DOI: 10.48305/jims.v43.i808.0224

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و سوم/شماره‌ی ۸۰۸/هفته‌ی چهارم اردیبهشت ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴ تاریخ چاپ: ۱۴۰۴/۰۲/۲۹

تولید مولکول نوترکیب پروتئین HTLV-1–پروتئاز متصل به Fcγ1 از IgG1 انسانی (HTLV-1 protease:hFcγ1) با هدف درمان بیماری‌های وابسته به HTLV-1

ساناز احمدی قزل دشت[۱]، سید عبدالرحیم رضائی[۲]، راحله میری[۱]، نرگس ولیزاده[۲]، آرمان مساوات[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: شمال شرق ایران به عنوان منطقه‌ی بومی ویروس HTLV-1 شناخته شده است. با توجه به افزایش شیوع بیماری‌های مرتبط با HTLV-1 در کشور، پیشگیری و دستیابی به درمان مؤثر ضروری می‌باشد. هدف از مطالعه‌ی حاضر، طراحی و تولید HTLV-1 protease:hFcγ1–پروتئاز متصل به قطعه Fcγ1 از آنتی‌بادی انسانی در سیستم بیانی مخمر *پیکیا پاستوریس* و استفاده آن در طراحی مهارکننده‌ی پروتئاز ویروس در مطالعات آینده می‌باشد.

روش‌ها: پس از طراحی‌سازه ژنی HTLV-1 protease:hFcγ1، ژن بهینه شده آن در محل جایگاه‌های آنزیمی *Xho*I و *Not*I و کتور بیانی pPICZαA وارد شد. ابتدا پلاسمید نوترکیب با روش کلرید کلسیم به باکتری *E. coli* TOP10F' و سپس با روش الکتروپوریشن به *پیکیا پاستوریس GS115* الحاق شد. سویه‌های حاوی ژن نوترکیب بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک زئوسین انتخاب و رشد داده شدند. در نهایت، به منظور تأیید بیان پروتئین نوترکیب، SDS-PAGE و وسترن بلات انجام شد.

یافته‌ها: در مطالعه‌ی حاضر؛ طراحی، کلونینگ و بیان پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1 با استفاده از دو عنصر HTLV-1–پروتئاز و مولکول hFcγ1 انسانی در سیستم بیانی *پیکیا پاستوریس* انجام گردید. پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1 همودایمر بسیار گلیکوزیله با pI: ۸/۳ و Mw: ۵۰kDa است. صحت الحاق سازه‌ی نوترکیب در وکتور بیانی pPICZαA با استفاده جفت پرایمر *AOX1* و *α-factor* با تکثیر قطعات به اندازه‌های ۱۳۸۸ bp و ۱۶۸۷ bp تأیید شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش، می‌تواند راهکاری نوید بخش جهت بکارگیری پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1 در طراحی کاندیدای مناسب برای مهارکننده‌ی پروتئاز ویروس و درمان بیماری‌های وابسته به HTLV-1 باشد.

واژگان کلیدی: HTLV-1–پروتئاز؛ hFcγ1؛ *پیکیا پاستوریس*؛ پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1

ارجاع: احمدی قزل دشت ساناز، رضائی سید عبدالرحیم، میری راحله، ولیزاده نرگس، مساوات آرمان. **تولید مولکول نوترکیب پروتئین HTLV-1–پروتئاز متصل به Fcγ1 از IgG1 انسانی (HTLV-1 protease:hFcγ1) با هدف درمان بیماریهای وابسته به HTLV-1.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۴؛ ۴۳ (۸۰۸): ۲۲۴-۲۳۳.

مقدمه

ویروس لنفوتروپیک انسانی نوع-۱ (HTLV-1)، اولین رتروویروس انسانی شناخته شده بوده که نخستین بار در سال ۱۹۸۰ در آزمایشگاه تحقیقاتی پروفسور «رابرت گالو» در مؤسسه ملی سرطان کشف و جداسازی شد. HTLV-1، در خانواده *رتروویریده*، زیرخانواده اورتورتروویرینه و جنس دلتارتروویروس قرار دارد (۱). این ویروس دارای چهار تیپ است. HTLV-1 در بروز برخی بیماری‌ها از جمله «لنفوم تهاجمی سلول T بالغین» (Adult T cell leukemia/lymphoma) ATLL و «میلوپاتی مرتبط با ویروس لنفوتروپیک سلول T انسانی نوع-۱» (HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis) HAM/TSP نقش دارد (۲).

HTLV-1 در جنوب غربی ژاپن، جزایر کارائیب، آفریقای تحت صحرا، آمریکای جنوبی و شمال شرقی ایران به صورت بومی وجود

۱- پژوهشگر و دانش‌آموخته‌ی دکتری تخصصی پژوهشی-ایمونولوژی، مرکز تحقیقات عفونت‌های منتقله از خون، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

۲- دانشیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، بخش التهاب و بیماری‌های التهابی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳- استادیار پژوهش، مرکز تحقیقات عفونت‌های منتقله از خون، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: آرمان مساوات: استادیار پژوهش، مرکز تحقیقات عفونت‌های منتقله از خون، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

Email: Mosavat@acecr.ac.ir

دارد (۳–۷). طبق برآورد، از میان ۲۵–۱۰ میلیون فرد آلوده به این ویروس در جهان، تقریباً ۱۰–۵ درصد به ATLL یا HAM/TSP مبتلا خواهند شد (۶). از آنجایی که هیچ دارو یا واکسن مؤثری برای درمان ATLL، HAM/TSP و یا پیشگیری از عفونت HTLV-1 وجود ندارد، آلودگی با این ویروس تبدیل به یک مشکل مهم بهداشت و سلامت انسان شده است (۸). بنابراین، طی چند سال اخیر تلاش هایی بمنظور دست یابی به واکسن و داروهای مؤثر علیه HTLV-1 صورت گرفته است (۹–۱۱).

HTLV-1 از نظر ساختمانی شباهت‌هایی با سایر رتروویروس‌ها، مانند ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان (Human Immunodeficiency Viruses) HIV دارد. برخلاف این شباهت‌ها و نیز راه‌های انتقال مشابه، این دو ویروس از نظر پاسخ سیستم ایمنی و تظاهرات بالینی تفاوت‌های بسیار زیادی باهم دارند. درمان با داروهای مهار کننده پروتئاز ویروس، مانند آخرین و موفق‌ترین درمانی که برای HIV انجام شده است، مبتنی بر مهار عملکرد پروتئاز ویروس بوده و نتایج امیدوارکننده و رضایت‌بخشی به‌همراه داشته است. HTLV-1–پروتئاز، پروتئین ساختاری و ضروری برای تکثیر ویروس می‌باشد، یک هدف مهم و مؤثر برای طراحی مهارکننده‌ی پروتئاز ویروس است (۱۲). این نوع از آسپارتیک پروتئازها به وسیله‌ی وجود دو بنیان اسیدی در جایگاه فعال خود شناسایی می‌گردند. این پروتئاز، همودایمر بوده که هر زنجیره‌ی آن حاوی ۱۲۵ بنیان اسید آمینه بوده و برای سوبسترای خود بسیار اختصاصی می‌باشد. این پروتئین مسئول پردازش پلی پروتئین Gag-pro-pol و Gag در طی بلوغ بوده و از آن رو، کاتالیز آن مرحله‌ای ضروری در فرایند رونویسی است. پروتئاز دارای جایگاه‌های برش زیادی نظیر کپسید/ماتریکس، نوکلئوکپسید/کپسید، پروتئاز/Gag و پروتئاز/P3 می‌باشد (۱۳).

توالی پروتئاز HTLV-1 با پروتئاز HIV، ۲۸ درصد شباهت مولکولی دارد. مدل مولکولی این آنزیم نشان داده است که ناحیه‌ی اتصال سوبسترا که حفاظت شده‌تر بوده و ۴۵ درصد شباهت مولکولی در ساختار را نشان می‌دهد. از این‌رو ویژگی سوبسترا و خصوصیات مهار هر دو آنزیم اساساً متفاوت از هم می‌باشد؛ ولی به دلیل اختصاصی‌تر بودن HTLV-1–پروتئاز، ترکیبات دارویی که برای این آنزیم ساخته می‌شود به احتمال زیاد برای آنزیم مشابه آن در ویروس HIV نیز کاربردی خواهد بود. اگرچه تاکنون، مهار کننده‌های بسیاری برای HTLV-1–پروتئاز ساخته شده است، اما فعالیت مناسبی از خود نشان نداده‌اند (۱۴، ۱۵). در طول سه دهه گذشته، اطلاعات بسیاری جهت درک خصوصیات زیستی و بیماری‌زایی ویروس HTLV-1 به دست آمده است، که در نهایت منجر به ایجاد و توسعه‌ی آزمایشگاه های متعدد جهت مطالعه‌ی ایمنی‌زایی علیه ویروس و همچنین راهکارهای درمانی به منظور مبارزه با عفونت HTLV-1 گردید (۲۰، ۲۱). تاکنون هیچ واکسن کارآمدی جهت پیشگیری افراد از ابتلا به عفونت HTLV-1 و یا داروی مؤثر برای درمان بیماری‌های وابسته به HTLV-1 تولید و ارائه نگردیده است (۲۲، ۲۳). بنابراین ساخت و دست‌یابی به واکسن علیه HTLV-1 به منظور افزایش پاسخ‌های ایمنی سیستمیک به ویژه ایمنی سلولی و همچنین جلوگیری از عوارض جانبی حاصل از تحریک سیستم ایمنی از قبیل واکنش‌های التهابی و بیماری خود ایمنی بسیار مهم می‌باشد (۲۴).

هدف از این مطالعه، کلونینگ، بیان و تولید پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1 در سیستم مخمری *پیکیا پاستوریس* به‌منظور دسترسی به مهار کننده‌ی پروتئاز ویروس با اهداف درمانی می‌باشد.

روش‌ها

مطالعات بیوانفورماتیک، طراحی سازه ژنی و مدلینگ مولکولی پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1

توالی نوکلئوتید ژن HTLV-1–پروتئاز و بخش های CH2-hinge و CH3 ناحیه‌ی Fc آنتی‌بادی IgG1 انسانی (Human-FcIgG1) از پایگاه اینترنتی مرکز ملی داده‌های بیوتکنولوژی (National Center for Biotechnology Information) NCBI بدست آمد و سپس به کمک نرم‌افزارهای مرتبط هر بخش ارزیابی شد، بطوری که توالی‌های انتخاب شده به صورت بهینه شده برای بیان در سیستم مخمری طراحی شدند. سازه‌ی ژنی طراحی و پس از ساخت توسط شرکت Generay™,China، در وکتوربیانی pPICZα سااب–کلون گردید. ابتدا پلاسمید نوترکیب با روش شیمیایی $CaCl_2$ به باکتری *E. coli* TOP10F' و سپس با روش الکتروپوریشن به سلول مخمر پیکیا *پاستوریس GS115* انتقال داده شده و بیان گردید.

برای بیان پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1 در مخمر *پیکیا پاستوریس*، وکتور بیانی pPICZαA دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک زئوسین انتخاب شد و جایگاه‌های برش (CTCGAG) *Xho*I و (GCGGCCGC) *Not*I به ترتیب در دو انتهای ۵′ و ۳′ سازه ژنی قرار داده شد (*5′Xho*I- HTLV-1 protease- hFcγ1-*Not*I3′). با توجه به اینکه در نقشه وکتور pPICZαA این ناحیه در بخش *α-Factor* آن قرار داشت، آن مقدار از بخش *α-Factor* (CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT) که در نتیجه‌ی برش حذف می‌گردید نیز به توالی سازه‌ی ژنی اضافه شد. در سمت C–ترمینال نیز ابتدا توالی خاتمه (دو کدون TGA و TAA) قرار گرفت و در نهایت جایگاه برش *Not*I قرار داده شد. سپس سازه‌ی طراحی شده به منظور کنترل قرارگیری آن‌ها در یک قالب صحیح

بیان، دوباره بررسی و تأیید شدند. جایگاه‌های برش آنزیم‌های مختلف برای توالی توسط نرم‌افزار آنلاین (NEB cutter, http://nc2.neb.com/NEBcutter2) ارزیابی شدند. بدین منظور توالی ژن‌ها بررسی شدند تا هیچ جایگاه برشی برای آنزیم‌های *Not*I،*Xho*I، *Not*I و *Sac*I نداشته باشند. آنزیم‌های محدودالاثر *Not*I و *Xho*I برای ساب-کلونینگ و *Sac*I برای خطی کردن وکتور pPICZαA و انجام الکتروپوریشن در *پیکیا پاستوریس* استفاده شدند.

با توجه به انتخاب ژن HTLV-1 protease، ژن قطعه Fcγ1 و از طرفی، عدم تطابق فراوانی کدون آنها با مخمر *پیکیا پاستوریس*، توالی سازه ژنی توسط نرم‌افزار آنلاین JCat (Java Codon Adaptation Tool, Version 1.0) از نظر انطباق کدون با میزبان بیانی بررسی و بهینه سازی شد. در نهایت پس از بهینه سازی توالی و کسب بالاترین شاخص انطباق کدون جهت بیان بهینه پروتئین HTLV-1 protease:hFcγ1، سنتز سازه ژنی توسط شرکت Generay™, China انجام شد.

به منظور آگاهی از ساختار و آرایش فضایی HTLV-1 protease:hFcγ1 و بررسی پیوندهای غیر کوالان مزاحم بین دومین Fc و ژن متصل شده مدلینگ مولکولی انجام شد. مدلینگ ساختار مولکولی HTLV-1 protease:hFcγ1، توسط نرم‌افزار MODELLER 9.15 (http://salilab.org/modeller/) انجام شد. در ابتدا توالی ساختارهای پروتئینی مرتبط با هر کدام از قطعات HTLV-1 protease و Fcγ1 با بیشترین شباهت ساختاری از پایگاه اینترنتی protein data bank (www.rcsb.org) استخراج شد. سپس، جهت شناسایی هومولوژی الگوهای ساختاری این پروتئین ها، از پایگاه http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST استفاده گردید. الگوهای مناسب هر جزء از پروتئین نوترکیب با بیشترین تشابه ساختاری انتخاب شدند. در نهایت ساختار فضایی و مولکولی پروتئین‌های بدست آمده توسط نرم‌افزار آنلاین http://nihserver.mbi.ucla.edu/savs ارزیابی شد.

ترنسفورماسیون و تکثیر پلاسمید نوترکیب در *E. coli TOP10F'*

بدین منظور از محیط‌های کشت مایع و آگار LB Low salt با و بدون زئوسین برای کشت اولیه و تکثیر باکتری *E. coli* TOP10F' استفاده شد. باکتری در محیط LB مایع بدون زئوسین و در شیکر انکوباتور (۱۵۰-۲۰۰ rpm) در دمای ۳۷ °C انکوبه شد تا اینکه میزان جذب نوری آن به OD600: ۰/۴-۰/۶ رسید. سپس، برای تراسفورماسیون و ایجاد سلول مستعد باکتری از محلول $CaCl_2$ استفاده شد. ۲µL از سازه‌ی ژنی (پلاسمید حاوی ژن مورد نظر) به ۱۵۰ µL سلول مستعد شده باکتری اضافه گردید و مخلوط پس از یک شوک حرارتی ۴۲ °C و بلافاصله شوک سرما در ۴ °C و پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک زئوسین تلقیح شد.

استخراج، ارزیابی و خطی کردن پلاسمید نوترکیب *HTLV-1 protease:hFcγ1*

باکتری حاوی پلاسمید HTLV-1 protease:hFcγ1 در زئوسین با غلظت 100 µg/mL تکثیر گردید، سپس استخراج پلاسمید با استفاده از کیت تجاری استخراج پلاسمید (Bioneer, Korea) صورت گرفت و درنهایت بر روی ژل آگارز، الکتروفورز شد تا از صحت مراحل انجام کار و وجود پلاسمید در محلول اطمینان حاصل شود. سپس بقایای بافر و آنزیم از پلاسمید حاصل از هضم *Sac*I با استفاده از کیت Silica Bead DNA gel extraction (Thermo Scientific, USA) حذف شد.

ترنسفورماسیون، تکثیر پلاسمید نوترکیب *HTLV-1 protease:hFcγ1* در پیکیا پاستوریس و انتخاب بهترین کلون

ابتدا پلاسمید نوترکیب *pPICZαA-HTLV-1 protease:hFcγ1*، با روش الکتروپوریشن به *پیکیا پاستوریس GS115* منتقل شد. سپس کلون‌های مخمری ترنسفورم شده بر روی محیط YPDS حاوی ۱۰۰ µg/mL زئوسین کشت داده شد. تنها کلون‌هایی که پلاسمید خطی نوترکیب در کروموزوم آن‌ها به‌شکل صحیح وارد شده بود، قادر به رشد بر روی این محیط بودند. در نهایت، کلون های مناسب انتخاب و بر روی محیط YPDS آگار بصورت شطرنجی کشت داده شد.

انتخاب کلون مناسب و بهینه سازی شرایط بیان پروتئین نوترکیب *HTLV-1 protease:hFcγ1*

به‌منظور دستیابی به بیشترین میزان تولید پروتئین نوترکیب، ابتدا کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب در حجم اندک کشت داده شد؛ پس از انتخاب کلون بیانی مناسب، جهت افزایش سطح بیان پروتئین نوترکیب، فاکتورهای مؤثر بر میزان بیان پروتئین ارزیابی شد. برای این منظور اثر غلظت متانول، سوربیتول، زمان انکوباسیون و pH محیط کشت بررسی شدند. سپس با القاء متانل ۰/۵ در صد تا روز چهارم، غربالگری اولیه توسط الایزا انجام شد و در نهایت کلون مخمری با بیشترین میزان تولید پروتئین HTLV-1 protease:hFcγ1 انتخاب گردید و پس از بهینه‌سازی شرایط بیان، پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1 در مقیاس بالا تولید شد.

تخلیص و تأیید پروتئین نوترکیب *HTLV-1 protease:hFcγ1*

پس از تولید پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1 در مقیاس بالا، سوپ حاوی پروتئین نوترکیب توسط ستون کروماتوگرافی پروتئین HiTrap rProtein A Sepharose Fast Flow Column و

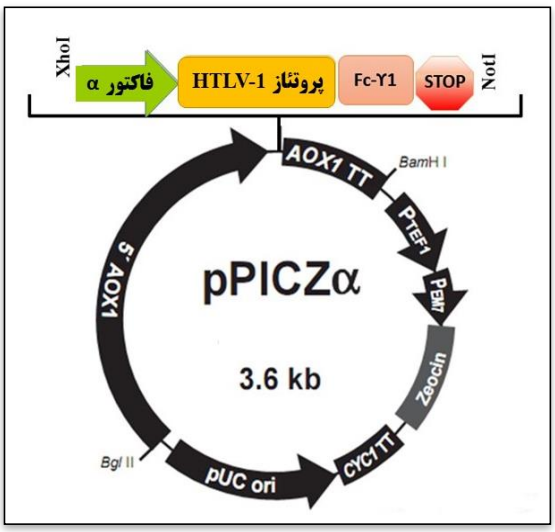
با استفاده از پمپ پریستالتیک تخلیص شد. این ستون، برای تخلیص و جداسازی آنتی بادی های منوکلونال از سوپرناتانت کشت سلولی و آسیت طراحی شده است. اختصاصیت پروتئین A، برای ناحیه‌ی Fc-IgG می باشد. جهت تغلیظ و نمک‌زدایی پروتئین از ultrafiltration Vivaspin 20 spin column (Sartorius stedim, Germany) با نفوذپذیری غشاء ۱۰kDa استفاده شد. ستون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ °C با ۸۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. در نهایت پس از سانتریفیوژ، نمونه از انتهای پاکت تغلیظ با سمپلر برداشته و به فریزر ۷۰°C- منتقل شد.

برای بررسی وجود و یا عدم وجود پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1 و همچنین تعیین وزن مولکولی پروتئین استخراج شده، پروتئین نوترکیب با روش سدیم دو دسیل سولفات-پلی اکریل آمید ژل (SDS-PAGE) الکتروفورز شدند. برای ژل متراکم کننده غلظت ۵ درصد و غلظت ۱۲ درصد برای ژل جداکننده استفاده گردید و رنگ‌آمیزی توسط کوماسی بلو G ۲۵۰ انجام شد. پس از اتمام SDS-PAGE، باندهای پروتئینی براساس الکتروترانسفر با استفاده از سیستم Bio-Rad Mini Trans-Blot® cell به غشاء پلی وینیلیدین دیفلورواید (PVDF) منتقل گردید. در نهایت به‌منظور تائید تولید پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1 با روش وسترن بلات، از آنتی‌بادی اختصاصی ضد Fc انسانی goat anti-human IgG-HRP با رقت ۱/۵۰۰۰ استفاده شد.

یافته‌ها

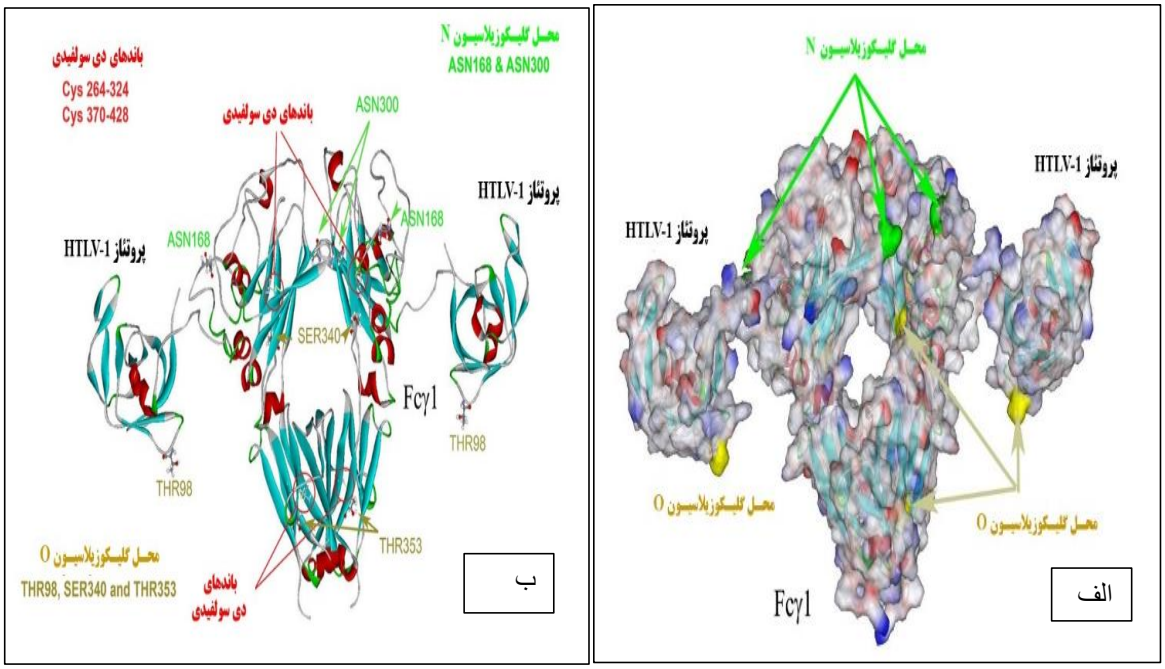
مدل مولکولی فیوژن پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1

در ابتدا توالی‌های DNA مربوط به سازه‌ی ژنی HTLV-1 protease:hFcγ1 از پایگاه NCBI گرفته شد. طراحی اولیه پروتئیننوترکیب به صورت منومر به همراه لینکر و نواحی برش آنزیمی توسط آنزیم‌های *Xho*I و *Not*I به ترتیب دردو انتهای '۵ و '۳ سازه، و همچنین جایگاه قرارگیری این سازه در پلاسمید pPICZαA اضافه شد (شکل ۱). نخست، ۳۰ الگو توسط نرم‌افزار MODELLER software v: 9.15 ایجاد شد. پس از پایش آنها، تنها یک مدل که بالاترین امتیاز ERRAT داشت، انتخاب گردید. با توجه به موقعیت‌های اسید آمینه سیستئین و تشکیل پیوندهای دی-سولفیدی در این نواحی، فرم هندسی دیمر پروتئین بهینه‌سازی و تکمیل شد. ساختار نهایی پروتئین نوترکیب، با امتیاز ERRAT ۹۲٪ و از نظر پایداری توسط نمودار راماچاندران تأیید گردید. به طور قابل توجهی سطوح بیان ژن‌ها با بهینه سازی استراتژیک توالی DNA بهینه‌سازی شد. ژن اولیه دارای چندین ویژگی بود که منجر به بیان ضعیف می‌شد. ژن با اعمال مجموعه‌ای از معیارهای طراحی با دقت انتخاب شده که بیان را بهبود می‌بخشید. سوگیری کدون با استفاده از کدون ترجیحی ارگانیسم هدف (*پیکیا پاستوریس*) سازگار شده است واختلاف مجذور فرکانس کدون واقعی در مقابل فرکانس کدون ترجیحی از ۳,۸۴ به ۶,۰۱ تغییر کرده است. محتوای GC در سراسر توالی به منظور افزایش نیمه عمر mRNA یکنواخت شده و ساختار ثانویه mRNA کاهش یافته است. نتایج نشان داد که پروتئین HTLV-1 protease:hFcγ1 یک همودایمر بسیار گلیکوزیله با pI نظری ۸,۳۰ و وزن مولکولی ظاهری ۵۰ کیلو دالتون است (شکل ۲-الف). فرم دایمر با نرم‌افزار Accelrys DS Visualizer v2.1 رسم شد. موقعیت‌های پیوندهای دی سولفیدی جایگاه‌های (Cys264-Cys324، Cys370-Cys428) می‌باشد. برای شناسایی و بررسی وجود احتمالی نواحی گلیکوزیلاسیون در پروتئین‌های نوترکیب، از نرم‌افزار آنلاین (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) NetNGlyc (v:1.0) استفاده گردید. چهار محل بالقوه N-گلیکوزیلاسیون در Asn63، Asn168، Asn187، و Asn300، آخرین مورد واقع در قطعه Fc و بقیه در ناحیه خارج سلولی پروتئین نوترکیب پیش‌بینی شد. این مکان‌ها پروتئین را مستعد گلیکوزیلاسیون شدید می‌کنند (شکل ۲-ب).



شکل ۱. طراحی اولیه‌ی پروتئین Fc نوترکیب به صورت منومر.

طبق نتایج، پس از بهینه‌سازی کدون و مدلینگ *in silico*، مشخص گردید که بین مولکول نوترکیب متصل شده با Fc همپوشانی و آثار آلو استریک بر آنزیم وجود ندارد. درنهایت پس از تأیید نهایی ساختار فضایی پروتئین نوترکیب، سازه‌ی ژنی برای ساخت ارسال شد. پس از دریافت سازه‌ی ژنی در وکتور بیانی، کلونینگ، بهینه سازی دما، متانول و زمان کشت انجام گردید. تأیید بیان پروتئین نوترکیب با روش



شکل ۲. الف) تصویر شماتیک مدلینگ به صورت دایمر فیوژن HTLV-1 protease:hFcγ1. ب) سطوح حل شونده با محل‌های گلیکوزیلاسیون HTLV-1 protease:hFcγ1:hFcγ1 دایمر.

SDS-PAGE و وسترن بلات با بکارگیری آنتی‌بادی ضد بخش ثابت ایمنوگلبولین انسانی صورت پذیرفت. در این مرحله، مشاهده‌ی نتایج وسترن بلات نشان داد که تولید پروتئین HTLV-1 protease:hFcγ1 با موفقیت صورت گرفته است.

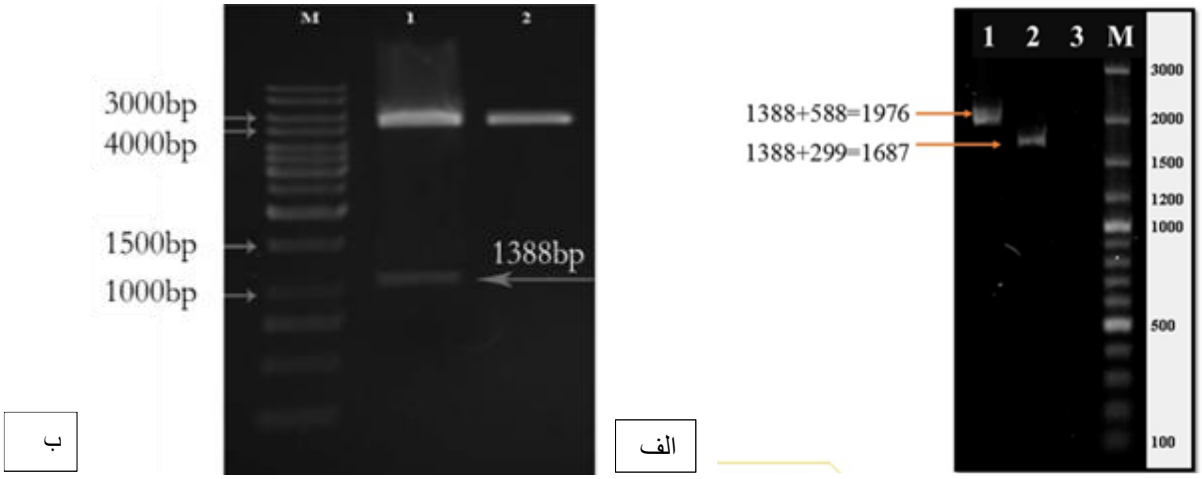
استخراج و خطی کردن پلاسمید نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1

پس از استخراج، هضم آنزیمی برای خطی کردن پلاسمید با استفاده از آنزیم *Sac*I انجام گردید و سپس الکتروفورز شد. نتیجه‌ی آن با باند حاصل از پلاسمید اولیه و حلقوی مقایسه شد، مشاهده گردید که پلاسمید خطی سنگین‌تر از پلاسمید حلقوی بوده و بالاتر از آن قرار گرفت (شکل ۳–الف).

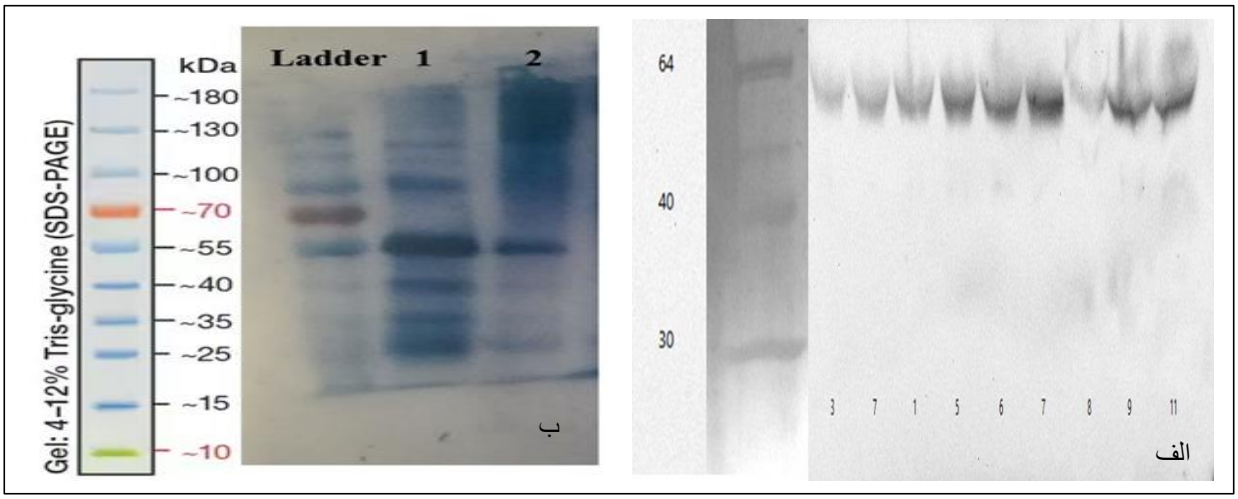
ترنسفورماسیون، انتخاب کلون مناسب، بهینه سازی شرایط بیان پروتئین، تخلیص و تأیید بیان پروتئین نوترکیب

پس از انجام الکتروپوریشن مخمر های مستعد، سلول های الکتروپوریت شده بر روی محیط YPDS آگار حاوی ۱۰۰ µg/mL زئوسین در دمای ۲۹ °C کشت داده شدند. پس از گذشت مدت زمان ۴ روز، تعداد ۹ کلون بر روی محیط YPDS آگار رشد کرد. بر اساس پدیده نوترکیبی می‌توان تعداد کلون‌هایی را که بیشتر از یک پلاسمید در ژنوم آنها وارد شده است را مشخص نمود. انتخاب این کلون‌ها خود می‌تواند یکی از نشانه‌های بیان بهتر کلون انتخاب شده باشد. برای انجام این کار از محیط های دارای زئوسین با غلظت ۱۰۰۰µg/mL، ۱۵۰۰µg/mL و ۲۰۰۰µg/mL استفاده شد. سپس، به‌منظور تأیید و انتخاب کلون مثبت از روش Colony-PCR استفاده شد. طبق دستورالعمل شرکت Invitrogen، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، کلون‌های مثبت جهت بیان پروتئین نوترکیب انتخاب گردیدند (شکل ۳–ب).

فاکتور های مؤثر بر میزان تولید پروتئین (درصد های مختلف متانل و سوربیتول، دما، زمان و pH با روش الایزا و SDS-PAGE ارزیابی شد. متانل ۲/۵ درصد، سوربیتول ۱ درصد، دمای ۳۰ °C، زمان ۹۶ ساعت و pH: ۵/۶ بعنوان شرایط بهینه برای بالاترین میزان تولید پروتئین‌های نوترکیب به‌دست آمد. بر اساس اطلاعات به دست آمده از پایگاه ExPASy (ProtParam tool of the ExPASy server (Biozentrum, University of Basel, Switzerland) at (http://web.expasy.org/protparam/ وزن پروتئین نوترکیب حدود ۵۰kDa بود. عدم حضور باندهای غیر اختصاصی پروتئین در این مرحله، بیانگر خلوص پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد (شکل ۴–الف). بررسی حضور پروتئین نوترکیب با استفاده از روش SDS-PAGE توسط ژل ۱۲ درصد: شاخص وزنی پروتئینی (kDa)؛ Lane 1&2، پروتئین نوترکیب با وزن ۵۰ kDa که با وجود قرار گرفتن باند در جایگاه اصلی خود، در قسمت های دیگر ژل هم به دلیل گلیکوزیلاسیون متفاوت پروتئین دیده می‌شود (شکل ۴–ب).



شکل ۳. الف) هضم آنزیمی توسط SacI برای خطی کردن پلاسمید. ب) تأیید ترنسفورماسیون پلاسمیدهای نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1 با روش Colony-PCR .ستون ۱: تکثیر ژن HTLV-1 protease:hFcγ1 با جفت پرایمر AOX1، 1388 + 588 = 1976 bp؛ ستون ۲: تکثیر ژن HTLV-1 protease:hFcγ1 با جفت پرایمر ۵´ α-factor و ۳´ AOX1، 1388 + 299=1687 bp؛ ستون ۳: کلونی ترنسفورم نشده پیکیا پاستوریس GS115 بعنوان کنترل منفی (جفت پرایمر ۵´ α-factor و ۳´ AOX1)؛ ستون M، شاخص وزنی DNA 100 bp plus



شکل۴. الف) ارزیابی تخلیص و تأیید حضور پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1 با روش SDS-PAGE. بررسی حضور پروتئین نوترکیب با استفاده از روش SDS-PAGE توسط ژل ۱۲٪: شاخص وزنی پروتئینی (kDa)؛ ستون ۱ و ۲: پروتئین نوترکیب با وزن kDa ۵۰ با وجود قرار گرفتن باند در جایگاه اصلی خود، در قسمت‌های دیگر ژل هم دیده می‌شود (به دلیل گلیکوزیلاسیون متفاوت پروتئین). ب) تأیید اختصاصیت پروتئین نوترکیب؛ با استفاده از روش Western blotting:اتصال آنتی‌بادی اختصاصی goat anti-human IgG-HRP antibody به ناحیه Fc پروتئین نوترکیب و مشاهده آن توسط دستگاه ژل داک (شماره‌های چاهک‌ها مربوط به فراکشن‌های تخلیص شده ستون می‌باشد).

بحث

تولید پروتئین‌های نوترکیب یکی از د ستاوردهای مهم فناوری زیستی است که به علت تقاضای بالای داروهای درمانی و تشخیصی در حال گسترش است (۱۶). برای بیان یک ژن خارجی در سیستم‌های میزبانی مختلف، نیاز به سیستمی با کارآیی و ایمنی بالا است. سیستم‌های مثل باکتری ها، مخمر ها، گ یا هان و حیوا نات برای تولید پروتئین های نوترکیب به کار می‌روند (۱۷). در گذشته سیستم‌های بیانی مختلفی برای پروتئین‌های HTLV-1 بکار گرفته شده است (۱۸). اما در این مطالعه بنا به مزیت‌های سیستم مخمری از آن استفاده شد.

سیستم بیانی متیلوتروف *پیکیا پاستوریس* با دارا بودن مزایایی چون

دستکاری ژنتیکی آسان، تراکم سلولی بالا نسبت به سلول‌های پستانداران، دارا بودن پتانسیل بالا جهت تولید پروتئین نوترکیب حامل تغییرات پس از ترجمه، وجود پروموتر های قوی جهت بیان حداکثری پروتئین نوترکیب و الحاق DNA خطی خارجی حاوی چندین کپی از پروتئین هدف با فرایند نوترکیبی همولوگ، این پتانسیل را جهت کاربرد گسترده در حوزه‌ی صنعتی و تجاری فراهم نموده است (۱۷، ۱۹).

برای اولین بار سازه پروتئینی متشکل از اپی توپ پوششی HTLV-1 (نوکلئوتید های ۹۵ تا ۸۴۳ و ۸۴۷ تا ۱۳۹۸ ژن Env) توسط Nakamura و همکاران در سال ۱۹۸۷ تولید گردید. هیبرید ژنی مذکور با وزن مولکولی تقریبی ۱۵۰ کیلو دالتون در باکتری *E.coli* بیان شد. نتایج نشان داد که ایمنی هومورال علیه پروتئین پوششی HTLV-1 در میمون‌های واکسینه شده القا شد و سبب ایجاد حفاظت علیه عفونت اولیه HTLV-1 گردید (۲۰).

در مطالعه‌ی Tanaka و همکاران، یک رویکرد درمانی جهت مبارزه با عفونت HTLV-1 مطرح گردید. آن ها نشان دادند که مولکول های درمانی با اثر بر نوکلئاز بر پایه روی (ZFN) دارای رویکردی بالقوه است که می‌تواند منجر به حذف ژنوم پرورویروس از سلول‌های آلوده به پرورویروس در مدل موشی مبتلا به لوسمی سلول T بالغین تأیید گردد (۲۱).

HTLV-1 برای تکثیر مشابه HIV-1 عمل می‌کند و مهار پروتئاز ویروسی از بلوغ ویروس جلوگیری می‌کند (۲۲). به طوری که مهارکننده‌های پروتئاز HIV-1 روشی موفقیت‌آمیز از طراحی دارو مبتنی بر ساختاری منطقی بوده است. مهارکننده‌های پروتئاز به‌عنوان آنالوگ‌های حالت گذار تکامل ویروس، در بین مهم ترین و قوی‌ترین مهار کننده های ویروس HIV-1 هستند، زیرا آنزیم‌ها در مقایسه با سوبستراها یا فرآورده‌ها، قوی‌ترین حالت انتقال را دارند (۲۳). پروتئاز همودایمری است که هر زنجیره‌ی آن حاوی ۱۲۵ بنیان آمینواسیدی است و بسیار برای سوبسترای خود اختصاصی می‌باشد. این پروتئین مسئول پردازش پلی پروتئین Gag-pro-pol و Gag در طی تکامل و بلوغ بوده و از آن‌رو، کاتالیز آن مرحله ای ضروری در رونویسی ویروس می باشد (۲۴). انواع مختلفی از دارو های ضد HIV در دسترس هستند که شامل مهارکننده‌های اتصال (مانند آنتاگونیست‌های CCR5 و مهارکننده‌های پس‌اتصال)، مهارکننده‌های ادغام، مهارکننده های ترانس کریپتاز معکوس (شامل مهارکننده های غیرنوکلئوزیدی و نوکلئوزیدی ترانس کریپتاز معکوس)، مهارکننده‌های اینتگراز و مهارکننده های پروتئاز می‌شوند (۲۵). اما بر اساس پژوهش‌های موجود مطالعات مشابه برای HTLV-1 وجود ندارد.

در مطالعه‌ی حاضر، نتایج ساختاری به‌دست‌آمده، طراحی مهارکننده‌های بسیار قوی پروتئاز HTLV-1 را امکان پذیر می‌کند. در این مطالعه طراحی و ساخت سازه‌ی ژنی، بیان و تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از دو قطعه، HTLV-1–پروتئاز و Fcγ1 به صورت توأم انجام شد. تولید پروتئین نوترکیب پروتئاز متصل به Fcγ1 مزایایی همچون سهولت تخلیص، افزایش ظرفیت، افزایش نیمه عمر، پایداری و حفظ فعالیت دارد. فیوژن پروتئین های حاوی Fc از دامین Fc ایمونوگلوبین تشکیل شده که به طور مستقیم به پپتید مورد نظر اصلی متصل شده‌اند. قسمت پروتئینی می تواند هر مولکول پروتئینی دلخواه باشد. این اتصال خواص مفید زیستی و فارماکولوژی دارد. از دیدگاه بیوفیزیک، ناحیه Fc بطور مستقل دچار پیچش شده و موجب افزایش قابلیت حل شدن و پایداری مولکول اصلی می‌شود ولی از نظر فناوری، وجود ناحیه Fc موجب خالص‌سازی مقرون به صرفه از طریق کروماتوگرافی افینیتی پروتئین A در طی تولید می‌شود (۲۶).

مطالعات گوناگون نشان می‌دهد، برداشت و عرضه‌ی آنتی‌ژن‌ها به سلول‌های دخیل در پاسخ ایمنی نقش مؤثری در ایجاد پاسخ مناسب دارند؛ بنابراین زمانی که آنتی‌ژن به رسپتورهای–Fc موجود بر سطح سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن متصل شود، پروتئین نوترکیب متصل به Fc (Fc-fusion) با عملکردی اختصاصی خواهیم داشت. رسپتورهای–Fc بر سطح سلول‌های ماکروفاژ و دندریتیک بیان می‌شود، بنابراین دومین–Fc قادر است به رسپتور اختصاصی خود در سطح این سلول‌ها متصل گردد. آنتی‌ژن‌های متصل به Fc، از طریق اندوسیتوز وابسته به رسپتور برداشته می شوند. فرایند اندوسیتوز آنتی‌ژن بواسطه رسپتور، موجب افزایش پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال می‌گردد؛ این ویژگی در شرایط آزمایشگاهی و درون–تنی به اثبات رسیده است (۲۷).

نتیجه‌گیری

بنابر اهمیت بیماری‌های وابسته به HTLV-1، نیاز فوری به درمان‌های مؤثر برای بیماری‌های مرتبط با HTLV-1، ATLL و HAM/TSP، در مناطق بومی وجود دارد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، پروتئین نوترکیب HTLV-1 protease:hFcγ1 کارآمد با پایداری مناسب جهت مطالعات تکمیلی در دسترس خواهد بود. بنظر می‌رسد، این پروتئاز با فعالیت مناسب، ساخت سوبسترای کاملاً اختصاصی که بتواند وارد سلول آلوده به ویروس شود، نتایج امیدوارکننده‌ای در پیدایش داروی مهارکننده‌ی مؤثر علیه HTLV-1–پروتئاز در پی خواهد داشت. هدف از تولید این پروتئین، استفاده از آن به عنوان کاندید واکسن پروتئینی و یا معرفی مهارکننده در پژوهش‌های آینده است.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر حاصل پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری تخصصی پژوهشی–ایمونولوژی پزشکی، خانم ساناز احمدی قزل دشت

می‌باشد. این مطالعه، طرح مشترک و مصوب معاونت پژوهشی جهاد دانشگاهی (شماره طرح: ۲۰-۳۰۸۹) و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (شماره طرح: ۹۷۱۴۰۹) می‌باشد. از معاونت محترم پژوهشی جهاد دانشگاهی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد بخاطر تصویب و تأمین هزینه‌های این مطالعه تقدیر و تشکر بعمل می‌آید. از تمامی همکاران و پرسنل گرامی مرکز تحقیقات عفونت‌های منتقله از خون- جهاد دانشگاهی خراسان رضوی و مرکز تحقیقات التهاب و بیماری‌های التهابی- دانشگاه علوم پزشکی مشهد، که در انجام این مطالعه همکاری نموده‌اند، سپاسگزاری و قدردانی می‌گردد.

References

1. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980; 77(12): 7415-9.
2. Gessain A, Vernant J, Maurs L, Barin F, Gout O, Calender Ad, De The G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. Lancet 1985; 326(8452): 407-10.
3. Hjelle B, Torrez-Martinez N, Mills R, Appenzeller O, Jahnke R, Alexander S, Ross G. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. Lancet. 1992; 339(8794): 645-6.
4. Vrielink H, Reesink HW. HTLV-I/II prevalence in different geographic locations. Transfus Med Rev 2004; 18(1): 46-57.
5. Shimada K, Koh C-S, Yanagisawa N, Tsukada N, Osame M. Anti-lymphocyte natibodies and circulating immune complexes in the sera of patients with myelopathy associated with human T lymphotropic virus type_I. J Neuroimmunol 1993; 42(2): 161-6.
6. Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. Front Microbiol 2012; 3: 388.
7. Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. Oncogene 2005; 24(39): 6058-68.
8. Shuker SB, Mariani VL, Herger BE, Dennison KJ. Understanding HTLV-I Protease. Chem Biol 2003; 10(5): 373-80.
9. Mahieux R, Pise-Masison C, Gessain A, Brady JN, Olivier R, Perret E, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1–and type 2–infected cells by a caspase-3–dependent mechanism involving Bcl-2 cleavage. Blood 2001; 98(13): 3762-9.
10. Shafifar M, Mozhgani S-H, Pashabayg KR, Mosavat A, Karbalaei M, Norouzi M, Rezaee SA. Selective APC-targeting of a novel Fc-fusion multi-immunodominant recombinant protein (tTax-tEnv: mFcγ2a) for HTLV-1 vaccine development. Life Sci 2022; 308: 120920.
11. Seighali N, Shafiee A, Rafiee MA, Aminzade D, Mozhgani S-H. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proposed vaccines: a systematic review of preclinical and clinical studies. BMC Infect Dis 2023; 23(1): 320.
12. Eusebio-Ponce E, Anguita E, Paulino-Ramirez R, Candel FJ. HTLV-1 infection: An emerging risk. Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and associated diseases. Revista Rev Esp Quimioter 2019; 32(6): 485-96.
13. Awahara C, Oku D, Furuta S, Kobayashi K, Teruya K, Akaji K, Hattori Y. The effects of side-chain configurations of a retro–inverso-type inhibitor on the Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV)-1 protease. Molecules 2022; 27(5): 1646.
14. Satoh T, Li M, Nguyen J-T, Kiso Y, Gustchina A, Wlodawer A. Crystal structures of inhibitor complexes of human T-cell leukemia virus) HTLV-1) protease. J Mol Biol 2010; 401(4): 626-41.
15. Ha JJ, Gaul DA, Mariani VL, Ding YS, Ikeda RA, Shuker SB. HTLV-I protease cleavage of P19/24 substrates is not dependent on NaCl concentration. Bioorganic chemistry 2002; 30(2): 138-44.
16. Jayakrishnan A, Wan Rosli WR, Tahir ARM, Razak FSA, Kee PE, Ng HS, et al. Evolving paradigms of recombinant protein production in pharmaceutical industry: a rigorous review. Sci 2024; 6(1): 9.
17. Karbalaei M, Rezaee SA, Farsiani H. Pichia pastoris : A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. J Cell Physiol 2020; 235(9): 5867-81.
18. Mosadeghi P, Zarnagh HH, Mohammad-Zadeh M, Moghaddam MS. High-level soluble expression and one-step purification of HTLV-I P19 protein in Escherichia coli by Fusion Expression. Iran J Allergy Asthma Immunol 2015; 14(6): 624-32.
19. Gassler T, Sauer M, Gasser B, Egermeier M, Troyer C, Causon T, et al. The industrial yeast Pichia pastoris is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO2. Nat Biotechnol 2020; 38(2): 210-6.
20. Nakamura H, Hayami M, Ohta Y, Ishikawa KI, Tsujimoto H, Kiyokawa T, et al. Protection of cynomolgus monkeys against infection by human T-cell leukemia virus type-I by immunization with viral env gene products produced in Escherichia coli. Int J Cancer 1987; 40(3): 403-7.
21. Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, Okada S, Komano J. A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus. Leukemia 2013; 27(8): 1621-7.
22. Kuhnert M, Steuber H, Diederich WE. Structural basis for HTLV-1 protease inhibition by the HIV-1 protease inhibitor indinavir. J Med Chem 2014; 57(14): 6266-72.
23. Schramm VL. Enzymatic transition state theory and transition state analogue design. J Biol Chem 2007; 282(39): 28297-300.
24. Nguyen J-T, Kato K, Hidaka K, Kumada H-O, Kimura T, Kiso Y. Design and synthesis of several small-size

HTLV-I protease inhibitors with different hydrophilicity profiles. Bioorg Med Chem Lett 2011; 21(8): 2425-9.

25. Okafor SN, Meyer A, Gadsden J, Ahmed F, Guzmán L, Ahmed H, et al. Drug reprofiling to identify potential HIV-1 protease inhibitors. Molecules 2023; 28(17): 6330.

26. Soleimanpour S, Hassannia T, Motiee M, Amini AA, Rezaee S. Fcγ1 fragment of IgG1 as a powerful affinity tag in recombinant Fc-fusion proteins: Immunological, biochemical and therapeutic properties. Crit Rev Biotechnol 2017; 37(3): 371-92.

27. Dong J, Kojima T, Ohashi H, Ueda H. Optimal fusion of antibody binding domains resulted in higher affinity and wider specificity. J Biosci Bioeng 2015; 120(5): 504-9.

DOI: *10.48305/jims.v43.i808.0224*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 43, No. 808, 4th Week, May 2025**

Received: 26.08.2024 Accepted: 13.04.2025 Published: 19.05.2025

Production of HTLV-1 Protease Recombinant Molecule Fused to Human IgG Fcγ1 (HTLV-1 Protease:hFcγ1) for Targeting HTLV-1-associated Diseases Treatment

Sanaz Ahmadi Ghezeldasht[1], Seyed Abdolrahim Rezaee[2], Raheleh Miri[1], Narges Valizadeh[2], Arman Mosavat[3]

Original Article

Abstract

Background: Northeast Iran is recognized as an endemic region for HTLV-1 virus. Given the increasing prevalence of HTLV-1-associated diseases in the country, prevention and achieving effective treatment are essential. The aim of the present study was to design and produce the HTLV-1 protease fused to the Fcγ1 fragment of human antibody in the *Pichia pastoris* yeast expression system for its use in designing a viral protease inhibitor in future studies.

Methods: Following the design of the HTLV-1 protease:hFcγ1 gene construct, the optimized gene was inserted into the XhoI and NotI restriction sites of the pPICZαA expression vector. First, the recombinant plasmid was transformed into E. coli TOP10F' using the calcium chloride method and then electroporated into *Pichia pastoris* GS115. Recombinant clones containing the gene were selected and grown on zeocin-containing culture medium. Finally, SDS-PAGE and Western blotting were performed to confirm the expression of the recombinant protein.

Findings: In the present study, the design, cloning, and expression of the recombinant protein HTLV-1 protease:hFcγ1, utilizing the two elements HTLV-1 protease and human hFcγ1 molecule, were performed in the *Pichia pastoris* expression system. The recombinant protein HTLV-1 protease:hFcγ1 is a heavily glycosylated homodimer with a pI of 3.8 and an Mw of 50 kDa. The correct insertion of the recombinant construct into the pPICZαA expression vector was confirmed using AOX1 and α-factor primer pairs, amplifying fragments of 1388 bp and 1687 bp, respectively

Conclusion: The results of this research could provide a promising strategy for employing the recombinant protein HTLV-1 protease:hFcγ1 in designing suitable candidates for viral protease inhibitors and treating HTLV-1-associated diseases.

Keywords: HTLV-1 protease; Human Fc gamma 1; *Pichia pastoris*; Recombinant protein HTLV-1 protease:hFcγ1

Citation: Ahmadi Ghezeldasht S, Rezaee SA, Miri R, Valizadeh N, Mosavat A. **Production of HTLV-1 Protease Recombinant Molecule Fused to Human IgG Fcγ1 (HTLV-1 Protease: hFcγ1) for Targeting HTLV-1-associated Diseases Treatment.** J Isfahan Med Sch 2025; 43(808): 224-33.

1- Blood Borne Infections Research Center, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Razavi Khorasan, Mashhad, Iran
2- Association Professor, Immunology Research Center, Inflammation and Inflammatory Diseases Division, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3- Blood Borne Infections Research Center, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Razavi Khorasan, Mashhad, Iran
Corresponding Author: Arman Mosavat, Blood Borne Infections Research Center, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Razavi Khorasan, Mashhad, Iran; Email: Mosavat@acecr.ac.ir