

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-Al-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 اتصال 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، رتینوپاتی 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 بیان‌شده به hVEGF165 با الایزای مستقیم و الایزای 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 بیان‌شده 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 میتوژنز 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 نئواسکالار 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 *ترمان* 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 درحال 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 اسید آمینه ای،
۲) افزودن جایگاه برش آنزیم KpnI به انتهای C و جایگاه برش آنزیم XhoI به انتهای N، ۳) افزودن توالی کدکننده دو اسید آمینه 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 -His6 tag به انتهای C و ۶) افزودن کدون پایان.
این سازه ژنی توسط شرکت MWG (آلمان) با نرم افزار Gene Optimizer برای بیان در مخمر پیکتیا پاستوریس بهینه و توسط شرکت Shine Gene (چین) ساخته و در پلاسمید pUC19 تحویل گرفته شد.

کلون سازی سازه نو ترکیب در وکتور بیانی pPink α -HC

تمام مراحل کلون سازی 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 باکتری های دارای پلاسمید روی محیط LB حاوی آمپی سیلین، استخراج وکتور توسط کیت استخراج پلاسمید انجام شد. سپس سازه ژنی KDR1-3 از طریق برش دوتایی با آنزیم های محدود کننده KpnI و XhoI از وکتور KDR1-3- pUC19 جداسازی شد. علی رغم دسترسی به وکتور بیانی pPink α -HC، به دلیل اطمینان از جایگاه های برشی پلاسمید pPink α -HC-SXA^[25] برای کلونینگ ژن KDR1-3 از آن استفاده شد. برش دوتایی وکتور pPink α -HC-SXA با آنزیم های محدود کننده 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 ۷۹۰۰ جفت باز مربوط به وکتور برش و خالص سازی شد. با توجه به این نکته که اندازه قطعه نوکلئوتیدی مورد نظر تقریباً یک هشتم 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 میکرو لیتر انجام شد. در وکتور نو ترکیب ژن مورد نظر در پایین دست سیگنال ترشحی α -mating و تحت تاثیر پروموتور *اکل/اکسیداز (AOX1)* قرار گرفت. سپس سلول های مستعد *E. coli* سویه DH5- α با وکتور نو ترکیب KDR1-3- pPink α -HC با روش شوک حرارتی نو ترکیب و باکتری های ترانسفورم شده روی LB آگار حاوی آمپی سیلین غربالگری شدند. برای اطمینان از حضور سازه KDR1-3 در کلنی های نو ترکیب، ابتدا کلنی PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرو لیتر حاوی ۵/۰ میکرو لیتر از هر یک از پرایمر های رفت و برگشت عمومی وکتور با غلظت ۱۰۰ پیکومول و ۳ میکرو لیتر از مخلوط کلنی های حل شده در آب انجام شد. توالی پرایمر رفت به صورت 5'- ACTGCTGTTTTATTCGAGCATCC-3' و در مورد پرایمر برگشت 5'- GGCGTGAATGTAAGCGTGACATAAC-3' بود. پرایمر رفت برای توالی سیگنال α - فاکتور و پرایمر برگشت برای منطقه اتمام

۱۱۵ کیلو دالتونی فوق شامل دومین شبه ایمونوگلوبولین VEGFR1 و سومین دومین شبه ایمونوگلوبولین VEGFR-2 است و به صورت فیوژن با دومین Fc IgG1 انسانی بیان می شود^[22]. دومین خارج سلولی نو ترکیب ۱-۳ گیرنده KDR (rKDR1-3) جدیدترین عضو از گیرنده های 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 آنتی تومور دارد^[23]. در این مطالعه برای اولین بار بیان ترشحی KDR1-3 انسانی در سیستم *Pichia pastoris* انجام و آنالیز کیفی تمایل اتصال rKDR1-3 به hVEGF165 با دو آزمون الیزای مستقیم و الیزای مبتنی بر گیرنده اثبات شد.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی و سلول ها

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. آنتی بادی مونوکلونال علیه VEGF، آنتی بادی علیه ایمونوگلوبولین G انسانی کوئوگه 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 آنزیم های محدود کننده و DNA لیگاز T4 از شرکت فرمنتاز (ایالات متحده)، مارک های وزن مولکولی DNA و پروتئین از شرکت Thermo Scientific (لیتوانی)، آگارز از شرکت Invitrogen (ایالات متحده)، کیت های استخراج پلاسمید و شست و شوی DNA (Clean up) از شرکت Gene All (کره) و کیت استخراج DNA از ژل آگارز از شرکت ویوانتیس (مالزی) تهیه شدند. پرایمر های 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 خانه ای الیزا 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 سلول های پیکتیا پاستوریس در محیط YPD حاوی پپتون، عصاره مخمر و D-گلوکز مونوهیدرات در ۳۰°C کشت داده شدند. برای رشد مخمر و بیان پروتئین نو ترکیب به ترتیب از محیط های BMMY و BMMY استفاده شد. محیط کشت انتخابی PAD (محیط فاقد آدنین) نیز خریداری شد (Teknova؛ ایالات متحده).

طراحی و سنتز سازه نو ترکیب KDR1-3

توالی نوکلئوتیدی دومین های خارج سلولی ۱-۳ گیرنده KDR شامل نوکلئوتید های ۱۰۹۷۸ از پایگاه های 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 ۵/۰ میلی‌لیتر بافر تریس- سالین با pH برابر ۷/۶ حل شد و به‌منظور 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

خالص سازی 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 NaH_2PO_4 + 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 NaH_2PO_4 + 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 به‌عنوان 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

رونویسی CYC1 طراحی شده است^[25]. برنامه دمایی کلنی PCR به‌صورت 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، طویل 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 فرایند انتقال به مخمر بتواند فرایند 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؛ ۱۸۰۰V، ۲۰۰Ω، ۲۵μF، C) 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 ۵۰-۱۰۰ نانوگرم ژنوم مخمر و پرایمرهای عمومی وکتور استفاده شد. شرایط واکنش PCR به‌صورت 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 به‌عنوان 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، به‌طوری 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).



TGATCAGCATGGTGTGGTCTACATTACAGAGAACAAGAACTGTAGTCAT
ACCTGTCTAGGTTCCATTTGCAATTTGAACGTTTCATTATGTGCTCGTTATCCTG
AAAAGAGATTGTCTCCGATGGAATCGTATATCTTGGGACTCCAAGAAAGGCT
TCACAATTCATCTACATGATCTCTATGCTGGAATGGTGTGTTGAGGCAAA
GATCAATGATGAAAGCTACCAATCGATTATGATACATAGTCGTGGTTGTGGCTAC
AGGATCTATGATGTCGTTTATCTCTTCACATGGCATAGAGTTGCTCGGTGGAG
AAAAGTTGGTGTGAAATGCACTGCTCGAACCCTAACTTAACTGTTGGAATTGACTT
CAATTGGGAATATCCAAGCTCGAAACACCAAGAACTGTTAAACAGGG
ATCTTAAACCCAAAGTGGTAGTGAGATGAAGAAGTCTTGTCTACGTTGACTA
TTGATGGTGTACACAGATCAGACCAAGGCTTTACACATGTGCAGCTTCAAGTG
GACTGATGACTAAGAAGACAGTACGTTGTTAGAGTGCATGAA

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 خطی‌شده pPink-αHC با طول ۷۹۰۰ جفت باز با روش استخراج از ژل از قطعات دیگر جدا شدند و فرایند 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 کونژوگ 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 پیکتیا 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 تولیدشده 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 پیکتیا 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 تولیدشده در پیکتیا پاستوریس به دلیل داشتن مسیر اصلاحات پس از ترجمه مشابه سلول‌های انسانی عملکرد بالاتری نسبت به نسخه قبلی گیرنده تولیدشده در باکتری داشته باشد^[34].

طراحی و سنتز سازه نوترکیب KDR1-3

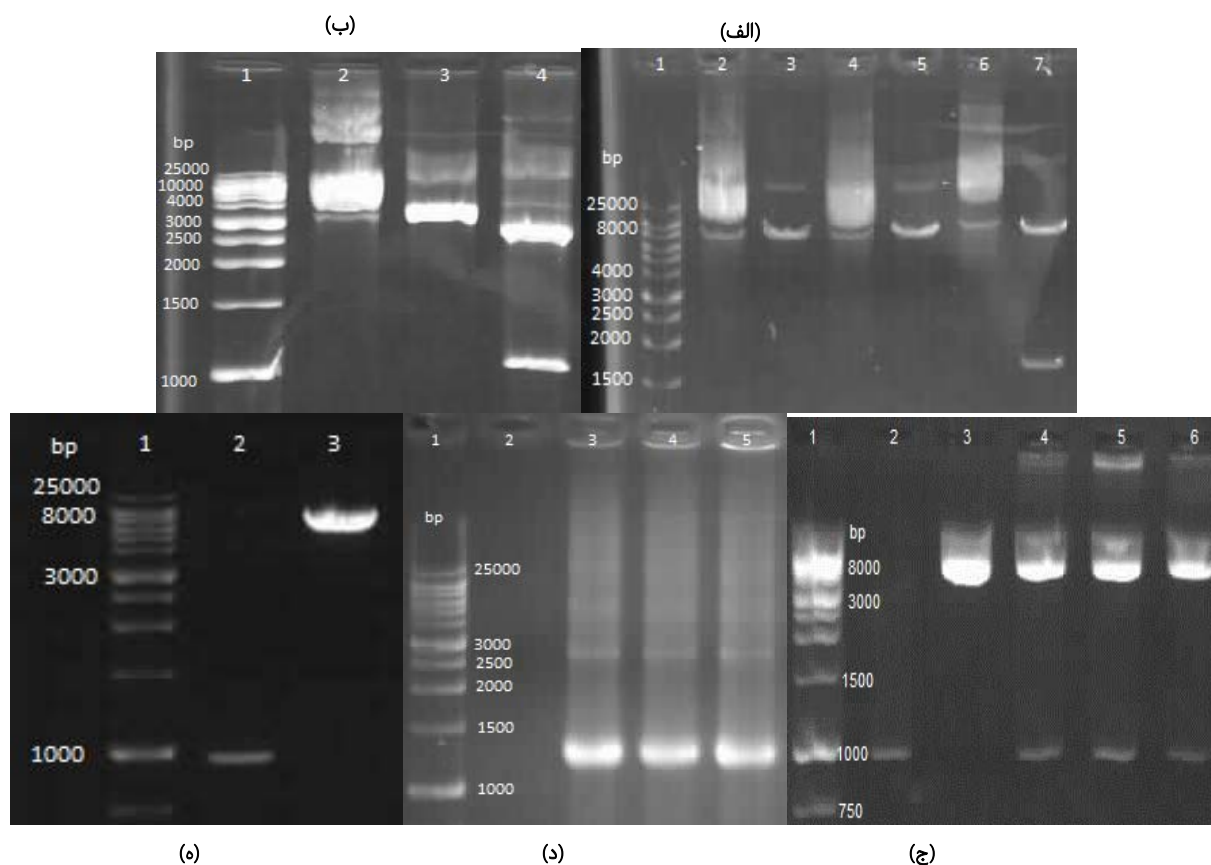
به منظور ایجاد یک استراتژی درمانی ضد VEGF/VEGFR، دومین‌های اتصال به لیگاند گیرنده KDR (توالی کدکننده اسید آمینه‌های ۳۲۶-۲۰) انتخاب شد. اسید آمینه‌های ۱۹-۱۰ گیرنده KDR مربوط به پپتید نشانه هستند. چون توالی نشانه نقش توپولوژیک ندارد بنابراین در طراحی ژن این توالی حذف شد. برای بیان از وکتور pPink-αHC استفاده 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

الکتروفورز 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).

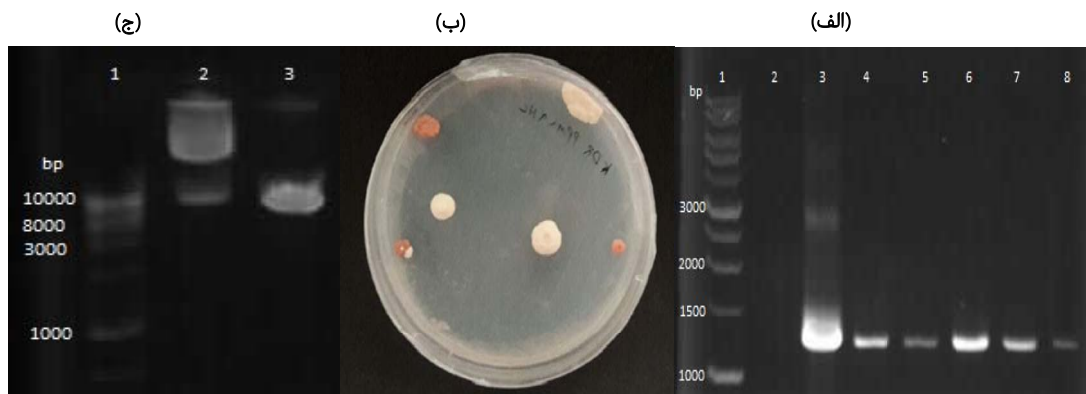
وکتور خطی روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شدند (شکل ۲- ه). همچنین وکتور برای تعیین توالی با پرایمرهای عمومی وکتور به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی درج قطعه کدکننده *KDR1-3* در وکتور به شکل صحیح را تایید کرد.

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 استخراج‌شده از باکتری و محصولات هضم آنزیمی وکتور (۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- وکتور pUC19-KDR1-3 حلقوی و ۳- 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 محدودکننده *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 محدودکننده *KpnI* و *XhoI* با طول ۷۹۰۰ جفت باز، ۶- وکتور pPink α -HC-SXA حلقوی، ۷- وکتور pPink α -HC-SXA برش‌یافته با آنزیم‌های محدودکننده *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 pPinkα-HC-KDR1-3 به مخمر؛ (الف) تصویر وکتور pPinkα-HC-KDR1-3 خطی شده با آنزیم محدودکننده SpeI (۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- وکتور pPinkα-HC-KDR1-3 استخراج شده حلقوی به عنوان کنترل، ۳- وکتور pPinkα-HC-KDR1-3 خطی شده با آنزیم SpeI)؛ (ب) مشاهده کلنی های نوترکیب مخمری حاوی سازه ژنی KDR1-3 روی محیط انتخابی PAD؛ (ج) تایید حضور وکتور نوترکیب pPinkα-HC-KDR1-3 در داخل مخمر با روش PCR (۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- کنترل منفی، ۳- کنترل مثبت (پلاسمید pPinkα-HC-KDR1-3) و ۴-۸- کلنی های مخمری نوترکیب)

بیان پروتئین نوترکیب در مخمر

از میان کلنی های نوترکیب، کلنی های سفیدرنگ چندین نسخه وکتور نوترکیب دریافت کرده اند و بنابراین پروتئین نوترکیب را بیان می کنند، ولی کلنی های صورتی رنگ چون تنها یک نسخه وکتور نوترکیب دریافت کرده اند دچار استرس آدنین هستند و برای بیان استفاده نمی شوند [38]. در وکتور بیانی pPinkα-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 می شود. برای بیان پروتئین نوترکیب، ابتدا مخمرها به محیط BMGY منتقل شدند. این محیط که برای رشد سلول ها از آن استفاده می شود حاوی گلیسرول است که به گلوکز تبدیل می شود. در محیط BMGY پروموتور *AOX1* خاموش است [39, 40] و سلول ها بدون بیان ژن مورد نظر به رشد خود ادامه می دهند تا به رشد قابل قبول برسند [35]. در فاز بیان سلول هایی که در محیط BMGY رشد کرده اند را رسوب داده شدند و به محیط BMMY انتقال یافتند. سپس پروموتور *AOX1* به مدت ۵ روز هر ۲۴ ساعت یک بار با متانول ۱٪ القا شد. پس از پایان دوره بیان خارج سلولی، حضور پروتئین نوترکیب بیان شده با آنالیز SDS-PAGE (شکل های 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 کیلوالتون 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 می دهد که به دلیل درجات مختلف گلیکوزیلاسیون، پروتئین نوترکیب دارای چندین باند است. در سیستم بیانی پیکیا پاستوریس علاوه بر پروتئین نوترکیب محلول، پروتئین های طبیعی سلول نیز به محیط کشت ترشح می شوند [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، پروتئین های 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 می شوند و باندهای پروتئین نوترکیب و پروتئین های طبیعی روی هم قرار گرفته اند و از این رو بهینه سازی بیان پروتئین نوترکیب *KDR1-3* توسط پیکیا پاستوریس در حال بررسی است که با توجه به نتایج مطالعات مشابه انتظار می رود بهینه سازی موجب تولید پروتئین های نوترکیب با وزن مولکولی و الگوی گلیکوزیلاسیون یکسان شود و پروتئین های طبیعی سلول به طور ناچیزی بیان شوند [25].

تخلیص پروتئین نوترکیب

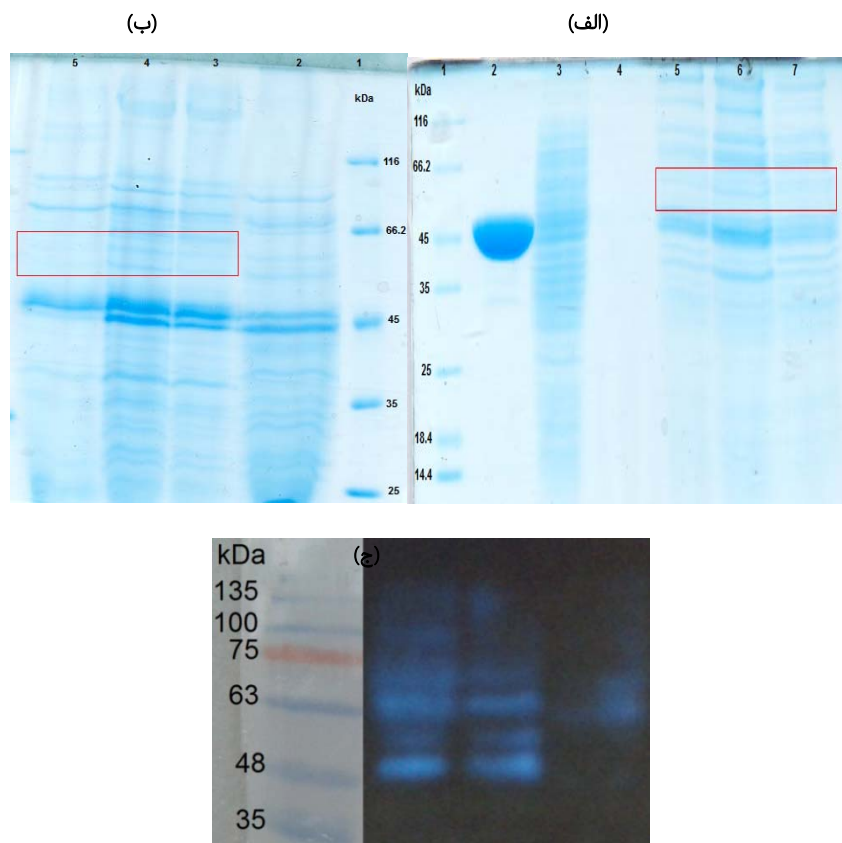
سویه مخمری مورد استفاده در این مطالعه به گونه ای مهندسی شده است که پروتئین نوترکیب را به صورت محلول و خارج سلولی به محیط کشت ترشح می کند. به همین دلیل تخلیص پروتئین آسان تر می شود. ژن *KDR1-3* در انتهای کربوکسیلی دارای دنباله هیستیدینی است، بنابراین برای تخلیص پروتئین نوترکیب از کروماتوگرافی تمایلی با 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- مرکاپتواتال) و وسترن بلاتینگ با آنتی بادی ضد پلی هیستیدینی بررسی شد. نتایج بیانگر پروتئینی با وزن مولکولی در محدوده ۶۰-۵۵ کیلوالتون با احتساب تغییرات پس از ترجمه، His-tag و لینکر G4S است (شکل های 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 کیلوالتون را نشان داد [23].

اتصال گیرنده نوترکیب تخلیص شده به hVEGF165 با تکنیک الیزای مستقیم

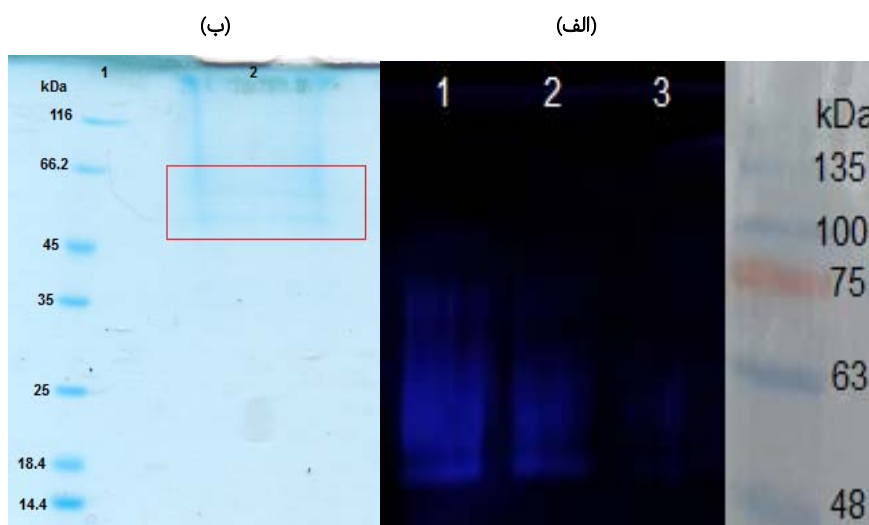
در این تست اتصال اختصاصی گیرنده *rKDR1-3* به hVEGF165 بررسی شد. hVEGF165 همودایمر دارای دو ناحیه اتصال به

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].

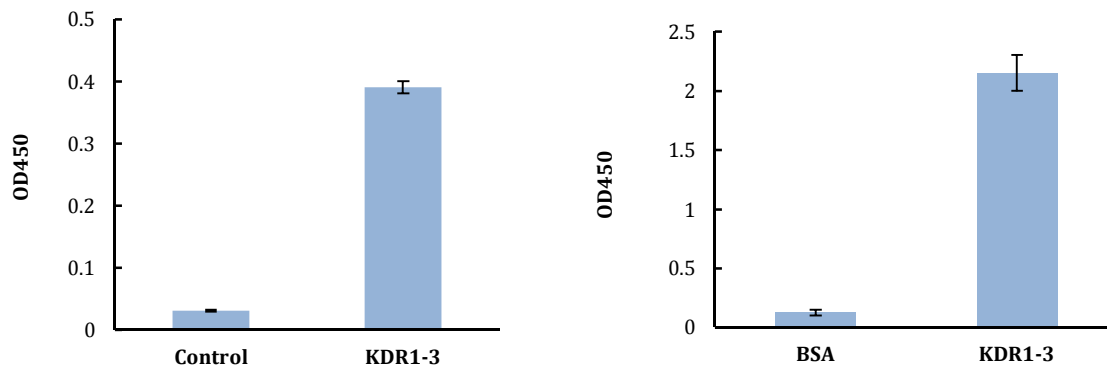
گیرنده و هر ناحیه قادر به اتصال به یک گیرنده rKDR1-3 است. نتایج در نمودار ۱- الف ارایه شده است. سیگنال‌های جذبی مربوط به نمونه تا ۱۰ برابر جذب کنترل بیشتر است که بیانگر موفق بودن اتصال لیگاند به گیرنده و حفظ فعالیت پروتئین حین تخلیص است. در شرایط این تست میزان جذب متوسط ۰/۳۹ بود، در حالی که در



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 متصل شونده به گیرنده hVEGF165 به رسپتور نوترکیب تخلیص شده در آزمون الایزای مبتنی بر گیرنده؛ در هر دو آزمون مقادیر انحراف معیار به عنوان خطا در نظر گرفته شده است.

مشهدی اکبر بوجار (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ احسان دهنوی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ رضا حسن ساجدی (نویسنده چهارم)، نگارنده مقدمه/روش شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)
منابع مالی: مطالعه حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد و با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه خوارزمی انجام شده است.

منابع

- 1- Folkman J. Tumor angiogenesis: The therapeutic 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 N22 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proceed 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 متصل شونده 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 آنتی بادی Avastin متصل شد. در انتها آنتی بادی ثانویه کوئزوگه به HRP علیه ایمونوگلوبولین G اضافه شد. نتایج در نمودار ۱-ب ارائه شده است. همان گونه که مشاهده می شود سیگنال های جذبی مربوط به نمونه تا ۱۰ برابر بیشتر از میزان جذب نمونه کنترل است که اتصال لیگاند به گیرنده را نشان می دهد.

نتیجه گیری

به طور کلی در مطالعه حاضر، روشی برای تولید دومین های متصل شونده به لیگاند گیرنده KDR به شکل محلول با هدف توسعه یک گیرنده محلول علیه رگ زایی ایجاد شد. پس از طراحی و بهینه سازی سازه نوترکیب، قطعه نوترکیب در سیستم بیانی پیکیا پاستوریس بیان و صحت تولید آن با SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ تایید شد. در نهایت اتصال VEGF انسان به این گیرنده نوترکیب با آزمون های الایزا اثبات شد. در آینده آزمایش های در شیشه و در محیط زنده بسیاری می توانند برای مقایسه فعالیت ضد رگ زایی این نسخه با نسخه قبلی انجام شوند و نتایج حاصل مقدمه ای برای استفاده بیشتر این محصول برای درمان بیماری های مرتبط با تشکیل عروق خونی فراهم کند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه خوارزمی به دلیل فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی کمال تشکر را دارند.
تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تعارض منافع: نویسندگان اعلام می کنند که هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهرا فتحی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش شناس/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, Taghdir 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.