Journal of
Arak University of Medical Sciences

February & March 2020. Vol 22. Issue 6

Research Paper

The Effect of Chemical Additives in Refolding of Recombinant Vascular Endothelial Growth Factor

Mohsen Khaki[1], *Hamid Abtahi[1], Ghasem Mosayebi[1]

1. Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Khaki M, Abtahi H, Mosayebi Gh. [The Effect of Chemical Additives in Refolding of Recombinant Vascular Endothelial Growth Factor (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2020; 22(6):170-181. https://doi.org/10.32598/JAMS.22.6.33.14

https://doi.org/10.32598/JAMS.22.6.33.14

CC BY NC

Article Info:
Received: 14 Dec 2019
Accepted: 24 Dec 2019
Available Online: 01 Feb 2020

Key words:
Cell differentiation, Vascular Endothelial Growth Factor, Chemical additives, Cluster Differentiation marker

ABSTRACT

Background and Aim The most important problem in the production of recombinant proteins in prokaryotic cells is the disruption of the function of these proteins due to their altered natural structure. The aim of present study is to identify the best chemicals dialysis buffer additives in order to improve the protein structure of recombinant Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Methods & Materials In this experimental study, different chemicals additives were selected using relevant software. After adding these additives to the recombinant VEGF dialysis buffer, their effect on the refolding of recombinant proteins and the differentiation of mesenchymal stem cells into endothelial cells was assessed by flow cytometry method.

Ethical Considerations This study obtained its ethical approval from the Research Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences (Code: ARAKMU. REC.1394.199).

Results : The results showed that the addition of arginine, cysteine and dithiothreitol (DTT) to dialysis buffer increases the differentiation of mesenchymal stem cells into endothelial cells. With the presence of sodium chloride (NaCl), cysteine, arginine and DTT in treated cells, the rate of specific Cluster Differentiation (CD) markers of endothelial cell (CD31/144) was at the highest level.

Conclusion Adding cysteine, arginine, DTT and NaCl to the dialysis buffer of recombinant VEGF had the greatest effect on the mesenchymal cell differentiation into endothelial cells.

Extended Abstract

Introduction

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a glycoprotein that is produced in various cells including macrophages, platelets, keratinocytes, renal mesangial cells as well as a variety of cancer cells. VEGF has angiogenic and mitogenic roles, differentiating cells, enhancing angiogenesis and repairing tissues. The most common and most important subset of this protein is VEGF-A-165 [3]. Production of recombinant proteins including VEGF in prokaryotic cells, impair their function due to disruption of protein structure. Since the process of modifying the protein structure by conventional methods such as chemical dialysis is time consuming and expensive, in the present study, appropriate additives were selected for structural modification and restoration of the activity of VEGF, and then these additives were used for chemical dialysis of the recombinant VEGF in vitro.

* *Corresponding Author:*
Hamid Abtahi, PhD.
Address: Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
Tel: +98 (86) 34173502
E-mail: abtahi@arakmu.ac.ir

Methods and Materials

In this experimental in vitro study, the gene encoding VEGF-A165 (Acc: NM_001287044), was extracted from NCBI database. By adding the sequence of BamHI and XhoI restriction enzymes to the gene, the fragment was synthesized by the Biomatics Company. After transformation of the gene into E. coli DH5α proliferative cells and E. coli BL21 (DE3) expression cells, protein expression induction was performed with IPTG [7-9]. Recombinant protein was extracted by affinity chromatography and Ni-NTA kit. The presence of protein was confirmed by SDS-PAGE method. To simulate the structural modification process of proteinase, ExPASy server, aggrescan server, PDB, Chimera Photo, PubChem, Hyperchem, AutoDock and LigPlot software were used. The selected additives used were used in these nine dialysis programs and the product of each program was evaluated by flow cytometry for treatment of Mesenchymal Stem Cell (MSc) and its differentiation into endothelial cell (EC). Commercial protein (ab9571, Abcam Co.) was used as positive control. Data were analyzed by independent T-test and Mann-Whitney U test in SPSS software considering a significance level of less than 0.05.

Results

The results of the LigPlot software showed that weaker hydrogen bonds were formed between cysteine and VEGF compared to other amino acids. The aggrescan server data showed sensitive areas of protein aggregation. Based on flow cytometry results, the rate of specific cluster differentiation markers (CD31/CD144) in the recombinant VEGF-treated group was 27%; in the commercial protein-treated group, 17%; and in the control group, 15%.

Discussion

The greater impact of recombinant VEGF than commercial protein on cell differentiation reported in this study may be due to the protein structure modification by using software and using appropriate chemical additives for chemical dialysis of this protein. According to the results of this study, cysteine had the most effect on the structural modification of recombinant VEGF. This result was consistent with the software results because the level of bonding energy between this amino acid and VEGF was lower and the hydrogen bonds between them were higher than the others. Cysteine can facilitate cross-linking of the disulfide bonds in the structure of recombinant VEGF. The effect of cysteine along with dithiothreitol (DTT) on modifying the structure of the recombinant VEGF is remarkable because DDT acts as a redox compound of the common disulfide bonds, which occurs more frequently under alkaline buffer conditions. Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA), arginine and triton X-100 also had a reinforcing role in modifying the structure of recombinant VEGF. EDTA is a chelator and inhibitor of metalloprotease enzymes and reduces oxidation reactions and enhances protein solubility. Triton X-100 is a non-ionic surfactant and a lubricant detergent; it stops protein aggregation and by inducing the solubility of the oligomeric proteins, supports the refolding process.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study obtained its Ethical approval from the Research Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences (Code: ARAKMU. REC.1394.199). All experiments in this study on living cells in standard laboratory conditions, were carried out in compliance with the principles of biosafety.

Funding

This study is a research proposal approved by Arak University of Medical Sciences (Code: 2356) and received financial support from the Deputy for Research and Technology.

Authors' contributions

Scientific design and management: Hamid Abtahi; Design and implementation of flow cytometry: Ghasem Mosibi; Implementation of practical research process and writing an article: Mohsen Khaki.

Conflicts of interest

The authors would like to thank the Deputy for Research and Technology of Arak University of Medical Sciences for their valuable support.

This Page Intentionally Left Blank

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.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۳ آذر ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۰۳ دی ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۱۲ بهمن ۱۳۹۸

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 علوم‌پزشکی اراک، به ثبت رسیده است.

یافته‌ها نتایج نشان داد که اضافه‌کردن 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 حضورآرژنین، سیستئین، DDT و NaCl در بافر دیالیز VEGF نوترکیب، بیشترین تأثیر را در تمایز سلول مزانشیمال به اندوتلیال دارد.

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

مقدمه

فاکتور رشد اندوتلیال عروقی Growth Factor Vascular Endothelial (VEGF) یک گلیکوپروتئین هوموداِیمر با وزن مولکولی ۴۵-۳۴ 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 فعال‌کردن آن بایستی فرایند تاخوردگی مجدد[1]، 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: ۳۴۱۷۳۵۰۲ (۸۶) ۹۸+
پست الکترونیکی: abtahi@arakmu.ac.ir

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 فراهم‌کردن امکان واکنش مواد شیمیایی مختلف با پروتئین نوترکیب موردنظر 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 [۵، ۶].

مواد و روش‌ها

مرحله تکثیر و انتقال ژن هدف

در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی[۳]، ژن کدکننده VEGF-A165، با رمز شناسایی Acc: NM_001287044، از پایگاه NCBI[۴] استخراج شد. با اضافه‌کردن 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 تکثیری E. coli DH5α و سلول‌های بیانی E. coli BL21 "DE3" و plysS "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 [۷-۹].

مرحله استخراج پروتئین نوترکیب

با توجه به استفاده از پلاسمید pET 32a و الصاق دنباله شش اسید آمینه هیستیدین[۷] به محصول، جهت تخلیص پروتئین، از فناوری کروماتوگرافی تمایلی و کیت Ni-NTA (ستون رزین نیکل نیتروتری استیک اسید)، استفاده شد. برای تأیید حضور پروتئین نوترکیب مورد نظردر محصول نهایی، از روش SDS- PAGE[۸] استفاده شد. با توجه به اینکه بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از SDS-PAGE، میزان پروتئین تولیدشده 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 تخلیص‌شده، با روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از فرمول شماره ۱ بر حسب mg/ml محاسبه شد [۱۰]:

۱. *مقدار پروتئین =– (0/76 × OD260) (1/55 × OD280)*

مرحله بازآرایی پروتئین

عطف به مطالب ذکرشده درقسمت 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 حضورمکمل‌های 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 اگریگیشن پروتئینی پیش‌بینی شد. با استفاده از بانک اطلاعات پروتئین[۹]، ساختار کریستالوگرافی VEGF، مشخص شد.

برای همسان‌سازی ساختار پروتئین از نرم‌افزار ویرایشگر Chi-mera Photo، استفاده شد. ساختار سه‌بعدی اسید امینه‌های موردنظر (سیستئین، پرولین، گلایسین 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 امینه 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 تولیدشده، اجرا شد.

برای ارزیابی اثربخشی فرایند بازآرایی محصول به‌دست‌آمده، از ۹ برنامه دیالیز، جهت تیمار سلول پایه مزانشیمال[۱۱] و تمایز آن به سلول اندوتلیال (EC)، استفاده شد. ابتدا در یک پلیت کشت سلولی ۲۴خانه‌ای با گودهای تخت، در هر گوده، ۵۰۰۰ سلول

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)

MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHE**VVKMDV**YQRSYCHPI**ETLVDIFQE**YPDE***IE*****YIFK**P-SCVP**LMRCG**GCCNDEGLECVPTEESNI**TMQIMRI**KPHQGQHI**GEMSFL**QHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQ-KRKRKKSRYKSWSVCDKPRR

تصویر ۱. نواحی حساس اگریگیشن پروتئینی در **VEGF-A**

MSc ریخته شد. در تراکم سلولی[12] ۵۰ درصد، طبق جدول شماره ۲، تیمار سلول‌ها به مدت ۱۰ روز انجام شد. برای افزایش دقت آزمایش، در مورد گودهای تیمارشده با VEGF دست‌ساز، به صورت دو گوده (دوپلیکیت) و در مورد کنترل‌ها، تیمار در سه گوده (تریپلیکیت) انجام شد. از پروتئین تجارتی 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[13] و من ویتنی یو[14]، انجام شد. میانگین و انحراف معیار داده‌ها، با نسخه ۱۶ برنامه SSPS (IBMB corporation, NY, USA) محاسبه شد. حد معنی‌داری با P value کمتر از ۰/۰۵، مشخص شد.

12. Confluency
13. Indipendent sample t-test
14. Mann-Whitney U-test

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 امینه، ایجاد می‌شود. داده‌ها از سرور aggre scan، نواحی حساس تجمع پروتئین[15] 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 تمایزیافته بر اساس میزان شاخص‌های مولکولی با روش فلو سایتومتری، مشخص شد (جدول شماره ۴).

بحث

در ارزیابی عملکرد VEGF نوترکیب در ایجاد تمایز در سلول‌های

15. Protein aggregation prone area

جدول ۱. برنامه‌های دیالیز بر اساس مواد مکمل متفاوت

مواد مکمل / برنامه‌ها	Tri ۰/۵ 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	–	–	+	–	–	+	+	+	+

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

+ حضور ادیتیو

- عدم حضور ادیتیو

جدول۲. الگوی تیمار سلول‌های مزانشیمال استم سل با پروتئین VEGF

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

جدول ۳. شاخص‌های مولکولی تعیین‌کننده رده‌های مختلف سلولی

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

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

نوع شاخص	نوع سلول	درصد	
		در کنترل مثبت	در کنترل منفی	در تیمارشده با VEGF ساخته شده
CD 105	مزانشیمال	۷۹	۶۹	۷۶
CD 34	سلول بلاست	۱۷	۱۷	۸
CD 34 / CD 105	سلول بلاست	۱۶/۵	۱۶	۸
CD 90	مزانشیمال	۸۵	۸۵	۵۰
CD 73	مزانشیمال	۶۵	۷۱	۴۲
CD90 / CD73	مزانشیمال	۶۳	۷۰	۴۰
CD 44	مزانشیمال	۸۵	۸۸	۵۹
CD44 / CD73	مزانشیمال	۶۲	۷۱	۴۰
CD90 / CD44	مزانشیمال	۷۵	۷۸	۴۶
CD 31	اندوتلیال	۲۰	۱۴	۲۹
CD 144	اندوتلیال	۶۲	۵۶	۶۸
CD 31 / CD 144	اندوتلیال	۱۷	۱۵	۲۷

مزانشیمال به سلول اندوتلیال، داده‌های این مطالعه نشان داد که شیب کاهش درصد شاخص‌های سلول‌های مزانشیمال، در سلول‌های تیمارشده با پروتئین نوترکیب، نسبت به سلول‌های تیمارشده با VEGF تجارتی، تندتر بود. این نتیجه مؤید تأثیر بیشتر VEGF ساخته‌شده نسبت به پروتئین تجارتی بود. این مطلب می‌تواند مؤید مناسب‌بودن 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 تجارتی خریداری‌شده 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 تجارتی در ایجاد تمایز در سلول مزانشیمال به سمت اندوتلیال، عملکرد مثبت داشت، ولی توان پروتئین نوترکیب تولیدشده، بهتر از VEGF تجارتی 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 تزایدی 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 تجارتی، 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 بازآرایی 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 سیستئین[16] [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 به‌دست‌آمده، بهترین ترکیباتی که در بافر دیالیز برای اصلاح ساختار VEGF نوترکیب، استفاده شد، سیستئین 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 امینه سیستئین در ترکیب بافر دیالیز، کاملاً توجیه منطقی و بیوشیمیایی داشت. سیستئین می‌تواند در پروتئین نوترکیب با صرف انرژی پایین، باعث اصلاح ساختار پروتئین و تبدیل فرم غیرفعال آن به فرم فعال شود [۱۶].

نقش دیگر سیستئین می‌تواند تسهیل فرایند در هم آمیختن باندهای دی سولفید باشد؛ زیرا این اسید امینه می‌تواند در پروتئین تغییر شکل‌یافته، 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 اسیدامینه به عنوان یک تثبیت‌کننده پروتئین، نسبت به سایر اسیدهای امینه، در مدل نرم‌افزاری، پیوند ضعیف‌تری با VEGF دارد. ارزیابی‌های اعمال جهش خاص[17]، نشان داد که باندهای دی سولفید متعدد، در هر زنجیره پلی پپتیدی VEGF، وجود دارد و رشته‌های ثابت سیستئین 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 امینه، می‌تواند با پروتئین غیر فعال‌شده و آب، پیوند هیدروژنی ضعیف ایجاد کند، در حالی که گروه گوانیدین آرژنین با برقراری پیوندهای قوی‌تر کاتیونی و الکترواستاتیک با اسیدهای امینه 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 ایمنوتوکسین [۲۱، ۲۲]، 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 دناتوره‌کننده پروتئین عمل کند. از جمله ژیا[18] و همکاران نشان دادند که آرژنین ممکن است ساختار آمینو اسیلاز را منهدم کند. در مطالعه یانسی[19] و همکاران، نتیجه‌گیری شده که آرژنین، می‌تواند ساختار و پایداری پروتئین را متزلزل کند و درنتیجه به عنوان یک عامل ضد ثبات پروتئین عمل کند [۲۳، ۲۴].

16. Cysteine-rich protein

17. Site-directed mutagenesis investigations

18. Xia

19. Yancey

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، مواد مکمل مفید در فرایند تاخوردگی مجدد VEGF، شامل سیستئین و DDT بود وEDTA نقش کمتری داشت. EDTA به عنوان یک ماده شیمیایی شلات‌کننده 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 هماتوپوئتیک، کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر استفاده ترکیبی این سه ماده در راستای تقویت تمایز سلول مزانشیمال به سمت سلول اندوتلیال است که مؤید افزایش طبیعی‌شدن 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 دی سولفید به جلو حرکت می‌کنند و تیول‌های دیگر موجود در DDT، حلقه مربوطه را بسته و با ایجاد DDT اکسیدشده، از سمت پشت حلقه، باند دی سولفید احیاشده را ترک کرده و واکنش را متوقف می‌کند. این عملکرد DDT در شرایط قلیایی (همان‌گونه 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 سنتتیک، مفید بود. نتایج این مطالعه نشان داد که پرولین، گلوکز و گلایسین، به عنوان عوامل بازدارنده در فرایند اصلاح ساختار VEGF نوترکیب عمل می‌کنند. دلیل این نقش منفی، ممکن است این باشد که گلایسین و گلوکز می‌توانند از طریق فشرده‌کردن و کلاپس‌کردن 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 اگریگیشن پروتئین شود. همچنین این ترکیب ممکن است از طریق پوشاندن مکان‌های هیدروفوب پروتئین هدف، مانع اگریگیشن شود. نکته مهم‌تر در خصوص نتایج متفاوت این مطالعه با چندین مطالعه مرتبط، ممکن است به دلیل ساختار ویژه VEGF، از جمله وجود باندهای دی سولفید متعدد و واکنش‌های هیدروفوب درون‌مولکولی این پروتئین باشد.

مقدم و همکاران دریافتند که پروتئین غنی از سیستئین چیتیناز، می‌تواند توسط بافر دیالیز حاوی سوکروز، تریتون X100 DDT، گوانیدین کلراید و گلیسرول، اصلاح شود [۲۸]. حضور باندهای دی سولفید متعدد در ساختار چیتیناز و VEGF، بهره‌گیری از تریتون X100 و DDT را به عنوان ترکیبات مشترک در بافر دیالیز، با مطالعه حاضر، توجیه می‌کند. تریتون X100، یک سورفکتانت غیریونی است و به عنوان یک دترجنت لیزکننده عمل می‌کند. این ترکیب، اگریگیشن 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، این‌گونه نتیجه‌گیری شده که تریتون X100، با القای حلالیت پروتئین‌های الیگومر، فرایند ریفولدینگ 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 تولیدشده، توسط تریتون X100، به ساختار طبیعی برمی‌گردد.

نتایج نشان داد که به کمک نرم‌افزارهای شبیه‌ساز پروتئین و انتخاب مواد شیمیایی هدفمند، VEGF-A نوترکیب ساخته‌شده 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 فراهم‌شدن 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 علوم‌پزشکی اراک، با شناسه ARAKMU. REC.1394.199 انجام شد.

حامی مالی

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

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 می‌کنندکه هیچگونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از پشتیبانی مسئولین محترم پژوهشی دانشگاه علوم‌پزشکی 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 pyogen hyaluronidase by bioinformatics softwares. Koomesh. 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] Didevara E, Abtahi H. Cloning and production of the monomer form of recombinant streptavidin and appraisal of its binding affinity to biotin. Koomesh. 2018; 20(1):115-21.

[10] Hamzehloo Z, Mosayebi Gh, Khansarinejad 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:10.2174/1389203715061408181130 15] [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