک آنتی‌بادی‌های Mouse anti His-Tag Ab، آنتـی‌بـادی شاهد ایزوتایـپ (Amersham)، Anti-mouse FITC (Anti-mouse fluorescein isothiocyanate) (abcam) و Anti-human CD4 FITC (CMG) از طریق تکنیک فلوسایتومتری سنجش شد.

به طور خلاصه، لنفوسیت‌هـا و taFv همـراه Mouse anti His-Tag Ab یا آنتی‌بـادی شـاهد ایزوتایـپ، در ابتدا و سپس همراه Anti-mouse FITC (abcam) در دو لوله‌ی مجزا و در لولـه‌ی دیگـر بـه عنـوان شـاهد مثبت لنفوسیت‌ها بدون حضـور taFv، بـا آنتـی‌بـادی تجـاری Anti-human CD4 FITC (CMG) یـا (Cyto Matin Gene) بـه مـدت ۳۰ دقیقـه در اتـاق تاریک انکوبه شدند. نمونه‌ها پس از شستشو بـا PBS (Phosphate-buffered saline)، از طریـق دسـتگاه فلوسایتومتری (Partec PAS, Germany) آنالیز شد.

جدول ۱. ۱۸ آزمایش طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار Miniteb ۱۶

Strain	Media	Tem (°C)	[IPTG] M
BL21	TB	۱۸	۰/۰۵
Origami	TB	۲۳	۰/۱۰
JM109	TB	۳۰	۱/۰۰
BL21	LB sorbitol	۱۸	۰/۱۰
Origami	LB sorbitol	۲۳	۱/۰۰
JM109	LB sorbitol	۳۰	۰/۰۵
Origami	SB sorbitol	۱۸	۰/۰۵
JM109	SB sorbitol	۲۳	۰/۱۰
BL21	SB sorbitol	۳۰	۱/۰۰
JM109	LB glycine-triton x-100	۱۸	۱/۰۰
BL21	LB glycine-triton x-100	۲۳	۰/۰۵
Origami	LB glycine-triton x-100	۳۰	۰/۱۰
Origami	SB glycine-triton x-100	۱۸	۱/۰۰
JM109	SB glycine-triton x-100	۲۳	۰/۰۵
BL21	SB glycine-triton x-100	۳۰	۰/۱۰
JM109	TB ethanol	۱۸	۰/۱۰
BL21	TB ethanol	۲۳	۱/۰۰
Origami	TB ethanol	۳۰	۰/۰۵

TB: محیط TB حاوی گلیسرول ۰/۶ M، LBs: محیط LB حاوی سوربیتول ۰/۵ M، SBs: محیط SB حاوی سوربیتول ۰/۵ M، LBg.t: محیط LB حاوی گلایسین و تریتون ۱۰۰– x هر کدام ۱ درصد، SBg.t: محیط SB حاوی گلایسین و تریتون ۱۰۰– x هر کدام ۱ درصد، TB ethanol: محیط TB که علاوه بر گلیسرول ۰/۶ M، حاوی اتانول ۳ درصد نیز بود.

جدول ۲. آماده‌سازی (تیمار) سلول‌های لنفوسیت با آنتی‌ژن و آنتی‌بادی

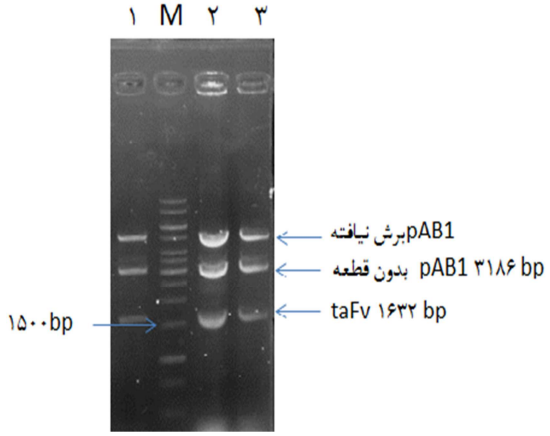
	شماره لوله	مرحله‌ی اول		مرحله‌ی دوم	مرحله‌ی سوم
		لنفوسیت	آنتی‌ژن	آنتی‌بادی اولیه	آنتی‌بادی اولیه/ ثانویه کانجوگه با FITC
اتوفلورسنت	۱	+	taFv	–	–
نمونه‌ی اصلی	۲	+	taFv	Mouse anti His-Tag Ab	Anti-mouse FITC
ایزوتایپ شاهد	۳	+	taFv	آنتی‌بادی شاهد ایزوتایپ	Anti-mouse FITC
شاهد FITC	۴	+	taFv	–	Anti-mouse FITC
شاهد مثبت	۵	+	–	–	Anti-human CD4 FITC

FITC: Fluorescein isothiocyanate

به منظور بررسی خاصیت زیستی، اتصال taFv خالص شده به CD4 سطح لنفوسیت‌ها به کمک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق جدول ۲، لوله‌ی شماره‌ی ۱ فقط دارای لنفوسیت و taFv و به عنوان اتوفلورسنت انتخاب شد. آماده‌سازی سایر لوله‌ها بدین ترتیب بود: در مرحله‌ی اول انکوباسیون، بر روی لنفوسیت‌های لوله‌های شماره‌ی ۲ تا ۴ که به ترتیب، نمونه‌ی اصلی، شاهد ایزوتایپ و شاهد FITC بود؛ taFv، در مرحله‌ی دوم انکوباسیون به لوله‌ی شماره‌ی ۲ Mouse anti His- Tag Ab و به لوله‌ی شماره‌ی ۳ آنتی‌بادی شاه ایزوتایپ (Amersham) و در مرحله‌ی سوم انکوباسیون، به لوله‌های شماره‌ی ۲، ۳ و ۴ Anti-mouse FITC (abcam) و به لوله‌ی شماره‌ی ۵ که کنترل مثبت بود، Anti-human CD4 FITC (CMG) اضافه شد. تمام انکوباسیون‌ها به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ و در صورت داشتن ماده‌ی فلورسنت، در تاریکی انجام گرفت و بین تمام انکوباسیون‌ها و همچنین بعد از آخرین مرحله، شستشو با PBS، به صورت ۵ دقیقه سانتریفیوژ در ۴۰۰ g انجام شد (۱۷). میزان فلورسنت نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری (Partec PAS, Germany) آنالیز شد.

یافته‌ها

هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود کننده‌ی NotI و HindIII بر روی پلاسمید pAB1، خروج قطعه‌ی taFv ۱۶۳۲ bp همراه با pelB را نشان داد (شکل ۱).



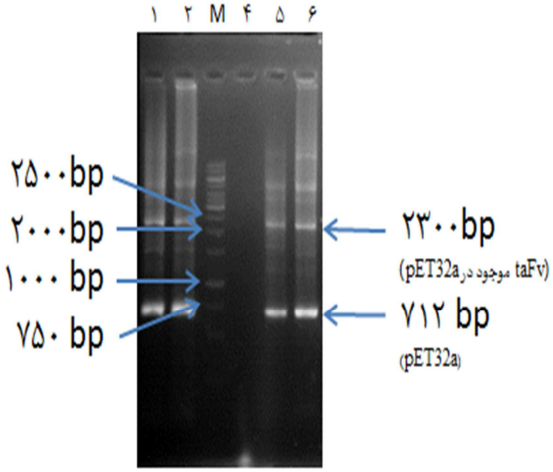
شکل ۱. هضم دوگانه‌ی آنزیمی پلاسمید pAB1 و خروج قطعه‌ی taFv

M، نشانگر kb ۱، چاهک‌های شماره‌ی ۱، ۲ و ۳ پلاسمید pAB1 برش یافته با آنزیم‌های محدود کننده‌ی NotI و HindIII (در بافرهای مختلف) می‌باشد. طول قطعه‌ی ژنی taFv، bp ۱۶۳۲ و طول باقی‌مانده‌ی پلاسمید pAB1، bp ۳۱۸۶ بود.

باکتری‌هایی که با پلاسمید نوترکیب (محصول الحاق pET32a و قطعه‌ی taFv) ترانسفورم شده بودند، تعداد زیاد کلونی و باکتری‌هایی که با پلاسمید Double digest pET32a شده (محصول واکنش

خودالحاقی) ترانسفورم شدند، ۳ کلونی بر روی پلیت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین تشکیل دادند.

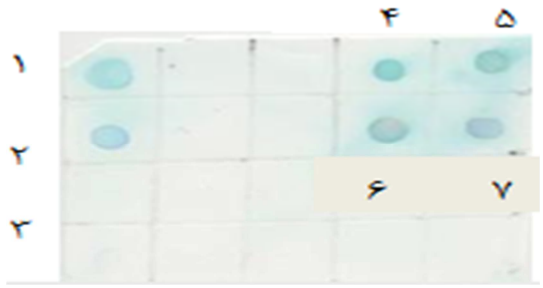
نتایج PCR به کمک پرایمرهای T7 بر روی پلاسمید نوترکیب استخراج شده، تکثیر قطعه‌ی ۲۳۰۰ bp (taFv و pelB) را نشان داد (شکل ۲).



شکل ۲. نتیجه‌ی واکنش Polymerase chain reaction (PCR) قطعه‌ی taFv موجود در pET32a. M، نشانگر kb ۱. چاهک‌های شماره‌ی ۱، ۲، ۵ و ۶ فقط در دمای Annealing تفاوت دارند. چاهک شماره‌ی ۳، شاهد منفی. قطعه‌ی bp ۲۳۳۷، taFv تکثیر شده در pET32a نوترکیب و قطعه‌ی bp ۷۱۲، pET32a تکثیر شده‌ی بدون قطعه، توسط پرایمرهای T7 را نشان می‌دهد.

نتایج Dot blot، بازگو کننده‌ی تولید پروتئین در تمام عصاره‌های پری‌پلاسم و سیتوپلاسم فقط در سویه‌ی E.coli BL21 بود (شکل ۳).

در Western blot و SDS PAGE، باند kDa ۷۸ مربوط به taFv ظاهر شد (شکل‌های ۴ و ۵).

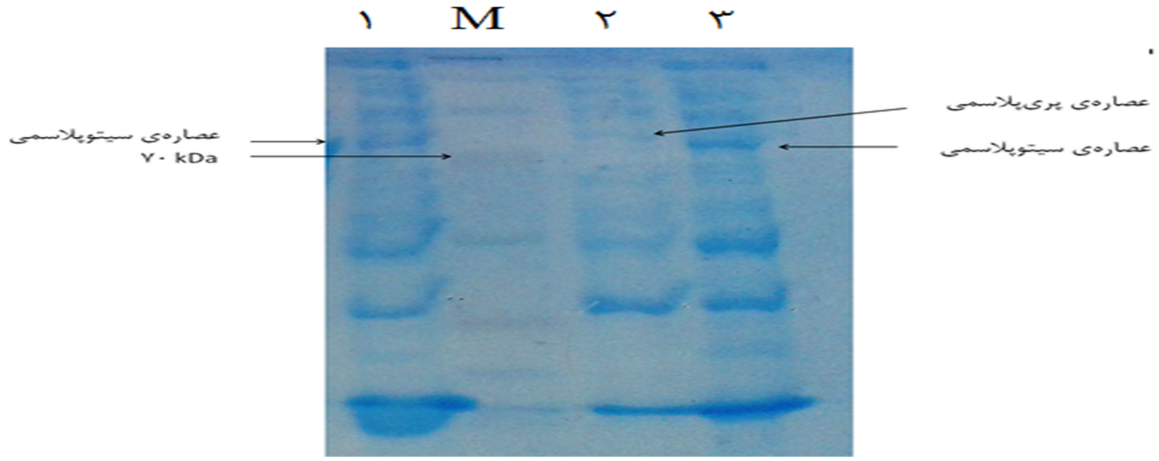


شکل ۳. نتایج حاصل از Dot blot عصاره‌ی سیتوپلاسمی و پری‌پلاسمی از طریق آنتی‌بادی Anti His- HRP

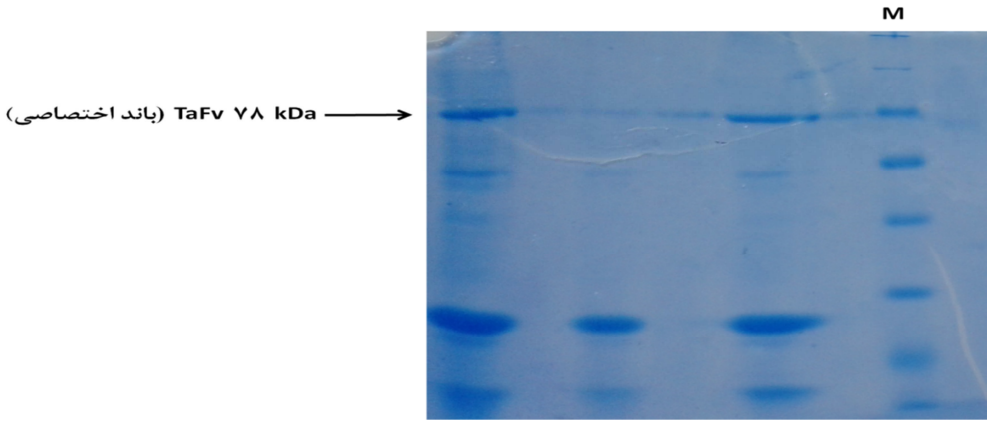
۱ و ۲) شاهد مثبت: پروتئین دیفنسین (دارای دنباله‌ی هیستیدین) تولید شده در وکتور pET 48b، ۳) شاهد منفی، ۴ و ۵) نمونه‌های پری‌پلاسمی و ۶ و ۷) نمونه‌های سیتوپلاسمی پروتئین taFv، تولید شده در Escherichia coli BL21 حامل وکتور pET32a نوترکیب. سایر خانه‌ها عصاره‌ی سیتوپلاسمی یا پری‌پلاسمی سویه‌های E.coli JM 109 و E.coli Origami حامل وکتور pET32a نوترکیب هستند (که با Dot blot به روش TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)، اثر حضور پروتئین در آن‌ها مشاهده نشد.

شکل ۴. نمای Western blot

در Western blot با آنتی‌بادی Anti His- HRP. باند taFv ۷۸ kDa مشاهده می‌شود.



شکل ۵. تصویر SDS-PAGE (**Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis**) قبل از خالص‌سازی **M**) نشانگر رنگی پروتئین. شماره‌های ۱ و ۳) عصاره‌ی سیتوپلاسمی و ۲) عصاره‌ی پری‌پلاسمی **E. coli BL21** (**Escherichia coli**) حاوی وکتور **pET32a** نوترکیب. باند **taFv kDa** ۷۸ مشاهده می‌شود.



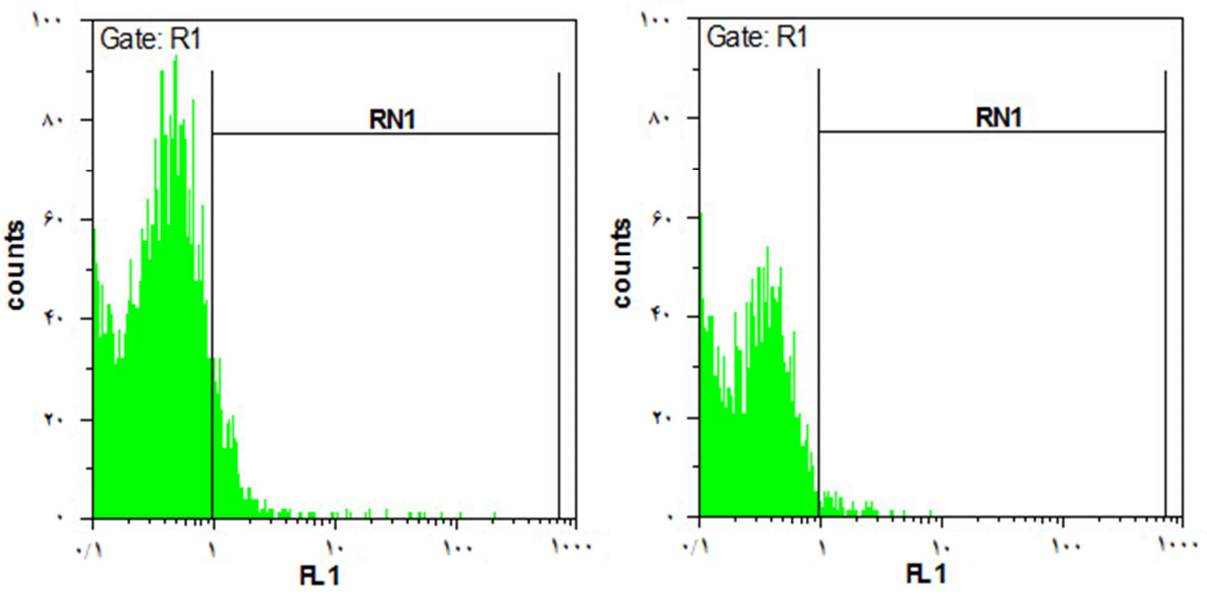
شکل ۶. SDS-PAGE (**Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis**) پس از خالص‌سازی. **M**) نشانگر باند **kDa** ۷۸ مربوط به **taFv** عبور داده شده از ستون نیکل است.

در SDS-PAGE پس از خالص‌سازی باند kDa ۷۸ی مربوط به taFv، قابل مشاهده است (شکل ۶).

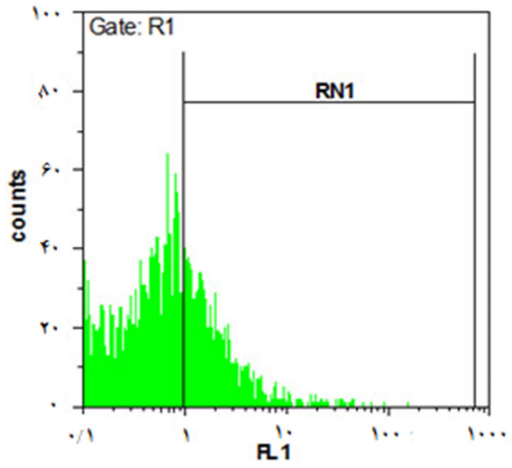
نتایج ELISA، سویه‌ی E. coli BL21، محیط کشت SB سوربیتول‌دار، دمای ۱۸ °C و غلظت IPTG ۰/۰۵ mM را بهترین شرایط برای تولید taFv نشان داد. غلظت taFv تولیدی با استفاده از آزمایش بردفورد، ۲۷ mg/ml تخمین زده شد. از نظر خاصیت زیستی در بیشترین حالت، taFv قادر به اتصال به ۲۲/۷۵ و آنتی‌بادی تجاری (Anti-human CD4 FITC) قادر به اتصال به ۲۷/۶۸ درصد از لنفوسیت‌ها نشان داده شد (شکل‌های ۷، ۸ و ۹).

بحث

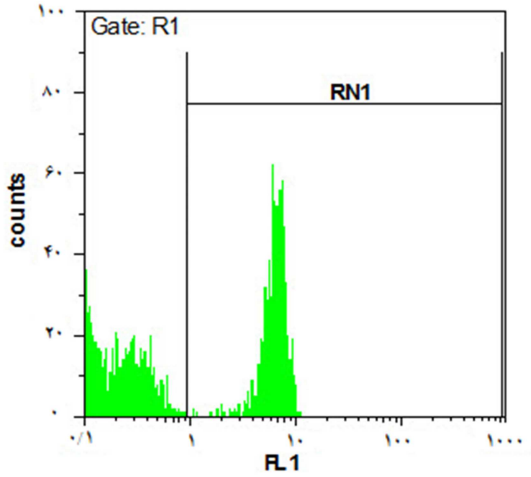
لپتین در القای پیشرفت بیماری آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) در موش نقش دارد. موش ob/ob (دچار نقص در ژن لپتین) در برابر ابتلا به EAE از خود مقاومت نشان می‌دهد؛ در حالی که تزریق لپتین به این موش منجر به ایجاد EAE در آن می‌شود.



شکل ۷. نمودار فلوسایتومتری نمونه‌های شاهد منفی: شاهد ایزوتایپ و شاهد FITC (Fluorescein isothiocyanate) (به ترتیب از راست به چپ). ۶ درصد و ۱/۵۳ درصد از سلول‌ها فلورسنت نشان می‌دهند.



شکل ۸. نمودار فلوسایتومتری نمونه‌ی اصلی. ۲۲/۷۵ درصد از سلول‌ها فلورسنت نشان می‌دهند (در ناحیه‌ی RN1 هستند).



شکل ۹. نمودار فلوسایتومتری شاهد مثبت. ۲۷/۶۸ درصد از سلول‌ها فلورسنت نشان می‌دهند.

به طور کلی، لپتین باعث افزایش واسطه‌های ایمنی سلولی و تمایز لنفوسیت $TCD4^+$ به سمت Th1 می‌شود. طبیعی است که این اثرات باعث گردد تا لپتین در بعضی از بیماری‌های خودایمن به عنوان یک عامل مستعد کننده‌ی بیماری عمل کند. در نتیجه، با ایجاد آنتاگونیستی در فرم آنتی‌بادی به منظور ممانعت از عمل لپتین بر سلول‌ها، تا حد زیادی می‌توان بیماری‌های خودایمن را مهار کرد، اما آنتی‌بادی علیه لپتین یا گیرنده‌اش عواقب زیادی را به دنبال خواهد داشت؛ چرا که لپتین یک هورمون چند منظوره است و علایم‌دهی گیرنده‌ی لپتین، نقش اساسی در رگ‌زایی، تومورزایی، میزان انسولین خون

و دیابت نوع II، تشکیل استخوان، فشار خون، بلوغ جنسی و باروری بازی می‌کند (۱۹-۱۸).

برای این که اثرات لپتین را فقط در سیستم ایمنی تعدیل کنیم، باید آن را به نحوی فقط به سمت سلول های T سوق دهیم و taFv با ویژگی دوگانه، علیه گیرنده‌ی تمایزی سلول‌های T و CD4، و علیه گیرنده‌ی لپتین ابزار مناسبی برای این هدف است.

مطالعات زیادی کارا بودن taFv/scFv را به عنوان ابزار تشخیص و درمان، به علت پایین‌تر بودن ایمونوژنیسیتی و نفوذ بهتر در بافت، نشان داده است اما فقدان سیستم کارا برای تولید در حجم زیاد، بزرگ‌ترین مانع برای تحقق نوید آنتی‌بادی درمانی در طیف وسیعی از بیماری‌های انسان می‌باشد (۲۰).

سیستم‌های متنوعی برای بیان و تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب از جمله سیستم‌های باکتریایی، سلول‌های مخمر، گیاهان، سلول‌های حشرات و سلول‌های پستانداران وجود دارد. در این تحقیق، از سیستم باکتریایی E. coli استفاده گردید. دلایل استفاده از این سیستم شامل دست‌ورزی آسان ژنتیکی، ترانسفورماسیون راحت، رشد سریع و عدم نیاز به محیط‌های کشت پیچیده می‌باشد (۲۱).

اگر چه برخی از سیستم‌ها ممکن است میزان بالاتری از برخی آنتی‌بادی‌ها را تولید نمایند، اما باکتری‌ها برای تولید بسیار سریع آنتی‌بادی‌ها و خالص‌سازی آن‌ها بی‌رقیب می‌باشند (۲۳-۲۲).

در این مطالعه نیز با هدف دست‌یابی به بیان مناسب، از سیستم باکتریایی و وکتور pET32a بهره برده شد که از طریق تعویض وکتور، یعنی قبل از انجام آزمایش‌های بهینه‌سازی، بیان قابل توجهی نسبت به قبل حاصل شد.

در مطالعه‌ی Yang و همکاران نیز برای تولید کتابخانه‌ی scFv، لایگیشن کارا، ترانسفورماسیون و دست‌ورزی ژنتیکی آسانِ TNF-scFv، از وکتور فاژمید pCANTAB 5E و برای بیان از وکتور pBV220 در میزبان E. coli BL21 استفاده شد که باعث افزایش چشمگیر بیان از ۰/۱۵ mg/ml در وکتور فاژمید pCANTAB 5E به ۰/۴۵ mg/ml در وکتور pBV220 شد. افزایش قابل ملاحظه در بیان به پروموتر قوی آن نسبت داده می‌شود که چندین بار کاراتر از پروموتر lac در وکتور فاژمید pCANTAB 5E و pAB1 می‌باشد (۲۰).

در این مطالعه، با وجود این که با به کارگیری سویه‌ی E. coli BL21 و وکتور pET32a (همراه با قطعه‌ی pel B که در آن انتقال داده شد)، به آسانی و در مدت زمان کم، سطح به نسبت خوبی از پروتئین به صورت ترشحی بیان شد، اما با وجود کمتر بودن خاصیت زیستی taFv تولیدی در مقایسه با آنتی‌بادی تجاری تولید شده در سلول هیبریدوما، تولید در باکتری به منظور اهداف درمانی، مستلزم بررسی‌های بیشتر است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد لیلا ممجدی در دانشگاه اصفهان می‌باشد.

References

1. Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. Nature 1997; 387(6629): 206-9.

2. Babaei A, Zarkesh-Esfahani SH, Bahrami E, Ross RJ. Restricted leptin antagonism as a therapeutic approach to treatment of autoimmune diseases. Hormones (Athens) 2011; 10(1): 16-26.
3. Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. Physiol Behav 2004; 81(2): 223-41.
4. Haghjooy Javanmard Sh, Khorshidi Behzadi M, Amjadi F, Khazaei M, Zarkesh Esfahani H. Leptin enhances melanoma tumor growth by increasing endothelial progenitor cells. J Isfahan Med Sch 2012; 29(170): 2653-61. [In Persian].
5. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 1998; 395(6704): 763-70.
6. Massaer M, Mazzu P, Haumont M, Magi M, Daminet V, Bollen A, et al. High-level expression in mammalian cells of recombinant house dust mite allergen ProDer p 1 with optimized codon usage. Int Arch Allergy Immunol 2001; 125(1): 32-43.
7. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. Clin Chem 2004; 50(9): 1511-25.
8. Fleet JC. Leptin and bone: does the brain control bone biology? Nutr Rev 2000; 58(7): 209-11.
9. Faggioni R, Jones-Carson J, Reed DA, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C, et al. Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97(5): 2367-72.
10. Chandra RK. Cell-mediated immunity in genetically obese C57BL/6J ob/ob) mice. Am J Clin Nutr 1980; 33(1): 13-6.
11. Sanna V, Di GA, La CA, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S, et al. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. J Clin Invest 2003; 111(2): 241-50.
12. Li C, Friedman JM. Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(17): 9677-82.
13. Carmen S, Jermutus L. Concepts in antibody phage display. Brief Funct Genomic Proteomic 2002; 1(2): 189-203.
14. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85(16): 5879-83.
15. Campbell AM. Monoclonal antibody and immunosensor technology. The production and application of rodent and human monoclonal antibodies. Philadelphia, PA: Elsevier; 1991.
16. Babaei A. Production and manipulation of a recombinant bispecific antibody which binds simultaneously to leptin receptor and one of the T lymphocytes CD markers in order to modulate the immune response [PhD Thesis]. Isfahan, Iran: University of Isfahan; 2010.
17. Zarkesh-Esfahani SH, Etemadifar Z. The principle of flow cytometry and its application in biological sciences. 1st ed. Isfahan, Iran: Isfahan University Publications; 2010. p. 179. [In Persian].
18. Matarese G, Di GA, Sanna V, Lord GM, Howard JK, Di TA, et al. Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2001; 166(10): 5909-16.
19. Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer C, Saphire EO, Binley JM, et al. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. J Virol 2001; 75(22): 10892-905.
20. Yang T, Yang L, Chai W, Li R, Xie J, Niu B. A strategy for high-level expression of a single-chain variable fragment against TNFalpha by subcloning antibody variable regions from the phage display vector pCANTAB 5E into pBV220. Protein Expr Purif 2011; 76(1): 109-14.
21. Arbabi-Ghahroudi M, Tanha J, MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies. Cancer Metastasis Rev 2005; 24(4): 501-19.
22. Humphreys DP, Sehdev M, Chapman AP, Ganesh R, Smith BJ, King LM, et al. High-level periplasmic expression in Escherichia coli using a eukaryotic signal peptide: importance of codon usage at the 5' end of the coding sequence. Protein Expr Purif 2000; 20(2): 252-64.
23. Jurado P, Ritz D, Beckwith J, de L, V, Fernandez LA. Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli. J Mol Biol 2002; 320(1): 1-10.

Journal of Isfahan Medical School Received: 12.05.2015

Vol. 33, No. 355, 3rd Week, December 2015 Accepted: 23.07.2015

Optimization of Production and Characterization of a Tandem Single Chain Fragment Variable (taFv) against Human Leptin Receptor and Anti-Human CD4

Leila Momajadi MSc[1], Sayyed Hamid Zarkesh-Esfahani PhD[2], Mohammad Rabbani PhD[2], Rahman Emamzadeh PhD[3], Forouzan Safari[1], Arash Babaei PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Leptin deficiency or dysfunction in leptin receptor (ObR) signaling may tend to resistance to autoimmune diseases. On the other hand, leptin receptors exist on many cells and therefore blocking all of them will probably result in unfavorable effects. Targeted ObR blocking on specific immune cells with a leptin antagonist such as taFv (Tandem single chain fragment variable or Tandem scFv) may be advantageous for patients with autoimmune diseases. This project aimed to optimize the condition for large scale production of such molecule and to test its effect.

Methods: The cloned taFv gene was sub-cloned from pAB1 to pET32a vector. The taFv fragment existence in pET32a vector was confirmed via polymerase chain reaction (PCR) method using T7 primers. Dot blotting was recruited to detect protein expression. Optimization experiments were carried out and assayed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Finally, the functional activity was evaluated via flow cytometry.

Findings: The result of PCR confirmed integration of taFv 2300 bp gene fragment in pET32a vector. Dot blotting confirmed taFv higher expression in pET32a vector compared to previous vector. It was found that media containing sorbitol, Escherichia coli BL21 strain, IPTG 0.05 mM and 18˚ C temperatures were resulted in higher production of protein levels. Based on flow cytometry, taFv was able to attach to 20% of lymphocytes.

Conclusion: pET32a vector with pel B fragment is suitable for secretory overexpression. Production of taFv could be enhanced via optimizing media and culture conditions.

Keywords: Leptin, Autoimmune disease, Optimization, Bispecific antibody

Citation: Momajadi L, Zarkesh-Esfahani SH, Rabbani M, Emamzadeh R, Safari F, Babaei A. **Optimization of Production and Characterization of a taFv against Human Leptin Receptor and Anti Human CD4.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(355): 1740-51

1- Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Biology, School of Science, University of Malayer, Malayer, Iran
Corresponding Author: Sayyed Hamid Zarkesh-Esfahani PhD, Email: s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk