مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹٤/هفته سوم شهریور ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۲۵

کلونینگ، بیان و ارزیابی فعالیت اگزوتوکسین A نوترکیب سودوموناس آئروژینوزا

دکتر جهانگیر لنگری[۱]، دکتر مجید گل‌کار[۲]، دکتر حسین خان‌احمد[۳]، دکتر مرتضی کریمی‌پور[۴]، رقیه آرزومند[۵]، رمضان بهزادی[۶]، دکتر رضا آهنگری کهن[۷]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: امروزه در بسیاری از مطالعات مربوط به درمان سرطان‌های مختلف، از هدفمند نمودن ترکیبات سمی علیه سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود. یکی از این ترکیبات بسیار مؤثر، اگزوتوکسین A سودوموناس می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی بیان و تخلیص و ارزیابی فرم کوتاه شده‌ای از این توکسین در سیستم بیانی پروکاریوتی بود.

روش‌ها: در ابتدا توالی فرم کوتاه شده‌ی توکسین (PE۳۸) با استفاده از پرایمرهای دارای جایگاه برش آنزیمی HindIII و NdeI از روی وکتور pUC-۵۷ حاوی این ژن تکثیر شد. بعد از برش آنزیمی، داخل وکتور pET-۲۶b خطی شده با این آنزیم‌های برشی کلون گردید. ارزیابی و تأیید ساختار وکتور نوترکیب به وسیله‌ی هضم آنزیمی و تعیین توالی، مورد بررسی قرار گرفت. وکتور نوترکیب به داخل باکتری‌های BL۲۱(DE۳)، BL۲۱(DE۳)plysS و Rosetta ترانسفورم شد و بعد از بیان و تخلیص توکسین، ارزیابی عملکرد آن در سلول‌های یوکاریوتی HUVEC و ۲۹۳KDR انجام شد.

یافته‌ها: توالی ژن توکسین با موفقیت تکثیر گردید و با هضم آنزیمی و تعیین توالی صحت کلونینگ اثبات گردید. وکتور نوترکیب در E. coli (Escherichia coli) بیان و به وسیله‌ی توالی هیستیدینی با موفقیت تخلیص گردید. در نهایت، توکسیسیتی توکسین تخلیص شده توسط آزمایش MTT (۳-(۵،۴-Dimethylthiazol-۲-yl)-۵،۲-diphenyltetrazolium bromide) بر روی دو رده‌ی سلول یوکاریوتی ۲۹۳KDR و HUVEC مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: با توجه به ساخت موفقیت‌آمیز وکتور نوترکیب pET-۲۶b-PE۳۸ و ترانسفورم آن به داخل سلول‌های پروکاریوتی، میزان بیان در سلول‌های مختلف E. coli متفاوت بود؛ به گونه‌ای که میزان بیان آن در BL۲۱(DE۳) بیشتر بود. از آن جایی که قسمت اتصالی توکسین در فرم کوتاه شده وجود ندارد، بنابراین در ارزیابی سلولی بر اساس مطالعه‌ی قبلی، دوز کشندگی آن بیش از هزار برابر بیشتر از نوع هدفمند شده‌ی آن با عامل رشد عروقی VEGF۱۲۱ می‌باشد.

واژگان کلیدی: اگزوتوکسین A سودوموناس آئروژینوزا، PE۳۸، کلونینگ، بیان

ارجاع: لنگری جهانگیر، گل‌کار مجید، خان‌احمد حسین، کریمی‌پور مرتضی، آرزومند رقیه، بهزادی رمضان، آهنگری کهن رضا. **کلونینگ، بیان و ارزیابی فعالیت اگزوتوکسین A نوترکیب سودوموناس آئروژینوزا.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۴): ۱۱۱۸-۱۱۱۰

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی دارویی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲- استادیار، بخش انگل‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، بخش پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۵- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۶- کارشناس، انستیتو پاستور ایران، واحد شمال، آمل، ایران
۷- استادیار، بخش رفرانس هاری، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مرتضی کریمی‌پور
Email: mortezakarimi@pasteur.ac.ir

مقدمه

اگزوتوکسین A سودوموناس آئروژینوزا (PE) یک پروتئین باکتریایی تک زنجیره‌ی ۶۶ KDa می‌باشد که سلول‌های یوکاریوتی را با ADP-ریبوزیله کردن عامل ۲ یوکاریوتی (EF-۲) مهار می‌کند (۱). مطالعات کریستالوگرافی به وسیله‌ی اشعه ایکس، سه دومین ساختاری برای این توکسین مشخص کرده است: دومین I یا دومین اتصالی به گیرنده که شامل اسیدهای آمینه‌ی ۲۵۲-۱ و ۴۰۴-۳۶۵ می‌باشد، دومین II یا دومین انتقالی که شامل اسیدهای آمینه‌ی ۳۶۴-۲۵۳ می‌باشد و دومین III یا دومین آنزیمی که شامل اسیدهای آمینه‌ی ۶۱۳-۴۰۵ می‌باشد (۴-۱).

فعالیت سیتوتوکسیسیتی اگزوتوکسین مربوط به دومین آنزیمی آن می‌باشد که سنتز پروتئین را از طریق ADP-ریبوزیله کردن EF-۲ مهار می‌کند. با ایجاد تغییرات ژنتیکی روی PE می‌توان از آن به عنوان یک ترکیب ضد سرطانی استفاده نمود. محققان دومین اتصالی توکسین را با آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه کانسرهای مختلف جایگزین می‌نمایند. هنگامی که آنتی‌بادی به گیرنده‌های سلول‌های سرطانی متصل می‌شود، توکسین وارد سلول می‌شود و آن‌ها را از بین می‌برد. PE۳۸KDEL فرم کوتاه شده‌ای از اگزوتوکسین می‌باشد که دومین Ia (اسیدهای آمینه‌ی ۲۵۲-۱) آن و قسمتی از دومین Ib (اسیدهای آمینه‌ی ۳۸۰-۳۶۵) حذف شده است. همچنین برای کارایی بهتر توکسین در داخل سیتوزول سلول‌های یوکاریوتی، اسیدهای آمینه‌ی انتهای کربوکسی (اسیدهای آمینه‌ی ۶۱۳-۶۰۹) که توالی REDLK نام دارد، نیز با توالی KDEL جایگزین شده است.

در این مطالعه نشان داده شد که توکسین PE۳۸KDEL در باکتری اشرشیاکلی با قرار گرفتن در وکتور pET -۲۶b تحت پروموتور T۷ پلیمراز بیان می‌شود. بیان این پروتئین نوترکیب به صورت انکلوژن بادی بود و به وسیله‌ی کروماتوگرافی افینیتی نیکل تخلیص گردید.

روش‌ها

ساخت پلاسمید نوترکیب

از وکتور نوترکیب pUC۵۷-VEGF-PE۳۸ به عنوان الگو جهت انجام PCR (Polymerase chain reaction) استفاده گردید. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده‌ی زیر با پروتکل دمایی ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۰°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت یک دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد:

Primer PE۳۸ forward (باز ۴۹):

GAGACATATGCATCATCATCATCATCAT GGTGGAAGCCTGGCCGCGCTG

Primer PE۳۸ reverse (باز ۳۴):

GAGAAAGCTTTCATTATAACTCGTCCTT CGGCGG

قطعه‌ی تکثیر شده به وسیله‌ی کیت استخرج از ژل (Thermo scientific) خالص‌سازی گردید. همزمان با آن وکتور pET-۲۶b با آنزیم‌های NdeI (Thermo scientific) و HindIII خطی شد. در نهایت، قطعه‌ی تکثیر شده به داخل وکتور خطی شده توسط آنزیم T۴ لیگاز متصل گردید. سپس به روش استاندارد شوک گرمایی (۵) به داخل سلول‌های TOP۱۰ ترانسفورم گردید. کلنی‌های به

دست آمده به روش Colony PCR غربالگری شد. در نهایت، از کلنی‌های مثبت، استخراج پلاسمید انجام شد. پلاسمید نوترکیب حاصل به روش هضم آنزیمی با آنزیم‌های NdeI و HindIII و تعیین توالی DNA تأیید گردید.

بیان توکسین در باکتری E.coli

وکتور نوترکیب بیانی pET۲۶b–PE۳۸ به باکتری‌های BL۲۱(DE۳)، BL۲۱(DE۳)plysS و Rosetta با روش کلسیم کلراید ترانسفرم گردید. سلول‌های ترانسفرم شده بر روی پلیت‌های کانامایسین‌دار پخش گردید و سپس این پلیت‌ها به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷ ^{o}C انکوبه گردید. سپس از هر پلیت، یک کلنی به LB ۴ ml (Lysogeny broth) حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت ۲۵ µg/ml اضافه گردید و در $OD_{۶۰۰}$ (Optical density در ۶۰۰ nm) کمتر از ۰/۵ با IPTG (Isopropyl β–D–۱–thiogalactopyranoside) با غلظت نهایی ۰/۳ mM القا گردید و شبانه در ۳۷ ^{o}C با دور ۱۲۰ rpm انکوبه شد. سپس پلت ۱ ml (نمونه‌ی بعد القا) از تمام کشت‌ها تهیه شد. در ادامه، نمونه‌های قبل و بعد القا بر روی ژل SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis) ۱۲ درصد الکتروفورز شد.

بررسی محلول یا نامحلول بودن پروتئین بیان شده

برای تشخیص محلول یا نامحلول بودن PE۳۸، پلت حاصل از ۱ ml کشت شبانه‌ی باکتری در ۱۰۰ µl بافر PBS (Phosphate buffered saline) حل و سونیکه گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سوپ و پلت آن از هم جدا گردید و با بافر لودینگ مخلوط شد. بعد از ۵ دقیقه جوشاندن به همراه نمونه‌ی قبل القا و نمونه‌ی بعد القا، روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد اعمال گردید.

حذف ناخالصی از انکلوژن بادی توکسین

ابتدا ۳ پلت ۱ ml از کشت شبانه‌ی باکتری تهیه شد و دو بار با ۵۰۰ µl بافر (Tris-Cl ۱۰ mM، EDTA ۴ mM یا Ethylenediaminetetraacetic acid، pH = ۵) شستشو داده شد. پلت نهایی در ۳۰۰ µl بافر (Tris-Cl ۱۰ mM، NaCl ۳۰ mM، ۴ mM EDTA، pH = ۵) حل شد و سپس سونیکه و سانتریفیوژ گردید. سپس پلت‌های حاصل در ۳۰۰ µl بافر حاوی Triton X–۱۰۰ با غلظت ۳ درصد (۳ درصد Triton X–۱۰۰، ۴ mM EDTA، ۱۰ mM Tris-Cl) سوسپانسیون شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط شد. بعد از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه، سوپ رویی برداشته شد. سپس پلت‌های باقی مانده در ۳۰۰ µl بافر حاوی اوره (Urea ۲ M، NaCl ۳۰ mM، ۴ mM EDTA، Tris-Cl ۱۰ mM) حل شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط و سانتریفیوژ گردید. در ادامه، پلت‌ها دوباره در ۱۰۰۰ µl بافر (Tris-Cl ۱۰ mM و EDTA ۴ mM) حل و سانتریفیوژ شد و سوپ رویی برداشته شد. سپس تمام نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد اعمال گردید.

تخلیص انکلوژن بادی

انکلوژن بادی شستشو داده شده در مرحله‌ی قبل، در بافر باینـدینگ (Urea ۸ M، NaCl ۵۰۰ mM، Tris-Cl ۵۰ mM، Imidazole ۵ mM، ۲–ME ۵ mM، pH = ۷/۲) حل و به مدت ۳–۲ ساعت در دمای اتاق مخلوط شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی به

روی ستون نیکل (Qiagen) از قبل آماده‌سازی شده منتقل و از آن عبور داده شد. ستون با بافرهای شستشوی ۱ (Urea ۴ M، NaCl ۵۰۰ mM، ۵۰ mM Tris-Cl، Imidazole ۱۰ mM، ۱ Triton X-۱۰۰ درصد، ۲-ME ۵ mM، pH = ۷/۲) و شستشوی ۲ (Urea ۲ M، NaCl ۵۰۰ mM، Tris-Cl ۵۰ mM، Imidazole ۱۵ mM، ۲-ME ۵ mM، pH = ۷/۲) و شستشوی ۳ (Urea ۲ M، NaCl ۵۰۰ mM، Tris-Cl ۵۰ mM، Imidazole ۲۰ mM، ۵ mM ۲-ME، pH = ۷/۲) شستشو داده شد و به وسیله‌ی بافر Elution (Urea ۰/۵ M، NaCl ۵۰۰ mM، Tris-Cl ۵۰ mM، Imidazole ۵۰۰ mM، ۲-ME ۵ mM، pH = ۷/۲) تخلیص گردید.

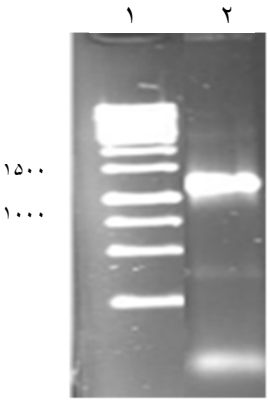
ارزیابی In vitro

از جمله آزمایش‌هایی که برای ارزیابی اثر ترکیبات بر روی سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش MTT (۳-(۵،۴-Dimethylthiazol-۲-yl)-۵،۲-diphenyltetrazolium bromide) می‌باشد. در این آزمایش، بعد از افزودن ترکیب مورد نظر به سلول، میزان حیات کشت سلولی سنجیده می‌شود. بنابراین در این مطالعه نیز از این آزمایش برای ارزیابی توکسین استفاده شد. در این روش، ۸۰۰۰ سلول (USA، SBT۰۲۱-۲۹۳) KDR و ۱۰۰۰۰ سلول HUVEC (ATCC No.CRL-۱۷۳۰) به داخل چاهک‌ها اضافه گردید و با محیط کشت به حجم ۲۰۰ µl رسانده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ °C دارای CO_2، توکسین تخلیص شده در غلظت‌های متفاوت از ۰/۰۱-۱۰۰۰۰ nM به چاهک‌ها اضافه گردید. در ادامه، میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای به انکوباتور منتقل و بعد از ۷۲ ساعت، ۳۰ µl از محلول MTT (۵ mg/ml) به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. در مرحله‌ی بعد، محلول رویی خالی گردید و مقدار ۱۰۰ µl از محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. بعد از حل کردن کریستال‌های فورمازان تشکیل شده، جذب نمونه در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد.

یافته‌ها

ساخت سازه‌ی pET۲۶b-PE۳۸

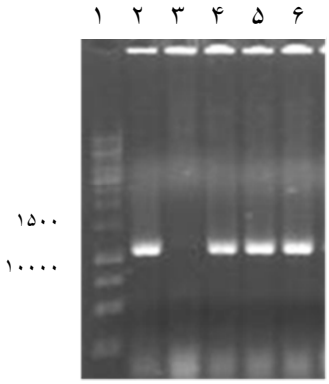
PCR ژن PE۳۸ بر روی وکتور حاوی آن با استفاده از پرایمرهای مورد نظر انجام گرفت و همان‌طور که در شکل مشخص شده است، محصولی در حدود ۱۱۰۰ جفت بازی تکثیر شده است (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز ژل آگاروز محصول PCR (Polymerase chain reaction) ژن E۳۸.
ستون ۱: نشانگر ۱ Kb شرکت Fermentas،
ستون ۲: باند محصول PCR

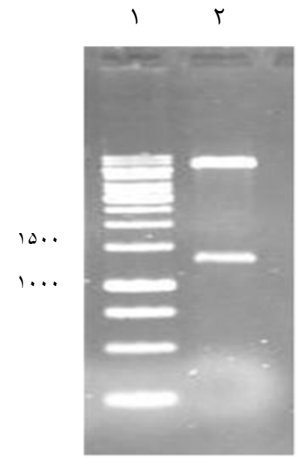
محصول PCR ژن PE۳۸ هضم شده با آنزیم‌های مربوط به داخل وکتور بیانی pET-۲۶b کلون گردید

و به داخل سلول‌های TOP۱۰ ترانسفورم گردید. با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، کلنی‌های مثبت انتخاب شدند (شکل ۲).



شکل ۲. ژل الکتروفورز محصول PCR کلنی‌های حاصل از ترانسفورماسیون وکتور نوترکیب حاوی ژن PE۳۸
ستون ۱: نشانگر Kb ۱ شرکت Fermentas،
ستون ۶-۲: محصول PCR کلنی‌های حاصل از ترانسفورماسیون

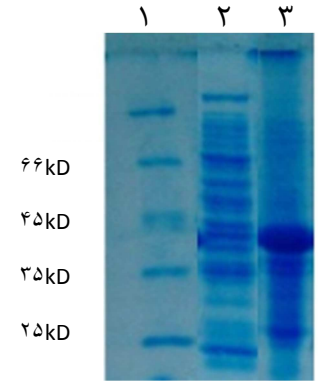
از کلنی‌های مثبت پلاسمید استخراج شد و وجود ژن PE۳۸ به وسیله‌ی هضم آنزیمی با HindIII و NdeI تأیید گردید (شکل ۳).



شکل ۳. هضم آنزیمی وکتور نوترکیب: ستون ۱: نشانگر Kb ۱ شرکت Fermentas، ستون ۲: محصول برش داده شده با آنزیم HindIII و NdeI. همان‌طور که مشاهده می‌شود باند حدود ۱۱۰۰ bp بعد از هضم آنزیمی از وکتور خارج شده است

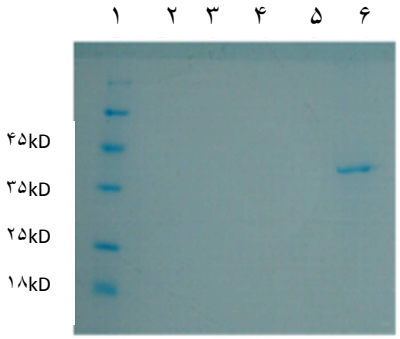
بیان پروتئین PE۳۸

وکتور نوترکیب pET-۲۶b-PE۳۸ به داخل سلول‌های BL۲۱(DE۳) ترانسفورم و میزان بیان آن ارزیابی شد (شکل ۴).



شکل ۴. بیان پروتئین نوترکیب PE۳۸ در میزبان L۲۱(DE۳)
ستون ۱: نشانگر پروتئین، ستون ۲: نمونه‌ی قبل القا،
ستون ۳: نمونه‌ی بعد القا. همان‌طور که در شکل مشخص است، باند برجسته‌ای در نمونه‌ی بعد القا دیده می‌شود

در ادامه، انکلوژن بادی به دست آمده در بافر اوره‌ی M ۸ حل گردید و با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل تخلیص گردید (شکل ۵).



شکل ۵. تخلیص پروتئین نوترکیب PE۳۸ با استفاده از ستون کروماتوگرافی اختصاصی نیکل: ستون ۱: نشانگر پروتئین، ستون ۲: نمونه‌ی Flow through، ستون‌های ۳، ۴ و ۵: نمونه‌ی شستشو، ستون ۶: نمونه‌ی تخلیص. همان‌طور که مشاهده می‌شود، باند ۳۸ KDa در نمونه‌ی تخلیص از ستون خارج شده است

ارزیابی پروتئین PE۳۸

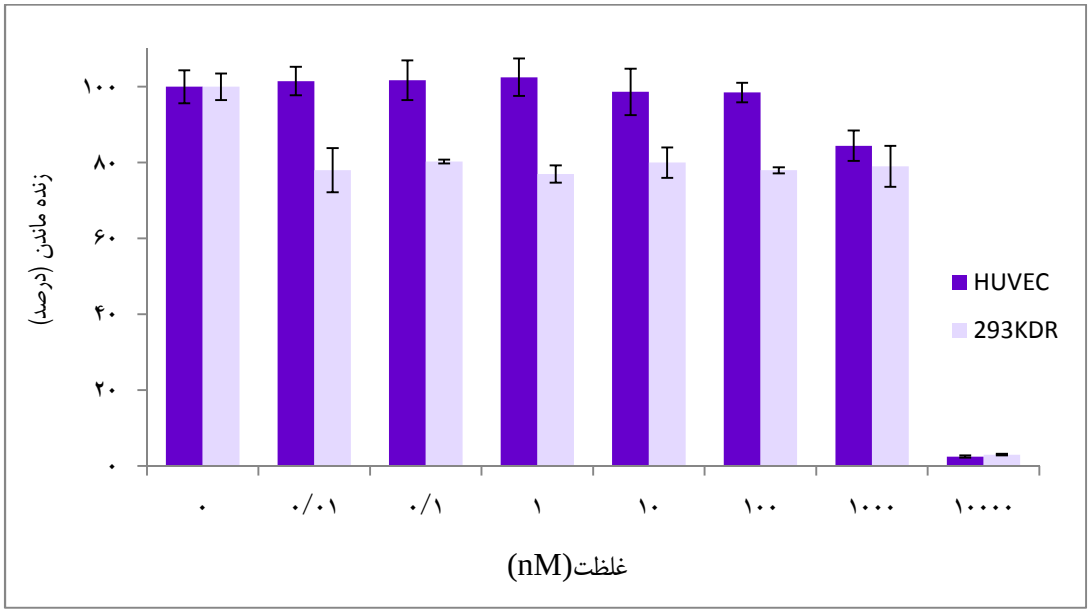
غلظت‌های متفاوتی از پروتئین PE۳۸ بر روی دو رده‌ی سلولی HUVEC و ۲۹۳KDR اثر داده شد که در هر دو مورد IC۵۰ به دست آمده بالاتر از ۱۰۰۰ nM بود (شکل ۶).

بحث

مطالعات کریستالوگرافی توکسین PE نشان داد که این توکسین از سه دومین ساختاری تشکیل شده است (۱) که هر یک از دومین‌ها عملکرد متفاوتی دارند (۲). دومین Ia (اسیدهای آمینه‌ی ۲۵۲-۱) دومین اتصالی به سلول است که توکسین به وسیله‌ی آن به گیرنده‌ی α۲ ماکروگلوبولین که در سطح بسیاری از سلول‌های طبیعی و سرطانی وجود دارد، متصل می‌شود. دومین II (اسیدهای آمینه‌ی ۳۶۴-۲۵۳) دومین انتقالی می‌باشد که توانایی انتقال انتهای کربوکسیلی توکسین (اسیدهای آمینه‌ی ۶۱۳-۲۸۰) به داخل سیتوزول را دارد (۲).

دومین III (اسیدهای آمینه‌ی ۶۱۳-۳۹۶) دومین ADP (Adenosine diphosphate) ریبوزیله کننده می‌باشد که با ADP ریبوزیله کردن EF-۲ باعث مهار سنتز پروتئین و در نهایت، مرگ سلولی می‌شود. دومین Ib عملکرد خاصی نداشته و می‌تواند بدون این که تأثیری در فعالیت توکسین داشته باشد، حذف گردید (۲).

مطالعات انجام شده در مورد ارتباط ساختار-عملکرد توکسین PE باعث ایجاد فرم‌های کوتاه شده‌ای از توکسین می‌گردد که امروزه برای ساخت ایمنوتوکسین‌ها استفاده می‌شود. PE۳۸ یک چنین فرم کوتاه شده‌ای از توکسین می‌باشد که در آن دومین Ia (اسیدهای آمینه‌ی ۲۵۲-۱) و قسمتی از دومین Ib (۳۸۰-۳۶۵) حذف گردیده است. از آن جایی که دومین Ia در توکسین حذف شده است، مولکول نمی‌تواند به سلول متصل شود.



شکل ۶. اثر سمیت سلولی غلظت‌های متفاوت از پروتئین PE۳۸ بر روی دو رده‌ی سلولی HUVEC و ۲۹۳KDR به روش MTT assay (۳-(۵،۴-Dimethylthiazol-۲-yl)-۵،۲-diphenyltetrazolium bromide)

در PE۳۸KDEL اسیدهای آمینه‌ی انتهایی PE۳۸ (۶۱۳-۶۰۹) در انتهای کربوکسیلی با اسیدهای آمینه‌ی KDEL جایگزین شده است که این باعث انتقال آسان‌تر ایمنوتوکسین‌ها به داخل سیتوزول و کارایی بهتر آن‌ها می‌گردد (۴). در مطالعه‌ی حاضر، بیان توکسین PE۳۸KDEL با استفاده از وکتور pET-۲۶b بهینه شد. این پروتئین در این وکتور به صورت انکلوژن بادی بیان گردید که انکلوژن بادی‌ها بعد از شستشو به وسیله‌ی کروماتوگرافی اختصاصی نیکل تخلیص شدند. همچنین سیتوتوکسیسیتی توکسین در سلول‌های HUVEC و ۲۹۳KDR با آزمایش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که PE۳۸ در غلظت‌های بسیار بالاتر از ۱۰۰۰ nM می‌تواند برای این سلول‌ها سمی باشد. در حالی که در فرم‌های هدفمند شده با لیگاندها و آنتی‌بادی‌های مختلف می‌تواند در غلظت‌های بسیار کمتر برای سلول‌های سرطانی اثر سمی داشته باشد. وجود این اختلاف غلظت در شکل توکسین به تنهایی و شکل کانژوگه نشان می‌دهد که می‌توان این توکسین را به عنوان کاندیدای مناسبی جهت تولید ایمنوتوکسین‌ها بر علیه سلول‌های سرطانی استفاده نمود.

مقایسه‌ی غلظت‌های به دست آمده در این مطالعه با شکل متصل به عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF یا Vascular endothelial growth factor)، تفاوت بیش از ۱۰۰ برابری را نشان داد. تفاوت اثر مشاهده شده را می‌توان به نداشتن خاصیت سمیت اختصاصی این توکسین بر علیه سلول‌های مورد مطالعه توصیف نمود.

مطالعات مختلفی بر روی ایمنوتوکسین‌های دیگر نیز نشان داده است که این پروتئین می‌تواند پتانسیل خوبی در راستای اهداف درمانی داشته باشد؛ به گونه‌ای که در حال حاضر، چندین ایمنوتوکسین حاوی PE در کارآزمایی‌های بالینی در مراحل I-III قرار دارند (۱۰-۶). البته تمام این این ایمنوتوکسین‌ها سندرم نشت عروقی را القا می‌کنند که این سندرم کارایی ایمنوتوکسین‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲-۱۱).

بعضی مطالعات نشان داده‌اند که وجود توالی X(D)Y توکسین در بروز این پدیده مؤثر است (۱۴-۱۳). آن چه که در این مورد در این توکسین دیده می‌شود، وجود سه توالی X(D)Y شامل دو توالی GDL و یک توالی GDV در آن می‌باشد (۱۵). بنابراین گام بعدی در این زمینه، ایجاد موتاسیون‌های مختلف در این توالی‌ها در جهت کاهش و حتی حذف سندرم نشت عروقی با استفاده از پیش‌بینی فعالیت- ساختار به صورت In silico و ایجاد یک توکسین توانمندتر و مؤثرتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت‌های مالی اداره‌ی آموزش (پایان‌نامه‌ی دانشجویی دکترای تخصصی) در بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران انجام شده است.

References

1. Allured VS, Collier RJ, Carroll SF, McKay DB. Structure of exotoxin A of Pseudomonas aeruginosa at 3.0-Angstrom resolution. Proc Natl Acad Sci U S A 1986; 83(5): 1320-4.
2. Hwang J, Fitzgerald DJ, Adhya S, Pastan I. Functional domains of Pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in E. coli. Cell 1987; 48(1): 129-36.

3. Chaudhary VK, Xu YH, FitzGerald D, Adhya S, Pastan I. Role of domain II of Pseudomonas exotoxin in the secretion of proteins into the periplasm and medium by Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85(9): 2939-43.
4. Kreitman RJ, Pastan I. Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of Pseudomonas exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. Biochem J 1995; 307(Pt 1): 29-37.
5. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
6. Pai LH, Wittes R, Setser A, Willingham MC, Pastan I. Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: an antibody linked to Pseudomonas exotoxin. Nat Med 1996; 2(3): 350-3.
7. Pastan I. Immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin A: a short history. Cancer Immunol Immunother 2003; 52(5): 338-41.
8. Kreitman RJ, Wilson WH, White JD, Stetler-Stevenson M, Jaffe ES, Giardina S, et al. Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. J Clin Oncol 2000; 18(8): 1622-36.
9. Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M, Stetler-Stevenson M, Fitzgerald DJ, et al. Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. N Engl J Med 2001; 345(4): 241-7.
10. Frankel AE, Neville DM, Bugge TA, Kreitman RJ, Leppla SH. Immunotoxin therapy of hematologic malignancies. Semin Oncol 2003; 30(4): 545-57.
11. Siegall CB, Liggitt D, Chace D, Tepper MA, Fell HP. Prevention of immunotoxin-mediated vascular leak syndrome in rats with retention of antitumor activity. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(20): 9514-8.
12. Baluna R, Vitetta ES. An in vivo model to study immunotoxin-induced vascular leak in human tissue. J Immunother 1999; 22(1): 41-7.
13. Baluna R, Rizo J, Gordon BE, Ghetie V, Vitetta ES. Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(7): 3957-62.
14. Smallshaw JE, Ghetie V, Rizo J, Fulmer JR, Trahan LL, Ghetie MA, et al. Genetic engineering of an immunotoxin to eliminate pulmonary vascular leak in mice. Nat Biotechnol 2003; 21(4): 387-91.
15. Siegall CB, Liggitt D, Chace D, Mixan B, Sugai J, Davidson T, et al. Characterization of vascular leak syndrome induced by the toxin component of Pseudomonas exotoxin-based immunotoxins and its potential inhibition with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Clin Cancer Res 1997; 3(3): 339-45.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 20.04.2014
Vol. 32, No. 293, 3rd Week, September 2014
Accepted: 16.07.2014

Cloning, Expression and Evaluation of Pseudomonas Aeruginosa Exotoxin A

Jahangir Langari[1], Majid Golkar PhD[2], Hossein Khanahmad PhD[3], Morteza Karimipoor PhD[4], Roghayeh Arezumand[5], Ramazan Behzadi[6], Reza Ahangari-Cohan PhD[7]

Original Article

Abstract

Background: Nowadays, in many studies related to the treatment of various cancers, toxic compounds are targeted against cancer cells. One of the most effective compounds is Pseudomonas exotoxin A. The purpose of this study was to investigate the expression, purification, and in-vitro evaluation of a short form of the toxin in a prokaryotic expression system.

Methods: The short form of the toxin (PE38) was amplified via polymerase chain reaction (PCR) using primers containing HindIII and NdeI restriction enzyme sites from pUC57-PE38. The polymerase chain reaction product was digested and subcloned in the pET-26b expression vector. The expression vector was separately transformed into the BL21(DE3), BL21(DE3) plys S and Rosetta Escherichia coli strains. Recombinant bacteria were cultured and induced and the resulted PE38 protein purified using metal affinity column chromatography. The toxicity effect of PE38 protein was assessed on HUVEC and 293KDR eukaryotic cells.

Findings: The gene was successfully cloned into the expression vector and the accuracy of construct was confirmed via restriction map analysis and sequencing. The expression was found more in BL21(DE3) than the other strains. The toxicity effect was observed at the same level for both HUVEC and 293KDR cells.

Conclusion: The lethal dose of truncated toxin is more than the previous study (1000-fold), where the targeted vascular endothelial growth factor (VEGF121) was fused to the truncated toxin.

Keywords: Pseudomonas auroginosa exotoxin A, PE38, Cloning, Expression

Citation: Langari J, Golkar M, Khanahmad H, Karimipoor M, Arezumand R, Behzadi R, et al. **Cloning, Expression and Evaluation of Pseudomonas Aeruginosa Exotoxin A.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(294): 1110-8

1- PhD Candidate, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Centre, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Molecular Medicine, Pasteur Institute of Iran, Amol, Iran
5- PhD Candidate, Department of Molecular Medicine, Pasteur Institute of Iran, Amol, Iran
6- Pasteur Institute of Iran, North Research Center, Amol, Iran
7- Assistant Professor, Department of Rabies, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Corresponding Author: Morteza Karimipoor PhD, Email: mortezakarimi@yahoo.com