

## کلونینگ، بیان، تخلیص و بررسی وضعیت ایمنوتراپی پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB در درمان سرطان پستان

فروغ یوسفی<sup>۱</sup>، سید داور سیادت<sup>۲</sup>، محمد مهدی اصلانی<sup>۳</sup>، عباس علی ایمانی فولادی<sup>۴</sup>، امید نصیری<sup>۳</sup>، سید فضل ا... موسوی<sup>۳\*</sup>

۱. بخش میکروب شناسی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
۲. گروه سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳. بخش باکتری شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** سوپرآنتی‌ژنهای باکتریایی قادرند لنفوسیت های T را بدون توجه به اختصاصی بودن آنها تحریک کرده و سبب آزادسازی حجم وسیعی از سایتوکاین‌ها، از لنفوسیت‌های T و مونوسیت‌ها گردند در نتیجه آنها می‌توانند سیستم ایمنی بیمار را در جهت از بین بردن سلولهای سرطانی فعال کنند. در این مطالعه برای اولین بار پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB از طریق اتصال ناحیه سوم فاکتور رشد اپیدرمی به انتروتوکسین تیپ B استافیلوکوکوس اورئوس طراحی و تولید گردید. بعلاوه فعالیت ضد توموری آن بر علیه رده سلول سرطان پستان انسانی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**روش‌ها:** پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB از طریق اتصال ژنتیکی انتهای آمینی *tgfa3* به انتهای کربوکسی *seb* با واسطه لینکر GGSGSGGG طراحی شد. حامل نو ترکیب pET28a::*tgfa3-seb* به میزبان بیانی اشرشیاکولی BL21(DE3) منتقل و به صورت یک پروتئین کایمیریک بیان گردید. سپس فعالیت ضد توموری پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB بر روی رده سلولی سرطان پستان انسانی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**نتایج:** یافته‌های حاصله از طریق colony PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید شد. پروتئین کایمیریک با وزن مولکولی ۳۱ kDa بیان، تخلیص و سپس از طریق آنالیز وسترن بلات تایید گردید. بررسی اثر ضد توموری نشان داد. TGF $\alpha$ L3-SEB قادر است رشد سلولهای سرطان پستان را مهار کند. **نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB با موفقیت طراحی، بیان و تخلیص گردیده و احتمالاً می‌تواند به عنوان کاندید انتخابی ایمنوتراپی سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد.

### کلید واژه‌ها:

انتروتوکسین تیپ B، استافیلوکوکوس اورئوس، کلونینگ، ایمنوتراپی، فاکتور  $\alpha$  رشد اپیدرمی، سرطان پستان، تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

### مقدمه

استفاده از پرتو درمانی، از تقسیم سلولی جلوگیری نموده ولی عملکرد آنها اختصاصی نیست در نتیجه سبب سرکوب سیستم ایمنی فرد می‌گردد (۴). فعال سازی سیستم ایمنی خود بیمار یکی از روش‌های درمانی امیدبخش در جهت کنترل پیشروی

سرطان مشکل عمده سلامت عمومی در همه جهان است (۱، ۲). استفاده از شیمی درمانی و پرتو درمانی سلولهای سرطان، گاهی بواسطه عوارض جانبی جدی و تهدید کننده سلولهای نرمال محدود می‌شود (۳). اکثر داروهای ضد سرطان و

گیرنده ای که از طریق لیگاند مورد هدف قرار می گیرد باید از تراکم بالایی در سطح سلولهای سرطانی برخوردار باشد (۳). در اینجا برای جهت گیری مناسب سوپرآنتی ژن SEB به سمت سلولهای توموری پستان از لیگاند طبیعی  $TGF-\alpha$  که گیرنده آن Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) است، استفاده شد (۱۲).

ارتباط قابل توجهی بین افزایش بیان EGFR و درجات تمایز و متاستاز مشاهده گردیده است (۱۴-۱۶). EGFR ها در طیف وسیعی از سلولهای تومورال انسانی مانند سرطانهای پستان، گردن، معده، کلون-مقعد، حلق-حنجره، پروستات، مثانه، کلیه، پانکراس و سرطان غیر سلول کوچک ریه (Non-(NSCLC) Small Cell Lung Carcinoma) افزایش بیان دارند. لذا با توجه به این که بیان بیش از اندازه EGFR مشخصه چندین تومور می باشد، بنابراین می تواند به عنوان ابزاری برای عوامل درمانی عمل کرده و بافت سرطانی مورد نظر را بطور اختصاصی مورد هدف قرار دهد (۱۷-۱۹). با توجه به افزایش بیان EGFR در انواع سرطانها، برای جهت گیری دقیق SEB از لیگاند این گیرنده یعنی  $TGF\alpha$  استفاده شد. لیگاند  $TGF\alpha$  از سه ناحیه تشکیل شده است که ناحیه سوم آن ( $TGF\alpha L3$ ) توانایی اتصال به EGFR را حفظ کرده است، در واقع ناحیه ۳ نقش اصلی را در اتصال به گیرنده بر عهده دارد. برای جلوگیری از فرآیند ورود القا شده از طریق اتصال لیگاند به گیرنده، در این تحقیق بجای استفاده از  $TGF-\alpha$  با طول کامل، از ناحیه سوم آن ( $TGF\alpha L3$ ) استفاده شد، بدین وسیله سوپرآنتی ژنها به سمت بافت سرطانی بیان کننده EGFR جهت گیری شده (۸) و پروتئین کایمیریک  $TGF\alpha L3$ -SEB می تواند به عنوان کاندیدای ایمنوتراپی سرطانهای که در آنها گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی افزایش بیان دارد مورد استفاده قرار گیرد.

#### روشها

**مواد و سویه های باکتریایی:** آنزیم های محدودالثر و کیت تخلیص DNA (Silica based DNA gel extraction kits) از شرکت فرمنتاس (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA)

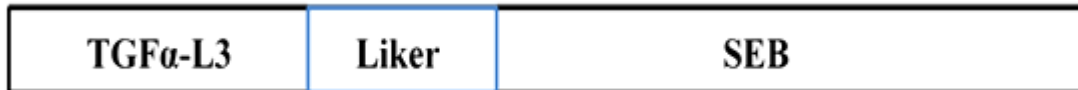
سرطان است (۵) استراتژی جالبی که برای این منظور بکار گرفته می شود استفاده از سوپرآنتی ژنها می باشد (۶، ۷). سوپرآنتی ژنها، پروتئینهای باکتریایی یا ویروسی هستند که کلونهای زیادی از سلولهای T را بدون توجه به اختصاصی بودن آنتی ژنی فعال می کنند در نتیجه سبب آزادسازی حجم وسیعی از سایتوکاینهای متنوع مانند  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $IL-1$ ,  $IL-2$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$  و  $IL-12$  از سلولهای T و منوسیتها می گردند (۵، ۸). کاربرد سوپر آنتی ژنها در درمان تومورها طی دهه های گذشته مورد بررسی قرار گرفته است (۹، ۱۰). در این تحقیق از سوپرآنتی ژن انترتوکسین تیپ B استافیلوکوکوس اورئوس (SEB) استفاده شد که مدل کلاسیکی از سوپرآنتی ژنها می باشد. این سوپرآنتی ژن القاگر قوی فعالیت سلولهای T سیتوتوکسیک و تولید سایتوکاین در شرایط *in vivo* می باشد (۵). پس از انتخاب SEB به عنوان القاگر سلولهای T سیتوتوکسیک جهت درمان، موضوع مورد بررسی دیگر در این تحقیق تحویل اختصاصی سوپرآنتی ژن به بافت سرطانی بود. تحویل اختصاصی داروی ضد سرطان یک استراتژی امیدبخش درمانی است زیرا کارایی درمان را افزایش داده و سمیت بر روی سلولهای نرمال را کاهش می دهد (۱۱). استراتژیهای برای جهت گیری دقیق دارو به سمت سلولهای سرطانی در دست بررسی می باشند که شامل اتصال عامل درمانی به آنتی بادی (۱۲) و یا لیگاندهایی است که به ترتیب آنتی ژن اختصاصی و یا گیرنده مرتبط با تومور را شناسایی می کنند، این اتصال سبب می شود که دارو به سمت سلول سرطانی جهت گیری شده و سلولهای نرمال از اثرات سمی دارو محفوظ بمانند (۳).

در این تحقیق برای جهت گیری دقیق سوپرآنتی ژن به سمت سلولهای توموری بجای استفاده از آنتی بادی اختصاصی ضد تومور از لیگاندهای مرتبط با تومور که آنتی ژنسیته کمتر و در نتیجه نیمه عمر بیشتری در گردش خون دارد، استفاده شد (۳). باید در نظر داشت انتخاب لیگاند مناسب در جهت گیری دقیق دارو به سمت سلولهای سرطانی بسیار مهم است و

شرکت Novagen Inc. (Madison, USA) خریداری شدند. رده سلولی سرطان پستان انسانی MDA-MB-468 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد.

**طراحی سازه کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB:** پس از بررسی نتایج مطالعه بیوانفورماتیک (۲۰) سازه کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB به صورتی طراحی گردید که توالی اسید آمینه ناحیه سوم فاکتور رشد اپیدرمی آلفا (TGF $\alpha$ L3) در قسمت انتهایی آمینی، پس از آن لینکری متشکل از ۶ اسید آمینه GGSGSGGG و در نهایت توالی اسید آمینه انتروتوکسین تیپ B/استافیلوکوکوس اورئوس (SEB) در انتهای کربوکسی پروتئین کایمیر TGF $\alpha$ L3-SEB قرار بگیرد (شکل ۱).

```
VCHSGYVGVRCHEADLLGGSGSGGSESQDPKPKDELHKASKFTGLMENMKVL YDDNHVSAINVKSIDQFLYFDLIYSIKD
TKLGNVDNVRVEFKNKDLADKYDKYVDVDFGANYYYQC YFSKKTNDINSHQTDKRKTCMYGGVTEHNGNQLDKYRSITVR
VFEDGKNLLSFDVQTNKKKVTAQELDYLTRHYLVKNKKLYEFNNSPYETGYIKFIENENSFWYDMMPAPGDKFDQSKYLM
MYNDNKMVDSKDKVIEVYLTKKK
```



شکل ۱. تصویر شماتیک سازه کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB

الکتروفورز گردیده و با رنگ آمیزی در اتیدیوم بروماید آشکار سازی شد و میزان ۲۰ میکرولیتر از محصول بدست آمده جهت تعیین توالی ارسال گردید.

**جداسازی سویه استافیلوکوکوس اورئوس داری ژن انتروتوسین تیپ B (seb+):** پس از تایید نهایی سویه های استافیلوکوکوس، حضور ژن انتروتوسین تیپ B (seb+) در آنها از طریق پرایمرهای تشخیصی اختصاصی رفت با توالی 5' TCGCATCAAACCTGACAAACG3' و پرایمر برگشت با توالی 5' GCAGGTACTCTATAAGTGCC3' استفاده شد.

شرایط PCR شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۴<sup>0</sup>C برای ۵ دقیقه و به دنبال آن ۲۵ سیکل واسرشت در دمای ۹۴<sup>0</sup>C به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایرها در دمای ۶۴<sup>0</sup>C به مدت ۱ دقیقه و گسترش در دمای ۷۲<sup>0</sup>C به مدت ۱ دقیقه بود. واکنش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲<sup>0</sup>C ادامه یافت. از بین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس داری ژن انتروتوسین

خریداری شد. سنتون تخلیص (Nickel- Ni-NTA nitrilotriacetic acid)، کیت تخلیص محصول PCR و کیت استخراج DNA ژنومی به ترتیب از شرکت های Qiagen GmbH (Germany)، metabion (Germany) و Bioneer (Korea) خریداری شدند. سنتز پرایمرهای مورد نیاز و همچنین توالی tgfa-linker به ترتیب توسط شرکت های Bioneer (Korea) و ShineGene Molecular Biotech, Inc. (China) انجام شد. سویه استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن انتروتوکسین تیپ B از نمونه بالینی جدا گردید. باکتریهای اشرشیاکولی TOP10 جهت تکثیر و نگهداری پلاسمید و اشرشیاکولی BL21(DE3) جهت بیان پروتئین نو ترکیب و همچنین حامل بیانی pET-28a+ از

**تایید سویه استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از تکثیر ژن نوکلئاز A مقاوم به حرارت:** جهت تایید نهایی سویه های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بدست آمده از نمونه بالینی از تکثیر قطعه حفاظت شده ژن نوکلئاز A مقاوم به حرارت (nucA) که اختصاصی استافیلوکوکوس اورئوس است، استفاده شد (۲۱-۲۶). بسطیدن منظهور توالی 5' ATGGCTATCAGTAATGTTTCG3' به عنوان پرایمر رفت و توالی 5' TTTAGGATGCTTTGTTTCAGG3' به عنوان پرایمر برگشت جهت تکثیر قطعه ۲۱۸ bp از ژن nucA طراحی و ساخته شد. این واکنش به صورت یک سیکل ابتدایی واسرشت به مدت ۵ دقیقه با دمای ۹۴<sup>0</sup>C، ۲۵ سیکل اصلی هر سیکل شامل سه مرحله واسرشت اولیه با دمای ۹۴<sup>0</sup>C و مدت زمان یک دقیقه، مرحله اتصال با دمای ۵۳<sup>0</sup>C و مدت زمان یک دقیقه و مرحله گسترش با دمای ۷۲<sup>0</sup>C درجه و مدت زمان یک دقیقه و در انتها نیز یک سیکل نهایی در دمای ۷۲<sup>0</sup>C به مدت زمان ۵ دقیقه اجرا گردید. محصول PCR روی ژل اگاروز ۱٪

UniProt (Accession No P01135) از بانک پروتئینی Knowledgebase database دریافت شده و پس از افزودن توالی ژنی لینکر GGSGGG در مکان برش آنزیم BamHI در انتهای آمینی و مکان برش آنزیم EcoRI در انتهای کربوکسی قرار داده شد. توالی نهایی توسط شرکت ساخته شد. پس از سنتز، توالی *tgfa3-linker* تحت هضم توسط آنزیم های BamHI و EcoRI قرار گرفت و سپس تخلیص گردید. جهت تولید سازه کایمیریک *pET28a::tgfa3-seb* حامل نوترکیب *pET28a::seb* نیز با آنزیم های BamHI و EcoRI تحت هضم آنزیمی قرار گرفت و سپس خالص گردید. هر دو محصول خالص شده در واکنش اتصال وارد و سپس به میزبان /شرشیاکولی TOP10 منتقل گردید. محصول اتصال بر روی محیط LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد. کلونی های ظاهر شده بر روی محیط کشت LB از نظر حضور ژن نوترکیب *tgfa3-seb* با استفاده از colony PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی ارزیابی و تایید گردیدند.

**بهینه سازی بیان پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB:** بهینه سازی بیان پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB در فراکسیون محلول با توجه به متغیرهای زمان القا، غلظت IPTG و دما ارزیابی گردید. جهت بهینه سازی زمان القا، پس از رسیدن ۰/۵ OD600، IPTG با غلظت نهایی ۱ mM افزوده شد سپس رسوب باکتری ۲، ۴، ۶ ساعت و همچنین یک شب پس از القا جمع آوری و میزان باند بیان پروتئین کایمیر در زمانهای ذکر شده مقایسه گردید. در این ارزیابی بهترین زمان القا یک شب پس از افزودن IPTG بود. در آزمون بعدی پس از رسیدن ۰/۵ OD600، IPTG با غلظت نهایی ۱ mM، ۰/۸ mM و ۰/۵ mM جهت القا افزوده گردید. لوله های کشت به مدت یک شب در دو دمای ۳۷<sup>0</sup>C و ۳۰<sup>0</sup>C القا و باند بیانی آنها از طریق SDS-PAGE آنالیز گردید (شکل ۵).

**خالص سازی پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB:** پس از تایید بیان پروتئین در فاز محلول، تخلیص در شرایط طبیعی و بدون استفاده از مواد دناتورده کننده انجام شد. با توجه به این

تیپ B (+seb)، یک سویه جهت همسانه سازی سازه TGF $\alpha$ L3-SEB انتخاب گردید.

**تولید حامل نوترکیب pET28a::seb:** جهت تکثیر قطعه ۷۲۰ bp کد کننده ژن انتروتوکسین تیپ B از پرایمر رفت با توالی 5'AGCAGAATTCATGGAGAGTCAACCAG 3' جایگاه برش آنزیمی برای EcoRI و پرایمر برگشت با توالی 5'TAACGAAGCTTTTCACTTTTTTCTTTGTGCG3' جایگاه برش آنزیمی برای HindIII استفاده شد. شرایط PCR شامل شرایط PCR شامل واسرشت اولیه در دمای با دمای ۹۴<sup>0</sup>C برای ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ سیکل واسرشت در دمای ۹۴<sup>0</sup>C به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایرها در دمای ۶۳<sup>0</sup>C به مدت ۱ دقیقه و گسترش در دمای ۷۲<sup>0</sup>C به مدت ۱ دقیقه بود. واکنش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲<sup>0</sup>C ادامه یافت. محصول PCR بدست آمده توسط آنزیم های EcoRI و HindIII تحت هضم آنزیمی قرار گرفت و پس از آن با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR خالص سازی گردید. پلاسمید pET28a نیز توسط آنزیم های EcoRI و HindIII تحت هضم آنزیمی قرار گرفت و سپس با استفاده از روش رسوب با اتانول تخلیص گردید. جهت تولید حامل نوترکیب *pET28a::seb* محصول PCR و حامل pET28a خالص شده به همراه آنزیم T4 لیگاز در واکنش اتصال وارد گردیدند. محصول واکنش اتصال با استفاده از روش شوک حرارتی به میزبان /شرشیاکولی TOP10 منتقل گردیده و سپس بر روی محیط (Luria-bertani) LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر کشت داده شد. جهت اطمینان از حضور ژن *seb*، colony PCR با استفاده از پرایمرهای T7 بر روی کلونهای بدست آمده انجام شد سپس پلاسمیدهای نوترکیب از کلونها استخراج شده و مجدد تحت هضم آنزیمی قرار گرفتند. در نهایت ۲۰ میکرولیتر از پلاسمید استخراج شده جهت توالی یابی ارسال گردید.

**همسانه سازی سازه کایمیریک *tgfa3-seb*:** جهت تولید سازه کایمیریک *tgfa3-seb*، توالی مربوط به ناحیه سوم TGF $\alpha$

Inhibition (TCGI%) از طریق سنجش XTT ارزیابی و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$TCGI\% = 1 - (A_{test-Ab}) / (A_{c-Ab}) \times 100$$

A<sub>test</sub> = جذب نوری سلولهای سرطانی رشد یافته در حضور سلول افکتور و فیوژن پروتئین

Ab = جذب نوری محیط کشت

Ac = جذب نوری سلولهای سرطانی در محیط کشت

### نتایج

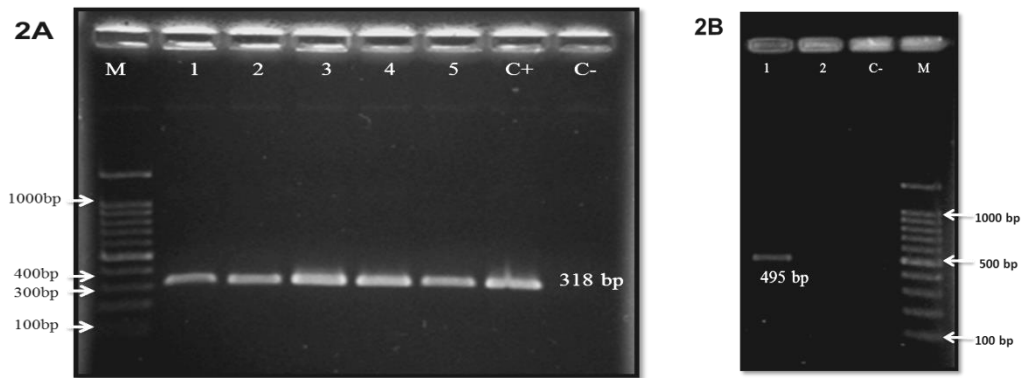
شناسایی سویه *seb+* / استافیلوکوکوس اورئوس: برای تایید سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بدست آمده از نمونه های بالینی یک قطعه حفاظت شده ۳۱۸ bp از ژن نوکلئاز A اختصاصی استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از PCR تکثیر شد (شکل ۲A). پس از تایید نهایی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، جهت شناسایی ژن انتروتوکسین تیپ B (*seb*) از پرایمرهای شناسایی ژن مذکور استفاده گردید و در نهایت یک سویه *seb+* / استافیلوکوکوس اورئوس جهت همسانه سازی انتخاب گردید (شکل ۲B).

همسانه سازی ژن *seb* پس از انتخاب سویه *seb+* / استافیلوکوکوس اورئوس، توالی کد کننده ژن انتروتوکسین تیپ B با استفاده از پرایمرهای همسانه سازی تکثیر شد و باند ۷۲۰ مربوطه پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید آشکار سازی شد (شکل ۲A). جهت تایید همسانه سازی ژن *seb* در کلونی های بدست آمده، colony PCR با استفاده از پرایمرهای T7 انجام شد و همچنین هضم آنزیمی انجام شد و به ترتیب باندهای باند ۱۰۲۰ bp (۷۲۰ ژن *seb* + ۳۰۰ bp از حامل) (شکل ۲B) و ۷۲۰ bp مربوط به ژن *seb* بر روی ژل آگاروز ۱٪ مشاهده گردید (شکل ۲C). در نهایت نتیجه توالی یابی پلاسمید نوترکیب pET28a::*seb* نشان داد که همسانه سازی با موفقیت انجام شده و ژن *seb* در چارچوب صحیح خوانش قرار گرفته است.

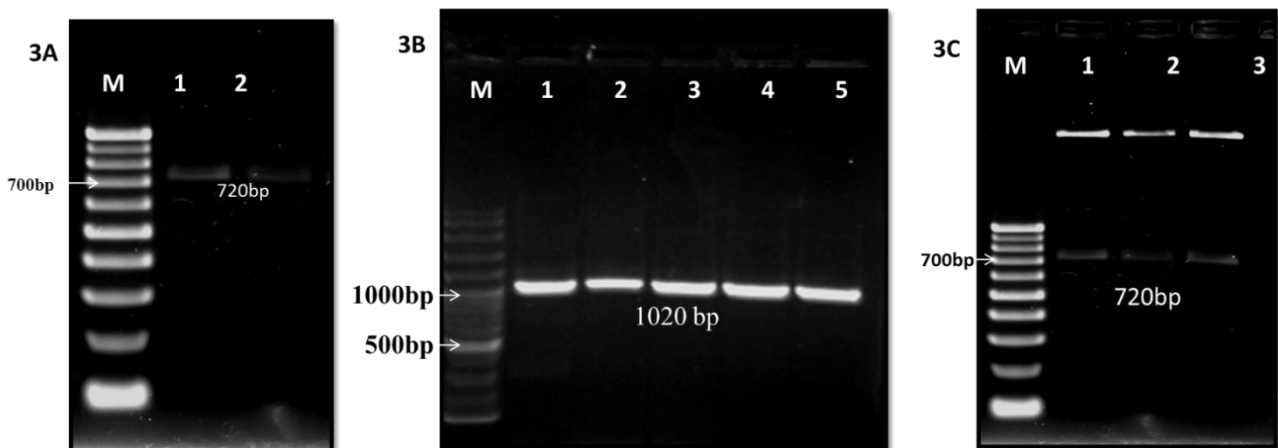
پروتئین کایمریک مورد نظر با دنباله ۶ هیستیدین بیان شده بود از ستون Ni-NTA جهت تخلیص پروتئین نوترکیب استفاده شد. باکتری اشرشیاکولی BL21(DE3) حاوی پلاسمید کایمریک pET28a::*tgfa3-seb* در حجم ۱ لیتر کشت داده شده و پس از رسیدن OD<sub>600</sub> = ۰/۵ با IPTG به غلظت نهایی ۰/۵ mM به مدت یک شب القا گردید. سپس باکتریها با سانتریفیوژ جمع آوری شده و رسوب آنها در ۵ میلی لیتر بافر لیز کننده و با استفاده از امواج فراصوت با شرایط ۴-۲ پالس ۱۵ ثانیه ای با قدرت ۳/۵ دستگاه Sonifier 450 لیز گردید. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی بر روی ستون تخلیص Ni-NTA قرار گرفت و پس از شستشو با بافرهای حاوی ۲۰ میلی مولار و ۵۰ میلی مولار ایمیدازول، پروتئین کایمریک محلول، در مجاورت بافر حاوی ۳۰۰ میلی مولار ایمیدازول از ستون جدا گردیده و در بافر تعلیق قرار گرفت و سپس در برابر بافر PBS دیالیز شد. پس از انجام SDS-PAGE پروتئین TGFαL3-SEB بر روی ژل ۱۲.۵٪ پلی اکریلامید مشاهده گردید.

**آنالیز لکه گذاری وسترن:** جهت تایید بیان پروتئین کایمریک TGFαL3-SEB آنالیز لکه گذاری وسترن با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال ضد هیستیدین انجام شد.

**بررسی مهار رشد سلول سرطانی در شرایط *in vitro*:** سلولهای سرطان پستان انسانی MDA-MB-468 که دارای گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی می باشند به عنوان سلول هدف به تعداد  $3 \times 10^4$  در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. پس از یک شب گرماگذاری، سلولهای طحال جدا شده از موش BALB/c سالم به عنوان سلول افکتور به نسبت سلول افکتور/هدف (E:T) ۳۰:۱ در حجم نهایی ۱۰۰ μl در حضور غلظتهای ۰/۰۵، ۰/۵، ۵، ۵۰ و ۵۰۰ ng/ml از فیوژن پروتئین TGFαL3-SEB و همچنین پروتئین SEB به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C حضور ۵٪ دی اکسید کربن کشت داده شد. درصد مهار رشد سلول سرطانی Tumor cell Growth



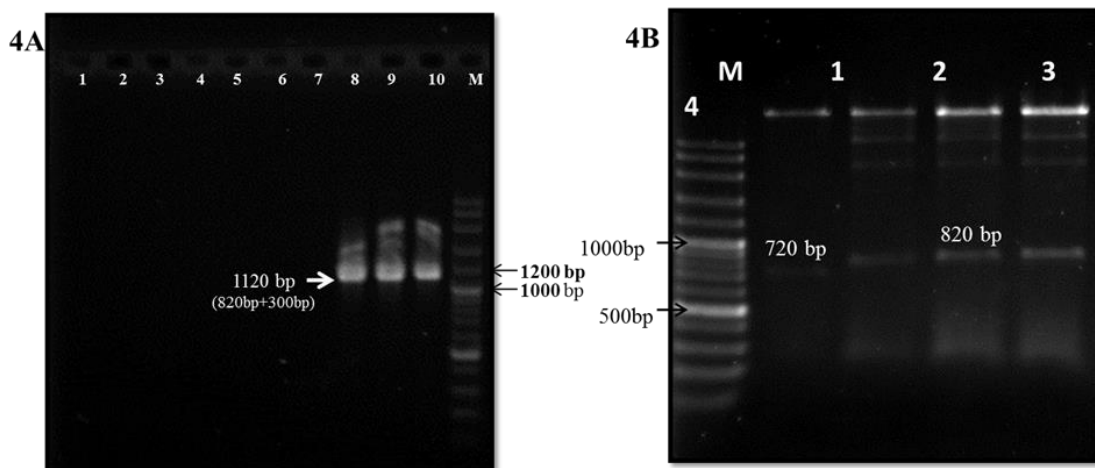
شکل ۲. (2A) تکثیر ژن *nuA* با استفاده از PCR. ستون ۱، ۲ و ۳ محصول تکثیر ژن *nuA* کنترل مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، کنترل منفی *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* ATCC 49453. ستون M مارکر وزن مولکولی. (2B): شناسایی سویه *seb+* *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از PCR. ستون ۱ کنترل بدون DNA، ستون ۲ و ۳ سویه *seb+* *استافیلوکوکوس اورئوس*، کنترل مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 14485، کنترل منفی *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 6538، ستون M مارکر وزن مولکولی. سویه *seb+* انتخاب *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شده در ستون ۳ جهت همسانه سازی مورد



شکل ۳. همسانه سازی ژن *seb* (3A): تکثیر ژن *seb* با استفاده از پرایمرهای همسانه سازی. ستون ۱ و ۲ باند ۷۲۰ bp مربوط به ژن *seb* ستون M مارکر وزن مولکولی. (3B): نتیجه colony PCR. ستون ۱-۵ نشان دهنده حضور باند ۱۰۲۰ bp مربوط به ژن *seb* و وکتور، M مارکر وزن مولکولی. (3C): هضم آنزیمی وکتور *pET28a::seb* با استفاده از آنزیم های *EcoRI* و *HindIII*. ستونهای ۱-۳ حضور باند ۷۲۰ bp ژن *seb* جدا شده از حامل *pET28a*. M مارکر وزن مولکولی

تحت هضم آنزیمی با *BamHI* و *EcoRI* قرار گرفتند. پس از هضم آنزیمی قطعه ۸۲۰ bp مربوط به ژن *tgfa3-seb* از حامل *pET28a* از ۳ کلون انتخاب شده جدا گردید (شکل ۴B). در نهایت نتیجه تعیین توالی پلاسمید نو ترکیب *pET28a::tgfa3-seb* نشان داد که همسانه سازی با موفقیت انجام شده و ژن کایمریک *tgfa3-seb* در چارچوب صحیح خوانش قرار گرفته است.

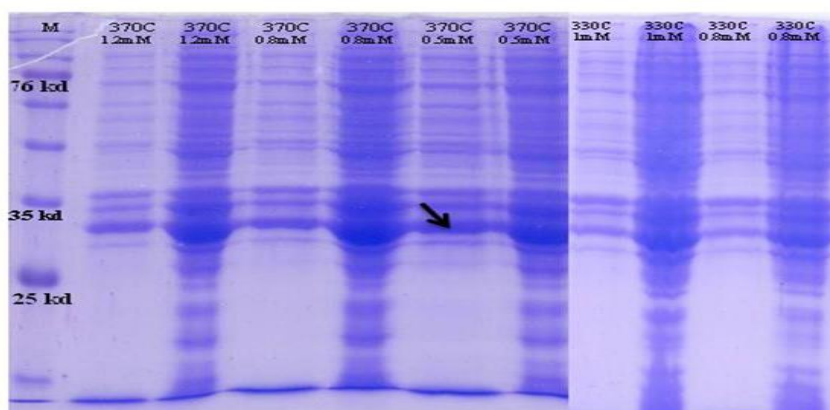
همسانه سازی ژن کایمریک *tgfa3-seb* جهت تایید همسانه سازی ژن *tgfa3-seb* در کلونی های بدست آمده، colony PCR با استفاده از پرایمرهای T7 انجام شد و باند ۱۱۲۰ bp (۸۲۰ bp ژن *seb* + ۳۰۰ bp از حامل) مربوط به ژن کایمریک *tgfa3-seb* در ۳ کلون از ۱۰ کلون انتخاب شده پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید بر روی ژل آگاروز ۱٪ مشاهده گردید (شکل ۴A). سپس پلاسمید از ۳ کلون مذکور استخراج و



شکل ۴. همسانه سازی ژن *tgfa3-seb* (4A). انجام colony PCR با استفاده از پرایمرهای T7 بر روی ۱۰ کلون انتخاب شده. ستونهای ۷-۹ دارای ژن *tgfa3-seb* با وزن مولکولی ۸۲۰ bp به همراه ۳۰۰ bp از وکتور pET28a می باشند. ستونهای ۱-۶ فاقد ژن *tgfa3-seb* می باشند. ستون M مارکر وزن مولکولی می باشد. (4B). نتیجه هضم آنزیمی حامل های نوترکیب با آنزیم های *Bam*HI و *Eco*RI. ستون ۱ هضم آنزیمی حامل pET28a:: *seb* و جدا شدن قطعه ۷۲۰ bp مربوط به ژن *seb* ستون ۲-۴ هضم آنزیمی حامل pET28a:: *tgfa3-seb* و جدا شدن قطعه ۸۲۰ bp مربوط به ژن *tgfa3-seb* ستون M مارکر وزن مولکولی

در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  بیش از ۵۰٪ از پروتئین کایمریک TGF $\alpha$ L3-SEB در فاز محلول قرار می گیرد. بیان پروتئین در فاز محلول علاوه بر حفظ ساختار پروتئین، سبب سهولت تخلیص پروتئین نیز می گردد (شکل ۵).

بهینه سازی بیان پروتئین کایمریک TGF $\alpha$ L3-SEB: بهینه سازی بیان پروتئین کایمریک TGF $\alpha$ L3-SEB در فراکسیون محلول با توجه به متغیرهای زمان القا، غلظت IPTG و دما ارزیابی گردید. مقایسه باندهای بیان نشان داد که در صورت القا بیان با غلظت نهایی ۰/۵ mM IPTG به مدت یک شب

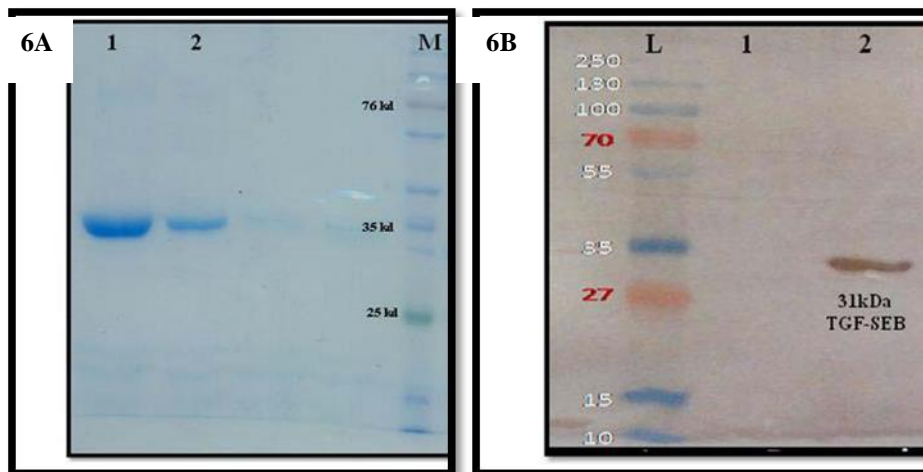


شکل ۵. بهینه سازی بیان پروتئین کایمریک TGF $\alpha$ L3-SEB. باند نشان داده شده با فلش بهترین باند بیانی در فاز محلول می باشد که در شرایط القا با غلظت نهایی ۰/۵ mM IPTG به مدت یک شب در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  بدست آمد. ستون M مارکر وزن مولکولی

بیان شده بود از ستون Ni-NTA برای تخلیص پروتئین نوترکیب استفاده شد. پروتئین کایمریک TGF $\alpha$ L3-SEB در بافر حاوی ۳۰۰ mM ایمیدازول تعلیق گشت. پس از انجام SDS-

خالص سازی و تایید پروتئین کایمریک TGF $\alpha$ L3-SEB: با توجه به این پروتئین کایمریک مورد نظر با دنباله ۶ هیستیدین

آنالیز لکه گذاری وسترن با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال ضد هیستیدین انجام شد و باند ۳۱ kDa پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB پس از آشکارسازی با سوبسترای دی آمینو بنزیدین (DAB) مشاهده گردید (شکل ۶B).



PAGE پروتئین TGF $\alpha$ L3-SEB خالص با وزن تقریبی ۳۱ kDa بر روی ژل ۱۲/۵٪ پلی اکریلامید مشاهده گردید (شکل ۶A). به دلیل حضور دنباله ۶ هیستیدینی در انتهای آمینی پروتئین کایمیریک جهت تایید بیان پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB

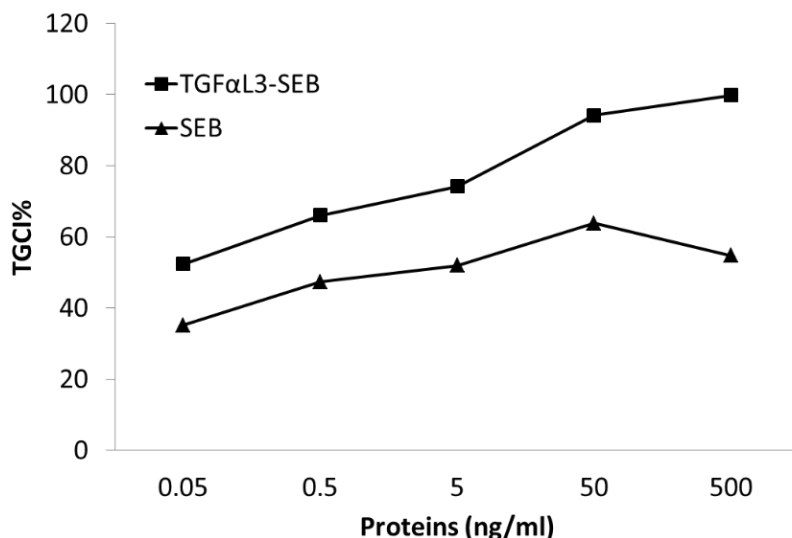
شکل ۶. تخلیص و تایید پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB. (6A). تخلیص پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB با استفاده از ستون Ni-NTA. ستونهای ۱ و ۲ پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB با وزن مولکولی ۳۱ kDa و خلوص بالای ۹۰٪، M مارکر وزن مولکولی. (6B). آنالیز لکه گذری وسترن. پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال ضد برجسب هیستیدین، ستون ۱ میزبان BL21 القا نشده، ستون ۲ پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB پس از القا، L مارکر وزن مولکولی

سوپرآنتی ژنها القاگر قوی سلولهای T سیتوتوکسیک می باشند، آنها قادرند تعداد زیادی از سلولهای T را بدون توجه به اختصاصیت آنتی ژنی آنها فعال می کنند در نتیجه سبب آزادسازی حجم وسیعی از سایتوکاینهای متنوع از سلولهای T و منوسیتها می گردند (۸، ۵) در نتیجه فعالیت ضد توموری سیستم ایمنی را افزایش داده، از رشد تومور و متاستاز جلوگیری کنند (۵). کاربرد سوپر آنتی ژنها در درمان تومورها چندین دهه است که مورد بررسی قرار گرفته است (۹، ۱۰). علت رو آوردن محققان به درمانهای جدید ضد سرطان مشکلاتی است که در شیمی درمانی و اشعه درمانی تومور مشاهده می شود. فعال سازی سیستم ایمنی خود بیمار یکی از روشهای درمانی امیدبخش در کنترل پیشروی سرطان می باشد (۵) و استفاده از سوپرآنتی ژن ها یکی از راه های فعال سازی سیستم ایمنی بیمار می باشد. Perabo و همکاران نشان دادند سلولهای تک هسته ای خون محیطی فعال شده با SEB

مهار رشد سلولهای سرطان پستان انسان توسط پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB: بررسی اثر ضد توموری در شرایط in vitro نشان داد که پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB قادر است مانند یک پل بین سلولهای افکتور و سلول سرطانی قرار گرفته و در نهایت سبب لیز سلولهای سرطان پستان گردد. در این مطالعه سلول MDA-MB-468 سرطان پستان انسانی دارای گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی به عنوان سلول هدف و سلولهای طحال به عنوان سلول افکتور مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظتهای ۰/۰۵، ۰/۵، ۵۰ و ۵۰۰ ng/ml فیوژن پروتئین TGF $\alpha$ L3-SEB به ترتیب سبب ۶۶٪، ۷۴/۱۸٪، ۹۴/۱۳٪ و ۹۹/۸٪ مهار رشد سلول توموری MDA-MB-468 شدند درحالیکه پروتئین SEB در غلظتهای مشابه سبب ۳۵/۲٪، ۴۷/۳۲٪، ۵۱/۹٪، ۶۳/۷۸٪ و ۵۴/۷٪ مهار رشد سلول توموری گردید (شکل ۷).

بجست





شکل ۷. بررسی اثر ضدتوموری پروتئین کایمیریک TGFαL3-SEB بر روی سلولهای سرطان پستان انسانی

لازم به ذکر است لیگاندهای طبیعی بواسطه میانکنش لیگاند-گیرنده سبب ورود القا شده لیگاند-گیرنده می شوند در نتیجه مانع حضور سوپرآنتی ژنها در سطح سلول و متعاقباً فعال کردن سلولهای T می گردد، بنابراین مشکل که با آن مواجه بودیم ورود القا شده لیگاند-SEB در نتیجه اتصال لیگاند به گیرنده بود. لیگاند TGFα از سه ناحیه تشکیل شده است که ناحیه سوم آن (TGF-αL3) توانایی اتصال به EGFR را حفظ کرده ولی فعالیت میتوژنیک را از دست داده است، در واقع ناحیه ۳ نقش اصلی را در اتصال به گیرنده بر عهده دارد. برای جلوگیری از فرآیند ورود القا شده از طریق اتصال لیگاند به گیرنده، ما در این تحقیق بجای استفاده از TGF-α با طول کامل ناحیه سوم آن (TGF-αL3) که میتوژن ناقص می باشد، استفاده کردیم بدین وسیله از ورود القا شده لیگاند-گیرنده به داخل سلول جلوگیری شده و سوپرآنتی ژن SEB به سمت بافت سرطانی بیان کننده EGFR جهت گیری خواهد شد. با این راهکار علاوه بر اینکه اتصال TGF-αL3 به EGFR سبب ورود القا شده نگردیده درمقایسه با آنتی بادی منوکلونال خاصیت آنتی ژنیک کمتری داشته و نیمه عمر بیشتری در گردش خون خواهد داشت (۸).

در بررسی In vitro پروتئین کایمیریک TGFαL3-SEB بر روی سلولهای سرطان پستان انسانی MDA-MB-468 اثر مهار

بطور گسترده‌ای سایتوکاین های IL-2 ، IFN-γ و TNF-α را ترشح می کند و قادر است سبب آپوپتوز سلولهای سرطان مثانه شود. زیرا مشخص شده است که سیتوتوکسیسیته القا شده توسط سوپرآنتی ژنها بطور اولیه از طریق آپوپتوز واسطه گری می شود (۲۷، ۲۸). Xu و همکاران (۲۰۱۱) برای کاهش توکسیسیته و افزایش خاصیت سوپرآنتی ژنی Staphylococcal Entrotoxin Type C (SEC2) بعنوان عامل ضدتوموری، با ایجاد جهش نقطه ای در دو موقعیت Thr20 و Gly22 مولکول SEC2 جهش یافته بنام SAM-3 را ایجاد کردند که خاصیت سوپرآنتی ژنی آن بهبود یافته بود و آنرا بعنوان کاندیدای قوی در درمان سرطان معرفی کردند (۲۹). ایمانی و همکاران (۲۰۰۸) کارایی SEB در درمان فیروسارکوما گزارش کردند. نتایج آنها پیشنهاد می کند که مرگ سلولهای توموری در نتیجه افزایش فعالیت سلولهای T سیتوتوکسیک و افزایش سطوح سایتوکاینها در اثر تزریق درون وریدی SEB است و SEB کاندیدای خوبی به عنوان داروی جدید در درمان فیروسارکوما مطرح می باشد (۵). همچنین Lu و همکاران از ترکیب SEB و TNF-α در درمان سرطان معده در مدل حیوانی استفاده کردند (۳۰). در تحقیق حاضر از SEB به عنوان عامل ضد سرطان استفاده و با بکارگیری لیگاند TGFα سوپرآنتی ژن SEB به سمت سلولهای بیان کننده EGFR جهت گیری شد.

بخشی آن در مدل های حیوانی را هر چه بیشتر روشن خواهد کرد.

#### نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از colony PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی نشان داد که همسانه سازسی ژن کایمیریک *tgfa3-seb* در وکتور pET28a با موفقیت انجام شده و این ژن کایمیریک در چارچوب صحیح خوانش قرار گرفته است. آنالیز SDS-PAGE و لکه گذاری وسترن بیان صحیح و کافی پروتئین TGF $\alpha$ L3-SEB در فاز محلول میزبان پروکاریوتی BL21(DE3) را تایید کرد. پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB بطور چشم گیری سبب مهار رشد سلولهای تومور پستان انسانی در شرایط *in vitro* گردید. در حال حاضر پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB با خلوص بالا به عنوان کاندیدای احتمالی ایمنوترایی سرطان جهت ادامه تحقیق و انجام آزمونهای *in vivo* در اختیار می باشد.

#### تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران به انجام رسیده است که بدین وسیله از مرکز فوق قدردانی می گردد.

#### تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

#### References

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA: a cancer journal for clinicians. 2013;63(1):11-30.
2. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA: a cancer journal for clinicians. 2014;64(1):9-29.
3. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. Nature Reviews Cancer. 2002;2(10):750-63.
4. Sundstedt A, Celander M, Öhman MW, Forsberg G, Hedlund G. Immunotherapy with tumor-targeted superantigens (TTS) in combination with docetaxel results in synergistic anti-tumor effects. International immunopharmacology. 2009;9(9):1063-70.

وابسته به دوز قابل توجهی نشان داد. نتایج نشان داد که غلظت ۵ ng/ml از پروتئین SEB قادر است سبب ۵۰٪ مهار رشد سلول توموری گردد. در حالیکه ۵۰٪ مهار رشد سلول توموری در غلظت ۰/۰۵ ng/ml از پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB یعنی حدود ۱۰۰ برابر کمتر از پروتئین SEB بدست آمد که به علت وجود لیگاند TGF $\alpha$  و اتصال هدفمند پروتئین کایمیریک به رسپورهای فاکتور رشد اپیدرمی موجود در سطح سلول توموری می باشد. همچنین پروتئین کایمیریک در غلظت ۵۰۰ ng/ml بر خلاف پروتئین SEB سبب ۱۰۰٪ مهار رشد سلول توموری گردید در حالیکه ۵۰۰ ng/ml تنها سبب ۵۴/۷٪ مهار رشد سلول توموری گردید.

مطالعه حاضر نخستین گزارش از هدفمند ساختن جهت گیری انتروتوکسین تیپ B/ستافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از لیگاند TGF $\alpha$  و تولید پروتئین نو ترکیب TGF $\alpha$ L3-SEB به هدف ایمنوترایی سرطان پستان می باشد.

در مطالعه حاضر پروتئین کایمیریک TGF $\alpha$ L3-SEB به صورت نو ترکیب بیان و خالص سازی شد و به عنوان کاندیدای ایمنوترایی سرطان پستان در شرایط *in vitro* مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعات آتی به صورت *in vivo* قابلیت این پروتئین در القا سیستم ایمنی سلولی، الگوی سایتوکینی تولید شده و اثر

5. Fooladi AAI, Sattari M, Hassan ZM, Mahdavi M, Azizi T, Horii A. In vivo induction of necrosis in mice fibrosarcoma via intravenous injection of type B staphylococcal enterotoxin. Biotechnology letters. 2008;30(12):2053-9.
6. Solanki LS, Srivastava N, Singh S. Superantigens: a brief review with special emphasis on dermatologic diseases. Dermatology online journal. 2008;14(2).
7. Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A. Multiple roles of Staphylococcus aureus enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. Toxins. 2010;2(8):2117-31.

8. Xu Q, Zhang X, Yue J, Liu C, Cao C, Zhong H, et al. Human TGF $\alpha$ -derived peptide TGF $\alpha$ L3 fused with superantigen for immunotherapy of EGFR-expressing tumours. *BMC biotechnology*. 2010;10(1):91.
9. Adkins I, Sadilkova L, Palova-Jelinkova L, editors. *Bacterial Toxins in Cancer Immunotherapy. Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics*; 2013: Begel House Inc.
10. Adkins I. *Bacterial Toxins Are Successful Immunotherapeutic Adjuvants and Immunotoxins. Molecular Vaccines*: Springer; 2014. p. 537-49.
11. Hussain S, Plückthun A, Allen TM, Zangemeister-Wittke U. Antitumor activity of an epithelial cell adhesion molecule-targeted nanovesicular drug delivery system. *Molecular cancer therapeutics*. 2007;6(11):3019-27.
12. Hemalatha V, Srikanth P, Mallika M. Superantigens-Concepts, clinical disease and therapy. *Indian journal of medical microbiology*. 2004;22(4):204.
13. Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, et al. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Modern pathology*. 2005;18(8):1027-33.
14. Grupka NL, Lear-Kaul KC, Kleinschmidt-DeMasters BK, Singh M. Epidermal growth factor receptor status in breast cancer metastases to the central nervous system: comparison with HER-2/neu status. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2004;128(9):974-9.
15. Bo A-h, Hou J-c, Lan Y-h, Tian Y-t, Zhang J-y. Over-expression of EGFR in breast cancer. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2008;20(1):69-72.
16. Meche A, Cimpean AM, Raica M. Immunohistochemical expression and significance of epidermal growth factor receptor (EGFR) in breast cancer. *Rom J Morphol Embryol*. 2009;50(2):217-21.
17. Aziz S, Pervez S, Khan S, Kayani N, Rahbar M. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a prognostic marker: an immunohistochemical study on 315 consecutive breast carcinoma patients. *Journal-pakistan medical association*. 2002;52(3):104-10.
18. Stratford AL, Habibi G, Astanehe A, Jiang H, Hu K, Park E, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is transcriptionally induced by the Y-box binding protein-1 (YB-1) and can be inhibited with Iressa in basal-like breast cancer, providing a potential target for therapy. *Breast Cancer Res*. 2007;9(5):R61.
19. Ueno NT, Zhang D. Targeting EGFR in triple negative breast cancer. *Journal of Cancer*. 2011;2:324.
20. Imani-Fooladi AA, Yousefi F, Mousavi SF, Amani J. In Silico Design and Analysis of TGF $\alpha$ L3-SEB Fusion Protein as "a New Antitumor Agent" Candidate by Ligand-Targeted Superantigens Technique. *Iranian journal of cancer prevention*. 2014; 7(3): 152-164.
21. Becker K, Larsen AR, Skov RL, Paterson GK, Holmes MA, Sabat AJ, et al. Evaluation of a modular multiplex-PCR methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection assay adapted for mecC detection. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(6): 1917-1919
22. Botaro B, Cortinhas C, Março L, Moreno J, Silva L, Benites N, et al. Detection and enumeration of *Staphylococcus aureus* from bovine milk samples by real-time polymerase chain reaction. *Journal of dairy science*. 2013;96(11):6955-64.
23. Medhus A, Slettemeås JS, Marstein L, Larssen KW, Sunde M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the novel mecC gene variant isolated from a cat suffering from chronic conjunctivitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(4):968-9.
24. Sunagar R, Deore S, Deshpande P, Rizwan A, Sannejal A, Sundareshan S, et al. Differentiation of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by PCR for the fibrinogen binding protein gene. *Journal of dairy science*. 2013;96(5):285.۶۵-۷

25. Velasco V, Sherwood JS, Rojas-García PP, Logue CM. Multiplex Real-Time PCR for Detection of *Staphylococcus aureus*, *mecA* and Panton-Valentine Leukocidin (PVL) Genes from Selective Enrichments from Animals and Retail Meat. *PloS one*. 2014;9(5):e976.۷
26. Yuan H, Liu Y, Jiang X, Xu S, Sui G. Microfluidic chip for rapid analysis of cerebrospinal fluid infected with *Staphylococcus aureus*. *Analytical Methods*. 2014;6(7):2015-9.
27. Perabo FG, Willert PL, Wirger A, Schmidt DH, Von Ruecker A, Mueller SC. Superantigen-activated mononuclear cells induce apoptosis in transitional cell carcinoma. *Anticancer research*. 2005;25(5):3565-73.
28. Perabo FG, Willert PL, Wirger A, Schmidt DH, Wardelmann E, Sitzia M, et al. Preclinical evaluation of superantigen (staphylococcal enterotoxin B) in the intravesical immunotherapy of superficial bladder cancer. *International journal of cancer*. 2005;115(4):591-8.
29. Xu M, Wang X, Cai Y, Zhang H, Yang H, Liu C, et al. An engineered superantigen SEC2 exhibits promising antitumor activity and low toxicity. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2011;60(5):705-13.
30. Lu X, Cheng C, Wang G, Shu X, Ma J, Tong Q. Synergistic Enhancement of Cancer Therapy Using a Combination of Fusion Protein MG7-scFv/SEB and Tumor Necrosis Factor Alpha. *Protein and peptide letters*. 2013;20(4):467-72.

## Cloning, expression, purification and the study of immunotherapy status of TGF $\alpha$ L3-SEB chimeric protein in breast cancer treatment

Forough Yousefi<sup>1</sup>, Seyed Davar Siadat<sup>2</sup>, Mohammad Mehdi Aslani<sup>3</sup>, Abbas Ali Imani-Fooladi<sup>4</sup>, Omid Nasiri<sup>5</sup>, Seyed Fazlollah Mousavi<sup>6\*</sup>

1. Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
2. Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3. Department of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4. Applied Microbiology Research center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding author: mousavi@pasteur.ac.ir

### Abstract

**Background & Aim:** Bacterial superantigens, stimulate polyclonal T cells irrespective of their antigen specificity, resulting in a massive release of cytokines from T cells and monocytes, and suggest that they could be candidates of new antitumor agents. Recent attempts have been done to specifically target superantigens towards tumors. Here, we evaluate TGF $\alpha$ L3-SEB fusion protein as a new antitumor candidate by genetically fusing the third loop of transforming growth factor alpha (TGF $\alpha$ L3) to staphylococcal enterotoxin type B.

**Methods:** Recombinant TGF $\alpha$ L3-SEB sequence was constructed by fusing the N-terminal of *tgfa3* and C-terminal of *seb* using hydrophobic GSGSGGG amino acid linker. In this study, gene coding for the SEB superantigen was amplified. The PCR product containing the *seb* gene was digested by EcoRI and HindIII and cloned in pET28a expression vector. Then the synthetic *tgfa*-linker sequence was digested by BamHI and EcoRI and cloned in pET28::seb vector. The recombinant pET28:tgfa3-seb transformed into *E. coli* BL21(DE3). Expression of recombinant protein was examined by SDS-PAGE and western blotting. *In vitro* antitumor activity against MDA-MB-468, human breast cancer cells expressing EGFR, was evaluated.

**Results:** Cloning of *tgfa3-seb* was confirmed by colony-PCR, enzymatic digestion and sequencing. The recombinant TGF $\alpha$ L3-SEB fusion protein with molecular weights of 31kDa was expressed and confirmed by anti-his western-blot analysis. The TGF $\alpha$ L3-SEB chimeric protein exhibited potent *in vitro* antitumor activity.

**Conclusion:** Our findings indicated that TGF $\alpha$ L3-SEB fusion protein can be successfully constructed expressed and purified and may serve as a useful antitumor candidate for breast cancer immunotherapy.

### Keywords:

SEB,  
*Staphylococcus aureus*,  
Cloning,  
Immunotherapy,  
Transforming  
Growth Factor alpha,  
Breast Neoplasms