

بیان سازه نوترکیب حاوی CTLA4 در باکتری و بررسی فعالیت بیولوژیکی آن

حسین مهدی زاده^۱، جعفر سلیمیان^{۲*}، زهرا نورمحمدی^۱، جعفر امانی^۳، راحله حبیبیان^۳ و یونس پناهی^۲

^۱ ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست‌شناسی



^۲ ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، پژوهشکده سیستم بیولوژی مسمویت‌ها، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی

^۳ ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، پژوهشکده سیستم بیولوژی مسمویت‌ها، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۱

چکیده

CTLA4 گیرنده مهارتی لنفوسیت‌های T می‌باشد. سازه کایمر متشکل از دامین خارج سلولی CTLA4 و بخش FC از آنتی‌بادی IgG1 انسانی با اتصال به لیگاندهای CD80 (B7-1) و CD86 (B7-2) بر روی سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC) مانع اتصال CD28 و در نتیجه مانع فعال شدن لنفوسیت T و مهار پاسخ ایمنی می‌شود. این سازه به نام داروی آباتاسپت جهت درمان بیماری آرتریت روماتوئید، در سال ۲۰۰۵ مجوز گرفت. در این تحقیق، سازه کایمر CTLA4-FC طراحی گردید و به کمک ابزارهای بیوانفورماتیک و ویژگی‌های آن بررسی شد. ژن سنتز شده در پلاسمید pET-28a کلون و در باکتری *E. coli* BL21DE3 ترانسفورم شد. پروتئین نوترکیب بیان و تخلیص شد و بررسی تمایل اتصال با روش فلوسایتومتری انجام شد. برای بررسی فعالیت بیولوژیک پروتئین نوترکیب از روش کشت لنفوسیتی مختلط (MLR) استفاده شد. ویژگی‌های بیوانفورماتیک-CTLA4 FC نشان داد که ساختار طراحی شده جهت بیان در سلول پروکاریوت مناسب می‌باشد. پروتئین نوترکیب در باکتری با غلظت ۱۰ mg/L بیان شد. نتایج وسترن بلاتینگ و الیزا صحت پروتئین را تایید کرد. نتایج فلوسایتومتری رابطه مستقیم بین غلظت پروتئین‌ها و میزان MFI را نشان داد. در تست MLR هم رابطه مستقیم بین غلظت پروتئین و مهار لنفوسیت‌های T تایید شد. پروتئین نوترکیب CTLA4-FC تولید شده در سلول باکتریایی بخوبی به گیرنده‌های CD80 و CD86 متصل شد و توانست سلول‌های T را مهار نماید. بنابراین می‌تواند کاندیدای خوبی برای تولید دارو باشد.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، آباتاسپت، فلوسایتومتری، CTLA4-FC

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۷۶۲۹۴۳۳۹، پست الکترونیکی: jafar.salimian@bmsu.ac.ir

مقدمه

۱) و CD86 (B7-2) بر روی APC‌ها متصل شده و باعث مهار تکثیر سلول T می‌شود. میل پیوندی CTLA4 به CD80 (B7-1) و CD86 (B7-2) ۱۰ تا ۱۵ برابر بیشتر از CD28 است. (۸ و ۱۲). CTLA4-FC یک پروتئین کایمر محلول است که از دامین خارج سلولی ریسپتور CTLA4 و بخش FC از ایمونوگلوبین G انسانی تشکیل شده است و بعنوان یک داروی مهارکننده ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این دارو بعنوان مهارکننده رقابتی در مسیر

یکی از لیگاندهای کمک‌تحریکی که بر روی سلول‌های T بیان می‌شود، CD28 است که به گیرنده‌های CD80 (B7-1) و CD86 (B7-2) بر روی APC‌ها متصل می‌شود و باعث تحریک تکثیر سلولی و ترشح سایتوکاین‌ها توسط سلول T می‌شود. برخی گیرنده‌های اعضاء خانواده CD28 نقش مهارکنندگی دارند و باعث مهار سلول T فعال شده می‌شوند یکی از این گیرنده‌ها CTLA4 می‌باشد که بر روی سلول T فعال شده بیان می‌شود و به CD80 (B7-)

انتهای آمینی، FC آنتی بادی IgG1 انسانی متصل شد. برخی از خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین با استفاده از نرم‌افزار آنلاین پروت پرام به آدرس <http://expasy.org/tools/protparam.html> مورد بررسی قرار گرفت (۱۷). ارزیابی ساختمان دوم پروتئین نو ترکیب به کمک نرم افزار گور ۴ به آدرس الکترونیکی http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl صورت گرفت (۲۰). برای پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین، از نرم‌افزار آی-تاسر به آدرس <http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER> استفاده گردید (۳۰). و جهت تصویرسازی فایل PDB ارائه شده توسط آی-تاسر، از نرم‌افزار استودیو ۱/۷ استفاده شد. ساختار دوم mRNA مربوط به سازه های ژنی، با نرم‌افزار تحت وب ام فولد در <http://mfold.rna.albany.edu/> پیش‌بینی شد (۳۲ و ۱۶). داکینگ یا نحوه اندرکنش پروتئین با لیگاند CD80 و CD86 با استفاده از سرور زد داک (<http://zdock.umassmed.edu/>) انجام شد (۱۹). افینیتی (تمایل اتصال) پروتئین های نو ترکیب به وسیله سرور-PPA-Pred (<http://www.iitm.ac.in/bioinfo/PPA-Pred/>) بررسی شد (۲۷ و ۱۵). آنتی ژنیستی پروتئین های نو ترکیب با سرور واکسی ژن (http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/scripts/VaxiJen_scripts/VaxiJen3.pl) بررسی گردید (۹۴ و ۲۸).

کلونینگ و ترانسفورماسیون پلاسمید نو ترکیب: توالی بهینه سازی شده جهت سنتز به شرکت Biomatik کانادا ارسال گردید. پس از طراحی و سفارش پرایمر، ژن مورد نظر با روش PCR تکثیر شد. همچنین پلاسمید pET-28a استخراج شد. سپس محصول PCR و پلاسمید با استفاده از آنزیم های محدود کننده *HindIII* و *XhoI* هضم شد. واکنش الحاق بین قطعه ژن و پلاسمید برش خورده با استفاده از آنزیم لیگاز DNA T4 انجام شد و ژن مورد نظر در پلاسمید pET-28a کلون شد. تایید کلونینگ با استفاده از واکنش PCR، هضم آنزیمی و تعیین سکانس انجام شد.

CD28/B7 (CD80,CD86) عمل می کند. به این ترتیب که CTLA4 که بر روی سلول های T بیان می شوند برخلاف CD28 با اتصال رقابتی به گیرنده های CD80 و CD86 بر روی سلول های عرضه کننده آنتی ژن باعث مهار لفسوسیت های T می شوند. این دارو با نام آباتاسپت امروزه در درمان بیماری آرتریت روماتوئید و برخی بیماری های خود ایمن دیگر مورد استفاده قرار می گیرد (۸ و ۱۳). با ایجاد دو جهش (A29Y و L104E) در دمین اتصالی CTLA4 داروی موثرتری با تمایل اتصال (افینیتی) بیشتر بنام بلاتاسپت تولید شد که برای جلوگیری از رد پیوند آلوگرافت در بیماران پیوند کلیوی مورد استفاده قرار می گیرد. جهش های ایجاد شده در دمین اتصالی باعث افزایش تمایل اتصال گردید (۲۴). CTLA4-FC توسط محققان مختلف در میزبان های مختلف بیان شده است. بعنوان مثال لی و همکاران در سال ۲۰۰۶ فیوژن پروتئین CTLA4-Ig را در گیاه برنج کلون و بیان کردند و ویژگی ها و فعالیت پروتئین تولید شده را در محیط برون تنی مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که پروتئین تولید شده دارای فعالیت بیولوژیکی می باشد و قادر است تکثیر سلول T را مهار نماید (۱۲). زنگ و همکاران در سال ۲۰۰۷، پلاسمیدهای خطی حاوی ژن CTLA4-Ig را در سلول *CHO* کلون و بیان کردند و پس از تخلیص نشان دادند که پروتئین تولیدی فعالیت بیولوژیک دارد (۲۹). بیان پروتئین در میزبان پروکاریوتی نسبت به میزبان یوکاریوتی مزایای زیادی از جمله ارزان بودن، بازدهی بالا و سادگی فرایند تولید و تخلیص دارد (۱۱ و ۳۰). در این تحقیق پروتئین CTLA4-Ig پس از بررسی های بیوانفورماتیک در سلول *E.coli BL21DE3* بیان و فعالیت بیولوژیکی آن بررسی شد.

مواد و روشها

بررسی های بیوانفورماتیک: جهت طراحی ساختار مورد نظر، انتهای کربوکسیلی دمین خارج سلولی CTLA4 به

پلاسمید نو ترکیب با استفاده از روش شوک حرارتی در باکتری مستعد *E.coli BL21DE3* ترانسفورم شد.

بیان پروتئین نو ترکیب: پس از تایید کلونینگ بمنظور بررسی بیان ژن در پلاسمید pET-28a بررسی بر روی چند کلونی حاوی پلاسمید نو ترکیب انجام گرفت. باکتری مورد نظر در محیط کشت حاوی کانامایسین ($50 \mu\text{g/ml}$) بمدت یک شب در دمای 37°C درجه سانتیگراد و سرعت 150rpm کشت داده شدند. سپس مقدار 50 میکرولیتر از هر کشت به طور جداگانه به 5 میلی‌لیتر محیط LB دارای $50 \mu\text{g/ml}$ کانامایسین اضافه و انکوبه شدند. پس از رسیدن کدورت رشد باکتری در طول موج 600 نانومتر به 0.7 ، IPTG با غلظت نهایی 1mM در شرایط استریل اضافه شده و بمدت 6 ساعت در دمای 37°C درجه سانتیگراد و سرعت 150rpm در شیکر انکوباتور نگهداری شدند. یک لوله شاهد نیز بدون افزودن IPTG طبق شرایط فوق تهیه گردید. پس از اتمام زمان فوق مقدار $1/5$ میلی‌لیتر از هر کدام از لوله‌های کشت تست و شاهد درون میکروتیوب های $1/5$ میلی‌لیتری ریخته شد و به کمک سانتریفوژ در سرعت 5000rpm بمدت 5 دقیقه سلول‌ها جمع شدند. سلول‌های جمع شده را با 60 میکرولیتر اوره 8 مولار شکسته شد و با بافر نمونه با رقت $2/5 \times$ مخلوط و پس از جوشانیدن بمدت 5 دقیقه روی ژل پلی‌اکریل‌آمید (SDS-PAGE) 12 درصد الکتروفورز شد.

تخلیص پروتئین نو ترکیب: برای تخلیص پروتئین نو ترکیب ابتدا محلول حاوی پروتئین روی ستون Ni-NTA اضافه گردید و مایع خروجی جمع‌آوری شد. سپس ستون بترتیب با بافر فروشویی حاوی ایمیدازول 20mM ، بافر فروشویی حاوی ایمیدازول 250mM و بافر MES (20mM) شستشو داده شد و خروجی آن جمع‌آوری شد. مقدار 20 میکرولیتر از خروجی‌های ستون به‌مراه 5 میکرولیتر بافر نمونه پس از 5 دقیقه قرار دادن در آب جوش روی ژل SDS-PAGE 12% الکتروفورز شد تا

نتیجه تخلیص بررسی شود. بقیه محلول‌ها در 20°C نگهداری شد. پس از تخلیص پروتئین بمنظور حذف ایمیدازول، دیالیز انجام شده و سپس با استفاده از روش برادفورد پروتئین مورد نظر تعیین غلظت شد. در نهایت پروتئین تخلیص شده مورد نظر در 70 -درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

و سترن بلا تینگ بمنظور تأیید پروتئین بیان شده: جهت انجام این تکنیک از آنتی بادی Anti-FC با کانجوگه HRP بصورت زیر استفاده شد. یکی از نمونه‌های بعد از بیان و نمونه شاهد (بدون القاء) مربوط به آن انتخاب شدند و بر روی ژل SDS-PAGE 12 درصد الکتروفورز شدند. کاغذ نیتروسولوز به ابعاد 7.5 بریده و روی ژل قرار داده شد سپس ساندویچ در داخل تانک قرار داده شد و بلا تینگ بمدت 45 دقیقه با ولتاژ 75 انجام شد. پس از بلا تینگ کاغذ نیتروسولوز بمدت 12 ساعت، در داخل بافر بلا کینگ شناور شد سپس با بافر PBST شستشو داده شد. آنتی بادی Anti-FC بر روی کاغذ نیتروسولوز ریخته شد و بمدت یک ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شد. سپس سه بار با PBST و هر بار بمدت 15 دقیقه شستشو داده شد. محلول DAB روی کاغذهای نیتروسولوز ریخته شد و پس از ظهور باندها با آب مقطر واکنش مهار شد (۴).

تایید پروتئین های نو ترکیب بوسیله تست الایزا: با توجه به اینکه پروتئین های نو ترکیب حاوی بخش FC آنتی بادی می باشند لذا بمنظور تأیید پروتئین های نو ترکیب سنجش الایزا غیر مستقیم استفاده شد. ابتدا غلظت های مختلف پروتئین ($5-0.3$ میکروگرم) در 100 میکرولیتر بافر پوشش دهنده (بافر کربنات-بی کربنات سدیم، 0.05 مولار، $\text{pH}=9.6$) در چاهک های میکروپلیت ریخته شد. در چاهک کنترل تنها بافر پوشش دهنده اضافه شد. سپس میکروپلیت بمدت یک شب در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. چاهک‌ها پس از تخلیه، با بافر PBST (بافر PBS با 0.05 درصد توئین 20) چندین مرتبه شستشو داده شده و خشک شدند. سپس چاهک ها با 100

انجام شد. سپس دو بار شستشو با PBS سرد انجام شد. جهت بررسی بیان رسپتور CD80 بر روی سلولهای *Raji* آنتی بادی PE Mouse Anti-Human CD80 به میزان ۵ میکرولیتر به هر میکروتیوپ اضافه شد و بمدت ۴۵ دقیقه دردمای C ۴° انکوبه شد. پس از شستشو با PBS سرد خوانش با دستگاه فلوسیتومتری BD FACS Calibur انجام شد. از سلول *HEK-293* بعنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین برای تنظیم ولتاژ دستگاه ابتدا سلول های *Raji* بدون رنگ (آنتی بادی کانژوگه) استفاده شد. در مرحله بعد پروتئین نوترکیب بترتیب با غلظت های $10 \mu\text{g/ml}$ ، $1 \mu\text{g/ml}$ ، $0.1 \mu\text{g/ml}$ و $0.01 \mu\text{g/ml}$ به لوله ها اضافه شد و بمدت ۴۵ دقیقه دردمای C ۴° انکوبه شد. سپس آنتی بادی Monoclonal Anti-Human IgG1-FITC به میزان ۲ میکرولیتر به سلول ها اضافه شد و بمدت ۴۵ دقیقه دردمای C ۴° انکوبه شد. در نهایت خوانش با دستگاه فلوسیتومتری انجام شد. ابتدا سلول *Raji* بدون رنگ برای تنظیم ولتاژ دستگاه و سپس نمونه های تست خوانش گردید. در نهایت آنالیز داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار Flowjo 7.6.1 انجام شد.

بررسی میزان مهار لئفوسیت T توسط پروتئین نوترکیب: ابتدا موش *BALB/c* با آنتی ژن CtxB (B subunit of Chloro toxin) ایمن شد سپس طحال موش جدا و سلول های طحالی جداسازی شد. تعداد 50000 سلول طحال در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد و به هر چاهک مقدار ۴ میکروگرم کانکانوالین A و $10 \mu\text{g/ml}$ از آنتی ژن CtxB اضافه شد. غلظت های مختلف ($2.5 \mu\text{g/ml}$ ، $5 \mu\text{g/ml}$ ، $10 \mu\text{g/ml}$ ، $20 \mu\text{g/ml}$) از پروتئین های استاندارد و همچنین نوترکیب به چاهک ها اضافه گردید و پلیت بمدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت درصد حیات سلول های تیمار شده با روش سنجش تکثیر و بقای سلولی (MTT) سنجش گردید.

نتایج

میکرولیتر از بافر بلاکینگ (PBST حاوی شیرخشک ۰/۰۵) و قرار دادن بمدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی-گراد تثبیت شدند. در مرحله بعد، آنتی بادی آنتی IgG کانژوگه شده با آنزیم HRP با رقت ۱/۴ در PBST تهیه و درون هر چاهک ریخته شد و بمدت ۳۰ دقیقه دردمای ۳۷ درجه سانتی-گراد انکوبه شد. ۵۰ میکرولیتر سوبسترای TMB به هر چاهک اضافه و میکروپلیت به محل تاریک منتقل شد تا واکنش انجام گیرد. پس از تغییر رنگ محلول به آبی، واکنش با محلول بازدارنده (اسید کلریدریک ۱N) متوقف گردید. در نهایت جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

انجام Circular Dichroism: جهت مقایسه ساختار دوم پروتئین های نوترکیب با ساختار دوم پیش بینی شده توسط نرم افزارهای بیوانفورماتیک بررسی ساختار دوم با CD با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریمتر JASCO J-810 با طیف اندازه گیری ۲۴۰-۱۸۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انجام شد. غلظت نمونه پروتئین مورد استفاده برابر با $200 \mu\text{g/ml}$ بود و از محلول شستشویی که پروتئین در آن حل شده بود بعنوان نمونه بلانک استفاده شد.

بررسی تمایل اتصال پروتئین های نوترکیب با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری: جهت مقایسه تمایل اتصال پروتئین نوترکیب با پروتئین استاندارد، پروتئین استاندارد CD152 (human):Fc (human) [CTLA-4] از شرکت آدیپوزن (شماره کاتالوگ: CHI-HF-210A4-C500) خریداری گردید. اتصال پروتئین نوترکیب و پروتئین استاندارد به گیرنده سلولی B7 بر سطح سلولهای راجی با روش فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. از سلولهای *HEK-293* که گیرنده B7 را بیان نمی کنند بعنوان کنترل منفی استفاده گردید. ابتدا 1×10^5 سلول از سلولهای *Raji* و *HEK-293* در لوله های جداگانه ریخته شده و با PBS سرد دو بار شستشو انجام شد. بلاکینگ با 100 میکرولیتر PBS حاوی ۲ درصد FBS بمدت ۴۵ دقیقه دردمای C ۴°

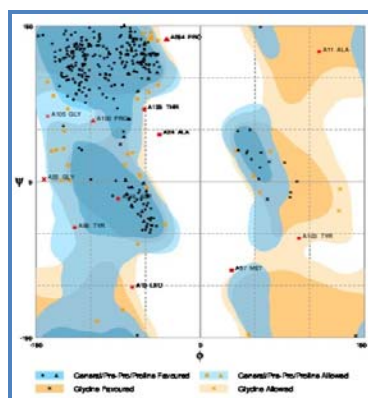
خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین نو ترکیب: آورده شده است.

خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین نو ترکیب در جدول ۱

جدول ۱- پیش بینی برخی از خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین نو ترکیب بوسیله نرم افزار پرات پرام

نام ساختار	تعداد اسیدهای آمینه	وزن مولکولی (دالتون)	PH ایزوالکتریک نظری	نیمه عمر برآورد شده (رتیکولوسیت پستانداران در شرایط آزمایشگاه)	شاخص ناپایداری	شاخص آلیفاتیک	میانگین هیدروپاتیسیته (GRAVY)
CTLA4-FC	۳۵۷	۳۹۴۴۷/۶	۵/۶۷	۳۰ ساعت	۴۷/۳۷	۷۴/۷۱	-۰/۴۰۳

نشان داد که رزیدوها در سه ناحیه مطلوب ۳۰۰ رزیدو (۸۳/۶٪)، ناحیه مجاز ۴۶ رزیدو (۱۲/۸٪) و ناحیه خارج ۱۳ رزیدو (۳/۶٪) قرار می‌گیرند. ساختاری پایدار است که حداقل ۸۰ درصد از رزیدوهای آن در ناحیه های مطلوب و مجاز قرار داشته باشند. بنابراین ساختار بررسی شده پایدار می‌باشد.



شکل - نمودار راماجاداران ساختار CTLA4-FC

نیمه عمر ساختار ۳۰ ساعت تخمین زده شد. نیمه عمر مدت زمانی است که طول می‌کشد تا نیمی از میزان یک پروتئین بعد از سنتز در سلول باقی می‌ماند. شاخص ناپایداری تخمین میزان پایداری پروتئین در لوله تست می‌باشد. وقتی شاخص پایداری یک پروتئین کمتر از ۴۰ باشد یعنی پروتئین پایدار است و شاخص بالاتر از ۴۰ نشان دهنده ناپایداری پروتئین است. شاخص آلیفاتیک پروتئین بعنوان میزان نسبی زنجیره های جانبی آلیفاتیک (آلانین، والین، ایزولوسین و لوسین) که در یک پروتئین وجود دارد تعریف می‌شود و فاکتور مثبتی برای افزایش پایداری حرارتی پروتئین های گلوبولار می‌باشد. شاخص GRAVY برای پپتیدها و پروتئین ها به صورت مجموع ارزش های هیدروپاتی همه اسید های آمینه تقسیم بر تعداد رزیدوهای موجود در سکانس محاسبه می‌شود. GRAVY کمتر پروتئین باعث اندرکنش بهتر آن با آب می‌شود (۵) و (۲۲).

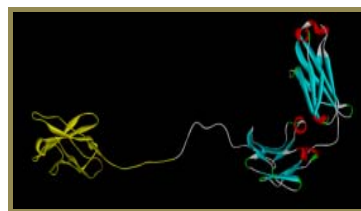
بررسی ساختمان دوم پروتئین: بر اساس پیش‌بینی‌های انجام گرفته با نرم افزار GORIV، پروتئین کایمر طراحی شده از ساختارهای دوم آلفا هلیکس ۹/۵۲٪ رشته گسترش یافته ۳۲/۷۷٪ و مارپیچ تصادفی ۵۷/۷۰٪ تشکیل شده است.

ارزیابی پایداری مدل های ساختاری: نتایج ارزیابی پایداری مدل های ساختاری طراحی شده با استفاده از نرم افزار راماجانداران پلات که در شکل ۱ آورده شده است

پیش‌بینی ساختمان سوم: پس از ذخیره اطلاعات سرور I-TASSER به فرمت pdb، با استفاده از نرم افزار Accelrys Discovery Studio Visualizer 1.7 که قادر به تصویرسازی فرمت pdb است، مدل ساختار سه بعدی پروتئین نام‌گذاری و مکان نواحی پایدارکننده و عملکردی مشخص گردید (شکل ۲). نتایج بررسی ساختمان سوم نشان می‌دهد که دمین های عملکردی و پایدارکننده مجزا از یکدیگر در ساختارها قرار گرفته اند. C-score برابر با

بررسی داکینگ پروتئین نوترکیب با لیگاند CD80 و CD86: در سرور هکس داکینگ برای بررسی نحوه اندرکنش پروتئین نوترکیب با لیگاندهای CD80 و CD86 نیاز به فرمت PDB این لیگاندها بود که این فرمت از سایت یونی پرات اخذ شد. سپس نحوه اندرکنش آنها با پروتئین های نوترکیب بررسی گردید. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است پروتئین های نوترکیب از ناحیه صحیح یعنی از ناحیه CTLA4 به لیگاندهای دایمر و مونومر CD80 و CD86 متصل می شوند.

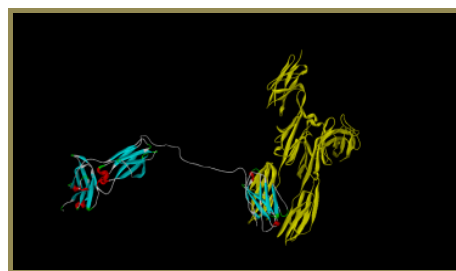
۰/۵۶ ساختار هم نشان دهنده این است که این ساختار کیفیت مناسبی دارد.



شکل ۲- ساختمان 3D پروتئین نوترکیب پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار I-TASSER و تصویرسازی شده توسط نرم‌افزار Accelrys DS Visualizer 1.7. ناحیه زرد رنگ مربوط به بخش عملکردی و ناحیه آبی و قرمز مربوط به بخش پایدار کننده می باشد)



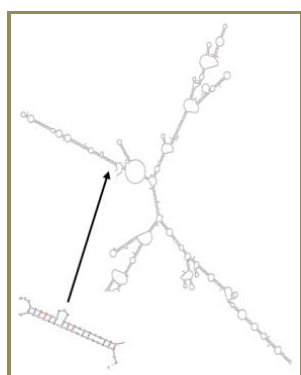
A



B

شکل ۳- نحوه اندرکنش (داکینگ) CTLA4-FC با لیگاندهای CD80 (I18L و I1DR9) و CD86 (I185 و INCN): اندرکنش مناسب بین بخش عملکردی پروتئین های کایمر (آبی رنگ) و لیگاند های مونومر و دایمر CD80 و CD86 (زرد رنگ) برقرار شده است.

حداقل انرژی آزاد برابر با $-336/10$ و ΔG شروع برابر با $-5/60$ می باشد. (شکل ۴).



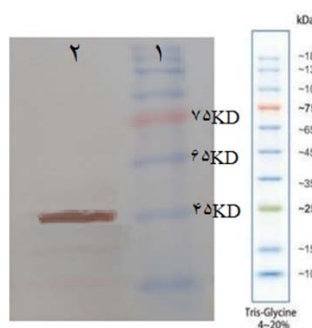
شکل ۴- پیش بینی ساختمان دوم mRNA برای CTLA4-FC

نتایج نشان می دهد که انتهای ۵' ژن پروتئین نوترکیب همانند ساختار ژنهای پروکاریوتی فولد شده است. شواهد

پیش بینی میل پیوندی پروتئین های نوترکیب با لیگاندهای CD80 و CD86: با استفاده از سرور PPA-Pred میل پیوندی پروتئین نوترکیب کایمری با لیگاندهای CD80 و CD86 به طور جداگانه بررسی گردید. مقدار Kd پیش بینی شده (ثابت تفکیک) بترتیب برای CD86 برابر با $M \cdot 07e-2/8$ و برای CD80 برابر با $M \cdot 086e-2/0$ و مقدار دلتا G پیش بینی شده (انرژی آزاد پیوند) برای CD86 برابر با $-10/48$ kcal/mol و برای CD80 برابر با $-93/93$ kcal/mol می باشد. هرچه دلتا G و ثابت تفکیک کمتر باشد میل پیوندی بیشتر است نتایج نشان داد که ساختار میل پیوندی مناسبی دارد.

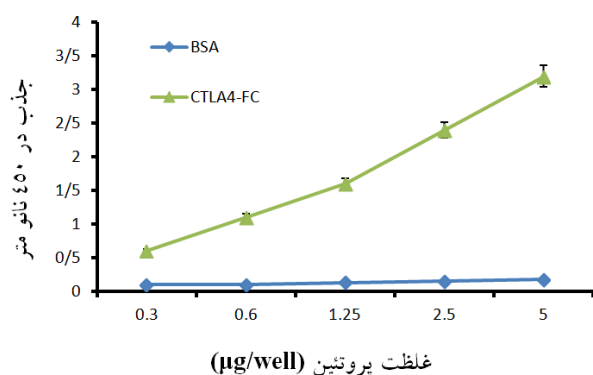
پیش‌بینی ساختار mRNA و پایداری آن: جزئیات ترمودینامیک مربوط به انتهای ۵' mRNA نشان داد که

آنالیز پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلات: همانگونه که در شکل ۶ نشان داده شده است نتایج وسترن بلات نشان داد که آنتی-FC بطور اختصاصی با بخش FC پروتئین نوترکیب واکنش می‌دهد. این در حالی است که آنتی-FC کوچکترین واکنشی با دیگر پروتئین‌های موجود در سوپ سلولی که حاوی تمام پروتئین‌های بیان شده در باکتری است، نداشت.



شکل ۶- نتیجه وسترن بلاتینگ پروتئین نوترکیب: (۱) مارکر پروتئینی (Prestained protein marker- proteintech) (۲) پروتئین نوترکیب

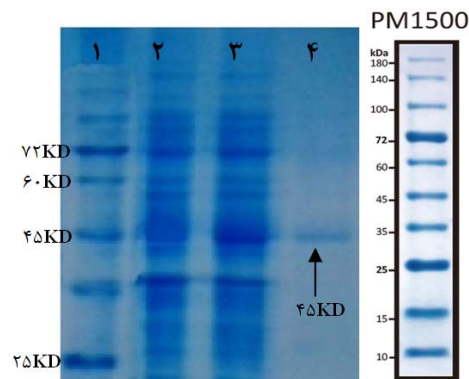
تایید پروتئین‌های نوترکیب به وسیله تست الایزا: با توجه به اینکه بخش پایدار کننده در پروتئین‌های نوترکیب تولید شده، FC آنتی بادی می‌باشد لذا با انجام الایزا با آنتی بادی کانژوگه ضد FC حضور پروتئین تایید شد. همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰nm با افزایش غلظت پروتئین نوترکیب افزایش یافته است در حالی که جذب پروتئین کنترل BSA با افزایش غلظت ثابت مانده است.



نشان می‌دهد که mRNA بمیزان کافی جهت بیان مناسب در میزان باکتریایی پایدار می‌باشد.

آنتی ژنیسیته پروتئین کایمر با سرور واکسی ژن با حد آستانه ۰/۵ نشان می‌دهد که ساختار کایمر با شاخص آنتی ژن ۰/۴۸۷۷، غیر آنتی ژن است و لذا سیستم ایمنی را تحریک نمی‌کند. (جدول ۶).

بررسی بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب: پس از بیان پروتئین نوترکیب در همسانه انتخاب شده و بدنال آن شکستن سلول‌های باکتری با استفاده از اوره ۸ مولار، بقایای سلولی و سایر اجزاء نامحلول با سانتریفیوژ از عصاره شفاف سلولی جدا گردید. در ادامه عصاره محلول در بافر نمونه پروتئینی حل شده و با SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۵ نتیجه بیان سازواره نوترکیب را پس از انجام فرآیند تخلیص نشان می‌دهد. تصویر ژل مؤید بیان پروتئین نوترکیب با وزن تقریبی ۴۵ کیلو دالتون بصورت ذرات مجتمع است. غلظت پروتئین تخلیص شده برای انجام آنالیزهای بعدی برابر با ۱۰mg/L اندازه‌گیری شد. بمنظور بازیافت پیوندهای دی سولفیدی پروتئین‌های نوترکیب که بصورت ذرات مجتمع بودند ریفرولد شدند.



شکل ۵- بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب جهت بیان پروتئین نوترکیب CTLA4-FC: ستون ۱، مارکر پروتئینی (SMOBIO) ستون ۲، نمونه عصاره سلول لقا نشده (کنترل منفی). ستون ۳، نمونه عصاره سلول بعد از لقا. ستون ۴، فروشویی ستون با بافر حاوی ایمیدازول ۲۵۰mM

نمودار ۱- نمودار الی‌ای پروتئین نوترکیب

نتایج CD: آنالیز ساختار دوم پروتئین نوترکیب CTLA4-

FC نشان داد که ساختار دوم این پروتئین با ساختار دوم

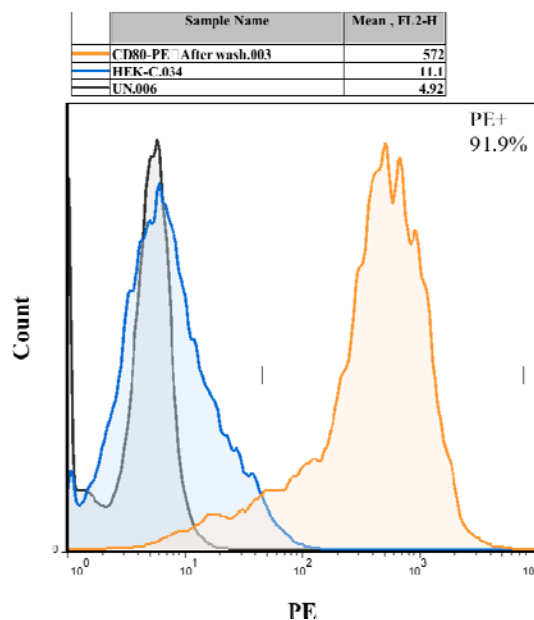
پیش‌بینی شده آنها تقریباً مشابه می‌باشد. (جدول ۷)

جدول ۷- مقایسه ساختار دوم پروتئین نوترکیب با ساختار دوم پیش‌بینی شده

نام ساختار	ساختار دوم	ماریچ تصادفی	صفحه-بتا	آلفا-هلیکس	پیچ-بتا
CTLA4-FC	پیش‌بینی شده	٪ ۵۸/۲۶	٪ ۳۴/۴۵	٪ ۷/۲۸	محاسبه نشد
	CD	٪ ۵۰/۷	٪ ۳۱/۳	٪ ۵/۳	٪ ۱۲/۷

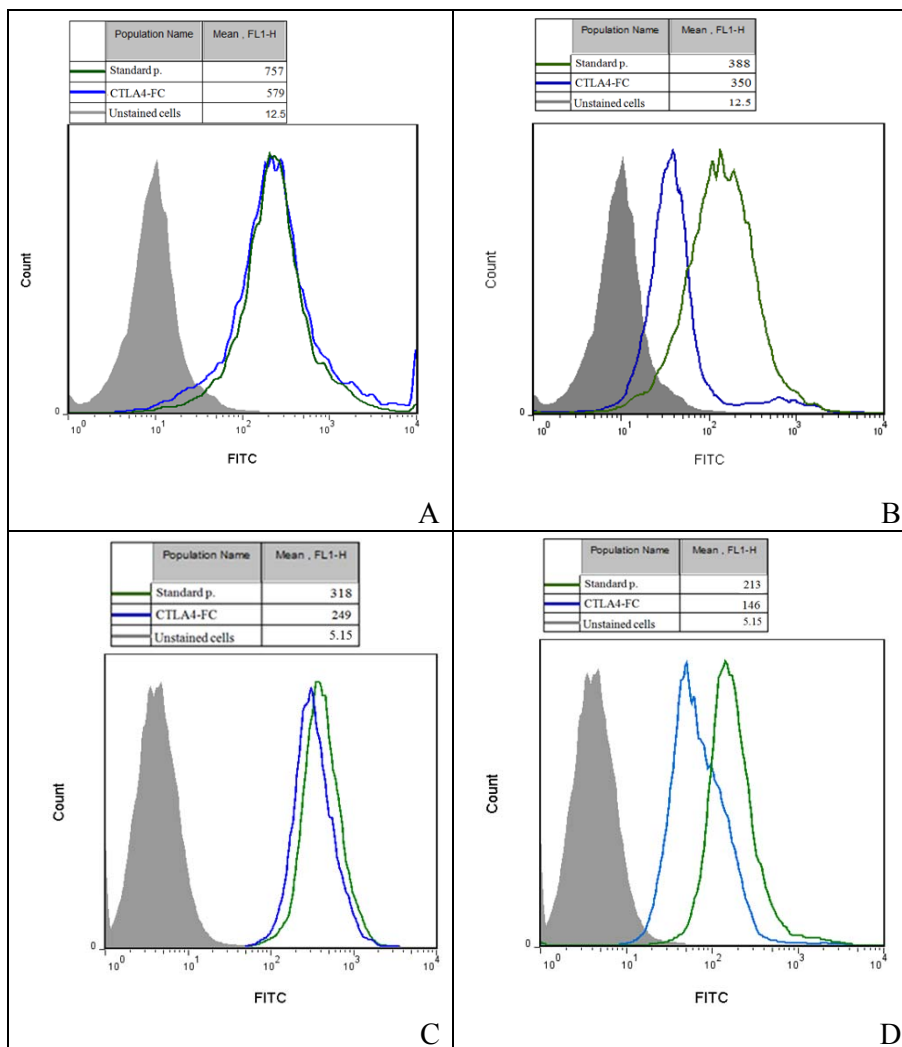
برای نمونه های مختلف متفاوت می باشد و با کاهش غلظت پروتئین ها میزان MFI بطور منطقی کاهش می یابد (شکل ۸). لذا می توان با مقایسه MFI پروتئین استاندارد با پروتئین نوترکیب غلظت های مختلف میزان تمایل اتصال آنها را بررسی نمود. نمودار ۲، MFI نمونه ها در غلظت های مختلف پروتئین استاندارد و پروتئین های نوترکیب را نشان می دهد. مطابق نمودار در غلظت های مختلف، پروتئین استاندارد میزان MFI بیشتری نسبت به پروتئین نوترکیب دارد.

بررسی تمایل اتصال پروتئین های نوترکیب با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری: شکل ۷ شدت رنگ PE در سلول *Raji* که بیانگر بیان بالای رسپتور CD80 بر سطح این سلول می باشد را نشان می دهد. همانگونه که در شکل ۷ نشان داده شده است نتایج شدت رنگ FITC در تمامی غلظت های پروتئین استاندارد و پروتئین نوترکیب تقریباً برابر و بالای ۹۰ درصد مثبت می باشد ولی وقتی در آنالیز نتایج با نرم افزار Flowjo، شدت فلورسانس میانگین (MFI) نمونه ها بررسی شد مشاهده شد که این پارامتر

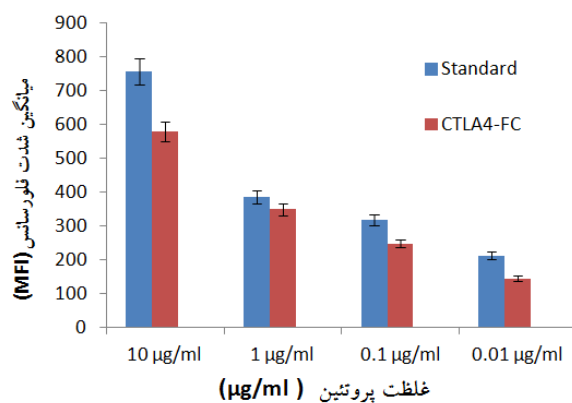


شکل ۷- شدت رنگ PE در سلول *Raji* که بیانگر بیان بالای رسپتور CD80 بر سطح این سلول می باشد: نمودار خاکستری نمونه بدون رنگ، نمودار

آبی سلول *Hek293* فاقد رسپتور CD80 و نمودار نارنجی سلول های *Raji*



شکل ۸- مقایسه شدت رنگ FITC در غلظت های مختلف پروتئین استاندارد (نمودار سبز)، پروتئین CTLA4-FC (نمودار آبی): (A) غلظت ۱۰ μg/ml (B) غلظت ۱ μg/ml (C) غلظت ۰/۱ μg/ml و نمونه بدون رنگ (نمودار خاکستری)

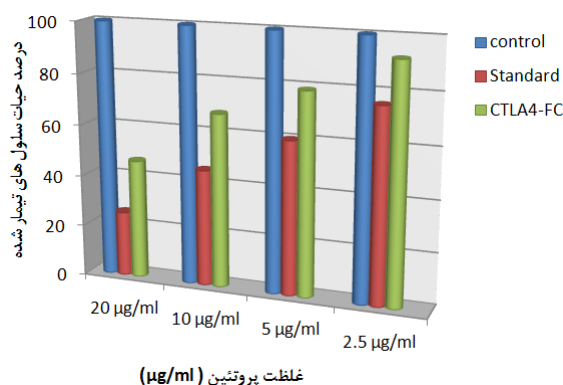


نمودار ۲- مقایسه MFI پروتئین استاندارد با پروتئین نوترکیب CTLA4-FC

یوکاریوتی با مشکلات زیادی مانند پیچیدگی پروسه استخراج خطر آلودگی ویروسی و هزینه‌های بالا همراه است. ولی در سیستم باکتریایی مزیت‌های زیادی همچون رشد سریع و زیاد، هزینه پایین استخراج، و به صرفه بودن از نظر اقتصادی دارد (۲۱). لذا در این تحقیق پروتئین کایمر CTLA4-FC در سلول باکتریایی بیان شد و فعالیت بیولوژیکی آن با نمونه تولید شده در سلول‌های یوکاریوتی مقایسه گردید.

امروزه استفاده از ابزارهای بیوانفوماتیک قبل از انجام تست‌های آزمایشگاهی بدلیل مزایای بسیاری مانند در دسترس بودن، سریع و کم هزینه بودن امری معمول و مرسوم می‌باشد (۲۳، ۲۵، ۳۴). طبق نتایج حاصل از نرم افزار ProtParam کایمر مورد مطالعه بیشترین پایداری و طول عمر را خواهد داشت. نتایج نرم افزار I-TASSER نشان داد که ساختار سوم پیش‌بینی شده پروتئین، ساختاری صحیح است. چرا که ضریب اطمینان (C-score) ساختار تعیین شده در محدوده مجاز قرار گرفته است. نرم افزار آیتاسر، در مقایسه با سایر نرم‌افزارها در پیش‌بینی ساختمان سوم پروتئین از دقت عمل بیشتری برخوردار است و دارای روش‌های مختلفی برای نیل به این مهم است. پارامترهایی که توسط این نرم‌افزار لحاظ می‌شود، به انتخاب مدل برتر کمک می‌کند (۱۹). C-score که از نظر عددی بین ۵- تا ۲ است، یک نمره اطمینان برای تعیین کیفیت ساختارهای پیش‌بینی شده توسط این نرم‌افزار می‌باشد که بر پایه اهمیت ساختار الگوهای همتراز و همگرایی پارامترهای ساختار شبیه‌سازی شده محاسبه می‌گردد. نمودار رامچاندردان مناطق مجاز از نظر انرژی برای زوایای ψ و ϕ رزیدوهای اسید آمینه در ساختار پروتئینی را بررسی می‌کند و بر این اساس تعداد رزیدوهای دلخواه، تعداد رزیدوهای مجاز و تعداد رزیدوهای خارج از محدوده را نشان می‌دهد. (۹ و ۳۳). سرور زد داک، سروری است که به آسانی و با سرعت بالا می‌تواند مدل‌های مناسب برای اندرکنش‌های پروتئین‌ها ارائه دهد (۳)

بررسی میزان مهار لئوسیت T توسط پروتئین‌های نوترکیب: میزان حیات سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های مختلف پروتئین استاندارد و پروتئین نوترکیب با روش MTT سنجیده شد. نتایج نشان می‌دهد که میزان مهارکنندگی لئوسیت‌های T توسط پروتئین نوترکیب CTLA4-FC در غلظت‌های مختلف از پروتئین استاندارد کمتر می‌باشد. (نمودار ۳)



نمودار ۳- درصد حیات لئوسیت‌های T در حضور غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب (ستون‌های قرمز) و مقایسه آن با پروتئین استاندارد (ستون‌های سبز رنگ). ستون‌های آبی رنگ نمونه‌های کنترل (فاقد پروتئین مهارکننده)

بحث

گیرنده CTLA4 بر روی سلول‌های T فعال شده بمیزان زیاد بیان می‌شود و با اتصال رقابتی به لیگاند‌های B7 باعث مهار پاسخ ایمنی می‌شود. تمایل اتصال مولکول CTLA4 نسبت به لیگاند‌های B7 تقریباً ۱۰ تا ۱۵ برابر مولکول CD28 می‌باشد. بدلیل این تمایل اتصال زیاد از مولکول CTLA4 بعنوان مهارکننده لئوسیت‌های T و مهارکننده سیستم ایمنی جهت درمان برخی بیماری‌های خود ایمن استفاده می‌شود. (۸)

در مطالعات قبلی CTLA4-Ig اغلب در سلول‌های یوکاریوتی بیان گردیده بود بعنوان مثال زنگ و همکاران در سال ۲۰۰۷ پلاسמיד خطی حاوی CTLA4-Ig را در سلول‌های CHO کلون و بیان کردند (۲۹). بیان در سلول

سلول‌های طحالی حاوی سلول‌های T و سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن هستند تحریک سیستم ایمنی موش با یک آنتی‌ژن باعث می‌شود تا افزودن این آنتی‌ژن در محیط کشت سلول‌های طحالی عرضه‌کننده آنتی‌ژن توسط APC ها بهتر انجام شده و در نتیجه فعالسازی و تکثیر سلول‌های T را در پی خواهد داشت. پایین بودن اثر مهارتی پروتئین نوترکیب در مقایسه با پروتئین استاندارد بدلیل تمایل اتصال کمتر این پروتئین‌ها به رسپتورشان نسبت به پروتئین استاندارد می‌باشد و موید نتایج تست فلوسایتومتری می‌باشد. مطالعات مختلف نشان داده است که گلیکوزیلاسیون CTLA4 در افزایش نیمه عمر پروتئین نقش دارد و در تمایل اتصال آن به گیرنده نقشی ندارد. (۸) با توجه به اینکه پروتئین نوترکیب به گیرنده متصل شد و باعث مهار تکثیر سلول‌های T گردید لذا به نظر می‌رسد بازیابی کامل پیوندهای دی‌سولفیدی و ایجاد ساختار صحیح پروتئین می‌تواند در افزایش عملکرد آن نقش داشته باشد. بنابراین با اصلاح و بهینه‌سازی روش‌های ریفرولد پروتئین می‌توان به این مهم دست یافت.

نتیجه‌گیری

پروتئین CTLA4-FC تولید شده در این تحقیق در مقایسه با پروتئین استاندارد که در سلول‌های یوکاریوتی تولید شده بود تمایل اتصال کمتری در اتصال به سلول‌های T از خود نشان داد و در نتیجه اثربخشی کمتری بعنوان دارو خواهد داشت. علارغم این موضوع با توجه به اینکه تولید پروتئین نوترکیب در سلول‌های پروکاریوتی مزایای بسیار زیادی دارد می‌توان این دارو را با بهینه‌سازی روش‌های بیان و تخلیص در فازهای بعدی مطالعه بعنوان دارو تولید نمود که این موضوع نیاز به مطالعات بیشتر و تکمیلی دارد.

و ۱۸). یکی از فاکتورهای مهم در طراحی ژنهای کایمر توجه به پایداری ساختار mRNA می‌باشد. بمنظور بررسی پایداری ساختار RNA میزان ΔG ، وجود ساختارهایی از قبیل لوپ‌های کاذب ارزیابی شد. حداقل انرژی آزاد (ΔG) که نشان‌دهنده پیشرفت خود به خودی واکنش بوده نشان می‌دهد که ساختار کایمر انتخاب شده پایدار بوده است. این واقعیت با بیان میزان بالای پروتئین در فاز آزمایشگاهی ثابت گردید (۱۴). بهینه‌سازی مناسب باعث بیان مناسب و بالای پروتئین‌های نوترکیب در میزبان گردید. از وکتور pET-28a بدلیل اینکه دارا بودن پروموتور قوی و در دسترس بودن استفاده شد. پروتئین‌های نوترکیب تحت شرایط دناتوره تخلیص و ریفرولد شدند. در مقایسه با دیگر مطالعات انجام شده مانند مطالعه سئوب شین و همکارانش در سال ۲۰۰۷ که میزان پروتئین ۶ mg/L تولید نمودند تولید پروتئین با غلظت ۱۰ mg/L در این تحقیق نشان‌دهنده بهینه‌سازی مناسب بیان می‌باشد. (۴ و ۲۱). یکسان بودن تقریبی نتایج CD با پیش‌بینی‌های انجام شده نشان‌دهنده پیش‌بینی دقیق ساختار دوم می‌باشد. از استفاده از تکنیک فلوسایتومتری جهت بررسی افینیتی در مطالعات مختلف مرسوم می‌باشد. زنگای و همکاران برای بررسی تمایل اتصال فیوژن پروتئین CTLA4-FC از روش فلوسایتومتری استفاده نمودند (۲۶). در آنالیزهای فلوسایتومتری از سلول *Raji* بدلیل اینکه رسپتور CD80 را در سطح خود بیان می‌کند استفاده شد. در مطالعات مختلف هم برای بررسی افینیتی از همین سلول استفاده می‌شود. میزان MFI پروتئین نوترکیب در غلظت‌های مختلف در مقایسه با میزان MFI پروتئین استاندارد مقادیر کمتری را نشان می‌دهد. این موضوع با توجه به اینکه پروتئین استاندارد در سلول‌های یوکاریوتی تولید شده است طبیعی به نظر می‌رسد. مخلوط

منابع

جهت تولید مکمل خوراک دام. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۳۳ شماره ۱.

۱- افشین ح، می‌آخوری ن، صفار ب، خواجعی ف. ۱۳۹۹. کلون‌سازی و بیان ژن بتا (۳-۱)(۴-۱) گلوکاناز در باکتری اشیرشیاکلی

- در میزبان *E.coli*. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۲۹ شماره ۱.
- 3-Ahmad A, Javed MR, Rao AQ, Khan MA, Ahad A, Shahid AA, et al. 2015. In-silico determination of insecticidal potential of Vip3Aa-Cry1Ac fusion protein against Lepidopteran targets using molecular docking. *Frontiers in plant science*. 6:1081.
 - 4-Bollag DM, Edelstein SJ, Rozycki MD. 1996. *Protein methods*: Wiley-Liss New York.
 - 5-Bidkar A, Thakur N, Bolshette JD, Gogoi R. 2014. In-silico Structural and Functional analysis of Hypothetical proteins of *Leptospira Interrogans*. *Biochem Pharmacol*. 3(136):2167-88.
 - 6-Doytchinova IA, Flower DR. 2007. Identifying candidate subunit vaccines using an alignment-independent method based on principal amino acid properties. *Vaccine*. 25(5):856-66.
 - 7-Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC*
 - 8-Gardner D, Jeffery L, Sansom D. 2014. Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) pathway and its implications for costimulatory blockade. *American Journal of Transplantation*.;14(9):1985-91.
 - 9-Hoofst RW, Sander C, Vriend G. 1997. Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot. *Bioinformatics*. 13(4):425-30.
 - 10-Jethra G, Mishra A, Pandey P, Chandrasekharan H. 2012. Structure and function prediction of unknown wheat protein using LOMETS and I-TASSER. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 82(10):867.
 - 11-Kroll DJ, ABDEL-HAFIZ HA-M, MARCELL T, SIMPSON S, CHEN C-Y, GUTIERREZ-HARTMANN A, et al. 1993. A multifunctional prokaryotic protein expression system: overproduction, affinity purification, and selective detection. *DNA and cell biology*. 12(5):441-53.
 - 12-Lee S-J, Park C-I, Park M-Y, Jung H-S, Ryu W-S, Lim S-M, et al. 2007. Production and characterization of human CTLA4Ig expressed in transgenic rice cell suspension cultures. *مجله زیست‌شناسی ایران*. ۱۳۹۵. ۲- مرتضوی م، صفار ب، میر آخوری ن، مبینی دهکردی م. طراحی، سنتز، همسانه سازی، ارزیابی بیان و بررسی خاصیت ضد میکروبی پروتئین دفتزین گندم (*Triticum aestivum*) Protein expression and purification. 51(2):293-302.
 - 13-Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, Tso P, Shirasugi N, Strobert M E, et al. 2005. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *American Journal of Transplantation*. 5(3):443-53.
 - 14-McFadden P. 1998. The fold test as an analytical tool. *Geophysical Journal International*. 135(2):329-38.
 - 15-Nikam R, Yugandhar K, Gromiha MM, editors. 2018. Discrimination and Prediction of Protein-Protein Binding Affinity Using Deep Learning Approach. *International Conference on Intelligent Computing*: Springer.
 - 16-Partovi Nasr M, Motallebi M, Zamani MR, and Jourabchi E. 2020. In Silico Analysis and Expression of Osmotin-EAAAK-LTP Fused Protein. *J Genet Resour*. 6(1): 41 -48
 - 17-ProtParam E. ExpASy-ProtParam tool. 2017.
 - 18-Pierce BG, Wiehe K, Hwang H, Kim B-H, Vreven T, Weng Z. 2014. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics*. 30(12):1771-3.
 - 19-Roy A, Kucukural A, Zhang Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*. 5(4):725-38.
 - 20-Suresh V, Parthasarathy S. 2014. SVM-PB-Pred: SVM based protein block prediction method using sequence profiles and secondary structures. *Protein and peptide letters*. 21(8):736-42
 - 21-Shin I-S, Choi E-W, Chung J-Y, Hwang C-Y, Lee C-W, Youn H-Y. 2007. Cloning, expression and bioassay of canine CTLA4Ig. *Veterinary immunology and immunopathology*. 118(1-2):12-8.
 - 22-Sivakumar K, Balaji S. 2007. In silico characterization of antifreeze proteins using computational tools and servers. *Journal of Chemical Sciences*. 119(5):571-9.

- 23-Thapar P, editor 2018. Bioinformatics-tools and applications. the proceedings of the 12th INDIACom International Conference.
- 24-Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, Rice K, Steinberg S, Gaite L, et al. 2016. Belatacept and long-term outcomes in kidney transplantation. *New England Journal of Medicine*. 374(4):333-43.
- 25-Woo PC, Huang Y, Lau SK, Yuen K-Y. 2010. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *viruses*. 2(8):1804-20.
- 26-Xu Z, Juan V, Ivanov A, Ma Z, Polakoff D, Powers DB, et al. 2012. Affinity and cross-reactivity engineering of CTLA4-Ig to modulate T cell costimulation. *The Journal of Immunology*. 189(9):4470-7
- 27-Yugandhar K, Gromiha MM. 2014. Protein-protein binding affinity prediction from amino acid sequence. *Bioinformatics*. 30(24):3583-9.
- 28-Yugandhar K, Gromiha MM. 2015. Response to the comment on 'protein-protein binding affinity prediction from amino acid sequence'. *Bioinformatics*. 31(6):978-82
- 29-Zheng L, Liu Q. 2007. The high level expression of CTLA-4/Ig fusion protein in CHO cell. *Sichuan da xue xue bao Yi xue ban= Journal of Sichuan University Medical science edition*. 38(3):370-3.
- 30-Zemella A, Thoring L, Hoffmeister C, Kubick S. 2015. Cell-free protein synthesis: pros and cons of prokaryotic and eukaryotic systems. *ChemBioChem*. 16(17):2420.
- 31-Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics*. 2009;40(1)
- 32-Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*. 31(13):3406-15.
- 33-Zhou AQ, O'Hern CS, Regan L. 2011. Revisiting the Ramachandran plot from a new angle. *Protein Science*. 20(7):1166-71.
- 34- Zali Benekohal M, Ghadam P, Gharavi S, Abdi Ali A and Piroozmand F. 2021. Overexpression of Thermal and pH Stable Alginate Lyase of *P. aeruginosa* 293 and in silico Study of algL Gene. *J Genet Resour*. 7(1): 49-58

Design and expression of recombinant CTLA4-FC structure and study of its biological activity

Mahdizadeh H.¹, Salimian J.^{2*}, Noormohammadi Z.¹, Amani J.³, Halabian R.³ and Panahi Y.²

¹ Dept. of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

² Chemical Injuries Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of Iran.

³ Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

The chimera structure consisting of the extracellular domain of CTLA4 and the FC fragment of human IgG1 antibody binds to CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) ligands on APCs as a result inhibits CD28 binding and T lymphocyte activation. This structure, called Abatasept, was approved by the US FDA in 2005 to treat rheumatoid arthritis. In this study, the CTLA4-FC chimera structure was designed and then some of its features were investigated using bioinformatics tools. The gene was then cloned into the pET-28a plasmid and transformed into *E.coli* BL21DE3. Recombinant protein was expressed and purified, and flow cytometry was used to evaluate the binding affinity. Mixed lymphocyte culture (MLR) method was also used to evaluate the biological activity of recombinant protein. Bioinformatics results showed that the designed structure of CTLA4-FC is suitable in terms of physicochemical properties, second and third structure, how it binds to the receptor, antigenic properties and mRNA properties. Recombinant protein was well expressed in bacteria. Purification was performed as required. Western blotting and ELISA results were positive and flow cytometry and MLR tests were acceptable. Recombinant CTLA4-FC protein was produced in bacterial cells and bound well to CD80 and CD86 receptors and was able to inhibit T cells. So it can be a good candidate for drug production.

Key words: bioinformatics, Abatasept, CTLA4-FC, flow cytometry