

ارزیابی تأثیر مواد افزودنی شیمیایی در تاخوردگی مجدد فاکتور رشد اندوتلیال عروقی نوترکیب

محسن خاکی^۱، حمید ابطحی^۱، قاسم مسیبی^۱

۱. مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: مهم‌ترین مشکل تولید پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های پروکاریوتیک، اختلال در عملکرد این پروتئین‌ها به دلیل تغییر ساختار طبیعی آن‌هاست. هدف این مطالعه انتخاب بهترین مواد شیمیایی به عنوان ترکیبات مکمل بافر دیالیز، جهت اصلاح ساختار فضایی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) نوترکیب است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، با بهره‌گیری از نرم‌افزارها، مواد شیمیایی مکمل مختلف انتخاب شدند. با افزودن این ترکیبات به بافر دیالیز VEGF نوترکیب، عملکرد این مواد در تاخوردگی مجدد پروتئین نوترکیب و ایجاد تمایز در سلول‌های پایه مزانشیمال به سلول‌های اندوتلیال، با روش فلوسایتومتری، ارزیابی شد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه با شناسه ARAKMU. REC.1394.199، در کمیته پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک، به ثبت رسیده است.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که اضافه کردن آرژنین، سیستئین و DDT، باعث افزایش تمایز سلول‌های مزانشیمال به اندوتلیال می‌شود. با حضور آرژنین، سیستئین، DDT و NaCl، در بافر دیالیز، میزان شاخص‌های تمایزی اختصاصی (CD) مربوط به سلول‌های اندوتلیال (CD31/144)، در بالاترین میزان بود.

نتیجه‌گیری: حضور آرژنین، سیستئین، DDT و NaCl در بافر دیالیز VEGF نوترکیب، بیشترین تأثیر را در تمایز سلول مزانشیمال به اندوتلیال دارد.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۲۳ آذر ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۰۲ دی ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۱۲ بهمن ۱۳۹۸

کلیدواژه‌ها:

تمایز سلولی، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، افزودنی‌های شیمیایی، شاخص‌های تمایزی سلولی

مقدمه

فاکتور رشد اندوتلیال عروقی Growth Factor Vascular Endothelial (VEGF) یک گلیکوپروتئین هومودایمر با وزن مولکولی ۳۴-۴۵ کیلو دالتون است که در سلول‌های مختلف از جمله ماکروفاژ، پلاکت، کراتینوسایت، سلول‌های مزانجیال کلیوی و نیز انواعی از سلول‌های سرطانی تولید می‌شود. VEGF خاصیت آنژیوژنیک و میتوژنیک دارد. این پروتئین به عنوان عامل رشد و تمایز سلول‌های استخوانی، هموستاز بعد از دوره نوزادی، بقای کندروسیت‌ها، رگ‌زایی و ترمیم بافتی عمل می‌کند. VEGF، پروتئین مؤثر در تمایز سلول‌های پایه مزانشیمال به سلول‌های اندوتلیال است که این ویژگی به عنوان نقطه عطف فعالیت این پروتئین در پدیده رگ‌زایی منظور می‌شود [۱].

ژن کدکننده VEGF، شامل ۸ اگزون است که روی باند ۱۲ بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۶ انسان، قرار دارند. از بیان این ژن، ایزومرهای VEGF-A, B, C, D, E, F و نیز عامل رشد جفتی

Placental growth factor (PLGF) تولید می‌شود [۲]. زیرگونه‌های VEGF-A انسانی عبارت است از VEGF-A-121، ۱۴۵، ۱۶۵، ۱۶۷، ۱۸۳ و ۱۸۹. فراوان‌ترین و مهم‌ترین این زیرگونه‌ها، VEGF-A-165 است [۳].

سلول‌های پروکاریوتی به‌ویژه باکتری‌ها به خاطر سهولت دستیابی، کشت ارزان و توان تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب، از بهترین سیستم‌های بیانی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب هستند. به رغم مزایای فراوان این سلول‌ها برای تولید فراورده‌های بیولوژیک نوترکیب، پروتئین ساخته‌شده به دلیل تغییر ساختار فضایی و خارج‌شدن از وضعیت طبیعی، عملکرد مناسب را نداشته و برای بازگرداندن ساختار طبیعی پروتئین نوترکیب و فعال کردن آن بایستی فرایند تاخوردگی مجدد، روی محصول تولیدشده اعمال شود. از معمول‌ترین روش‌ها برای اصلاح ساختار پروتئین نوترکیب، دیالیز شیمیایی این محصولات با استفاده از بافرهای

1. Refolding

* نویسنده مسئول:

حمید ابطحی

نشانی: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی.

تلفن: +۹۸ (۸۶) ۳۴۱۷۳۵۰۲

پست الکترونیکی: abtahi@arakmu.ac.ir

فناوری کروماتوگرافی تمایلی و کیت Ni-NTA (ستون رزین نیکل نیتروتری استیک اسید)، استفاده شد. برای تأیید حضور پروتئین نوترکیب مورد نظر در محصول نهایی، از روش SDS-PAGE استفاده شد. با توجه به اینکه بر اساس نتایج به دست آمده از SDS-PAGE، میزان پروتئین تولید شده در سلول DE3، به مراتب بیشتر از PLYSS بود، در ادامه این طرح، کلیه مراحل مربوط به تولید پروتئین، روی سلول DE3، اجرا شد. غلظت پروتئین تخلیص شده، با روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از فرمول شماره ۱ بر حسب mg/ml محاسبه شد [۱۰].

$$1. \text{ (0/76} \times \text{OD260 (1/55} \times \text{OD280))} = - \text{ مقدار پروتئین}$$

مرحله بازآرایی پروتئین

عطف به مطالب ذکر شده در قسمت مقدمه، در خصوص چالش‌های فناوری تولید و بازآرایی پروتئین نوترکیب [۱۱]، در اجرای این طرح، برای صرفه‌جویی در وقت و هزینه‌ها، ابتدا با بهره‌گیری از نرم‌افزارها، الگوی اصلاح ساختار پروتئین نوترکیب با حضور مکمل‌های شیمیایی مختلف در بافر دیالیز، شبیه‌سازی شد. ابتدا با Expasy server، مقدار pH پروتئین هدف، تعیین شد. سپس با برنامه Aggre scan server، نواحی حساس آگریگیشن پروتئینی پیش‌بینی شد. با استفاده از بانک اطلاعات پروتئین^۱، ساختار کریستالوگرافی VEGF، مشخص شد.

برای همسان‌سازی ساختار پروتئین از نرم‌افزار ویرایشگر Chi-mera Photo، استفاده شد. ساختار سه‌بعدی اسید آمینه‌های مورد نظر (سیستئین، پرولین، گلیسین و آرژنین)، از سایت PubChem^{۱۰} استخراج شد. با بهره‌گیری از برنامه Hyper-chem، انرژی همسان‌سازی پروتئین با مواد مکمل مختلف، مشخص شد [۱۲]. جهت پیش‌بینی فرایند باراندازی اسیدهای آمینه و مکمل‌های شیمیایی با نواحی حساس VEGF (داکینگ)، از نرم‌افزار AutoDock استفاده شد [۱۳]. در انتها از نرم‌افزار LigPlot، جهت پیشگویی واکنش‌های لیگاند‌های هیدروژنیک و هیدروفوبیک VEGF-A و ارزیابی طول باندهای هیدروژنی پروتئین، استفاده شد [۱۴]. برای دیالیز شیمیایی پروتئین، ابتدا بافر پایه PBS تهیه شد و سپس طبق جدول شماره ۱ با انتخاب مکمل شیمیایی مختلف، ۹ برنامه دیالیز روی محصول پروتئین تولید شده، اجرا شد.

برای ارزیابی اثربخشی فرایند بازآرایی محصول به دست آمده، از ۹ برنامه دیالیز، جهت تیمار سلول پایه مزانشمال^{۱۱} و تمایز آن به سلول اندوتلیال (EC)، استفاده شد. ابتدا در یک پلیت کشت سلولی ۲۴ خانه‌ای با گوده‌های تخت، در هر گوده، ۵۰۰۰ سلول

اختصاصی است. انتخاب ترکیب این بافرها، با توجه به ویژگی‌های ساختاری پروتئین نوترکیب مربوطه، مستلزم بهره‌گیری از مواد افزودنی^۲ مختلف و صرف هزینه و زمان بسیار است. استفاده از نرم‌افزارهای شبیه‌ساز، با فراهم کردن امکان واکنش مواد شیمیایی مختلف با پروتئین نوترکیب مورد نظر در محیط مجازی، ساختار محصول نوترکیب را اصلاح می‌کند و با انتخاب بهترین مواد برای تاخوردگی مجدد محصول نوترکیب، از این مواد برای اصلاح ساختار پروتئین در شرایط آزمایشگاهی، با صرف هزینه کمتر و زمان کوتاه‌تر استفاده می‌شود [۴].

با عنایت به این نکته که برای واردات VEGF نوترکیب، جهت اهداف پژوهشی، درمانی و غیره سالانه هزینه‌های فراوانی به کشور تحمیل می‌شود، تولید پروتئین نوترکیب مذکور، می‌تواند بخش کوچکی از مشکلات حوزه سلامت را برطرف کند.

در پژوهش حاضر، تولید نوترکیب این پروتئین به روش کلونینگ و سپس اصلاح ساختاری و بازگرداندن فعالیت این محصول با روش‌های مبتنی بر نرم‌افزار و دیالیز شیمیایی، با تأکید بر استفاده هدفمند از افزودنی‌ها در بافر دیالیز، اجرا شد. جهت ارزیابی کارایی فرایند تولید و بازآرایی پروتئین، عملکرد بیولوژیک آن در ایجاد تمایز سلولی، مورد بررسی قرار گرفت [۶، ۵].

مواد و روش‌ها

مرحله تکثیر و انتقال ژن هدف

در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی^۲، ژن کدکننده VEGF-A165، با رمز شناسایی Acc: NM_001287044، از پایگاه NCBI^{۱۰} استخراج شد. با اضافه کردن توالی مربوط به آنزیم‌های محدودگر BamHI و XhoI در دو سر آن، ژن مذکور توسط شرکت بیوماتیک (Biomatic.Co. Canada) ساخته شد. فرایند ترانسفورمیشن (انتقال ژن هدف به سلول پروکاریوتیک تکثیر یافته E. coli DH5α و سلول‌های بیانی "DE3" E. coli BL21 plysS و "Novagen, USA") به طریق شوک حرارتی و روش کوهن^۵، انجام شد. برای فرایند القای بیان پروتئین از IPTG^۶ شرکت Thermo Scientific, Italy، استفاده شد [۹-۷].

مرحله استخراج پروتئین نوترکیب

با توجه به استفاده از پلاسמיד pET 32a و الصاق دنباله شش اسید آمینه هیستیدین^۷ به محصول، جهت تخلیص پروتئین، از

2. Additives
3. Experimental laboratory study
4. National Center for Biotechnology Information
5. Cohen transforming method
6. Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside
7. His-tag

8. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
9. Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>)
10. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
11. Mesenchymal Stem Cells (MSC)

MNFLLSWVHWSLALLLHLHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDE/EYIFKP-SCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHMKCECRPKKDRARQEKKSVRGKKGQ-QRRKRKKSRYKSWSVCDKPRR



تصویر ۱. نواحی حساس اگریگیشن پروتئینی در VEGF-A

یافته‌ها

به استناد داده‌های پایگاه Expasi، میزان pH ایزو الکتریک VEGF-A (pI)، ۹/۲ تعیین شد و بر اساس آن میزان pH بافر پایه دیالیز، هشت در نظر گرفته شد. نتایج نرم‌افزار LigPlot، نشان داد که بین سیستئین و VEGF، باندهای هیدروژنی ضعیف‌تری نسبت به سایر اسیدهای آمینه، ایجاد می‌شود. داده‌ها از سرور aggre scan، نواحی حساس تجمع پروتئین^{۱۵} برای VEGF را مشخص کرد. این مکان‌ها در تصویر شماره ۱ با حروف درشت، نمایش داده شده است. بر اساس نتایج فلوسایتومتری، درصد سلول‌های پایه و تمایز یافته بر اساس میزان شاخص‌های مولکولی با روش فلو سیتومتری، مشخص شد (جدول شماره ۴).

بحث

در ارزیابی عملکرد VEGF نو ترکیب در ایجاد تمایز در سلول‌های

15. Protein aggregation prone area

MSC ریخته شد. در تراکم سلولی^{۱۲} ۵۰ درصد، طبق جدول شماره ۲، تیمار سلول‌ها به مدت ۱۰ روز انجام شد. برای افزایش دقت آزمایش، در مورد گوده‌های تیمار شده با VEGF دست‌ساز، به صورت دو گوده (دوپلیکیت) و در مورد کنترل‌ها، تیمار در سه گوده (تریپلیکیت) انجام شد. از پروتئین تجارتي شرکت abcam (ab9571)، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

برای ارزیابی میزان تمایز MSC به EC به روش فلوسایتومتری، شاخص‌های اختصاصی (CD Markers) سلول‌های مورد نظر، مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول شماره ۳).

تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون تی مستقل^{۱۳} و من ویتنی یو^{۱۴}، انجام شد. میانگین و انحراف معیار داده‌ها، با نسخه ۱۶ برنامه SSPS (IBM corporation, NY, USA) محاسبه شد. حد معنی‌داری با P value کمتر از ۰/۰۵، مشخص شد.

12. Confluency

13. Independent sample t-test

14. Mann-Whitney U-test

جدول ۱. برنامه‌های دیالیز بر اساس مواد مکمل متفاوت

مواد مکمل برنامه‌ها	Tri + / ۵ درصد	Glu ۱ میلی مولار	DDT ۱ میلی مولار	Pro ۱۵۰ میلی مولار	Gly ۱۵۰ میلی مولار	Cys ۱۵۰ میلی مولار	Arg ۱۵۰ میلی مولار	EDTA ۱ میلی مولار	NaCl ۲۰۰ میلی مولار
۱	-	-	-	-	+	-	+	+	+
۲	-	-	-	-	-	+	-	+	+
۳	-	-	-	+	-	-	-	+	+
۴	+	-	+	-	-	+	+	+	+
۵	-	-	+	-	-	+	-	+	+
۶	-	+	-	-	-	+	-	-	+
۷	-	-	+	-	-	+	+	-	+
۸	-	-	+	-	-	+	-	-	+
۹	-	-	+	-	-	+	+	+	+



DDT: Diamine Tetraacetic Acid; Cys: Cysteine; Pro: Proline; Arg: Arginine, Gly: Glycine; GLU: Glucose; Tri: TritonX-100; EDTA: Ethylene Dithiothreitol;

⁺ حضور ادیتو

⁻ عدم حضور ادیتو

جدول ۲. الگوی تیمار سلول‌های مزانشیمال استم سل با پروتئین VEGF

الگوی تیمار سلول‌ها			
۱ برنامه VEGF و MSc	۲ برنامه VEGF و MSc	۳ برنامه VEGF و MSc	۴ برنامه VEGF و MSc
۱ برنامه VEGF و MSc	۲ برنامه VEGF و MSc	۳ برنامه VEGF و MSc	۴ برنامه VEGF و MSc
۵ برنامه VEGF و MSc	۶ برنامه VEGF و MSc	۷ برنامه VEGF و MSc	۸ برنامه VEGF و MSc
۵ برنامه VEGF و MSc	۶ برنامه VEGF و MSc	۷ برنامه VEGF و MSc	۸ برنامه VEGF و MSc
۹ برنامه VEGF و MSc	کنترل منفی	کنترل منفی	کنترل منفی: MSc و PBS
۹ برنامه VEGF و MSc	کنترل مثبت	کنترل مثبت	کنترل مثبت: VEGF و MSc تجارتي



جدول ۳. شاخص‌های مولکولی تعیین کننده رده‌های مختلف سلولی

شاخص سلولی	سلول اختصاصی
CD 34	Blast cell
CD 34, CD73, CD44	MSc
CD 31, CD144	EC



جدول ۴. درصد سلول‌های پایه و تمایز یافته بر اساس میزان شاخص‌های مولکولی

نوع شاخص	نوع سلول	درصد	
		در کنترل مثبت	در کنترل منفی
CD 105	مزانشیمال	۷۹	۶۹
CD 34	سلول بلاست	۱۷	۱۷
CD 34 / CD 105	سلول بلاست	۱۶/۵	۱۶
CD 90	مزانشیمال	۸۵	۸۵
CD 73	مزانشیمال	۶۵	۷۱
CD90 / CD73	مزانشیمال	۶۳	۷۰
CD 44	مزانشیمال	۸۵	۸۸
CD44 / CD73	مزانشیمال	۶۲	۷۱
CD90 / CD44	مزانشیمال	۷۵	۷۸
CD 31	اندوتلیال	۲۰	۱۴
CD 144	اندوتلیال	۶۲	۵۶
CD 31 / CD 144	اندوتلیال	۱۷	۱۵



برای اصلاح ساختار VEGF نوترکیب، استفاده شد، سیستمین و DDT بود. علاوه بر این دو ترکیب، نقش عواملی چون EDTA، آرژنین و تریتون X100، مورد تأیید قرار گرفت. با توجه به وجود باندهای دی سولفید متعدد در بخش‌های مختلف ساختار VEGF، بهره‌برداری از اسید آمینه سیستمین در ترکیب بافر دیالیز، کاملاً توجیه منطقی و بیوشیمیایی داشت. سیستمین می‌تواند در پروتئین نوترکیب با صرف انرژی پایین، باعث اصلاح ساختار پروتئین و تبدیل فرم غیرفعال آن به فرم فعال شود [۱۶].

نقش دیگر سیستمین می‌تواند تسهیل فرایند در هم آمیختن باندهای دی سولفید باشد؛ زیرا این اسید آمینه می‌تواند در پروتئین تغییر شکل یافته، به جای باندهای دی سولفید ضعیف با برقراری اتصالات قوی‌تر وارد شده و با این مکانیسم ساختار پروتئین را تثبیت کند [۱۷]. نتایج برنامه نرم‌افزار LigPlot، نیز نشان داد که این اسید آمینه به عنوان یک تثبیت‌کننده پروتئین، نسبت به سایر اسیدهای آمینه، در مدل نرم‌افزاری، پیوند ضعیف‌تری با VEGF دارد. ارزیابی‌های اعمال جهش خاص^{۱۷}، نشان داد که باندهای دی سولفید متعدد، در هر زنجیره پلی پپتیدی VEGF، وجود دارد و رشته‌های ثابت سیستمین در داخل لیگاندهای دیمر VEGF، از اختصاصی‌ترین ویژگی‌های ساختار VEGF هستند [۱۷].

آرژنین، به عنوان یکی دیگر از مواد مکمل در بافر دیالیز، ممکن است باعث افزایش حلالیت پروتئین، از طریق گروه گوانیدین شود. به عبارت دیگر، گروه‌های آمین و کربوکسیل این اسید آمینه، می‌تواند با پروتئین غیر فعال شده و آب، پیوند هیدروژنی ضعیف ایجاد کند، در حالی که گروه گوانیدین آرژنین با برقراری پیوندهای قوی‌تر کاتیونی و الکترواستاتیک با اسیدهای آمینه هیدروفوب سطحی پروتئین، واکنش می‌دهد. این ترکیب می‌تواند به عنوان یک مهارکننده اگریگیشن پروتئین نوترکیب عمل کند [۲۰-۱۸].

در مورد اثر آرژنین، نتایج بعضی مطالعات با مطالعه حاضر همخوانی داشت. این یافته‌ها نشان داد که آرژنین در بافر ریفولدینگ به عنوان یک ترکیب مفید در بازاصلاح پروتئین عمل می‌کند. از جمله در زمینه تولید چند پروتئین نوترکیب مثل بخش Fab آنتی‌بادی، آنزیم کازئین کیناز و زنجیره تکی ایمونوتوکسین [۲۲، ۲۱]. نقش مثبت مواد شیمیایی مختلف از جمله آرژنین در اصلاح ساختاری پروتئین نوترکیب ارزیابی و تأیید شده است. اما نتایج چندین مطالعه نشان داد که آرژنین ممکن است به عنوان یک دناتورکننده پروتئین عمل کند. از جمله ژیا^{۱۸} و همکاران نشان دادند که آرژنین ممکن است ساختار آمینو اسیلز را منهدم کند. در مطالعه یانسی^{۱۹} و همکاران، نتیجه‌گیری شده که آرژنین، می‌تواند ساختار و پایداری پروتئین را متزلزل کند و در نتیجه به عنوان یک عامل ضد ثبات پروتئین عمل کند [۲۴، ۲۳].

مزانشیمال به سلول اندوتلیال، داده‌های این مطالعه نشان داد که شیب کاهش درصد شاخص‌های سلول‌های مزانشیمال، در سلول‌های تیمار شده با پروتئین نوترکیب، نسبت به سلول‌های تیمار شده با VEGF تجارتي، تندتر بود. این نتیجه مؤید تأثیر بیشتر VEGF ساخته شده نسبت به پروتئین تجارتي بود. این مطلب می‌تواند مؤید مناسب بودن روش اصلاح ساختار پروتئین، در این مطالعه باشد؛ زیرا با بهره‌گیری از روش شبیه‌سازی پروتئین در محیط مجازی، فرایند تاخوردگی مجدد پروتئین نوترکیب، هدفمند و انتخابی اجرا شد. نکته قابل بیان دیگر اینکه ممکن است پروتئین تجارتي خریداری شده و وارداتی، در پروسه نگهداری و حمل‌ونقل توسط شرکت‌های داخلی که خارج از کنترل این مطالعه هستند، تا حدی فعالیتش را از دست داده باشد.

قدر مسلم، پروتئین تجارتي در ایجاد تمایز در سلول مزانشیمال به سمت اندوتلیال، عملکرد مثبت داشت، ولی توان پروتئین نوترکیب تولید شده، بهتر از VEGF تجارتي بود. نتایج کلی اغلب مطالعات در این موضوع، با این مطالعه همخوانی داشت. در اغلب این مطالعات به نوعی از عملکرد بیولوژیک VEGF، استفاده شده بود و تأثیر این پروتئین در کنار عوامل دیگر به صورت اثربخشی تریایی یا مهارکنندگی در مداخلات بالینی و آزمایشگاهی، ارزیابی شده بود. تفاوت عمده اغلب این مطالعات با مطالعه حاضر، این است که در این پژوهش‌ها، از VEGF بافتی به جای نوع تجارتي، استفاده شده بود.

نقطه عطف مطالعه حاضر، بهینه‌سازی روش دیالیز پروتئین نوترکیب با بهره‌گیری از الگوهای نرم‌افزاری و استفاده از بافرهای دیالیز حاوی مواد افزودنی متفاوت است. با توجه به اینکه قبل از اجرای فرایند دیالیز پروتئین به روش شیمیایی، از نرم‌افزارهای شبیه‌ساز بازاریابی پروتئین استفاده شد، ضمن صرفه‌جویی در زمان، هزینه فرایند دیالیز پروتئین به حداقل رسید.

یافته‌های حاصل از نرم‌افزارهای شبیه‌ساز، با نتایج بخش تجربی آزمایشگاهی، همخوان بود و نشان داد پیش‌داوری‌های نرم‌افزاری، مناسب بوده است. با توجه به ویژگی‌های ساختاری VEGF، از جمله وجود باندهای دی سولفید متعدد، به عنوان یک پروتئین غنی از سیستمین^{۱۶} [۱۵]، در انتخاب روش تاخوردگی مجدد پروتئین، به این مشخصه‌های ساختاری پروتئین، توجه شد. در برنامه‌های شبیه‌سازی کامپیوتری، داشتن حداقل سطح انرژی پیوند بین پروتئین و مواد افزودنی همچنین وجود باند هیدروژنی طولانی‌تر و تعداد پیوندهای هیدروژنی کمتر با لیگاند مربوطه، به عنوان فاکتورهای انتخاب ماده شیمیایی مناسب، در نظر گرفته شد.

بعد از تلفیق داده‌های برنامه‌های شبیه‌سازی کامپیوتری و اجرای روش‌های آزمایشگاهی اصلاح ساختاری پروتئین، محصول نهایی، از نظر توان ایجاد تمایز روی سلول مزانشیمال به اندوتلیال، ارزیابی شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، بهترین ترکیباتی که در بافر دیالیز

17. Site-directed mutagenesis investigations

18. Xia

19. Yancey

16. Cysteine-rich protein

در بافر دیالیز، با مطالعه حاضر، توجه می‌کند. تریتون X100، یک سورفکتانت غیر یونی است و به عنوان یک دترجنت لیز کننده عمل می‌کند. این ترکیب، اگر یکیشن پروتئین را متوقف می‌کند و نتیجه حضور آن در بافر دیالیز، موجب افزایش میزان اصلاح ساختار پروتئین، می‌شود [۲۹].

در راستای همخوانی مطالعات مرتبط با نتایج مطالعه حاضر و استفاده از این مواد، مطالعه لی و همکاران، قابل توجه است. در پژوهش مذکور، این گونه نتیجه‌گیری شده که تریتون X100، با القای حلالیت پروتئین‌های الیگومر، فرایند ریفلدینگ این گروه‌های پروتئینی را بیش از پروتئین‌های منومر، حمایت و جهت‌دهی می‌کند [۲۷]. این مطلب با ساختار VEGF، به عنوان یک پروتئین دایمر همخوانی دارد و نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین نوترکیب تولید شده، توسط تریتون X100، به ساختار طبیعی برمی‌گردد.

نتایج نشان داد که به کمک نرم‌افزارهای شبیه‌ساز پروتئین و انتخاب مواد شیمیایی هدفمند، VEGF-A نوترکیب ساخته شده توانایی ایجاد تمایز در سلول مزانشیمال به اندوتلیال را دارد. یکی از کاستی‌ها و کمبودهای این مطالعه، در دسترس نبودن پروتئین‌های نوترکیب با ساختار متفاوت بود. در صورت فراهم شدن این شرایط، می‌توان طیف وسیعی از پروتئین‌های نوترکیب را با این روش دیالیز، به فرم طبیعی تبدیل کرد. با تحلیل داده‌های وسیع‌تر در این مورد می‌توان دستور کارهای عملیاتی برای اصلاح ساختار پروتئین‌های نوترکیب با ساختار متنوع، پیشنهاد کرد.

نتیجه‌گیری

حضور مواد مکمل شامل آرژنین، سیستئین، DDT و NaCl در بافر دیالیز VEGF نوترکیب، باعث اصلاح ساختار این پروتئین و برگشت عملکرد آن از نظر ایجاد تمایز سلول‌های پایه مزانشیمال به اندوتلیال می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

تمام آزمایش‌های این پژوهش روی سلول‌های زنده در شرایط استاندارد آزمایشگاه کشت سلول، با رعایت اصول ایمنی زیستی و بر اساس تأیید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی اراک، با شناسه ARAKMU. REC.1394.199 انجام شد.

حامی مالی

این مقاله حاصل از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک با شماره ۲۳۵۶ و تأمین مالی معاونت محترم تحقیقات و فناوری این دانشگاه، است.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، مواد مکمل مفید در فرایند تاخوردگی مجدد VEGF، شامل سیستئین و DDT بود و EDTA نقش کمتری داشت. EDTA به عنوان یک ماده شیمیایی شلات کننده و نیز مهارکننده آنزیم متالوپروتئاز، باعث کاهش واکنش‌های اکسیداسیون شده و به این دلیل حلالیت پروتئین هدف را افزایش می‌دهد. در استفاده توأم EDTA، سیستئین و DDT، در یک برنامه دیالیز پروتئین، مشاهده شد که میزان CD44 به عنوان شاخص سلول‌های بلاست و هماتوپوئیک، کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر استفاده ترکیبی این سه ماده در راستای تقویت تمایز سلول مزانشیمال به سمت سلول اندوتلیال است که مؤید افزایش طبیعی شدن ساختار پروتئین نوترکیب است.

DDT، همچنین به عنوان یک ترکیب ردوکس (اکسیداسیون و احیاکننده)، عمل می‌کند. به این صورت که باندهای دی‌سولفید معمول، از طریق واکنش‌های تعویض تیول دی‌سولفید به جلو حرکت می‌کنند و تیول‌های دیگر موجود در DDT، حلقه مربوطه را بسته و با ایجاد DDT اکسید شده، از سمت پشت حلقه، باند دی‌سولفید احیاء شده را ترک کرده و واکنش را متوقف می‌کند. این عملکرد DDT در شرایط قلیایی (همان گونه که در بافر مورد استفاده در این مطالعه وجود داشت)، بیشتر رخ می‌دهد [۲۵]. در این مطالعه، عملکرد آرژنین، کمتر از سیستئین و DDT بود، اما به طور کلی، حضور آرژنین برای بازگرداندن ساختار و فعال کردن VEGF سننتیک، مفید بود. نتایج این مطالعه نشان داد که پرولین، گلوکز و گلیاسین، به عنوان عوامل بازدارنده در فرایند اصلاح ساختار VEGF نوترکیب عمل می‌کنند. دلیل این نقش منفی، ممکن است این باشد که گلیاسین و گلوکز می‌توانند از طریق فشردن و کلاپس کردن ساختار پروتئین، باعث بدشکلی پروتئین شود [۲۲].

گلوکز به عنوان یک مکمل با وزن مولکولی پایین، در مورد بعضی پروتئین‌ها، می‌تواند ساختار پروتئین نوترکیب را از شکل انکلوژن بادی به حالت طبیعی برگرداند [۲۶، ۲۷]. پرولین نیز ممکن است از طریق اتصال به بخش‌های بینابینی پیچ‌خورده بعضی پروتئین‌های نوترکیب، باعث مهار اگر یکیشن پروتئین شود. همچنین این ترکیب ممکن است از طریق پوشاندن مکان‌های هیدروفوب پروتئین هدف، مانع اگر یکیشن شود. نکته مهم‌تر در خصوص نتایج متفاوت این مطالعه با چندین مطالعه مرتبط، ممکن است به دلیل ساختار ویژه VEGF، از جمله وجود باندهای دی‌سولفید متعدد و واکنش‌های هیدروفوب درون مولکولی این پروتئین باشد.

مقدم و همکاران دریافتند که پروتئین غنی از سیستئین چیتیناز، می‌تواند توسط بافر دیالیز حاوی سوکروز، تریتون DDT X100، گوانیدین کلراید و گلیسرول، اصلاح شود [۲۸]. حضور باندهای دی‌سولفید متعدد در ساختار چیتیناز و VEGF، بهره‌گیری از تریتون X100 و DDT را به عنوان ترکیبات مشترک

مشارکت نویسندگان

طراحی و مدیریت علمی: حمید ابطحی؛ طراحی و اجرای فلوسایتومتری: دکتر قاسم مسیبی؛ اجرای فرآیند عملی تحقیق و نگارش مقاله: محسن خاکی..

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله تصریح می‌کنند که هیچگونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پشتیبانی مسئولین محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک، قدردانی می‌شود.

References

- [1] Yamagishi N, Teshima-Kondo S, Masuda K, Nishida K, Kuwano Y, Dang DT, et al. Chronic inhibition of tumor cell-derived VEGF enhances the malignant phenotype of colorectal cancer cells. *BMC Cancer*. 2013; 13(1):229. [DOI:10.1186/1471-2407-13-229] [PMID] [PMCID]
- [2] Lee SB, Park JS, Lee S, Park J, Yu S, Kim H, et al. Overproduction of recombinant human VEGF (vascular endothelial growth factor) in Chinese hamster ovary cells. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18(1):183-7.
- [3] Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: Isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014; 25(1):1-19. [DOI:10.1016/j.cytogfr.2013.11.002] [PMID] [PMCID]
- [4] Atilgan E, Hu J. Improving protein docking using sustainable genetic algorithms. *Int J Compu Inoform Sys Ind Manag App*. 2011; 3:248-55.
- [5] Khaki M, Salmanian AH, Abtahi H, Ganji A, Mosayebi G. Mesenchymal Stem Cells Differentiate to Endothelial Cells Using Recombinant Vascular Endothelial Growth Factor-A. *Rep Biochem Mol Biol*. 2018; 6(2):144-50. [PMID] [PMCID]
- [6] Kinashi H, Ito Y, Sun T, Katsuno T, Takei Y. Roles of the TGF- β -VEGF-C pathway in fibrosis-related lymphangiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(9):E2487. [DOI:10.3390/ijms19092487] [PMID] [PMCID]
- [7] Abbasian S, Soufian S, Nejad A, Abtahi H. Investigating the possibility of recombination the predicted antigenic fragment of Streptococcus pyogenes hyaluronidase by bioinformatics softwares. *Koomeh*. 2015; 17(1):77-83.
- [8] Mirjamali NAS, Soufian S, Molaee N, Abbasian SS, Abtahi H. Cloning and expression of the enzymatic region of Streptococcal hyaluronidase. *Iran J Basic Med Sci*. 2014; 17(9):667-72. [PMID] [PMCID]
- [9] Divevara E, Abtahi H. Cloning and production of the monomer form of recombinant streptavidin and appraisal of its binding affinity to biotin. *Koomeh*. 2018; 20(1):115-21.
- [10] Hamzehloo Z, Mosayebi Gh, Khansarnejad B, Zolfaghari M, Abtahi H. Antigenicity Identification of a Novel Recombinant Multi-Epitope Antigen Based on FlaA and UreB Antigens of Helicobacter pylori. *Jundishapur J Microbiol*. 2019; 12(5):e66502.
- [11] Morozova VV, Vlassov VV, Tikunova NV. Applications of bacteriophages in the treatment of localized infections in humans. *Front Microbiol*. 2018; 9:1696. [DOI:10.3389/fmicb.2018.01696] [PMID] [PMCID]
- [12] Bystrov VS, Bdikin IK, Silibin M, Karpinsky D, Kopyl S, Paramonova EV, et al. Molecular modeling of the piezoelectric properties of ferroelectric composites containing Polyvinylidene Fluoride (PVDF) and either graphene or graphene oxide. *J Mol Model*. 2017; 23(4):128. [DOI:10.1007/s00894-017-3291-2] [PMID]
- [13] Mohamadyar-Toupkanlou F, Esfandiari M, Kashef-Saberi MS, Renani MK, Soleimani M. The structural bioinformatics analysis of biophenolic lignan-estrogen receptor interaction. *Curr Cancer Drug Targets*. 2017. [DOI:10.2174/1568009617666170623121446] [PMID]
- [14] Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng Des Sel*. 1995; 8(2):127-34. [DOI:10.1093/protein/8.2.127] [PMID]
- [15] Claffey KP, Senger DR, Spiegelman BM. Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1246(1):1-9. [DOI:10.1016/0167-4838(94)00144-6]
- [16] Walker KW, Lyles MM, Gilbert HF. Catalysis of oxidative protein folding by mutants of protein disulfide isomerase with a single active-site cysteine. *Biochem*. 1996; 35(6):1972-80. [DOI:10.1021/bi952157n] [PMID]
- [17] Cothran A, St John RJ, Schmelzer CH, Pizarro SA. High-pressure refolding of human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) recombinantly expressed in bacterial inclusion bodies: Refolding optimization, and feasibility assessment. *Biotechnol Prog*. 2011; 27(5):1273-81. [DOI:10.1002/btpr.642] [PMID]
- [18] Buchner J, Rudolph R. Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in Escherichia coli. *Biotechnology (N Y)*. 1991; 9(2):157-62. [DOI:10.1038/nbt0291-157] [PMID]
- [19] Inoue N, Takai E, Arakawa T, Shiraki K. Arginine and lysine reduce the high viscosity of serum albumin solutions for pharmaceutical injection. *J Biosci Bioeng*. 2014; 117(5):539-43. [DOI:10.1016/j.jbiosc.2013.10.016] [PMID]
- [20] Arakawa T, Kita Y. Multi-faceted arginine: Mechanism of the effects of arginine on protein. *Curr Protein Pept Sci*. 2014; 15(6):608-20. [DOI:10.2174/138920371506140818113015] [PMID]
- [21] Arora D, Khanna N. Method for increasing the yield of properly folded recombinant human gamma interferon from inclusion bodies. *J Biotechnol*. 1996; 52(2):127-33. [DOI:10.1016/S0168-1656(96)01636-7]
- [22] Xia Y, Park YD, Mu H, Zhou HM, Wang XY, Meng FG. The protective effects of osmolytes on arginine kinase unfolding and aggregation. *Int J Biol Macromol*. 2007; 40(5):437-43. [DOI:10.1016/j.ijbiomac.2006.10.004] [PMID]
- [23] Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in E. coli. *Curr Opin Biotechnol*. 1998; 9(5):497-501. [DOI:10.1016/S0958-1669(98)80035-9]
- [24] Bourot S, Sire O, Trautwetter A, Touze T, Wu LF, Blanco C, et al. Glycine betaine-assisted protein folding in a lysA mutant of Escherichia coli. *J Biol Chem*. 2000; 275(2):1050-6. [DOI:10.1074/jbc.275.2.1050] [PMID]
- [25] Alibolandi M, Mirzahoseini H. Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. *Biochem Res Int*. 2011; 2011:631607. [DOI:10.1155/2011/631607] [PMID] [PMCID]
- [26] Ke N, Berkmen M. Production of disulfide-bonded proteins in Escherichia coli. *Curr Protoc Mol Biol*. 2014; 108(16.1B):1-21. [DOI:10.1002/0471142727.mb1601bs108] [PMID]
- [27] Lee SH, Carpenter JF, Chang BS, Randolph TW, Kim YS. Effects of solutes on solubilization and refolding of proteins from inclusion bodies with high hydrostatic pressure. *Protein Sci*. 2006; 15(2):304-13. [DOI:10.1002/pro.27] [PMID] [PMCID]
- [28] Reddy KRC, Lilie H, Rudolph R, Lange C. L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. *Protein Sci*. 2005; 14(4):929-35. [DOI:10.1110/ps.041085005] [PMID] [PMCID]
- [29] Thomson CA, Olson M, Jackson LM, Schrader JW. A simplified method for the efficient refolding and purification of recombinant human GM-CSF. *PLOS One*. 2012; 7(11):e49891. [DOI:10.1371/journal.pone.0049891] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank