

Engineering and production of recombinant ricin protein with the aim of producing effective immunotoxin

Abdollah Rahmani

Ph.D. Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: rahmani.abdolla@gmail.com

Seyed Hasan Marashi

Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: marashi@um.ac.ir

Nasrin Moshtaghi

*Corresponding author, Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: moshtaghi@um.ac.ir

Mohammad Reza Nasiri

Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: nassiry@um.ac.ir

Amin Mirshamsi Kakhki

Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: mirshamsi@um.ac.ir

Hamid Ariannejad

Ph.D. of Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: ariannejad@yahoo.com

Abstract

Objective

Ricin is a globular glycoprotein poison found in the endosperm of the castor plant. This protein consists of two A chains with 267 amino acids (32 kilo Daltons) and a B chain with 262 amino acids (34 kilodaltons), connected by a disulfide bond. The sensitivity of cancer cells to ricin is due to the higher expression of glycoproteins on the surface of cancer cells. The toxicity of the ricin enzyme in destroying cells caused this enzyme to be used as the most important candidate in the production of immunotoxins. However, the low ability of ricin to enter the target cell using the Golgi apparatus has caused increased cytotoxicity, which affected its use as an immunotoxin. This research was carried out with the aim of engineering ricin protein to increase the surface charge of the protein and facilitate the entry of ricin into the cell through the endosomal route and reduce the effect of cytotoxicity.

Materials and methods

Therefore, the structural status of ricin protein with R134A, L214A, R31A, and P250A mutations was investigated using thermodynamic studies. Then, the gene sequence related to the mutant version was synthesized and expressed using the expression vector pET22b(+) in the cell wall of *Escherichia coli* BL21(DE3). Purification was done using a Ni-NTA column, and then the function of the protein on class A431 cancer epithelial cells was evaluated using a cytotoxicity test.

Results

The obtained results showed that the considered mutations significantly increased the surface charge of the protein. Also, comparing the analysis of Root Mean Square Deviation (RMSD), root-mean-square fluctuations (RMSF) and Radius of gyration (Rg) graphs between the natural sample and the mutant showed that the mutations have no significant effect on the main structure of the protein. Confirmation of the production and purification of recombinant ricin protein in the cell wall with a molecular weight of about 33 kilodaltons was done using SDS-PAGE gel. Cytotoxicity results showed that mutant ricin protein can cause cell death of A431 cancer cells at a concentration of 300 ng/ml.

Conclusions

In silico and In vitro results on ricin protein showed that creating targeted mutations to increase protein surface charge can improve protein performance. Therefore, mutant ricin protein (R134A, L214A, P250A, and R31A) with greater cell penetration and less toxicity for target cells has a high ability to be used as a toxin in the production of immunotoxins.

Keywords: Cancer, Cytotoxicity, Recombinant protein, Ricin

Paper Type: Research Paper.

Citation: Rahmani A, Marashi S H, Moshtaghi N, Nasiri M R, Mirshamsi Kakhki A, Ariannejad H (2024) Engineering and production of recombinant ricin protein with the aim of producing effective immunotoxin. *Agricultural Biotechnology Journal* 16(4), 121-138.

Agricultural Biotechnology Journal 16(4), 121-138.

DOI: 10.22103/jab.2024.23650.1578

Received: September 10, 2024.

Received in revised form: October 23, 2024.

Accepted: October 24, 2024.

Published online: December 30, 2024.




Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مهندسی و تولید پروتئین ریسین نوترکیب با هدف تولید ایمونوتوکسین موثر

عبد... رحمانی

دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: rahmani.abdolla@gmail.com

سید حسن مرعشی 


استاد، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: marashi@um.ac.ir

نسرین مشتاقی 

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: moshtaghi@um.ac.ir

محمد رضا نصیری 

استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: nassiry@um.ac.ir

امین میرشمسی کاخی 

دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: mirshamsi@um.ac.ir

حمید آریان نژاد

دانش آموخته دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: ariennejhad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۸/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۳

چکیده

هدف: متابولیت ریسین یک گلیکوپروتئین سمی است که در آندوسپرم گیاه کرچک یافت می‌شود. این پروتئین شامل دو زنجیره A با ۲۶۷ آمینواسید (۳۲ کیلودالتون) و زنجیره B با ۲۶۲ آمینو اسید (۳۴ کیلودالتون) می‌باشد که بوسیله پیوند دی سولفیدی به هم متصل هستند. حساسیت سلول‌های سرطانی به ریسین به دلیل بیان بیشتر گلیکوپروتئین‌های موجود در سطح سلول‌های سرطانی است. سمیت آنزیم ریسین در از بین بردن سلول‌ها سبب شد که این آنزیم به عنوان مهمترین انتخاب در تولید ایمونوتوکسین‌ها بکار گرفته

شود. با این حال، توانایی پایین ریسین در ورود به سلول هدف با استفاده از مسیر دستگاه گلژی، سبب بالا رفتن سمیت سلولی شده، که این نقص، استفاده از آن را در ایمونوتوکسین‌ها تحت تأثیر قرار داده است. این پژوهش با هدف مهندسی پروتئین ریسین به منظور افزایش بارالکتریکی سطحی پروتئین و تسهیل ورود ریسین به داخل سلول از طریق مسیر اندوزومیک و کاهش اثر سمیت سلولی صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها: وضعیت ساختاری پروتئین ریسین با ایجاد جهش‌های R134A, L214A, R31A, P250A و در مقایسه با نمونه طبیعی این آنزیم با استفاده از مطالعات ترمودینامیکی مورد بررسی قرار گرفت. سپس توالی ژنی مربوط به نسخه جهش‌یافته، سنتز و با استفاده از وکتور بیانی *pET22b(+)* در فضای پیروپلاسمی سلولی باکتری *اشریشیا کلی* BL21(DE3) بیان شد. خالص‌سازی با استفاده از ستون Ni-NTA انجام و سپس عملکرد پروتئین بر رده سلول‌های سرطانی پوست A431 با استفاده از آزمون سمیت سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: جهش‌های ایجاد شده به شکل چشمگیری سبب افزایش بارالکتریکی سطحی پروتئین شده است. مقایسه آنالیز نمودارهای RMSD (انحراف جذر میانگین مربعات)، RMSF (نوسانات جذر میانگین مربعات) و Rg (شعاع ژیراسیون) بین نمونه طبیعی و موتانت مشخص کرد که جهش‌ها هیچ تأثیر معنی‌داری بر ساختار اصلی پروتئین ندارد. تأیید تولید و خالص‌سازی پروتئین نو ترکیب ریسین در دیواره سلولی با وزن مولکولی حدود ۳۳ کیلودالتون با استفاده از ژل SDS-PAGE انجام شد. این فرم نو ترکیب نسبت به فرم طبیعی از وزن مولکولی کمتری برخوردار است. نتایج سمیت سلولی نشان داد که پروتئین ریسین موتانت قادر است در غلظت ۳۰۰ ng/mL سبب مرگ سلولی سلول‌های سرطانی A431 گردد.

نتیجه‌گیری: نتایج *In vitro* و *In silico* بدست آمده در این مطالعه بر روی پروتئین ریسین نشان داد که ایجاد جهش‌های هدفمند به منظور افزایش بارالکتریکی سطحی پروتئین می‌تواند به شکل مؤثری سبب بهبود عملکرد پروتئین گردد. از این رو، پروتئین ریسین موتانت (R134A, L214A, P250A, R31A) با قابلیت ورود سلولی بیشتر و سمیت کمتر برای سلول‌های هدف، قابلیت خوبی به عنوان توکسین در تولید ایمونوتوکسین‌ها دارد.

کلیدواژه‌ها: پروتئین نو ترکیب، سمیت سلولی، سرطان، ریسین.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: رحمانی عبدالله، مرعشی سیدحسن، مشتاقی نسرین، نصیری محمدرضا، میرشمسی کاخکی امین، آریان نژاد حمید (۱۴۰۳) مهندسی و تولید پروتئین ریسین نو ترکیب با هدف تولید ایمونوتوکسین موثر. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۴)، ۱۲۱-۱۳۸.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

ایمونوتوکسین‌های نو ترکیب^۱ (RIT) پروتئین‌های کایمیری هستند که از یک آنتی‌بادی هدف مرتبط با یک سم تشکیل شده‌اند. این آنتی‌بادی، آنتی‌ژن خاصی را روی تومور یا سلول‌های عفونی مورد هدف قرار می‌دهد و سم متصل به آن فرآیند مرگ سلولی را تسهیل می‌کند (Wilkins et al. 2006). ایمونوتوکسین‌ها برای درمان سرطان‌ها و بیماری‌های مختلف مانند سرطان خون (Sausville et al. 1995; Azemar et al. 2003;)، تومورهای جامد (Kreitman et al. 2000; Wayne et al. 2014)، بیماری پیوند در مقابل میزبان^۲ (Groth et al. 2019)، عفونت‌های ویروسی (Berger et al. 2010;)، بیماری‌های خودایمنی (Krishna et al. 2017) و بیماری‌های خودایمنی (Zhao et al. 2019) توسعه یافته‌اند. برای تومورهای جامد، ۶۶/۷ درصد از مرگ و میرهای سرطانی با متاستاز به عنوان یک علت ثبت شده است (Dillekås et al. 2019). اولین ایمونوتوکسین‌های کارآمد با ترکیب آنتی‌بادی‌ها با توکسین‌های گیاهی همچون ریسین^۳ و زلونین^۴ بدون اتصال دومینی تولید شدند (Krolick et al. 1981; Casellas et al. 1982; Thorpe et al. 1982). از دست دادن ویژگی‌های عملکردی، پایداری بسیار کم، ترکیب ناهمگن، سمیت بالای سموم متصل شونده از مهمترین معایب نسل اول ایمونوتوکسین‌ها گزارش شده است (Antignani et al. 2013). با پیشرفت تکنولوژی و کسب دانش ساختار و عملکرد توکسین‌ها، امکان طراحی و مهندسی نسل دوم ایمونوتوکسین‌ها با بکارگیری روش اتصال شیمیایی ایجاد شد. در این روش، نواحی از توکسین‌ها که برای مرگ سلولی نیاز نباشد، حذف می‌شود. از اینرو، عوارض دارویی ایمونوتوکسین‌ها به شکل چشمگیری کاهش یافت (Allahyari et al. 2017). همچنین می‌توان به تلاش‌های متعددی در خصوص تولید ایمونوتوکسین‌های الحاقی خصوصاً در ترکیب با پروتئین‌های گیاهی اشاره کرد که برای درمان تومور قابل استفاده هستند. از جمله این پروتئین‌ها پروتئین غیرفعال ریپوزوم گیاهی است که تا کنون در موارد متعددی برای ساخت ایمونوتوکسین‌ها استفاده شده است (Gilabert-Oriol et al. 2014). Saporin-S6، یک پروتئین غیرفعال کننده ریپوزوم استخراج شده از دانه‌های *Saponaria officinalis* L، است که به دلیل فعالیت آنزیمی بالا، پایداری و مقاومت در برابر فرآیندهای کونژوگه، به طور گسترده برای ساختن ترکیبات ضد سرطانی مورد استفاده قرار گرفته است (Polito et al. 2011).

ساختار پروتئینی سم، جهت‌گیری دومین‌ها، بازده بیان و خالص‌سازی پروتئین، سهولت شبیه‌سازی، اتصال قند، ایمنی‌زایی و سمیت غیراختصاصی مهمترین شاخص‌های انتخاب سم برای تولید ایمونوتوکسین‌ها می‌باشد (Shapira et al. 2010). سم ریسین از گیاه کرچک، یک گلیکوپروتئین غیرفعال کننده ریپوزوم است که از دو زنجیره A و B تشکیل شده است زنجیره A پروتئین ریسین یک N-گلیکوزوئیدی است که با دپورینه کردن آدنین‌های حیاتی در 28s rRNA سمیت ایجاد می‌کند (Moshiri et al. 2016). این آدنین در ساختار سنجاق سری GAGA حلقه سارسین/ریسین قرار داشته که در تمام واحدهای بزرگ ریپوزومی بسیار محافظت

¹ Recombinant immunotoxins

² Graft-vs.-host disease

³ Ricin

⁴ Gelonin

شده است و برای عملکرد صحیح زیرواحد بزرگ ریبوزوم ضروری است (Lancaster et al. 2008). با این حال، مطالعات بعدی نشان داد که سمیت ریسین از طریق مسیرهای مهار سنتز پروتئین، القاء آپوپتوز سلولی و آزادسازی واسطه‌های التهابی سیتوکین نیز ناشی می‌شود (Day et al. 2002; Kumar et al. 2003). از این‌رو، ریسین به عنوان یکی از مهمترین کاندیدهای تولید ایمونوتوکسین‌ها مطرح بوده است (Antignani et al. 2013; Allahyari et al. 2017). زنجیره B ریسین برای مسیریابی درون سلولی مهم بوده و به نظر می‌رسد که نقش مهمی در انتقال زنجیره A از طریق یک غشای سلولی به سیتوزول دارد. استفاده توأمان از زنجیره A و B ریسین در تولید ایمونوتوکسین‌ها با توجه به اندازه بزرگ پروتئین وجود ندارد. بنابراین تمرکز اصلی پژوهش‌های این حوزه بر روی زنجیره A ریسین می‌باشد (Bortolotti et al. 2022; Park et al. 2022). بررسی‌ها نشان داده که مسیر انتقال زنجیره A ریسین از سطح سلول به داخل آن، از طریق اندوسیتوز و انتقال بخش جزئی (حدود ۵ درصد) آن به دستگاه گلژی است. پروتئین وارد شده از آنجا به طور انتقال معکوس به شبکه آندوپلاسمی منتقل و زنجیره A وارد سیتوزول می‌شود. در این خصوص پژوهشگران شواهدی مبنی بر انتقال ریسین از طریق اندوزوم‌ها به داخل سلول نیز گزارش کرده‌اند (Yoshida et al. 1991; Słomińska et al. 2013). گزارش‌ها نشان می‌دهد که هرچه پروتئین دارای بارالکتریکی سطحی بیشتری باشد، مسیر انتقال از طریق اندوزوم‌ها بیشتر تسهیل می‌گردد (Fröhlich 2012). از این‌رو، به منظور استفاده از زنجیره A ریسین در ایمونوتوکسین‌ها، بایستی مهندسی این پروتئین به گونه‌ای باشد که بارالکتریکی سطحی آن ضمانتی برای ورود آنزیم به داخل سلول سرطانی فراهم سازد و آنزیم در سیتوزول عملکرد مناسب را در ایجاد آپوپتوز داشته باشد (Park et al. 2022). مطابق گزارش کیم و همکاران (۱۹۹۲) اسیدهای امینه R180، E177، Y80 و Y123 در جایگاه آنزیمی ریسین نقش دارند و جایگزینی آنها سبب کاهش چشمگیر عملکرد آنزیم می‌گردد (Kim et al. 1992). همچنین محققان گزارش کردند که تغییر پرولین ۲۵۰ به آلانین نقش بسزایی در ورود سریعتر ریسین از طریق اندوسیتوز به سلول و سمیت کمتر ریسین برای سلول‌های مجاور می‌گردد (Sokołowska et al. 2011). از این‌رو، این مطالعه نوین با هدف دستیابی به آنزیم ریسین A با توانایی سمیت کمتر برای سلول‌های سالم و تسهیل ورود از طریق اندوسیتوز، به کمک آنالیزهای دینامیک مولکولی صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

دینامیک مولکولی-آماده سازی ساختار پروتئینی: توالی و ساختار سه بعدی زنجیره A آنزیم ریسین از بانک جهانی ژن به شماره دسترسی (<https://doi.org/10.2210/pdb1OBS/pdb>) استخراج شد. به منظور ایجاد مدل جهش یافته از نرم افزار Modeller 9.2 استفاده شد (Eswar, Webb et al. 2006). کیفیت مدل تولید شده با استفاده از سرور PROCHECK server (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>) مورد آنالیز و بررسی قرار گرفت (Laskowski et al. 1993).

ایجاد جهش: مطالعات نشان داده که به منظور اندوسیتوز زنجیره A ریسین، ایجاد جهش P250A ضروری است (Sokołowska et al. 2011). همچنین بررسی بارالکتریکی سطحی پروتئین ریسین نشان می‌دهد که اسیدهای آمینه R134، L214، R26، R29 و R31 در محل‌های با بارالکتریکی سطحی بسیار پایین قرار گرفته‌اند. از این‌رو، در این تحقیق به منظور افزایش بارالکتریکی سطحی جهش‌های اسیدهای آمینه آرژنین R134A، لوسین L214A و آرژنین R31A به همراه جهش پرولین P250A در نظر گرفته شد. سازه جهش‌یافته با استفاده از نرم افزار مدل ۹/۲ مدل‌سازی و سپس دینامیک مولکولی آن به مدت ۵۰ نانوثانیه مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس مطالعات انجام شده و نتایج بدست آمده از بخش دینامیک مولکولی، امینواسیدهای کاندید برای تغییر مشخص شده و سپس این امینواسیدها (آرژنین R134A، R31A، لوسین L214A و پرولین P450A) با آلانین در ساختار پروتئین تعویض شده (جهش نقطه ای) و در ادامه با استفاده از علم دینامیک مولکولی، شارژ سطحی و پایداری مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز دینامیک مولکولی: رفتار ترمودینامیکی پروتئین ریسین در دو شکل طبیعی و جهش یافته با استفاده از نرم‌افزار ترمودینامیکی گرومکس^۵ ۱۸ مورد آزمون و بررسی قرار گرفت (Abraham et al. 2015). بدین منظور، از میدان نیروی CHARM27 (MacKerell et al. 2000) همراه مدل Simple Point Charge (SPC) water استفاده و به منظور ایجاد شرایط مطلوب مدل‌سازی و رهاسازی محلول، مدل مکعب انتخاب گردید (Berendsen et al. 1981). برای خنثی کردن بار کلی سیستم از یون‌های سدیم (مثبت) و کلر (منفی) با جایگزینی آب استفاده شد. بهینه‌یابی انرژی سیستم با استفاده از الگوریتم Steepest Descent انجام و تعادل دمای سیستم در دمای ۳۰۰ درجه کلون برای ۵۰۰ پیکوثانیه صورت گرفت. همچنین تعادل فشار سیستم تحت ۱ بار و دمای ۳۰۰ درجه کلون برای ۵۰۰ نانوثانیه صورت پذیرفت. از الگوریتم‌های Nosé-Hoover با زمان پایداری ۰/۱ پیکوثانیه و Parrinello-Rahman با زمان پایداری ۰/۵ پیکوثانیه جهت همگام سازی دما و فشار استفاده شد. مراحل ایجاد دینامیک مولکولی به مدت ۵۰ نانوثانیه تحت فشار ۱ بار و دمای ۳۱۰ درجه کلون صورت پذیرفت. دینامیک و پایداری پروتئین با استفاده از آنالیزهای Root Mean Square Deviation (RMSD) و Square-Mean- Root-Fluctuations (RMSF) و Gyration Radius مورد آنالیز و بررسی قرار گرفت (Abraham et al. 2015).

تولید پروتئین نو ترکیب ریسین A-سنتز ژن و تولید پروتئین نو ترکیب: به منظور تولید پروتئینی با ساختار صحیح، از وکتور بیانی pET22b(+) استفاده شد. این وکتور حاوی سیگنال پپتید *pelB* است که سبب تولید پروتئین در فضای پری پلاسمیک می‌شود (Taghizadegan et al. 2020). توالی پروتئینی ریسین بدست آمده از مطالعات دینامیک مولکولی با استفاده از نرم افزار CLC Main Work Bench (ver 5.5) تبدیل به توالی نوکلئوتیدی گردید. به منظور انجام فرآیندهای مهندسی ژن، توالی نوکلئوتیدی آنزیم‌های برشی *XhoI* و *NcoI* در ابتدا و انتهای توالی هدف قرار داده شد. به منظور بیان توالی

⁵ Gromacs

راهبر His Taq در وکتور بیانی از قرار دادن کدون پایان در سازه ژنی امتناع گردید. توالی نوکلئوتیدی به منظور بیان در در باکتری اشریشیاکلی (*BL21 DE3*) با استفاده از نرم افزار آنلاین شرکت ژن اسکریپت (<https://www.genscript.com>) بهینه‌سازی کدون شده و سپس به شرکت GenRay Biotechnology جهت سنتز، ارسال شد (Shanghai, China). ژن هدف سنتز شده در وکتور pUC تحویل و با استفاده از آنزیم‌های برشی *XhoI* و *NcoI* برش و به وکتور بیانی pET22b(+) که با آنزیم‌های مشابه هضم شده است، وارد گردید. محصول واکنش الحاق، به باکتری *E. coli* BL21(DE3) انتقال و تأیید انتقال با استفاده از روش توالی یابی و هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت. به منظور القای بیان ژن، سلول‌های اشریشیاکلی BL21(DE3) حاوی وکتور نوترکیب کشت ۱۶ ساعته داده شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از کشت شبانه به ۴۹ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱ درصد) منتقل و تا زمان رسیدن غلظت سلول‌ها به ۰/۶ در OD=600 شرایط کشت میکروبی در انکوباتور شیکردار با دور RPM ۱۱۰ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد فراهم گردید. سپس به منظور القای بیان ژن، نمونه صفر برداشته و القاگر IPTG⁶ با غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط کشت اضافه و هر ساعت نمونه‌برداری تولید پروتئین نوترکیب صورت پذیرفت. پروتئین نهایی جهت بررسی بر روی ژل SDS-PAGE بارگذاری شد (Taghizadegan et al. 2020).

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب: بدین منظور، ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی باکتری اشریشیاکلی BL21(DE3) با

استفاده از IPTG یک درصد القاء و سپس با استفاده از روش شوک اسمزی، پروتئین از دیواره سلولی جداسازی گردید (Das et al. 2013). بدین منظور ۲۰۰ میلی‌لیتر از بافر هیپرتونیک^۷ (Tris-HCl 30 mM, EDTA 1 mM and Sucrose 20%, pH=8) به سلول‌های باکتری اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه گردید. سپس محلول با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و محلول رویی جمع‌آوری گردید. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر از بافر هیپوتونیک^۸ (5 mM MgSO₄) به پلت‌ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. محصول به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و بخش رویی جمع‌آوری شد. بخش رویی مرحله هیپرتونیک و هیپوتونیک با هم ترکیب و در محلول لیزکننده (50 mM Ni-NTA (ترموفیشر سایننتیفیک، امریکا) برای خالص‌سازی پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بررسی کیفیت پروتئین خالص‌سازی شده، محصول بر روی ژل SDS-PAGE برده شد (Das et al. 2013). همچنین غلظت پروتئین استخراجی با استفاده از روش برادفورد (Bradford 1976) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

بررسی سمیت سلولی پروتئین نوترکیب ریسین A: به منظور بررسی عملکرد پروتئین نوترکیب تولید شده در این

مطالعه، از روش بررسی سمیت پروتئین نوترکیب ریسین بر رده سلول‌های سرطانی پوست A431 استفاده گردید. بدین منظور،

⁶ Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

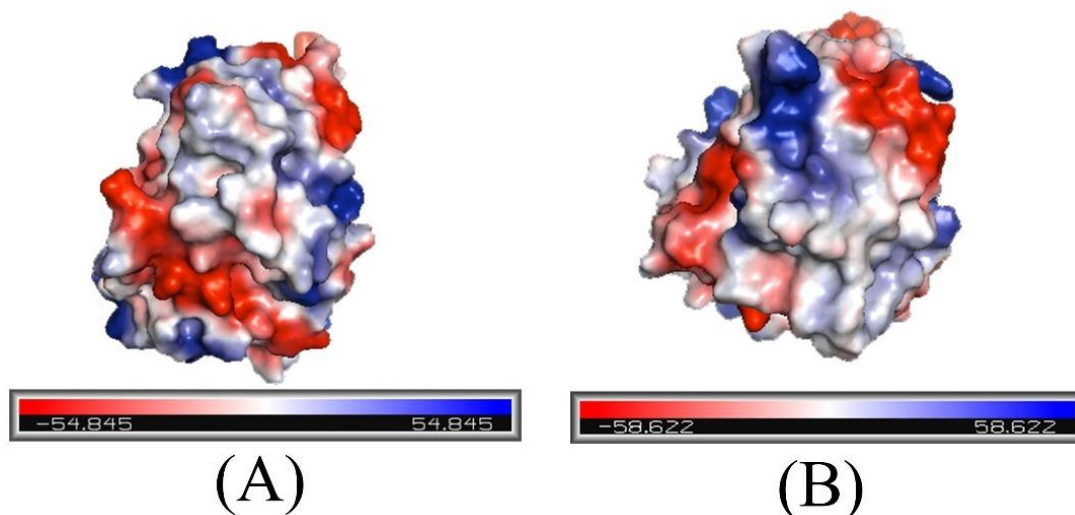
⁷ Hypertonic

⁸ Hypotonic

سلول‌های A431 در چاهک‌های ۹۶ خانه تحت شرایط ۵ درصد دی‌اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت در محیط کشت RPMI به همراه ۱۰ درصد FBS کشت داده شدند. ۵ غلظت مختلف از پروتئین نوترکیب ریسین (۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ نانوگرم) در سه تکرار بر روی سلول‌های سرطانی A431 اضافه و سپس حیات سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی قدرت پروتئین ریسین در از بین بردن سلول‌ها، سمیت سلولی آنزیم با استفاده از لیپوفکتامین LTX شرکت اینویترژن (امریکا) به عنوان حامل انتقال‌دهنده پروتئین به داخل سلول‌ها نیز با غلظت‌های (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ نانوگرم) انجام شد (Rust et al. 2015). به منظور برآورد میزان سمیت سلولی، ۲۰ میلی‌لیتر از محلول PBS حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از ماده 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) به روی سلول‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در تاریک خانه بر روی شیکر گذاشته شد. سپس تغییر رنگ با استفاده از دستگاه رنگ سنجی Epoch در ۵۹۰ نانومتر مورد آزمون قرار گرفت (Zhu et al. 2017).

نتایج و بحث

بررسی دینامیک مولکولی پروتئین ریسین-بارالکتریکی سطحی پروتئین: گزارش‌ها نشان داده که سطح غشای سلولی سلول‌های سرطانی دارای بار الکتریکی منفی است (Chen et al. 2016). از این رو، پروتئین‌های با بارالکتریکی مثبت تمایل بیشتری برای اتصال به دیواره سلول‌های سرطانی دارند. در این خصوص گزارش‌ها نشان داده که اسیدآمینه آلانین (غیرقطبی) نقش بسزایی در افزایش بارالکتریکی سطحی پروتئین دارد (Chen et al. 2012; Sokołowska et al. 2011). بررسی نتایج دینامیک مولکولی بین پروتئین طبیعی و جهش‌یافته (جهش‌های R31A، L214A، R134A و P250A) به مدت ۵۰ نانوثانیه نشان داد، که مهندسی پروتئین ریسین و تغییر آمینواسیدها به شکل مؤثری سبب افزایش بارالکتریکی مثبت سطحی پروتئین گردیده است (شکل ۱). نواحی قرمز در شکل (۱) نشان‌دهنده بارمنفی سطح پروتئین است که در پروتئین جهش یافته این نواحی به شکل معنی‌داری کاهش یافته است. همچنین دامنه شارژسطحی پروتئین از ۵۴/۸۴۵ تا ۵۴/۷۴۵- به ۵۸/۶۲۲ تا ۵۸/۶۲۲- رسیده است. این نتایج نشان داد افزایش بارالکتریکی سطحی در پروتئین جهش یافته، دامنه بارالکتریکی سطحی نیز افزایش یافته است. همچنین گزارش‌ها نشان داد که افزایش بارالکتریکی سطحی پروتئین می‌تواند منجر به افزایش ورود توکسین از طریق فرآیند اندوسیتوز به سلول گردد (Taghizadegan et al. 2020, Sokołowska et al. 2011). دستیابی به این مهم خود تسهیل‌کننده کاهش اثر سمیت برای سلول‌های مجاور با افزایش ورود به سلول می‌باشد. با توجه به حفظ اسیدهای آمینه جایگاه کاتالیکی آنزیمی، انتظار می‌رود که قدرت فعالیت آنزیم ریسین کاهش نداشته و به لحاظ عملکردی قوی‌تر گردد. جایگاه کاتالیکی آنزیمی ریسین شامل اسیدهای آمینه (آرژنین) R180، (گلوتامیک) E177، (تیروزین) Y80 و Y123 است (Kim et al. 1992) که به لحاظ ساختار پروتئینی فاصله زیادی به محل‌های جهش‌یافته (R31A، L214A، R134A و P250A) دارد.



شکل ۱. بررسی بارالکتریکی سطحی پروتئین ریسین بعد از ۵۰ نانوثانیه در شرایط ترمودینامیکی. (A): پروتئین ریسین طبیعی (B): پروتئین ریسین جهش یافته. (محاسبه شارژ سطحی پروتئین بر اساس اسید آمینه های شرکت کننده با استفاده از نرم افزار های بیوانفورماتیک بعد از مدل سازی و شبیه سازی با نرم افزار pymol محاسبه و نشان دهنده افزایش شارژ سطحی پروتئین (بار مثبت) جهش یافته می باشد که با توجه به شارژ سطحی منفی سلول های سرطانی باعث افزایش نفوذ ایمونوتوکسین به سلول های سرطانی از طریق آندوسیتوز می شود. (افزایش رنگ آبی در شکل ۱ و همچنین افزایش دامنه بار الکتریکی در زیر شکل نشان دهنده افزایش بار الکتریکی پروتئین جهش یافته می باشد)

Figure 1. Checking the surface charge of ricin protein after 50 nanoseconds in thermodynamic conditions. (A): normal ricin protein (B): mutant ricin protein. (Calculation of protein surface charge based on amino acids of the participants using bioinformatic software after modeling and simulation with Pymol software shows an increase in the surface charge of the mutated protein, which according to the negative surface charge of cancer cells increases the penetration of immunotoxin into cancer cells through endocytosis)

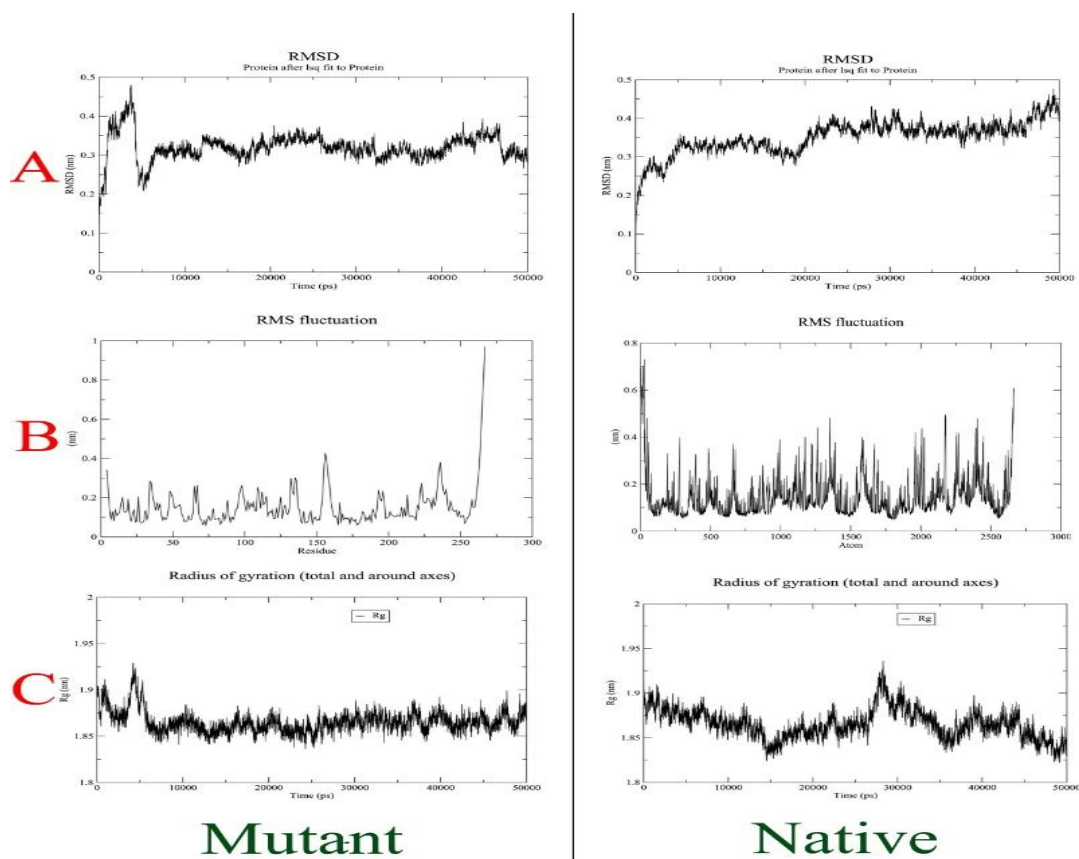
مقایسه رفتار دینامیکی ریسین طبیعی با جهش یافته: دقیق ترین و معتبرترین روش آنالیز ساختاری سه بعدی در دینامیک مولکولی، جذر متوسط مجذور انحرافات (RMSD) است که معیاری از میزان پایداری ساختار پپتید در شرایط دینامیک مولکولی می باشد (Aier et al. 2016). مقایسه دو نمودار RMSD در شکل (۲A) برای پروتئین ریسین طبیعی با جهش یافته نشان داد که اگرچه هر دو پروتئین به علت تغییر در توالی آمینو اسیدها در محل های جهش نقطه ای در پروتئین جهش یافته الگوی دقیقا مشابهی ندارند، اما نتایج دینامیک مولکولی (بررسی روابط بین ساختار مولکول ها، حرکت مولکول ها و توابع مولکولی) نشان

می‌دهد که پایداری در نمونه جهش‌یافته بیشتر است. از زمان ۲۰ نانوثانیه به بعد، ریسین جهش‌یافته تقریباً پایدار شده و نوسانات کوچکی دارد این در حالیست که در زمان ۳۰ نانوثانیه در ریسین طبیعی همچنان نوسان دارد (شکل ۲A). جذر میانگین مجذور نوسانات (RMSF) نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری اسیدهای آمینه یک پروتئین است. بررسی انعطاف‌پذیری اسیدهای آمینه بین نمونه طبیعی و جهش‌یافته نشان می‌دهد که تغییر اسیدهای آمینه در نمونه جهش‌یافته تأثیری بر انعطاف پروتئین ریسین نداشته و دارای الگوی کاملاً مشابه با یکدیگر می‌باشند (شکل ۲B). مقایسه اسیدهای آمینه نقاط جهش یافته (134، 214، 31 و 250) در بین دو نمودار شکل (۲B) نشان از تعادل یکسان اسیدهای آمینه طبیعی و جهش‌یافته داشته که این به نوبه خود سبب عدم تغییر عملکردی پروتئین می‌گردد. میزان فشردگی پروتئین با شعاع ژیراسیون (Rg) توصیف می‌گردد (شکل ۲C). نتایج حاصل از بررسی شعاع ژیراسیون نشان داد که پروتئین ریسین جهش‌یافته در مقایسه با نمونه طبیعی در طول شبیه‌سازی اگرچه که دارای نوساناتی است اما از تراکم ساختاری مناسبی برخوردار می‌باشد. ساختار سه بعدی پروتئین ریسین طبیعی و جهش‌یافته آن در قالب نهایی آنالیز دینامیک مولکولی (۵۰ نانوثانیه) نشان از مشابهت ۱۰۰ درصدی ساختاری دارد (شکل ۳). همدیفی ساختاری نشان داد که تغییر در ۴ آمینواسید کاندید، هیچ نوع تغییری در ساختار اصلی پروتئین به وجود نیاورده است. مطالعات نشان داده که ایجاد جهش با عدم تغییر در ساختار سوم پروتئین می‌تواند تضمین کننده عملکرد آنزیم باشد (Chen et al. 2016). گرچه هر دو پروتئین به علت تغییر در توالی آمینو اسیدها در محل‌های جهش نقطه‌ای در پروتئین جهش یافته الگوی دقیقاً مشابهی ندارند، اما نتایج دینامیک مولکولی (بررسی روابط بین ساختار مولکول‌ها، حرکت مولکول‌ها و توابع مولکولی) و بررسی خواص ترمودینامیکی (مانند دما، چگالی، حجم، فشار و ...) با استفاده از نرم افزار گرومکس نشان دهنده عدم تغییر در ساختار اساسی پروتئین و تشابه ساختاری بالای دو نوع پروتئین می‌باشد و با توجه به عدم تغییر در ساختار اساسی دو نوع پروتئین و آمینواسیدها و بخصوص عدم تغییر توالی آمینواسیدها در سایت‌های کاتالیتیکی (جایگاه‌های فعال آنزیم) در فعالیت آنزیمی و عملکرد دو نوع پروتئین تغییری ایجاد نشده است.

تولید پروتئین نو ترکیب ریسین: تولید پروتئین نو ترکیب ریسین جهش‌یافته با وزن مولکولی حدودی ۳۳ کیلو دالتون با استفاده از ژل SDS-PAGE مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۴). همچنین این پروتئین نو ترکیب با استفاده از ستون NI-NTA از عصاره دیواره سلولی با کیفیت مناسب خالص‌سازی شد. غلظت پروتئین خالص شده با استفاده از روش برادفورد، ۱۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. عدم مشاهده باند پروتئین ریسین در محتویات سیتوپلاسمیک سلولی *اشرشیاکلی* BL21(DE3) در ساعت ۲ و ۵ نشان از عملکرد صحیح سازه و پپتید راهبر *pelB* دارد (شکل ۴، S4 و S5). این پروتئین نو ترکیب وزن مولکولی کمتری نسبت به پروتئین ریسین طبیعی دارد. اهمیت تولید پروتئین در دیواره سلولی، ناشی از عدم تولید پروتئین در شکل انکلوژن بادی^۹ در سیتوپلاسم است. انکلوژن بادی فرمی از تولید پروتئین است که در آن پروتئین ساختار خود را حفظ نکرده و نمی‌تواند دارای عملکرد باشد (Carrio et al. 2000). اگرچه که روش‌های آزمایشگاهی وجود دارد که با استفاده از آن می‌توان تاخوردگی مجدد پروتئین

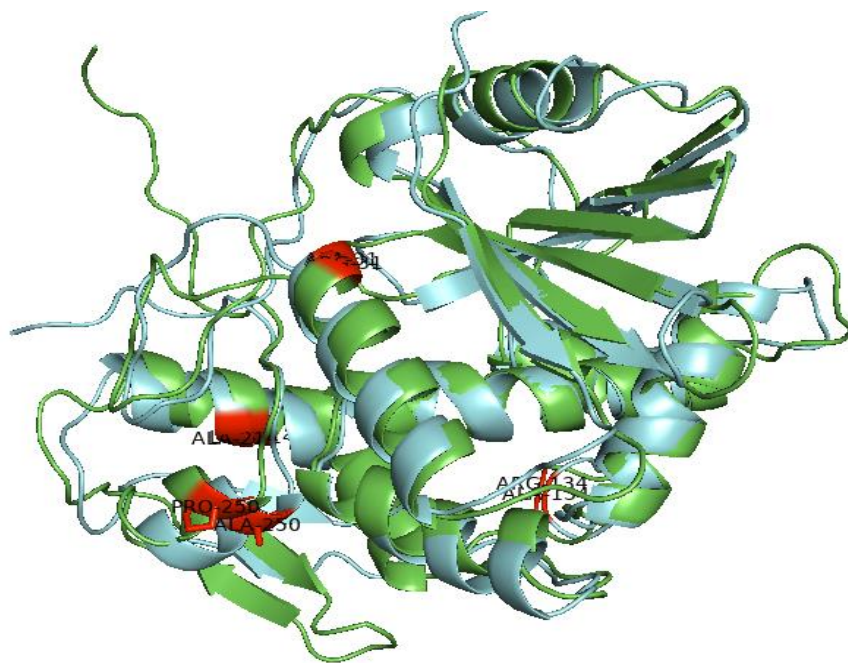
⁹ Inclusion Body

را ایجاد نمود، اما این روش‌ها سبب افزایش چشمگیر هزینه‌های تولید شده و بازدهی بسیار پایینی را دارند (Singh et al. 2015). از این‌رو، بهینه‌سازی تولید آنزیم‌ها در باکتری *اشرشیاکلی* با استفاده از وکتور pET22(b) این امکان را فراهم می‌سازد که بیان پروتئین با استفاده از سیگنال پپتید *pelB* در دیواره سلولی صورت پذیرد. البته فرآیند بهینه‌سازی تولید پروتئین نوترکیب با توجه به اینکه تولید انکلوژن بادی‌ها در *اشرشیاکلی* به مواردی مانند سطح بیان پروتئین، دمای بالای بیان، دز بالای القاگر و بیان تحت سیستم‌های قوی پیش‌بری بستگی دارد، باید تنظیم گردد (Carrio et al. 2000).



شکل ۲. آنالیز نوسانات ساختاری پروتئین ریسین در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی. (A): تغییرات انحراف جذر میانگین مربعات (RMSD)، (B): تغییرات نوسانات جذر میانگین مربعات (RMSF) و (C): تغییرات شعاع ژیراسیون (Rg)

Figure 2. Analysis of structural fluctuations of ricin protein during 50 ns of simulation. (A): RMSD changes, (B): RMSF changes and (C): Rg changes

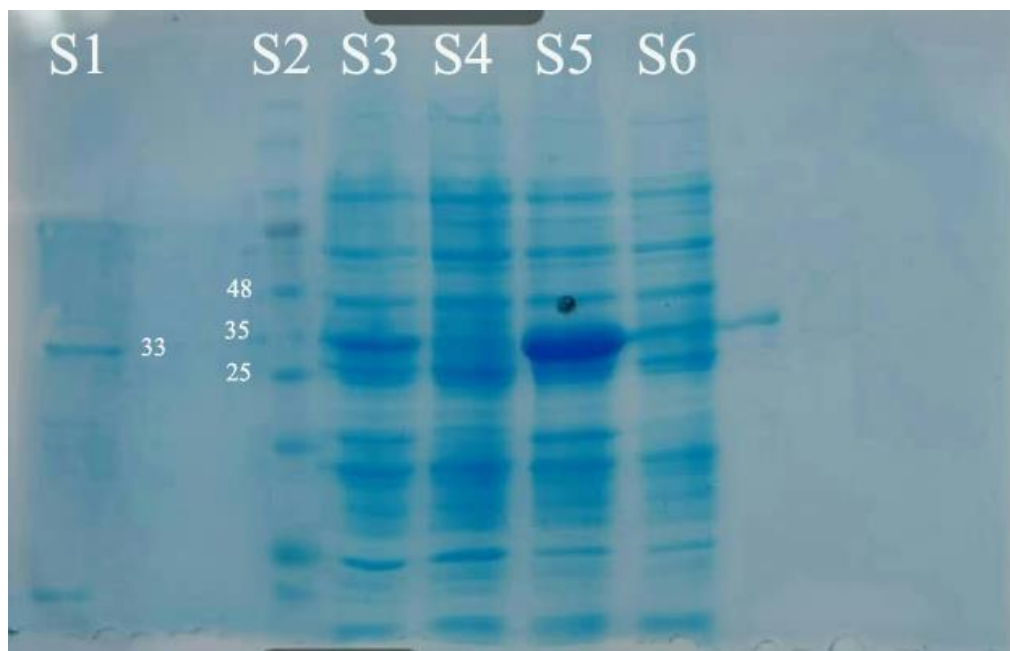


شکل ۳. هم‌ردیفی پروتئین ریسین طبیعی با جهش یافته. رنگ سبز مربوط به پروتئین ریسین طبیعی و رنگ آبی مربوط به ریسین جهش یافته می‌باشد. رنگ قرمز نشان‌دهنده محل‌های ایجاد جهش است

Figure 3. Alignment of normal and mutant ricin protein. The green and blue colors correspond to natural ricin and mutated ricin, respectively. The red color indicates the locations of the mutations

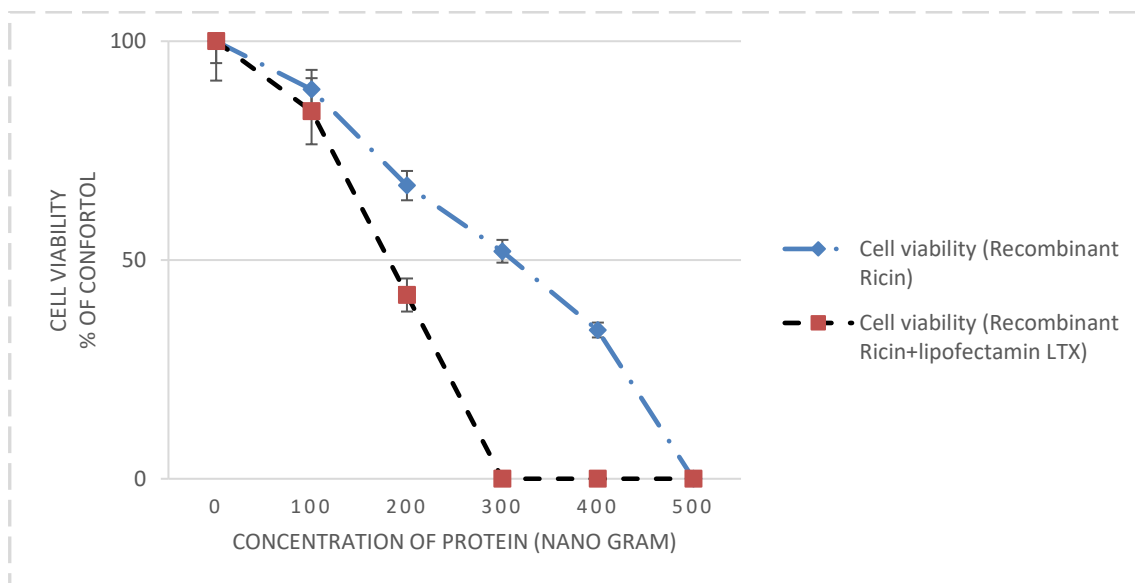
بررسی سمیت سلولی ریسین بر روی سلول‌های A431: به منظور برآورد اثر پروتئین نوترکیب ریسین تولید شده بر روی سلول‌های سرطانی، آزمون سمیت سلولی با مجاورت پروتئین با سلول و همچنین انتقال پروتئین به داخل سلول با موفقیت انجام شد. با توجه به نمودار شکل ۵ و با استفاده از مختصات نقطه با توجه به تعریف IC_{50} (غلظتی از دارو که در نتیجه آن ۵۰ درصد از رشد سلول‌ها جلوگیری می‌شود) در نتیجه IC_{50} پروتئین نوترکیب ریسین تولید شده در این مطالعه بر روی سلول‌های سرطانی حدود ۳۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد و IC_{50} برای این پروتئین با استفاده از حامل لیپوفکتامین LTX حدود ۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (شکل ۵). در حالی که IC_{50} پروتئین طبیعی ریسین حدود ۸۱/۷۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (Naemi et al. 2023). همچنین نتایج نشان داد که پروتئین ریسین تولید شده در این مطالعه، در غلظت ۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر قادر به از بین بردن تمامی سلول‌های سرطانی است ($P < 0.05$) (شکل ۵). در حالی که، انتقال پروتئین نوترکیب ریسین با استفاده از حامل لیپوفکتامین LTX با غلظت ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به داخل سلول‌ها، سبب از بین رفتن تمام سلول‌ها گردید ($P < 0.05$) (شکل ۵). این نتیجه به نوبه خود نشان می‌دهد که تغییر آمینو اسیدها سبب شده که از میزان سمیت سطحی سلولی

پروتئین ریسین کاسته شود. محققان با بکارگیری توکسین ریسین A در اتصال با ScfV آنتی‌بادی پانتومومب موفق به ایجاد مرگ سلولی IC50 در غلظت ۸۱/۷۱ نانوگرم شدند (Naemi et al. 2023). اگرچه که این غلظت مربوط به پروتئین ScfV و ریسین می‌باشد، اما به لحاظ عملکردی نشان می‌دهد پروتئین طبیعی ریسین دارای سمیت بالای کنترل نشده‌ای برای سلول‌های سرطانی و سالم است که این سبب ایجاد عوارض دارویی بالا برای بیماران می‌شود.



شکل ۴. بررسی پروتئین نو ترکیب ریسین جهش یافته تولید شده در دیواره سلولی بر روی SDS-PAGE. S1: پروتئین ریسین خالص سازی شده با ستون نیکل، S2: مارکر پروتئین شرکت سیناژن، S3: پروتئین حاضر در دیواره سلولی باکتری در ۲ ساعت بعد از القا با IPTG، S4: محتویات سیتوپلاسمیک سلول در ۲ ساعت بعد از القا با IPTG، S5: پروتئین حاضر در دیواره سلولی باکتری ۵ ساعت بعد از القا با IPTG، S6: محتویات سیتوپلاسمیک سلول ۵ ساعت بعد از القا با IPTG

Figure 4. Examination of the recombinant Ricin protein produced in the cell wall on SDS-PAGE. S1: ricin protein purified by nickel column, S2: Cinagen protein marker, S3: protein present in the bacterial cell wall at 2 hours after induction with IPTG, S4: cytoplasmic contents of cells at 2 hours after induction with IPTG, S5: protein present in the bacterial cell wall at 5 hours after induction with IPTG, S6: cytoplasmic contents of cells at 5 hours after induction with IPTG



شکل ۵. آزمون MTT برای سلول‌های سرطانی پوست رده A431 با پروتئین نو ترکیب ریسین و انتقال دهنده لیپوفکتامین

Figure 5. MTT assay for A431 cells with recombinant ricin protein and lipofectamine transporter

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که اهداف اصلی در نظر گرفته شده برای مهندسی آنزیم ریسین با استفاده از دینامیک مولکولی به شکل کامل بدست آمده است. دستیابی به بارالکتریکی سطحی بالاتر که خود تضمینی بر ورود بهتر پروتئین ریسین به داخل سلول و کاهش سمیت سلولی است به عنوان مهمترین دستاورد این پژوهش ارائه شده است. همچنین عدم تغییر در ساختار عملکردی پروتئین و حفظ ساختار سوم پروتئین منطبق با نمونه طبیعی آنزیم نشان از دقت مهندسی انجام شده بر روی پروتئین می‌باشد. نتایج آزمایشگاهی بدست آمده تأییدی قوی برای فرآیند مهندسی با استفاده از روش دینامیک مولکولی می‌باشد. دستیابی به پروتئین ریسین جهش یافته با سمیت سطح سلولی کمتر نسبت به نمونه طبیعی و عملکرد قوی در داخل سلول نشان می‌دهد که پروتئین تولید شده در این مطالعه کاندیدای بسیار مناسب جهت بکارگیری به عنوان توکسین در تولید ایمونوتوکسین‌ها است.

سپاسگزاری: این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد در قالب کد طرح ۴۹۲۰۶ صورت پذیرفته است که

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از آن دانشگاه محترم تشکر و قدردانی نمایند.

References

Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, et al. (2015) GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *Software X* 1-2, 19-25.

- Aier I, Varadwaj P, Raj U (2016) Structural insights into conformational stability of both wild-type and mutant EZH2 receptor. *Sci Rep* 6, 34984.
- Allahyari H, Heidari S, Ghamgosha M, et al. (2017) Immunotoxin: A new tool for cancer therapy. *Tumor Bio* 39, e2.
- Antignani A, FitzGerald D (2013) Immunotoxins: The Role of the Toxin. *Toxins* 5(8), 1486-1502.
- Azemar M, Djahansouzi S, Jager E, et al. (2003) Regression of cutaneous tumor lesions in patients intratumorally injected with a recombinant single-chain antibody-toxin targeted to ErbB2/HER2. *Breast Cancer Res Treat* 82, 155–64.
- Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, et al. (2010) Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In: Pullman, B. (eds) *Intermolecular Forces. The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry*, 1981; vol 14. Springer, Dordrecht.
- Berger EA, Pastan I (2010) Immunotoxin complementation of HAART to deplete persisting HIV-infected cell reservoirs. *PLoS Pathog* 6, e1000803.
- Bortolotti M, Polito L; Bolognesi A (2022) Toxin and Immunotoxin Based Therapeutic Approaches. *Toxins* 14, e63.
- Bradford, M (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". *Analytical Biochemistry*. 72 (1–2): 248–254.
- Carrio MM, Cubarsi R, Villaverde A (2000) Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Lett* 471, 7–11.
- Casellas P, Brown JP, Gros O (1982) Human melanoma cells can be killed in vitro by an immunotoxin specific for melanoma-associated antigen p97. *Int J Cancer* 30(4), 437–443.
- Chen B, Le W, Wang Y, et al. (2016) Targeting Negative Surface Charges of Cancer Cells by Multifunctional Nanoprobes. *Theranostics* 6(11), 1887-1198.
- Chen LC, Chiang WD, Chen WC, et al. (2012) Influence of alanine uptake on *Staphylococcus aureus* surface charge and its susceptibility to two cationic antibacterial agents, nisin and low molecular weight chitosan. *Food Chem* 135(4), 2397-2403.
- Das U, Shuman S (2014) Mechanism of RNA 2',3'-cyclic phosphate end healing by T4 polynucleotide kinase-phosphatase. *Nucleic Acids Res* 1, 355-365.
- Day PJ, Pinheiro TJ, Roberts LM, et al. (2002) Binding of ricin A-chain to negatively charged phospholipid vesicles leads to protein structural changes and destabilizes the lipid bilayer. *Biochemistry* 41, 2836-2843.
- Dillekås H, Rogers MS, Straume O (2019) Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med* 8(12), 5574-5576.

- Esvar N, Webb B, Marti-Renom MA, et al. (2006) Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 5, Unit 5-6.
- Fröhlich E (2012) The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 7, 5577-5591.
- Gilabert-Oriol R, Weng A, Mallinckrodt B, et al. (2014) Immunotoxins constructed with ribosome-inactivating proteins and their enhancers: a lethal cocktail with tumor specific efficacy. *Curr Pharm Des* 20(42), 6584-643.
- Groth C, van Groningen LFJ, Matos TR, et al. (2019) Phase I/II trial of a combination of anti-CD3/CD7 immunotoxins for steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 25, 712-219.
- Kim Y, Robertus JD (1992) Analysis of several key active site residues of ricin A chain by mutagenesis and X-ray crystallography. *Protein Eng* 5(8), 775-9.
- Kreitman RJ, Wilson WH, White JD, et al. (2000) Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 18, 1622-1636.
- Krishna BA, Spiess K, Poole EL, et al. (2017) Targeting the latent cytomegalovirus reservoir with an antiviral fusion toxin protein. *Nat Commun* 8, e14321.
- Krolick KA, Uhr JW, Slavin S (1982) In vivo therapy of a murine B cell tumor (BCL1) using antibody-ricin A chain immunotoxins. *J Exp Med* 155(6), 1797-1809.
- Kumar O, Sugendran K, Vijayaraghavan R (2003) Oxidative stress associated hepatic and renal toxicity induced by ricin in mice. *Toxicon* 41, 333-338.
- Lancaster L; Lambert NJ, Maklan EJ, et al. (2008) The sarcin-ricin loop of 23S rRNA is essential for assembly of the functional core of the 50S ribosomal subunit. *RNA* 14, 1999-2012.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, et al. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* 26, 283-291.
- MacKerell AD, Banavali N, Foloppe N (2001) Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. *Biopolymers* 56(4), 257-65.
- Moshiri M, Hamid F, Etemad L. (2016) Ricin Toxicity: Clinical and Molecular Aspects. *Rep Biochem Mol Biol* 4(2), 60-65.
- Naemi AA, Salmanian AH, Noormohammadi Z, et al. (2023) A novel EGFR-specific recombinant ricin-panitumumab (scFv) immunotoxin against breast and colorectal cancer cell lines; in silico and in vitro analyses. *Eur J Pharmacol* 955, e175894.
- Park SG, Kim H, Jun H (2022) Directing ricin-based immunotoxins with targeting affibodies and KDEL signal peptide to cancer cells effectively induces apoptosis and tumor suppression. *J Nanobiotechnol* 20, e387.

- Polito L, Bortolotti M, Pedrazzi M, et al. (2011) Immunotoxins and other conjugates containing saporin-s6 for cancer therapy. *Toxins (Basel)* 3(6), 697-720.
- Rust A, Hassan HH, Sedelnikova S, et al. (2015) Two complementary approaches for intracellular delivery of exogenous enzymes. *Sci Rep* 24(5), e12444.
- Sausville EA, Headlee D, Stetler-Stevenson M, et al. (1995) Continuous infusion of the anti-CD22 immunotoxin IgG-RFB4-SMPT-dgA in patients with B-cell lymphoma: a phase I study. *Blood* 85, 3457-3465.
- Shafiee F, Aucoin MG, Jahanian-Najafabadi A (2019) Targeted diphtheria toxin-based therapy: a review article. *Front Microbiol* 10, e2340.
- Shapira A, Benhar I (2010) Toxin-based therapeutic approaches. *Toxins* 2, 2519-2583.
- Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK (2015) Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact* 14, e41.
- Słomińska-Wojewódzka M, Sandvig K (2013) Ricin and ricin-containing immunotoxins: Insights into intracellular transport and mechanism of action in vitro. *Antibodies* 2, 236-269.
- Sokołowska I, Wälchli S, Węgrzyn G, et al. (2011) A single point mutation in ricin A-chain increases toxin degradation and inhibits EDEM1-dependent ER retrotranslocation. *Biochem J* 436(2), 371-385.
- Taghizadegan N, Firozrai M, Nassiri M, et al. (2020) Use of molecular dynamic tools in engineering of onconase enzyme to increase cellular uptake and evade RI. *Int J Pept Res Ther* 26, 737-743.
- Thorpe PE, Brown AN, Ross WC (1981) Cytotoxicity acquired by conjugation of an anti-Thy1.1 monoclonal antibody and the ribosome-inactivating protein, gelonin. *Eur J Biochem* 116(3), 447-454.
- Wayne AS, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ, et al. (2014) Immunotoxins for leukemia. *Blood* 123, 2470-2477.
- Wilkins DK, Mayer A (2006) Development of antibodies for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 6, 787-796.
- Yoshida T, Chen CC, Zhang MS, et al. (1991) Disruption of the Golgi apparatus by brefeldin A inhibits the cytotoxicity of ricin, modeccin, and *Pseudomonas* toxin. *Exp Cell Res* 192, 389-395.
- Zhao P, Wang P, Dong S, et al. (2019) Depletion of PD-1-positive cells ameliorates autoimmune disease. *Nat Biomed Eng* 3, 292-305.
- Zhu Q, Jiang L, Wang X (2017) The expression of Duffy antigen receptor for chemokines by epithelial ovarian cancer decreases growth potential. *Oncol Lett* 13(6), 4302-4306.