

Original Article

Design and Production of Recombinant TAT Protein Structure, Catalytic Domain of Diphtheria Toxin, and Evaluation of Its Effect on Cell Line

Mohaddeseh Parvand¹, Fahimeh Nemati Mansour¹, Jafar Amani^{2*}

¹Department of
Biotechnology, Faculty of
New Sciences &
Technologies,
Pharmaceutical Sciences
Branch, Islamic Azad
University, Tehran, Iran.

²Applied Microbiology
Research Center, Systems
Biology &
Poisonings Institute, Baqiyat
allah University of Medical
Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding Author:
Jafar Amani; Applied
Microbiology Research
Center, Systems Biology &
Poisonings Institute,
Baqiyatallah University of
Medical Sciences, Tehran,
Iran.

Email:
jafar.amani@gmail.com

Received: 30 May, 2019
Accepted: 15 Oct, 2019

Abstract

Background and Objectives: Cancer is one of the most deadly diseases in the present age and its conventional therapies have had low success. Toxin therapy of cancer is a new therapeutic approach, which has attracted the attention of pharmaceutical specialists. Diphtheria toxin consists of three functional, transducing, and binding domains, that the functional part inhibits protein synthesis and causes cell death. The purpose of this study was to produce the functional domain of the diphtheria toxin fused with a TAT penetrating peptide and to investigate its degree of lethality on cell line.

Methods: In this study, primer was designed for *tat-diph* gene and the gene construct containing the sequence of the functional chain of diphtheria toxin and the TAT peptide sequence, were amplified and cloned into prokaryotic expression vector pET-28a containing a sequence of histidine. After transferring into bacterial host (*E. coli* BL21 DE3), induction of expression was performed using IPTG, then, the resulting protein was purified and the protein expression was confirmed by anti-histidine antibody attached to horseradish peroxidase (HRP) using western blotting technique. In the next step, the lethality of the produced chimeric protein, was evaluated on MCF7 cell line by MTT assay. Data were analyzed by uni pirate and oligo 6 software.

Results: The results of MTT assay indicated that the TAT-Diph recombinant protein adjacent to the MCF7 cell line increased the rate of mortality of the cells.

Conclusion: The results of this study revealed that the recombinant protein with functional domain of diphtheria toxin and AT peptide could have lethal effect on MCF7 cell line.

Keywords: Diphtheria toxin; Recombinant proteins; Peptides; TAT.

DOI: 10.29252/qums.13.9.19

طراحی و تولید سازه نو ترکیب پروتئین TAT و بخش عملکردی سم دیفتری و ارزیابی عملکرد آن بر روی لاین سلولی

محدثه پروند^۱، فهیمه نعمتی منصور^۱، جعفر امانی^{۲*}

چکیده

زمینه و هدف: سرطان، یکی از مهلک‌ترین بیماری‌هایی است که در عصر حاضر وجود دارد و درمان‌های مرسوم به آن نیز دارای موفقیت کمی بوده است. توکسین درمانی سرطان، از روش‌های درمانی نوینی است که مورد توجه متخصصان ساخت دارو قرار گرفته است. توکسین باکتری دیفتری شامل: سه بخش عملکردی، انتقال‌دهنده و اتصال‌دهنده بوده که بخش عملکردی آن باعث مهار سنتز پروتئین و مرگ سلول می‌شود. این مطالعه با هدف تولید بخش عملکردی توکسین دیفتری به همراه پپتید نفوذکننده TAT و بررسی میزان کشندگی آن بر روی لاین سلولی صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه، طراحی پرایمر برای قطعه ژنی *tat-diph* انجام شد و سازه ژنی حاوی توالی زنجیره عملکردی توکسین دیفتری و توالی پپتید TAT، تکثیر و در ناقل بیانی پروکاریوت، pET۲۸a حاوی دنباله هیستیدین کلون گردید. بعد از انتقال به میزبان باکتریایی (*E. coli* DE 21 BL 3)، القای بیان با IPTG صورت گرفت. سپس پروتئین حاصل تخلیص شد و پروتئین نو ترکیب با کمک آنتی‌بادی ضد هیستیدین متصل به HRP با استفاده از تکنیک وسترن‌بلات تأیید گردید. در مرحله بعد، میزان کشندگی پروتئین کایمیریک تولیدشده بر روی رده سلولی MCFV با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از MTT نشان داد پروتئین نو ترکیب TAT-Diph می‌تواند رده سلولی سرطانی MCFV را از بین ببرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد پروتئین نو ترکیب با بخش عملکردی توکسین دیفتری و پپتید TAT، می‌تواند بر روی رده سلولی MCFV اثر کشندگی داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: سم دیفتری؛ پروتئین نو ترکیب؛ پپتیدها؛ TAT.

^۱گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

^۲مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

جعفر امانی؛ مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

jafar.amani@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۹

تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۲۳

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Parvand M, Nemati Mansour F, Amani J. Design and production of recombinant TAT protein structure, catalytic domain of diphtheria toxin, and evaluation of its effect on cell line. Qom Univ Med Sci J 2019;13(9):19-33. [Full Text in Persian]

مقدمه

سرطان، یکی از کشنده‌ترین بیماری‌ها در سراسر جهان است. درمان‌های رایج سرطان مانند شیمی‌درمانی و اشعه‌درمانی دارای درصد بقا کمی بوده که علت آن پیشرفت تومور، مقاومت به درمان و عدم اختصاصیت درمان برای تومور می‌باشد. باکتری‌ها می‌توانند به‌طور اختصاصی تومورها را هدف قرار داده، به‌طور فعال در بافت نفوذ و جستجو کرده و به شکل کنترل‌شده‌ای ایجاد سمیت کنند (۱). یکی از روش‌های درمانی سرطان، استفاده از پروتئین‌های مؤثر جهت بلوکه کردن فعالیت‌های تکثیری سلول‌های سرطانی است. در این راستا، پروتئین درمانی معمول، همچنین پروتئین‌های هدف‌گذاری‌شده و هوشمند مورد استفاده قرار می‌گیرند. استراتژی جدید بیوترایی تومورهای خاص با استفاده از مهندسی ژنتیک، در اثر تولید پروتئین‌های هیبریدی بر توکسین‌های مهارکننده سنتز پروتئین و گیرنده‌های سلولی موجود بر روی سطح سلول‌های سرطانی می‌باشد (۲). بازدهی و تنوع‌پذیری توکسین دیفتری در نقل و انتقالات دارویی به‌عنوان پروتئین فعال مورد توجه است (۳). از طرفی، توکسین دیفتری در بین توکسین‌های باکتری‌های دیگر شناخته‌تر می‌باشد. یک پروآنزیم، از یک زنجیره تک پلی‌پپتیدی با وزن مولکولی ۵۸ کیلو دالتون ساخته شده است (۴). سم دیفتری به‌طور ذاتی دارای دمین‌های انتقال از غشا می‌باشد، این در حالی است که این دمین‌ها در بسیاری از توکسین‌های دیگر یافت نمی‌شوند. پدیده انتقال از غشا و رها شدن توکسین از اندوزوم، امری مهم تلقی می‌شود. باکتری برای ایجاد علائم، نیازی به ورود به خون ندارد. گیرنده توکسین، فاکتور اپیدرمی متصل به هپارین است که بر روی بسیاری از سلول‌های یوکاریوت، به‌ویژه سلول‌های قلبی و عصبی حضور دارد. در سلول‌های آلوده به توکسین، پس از توقف سنتز پروتئین، از همانندسازی DNA و رونویسی RNA جلوگیری می‌شود (۵). توکسین دیفتری از دو فاکتور A و B تشکیل شده که فاکتور A، فاکتور عملکردی و فاکتور B، فاکتور اتصال است. فاکتور A هنگامی که فاکتور B به مقدار کافی وجود داشته باشد اثر خود را اعمال می‌کند. جالب آنکه فاکتور B آنتی‌ژنی است که سبب تولید آنتی‌بادی محافظ در برابر بیماری می‌شود (۶).

توکسین دیفتری از طریق دو مکانسیم به سلول میزبان وارد می‌شود: (۱) ورود مستقیم که باعث تشکیل یک سوراخ در سطح غشا میزبان می‌شود؛ (۲) ورود غیرمستقیم که به‌وسیله اندوسیتوز وابسته به رسپتور انجام می‌گیرد (۵). پپتیدهای نفوذکننده به سلول CPP برای بهبود ترانسپورت داروهای مرتبط با آن‌ها و حامل‌های دارویی به درون سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۷). CPP، ابزار قدرتمندی را شکل می‌دهد که می‌توان از آن جهت تسهیل ترانسپورت داروها با پایه پروتئینی در شرایط آسیب‌شناسی؛ از جمله سرطان، بیماری‌های التهابی، نقایص در ارتباط با استرس اکسیداتیو، دیابت و آسیب مغزی استفاده کرد. پپتیدهای TAT نیز جزء این دسته از پروتئین‌ها هستند (۸). پپتیدهای CPP فرصت انتقال مولکول‌های دارویی را که ۲۰۰ بار بزرگتر از محدودیت اندازه داروهای زیستی در دسترس هستند، فراهم می‌آورند. محققان توانسته‌اند با استفاده از پپتیدهای CPP، لیپوزوم‌هایی با طول عمر بالا و چندین عملکرد تهیه کنند (۹). دومین‌های ترانسپورت پروتئین PTD به این دلیل پیشنهاد شده است که بعضی از پروتئین‌ها که اغلب فاکتورهای رونویسی هستند، می‌توانند به‌درون سلول‌ها یا از سلولی به سلول دیگر رفت‌وآمد کنند (۱۰). این مطالعه با هدف تولید سازه عملکردی از دومین توکسین دیفتری به همراه فیوژن پپتید TAT از خانواده پپتیدهای نفوذکننده به سلول CPP و ارزیابی عملکرد پروتئین کایمیریک در محیط آزمایشگاهی بر روی رده سلولی MCF 7 به‌عنوان نمونه‌ای از سلول‌های سرطان سینه انجام شد.

روش بررسی

در طراحی و آنالیز نرم‌افزاری پرایمرها جهت تکثیر ژن *tat-diph* ابتدا ژن کدکننده توالی اسیدآمینه‌ای توکسین دیفتری A بخش عملکردی (۶۲۳ بیس‌پیر) از سویه استاندارد کورینه باکتریوم دیفتریا (UniProt KB:Q6 KB 85) و ژن کدکننده پپتید TAT (اسیدآمینه‌های ۴۷-۵۷) مربوط به ویروس نقص ایمنی اکتسابی، بهینه‌سازی و سنتز گردید (۱۱). سپس توالی پرایمر رفت‌و برگشت طراحی با استفاده از نرم‌افزار الیگو ۶ (Inc. الیگو، DBA) و آنالیزهایی از قبیل درصد GC، میزان پرایمر دایمر و Tm انجام شد.

سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه و مجدداً به مدت ۵ دقیقه در یخ قرار گرفتند. در ادامه، به مقدار ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB به آن‌ها اضافه و به مدت یک ساعت در انکوباتور گذاشته شدند و پس از آن به محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (سیگما آلمان)، (غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) منتقل شدند.

تخلیص پلاسمید pET28a فاقد ژن هدف

از پلیت حاوی کلون‌های دارای پلاسمید pET28a به محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تلقیح شد، سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد درون شیکر انکوباتور انکوبه گردید؛ به منظور تخلیص پلاسمید pET28a، طبق پروتکل استخراج پلاسمید، از کیت استخراج (شرکت ژنت بיו کره جنوبی) استفاده شد.

واکنش Touch-up PCR جهت تکثیر ژن کایمریک *tat-diph* (۶۲۳bp)

واکنش Touch-up PCR با آنزیم پلیمراز *Pfu* و پلیمراز *DNA-Taq* (فرمنتاز روسیه) به شرح زیر انجام شد: ۱/۵ میکرولیتر و ۷/۵ ماکرولیتر منیزیم سولفات به اضافه بافر و ۱/۵ میکرولیتر از هر آغازگر، ۱/۵ میکرولیتر dNTP و ۱/۵ میکرولیتر از پلاسمید pET28a حاوی سازه ژنی *tat-diph* (شامل سویه استاندارد کورینه باکتریوم دیفتریا KE 85 UniProt KB:Q6) ژن کدکننده پپتید TAT مربوط به ویروس نقص ایمنی اکتسابی (۱۱) که قبلاً توسط شرکت بیوماتیک کانادا به عنوان الگو سنتز شده بود.

مراحل Touch-up PCR شامل: یک مرحله واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه، تکثیر قطعه موردنظر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه و در پایان، یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه بود. در نهایت، برای تأیید، محصول روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد.

آغازگر رفت دارای جایگاه برشی آنزیم *EcoRI* در ابتدای ۵' و آغازگر برگشت واجد جایگاه برشی آنزیم *Hind III* و کدون خاتمه رونویسی در انتهای ۳' ژن طراحی شد. آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت سیناژن سنتز شدند.

آغازگر رفت:

5'ATCATAGAATTCTATGGTCGCAAAAAGCGTCGTCAGCGCC
GTCGTGGCTCAATGGGCGCTGATGATGTAGTC3'
EcoRI

دما: ۹۲/۲ درجه سانتیگراد

آغازگر برگشت:

5'ATCATATAAGCTTTTAGTGGTGATGGTGATGGTGAG
CGCAGCGCTGCGCCATGTAC3'
Hind III

دما: ۸۹/۲ درجه سانتیگراد

جهت تهیه سلول‌های مستعد، سویه *E.coli* BL 21 DE3، به مدت ۱۵ ساعت بدون حضور آنتی‌بیوتیک در محیط کشت لوریا برتونی (شرکت سیگما آلمان) مایع در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و هوادهی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه کشت داده شد. پس از تلقیح و رسیدن به ۰/۶ OD، محیط کشت باکتری به مدت ۲۰ دقیقه در یخ قرار گرفت و به مدت ۳ دقیقه با ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید، سپس محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب، ۲۰ میلی‌لیتر کلسیم کلراید (سیگما آلمان)، ۱۰۰ میلی‌مولار سرد استریل اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ گذاشته شد. پس از این مرحله، محلول با ۶۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردید. مجدداً مراحل بالا با اضافه کردن ۵ میلی‌لیتر کلسیم کلراید ۱۰۰ میلی‌مولار و ۱ میلی‌لیتر گلیسرول استریل ۲۰٪ انجام گرفت. بعد از هم‌زدن آرام، محلول در لوله‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتر (در مقادیر ۲۰۰ میکرولیتر) تقسیم و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. انتقال واکنش لیگیشن به سلول‌های مستعد با روش شوک دمایی (شوگ گرما- سرما) انجام گرفت؛ بدین صورت که ابتدا واکنش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در داخل یخ قرار داده شدند،

همسانه سازی ژن *tat-diph* در ناقل *pET28a*

به منظور همسانه سازی، ابتدا واکنش هضم آنزیمی بر روی محصول PCR و پلاسمید بیانی *pET28a* حاوی ژن *tat-diph* با دو آنزیم محدودالایر *EcoRI* و *HindIII* (سینا کلون ایران) به مدت ۲ ساعت در میکروتیوب های جداگانه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد هضم آنزیمی انجام شد. محصول برش خورده با کمک کیت تخلیص محصول PCR (ژنت بیو) تخلیص شد. واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T4 لیگاز به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد انجام و با روش شوک حرارتی به میزبان /شرشیاکلی مستعد سویه، *E.coli* DE 21 (BL3) انتقال داده شد. برای بررسی صحت همسانه سازی، ابتدا از کلنی های رشد یافته بر روی پلیت حاوی محیط کشت L آگار (سیگما آلمان)، حاوی کانامایسین (غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) (شرکت سیگما آلمان) جهت انجام آنالیز کلنی ها استفاده شد. روش های زیر برای تأیید صحت همسانه سازی صورت گرفت:

الف: واکنش PCR: جهت تکثیر ژن کایمیریک *tat-diph* از واکنش کلنی PCR استفاده شد که برای انجام عمل PCR، ابتدا از ۱۵ کلون از کلنی های تشکیل شده، به صورت تصادفی مستر پلیت تهیه گردید، سپس هر کدام از این ۱۵ کلنی ها داخل ۱۵ ویال ۰/۲ حاوی ۲۵ میکرو لیتر آب مقطر دیونیزه پیتاژ شدند. در ادامه، به منظور تخریب دیواره باکتری، به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر، دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و از آن ها به عنوان DNA الگو برای واکنش PCR استفاده گردید. واکنش PCR با کمک جفت پرایمرهای طراحی شده و آنزیم *Taq* پلیمرز با دمای اتصال ۶۰ درجه سانتیگراد و ۲ میلی مولار کلرید منیزیم انجام شد.

ب) هضم آنزیمی پلاسمید و خروج قطعه مورد نظر: برای تأیید قطعه همسانه سازی، واکنش هضم آنزیمی با آنزیم های محدودالایر *EcoRI* و *Hind III* بر پلاسمید تخلیص شده با روش لیز قلیایی از کلنی های مثبت حاوی پلاسمید نو ترکیب به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد صورت گرفت.

بیان سازه ژن *tat-diph* - *pET28a*

پس از تأیید همسانه سازی، از کشت شبانه سویه های نو ترکیب واجد پلاسمید *pET28a-tat-diph* به میزان ۵۰ میکرو لیتر به

۵ میلی لیتر محیط LB حاوی غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر کانامایسین تلقیح شد و پس از رسیدن جذب نوری محیط کشت، در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ۰/۸-۰/۶ القا کننده IPTG با غلظت ۱ میلی مولار به محیط کشت اضافه و سلول ها (به مدت ۴ ساعت در شبانه روز، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه) در شیکر انکوباتور نگهداری شدند. پس از طی مدت زمان مذکور، سلول ها سانتریفوژ و جمع آوری شدند. نمونه های جمع شده جهت بررسی بیان با Sample Buffer با رقت ۱X مخلوط و پس از جوشانیدن به مدت ۱۰ دقیقه بر روی ژل 10% SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۲).

تعیین میزان محلول و غیر محلول بودن پروتئین

به منظور تعیین حلالیت پروتئین نو ترکیب، رسوب سلولی حاصل از بیان باکتری با استفاده از بافر لیز کننده (حاوی لیزوزیم با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر) لیز شد، سپس بعد از انجام سانتریفوژ به مدت ۳ دقیقه، محلول رویی به عنوان فاز محلول جداسازی و در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. به رسوب باقی مانده مقدار یک میلی لیتر بافر لیز کننده با pH=۸ (حاوی اوره ۸ مولار) افزوده و به مدت یک ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد و پس از انجام سانتریفوژ به مدت ۳ دقیقه، محلول رویی به عنوان فاز نامحلول در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. هر نمونه به همراه نشانگر پروتئینی روی ژل 10% SDS-PAGE الکتروفورز و بررسی انجام گرفت.

تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی**:Ni-NTA**

تخلیص پروتئین نو ترکیب به وسیله ستون کروماتوگرافی، میل ترکیبی Ni-NTA، با روش دنا توره و طبیعی انجام گرفت. نمونه های تخلیص روی ژل 10% SDS-PAGE الکتروفورز شدند (۱۲، ۱۳).

تأیید پروتئین نو ترکیب

برای تأیید پروتئین نو ترکیب بیان شده، از روش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی Anti-His tag متصل به HRP استفاده شد. پس از الکتروفورز، پروتئین کایمر با استفاده از بافر انتقال (گلاسیسین ۳۹ میلی مولار، تریس ۴۸ میلی مولار، 3% SDS و متانول ۲۰٪) به کاغذ نیتروسلولز انتقال داده شد.

کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر بلوکه کننده (۵ گرم Skim Milk (راما مهر آریا ایران) در ۱۰۰ میلی لیتر ۱ X TBS) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، انکوباسیون انجام گرفت. آنتی بادی ضد هیستیدین با رقت ۱:۱۰۰۰ در داخل بافر ۱X TBS تهیه و روی غشای PVDF (سیگما آلمان) ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، داخل شیکر انکوباتور قرار گرفت، سپس سه بار با بافر TBS و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه شست و شو داده شد. سوپسترای DAB و H₂O₂ 30% به عنوان کاتالیزور به غشا افزوده شد و پس از ظهور باندها، واکنش با آب مقطر مهار گردید (۱۲).

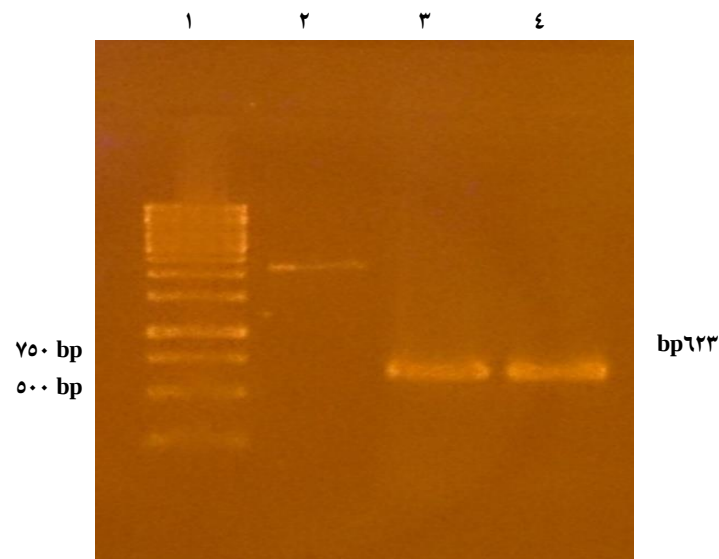
بررسی میزان کشندگی پروتئین های نو ترکیب به روش MTT

به منظور بررسی میزان تکثیر سلول ها، از تست MTT استفاده شد؛ بدین منظور ۵۰ میلی گرم پودر MTT (بیو وست آمریکا) را در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه (کیما تهران اسید، ایران) کاملاً حل کرده و با فیلتر ۰/۲ میکرون (شرکت سیگما آلمان) فیلتر شد، سپس در حجم های ۱/۵ میلی لیتری تقسیم و در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. رقت های مختلف پروتئین بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر به چاهک ها اضافه گردید. سلول MCF 7 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در ظرف (شرکت سیگما آلمان) نگهداری شد. سلول ها در فلاسکی کشت داده شدند و پس از جمع آوری در لوله فالكون (شرکت پارس آزما ایران)، در ۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس در میکروپلیت ۹۶ خانه ای به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دی اکسید کربن ۵٪ (شرکت سیگما آلمان) انکوبه گردید و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مجاورت، مورد بررسی قرار گرفت.

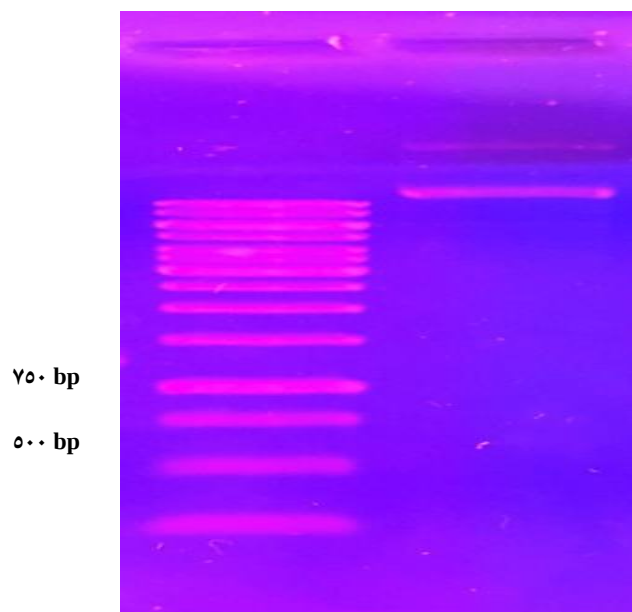
پس از اتمام دوره انکوباسیون در ساعت های فوق، به میزان ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک اضافه شد (غلظت نهایی رنگ معادل ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر است)، سپس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و دی اکسید کربن ۵٪ انکوبه گردید. پس از طی این زمان، در پی بررسی و تشکیل بلورهای بنفش رنگ با میکروسکوپ (T1-SM - نیکون ژاپن) محلول رویی سلول ها را به آرامی جمع آوری و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حلال کریستال (DMSO) D 4540 (سیگما آلمان) به آن اضافه کرده و با پیپتاژ کردن، کریستال ها حل شدند. پس از ۲۰-۱۰ دقیقه، میزان جذب OD در طول ۵۷۰ نانومتر با دستگاه ELISA rider (بیوتک آمریکا) قرائت گردید و سیتوتوکسیسیته آن با کمک نمودار محاسبه شد (۱۴).

یافته ها

برای انتخاب قطعه ژنی *tat-diph*، ابتدا توالی اسید آمینه از بانک یونی پرات، استخراج و براساس کدون های *E.coli* بهینه سازی کدون انجام گرفت، سپس سنتز و به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه از روی ژن سنتز شده، پرایمر طراحی گردید. برای طراحی و آنالیز پرایمرها نیز از نرم افزار الیگو ۶ (به منظور بررسی ویژگی های مرتبط با جفت پرایمرهای رفت و برگشت همانند دمای Tm، درصد GC، احتمال تشکیل جفت شدگی پرایمرها و لوپ) استفاده شد. با استفاده از پرایمر اختصاصی طراحی شده که ژن TAT بر روی پرایمر فروروارد آن تعبیه شده بود و آنزیم *Pfu*، قطعه عملکردی دیفتریا (۶۲۳bp) تکثیر شد (شکل ۱). در نهایت، استخراج پلاسمید *pET28a* جهت کلونینگ انجام گرفت (شکل شماره ۲).

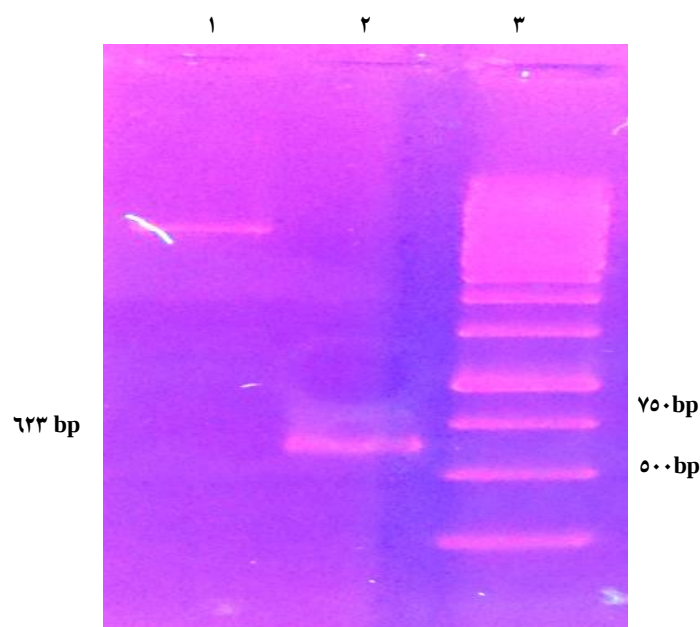


شکل شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن بخش عملکردی دیفتری بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون (۱) نشانگر اندازه DNA، ستون (۲) کنترل منفی، ستون (۳) ژن بخش عملکردی دیفتری تکثیر شده با آنزیم Taq DNA polymerase، ستون (۴) ژن بخش عملکردی دیفتری تکثیر شده با آنزیم Pfu DNA polymerase می باشد.



شکل شماره ۲: الکتروفورز *pET28a* تخلیص شده بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون (۱) نشانگر اندازه DNA و ستون (۲) *pET28a* تخلیص شده می باشد.

هضم آنزیمی و کتور و ژن مورد نظر با استفاده از دو آنزیم *EcoRI* در شکل شماره ۳، ستون ۱ نشانگر و کتور *pET28a* و ستون ۲ نشانگر ژن *tat-diph* بوده که هر دو با آنزیم های *EcoRI* و *Hind III* انجام شد. هضم *Hind III* هضم شده همراه با قطعه ۶۲۳bp می باشند.

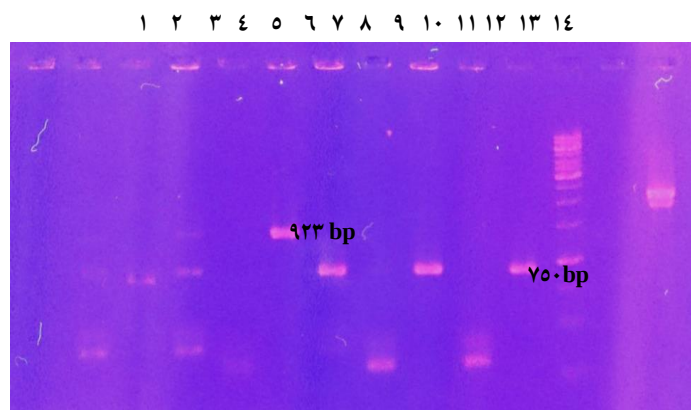


شکل شماره ۳: هضم آنزیمی ژن عملکردی *tat-diph* همراه با پپتید TAT در ژل آگارز ۱٪.

ستون (۱) وکتور *pET28a* هضم آنزیمی شده با *EcoRI/Hind III*، ستون (۲) قطعه ژن بخش عملکردی *tat-diph* هضم شده با ستون و (۳) نشانگر اندازه DNA می باشد.

لازم به ذکر است با توجه به اینکه از پرایمر T7 استفاده شده، حدود ۳۰۰ bp به انتهای ژن اضافه گردید؛ بنابراین اندازه ژن، ۹۲۳bp بود (شکل شماره ۴).

پس از انجام الحاق و همسانه سازی ژن، ناقل *pET28a* به وسیله روش شوک حرارتی به سلول های مستعد تراریخت شد، سپس به منظور مشخص شدن کلنی های حاوی ژن *tat-diph*، واکنش PCR انجام شد.

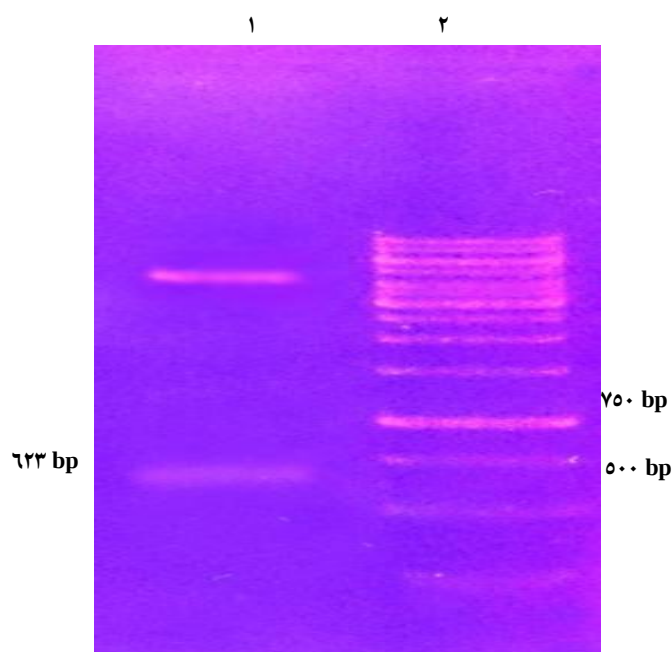


شکل شماره ۴: آنالیز کلنی های نو ترکیب دارای ژن *tat-diph* بر روی ژل آگارز ۱٪.

ستون های ۱-۶ و ستون ۸ و ۱۰ کلنی های فاقد ژن و ستون های ۹، ۷ و ۱۱ کلنی های نو ترکیب هستند. ستون (۱۲) نشانگر اندازه DNA، ستون (۱۳) کنترل منفی، ستون (۱۴) کنترل مثبت از ژن سنتزی دیفتری به عنوان الگو.

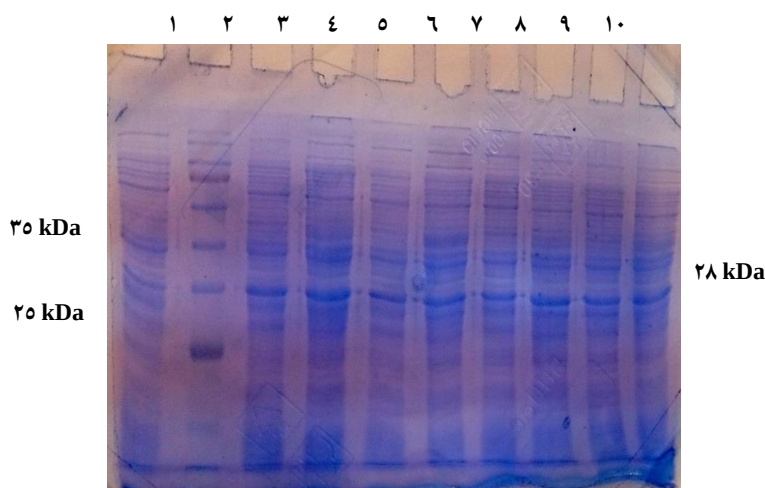
آنزیمی با دو آنزیم *EcoRI* و *Hind III* مجدداً روی ژل آگارز مشخص گردید (شکل شماره ۵).

هضم آنزیمی برای تأیید کلونینگ نیز انجام شد و به منظور اطمینان از هم جوشی وکتور *pET-28a* و ژن *tat-diph*



شکل شماره ۵: آنالیز تأیید کلونینگ برای سازه نو ترکیب *tat-diph*. ستون (۱) *pET-28a* و ستون (۲) نشانگر اندازه DNA.

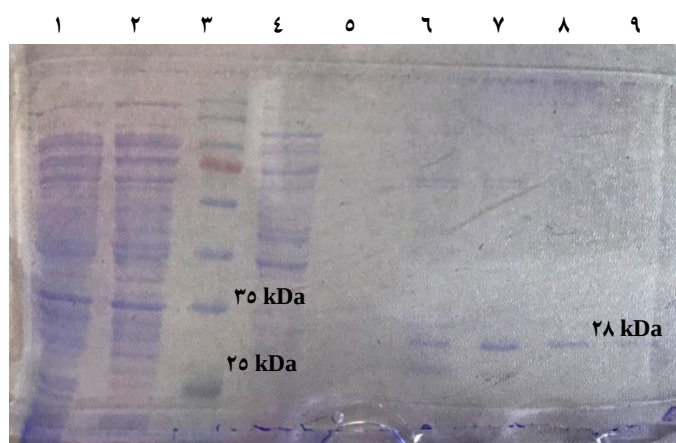
جهت بررسی بیان سازه نو ترکیب *tat-diph*، ابتدا جهت اطمینان از بیان پروتئین مورد نظر بعد از تلقیح باکتری به محیط کشت و اضافه کردن Sample Buffer، سپس جوشاندن نمونه‌ها روی ژل SDS-PAGE، بررسی اولیه انجام گرفت (شکل شماره ۶).



شکل شماره ۶: بررسی بیان پروتئین TAT-Diph بر روی ژل 12% SDS-PAGE

ستون (۱) نمونه قبل از القا، ستون (۲) نشانگر اندازه پروتئین، ستون (۳) کلنی یک، ۲ ساعت القا شده، ستون (۴) کلنی یک، ۲۴ ساعت القا شده، ستون (۵) کلنی دو، ۲ ساعت القا شده، ستون (۶) کلنی دو، ۲۴ ساعت القا شده، ستون (۷) کلنی چهار، ۲ ساعت القا شده، ستون (۸) کلنی چهار، ۲۴ ساعت القا شده، ستون (۹) کلنی پنج، ۲ ساعت القا شده، ستون (۱۰) کلنی پنج، ۲۴ ساعت القا شده.

تخلیص پروتئین TAT-Diph به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی (ستون Ni-NTA) انجام گرفت. پروتئین در غلظت ۱ میلی مولار IPTG، در دو فاز محلول (۲۴ ساعت) و نامحلول (۲ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد دارای بالاترین میزان بیان بود، نتایج پروتئین تخلیص شده به طور جداگانه بر روی ژل 12% SDS-PAGE الکتروفورز شد (شکل شماره ۷ و ۸).

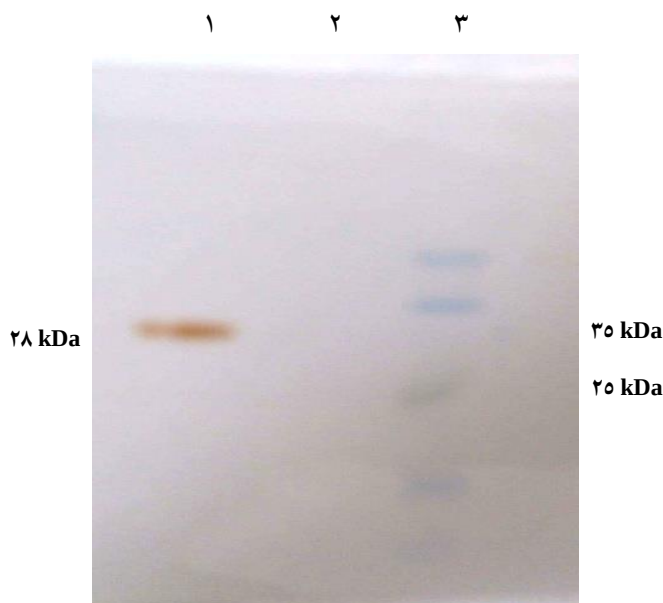


شکل شماره ۷: پروتئین نو ترکیب TAT-Diph دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت با فاز محلول 1Mm-IPTG.

ستون (۱) نمونه قبل از القا، ستون (۲) محلول خروجی از ستون، ستون (۳) نشانگر اندازه پروتئین، ستون (۴) محلول شست و شوی ستون، ستون (۵-۸) محلول Elution، ستون (۹) محلول MES (2-N-morpholino Ethane Sulfonic acid)

با انجام وسترن بلات مشخص گردید آنتی بادی ضد His-Tag به طور اختصاصی با توالی هیستیدین پروتئین های نو ترکیب واکنش می دهد.

تأیید محصول پروتئینی نو ترکیب با استفاده از روش وسترن بلاتینگ و آنتی بادی Anti-His Tag انجام گرفت. نتیجه وسترن بلاتینگ پروتئین های نو ترکیب خالص شده بر روی کاغذ نیتروسلولز در شکل شماره ۸ دیده می شود.



شکل شماره ۸: تأیید پروتئین TAT-Diph بیان شده با استفاده از تکنیک وسترن بلاتینگ.

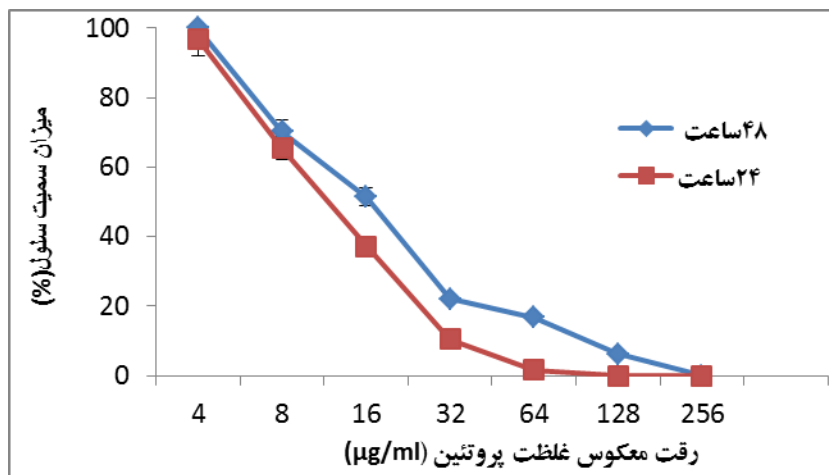
ستون (۱) پروتئین نو ترکیب TAT-Diph، ستون (۲) کنترل، ستون (۳) نشانگر اندازه پروتئین است.

دستگاه ELISA rider خوانده شد و نمودار آن مشخص گردید. نمودار و جدول، نشان دهنده میزان تأثیر پروتئین در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت بر روی سلول های سرطانی MCF7 می باشد.

به منظور تعیین اثر پروتئین نو ترکیب بر روی لاین سلولی به روش MTT، پس از پاساژ دادن سلول های سرطانی MCF7 درون چاهک ها، اضافه کردن رنگ MTT و ایجاد کریستال های بنفش رنگ طی مدت ۴۸ ساعت، طول موج آن ها با استفاده از

جدول: غلظت‌های استفاده شده از پروتئین TAT-Diph در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت.

غلظت پروتئین (۸۰ میکروگرم)	زمان ۲۴ ساعت	زمان ۴۸ ساعت
۱/۴	۱۰۰	۱۰۰
۱/۸	۷۰	۷۰/۲
۱/۱۶	۲۰	۵۱/۴
۱/۳۲	۲	۲۲/۱۵
۱/۶۴	۰	۱۶/۷
۱/۱۲۸	۰	۶/۱۵
۱/۲۵۶	۰	۰



نمودار: میزان تأثیر پروتئین TAT-Diph بر روی سلول‌های سرطانی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت.

بحث

یکی از مه‌لک‌ترین بیماری‌های دنیا، سرطان است که درمان‌های رایج آن مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی، اثربخشی کمی دارند. درمان‌های باکتریایی نیز دارای مکانیسم‌های منحصربه‌فردی برای درمان سرطان بوده که روش‌های استاندارد به آن دسترسی ندارند. باکتری‌ها می‌توانند به‌طور اختصاصیت تومورها را هدف قرار دهند، به‌طور فعال در بافت نفوذ کرده و به شکل کنترل‌شده‌ای ایجاد سمیت کنند (۱). درمان سرطان با استفاده از توکسین، روش نوینی است که مورد توجه متخصصان ساخت دارو قرار گرفته است. امروزه، مقاومت به سرطان‌ها نسبت به برخی داروهای شیمی‌درمانی، توجه دانشمندان را به این ترکیبات معطوف کرده است. استراتژی جدید بیوترایی تومورهای خاص با استفاده از مهندسی ژنتیک و در اثر تولید پروتئین‌های هیبریدی بر توکسین‌های مهارکننده سنتز پروتئین و گیرنده‌های سلولی موجود بر روی سطح سلول‌های سرطانی است (۲).

در مطالعه‌ای که توسط Trabulo و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد، مشخص گردید عوامل درمانی معمولاً به‌صورت درون‌سلولی انتقال می‌یابند تا خاصیت دارویی خود را در داخل سیتوپلاسم یا یک اندامک ویژه اعمال کنند (مانند هسته در ژن‌درمانی، انتقال آنزیم‌های ناقص لیزوزومی به لیزوزوم برای درمان و داروهای ضدسرطانی پیش‌آپتوزی در میتوکندری برای درمان سرطان)، همچنین غشای سلولی از ورود پروتئین‌ها، پپتیدها و حامل‌های دارویی به سلول‌ها جلوگیری به عمل می‌آورد؛ مگر اینکه یک مکانیسم ترانسپانسی فعال به عبور آن‌ها کمک کند (۱۵). مقاومت به سلول‌های تومور به آپتوز که توسط بسیاری از درمان‌های ضد تومور ایجاد می‌شود، یک مشکل عمده بالینی است؛ بنابراین توسعه درمان‌های مؤثرتر برای پیشگیری از پیش‌آگهی سرطان یک اولویت است (۱۶). Frøysnes و همکاران طی تحقیقی در سال ۲۰۱۹ با بررسی استفاده از ایمونوتوکسین MOC 31 PE داخل صفاقی به‌عنوان یک اصل جدید درمان برای درمان متاستاز صفاقی از سرطان کولورکتال (PM-CRC)، نشان دادند به‌طور

میانگین، طی ۱۳ ماه نزدیک به ۷۲٪ از بیماران درمان شده‌اند (۱۷). همچنین Yang و همکاران در مطالعه‌ای (سال ۲۰۱۸)، تأثیر بالای ایمونوتوکسین را در درمان سرطان مری نشان دادند. در این تحقیق، قسمت متغیر از یک آنتی‌بادی هدفمند EGFR با یک قطعه از *Pseudomonas exotoxin A* جایگزین شد که باعث بهبود تومور در موش‌های برهنه گردید و در نهایت، وجود ایمونوتوکسین ناشی از His-tag از طریق کروماتوگرافی جذب یون فلز (IMAC) با استفاده از رزین

Ni-NTA و با SDS-PAGE تأیید شد (۱۸). درمان‌های مبتنی بر توکسین به عنوان یکی از پرطرفدارترین روش‌های درمانی در درمان سرطانی مطرح است که یک استراتژی امیدوارکننده برای درمان هدفمند متاستاز سرطان می‌باشد (۱۹). در طی تحقیقی که در سال ۱۹۹۵ توسط Günter و همکاران انجام گرفت از ژن توکسین باکتری در وکتور بیانی کلون، به عنوان یک ابزار قوی در تحریک سیستم ایمنی استفاده شد (۶). سم دیفتری نیز تحت تغییرات کانونی در محلول اسیدی قرار می‌گیرد و با غشاهای چربی همراه است که پس از آن، بازسازی و انتقال غشایی ایجاد می‌شود. این فرآیند، یک گام اساسی در تحویل دامنه کاتالیتیکی سمی توکسین دیفتری به سلول آلوده است (۲۰). DT نیز یک پروتئین باکتریایی منحصربه‌فرد بوده که به طور انتخابی می‌کشد و به دلیل تخصص خاص عملکرد دمین در آن‌ها، اجازه استفاده از این سم در مهندسی پروتئین برای ساخت پروتئین نو ترکیب داده شده است (۳). توکسین دیفتری به گیرنده سطح سلولی خاصی متصل و با ایجاد کانال در غشای سلولی باعث ایجاد سمیت از طریق دمین کاتالیکی می‌شود (۲۱-۲۳). توکسین‌های باکتریایی، نوع جدیدی از ژن‌های خودکشی را نیز بیان می‌کنند. آن‌ها به عنوان پروتئین‌های سریع و انتخاب‌گرهایی سمی نسبت به طیف گسترده‌ای از سرطان‌ها هستند (۱۰). Romaniuk و همکاران طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ نشان دادند مشتقات نو ترکیب از توکسین دیفتری برای درمان و پیشگیری از بیماری‌های انکولوژیک، خودایمنی، عفونی و سایر بیماری‌ها مؤثر است، همچنین کاربرد عملی آن برای توسعه واکسن، سیتوتوکسین‌ها، مسدودکننده‌های HB-EGF، سیستم‌های تشخیصی، داروهای سرپوئیونیدی و ساخت‌وساز برای تحویل دارو میسر است (۲۴).

از طرفی، پپتید TAT به عنوان حامل غشایی عمل می‌کند. جذب سلولی از پپتید TAT غیرمستقیم بوده و به وسیله فاگوسیتوز یا پینوسیتوز انجام می‌گیرد. پپتیدهای مرتبط با TAT نیز با وارد شدن به سلول‌ها، براساس بار مولکولی پس از مسیرهای مختلف اندوسیتوز، وارد سلول شده که گلیکوز امینوگلیکان‌ها در سطح سلول بر جذب آن‌ها تأثیر می‌گذارند (۲۵). دامنه انتقال پروتئین (PTD) یا پپتیدهای نفوذ سلولی (CTPs) قادر به حمل پروتئین، پپتیدها، اسید نوکلئیک و نانوذرات؛ از جمله ذرات ویروسی، در غشای سلولی به سلول هستند (۲۶). Behrendt طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ نشان داد سیستم انتقال دوقلو - آرژنینین (Tat) که برای حمل پروتئین‌های پیچیده در سراسر غشای پروکاریوت‌ها استفاده می‌شود؛ یک مجموعه از چندین نسخه TatB و TatC حمل و نقل با پیوند پپتید سیگنال که هر دو از زیربنای پروتئین Tat هستند بوده که در این نقل و انتقالات مؤثرند (۲۷). همچنین در تحقیقی که در سال ۲۰۱۵ توسط Song و همکاران صورت گرفت، مشخص گردید پپتید TAT می‌تواند به یک لیپید ضد میکروبی تبدیل شود و با مکانیسم دوگانه ضد سرطان، استراتژی جدیدی را برای تولید پپتیدهای ضد سرطان بر پایه پپتیدهای نفوذ سلولی ارائه دهد (۲۸). براساس آزمایش‌هایی که توسط Gao و همکاران (سال ۲۰۱۲) در مورد بیان توکسین دیفتری و فاکتور فعال‌کننده سلول‌های B انسانی با روش MTT بر روی سلول‌های سرطانی لنفای BALL-۱ انجام گرفت، مشخص گردید در غلظت‌های ۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۴۰٪ از سلول‌ها و در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۲۲٪ تا غلظت ۰/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز به مقدار ۴٪ از سلول‌های سرطانی از بین می‌روند (۲۹). در سال ۲۰۱۶ نیز شفیع و همکاران با ارزیابی اثرات پروتئین نو ترکیب DT 386- BR 2 به عنوان عامل ضد سرطانی بر روی مجموعه‌ای از انواع سرطان‌ها (در رابطه با سلول‌های MCF 7) با استفاده از روش MTT و با غلظت اولیه پروتئین نو ترکیب ۲/۰۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نشان دادند در غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۶۰٪ سلول‌ها و در نهایت، در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، تمامی سلول‌های سرطانی نابود می‌شوند (۱۴). این یافته در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر که مقدار اولیه پروتئین نو ترکیب ۸۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و در غلظت ۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر،

۱۰۰٪ سلول‌ها از بین رفتند؛ نشان داد با غلظت اولیه بیشتر، نتیجه بهتری حاصل می‌گردد. همچنین Qiao و همکاران در سال ۲۰۱۲ در بررسی گروهی از پروتئین‌ها مانند PG 13 که با کمک توکسین دیفتری جهش پیدا کرده بودند (به عنوان آنتی تومور بر روی لاین سلولی) با کمک روش MTT به این نتیجه دست یافتند که تنها ۲۵٪ سلول‌های سرطانی که در معرض پروتئین‌های نو ترکیب به مدت ۶ روز قرار داشته‌اند، زنده مانده‌اند (۳۰). در تحقیق دیگری توسط Pan و همکاران (سال ۲۰۱۰) در رابطه با استفاده از پروتئین‌های نو ترکیب آنتی تومور

AdDC312-DT-A

که به وسیله H 19 و DMD-H 19 کمپلکس پروموتور بیان می‌شوند، بر روی سلول‌های سرطانی MCF 7 به کمک روش MTT، مشخص گردید ۱۰۰٪ سلول‌های سرطانی از بین رفته‌اند (۳۱). Zhang و همکاران در مطالعه‌ای (سال ۲۰۰۴) با بررسی پروتئین نو ترکیب (شامل اینترلوکین - ۴ و توکسین دیفتری) و سمیت بالای آن در سلول‌های سرطانی با غلظت اولیه پروتئین نو ترکیب ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و با روش MTT بر روی سلول‌های سرطانی MCF 7، نشان دادند در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، ۸۰٪ سلول‌ها از بین می‌روند و در غلظت ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نیز هیچ سلول سرطانی زنده نمی‌ماند (۳۲)، که نتایج نسبت به تحقیق حاضر قابل مقایسه است. نتایج بیان پروتئین نو ترکیب بر روی ژل ۱۰٪ SDS-PAGE، نشان‌دهنده حضور یک باند در محدوده ۲۸ کیلو دالتونی بوده که با اندازه مورد انتظار پروتئین کایمریک مطابقت داشت. آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی ضد هیستیدین، حضور باند ۲۸ کیلودالتونی را در نتایج تخلیص پروتئین تأیید می‌کند. همچنین پس از اضافه کردن پودر MTT به هر کدام از چاهک‌ها،

نتایج بدین صورت بود که در چاهک اولی با وجود غلظت ۱/۴ میکروگرم بر میلی لیتر پروتئین، بعد از گذشت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، تمامی سلول‌ها از بین رفته بود و میزان سمیت برای سلول‌ها ۱۰۰٪ گزارش شد. در چاهک دوم نیز با غلظت ۱/۸ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۲۴ ساعت، ۷۰٪ سلول‌ها کشته شدند و بعد از ۴۸ ساعت، ۷۰٪ از سلول‌ها و در چاهک چهارم با غلظت ۱/۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر در مدت زمان ۲۴ ساعت، ۲٪ از سلول‌ها از بین رفتند، اما در غلظت‌های ۱/۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر، ۱/۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱/۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر سلول‌ها همچنان زنده ماندند. اما در زمان ۴۸ ساعت، نتیجه بهتری حاصل شد و تا غلظت ۱/۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر نیز ۶/۱۵٪ از سلول‌ها از بین رفتند.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج مطالعات مشابه و تحقیق حاضر، هرچه زمان بیشتری می‌گذرد پروتئین نو ترکیبی شامل توکسین دیفتری، اثر بیشتری بر روی سمیت سلول‌های سرطانی دارد. همچنین با گذشت زمان در غلظت‌های بالای پروتئین نو ترکیب، میزان از بین رفتن سلول‌های سرطانی به ۱۰۰٪ می‌رسد؛ بنابراین استفاده از پروتئین‌های نو ترکیب هدفمند، راه‌حلی امیدوارکننده در جهت درمان انواع سرطان‌ها می‌باشد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی است.

References:

- Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. Nat Rev Cancer 2006;6(8):583-92. PubMed
- Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. Nat Rev Drug Discov 2008;7(1):21-39. PubMed
- Auger A, Park M, Nitschke F, Minassian LM, Beilhartz GL, Minassian BA, et al. Efficient Delivery of Structurally Diverse Protein Cargo into Mammalian Cells by a Bacterial Toxin. Mol Pharm 2015;12(8):2962-71. PubMed

4. Wang J, London E. The membrane topography of the diphtheria toxin T domain linked to the a chain reveals a transient transmembrane hairpin and potential translocation mechanisms. *Biochemistry* 2009;48(43):10446-56. PubMed
5. Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J* 2006;E532-E51. PubMed
6. Günter-Seeboth K, Schupp T. Cloning and sequence analysis of the *Corynebacterium diphtheriae* dtxR homologue from *Streptomyces lividans* and *S. pilosus* encoding a putative iron repressor protein. *Gene* 1995;166(1):117-9. PubMed
7. Murriel CL, Dowdy SF. Influence of protein transduction domains on intracellular delivery of macromolecules. *Expert Opin Drug Deliv* 2006;3(6):739-46. PubMed
8. Tan ML, Choong PF, Dass CR. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides* 2010;31(1):184-93. PubMed
9. Torchilin VP. Cell penetrating peptide-modified pharmaceutical nanocarriers for intracellular drug and gene delivery. *Biopolymers* 2008;90(5):604-10. PubMed
10. Pahle J, Walther W. Bacterial toxins for oncoleaking suicidal cancer gene therapy. *Recent Results Cancer Res.* 2016;209:95-110. PubMed
11. Amani J, Saffarian P, Najar-Peerayeh S, Imani-Fooladi AA. Designing and analyzing the structure of Tat-BoNT/A(1-448) fusion protein: An in silico approach. *Mol Biol Res Commun* 2014;3(2):115-27. PubMed
12. Hosseini ZS, Amani J, Baghbani Arani F, Nazarian S, Motamedi MJ, Shafighian F. Immunogenicity of the nanovaccine containing intimin recombinant protein in the BALB/c mice. *Clin Exp Vaccine Res* 2018;7(1):51-60. PubMed
13. Gheybi E, Salmanian AH, Fooladi AAI, Salimian J, Hosseini HM, Halabian R, et al. Immunogenicity of chimeric MUC1-HER2 vaccine against breast cancer in mice. *Iran J Basic Med Sci* 2018;21(1):26-32. PubMed
14. Shafiee F, Rabbani M, Jahanian-Najafabadi A. Production and evaluation of cytotoxic effects of DT386-BR2 fusion protein as a novel anti-cancer agent. *J Microbiol Methods* 2016;130:100-5. PubMed
15. Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, De Lima MCP. Cell-penetrating peptides—mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems. *Pharmaceuticals* 2010;3(4):961-93. PubMed
16. Heulot M, Chevalier N, Puyal J, Margue C, Michel S, Kreis S, et al. The TAT-RasGAP317-326 anti-cancer peptide can kill in a caspase-, apoptosis -,and necroptosis-independent manner. *Oncotarget* 2016;7(39):64342-59. PubMed
17. Frøysnes IS, Andersson Y, Larsen SG, Davidson B, Øien J-MT, Julsrud L, et al. ImmunoPeCa trial: Long-term outcome following intraperitoneal MOC31PE immunotoxin treatment in colorectal peritoneal metastasis. *Eur J Surg Oncol* 2019;S0748-7983(19):30406-8. PubMed
18. Yang Y, Tian Z, Ding Y, Li X, Zhang Z, Yang L, et al. EGFR-targeted immunotoxin exerts antitumor effects on esophageal cancers by increasing ROS accumulation and inducing apoptosis via inhibition of the Nrf2-Keap1 Pathway. *J Immunol Res* 2018;2018. PubMed
19. Ma X, Lv P, Ye S, Zhang Y, Li S, Kan C, et al. DT390-triTMTP1, a novel fusion protein of diphtheria toxin with tandem repeat TMTP1 peptide, preferentially targets metastatic tumors. *Mol Pharm* 2012;10(1):115-26. PubMed
20. Flores-Canales JC, Kurnikova M. Microsecond simulations of the diphtheria toxin translocation domain in association with anionic lipid bilayers. *J Phys Chem B* 2015;119(36):12074-85. PubMed
21. Kumar A, Das G, Bose B. Recombinant receptor-binding domain of diphtheria toxin increases the potency of curcumin by enhancing cellular uptake. *Mol Pharm* 2014;11(1):208-17. PubMed
22. Li J, Rodnin MV, Ladokhin AS, Gross ML. Hydrogen–deuterium exchange and mass spectrometry reveal the pH-dependent conformational changes of diphtheria toxin T domain. *Biochemistry* 2014;53(43):6849-56. PubMed

23. Vargas-Urbe M, Rodnin MV, Kienker P, Finkelstein A, Ladokhin AS. Crucial role of H322 in folding of the diphtheria toxin T-domain into the open-channel state. *Biochemistry* 2013;52(20):3457-63. PubMed
24. Romaniuk S, Kolibo D, Komisarenko S. Perspectives of application of recombinant diphtheria toxin derivatives. *Bioorg Khim* 2012;38(6):639-52. PubMed
25. Subrizi A, Tuominen E, Bunker A, Róg T, Antopolsky M, Urtti A. Tat (48-60) peptide amino acid sequence is not unique in its cell penetrating properties and cell-surface glycosaminoglycans inhibit its cellular uptake. *J Control Release* 2012;158(2):227-85. PubMed
26. Zahid MD, Robbins P. Protein transduction domains: applications for molecular medicine. *Curr Gene Ther* 2012;12(5):374-80. PubMed
27. Behrendt J, Brüser T. The TatBC complex of the Tat protein translocase in *Escherichia coli* and its transition to the substrate-bound TatABC complex. *Biochemistry* 2014;53(14):2344-54. PubMed
28. Song J, Zhang Y, Zhang W, Chen J, Yang X, Ma P, et al. Cell penetrating peptide TAT can kill cancer cells via membrane disruption after attachment of camptothecin. *Peptides* 2015;63:143-9. PubMed
29. Gao X-p, Liu Z-m, Jiao Y-l, Cui B, Zhu Y-t, Zhang J, et al. Diphtheria toxin/human B-Cell activating factor fusion protein kills human acute lymphoblastic leukemia BALL-1 cells: An experimental study. *Chin J Cancer Res.* 2012;24(3):238-44. PubMed
30. Qiao J, Caruso M. PG13 packaging cells produce recombinant retroviruses carrying a diphtheria toxin mutant which kills cancer cells. *J Virol* 2002;76(14):7343-8. PubMed
31. Pan Y, He B, Li T, Zhu C, Zhang L, Bo W ,et al. Targeted tumor gene therapy based on loss of IGF2 imprinting. *Cancer Biol Ther* 2010;10(3):290-8. PubMed
32. Zhang YJ, Hu XB, Li SX, Tian LP, Yang SL, Gong Y. Fusion protein of interleukin 4 and diphtherial toxin with high cytotoxicity to cancer cells. *Acta Biochim Bbiophys Sin* 2004;36(6):437-42. PubMed