

Cloning and Expression of Extracellular Domain of Human VEGF Receptor-2 in *Pichia pastoris* and Investigation of its Binding Properties

Fathi Z.¹ MSc, Mashhadi Akbar Boojar M.¹ PhD, Dehnavi E.² PhD, Hassan Sajedi R.^{*3} PhD

¹ Cellular & Molecular Sciences Department, Biological Sciences Faculty, Kharazmi University, Tehran, Iran

² Gene Transfer Pioneers Research Group, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

³ Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Abnormal angiogenesis is associated with various diseases such as solid tumors and metastasis, retinopathies, and rheumatoid arthritis. VEGF-A is the most important mediator of angiogenesis among all growth factors. The bioactivity of VEGF is mediated by two tyrosine kinase receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 present on endothelial cells. VEGF signaling through VEGFR-2 is the major angiogenic pathway that leads to stimulation of endothelial cell ingrowths into the tumor. It comprised of an extracellular portion, a cytoplasmic portion, and a short transmembrane domain. The extracellular portion consists of seven Ig-like domains (D1-D7), of which the 1st to 3rd domains function as ligand-binding sites. In the present study, a soluble recombinant extracellular domain 1-3 of VEGFR-2 (KDR) was expressed in *Pichia pastoris*. The 975bp DNA fragment containing extracellular 1st to 3rd domains, was designed according to the nucleotide sequence at GenBank and protein sequence at Swiss-Prot. The recombinant secretory expression vector (pPink α HC/KDR1-3) was constructed and transferred into yeast by electroporation. The high expression transformants were identified through complementation of adenine auxotrophy and cultured. KDR1-3 was expressed under the induction of 1% methanol and confirmed by using SDS-PAGE and western blot techniques. After being purified by affinity chromatography using Ni-NTA resins, binding of expressed product to hVEGF165 was proved by two direct ELISA and ELISA receptor binding assays. The results showed that human VEGFR-2 extracellular domain 1-3 with eukaryotic protein structure, that there is no reported paper about, has successfully expressed.

Keywords

Angiogenesis [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68043925>];

VEGF [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68042461>];

VEGF Receptor-2 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68040301>];

Pichia pastoris [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/2024330>]

* Corresponding Author

Tel: +98 (21) 82884759

Fax: +98 (21) 82884717

Post Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Ahmad Highway, Tehran, Iran.

Postal Code: 1411713116

sajedi_r@modares.ac.ir

Received: May 19, 2019

Accepted: November 24, 2019

ePublished: March 14, 2020

کلون سازی و بیان دومین خارج سلولی رسپتور-۲ VEGF انسانی در پیکیا پاستوریس و بررسی خواص اتصالی آن

زهرا فتحی MSc

گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

مسعود مشهدی اکبریوجار PhD

گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

احسان دهنوی PhD

گروه پژوهشی پیشگامان انتقال ژن، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

رضا حسن ساجدی PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

رگ‌زایی (آنژیوژنز) غیرطبیعی با بیماری‌های مختلف نظیر سرطان و متاستاز آن، رتیئوپاتی و آرتریت روماتوئید در ارتباط است. VEGF-A مهم‌ترین واسطه آنژیوژنز در میان تمام فاکتورهای رشد است. فعالیت زیستی VEGF توسط دو گیرنده تیروزین‌کینازی VEGFR-1 و VEGFR-2 سلول‌های اندوتلیال واسطه می‌شود. سیگنالینگ VEGF از طریق VEGFR-2 مسیر اصلی آنژیوژنز است که منجر به تحریک رشد سریع سلول‌های اندوتلیال به داخل تومور می‌شود. این رسپتور از یک بخش خارج سلولی، یک بخش سیتوپلاسمی و یک دومین ترانس‌ممبران تشکیل شده است. بخش خارج سلولی متشکل از هفت دومین شبه ایمونوگلوبولین (D1-D7) است که دومین‌های اول تا سوم به‌عنوان جایگاه اتصال لیگاند عمل می‌کنند. در مطالعه حاضر دومین‌های خارج سلولی ۱-۳ گیرنده (KDR1-3) به‌صورت نوترکیب در *Pichia pastoris* بیان شدند. یک قطعه DNA ۹۷۵ جفت بازی حاوی دومین‌های ۱-۳ براساس توالی نوکلئوتیدی در GenBank و توالی پروتئین در Swiss-Prot طراحی شد. وکتور بیانی ترشحی نوترکیب (pPinkαHC/KDR1-3) ساخته و به روش الکتروپوریشن به داخل مخمر منتقل شد. سلول‌های نوترکیب با بیان بالا از طریق تکمیل آگروتروفی آدنین شناسایی و کشت شدند. KDR1-3 تحت القا با متانول ۱٪ بیان و با SDS-PAGE و تکنیک وسترن بلات تایید شد. پس از تخلیص با کروماتوگرافی تمایلی با رزین Ni-NTA، اتصال محصول بیان شده به hVEGF165 با الیازی مستقیم و الیازی مبتنی بر گیرنده اثبات شد. نتایج نشان داد که دومین خارج سلولی ۱-۳ گیرنده-VEGFR-2 انسانی با ساختار پروتئین یوکاریوتی، که هیچ گزارشی در مورد آن وجود ندارد، با موفقیت بیان شده است.

کلیدواژه‌ها: رگ‌زایی، فاکتور رشد اندوتلیال رگی، گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال رگی-۲ (VEGFR-2)، پیکیا پاستوریس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۳

*نویسنده مسئول: sajedi_r@modares.ac.ir

مقدمه

آنژیوژنز، فرآیند تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق پیشین است که در حالات مختلف پاتولوژیک از قبیل رشد و متاستاز تومور و آرتریت روماتوئید نقش مهمی دارد[1]. ترشح فاکتورهای رگ‌زایی از

تومورهای توپر باعث ایجاد رگ‌های خونی جدید توسط سلول‌های اندوتلیال مجاور می‌شود که سلول‌های سرطانی را با اکسیژن و مواد مغذی تغذیه می‌کنند[2]. در نهایت این عروق به‌عنوان مسیری برای گسترش متاستاز استفاده خواهند شد[3]. بنابراین درمان ضدآنژیوژنیک یکی از درمان‌های موثر و کارآمد برای سرطان است[4]. موثرترین پروتئین آنژیوژنیک با عملکرد مستقیم و واسطه اصلی آنژیوژنز تومور فاکتور رشد اندوتلیال رگی A (VEGF-A) است که معمولاً با نام VEGF شناخته می‌شود[5]. VEGFA165 غالب‌ترین ایزوفرم پروآنژیوژنیک است که معمولاً در بسیاری از تومورهای توپر بیش از حد بیان می‌شود. VEGF165 ترشح و به گیرنده‌های تیروزین‌کینازی بیان شده توسط سلول‌های اندوتلیال فعال عروق خونی تازه‌شکل‌گرفته متصل می‌شود[6]. این گیرنده‌ها با عنوان VEGFR-2 که همچنین KDR (در انسان) و Flk-1 (در موش) نیز نامیده می‌شود و VEGFR-1 یا Flt-1 شناخته شده‌اند[7]. KDR برای تمایز و میتوز سلول‌های اندوتلیال ضروری است[8]، در حالی که Flt-1 برای تشکیل کانال‌های اندوتلیال عروقی مورد نیاز است[9]. گزارش شده است که VEGFR-2 به‌عنوان گیرنده اصلی سیگنالینگ VEGF/VEGFR در مسیر آنژیوژنز عمل می‌کند[10, 11]. VEGFR-2 به‌طور اختصاصی روی سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود و زنجیره کامل اثرات مرتبط با VEGF مانند تکثیر سلول‌های اندوتلیال، مهاجرت، تمایز، افزایش نفوذپذیری عروقی و بقای نئواسکوالر را واسطه می‌کند[12]. KDR عضوی از خانواده گیرنده‌های تیروزین‌کیناز نوع III و متشکل از ۱۳۵۶ اسید آمینه است که اولین بار در سال ۱۹۹۱ توسط *Truman* و همکاران ایزوله شد[13]. این گیرنده از یک بخش خارج سلولی، یک بخش سیتوپلاسمی با یک دومین تیروزین‌کیناز و یک ناحیه تراغشایی منفرد تشکیل شده است[14]. بخش خارج سلولی شامل ۷ دومین شبه ایمونوگلوبولین (D1-D7) است که دومین‌های ۱-۳ به‌عنوان نواحی اتصال لیگاند عمل می‌کنند و دومین‌های ۴-۷ برای دایمریزاسیون لیگاند- واسطه گیرنده نیاز هستند[15, 16]. چون KDR نقش عمده را در واسطه اثرات بیولوژیکی VEGF دارد و در سلول‌های اندوتلیال در حال تکثیر طی آنژیوژنز تومور بیش از حد بیان می‌شود، مهار ویژه سیگنالینگ سلولی از طریق سیستم VEGF/VEGFR گیرنده VEGF یک رویکرد عمده برای درمان سرطان است[17, 18]. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که یک فرم کوتاه‌شده و با میل ترکیبی بالای Flt-1 فعالیت VEGF را با یک مکانیزم منفی غالب مهار می‌کند. این مهارکننده با همجوشی نوترکیب سه دومین شبه ایمونوگلوبولین اول VEGFR-1 به ناحیه FC زنجیره سنگین IgG1 انسان تولید شد[19, 20]. با این حال این مهارکننده به‌دلیل خواص فارماکوکینتیک ضعیف و عوارض جانبی سمی یک کاندید محتمل دارویی در کلینیک نبود[21]. افلیبرسپت (Aflibercept) که با عنوان VEGF-Trap نیز شناخته می‌شود، یک گیرنده طعمه محلول موفق است که از قسمت‌های متصل‌شونده به VEGF مربوط به گیرنده hVEGFR ساخته شده است. پروتئین نوترکیب

(۱) حذف توالی نوکلئوتیدی مربوط به پپتید نشانه ۱۹ اسیدآمینه‌ای،
 (۲) افزودن جایگاه برش آنزیم KpnI به انتهای C و جایگاه برش
 آنزیم XhoI به انتهای N، (۳) افزودن توالی کدکننده دو اسیدآمینه
 آخر پپتید نشانه ترشحی وکتور pPink α -HC به ابتدای ژن -KDR1
 3 بعد از جایگاه برش XhoI، (۴) اضافه کردن توالی نوکلئوتیدی لینکر
 G4S به انتهای C توالی ژنی، (۵) افزودن توالی نوکلئوتیدی -6His
 tag به انتهای C و (۶) افزودن کدون پایان.
 این سازه ژنی توسط شرکت MWG (آلمان) با نرم‌افزار Gene
 Optimizer برای بیان در مخمر پیکیا پاستوریس بهینه و توسط
 شرکت Shine Gene (چین) ساخته و در پلاسمید pUC19 تحویل
 گرفته شد.

کلون‌سازی سازه نوترکیب در وکتور بیانی pPink α -HC

تمام مراحل کلون‌سازی ژن به غیر از موارد اشاره شده براساس مرجع
 کلونینگ مولکولی سمبروک انجام شد^[24]. وکتور -KDR1-3
 pUC19 با باکتری *E. coli* سویه DH5- α با روش شیمیایی منتقل
 شد. پس از غربالگری باکتری‌های دارای پلاسمید روی محیط LB
 حاوی آمپی‌سیلین، استخراج وکتور توسط کیت استخراج پلاسمید
 انجام شد. سپس سازه ژنی -KDR1-3 از طریق برش دوتایی با
 آنزیم‌های محدودکننده KpnI و XhoI از وکتور -KDR1-3
 pUC19 جداسازی شد. علی‌رغم دسترسی به وکتور بیانی
 pPink α -HC، به دلیل اطمینان از جایگاه‌های برشی پلاسمید
 pPink α -HC-SXA^[25] برای کلونینگ ژن -KDR1-3 از آن استفاده
 شد. برش دوتایی وکتور pPink α -HC-SXA با آنزیم‌های
 محدودکننده KpnI و XhoI انجام شد. برای الحاق سازه -KDR1-3
 به وکتور pPink α -HC ابتدا محصول هضم آنزیمی هر دوی آنها در
 ژل آگارز ۰/۵٪ الکتروفورز شد و باند -KDR1-3 با طول ۹۶۳ جفت باز
 و باند ۷۹۰ جفت باز مربوط به وکتور برش و خالص‌سازی شد. با
 توجه به این نکته که اندازه قطعه نوکلئوتیدی مورد نظر تقریباً
 یک‌هشتم اندازه وکتور است، فرآیند الحاق با استفاده از ۳۸ نانوگرم
 از قطعه DNA و ۲۱ نانوگرم پلاسمید با آنزیم DNA لیگاز T4 در
 حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. در وکتور نوترکیب ژن مورد نظر
 در پایین دست سیگنال ترشحی α -mating و تحت تاثیر پروموتور
 الکل‌اکسیداز (*AOX1*) قرار گرفت. سپس سلول‌های مستعد *E. coli*
 سویه DH5- α با وکتور نوترکیب -KDR1-3-pPink α -HC با روش
 شوک حرارتی نوترکیب و باکتری‌های ترانسفورم شده روی LB آگار
 حاوی آمپی‌سیلین غربالگری شدند. برای اطمینان از حضور سازه
 -KDR1-3 در کلنی‌های نوترکیب، ابتدا کلنی PCR در حجم نهایی
 ۱۵ میکرولیتر حاوی ۵/۰ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و
 برگشت عمومی وکتور با غلظت ۱۰ اپیکومول و ۳ میکرولیتر از مخلوط
 کلنی‌های حل شده در آب انجام شد. توالی پرایمر رفت به صورت -5'
 3'-ACTGCTGTTTTATTCGAGCATCC- و در مورد پرایمر
 برگشت به صورت 5'-
 3'-GGCGTGAATGTAAGCGTGACATAAC- بود. پرایمر رفت
 برای توالی سیگنال α -فاکتور و پرایمر برگشت برای منطقه اتمام

۱۱۵ کیلودالتونی فوق شامل دومین شبه ایمونوگلوبولین VEGFR1
 و سومین دومین شبه ایمونوگلوبولین VEGFR-2 است و به صورت
 فیوژن با دومین Fc IgG1 انسانی بیان می‌شود^[22]. دومین خارج
 سلولی نوترکیب ۱-۳ گیرنده KDR (KDR1-3) جدیدترین عضو از
 گیرنده‌های محلول VEGF با توانایی اتصال ویژه به VEGF است.
 این قطعه که قبلاً در *E. coli* بیان و تخلیص شد، در شرایط در
 محیط زنده فعالیت آنتی‌تومور دارد^[23]. در این مطالعه برای اولین بار
 بیان ترشحی KDR1-3 انسانی در سیستم *Pichia pastoris* انجام
 و آنالیز کیفی تمایل اتصال KDR1-3 به hVEGF165 با دو
 آزمون الایزای مستقیم و الایزای مبتنی بر گیرنده اثبات شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و سلول‌ها

از باکتری *E. coli* سویه DH5 α (Novagen؛ انگلستان) برای انجام
 مراحل کلونینگ استفاده شد. مخمر *PichiaPink*TM سویه ۴ و
 وکتور بیانی pPink α -HC (اینویترژن؛ ایالات متحده) خریداری
 شدند. آنتی‌بادی مونوکلونال علیه VEGF، آنتی‌بادی علیه
 ایمونوگلوبولین G انسانی کونژوگه به HRP و GAM-poly HRP
 از شرکت پیشتاز طب (ایران) و Anti His-HRP conjugate از
 شرکت Sigma (ایالات متحده) تهیه شدند. مستر میکس PCR از
 شرکت Ampliqon (دانمارک)، تمامی آنزیم‌های محدودکننده و
 DNA لیگاز T4 از شرکت فرمنتاز (ایالات متحده)، مارک‌های وزن
 مولکولی DNA و پروتئین از شرکت Thermo Scientific
 (لیتوانی)، آگارز از شرکت Invitrogen (ایالات متحده)، کیت‌های
 استخراج پلاسمید و شست‌وشوی DNA (Clean up) از
 شرکت Gene All (کره) و کیت استخراج DNA از ژل آگارز از شرکت
 ویوانتیس (مالزی) تهیه شدند. پرایمرهای مورد استفاده توسط
 شرکت ماکروژن (کره) سنتز شدند. BSA و IPTG از شرکت سیگما
 (ایالات متحده)، soy peptone، پپتون و تریپتون از شرکت
 Micromedia (مجارستان)، عصاره مخمر، D-گلوکز مونوهیدرات و
 لاکتوز از شرکت Bio Basic (کانادا)، پلیت 96 خانه‌ای الایزا از
 شرکت Nunc (ایالات متحده) و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک
 (آلمان) خریداری شدند. باکتری *E. coli* در محیط کشت LB در
 دمای ۳۷°C و سلول‌های پیکیا پاستوریس در محیط YPD حاوی
 پپتون، عصاره مخمر و D-گلوکز مونوهیدرات در ۳۰°C کشت داده
 شدند. برای رشد مخمر و بیان پروتئین نوترکیب به ترتیب از
 محیط‌های BMMY و BMGY استفاده شد. محیط کشت انتخابی
 PAD (محیط فاقد آدنین) نیز خریداری شد (Teknova؛ ایالات
 متحده).

طراحی و سنتز سازه نوترکیب KDR1-3

توالی نوکلئوتیدی دومین‌های خارج سلولی ۱-۳ گیرنده KDR شامل
 نوکلئوتیدهای ۱-۹۷۸ از پایگاه‌های اطلاعاتی GenBank
 (GI2655411) و Swiss-Prot (P35968) انتخاب شد و
 تغییرات زیر روی آن اعمال شد:

سانتریفیوژ (با دور ۱۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴°C) به دست آمد. پروتئین‌های سوپ رویی با استفاده از رسوب با آمونیوم سولفات ۸۵% به میزان ۱۰ برابر غلیظ شدند. رسوب در ۵/۵ میلی‌لیتر بافر تریس-سالین با pH برابر ۷/۶ حل شد و به منظور کم کردن میزان نمک آمونیوم سولفات با استفاده از همان بافر دیالیز شد. پس از اتمام دیالیز غلظت پروتئین با روش برادفورد با استفاده از استاندارد BSA به دست آمد و صحت حضور پروتئین نوترکیب با SDS-PAGE ۱۲/۵% و وسترن بلاتینگ با آنتی‌بادی مونوکلنال anti His-tag (۴۰۰۰ بار رقیق شده) تایید شد.

تخلیص پروتئین نوترکیب

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون نیکل-آگارز (Qiagen؛ آلمان) انجام شد. نمونه پروتئینی روی ستونی که قبلاً توسط بافر شست‌وشو (pH=۸، ۵۰ میلی‌مولار NaH₂PO₄+۳۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید+۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول) به تعادل رسیده بود برده شد و پس از شست‌وشو با همان بافر، برای جداسازی پروتئین نوترکیب متصل به ستون، از بافر جداکننده (pH=۸، ۵۰ میلی‌مولار NaH₂PO₄+۳۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید+۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول) استفاده شد. با توجه به حساسیت پروتئین به دما، تمامی مراحل تخلیص در Cold room انجام شد و نمونه‌های خروجی از ستون دارای ۱۰% گلیسرول در حجم نهایی بودند. سپس تخلیص پروتئین ۵۰ کیلودالتون KDR1-3 نوترکیب از طریق SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ مورد تایید قرار گرفت.

بررسی اتصال گیرنده نوترکیب به hVEGF165 با تکنیک الایزای

مستقیم

میزان اتصال گیرنده نوترکیب تخلیص شده به لیگاند hVEGF165 با انجام تست الایزای مستقیم بررسی شد. در ۳ تکرار چاهک‌ها با ۵۰ نانوگرم hVEGF165 (سیگما؛ ایالات متحده) با وزن مولکولی ۴۵ کیلودالتون پوشیده و ۱۶ ساعت در ۴°C انکوبه شدند. از پروتئین BSA به عنوان کنترل منفی استفاده شد. مرحله شست‌وشو و خشک کردن بعد از هر مرحله تست الایزا تکرار شد. محل‌های خالی از گیرنده در کف چاهک‌ها بلوکه و ۱۰۰ میکرولیتر از گیرنده نوترکیب تخلیص شده با جذب ۰/۲ به هر چاهک اضافه شد. بعد از شست‌وشوی چاهک‌ها، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی anti His-tag-HRP conjugate با رقت ۱:۸۰۰۰ اضافه شد. پس از افزودن سوبسترای TMB و توقف واکنش با هیدروکلریک اسید، میزان جذب در ۴۵۰ نانومتر بررسی شد.

بررسی اتصال گیرنده نوترکیب به دومین متصل‌شونده به گیرنده

hVEGF165 با تکنیک الایزای غیرمستقیم

اتصال گیرنده نوترکیب تخلیص شده به دومین متصل‌شونده به گیرنده hVEGF165 که صحت عملکرد آن از قبل اثبات شده بود [27]، با انجام تست الایزای غیرمستقیم بررسی شد. روند این آزمون مشابه الایزای مستقیم است، با این تفاوت که در این آزمون ۱۰۰ میکرولیتر از گیرنده نوترکیب تخلیص شده با جذب نوری ۰/۲ در

رونیسی CYC1 طراحی شده است [25]. برنامه دمایی کلنی PCR به صورت دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴°C برای ۷ دقیقه، ۳۰ سیکل دمایی شامل دناتوراسیون در ۹۴°C برای ۴۵ ثانیه، اتصال در ۵۹°C برای یک دقیقه، طولی شدن رشته الگو در دمای ۷۲°C برای ۴۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲°C برای ۱۰ دقیقه تنظیم شد. سپس تست تاییدی به روش هضم آنزیمی با دو آنزیم XhoI و KpnI روی دو نمونه از وکتورهای نوترکیب استخراج شده انجام شد و در نهایت این وکتورها برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. واکنش توالی‌یابی DNA با پرایمرهای رفت و برگشت عمومی وکتور، با استفاده از کیت توالی‌یابی BigDye v3.1 (Applied Biosystems؛ ایالات متحده) و توسط دستگاه 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems؛ ایالات متحده) با روش سانگر انجام شد.

انتقال وکتور pPinkα-HC-KDR1-3 به مخمر پیکیا پاستوریس

و غربالگری

برای انتقال وکتور pPinkα-HC-KDR1-3 به درون مخمر پیکیا پاستوریس، این وکتور با آنزیم محدودکننده SpeI خطی شد تا طی فرآیند انتقال به مخمر بتواند فرآیند نوترکیبی همولوگ را با ناحیه TRP2 پیکیا انجام دهد. سپس برای جلوگیری از جرقه‌زنی حین الکتروپوریشن، پلاسمید خطی شده با کیت Clean up-PCR خالص و یون زدایی شد. ترانسفورماسیون میکروگرم وکتور خطی شده pPinkα-HC-KDR1-3 به ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد مخمر با روش الکتروپوریشن و با استفاده از پروتکل شرکت اینویترژن با الکتروپوریتور (Bio-Rad؛ ایالات متحده؛ V: ۱۸۰۰۷، R: ۲۰۰Ω، C: ۲۵μF) انجام شد. در نهایت سلول‌های تراریخت شده روی پلیت انتخابی PAD غربالگری شدند. رشد کلنی‌ها روی محیط انتخابی PAD نشان‌دهنده وجود سازه KDR1-3 درون ژنوم مخمر است که برای تایید این امر از کلنی PCR با ۱۰۰-۵۰ نانوگرم ژنوم مخمر و پرایمرهای عمومی وکتور استفاده شد. شرایط واکنش PCR به صورت ۳ دقیقه بادمای ۹۵°C، ۳۰ سیکل با شرایط ۴۵ ثانیه ۹۳°C، ۳۰ ثانیه با دمای ۵۹°C، ۱ دقیقه با دمای ۷۲°C و در نهایت یک سیکل ۱۰ دقیقه و دمای ۷۲°C تنظیم شد.

بیان گیرنده نوترکیب و جداسازی آن

بیان پروتئین نوترکیب براساس روش ارایه شده در پروتکل شرکت اینویترژن انجام شد [26]. بر همین اساس از کلنی‌های نوترکیب کشت شده روی محیط YPD آگار برای تلقیح ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط BMGY درون ارلن یک‌لیتری استفاده شد. در این مطالعه سلول مخمری غیرنوترکیب به عنوان کنترل منفی انتخاب شد. در محیط BMGY در دمای ۳۰°C و سرعت ۲۵۰ دور بر دقیقه سلول‌های مخمر مراحل رشد را سپری می‌کنند. ۲۴-۴۸ ساعت بعد، کلنی‌ها برای شروع فاز بیانی به ۲۰ میلی‌لیتر محیط BMMY در دمای ۲۸°C و سرعت ۲۵۰ دور بر دقیقه منتقل شدند. پس از گذشت یک شب کلنی‌ها به مدت ۵ روز هر ۲۴ ساعت یک‌بار با متانول ۱% القا شدند. پس از پایان مرحله بیان، سوپ رویی دارای گیرنده نوترکیب با

می‌شود. برای اینکه سازه ژنی به درون پلاسمید منتقل شود بایستی هر دو برش داده شوند. بر همین اساس در انتهای کربوکسیلی سازه، توالی جایگاه برشی آنزیم KpnI طراحی شد و آنزیم برشی در نقطه مقابل در پلاسمید، جایگاه آنزیم XhoI انتخاب شد. در صورتی که برش در این ناحیه صورت گیرد دو اسید آمینه آخر سیگنال ترشحی سنتز نمی‌شوند، بنابراین توالی کدکننده این دو اسید آمینه به ابتدای سازه ژنی بعد از جایگاه برشی XhoI اضافه شد. برای تخلیص پروتئین نوترکیب موتیف His-tag به انتهای C سازه ژنی اضافه شد. سپس لینکر G4S بین توالی ژن و موتیف His-tag قرار گرفت. لینکرها توالی‌های پپتیدی کوتاهی هستند که بین دومین‌های پروتئینی واقع می‌شوند. این توالی‌ها اغلب از آمینواسیدهای انعطاف‌پذیر مثل گلیسین و سرین تشکیل شده‌اند، به طوری که دومین‌های پروتئینی مجاور برای حرکت نسبت به یکدیگر آزاد هستند. برای جلوگیری از تداخل فضایی دو دومین مجاور با یکدیگر از لینکرهای بلندتر استفاده می‌شود^[36]. در نهایت کدون خاتمه TAA به انتهای سازه ژنی اضافه شد (شکل ۱).



```
TGATCAGCATGGTGTGGTCTACATTACAGAGAACAAGAACAAAAGTGTAGTCAT
ACCTTGTCTAGGTTCCATTTGCAATTTGAACGTTTCATTATGTGCTCGTTATCCTG
AAAAGAGATTGTTCCCGGATGGAAATCGTATATCTTGGGACTCCAAGAAAGGCT
TCACAATTCATCTACATGATCTCCTATGCTGGAATGGTGTGTTGTTGAGGCCAA
GATCAATGATGAAAGCTACCAATCGATTATGACATAGTCGTGGTTGTTGGCTAC
AGGATCTATGATGTCGTTTTATCTCCTTCACATGGCATAGAGTTGCCGTTGGAG
AAAAGTTGGTGTGAAATGCACTGCTCGAACCGAACTTAACGTTGGAATTGACTT
CAATTTGGGAATATCCAAGCTCGAAACCAACAAGAAGAACTGGTAAACAGGG
ATCTTAAACCCAAAGTGGTAGTGAGATGAAGAAGTCTTGTCTACGTTGACTA
TTGATGGTGTCAACAGATCAGACCAAGGCTTTACACATGTGCGACGTTCAAGTG
GACTGATGACTAAGAAGAACAGTACGTTGTTAGAGTGCATGAA
```

شکل ۱) تصویر سازه ژنی KDR1-3 و توالی نوکلئیدی آن

ساب کلونینگ سازه KDR1-3 در وکتور بیانی pPink-α-HC

برای تکثیر وکتور KDR1-3-pUC19، این وکتور با روش شیمیایی به داخل باکتری *E. coli* سویه DH5α انتقال یافت. چون وکتور pUC19 دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است بنابراین به کمک محیط کشت LB آگار حاوی این آنتی‌بیوتیک باکتری‌های نوترکیب غربالگری و وکتور با روش لیز قلیایی استخراج شد. وکتور KDR1-3-pUC19 با آنزیم‌های محدودکننده KpnI و XhoI برش داده شدند و ژن KDR1-3 جداسازی شد (شکل ۲-الف). برای کلونینگ سازه ژنی KDR1-3 از وکتور pPink-αHC-SXA استفاده شد. این وکتور با آنزیم‌های KpnI و XhoI برش یافت (شکل ۲-ب). سپس سازه ژنی KDR1-3 با طول ۹۲۱ جفت باز و وکتور خطی شده pPink-αHC با طول ۷۹۰۰ جفت باز با روش استخراج از ژل از قطعات دیگر جدا شدند و فرآیند الحاق بین ژن و وکتور با نسبت مولی (سازه ژنی) ۴/۸: (وکتور) ۳/۲ انجام شد (شکل ۲-ج). کلونینگ سازه ژنی KDR1-3 در وکتور pPink-αHC توسط کلنی‌PCR با پرایمرهای عمومی وکتور تایید شد (شکل ۲-د). برای تایید بیشتر برش دوتایی پلاسمید KDR1-3-pPink-αHC با دو آنزیم KpnI و XhoI انجام شد و باند قطعه کدکننده KDR1-3

هر چاهک کوت شد و ۱۶ ساعت در ۴°C انکوبه شد. پس از بلوک کردن محل‌های خالی از گیرنده، ۱۰۰ میکرولیتر پروتئین همودایمر دومین اتصال‌شونده به گیرنده hVEGF165 با غلظت ۵/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از شست‌وشو، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی Avastin با رقت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و ۹۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. سپس رقت ۱:۸۰۰۰ از آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به HRP علیه ایمونوگلوبولین G تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. در نهایت افزودن سوبسترا، توقف واکنش و ردیابی سیگنال انجام شد.

یافته‌ها و بحث

چند دلیل وجود دارد که ثابت می‌کند پیکیا پاستوریس گزینه مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی است^[28]. مهمترین دلیل این است که این مخمر علاوه بر اینکه مانند باکتری‌ها به خوبی رشد می‌کند و به آسانی دستکاری می‌شود، این برتری را نسبت به آنها دارد که می‌تواند بسیاری از اصلاحات پس از ترجمه مشابه انسان از جمله تاخوردگی مناسب، تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی و گلیکوزیلاسیون را انجام دهد و پروتئین‌های نوترکیب به صورت محلول هستند^[29]. در حالی که باکتری‌ها نمی‌توانند چنین پردازش‌هایی را انجام دهند و بسیاری از پروتئین‌های یوکاریوتی تولید شده در آنها تاخوردگی‌های ساختاری نادرست دارند و نامحلول یا غیرفعال هستند^[30]. گلیکوزیلاسیون تاثیر قابل توجهی بر خصوصیات فیزیکی و عملکردی پروتئین‌های نوترکیب دارد و یکی از مهمترین ویژگی‌های کیفی تعیین‌کننده برای کارایی مطلوب و ایمنی بیوداروها است^[31]. مخمر متیلوتروف پیکیا پاستوریس الگوی گلیکوزیلاسیون مشابه الگوی به‌دست‌آمده در ارگانیزم‌های بالاتر را دارد^[32]. با توجه به اینکه KDR1-3 دارای ۳ پیوند دی‌سولفیدی و ۷ جایگاه N- گلیکوزیلاسیون است^[33]، بنابراین انتظار می‌رود پروتئین نوترکیب تولید شده در پیکیا پاستوریس به دلیل داشتن مسیر اصلاحات پس از ترجمه مشابه سلول‌های انسانی عملکرد بالاتری نسبت به نسخه قبلی گیرنده تولید شده در باکتری داشته باشد^[34].

طراحی و سنتز سازه نوترکیب KDR1-3

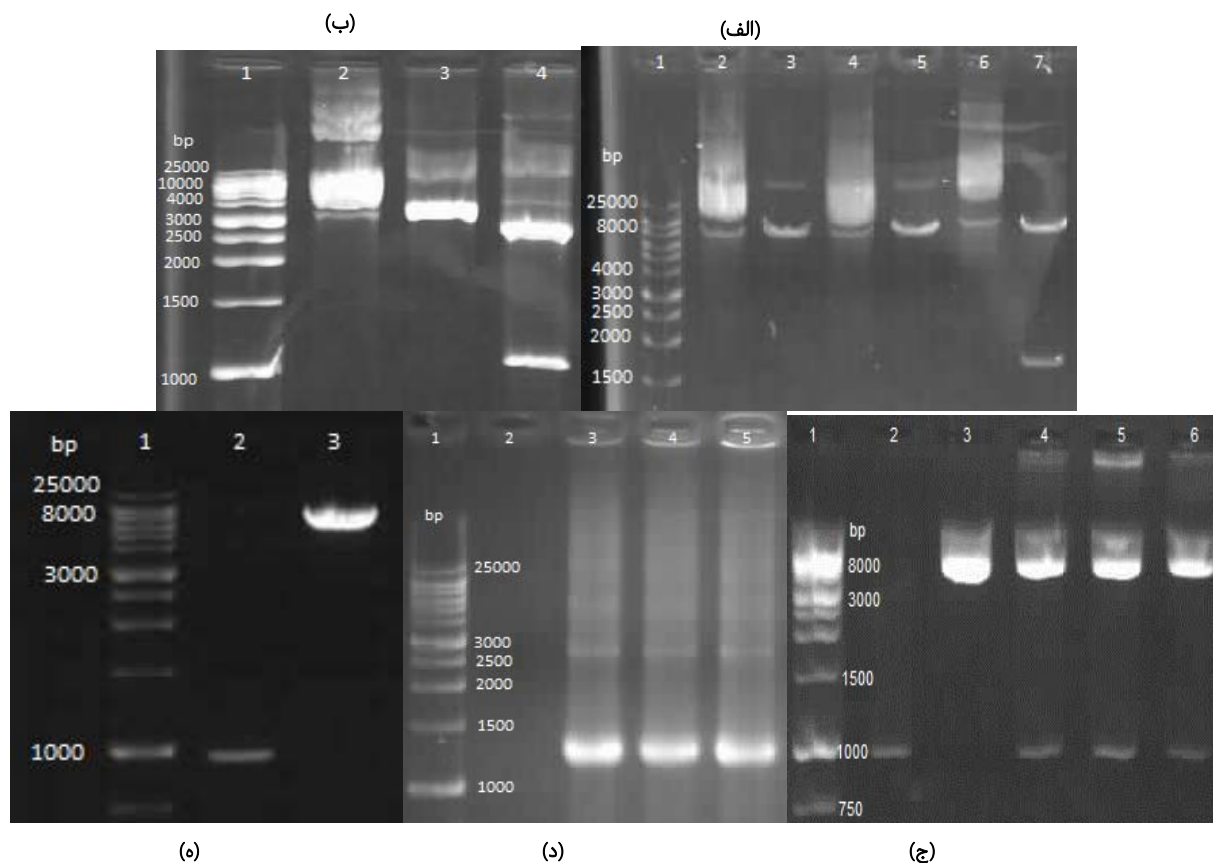
به منظور ایجاد یک استراتژی درمانی ضد VEGF/VEGFR، دومین‌های اتصال به لیگاند گیرنده KDR (توالی کدکننده اسید آمینه‌های ۳۲۶-۲۰) انتخاب شد. اسید آمینه‌های ۱۹-۱۰ گیرنده KDR مربوط به پپتید نشانه هستند. چون توالی نشانه نقش توپولوژیک ندارد بنابراین در طراحی ژن این توالی حذف شد. برای بیان از وکتور pPink-αHC استفاده شد که در آن ژن تحت پروموتور القایی AOX1 قرار می‌گیرد^[35]. در این وکتور از سیگنال ترشحی α-mating factor مربوط به مخمر *Saccharomyces cerevisiae* در بالادست ژن نوترکیب استفاده شده است و پروتئین نوترکیب پس از بیان شدن توسط این سیگنال به محیط کشت ترشح

الکتروفورس شد (شکل ۳- الف). توالی DNA موجود در انتهای وکتور خطی شده ورود DNA نوترکیب را به جایگاه ژنومی مخمر تحریک می‌کند [37]. در وکتور بیانی pPink α -HC از ژن آدنین سنتاز به عنوان نشانگر انتخابی استفاده شده است. این ژن از داخل ژنوم سویه مخمری استفاده شده (PichiaPink™) حذف می‌شود و مخمر نسبت به آدنین اگزوتروف است [35]. محیط انتخابی PAD فاقد آدنین است و کلنی‌هایی می‌توانند روی این محیط رشد کنند که وکتور نوترکیب را دریافت کرده باشند. برای انتقال وکتور نوترکیب خطی به مخمر از الکتروپوریشن استفاده شد. ظهور کلنی‌های تراریخت پس از ۴ تا ۷ روز روی محیط PAD تاییدکننده ورود توالی وکتور به درون ژنوم مخمر است (شکل ۳- ب). برای تایید حضور ژن *KDR1-3* در داخل ژنوم مخمرهای تراریخت از تست PCR استفاده شد (شکل ۳- ج).

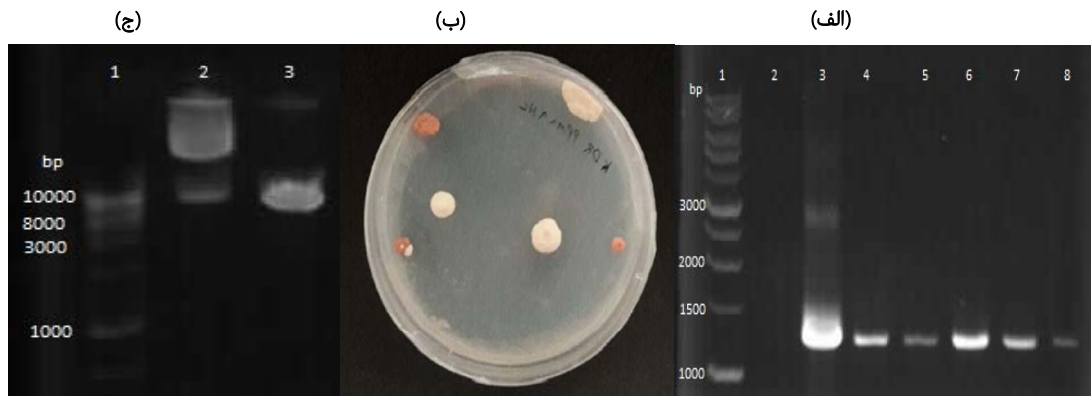
وکتور خطی روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شدند (شکل ۲- ه). همچنین وکتور برای تعیین توالی با پرایمرهای عمومی وکتور به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی درج قطعه کدکننده *KDR1-3* در وکتور به شکل صحیح را تایید کرد.

انتقال وکتور pPink α -HC-KDR1-3 به مخمر

وکتورهایی که برای الحاق به داخل ژنوم پیکیا پاستوریس طراحی شده‌اند قادر به بیان پایدار هستند، ولی کارایی ترانسفورماسیون آنها بسیار پایین است. زیرا برخلاف سایر مخمرها، پیکیا پاستوریس نمی‌تواند پلاسمید خارج کروموزومی داشته باشد و وکتور بایستی از طریق نوترکیبی همولوگوس به داخل لوکوس‌های مخصوص در کروموزوم میزبان الحاق شود. برای انتقال وکتور نوترکیب pPink α -HC-KDR1-3 به درون مخمر، وکتور با آنزیم *SpeI* از ناحیه TRP2 خطی شد. محصول هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱٪



شکل ۲ مراحل ساب‌کلونینگ سازه *KDR1-3* در وکتور بیانی pPink α -HC: الف) وکتور pUC19-KDR1-3 استخراج شده از باکتری و محصولات هضم آنزیمی وکتور (۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- و ۳- وکتور pUC19-KDR1-3 حلقوی و ۴- وکتور pUC19-KDR1-3 برش‌یافته با دو آنزیم *XhoI* و *KpnI*)؛ ب) هضم آنزیمی وکتور pPink α -HC و pPink α -HC-SXA با آنزیم‌های *KpnI* و *XhoI* (۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- وکتور pPink α -HC حلقوی (کلنی ۱)، ۳- وکتور pPink α -HC (کلنی ۱) برش‌یافته با آنزیم‌های *KpnI* و *XhoI* با طول ۷۹۰۰ جفت باز، ۴- وکتور pPink α -HC (کلنی ۲) حلقوی، ۵- وکتور pPink α -HC (کلنی ۲) برش‌یافته با آنزیم‌های *KpnI* و *XhoI* با طول ۷۹۰۰ جفت باز، ۶- وکتور pPink α -HC-SXA حلقوی، ۷- وکتور pPink α -HC-SXA برش‌یافته با آنزیم‌های *KpnI* و *XhoI* (ژن *SXA* با طول ۱۶۰۰ جفت باز و وکتور خطی با طول ۷۹۰۰ جفت باز)؛ ج) محصول ریکاوری وکتور pPink α -HC و سازه ژنی *KDR1-3* برای لیگاسیون (۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- سازه ژنی *KDR1-3* بریده‌شده با آنزیم‌های *KpnI* و *XhoI* پس از ایزولاسیون، ۳- وکتور pPink α -HC بریده‌شده با آنزیم‌های *KpnI* و *XhoI* پس از جداسازی)؛ د) محصول کلنی‌PCR وکتور pPink α -HC-KDR1-3 روی چندین کلنی (۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- کنترل منفی (نمونه بدون باکتری نوترکیب)، ۳- سازه ژنی *KDR1-3* حاصل از کلنی‌های ۱ تا ۳)؛ ه) هضم آنزیمی تاییدی پلاسمید نوترکیب pPink α -HC-KDR1-3 (۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- سازه خطی *KDR1-3* به عنوان کنترل، ۳- وکتور خطی pPink α -HC به عنوان کنترل، ۴- هضم دوتایی وکتور نوترکیب کلنی‌های ۱ تا ۳)



شکل ۳ مراحل انتقال وکتور pPink α -HC-KDR1-3 به مخمر؛ الف) تصویر وکتور pPink α -HC-KDR1-3 خطی شده با آنزیم محدودکننده SpeI (۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- وکتور pPink α -HC-KDR1-3 استخراج شده حلقوی به عنوان کنترل، ۳- وکتور pPink α -HC-KDR1-3 خطی شده با آنزیم SpeI)؛ ب) مشاهده کلنی‌های نوترکیب مخمری حاوی سازه ژنی KDR1-3 روی محیط انتخابی PAD؛ ج) تایید حضور وکتور نوترکیب pPink α -HC-KDR1-3 در داخل مخمر با روش PCR (۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- کنترل منفی، ۳- کنترل مثبت (پلاسمید pPink α -HC-KDR1-3) و ۴-۸ کلنی‌های مخمری نوترکیب)

بیان پروتئین نوترکیب در مخمر

از میان کلنی‌های نوترکیب، کلنی‌های سفیدرنگ چندین نسخه وکتور نوترکیب دریافت کرده‌اند و بنابراین پروتئین نوترکیب را بیان می‌کنند، ولی کلنی‌های صورتی‌رنگ چون تنها یک نسخه وکتور نوترکیب دریافت کرده‌اند دچار استرس آندین هستند و برای بیان استفاده نمی‌شوند^[38]. در وکتور بیانی pPink α -HC از پروموتور قوی و القایی ژن *AOX1* (الکل اکسیداز) برای بیان پروتئین نوترکیب استفاده شده است. این پروموتور در حضور گلوکز مهار و با متانول القا می‌شود. برای بیان پروتئین نوترکیب، ابتدا مخمرها به محیط *BMGY* منتقل شدند. این محیط که برای رشد سلول‌ها از آن استفاده می‌شود حاوی گلیسرول است که به گلوکز تبدیل می‌شود. در محیط *BMGY* پروموتور *AOX1* خاموش است^[39, 40] و سلول‌ها بدون بیان ژن مورد نظر به رشد خود ادامه می‌دهند تا به رشد قابل قبول برسند^[35]. در فاز بیان سلول‌هایی که در محیط *BMGY* رشد کرده‌اند را رسوب داده شدند و به محیط *BMMY* انتقال یافتند. سپس پروموتور *AOX1* به مدت ۵ روز هر ۲۴ ساعت یک‌بار با متانول ۱٪ القا شد. پس از پایان دوره بیان خارج سلولی، حضور پروتئین نوترکیب بیان شده با آنالیز SDS-PAGE (شکل‌های ۴- الف و ۴- ب) و وسترن بلات (شکل ۴- ج) بررسی و تایید شد. برای تایید صحت انجام SDS-PAGE از یک پروتئین با وزن مولکولی ۴۵ کیلودالتون به عنوان کنترل مثبت آزمایش استفاده شد. چون غلظت متانول به طور مستقیم بر تولید پروتئین نوترکیب اثر دارد، میزان بیان *rKDR1-3* در القا با متانول ۵٪ نسبت به متانول ۱٪ کاهش یافت. همچنین تصویر وسترن بلات پروتئین تخلیص نشده نشان می‌دهد که به دلیل درجات مختلف گلیکوزیلاسیون، پروتئین نوترکیب دارای چندین باند است. در سیستم بیانی پیکیا پاستوریس علاوه بر پروتئین نوترکیب محلول، پروتئین‌های طبیعی سلول نیز به محیط کشت ترشح می‌شوند^[41]. در این مطالعه اگرچه بیان پروتئین نوترکیب *KDR1-3* توسط مخمرهای نوترکیب با آنالیز وسترن بلات تایید شد ولی به دلیل شرایط استرس اکسیژن در محیط

کشت بیانی، پروتئین‌های طبیعی سلول در سطح بالایی بیان و ترشح شده است، به طوری که در تصویر SDS-PAGE، باندهای پروتئینی مشترک بسیاری در نمونه مخمرهای نوترکیب و کنترل منفی مشاهده می‌شوند و باندهای پروتئین نوترکیب و پروتئین‌های طبیعی روی هم قرار گرفته‌اند و از این رو بهینه‌سازی بیان پروتئین نوترکیب *KDR1-3* توسط پیکیا پاستوریس در حال بررسی است که با توجه به نتایج مطالعات مشابه انتظار می‌رود بهینه‌سازی موجب تولید پروتئین‌های نوترکیب با وزن مولکولی و الگوی گلیکوزیلاسیون یکسان شود و پروتئین‌های طبیعی سلول به طور ناچیزی بیان شوند^[25].

تخلیص پروتئین نوترکیب

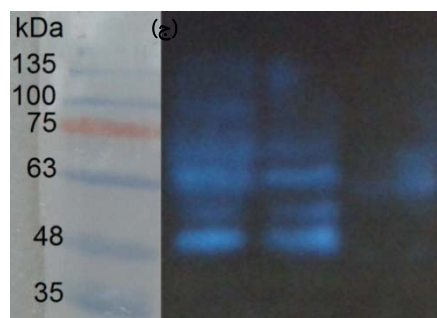
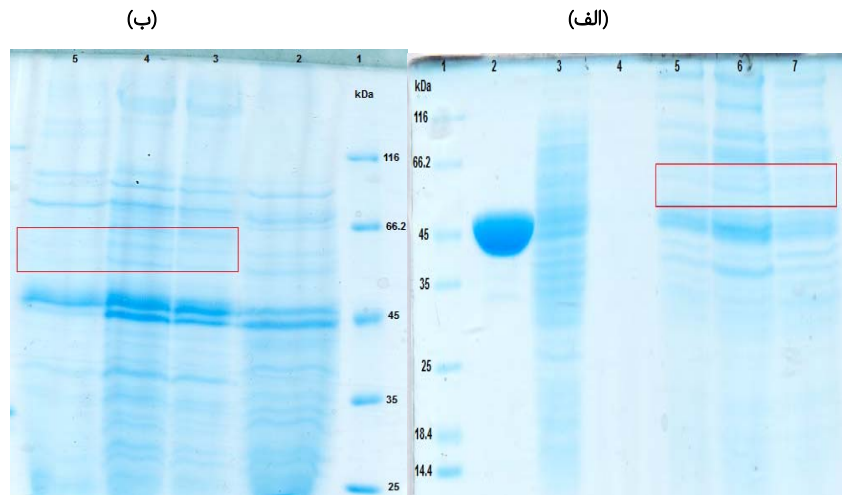
سویه مخمری مورد استفاده در این مطالعه به گونه‌ای مهندسی شده است که پروتئین نوترکیب را به صورت محلول و خارج سلولی به محیط کشت ترشح می‌کند. به همین دلیل تخلیص پروتئین آسان‌تر می‌شود. ژن *KDR1-3* در انتهای کربوکسیلی دارای دنباله هیستیدینی است، بنابراین برای تخلیص پروتئین نوترکیب از کروماتوگرافی تمایلی با ستون نیکل- آگارز استفاده شد. پس از تعیین جذب نوری پروتئین تخلیص شده در ۲۸۰ نانومتر، کیفیت پروتئین با استفاده از SDS-PAGE ۱۲/۵٪ در حالت احیایی (حضور بتا- مرکاپتواتانل) و وسترن بلاتینگ با آنتی‌بادی ضد پلی‌هیستیدینی بررسی شد. نتایج بیانگر پروتئینی با وزن مولکولی در محدوده ۶۰-۵۵ کیلودالتون با احتساب تغییرات پس از ترجمه، His-tag و لینکر *G4S* است (شکل‌های ۵- الف و ۵- ب). در مقایسه با پروتئین تولید شده در پیکیا پاستوریس، پروتئین *KDR1-3* تولید شده در باکتری در آنالیزهای SDS-PAGE و وسترن بلات وزن مولکولی ۳۳ کیلودالتون را نشان داد^[23].

اتصال گیرنده نوترکیب تخلیص شده به hVEGF165 با تکنیک الیزای مستقیم

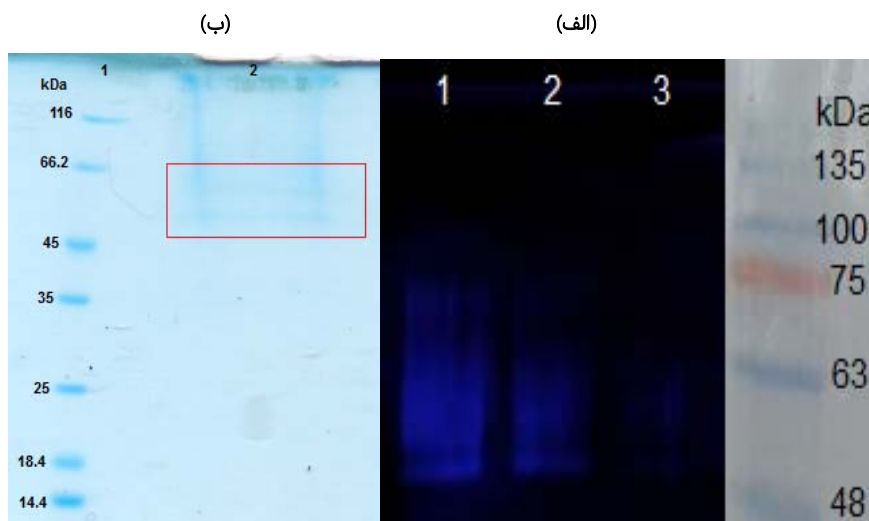
در این تست اتصال اختصاصی گیرنده *rKDR1-3* به hVEGF165 بررسی شد. hVEGF165 همودایمر دارای دو ناحیه اتصال به

یک آزمون الیزا مشابه که با مقادیر ۳/۹-۶۲/۵ نانومولار گیرنده KDR1-3 تولیدشده در باکتری و ۱۰۰۰ نانومولار hVEGF انجام شد حداکثر میزان جذب متوسط ۰/۲ بود که نشان می‌دهد گیرنده تولیدشده در مخمر کارایی بالاتری دارد [23].

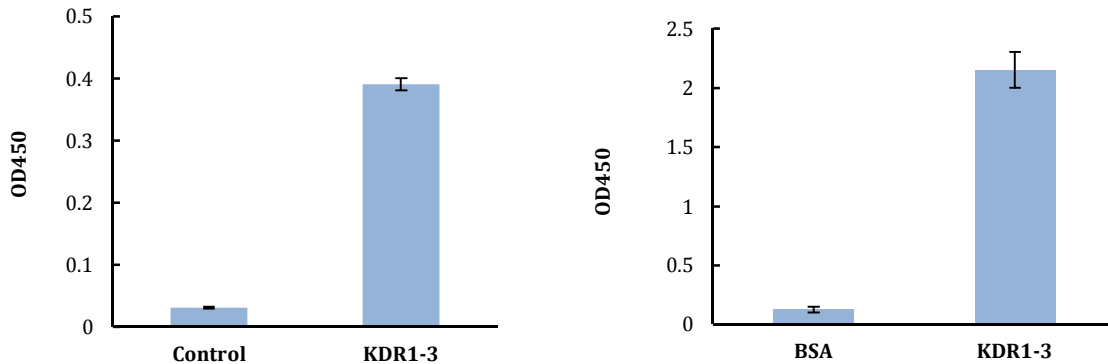
گیرنده و هر ناحیه قادر به اتصال به یک گیرنده rKDR1-3 است. نتایج در نمودار ۱- الف ارایه شده است. سیگنال‌های جذبی مربوط به نمونه تا ۱۰ برابر جذب کنترل بیشتر است که بیانگر موفق بودن اتصال لیگاند به گیرنده و حفظ فعالیت پروتئین حین تخلیص است. در شرایط این تست میزان جذب متوسط ۰/۳۹ بود، در حالی که در



شکل ۴) بررسی بیان پروتئین نوترکیب در مخمر؛ الف) نتایج بیان گیرنده KDR1-3 با متانول ۱٪ روی ژل SDS-PAGE (۱- مارکر پروتئینی، ۲- کلنی غیرنوترکیب، ۳-۵- کلنی‌های نوترکیب سفیدرنگ ۱، ۳ و ۴)؛ ب) نتایج بیان گیرنده KDR1-3 با متانول ۵٪ روی ژل SDS-PAGE (۱- مارکر پروتئینی، ۲- کنترل مثبت (یک پروتئین با وزن مولکولی ۴۵ کیلودالتون)، ۳- کنترل منفی (بیان کلنی غیرنوترکیب)، ۴- کلنی ۱ قبل از القا، ۵-۷- کلنی‌های ۱، ۳ و ۴ نوترکیب)؛ ج) تصویر وسترن بلات مربوط به گیرنده تخلیص‌نشده کلنی‌های نوترکیب ۱، ۳ و ۴



شکل ۵) بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب؛ الف) نتیجه ژل پلی‌اکریل‌آمید گیرنده KDR1-3 پس از تخلیص (۱- مارکر پروتئینی، ۲- گیرنده خالص)؛ ب) نتیجه وسترن بلاتینگ گیرنده rKDR1-3 پس از تخلیص (۱-۳- پروتئین‌های تخلیص‌شده کلنی‌های ۱، ۳ و ۴ نوترکیب)



نمودار ۱ الف) نمودار میانگین جذب نوری اتصال hVEGF165 به رسپتور نوترکیب تخلیص شده در آزمون الایزای مستقیم؛ ب) نمودار میانگین جذب نوری اتصال دومین متصل‌شونده به گیرنده hVEGF165 به رسپتور نوترکیب تخلیص شده در آزمون الایزای مبتنی بر گیرنده؛ در هر دو آزمون مقادیر انحراف معیار به‌عنوان خطا در نظر گرفته شده است.

مشهدی اکبربوجار (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ احسان دهنوی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ رضا حسن‌ساجدی (نویسنده چهارم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناسی/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد و با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه خوارزمی انجام شده است.

منابع

- 1- Folkman J. Tumor angiogenesis: The rapetic implications. *New Engl J Med.* 1971;285(21):1182-6.
- 2- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18(1):4-25.
- 3- Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1994;269(43):26988-95.
- 4- Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001;7(5):575-83.
- 5- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6(4):389-95.
- 6- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-76.
- 7- Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol.* 2001;106(4):148-56.
- 8- Von Tiedemann B, Bilitewski U. Characterization of the vascular endothelial growth factor-receptor interaction and determination of the recombinant protein by an optical receptor sensor. *Biosens Bioelectron.* 2002;17(11-12):983-91.
- 9- Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZZ binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proced Natl Acad Sci.* 1999;96(6):3071-6.
- 10- Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2006;39(5):469-78.
- 11- Kanno Sh, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K, et al. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene.* 2000;19(17):2138-46.

بررسی اتصال گیرنده نوترکیب تخلیص شده به دومین متصل‌شونده به گیرنده hVEGF165 با تکنیک الایزای غیرمستقیم

اتصال اختصاصی دومین اتصال به گیرنده hVEGF165 به rKDR1-3 با روش ساندویچ الایزا نیز بررسی شد. ابتدا گیرنده تخلیص شده در کف پلیت کوت شد. سپس لیگاند از طریق یک جایگاه اتصال به گیرنده و از طریق جایگاه اتصال دومی به آنتی‌بادی Avastin متصل شد. در انتها آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به HRP علیه ایمونوگلوبولین G اضافه شد. نتایج در نمودار ۱- ب ارائه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود سیگنال‌های جذبی مربوط به نمونه تا ۱۰ برابر بیشتر از میزان جذب نمونه کنترل است که اتصال لیگاند به گیرنده را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی در مطالعه حاضر، روشی برای تولید دومین‌های متصل‌شونده به لیگاند گیرنده KDR به شکل محلول با هدف توسعه یک گیرنده محلول علیه رگ‌زایی ایجاد شد. پس از طراحی و بهینه‌سازی سازه نوترکیب، قطعه نوترکیب در سیستم بیانی پیکیا پاستوریس بیان و صحت تولید آن با SDS-PAGE و وسترن‌بلاتینگ تایید شد. در نهایت اتصال VEGF انسان به این گیرنده نوترکیب با آزمون‌های الایزا اثبات شد. در آینده آزمایش‌های در شیشه و در محیط زنده بسیاری می‌توانند برای مقایسه فعالیت ضد رگ‌زایی این نسخه با نسخه قبلی انجام شوند و نتایج حاصل مقدماتی برای استفاده بیشتر این محصول برای درمان بیماری‌های مرتبط با تشکیل عروق خونی فراهم کند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه خوارزمی به‌دلیل فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی کمال تشکر را دارند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهرا فتحی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناسی/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ مسعود

- 26- Invitrogen™ by life technologies. PichiaPink expression system: For high-level and large-scale expression and secretion of bioactive recombinant proteins in Pichia pastoris. Carlsbad: Life Technologies; 2014.
- 27- Shahangian SS, Sajedi RH, Hasannia S, Jalili Sh, Mohammadi M, Taghdiri M, et al. A conformation-based phage-display panning to screen neutralizing anti-VEGF VHHs with VEGFR2 mimicry behavior. *Int J Biol Macromol.* 2015;77:222-34.
- 28- Bahadori Z, Kalhor HR, Mowla SJ. Producing functional recombinant human keratinocyte growth factor in Pichia pastoris and investigating its protective role against irradiation. *Enzym Microb Technol.* 2018;111:12-20.
- 29- Camattari A, Goh A, Yip LY, Tan AH, Ng SW, Tran A, et al. Characterization of a panARS-based episomal vector in the methylotrophic yeast Pichia pastoris for recombinant protein production and synthetic biology applications. *Microb Cell Factor.* 2016;15(1):139.
- 30- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in Pichia pastoris. *Mol Biotechnol.* 2000;16(1):23-52.
- 31- Butler M, Spearman M. The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2014;30:107-12.
- 32- Pal Y, Khushoo A, Mukherjee KJ. Process optimization of constitutive human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) expression in Pichia pastoris fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;69(6):650-7.
- 33- Leppänen V, Prota AE, Jeltsch M, Anisimov A, Kalkkinen N, Strandin T, et al. Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(6):2425-30.
- 34- Strasser R, Altmann F, Steinkellner H. Controlled glycosylation of plant-produced recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol.* 2014;30:95-100.
- 35- Chen H, Gu Z, Zhang H, Wang M, Chen W, Lowther WT, et al. Expression and purification of integral membrane fatty acid desaturases. *PLoS One.* 2013;8(3):e58139.
- 36- Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(10):1357-69.
- 37- Cunningham SA, Arrate MP, Brock TA, Waxham MN. Interactions of FLT-1 and KDR with phospholipase C γ : Identification of the phosphotyrosine binding sites. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;240(3):635-9.
- 38- Invitrogen by Life Technologies. EasySelect Pichia expression kit for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZ α in Pichia pastoris. Carlsbad: Invitrogen by Life Technologies; 2010.
- 39- Puxbaum V, Mattanovich D, Gasser B. Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in Pichia pastoris. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(7):2925-38.
- 40- Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24(1):45-66.
- 41- Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. Protein secretion in Pichia pastoris and advances in protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;93(1):31-9.
- 12- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 2005;23(5):1011-27.
- 13- Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* 1991;6(9):1677-83.
- 14- Brekken RA, Overholser JP, Stastny VA, Waltenberger J, Minna JD, Thorpe PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res.* 2000;60(18):5117-24.
- 15- Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1998;273(47):31283-8.
- 16- Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1998;273(18):11197-204.
- 17- Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, Valentine PJ, Barry ST, Brave SR, et al. AZD2171: A highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. *Cancer Res.* 2005;65(10):4389-400.
- 18- Bold G, Schnell C, Furet P, McSheehy P, Brügger J, Mestan J, et al. A novel potent oral series of VEGFR2 inhibitors abrogate tumor growth by inhibiting angiogenesis. *J Med Chem.* 2016;59(1):132-46.
- 19- Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med.* 1998;4(3):336-40.
- 20- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 1999;5(6):623-8.
- 21- Kuo CJ, Farnebo F, Evan YY, Christofferson R, Swearingen RA, Carter R, et al. Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proceed Natl Acad Sci.* 2001;98(8):4605-10.
- 22- Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis.* 2012;15(2):171-85.
- 23- Li H, Cao W, Chen Z, Acheampong DO, Jin H, Li D, et al. The antiangiogenic activity of a soluble fragment of the VEGFR extracellular domain. *Biomed Pharmacother.* 2013;67(7):599-606.
- 24- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- 25- Dehnavi E, Ranaei Siadat SO, Fathi Roudsari MF, Khajeh K. Cloning and high-level expression of β -xylosidase from Selenomonas ruminantium in Pichia pastoris by optimizing of pH, methanol concentration and temperature conditions. *Protein Expr Purif.* 2016;124:55-61.