Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Optimization of refolding of human vascular endothelial growth factor-A_{121}

Fatemeh Kazemi-Lomedasht[1], Mahdi Behdani[1*], Kamran Pooshang Bagheri[1], Delavar Shahbazzadeh[1], Mahdi Habibi-Anbouhi[2]

[1]Biotechnology Research Center, Venom & Biotherapeutics Molecules Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[2]National Cell Bank, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
*Co-Corresponding author; E-mail: Behdani@pasteur.ac.ir

Received: 8 March 2016 Accepted: 8 May 2016 First Published online: 5 February 2018
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 April-May;40(1):59-65

Abstract

Background: Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays an important role in development of new blood vessel and angiogenesis. Human $VEGF_{121}$ is smallest member of VEGF family. Production of active and correct form of VEGF is the most challenging issue.

Methods: Here we described a method for optimization of refolding of $VEGF_{121}$ which was expressed in bacterial host. Enzyme linked immunosorbent assay and proliferation assay of human endothelial cells was performed to monitor refolding and functional assay of $VEGF_{121}$.

Results: Using described method; VEGF was in correct fold and detected by antibody in ELISA. Furthermore, VEGF stimulated proliferation of human endothelial cells in dose-dependent manner.

Conclusion: Refolded VEGF has potential for stem cell differentiation.

Keywords: Vascular Endothelial Growth Factor, Angiogenesis, Refolding

How to cite this article: Kazemi-Lomedasht F, Behdani M, Pooshang Bagheri K, Shahbazzadeh D, Habibi-Anbouhi M. [Optimization of refolding of human vascular endothelial growth factor-A121]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 April-May;40(1):59-65. Persian.

© 2018 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

بهینه سازی بازآرایی فرم فعال فاکتور رشد سلولهای اندوتلیال عروق انسان: $VEGF\text{-}A_{121}$

فاطمه کاظمی لمعه دشت[۱]، مهدی بهدانی[*۱]، کامران پوشنگ باقری[۱]، دلاور شهباززاده[۱]، مهدی حبیبیانبوهی[۲]

[۱]بخش بیوتکنولوژی پزشکی، آزمایشگاه و نوم و بیومولکول های دارویی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۲]بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[*] نویسنده مسؤول؛ ایمیل: Behdani@pasteur.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱۹ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۱۱/۱۶
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۷؛ ۴۰(۱):۵۹-۶۵

چکیده

زمینه: فاکتور رشد سلولهای اندوتلیال عروق انسان (VEGF) نقش مهمی در تشکیل عروق خونی جدید و رگ زایی ایفا می کند. ایزوفرم ۱۲۱ اسیدآمینه ای فاکتور رشد سلولهای اندوتلیال عروق انسان ($VEGF_{121}$) کوچکترین عضو خانواده VEGF-A می باشد. تولید فرم صحیح و فعال VEGF از چالش بر انگیزترین مقوله ها می باشد.

روش کار: در این مطالعه روشی جهت بهینه سازی بازآرایی پروتئین VEGF تولید شده در میزبان باکتریایی ارایه گردید. سپس از روش الایزا و تکثیر سلولهای اندوتلیال به منظور نشان دادن عملکردی بودن و فرم صحیح پروتئین استفاده شد.

یافته ها: نتایج مطالعه نشان داد که با استفاده از روش ارایه شده در این مطالعه، پروتئین VEGF دارای فرم صحیح بوده و در الایزا توسط آنتی بادی شناسایی گردید. علاوه بر این VEGF تولید شده قادر به تحریک تکثیر وابسته به دوز سلولهای اندوتلیال انسان بود.

نتیجه گیری: در مجموع می توان گفت که از روش ارایه شده در این مطالعه می توان جهت تولید VEGF به منظور استفاده در تمایز سلولهای بنیادی و سایر مطالعات مرتبط استفاده کرد.

کلیدواژه ها: فاکتور رشد سلولهای اندوتلیال عروق انسان، رگ زایی، بازآرایی پروتئین

نحوه استناد به این مقاله: کاظمی لمعه دشت ف، بهدانی م، پوشنگ باقری ک، شهباززاده د، حبیبی انبوهی م. بهینه سازی بازآرایی فرم فعال فاکتور رشد سلولهای اندوتلیال عروق انسان :VEGF-A121. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۰(۱):۵۹-۶۵

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

فاکتور رشد اندوتلیال عروق (VEGF) نقش مهمی در پیشرفت بیماریهای وابسته به رگ زایی ایفا می کند. رگ زایی مربوط به شکل گیری عروق خونی جدید از عروق قبلی می باشد که در شرایط طبیعی بدن بسیار پایدار بوده و به جز در مواردی مانند : دوران قاعدگی ،بارداری و ترمیم زخم، بندرت در افراد بالغ رخ می دهد (۱). علاوه بر شرایط طبیعی بدن، رگ زایی نقش مهمی در شرایط پاتولوژیک مانند : روماتوئید آرتریت، دژنراسیون ماکولار وابسته به سن، رتینوپاتی دیابت و سرطان ایفا می کند (۲). فاکتور رشد اندوتلیال عروق یک ترکیب کلیدی در توسعه سیستم عروقی و لنفاوی می باشد که به صورت اختصاصی و تنها بر روی سلول های آندوتلیال عروق اثر می گذارد. خانواده فاکتور رشد اندوتلیال عروق متشکل از هفت گلیکوپروتئین ترشحی (VEGF-A، VEGF-B، VEGF-C، VEGF-D ، VEGF-E ، PLGF7 و VEGF-F) می باشد(۳). در انسان حداقل ۵ نوع از این فاکتور شناخته شده است(VEGF-A، VEGF-B، VEGF-C، VEGF-D و PLGF7) که مهمترین آنها VEGF-A می باشد. در انسان ژن VEGF-A از ۸ اگزون تشکیل شده است که بر اثر فرآیند Alternative Splicing هفت ایزوفرم ۱۲۱، ۱۴۵،۱۴۸، ۱۶۵، ۱۸۳، ۱۸۹ و ۲۰۶ اسید آمینه ای بوجود می آورد. همچنین یک فرم ۱۱۰ اسید آمینه ای هم در نتیجه ی برش پروتئولیتیک ایجاد می گردد (۴). در اغلب سرطان ها افزایش بیان VEGF ۱۲۱ و ۱۶۵ اسیدآمینه ای مشاهده شده است. VEGF۱۲۱ فاقد اگزون ۷ از ژن VEGF می باشد. اگزون ۷ در VEGF۱۶۵ وجود دارد و این فاکتور را قادر می کند که به گیرنده NP-1 (که مسوول رشد جنین است) متصل شود (۵). وزن مولکولی کوچک $VEGF_{۱۲۱}$ باعث می شود که این فاکتور نسبت به بقیه دارای حلالیت بالاتری بوده و به راحتی قابل انتشار باشد (۶). مطالعات مختلفی مشخص کرده اند که $VEGF_{۱۲۱}$ دارای فعالیت بیولوژیکی کامل می باشد [۶]. پروتئین های خانواده VEGF از دو منومر یکسان تشکیل شده اند که توسط باندهای دی سولفیدی به یکدیگر متصل شده و فرم فعال دایمر را بوجود می آورند (۷). مشاهده شده است که سلول های مختلفی از قبیل سلول های عضلات صاف، ماکروفاژها و سلول های توموری قادر به بیان VEGF-A در بدن می باشند[۷].VEGF عملکرد بیولوژیکی خود را از طریق برهمکنش با گیرنده های (VEGFR) خود اعمال می کند[۸]. گیرنده های VEGF از نوع گیرنده های تیروزین کینازی گذرنده از غشا می باشند که همگی از نظر ساختاری به هم شبیه می باشند. گیرنده های VEGF-A شامل ۱: (Flt-1) (VEGFR-1)،

(Kinase insert domain containing receptor/Flk-1, VEGFR-2);

(KDR/Flk-1) و VEGFR-3 (Flt-4) می باشد که به صورت انتخابی تنها در سطح سلول های آندوتلیال بیان می شوند و ۲: گیرنده های نوروپیلین NP-1 و NP-2 که در سطح عروق اندوتلیوم و نورون ها بیان می شود[۹]. در پی اتصال VEGF-A به قسمت خارج سلولی گیرنده ها، آبشار سیگنالینگ به راه می افتد که در نهایت منجر به دایمریزه شدن و فعال شدن گیرنده می گردد که در پی آن اتوفسفریلاسیون داخل سلولی در پایانه های تیروزین کینازی گیرنده رخ می دهد. گزارش شده است که VEGFR-2 مهمترین گیرنده مسول اثرات آنژیوژنز VEGF-A در شرایط پاتولوژیک می باشد (۱۰). فاکتور رشد سلولهای اندوتلیال عروق به صورت همودایمر بوده و دارای ۳ باند دی سولفیدی درون مولکولی و ۲ باند دی سولفیدی بین مولکولی می باشد. در میزبان باکتریایی فاکتور رشد سلولهای اندوتلیال عروق به صورت منومر می باشد و باکتری قادر به دایمر کردن صحیح نمی باشد. فعالیت بیولوژیکی پروتئین نیازمند دایمر بودن صحیص آن می باشد. با توجه به مقرون به صرفه اقتصادی بودن استفاده از سیستم بیانی باکتریایی در زمینه تولید پروتئین های نوترکیب و نیاز پژوهشگران به فاکتور رشد جهت مطالعات تمایز سلولهای بنیادی، ترمیم زخم و مهندسی بافت، هدف از انجام این مطالعه بهینه سازی بازآرایی فرم فعال فاکتور رشد سلولهای اندوتلیال عروق انسان می باشد.

روش کار

در مطالعه صورت گرفته توسط کاظمی لمعه دشت و همکاران، سازه ژنی $pET-26b-VEGF_{121}$ به درون میزبان *E. coli* BL-21(DE3) ترانسفورم شد (۱۱). بیان فاکتور رشد سلولهای اندوتلیال عروق با استفاده از IPTG یک میلی مولار و انکوباسیون سه ساعته در شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۲۵۰ انکوبه القا گردید. به منظور بیان از محیط کشت TB استفاده گردید. تخلیص فاکتور رشد سلولهای اندوتلیال عروق با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA (شرکت کیاژن) انجام گرفت. به ازای هر یک گرم رسوب باکتری ۷ میلی لیتر از بافر لیز (اوره ۸ مولار، ایمیدازول ۱۰ میلی مولار، NaH2Po4 ۵۰ میلی مولار و NaCl ۵۰۰ میلی مولار در PH=8) اضافه گردید. به منظور پاره کردن غشای سلولی از سونیکاسیون(۲۰ پالس ۲۰ ثانیه ای) در ۴ درجه سانتیگراد استفاده شد. سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. در نهایت باقی مانده سلولی با سانتریفوژ در دورrpm ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد .سپس سوپ رویی به درون ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل (Q IAGEN، آلمان) اضافه گردیدو تخلیص به روش دناتوره انجام گرفت. ستون با استفاده از ۴ حجم بافر شستشو(اوره ۴ مولار، ایمیدازول ۳۰ میلی مولار، NaH2Po4 ۵۰ میلی مولار و NaCl ۵۰۰ میلی مولار در PH=8) شستشو داده شد تا پروتئین های اتصال نیافته خارج

گردند. سپس پروتئین های متصل شده با استفاده از بافر الوشن (اوره ۴ مولار، ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار، NaH2Po4 ۵۰ میلی مولار و NaCl ۵۰۰ میلی مولار در PH=8) خارج گردید. غلظت نهایی پروتئین با استفاده از محلول برادفورد سنجیده شد. و فرایند تخلیص با SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ تایید شد (۱۱).

یک میلی لیتر از غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از فاکتور رشد سلولهای اندوتلیال عروق تخلیص شده به صورت قطره قطره در ۹ میلی لیتر از بافربازآرایی (گلوتاتیون احیا ۳میلی مولار ، گلوتاتیون اکسید ۰/۹ میلی مولار، ال ارژینین۰/۱۶ مولار، Tris-Hcl ۵۰ میلی مولار و اوره ۱ مولار در PH=8) اضافه گردید و به مدت ۳۰ ساعت در ۴ سانتیگراد درجه انکوبه گردید. سپس VEGF فولد شده تغلیظ و در بافر (PBS 1X به همراه گلوتاتیون احیا ۳ میلی مولار) دیالیز گردید. در پایان، این فرایند با SDS-PAGE ۱۵ درصد و وسترن بلاتینگ با آنتی بادی Bevacizumab (۱ :۴۰۰۰ در بافر فسفات) در دو حالت احیا با ۲ مرکاپتو اتانول و غیر احیا مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور بررسی اینکه آیا پروتئین نوترکیب بازآرایی شده دارای فولد صحیح بوده وتوسط آنتی بادی مورد شناسایی قرار می گیرد، روش ساندویچ الایزا با استفاده از کمپلکس آویدین-بیوتین طراحی گردید. ابتدا در کف پلیت مقدار یک میکروگرم در میلی لیتراز آنتی بادی تجاری Bevacizumab به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد با استفاده از بافر بیکربنات کوت گردید. روز بعد چاهک ها ۴ بار با استفاده از بافر PBST (توئین ۰/۰۵ درصد به همراه PBS)، شستشو داده شد و سپس با استفاده از BSA , 2% بلاک گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. غلظت های مختلف از VEGF بیان شده و VEGF استاندارد (شرکت R&D) (۰، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) به هر یک از چاهک ها اضافه گردید و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. بعد از شستشو با استفاده از بافر PBST ، آنتی بادی پلی کلونال Anti-VEGF بیوتینه (رقت ۱:۱۰۰) اضافه گردید و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس آنتی بادی استرپتوآویدین HRPکونژوگه (رقت ۱:۵۰۰۰) اضافه گردید و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. در نهایت سوبسترای TMB اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و واکنش با استفاده از۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ نرمال متوقف گردید. میزان جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

سلولهای اندوتلیال از سیاهرگ بند ناف مطابق پروتکل [۱۱]جداسازی گردید. ابتدا نمونه‌ی بند ناف انسانی از بیمارستان بابک تهیه و در محلول استریل حاوی گلوکز۲ درصد، پنی‌سیلین و استرپتومایسین محلول در PBS، به آزمایشگاه ونوم برای جداسازی سلول منتقل شد[۱۱]. سپس سیاهرگ بند ناف به وسیله PBS شستشو داده شد و با محلول کلاژناز ۰/۲٪ استریل پر شد و دو سر بند ناف با گیره بسته شد. بند ناف داخل بشر حاوی آب مقطر استریل قرار داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. در مرحله بعد با مالش دادن بند ناف و باز نمودن گیره ها، سیاهرگ با استفاده از PBS شستشو داده شد تا سلول‌های اندوتلیال از بند ناف جدا شوند. سوسپانسیون سلولی در یک فالکن ۱۵mL جمع و با دور g۹۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی حاصل در محیط کشت EBM-2 حاوی ۱۰٪ FBS، ۱٪پنیسیلین-استرپتومایسین، ۱٪گلوتامین، حل گردید و به یک فلاسک کشت سلول منتقل گردید. بعد از گذشت ۴ روز سلولها فلاسک را پر نمودند. پاساژ سلولها با تریپسین- EDTA انجام گردید. هویت سلولهای جدا شده با رنگ آمیزی مارکر اختصاصی CD31 با استفاده از آنتی بادی علیه CD31 کونژوگه با FITC تعیین گردید.

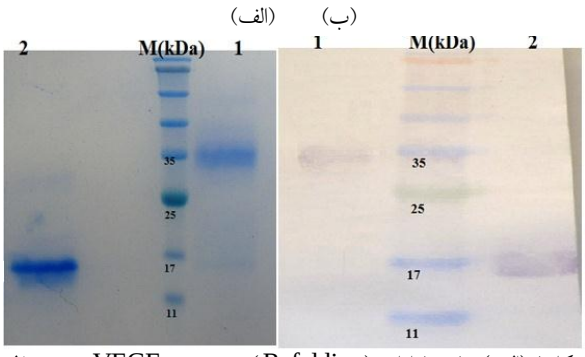
حدود ۱۰۴ سلول HUVEC در چاهک پلیت ۹۶ خانه ای در محیط کشت EBM-2، FBS ۲ در صد و بدون فاکتور رشد به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتی گراد و CO2 ۵ % انکوبه گردید. روز بعد مقادیر مختلف (۰-۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) VEGF121 بیان شده و استاندارد و PBS(کنترل منفی) به چاهک ها اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت در همان شرایط انکوبه گردید. بعد از ۷۲ ساعت محیط کشت سلولها خالی گردید و سلولها دو بار با PBS شستشو داده شدند. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT (۳-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (۵میلی گرم در میلی لیتر) به چاهک ها اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد در تاریکی انکوبه گردید. محلول MTT از چاهک ها خارج گردید و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethylsulfoxide) به هر یک از چاهک ها اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید.سپس بلافاصله میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید.(طول موج ۶۳۰ نانومتر نیز به عنوان طول موج رفرنس قرائت گردید).

یافته ها

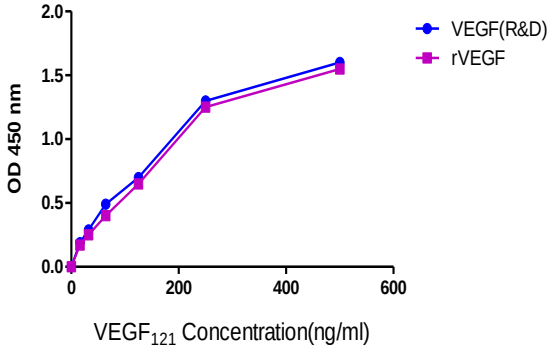
بعد از تایید بیان، پروتئین $VEGF_{121}$ در حجم یک لیتر بیان گردید و با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل تحت شرایط دناتوره و مطابق با پروتکل شرکت سازنده تخلیص گردید. پروتئین مورد نظر به صورت اینکلوژن بادی در باکتری می باشد لذا تخلیص آن با استفاده از روش دناتوره صورت پذیرفت. میزان محصول به دست آمده با روش برادفورد حدود ۵ میلی گرم در لیتر محاسبه گردید. پروتئین $VEGF_{121}$ دارای ۳ باند دی سولفیدی درون مولکولی و ۲ باند دی سولفیدی بین مولکولی (دایمر) می باشد و

میزبان باکتری قادر به دایمر نمودن پروتئین $VEGF_{121}$ نمی باشد ، لذا فرایند دایمر کردن بعد از تخلیص صورت پذیرفت. در پایان، فرایند بازارایی با SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). نمودار جذب و شناسایی VEGF توسط آنتی بادی Bevacizumab با روش الایزا رسم گردید. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است با افزایش غلظت VEGF افزایش جذب آن توسط آنتی بادی رخ می دهد که نشان دهنده توانایی شناسایی آنتی بادی Bevacizumab می باشد. این نتایج می تواند دال بر فولد صحیح VEGF باشد که توسط آنتی بادی مورد شناسایی قرار می گیرد. نمودار جذب VEGF بیان شده تقریبا مشابه با نمودار جذب VEGF تجاری می باشد که این نتایج نیز می تواند نشان دهنده ی فولد صحیح VEGF بیان شده مشابه VEGF تجاری باشد. هویت سلولهای اندوتلیال بعد از پاساژ دوم سلولی و اطمینان یافتن از مورفولوژی صحیح آنها با استفاده از رنگ آمیزی مارکر اختصاصی CD31 تایید شد. شکل ۳ نتایج فلوسایتومتری را نشان می دهد. نتایج نشان داد حدود ۹۹ جمعیت سلولی دارای مارکر اختصاصی می باشند. برای بررسی عملکرد VEGF از سلول اندوتلیال بین پاساژهای ۲ تا ۴ استفاده گردید.

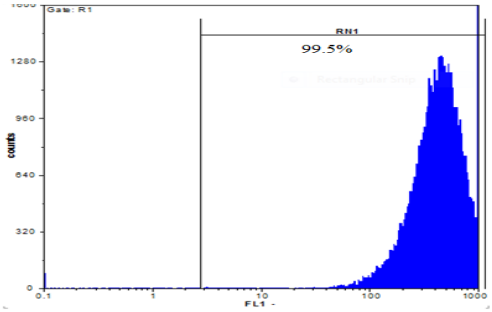
در مطالعات مختلف نشان داده شده است که تکثیر سلولهای اندوتلیال وابسته به فاکتور های رشد مختلفی می باشد که مهمترین این فاکتور ها که بیشترین تاثیر را هم در رشد سلولهای اندوتلیال دارد، VEGF می باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد اثر VEGF بر روی تکثیر سلولهای اندوتلیال وابسته به دوز می باشد و با افزایش غلظت VEGF در محیط کشت ، تکثیر سلولهای اندوتلیال نیز افزایش می یابد. اثر تکثیری VEGF بیان شده مشابه VEGF تجاری می باشد و در غلظت ۵۰ نانوگرم بیشترین اثر دیده می شود (شکل ۴). در حالی که در گروه کنترل منفی (PBS) سلولهای اندوتلیال رشد معنی داری ندارند.



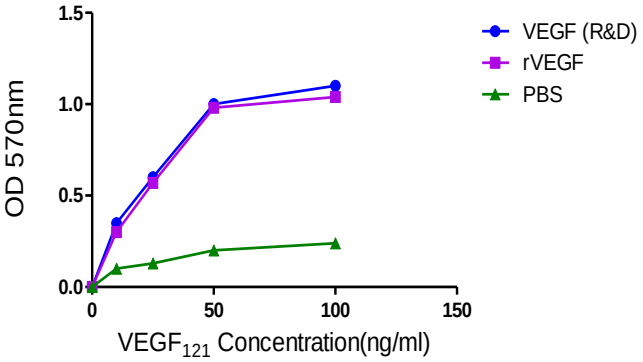
شکل ۱: (الف): نتایج بازارایی (Refolding) پروتئین $VEGF_{121}$ بر روی ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد. (ب): نتایج Refolding پروتئین $VEGF_{121}$ در وسترن بلاتینگ. M: مارکر پروتئین ، ۱: SDS-PAGE در حالت غیر احیا. ۲: در SDS-PAGE حالت احیا.



شکل۲: نتایج شناسایی VEGF بیان شده و استاندارد توسط آنتی بادی Bevacizumab. نمودار جذب VEGF استاندارد به روش الایزا و با استفاده از روش آویدین- بیوتین- کمپلکس رسم گردیده است.



شکل ۳: نتایج فلوسایتومتری CD31 (مارکر اختصاصی سلولهای اندوتلیال). بعد از دومین پاساژ سلولی تقریبا تمامی سلولها دارای مارکر اختصاصی CD31 می باشند.



شکل ۴: نتایج اثر تکثیری VEGF بر روی سلولهای اندوتلیال. اثر VEGF بر روی تکثیر سلولها با استفاده از روش MTT بررسی شده است. در چاهکی که VEGF اضافه نشده است سلولهای اندوتلیال تکثیر قابل ملاحظه ای نشان نمی دهند (PBS کنترل منفی). در حالی که در حضور VEGF سلولها رشد قابل ملاحظه ای دارند.

بحث

امروزه محققین مختلفی سعی در تولید پروتئین های نوترکیب نموده اند که از پایداری و عملکرد مناسب برخوردار باشد. یکی از عواملی که عملکرد و فعالیت پروتئین ها را تحت تاثیر قرار می دهد داشتن فولد صحیح می باشد. انتخاب سیستم بیانی که بتواند با کمترین هزینه منجر به بیشترین میزان در تولید پرونئین های نوترکیب شود از اهمیت فراوانی در بیوتکنولوژی برخوردار می باشد (۱۲). از این رو سیستم بیانی باکتریایی مورد توجه پژوهشگران بسیاری قرار گرفته است. میزبان بیانی *E. coli* از رایج ترین سیستم های مورد استفاده برای تولید پروتئین های نوترکیب می باشد که دارای مزایایی مانند: رشد سریع، توانایی رشد در محیط های کم هزینه و میزان بیان بالا می باشد (۱۳). در این مطالعه از میزبان *E. coli* BL-21 (DE3) استفاده شده است که فرمی از *E. coli* می باشد که مورد دستکاری ژنتیکی قرار گرفته است و گفته می شود قادر به تاخوردگی صحیح پروتئین های نوترکیب می باشد. نتایج این مطالعه و سایر مطالعات نشان داد که باکتری قادر به دایمر نمودن پروتئین ها ی نوترکیب نمی باشد. لذا فرایند بازآرایی (Refolding) بر روی پروتئین تخلیص شده انجام گردید. روش های مختلفی جهت بازآرایی پروتئین ها مخصوصا اعضای مختلف خانواده VEGF گزارش شده است. مشخص شده است که میزان VEGF دایمر به نمک های موجود در بافر بازآرایی بستگی دارد. در برخی مطالعات از کلرید سدیم ۰/۴ مولار و گوانیدیوم هیدروکلراید ۰/۵ مولار در بافر بازآرایی استفاده شده است (۱۴). در برخی نیز از ال–آرژینین یک مولار در بافر بازآرایی استفاده شده است (۱۵). در مطالعه حاضر از روش متفاوتی استفاده گردید و در بافر بازآرایی از ترکیبی از دو روش ذکر شده استفاده شد. نتایج نشان داد که بعد از ۳۰ ساعت تقریبا تمامی پروتئین VEGF بصورت دایمر می باشد. زمان نیز از معیارهای مهم در این مقوله می باشد به طوری که در مدت زمان کمتر از ۳۰ ساعت تمامی VEGF به شکل دایمر نمی باشد و بخشی از آن بصورت منومر باقی می ماند. بافر دیالیز از معیارهای دیگر نگهداری پروتئین دایمر می باشد. مشاهده شده است که بعد از گذشت مدت زمان پروتئین VEGF تمایل به اولیگومریزاسیون دارد و علاوه بر شکل دایمر، اشکال دیگری چون تترامر، هگزامر و .... دیده می شود. لذا به منظور جلوگیری از بوجود آمدن این حالت در این مطالعه به بافر دیالیز گلوتاتیون احیا ۳ میلی مولار اضافه گردید. در مطالعات نشان داده اند که فرم منومر VEGF در غلظت های بالاتری قادر به اشباع و شناسایی توسط آنتی بادی می باشد در حالی که فرم دایمر VEGF در غلظت های پایین تر توسط آنتی بادی شناسایی می شود (۹). نتایج الایزای مطالعه حاضر نشان داد که VEGF بیان شده در غلظت های مشابه با VEGF تجاری توسط آنتی بادی شناسایی می شود. به منظور بررسی عملکرد VEGF از سلوهای اندوتلیال بین پاساژهای ۲ تا ۴ استفاده گردید. تعداد پاساژ سلولی بسیار مهم می باشد زیرا سلول در پاساژهای اولیه خود دارای بیشترین میزان بیان گیرنده های VEGF مانند VEGFR2 می باشد. و با افزایش تعداد پاساژ سلولی، میزان بیان این گیرنده ها کاهش می یابد (۱۶). پروتئین VEGFR2 گیرنده اصلی جهت رشد و توسعه سلول های آندوتلیال عروق خونی بوده و در سلول های آندوتلیال عروق و بافت لنفاتیک بیان می شود و مهمترین نقش را در رگ زایی شرایط پاتولوژیک ایفا می کند (۱۷). سلول اندوتلیال نیز مانند سلولهای سرطانی دارای بیشترین میزان بیان VEGFR2 در پاساژهای ابتدایی می باشد و میتواند به نحو مناسبی اثرات تحریک و مهار کننده های رگ زایی را مورد بررسی قرار دهد. نتایج عملکرد VEGF بر روی تکثیر سلولهای اندوتلیال نشان داد که VEGF بیان شده مانند VEGF تجاری منجر به تکثیر وابسته به دوز سلولهای اندوتلیال گردید . بیشترین اثر در غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر VEGF مشاهده گردید. عملکردی بودن VEGF نشان دهنده ی فولد صحیح آن می باشد.

نتیجه گیری

در این پژوهش پروتکلی به منظور بازآرایی صحیح VEGF ارایه گردید. نتایج نشان داد که VEGF دارای فولد صحیح بوده و قادر به شناسایی توسط آنتی بادی Bevacizumab می باشد .همچنین VEGF بیان شده اثر تکثیری وابسته به دوز بر روی سلولهای اندوتلیال انسان نشان داد. این مطالعه می تواند مقدمه ای بر تولید VEGF در میزبان باکتریایی به منظور استفاده در مطالعات تمایز سلولهای بنیادی، ترمیم زخم و مهندسی بافت باشد.

قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران ، تهران، ایران انجام شده است. محققین کمال تشکر را از انستیتو پاستور ایران به خاطر تامین بودجه این پژوهش دارند.

References

1. Bellou S, Pentheroudakis G, Murphy C, Fotsis T. Anti-angiogenesis in cancer therapy: Hercules and hydra. *Cancer Letters* 2013; **338**(2): 219-228.
2. Shojaei F. Anti-angiogenesis therapy in cancer: Current challenges and future perspectives. *Cancer Letters* 2012; **320**: 130-137.

3. Tarallo V, De Falco S. The vascular endothelial growth factors and receptors family: Up to now the only target for anti-angiogenesis therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2015; **6:** 185-189.
4. Ferrara N, Adamis A.P. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 2016; **15**: 385-403.
5. Kazemi-Lomedasht F. Inhibition of angiogenesis in human endothelial cell using VEGF specific nanobody. *Molecular Immunology* 2015; **65**(1): 58-67.
6. Tsimberidou A.M, Kurzrock R, Anderson K.C. The Role of Angiogenesis in Cancer. *Targeted Therapy in Translational Cancer Research* 2015; **5:** 64.
7. van Lessen M. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor function in angiogenesis by numb and numb-like. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2015; **35**(8): 1815-1825.
8. Teran M, Nugent M.A. Synergistic binding of vascular endothelial growth factor-A and its receptors to heparin selectively modulates complex affinity. *Journal of Biological Chemistry* 2015; **290**(26): 16451-16462.
9. Zhuang G, Ferrara N. The VEGF Receptor Family, in Receptor Tyrosine Kinases. *Family and Subfamilies* 2015; **5**: 821-841.
10. Fagiani E. VEGF receptor-2-specific signaling mediated by VEGF-E induces hemangioma-like lesions in normal and in malignant tissue. *Angiogenesis* 2016; **22**: 1-20.
11. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nature Protocols* 2007; **2**(3): 481-485.
12. Sanchez-Garcia L. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microbial Cell Factories* 2016; **15**(1): 1.
13. Zhong N. Optimizing Production of Antigens and Fabs in the Context of Generating Recombinant Antibodies to Human Proteins. *PloS one* 2015; **10**(10): e0139695.
14. Scrofani S.D. Purification and refolding of vascular endothelial growth factor-B. *Protein Science* 2000; **9**(10): 2018-2025.
15. Liang L, Pei-Shan Li, Wei-Lin Yu, Hsin-Hsin Sh. Prokaryotic expression, refolding, and purification of functional human vascular endothelial growth factor isoform 165: Purification rocedures and refolding conditions revisited. *Protein Expression and Purification* 2011; **76**: 54-58.
16. Kazemi-Lomedasht F, Behdani M, Pooshang Bagheri K, Habibi Anbouhi M, Abolhassani M, Khanahmad H, et al. Expression and Purification of Functional Human Vascular Endothelial Growth Factor-A121; the Most Important Angiogenesis Factor. *Adv Pharm Bull* 2014; **4**(4): 323-328. doi: 10.1016/j.molimm.2015.01.010
17. Fan F, Schimming A, Jaeger D, Podar K. Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. *J Oncol* 2012; **2012**: 281261, 16 pages.