

بیان آنتی‌بادی تک دومینی ضد VEGF انسانی از طریق نمایش سطحی در *E. coli* با استفاده از دومین انتهایی آمین پروتئین هسته‌زایی یخ (INP)

سلیم الحفیان^۱، زینب رضائی^۲، سیده شیرین شاهنگیان^۳، رضا حسن ساجدی^{۴*}

۱- دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲- دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳- استادیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۴- استاد تمام بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

* صندوق پستی ۱۵۴-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

sajedi_r@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۳۰

دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۴

چکیده

آنژیوزنز در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک از جمله رشد تومور دخالت دارد و VEGF مهمترین فاکتور در این فرایند محسوب می‌شود. امروزه تولید آنتی‌بادی‌های تک دومینی (VHH) با ویژگی مهار فاکتورهای رشد در تومورهای سرطانی یکی از راهکارهای جدید درمان سرطان می‌باشد. در پژوهش قبلی ما مشخص شد VHH‌های شتری تهیه شده با استفاده از نمایش فاژی علیه VEGF در مهار آن نقش اساسی ایفا می‌کند. در این بین VHH‌ی که دارای بیشترین تمایل به جایگاه اتصال به VEGF در بین دیگر اعضا کتابخانه فاژی VHH‌ها تهیه شده بود، انتخاب شد. با توجه به کارایی بیان سطحی *E. coli* با استفاده از موتیف لنگری پروتئین هسته‌زایی یخ (INP)، از این سیستم برای بیان پروتئین استفاده شد. از آنجا که در اتصال INP به سطح سلول فقط دومین انتهایی آمینی نقش دارد، در طراحی سازه ژنی از ۵۳۷ جفت باز ابتدایی ژن InaK استفاده شد. همچنین، با قراردادن جایگاه برش آنزیم پروتئاز TEV بین INP و VEvh10، امکان جداسازی موفقیت آمیز VEvh10 از سطح سلول باکتری فراهم شد. بیان سطحی با استفاده از پلاسمید pET-21a حاوی INP و VEvh10 علیه VEGF انجام شد. نتایج نشان داد دنباله INP گزینه مناسبی برای بیان سطحی VEvh10 در *E. coli* می‌باشد. پس از تولید VEvh10 نوترکیب، جدا سازی و تخلیص با استفاده از ساترفیوژ و شست‌شوی متعدد انجام گرفته و اتصال آن به VEGF بررسی شد. اتصال موفقیت آمیز VEvh10 به VEGF نشان داد که پروتئین نوترکیب حاصل می‌تواند برای کاربردهای درمانی و تشخیص بالینی بیماران در آینده استفاده شود. کلید واژگان: نمایش سطحی در باکتری، پروتئین هسته‌زایی یخ، VHH، آنژیوزنز، فاکتور رشد اندوتلیال رگی

۱-مقدمه

آنژیوژنز تومور، اثرات رگ‌زایی خود را از طریق اتصال به گیرنده‌های خود بویژه VEGFR-II انجام می‌دهد [۴، ۱۱-۱۳]. بنابراین این مولکول به‌عنوان یک هدف دارویی ارزشمند در درمان‌های ضد آنژیوژنز بسیار حائز اهمیت است.

آنتی‌بادی تک دومینی^۹، نانوبادی^{۱۰} یا VHH داری ویژگی‌های ارزشمندی از جمله قدرت نفوذ مؤثر به بافت‌ها، پایداری بالا، سهولت در فرایند انسانی کردن، بیان کارآمد در میزبان‌های پروکاریوتی و تمایل و اختصاصیت به آنتی‌ژن مربوطه می‌باشد. بنابراین آنها را می‌توان به‌عنوان کاندید درمانی جایگزین آنتی‌بادی‌های سنتی معرفی کرد. VHH کوچکترین قطعه آنتی‌بادی است که تمام عملکرد خود را حفظ کرده و به دلیل اندازه بسیار کوچک به‌عنوان نانوبادی نیز شناخته می‌شود [۱۴، ۱۵]. مطالعات شاهنگیان و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که VEvh10 (کد دسترسی LC010469) دارای یک اثر مهار قوی در اتصال VEGF به گیرنده خود می‌باشد [۱۶]. VHH نامبرده نقش بازدارندگی خود را با اتصال به محل اتصال گیرنده VEGF انجام می‌دهد. VEvh10 همچنین دارای بالاترین انرژی اتصال در محل اتصال گیرنده VEGF در میان سایر اعضای کتابخانه فاژ VHH است که آمینواسیدهای کلیدی در عملکرد VEGF را پوشش می‌دهد و فعالیت بیولوژیکی VEGF را مختل می‌کند.

یکی از روش‌های معمول برای بیان VHH نوترکیب، استفاده از سیستم‌های بیانی *E. coli* می‌باشد، هرچند بیان VHH به صورت نوترکیب با استفاده از روش‌های معمول بیان سیتوپلاسمی در این میزبان پروکاریوتی اغلب باعث تشکیل اجسام توده‌ای^{۱۱} می‌شود [۱۷ و ۱۸] در این مطالعه برای غلبه بر این مشکل، تکنیک نمایش در سطح سلول

فاکتور رشد اندوتلیال عروقی^۱ (VEGF) یک گلیکوپروتئین همودیمر با وزن مولکولی تقریباً ۲۸ کیلودالتون است. این پروتئین یک واسطه کلیدی برای رگ‌زایی (تشکیل رگ‌های خونی جدید) است. VEGF اثرات فیزیولوژیک خود را از طریق اتصال به دو رسپتور مشابه به نام‌های رسپتور VEGFR-1 (VEGFR-I) و رسپتور VEGFR-2 (VEGFR-II) KDR^۲ اعمال می‌کند، که دارای هفت دومین خارج سلولی شبه ایمنوجلوبولین و یک دومین تیروزین کینازی داخل سلولی بوده و در سطح سلول‌های اندوتلیال رگی بیان می‌شوند [۱، ۲]. در شرایط هیپوکسی بیان رسپتورهای VEGF افزایش می‌یابد و باعث پدیده آنژیوژنز می‌شود. اتصال VEGF به رسپتور VEGFR-II پاسخ سلول‌های اندوتلیال رگی را بر می‌انگیزد [۳-۵]. اگرچه رسپتور VEGFR-I با تمایل بیشتری به این فاکتور متصل می‌شود، اما فقط در به دام انداختن VEGF نقش دارد و دسترسی آن را به رسپتور VEGFR-II، که رسپتور اصلی القاء سیگنال‌های رگ‌زایی است، تسهیل می‌کند. VEGF توسط دو دومین مجزا به رسپتورهای مذکور متصل می‌شود [۶، ۷].

در افراد سالم، VEGF باعث رگ‌زایی طی دوران جنینی شده و در بهبود زخم در بزرگسالان نقش مهمی ایفا می‌کند. رگ‌زایی پاتولوژیک در بسیاری از شرایط مانند رشد تومور، متاستاز^۴، رتینوپاتی دیابتی^۵، دژنراسیون ماکولا^۶، آرتریت روماتوئید^۷ و پسوریازیس^۸ نقش کلیدی دارد [۸-۱۰]. مهار پدیده رگ‌زایی به چند روش صورت می‌پذیرد که شامل مهار در انتقال سیگنال سلول اندوتلیالی، مهاجرت سلول اندوتلیال و بقای آن، فاکتورهای رشد، تکثیر سلول اندوتلیال، ماتریکس متالوپروتئینازها و سلول‌های پیش‌ساز مغز استخوان می‌باشد و VEGF به‌عنوان تنظیم‌کننده

⁷ Rheumatoid Arthritis

⁸ Psoriasis

⁹ Single Domain Antibody

¹⁰ Nanobody

¹¹ Inclusion body

¹ Vascular Endothelial Growth Factors

² VEGF Receptor I (Fms-Like Tyrosine Kinase-1)

³ VEGF Receptor II (Kinase Domain Region)

⁴ Metastasis

⁵ Diabetic Retinopathy

⁶ Macular Degeneration

انتخاب شد که به پپتیدها اجازه می‌دهد تا به واسطه همجوشی با موتیف‌های لنگری در سطح سلول‌های میکروبی نمایش پیدا کنند. پروتئین هسته‌زایی یخ^۱ (INP) یکی از انواع معمول پروتئین‌های غشایی در باکتری‌ها است. با وجود محدودیتی که بیشتر سیستم‌های بیان سطحی از نظر اندازه پروتئین‌های هدف برای نمایش در سطح سلول دارند، سیستم بیان سطحی مبتنی بر INP می‌تواند انواع پروتئین‌ها را در سطح باکتری بیان کرده و به نمایش بگذارد [۱۹-۲۲، ۱۳].

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲ مواد مولکولی و شیمیایی

پلاسمید pET-21a حاوی لینکر INP از شرکت ShineGene (چین)، مارکر وزن مولکولی DNA^۲ از شرکت یکتا تجهیز آزما (YT8507) و مارکر وزن مولکولی پروتئین^۳ (BSM0431) از شرکت BIO BASIC (کانادا)، آمپی‌سیلین و آگارز از شرکت Acros (تایوان)، IPTG از شرکت SinaClon (ایران)، رزین-Ni^۴ (NTA) از شرکت Qiagen (هلند)، کیت استخراج پلاسمید و استخراج از ژل از شرکت GeneAll (کره)، کیت پاکسازی محصول آنزیمی شرکت Yektatajhez (ایران)، آنزیم محدودکننده *HindIII* / *XhoI*، آنزیم لیگاز و سایر آنزیم‌های مولکولی فرمنتاز (آمریکا)، آنزیم *pfu*

۲-۲ همسانه‌سازی ژن

ابتدا پرایمرهای مناسب برای جداسازی قطعه ژنی VEvh10 با کد دسترسی LC010469 از پلاسمید فاژی طراحی (جدول ۱) و از پلاسمید به‌عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (PCR)^۵ استفاده شد. برای تکثیر با آنزیم پلیمراس *Taq* و آنزیم پلیمراس *Pfu* از ترموسایکلر با برنامه تنظیمی (جدول ۲) انجام شد. دماهای مختلف اتصال پرایمر به الگو برای PCR آزمایش شد و دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای بهینه انتخاب شد. جایگاه‌های برشی پرایمرها در ابتدا و انتهای ژن طراحی شد و جایگاه برش آنزیم پروتئاز TEV بین لینکر INP و توالی VEvh10 قرار گرفت.

جدول ۱ توالی پرایمرها برای تکثیر ژن VEvh10 با کد دسترسی LC010469

	Sequence'5'→'3'	Tm (°C)
Forward primer	CCCAAGCTTGAGAATCTATATTTTCAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTC	69.7
Reverse primer	CCGCTCGAGCTATGAGGAGACGGTGAYCTGGGTC	68.3

جدول ۲ چرخه‌های دمایی کلونی PCR این پژوهش

⁴ Nickel-Nitrilotriacetic Acid

⁵ Polymerase chain reaction

¹ Ice nucleation protein

² DNA Ladder

³ Protein Marker

Steps	Reaction	Taq polymerase		Pfu	
		Temperature °C	Time	Temperature °C	Time
1	Initial denaturation	95	6 min	95	5 min
2	Denaturation	95	30 Sec	95	30 Sec
3	Annealing	64-51	30 Sec	61-67	30 Sec
4	Extension	72	1 min	72	2 min

بر روی محیط Agar LB حاوی ۱۰۰ mg/ml آمپی سیلین بررسی شد.

به منظور بیان پروتئین سازه‌ی ژنی، یک کلونی از باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب بیانی به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با هوادهی مطلوب (۲۵۰ rpm) انکوبه شد. سپس، یک میلی‌لیتر باکتری رشد کرده به ۵۰ میلی‌لیتر محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک انتقال داده شد و تا افزایش جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶، در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. نهایتاً، بیان در غلظت ۱ میلی مولار IPTG طی مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس، محصول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و رسوب به دست آمده تا زمان انجام آزمایشات اصلی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای کسب اطمینان از بیان پروتئین از الکتروفورز SDS-PAGE احیایی / غیراحیایی استفاده شد. SDS-PAGE با استفاده از ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲/۵ درصد در شرایط غیر احیایی و براساس روش Laemmli انجام شد [۲۳].

۲-۴ بیان وخالص سازی VEGF₈₋₁₀₉ نوترکیب در سویه شافل

پلاسمید pET-28a حاوی ژن VEGF₈₋₁₀₉ (دومین اتصالی به رسپتور VEGF) در سلول‌های باکتریایی *E. coli*

قطعه ژنی VEvh10 که با PCR توسط آنزیم *pfu* تکثیر و از ژل استخراج شد و همزمان با وکتور pET-21a حاوی لینکر INP هضم آنزیمی^۱ با آنزیم‌های برشی *HindIII* و *XhoI* انجام شد. پاک سازی آن با استفاده از کیت تجاری پاکسازی محصول آنزیمی^۲ انجام شده است. فرایند الحاق^۳ قطعه ژنی مذکور به وکتور مورد نظر با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase انجام شد. پس از آن محصول الحاق به مدت یک شب در دمای ۴°C انکوبه شد. محصول حاصل به باکتری *E. coli* DH-5α منتقل شد^۴ و برای تأیید الحاق ژن به داخل وکتور، بر روی پلیت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. در نهایت کلونی‌های تکثیر یافته، وارد مرحله Colony PCR شدند، که از پرایمرهای اختصاصی مربوط به VHH و پرایمرهای T7 پروموتور و ترمیناتور استفاده شد. محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز ۱ درصد آنالیز و کلونی‌های مثبت نوترکیب غربال و کشت شدند. پلاسمید نوترکیب توسط کیت استخراج پلاسمید تخلیص شد. برای تأیید ورود قطعه ژنی به درون پلاسمید، هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی انجام شد.

۲-۳ بیان سازه ژنی InaK-N_TEV Protease

پلاسمید PET-21a حاوی INP و VHH با روش شوک حرارتی به میزبان بیانی *E. coli* BL21(DE3) انتقال داده شد. صحت انتقال با جداسازی کلنی‌های رشد کرده

^۴ Transformation

^۱ Double digest

^۲ Clean up

^۳ Ligation

استفاده از روش بردفورد و BSA به‌عنوان پروتئین استاندارد تعیین شد [۲۶].

۲-۵ کشت سلول

سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسانی^۲ (HUVEC) در فلاسک T25 با استفاده از محیط (DMEM (Dulbecco's Eagle Medium Modified) حاوی ۵ میلی مولار گلوکز و با افزودن L-گلوتامین ۲ میلی مولار، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی^۳ و ۱ درصد پنی سیلین ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر با حضور CO₂ ۵ درصد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده و برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

۲-۵ سنجش تکثیر سلول‌های اندوتلیال HUVECs در شرایط آزمایشگاهی

برای بررسی اثر VEGF₈₋₁₀₉ بر رشد و تکثیر HUVEC از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد [۱۲]. تعداد 5×10^3 سلول در چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. پس از اتصال سلول‌ها طی ۲۴ ساعت، محیط کشت با محیط تازه حاوی پروتئین VEGF₈₋₁₀₉-RBD در غلظت‌های مختلف (۱۰، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰ نانوگرم در میلی لیتر) جایگزین و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. برای هر تیمار سه سنجش مستقل انجام شد. برای تعیین تکثیر سلولی، سلول‌ها با غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر MTT به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت تیمار قرار گرفته و سپس محیط به دقت خارج شد. بلورهای فورمازان در ۱۰۰ میکرولیتر DMSO حل شدند و جذب در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از پلیت ریدر μ Quant, BioTek (آمریکا) خوانش شد.

۲-۷ سنجش ایمنی مبتنی بر ELISA^۴

BL21 (DE3) ترانسفورم و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب در محیط Terrific Broth (TB) حاوی ۱۰۰ mg/ml کانامایسین کشت داده شد. سپس، با غلظت ۰/۵ میلی مولار از IPTG در ۰/۶: OD₆₀₀، القاء و به مدت ۲۲ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند [۲۴]. پس از سانتریفیوژ (۵۰۰۰g، ۱۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد) سلول‌های باکتریایی در بافر لیز حاوی ۵۰ میلی مولار NaH₂PO₄، ۳۰۰ میلی مولار NaCl، ۱۰ میلی مولار ایمیدازول، ۱ میلی مولار PMSF^۱ با (pH: ۸) سونیکیت شدند. محصول سونیکاسیون مجدداً در rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی با استفاده از روش SDS-PAGE آنالیز شد [۲۵].

تخلیص پروتئین‌ها به روش کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون نیکل آگارز انجام شد. برای این کار، نمونه پروتئینی روی ستونی که قبلاً توسط بافر شستشو (Tris-base (50 mM, pH 8.0) + NaCl (300 mM) + Imidazole (20 mM) به تعادل رسیده بود انتقال داده شد. در این مرحله با استفاده از این بافر، پروتئین‌هایی که به دلیل فقدان دنباله هیستیدینی توانایی اتصال به ستون را نداشتند، شسته شده و از ستون خارج شدند. تنها پروتئین مورد نظر به علت وجود دنباله هیستیدینی به ستون متصل باقی ماند. سپس، به کمک بافر جدا کننده (Tris-base (50 mM, pH 8.0) + NaCl (300 mM) + Imidazole (250 mM) در حضور غلظت بالای ایمیدازول عمل جداسازی پروتئین‌ها انجام شد. همچنین، برای جلوگیری از تخریب گرمایی پروتئین‌ها، تخلیص با استفاده از بافرهای سرد انجام شد. به دنبال آن دیالیز در بافر PBS حاوی گلیسرول در طول شب در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام و با استفاده از SDS-PAGE غیراچایی آنالیز شد. غلظت پروتئین با

³ Fetal Bovine Serum

⁴ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

¹ phenylmethylsulfonyl fluoride

² Human umbilical vein endothelial cells

ابتدا سلول باکتری بیان کننده سطحی VHH تو سطر لنگر JNP، در بافر کربنات-بی کربنات (pH: ۹/۶) (0.1M) $(\text{Na}_2\text{CO}_3, 0.1 \text{ M NaHCO}_3)$ تهیه شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سلول باکتری حاوی لینکر INP-VEvhh10 به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از ۱۶ ساعت محلول رویی تخلیه شده و سه مرتبه با ۱۰۰ میکرولیتر از بافر PBS شسته شد. مرحله مسدود سازی با بافر PBS حاوی ۲ درصد ژلاتین به حجم ۳۵۰ میکرولیتر انجام شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس، بافر بلاکینگ تخلیه و با ۱۰۰ میکرولیتر از بافر PBST (PBS+0.05% Tween-20) ۳ بار شستشو شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های سریالی VEGF (از ۵۰۰ تا ۰/۵) نانوگرم بر میلی لیتر) به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از انکوبه سیون همه چاهک‌ها تخلیه و با بافر PBST سه بار به خوبی شستشو شد ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی مونوکلونال انسانی ضد

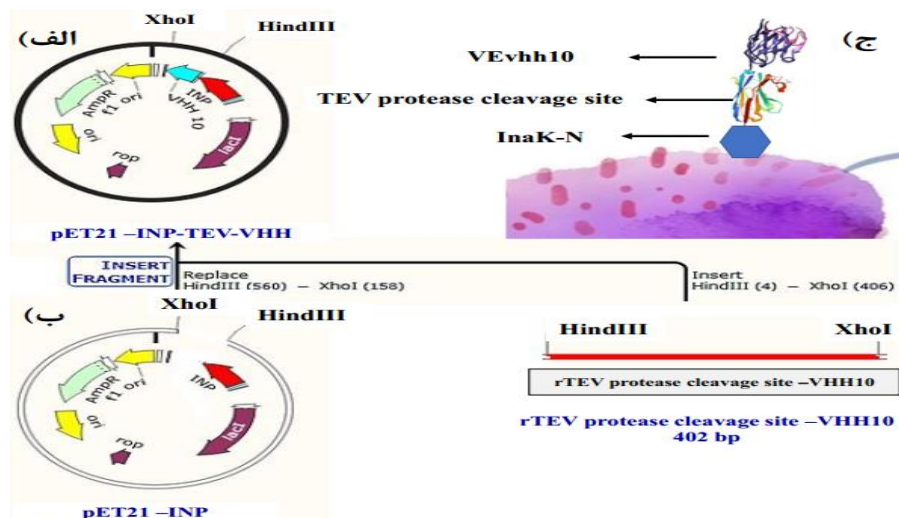
VEGF با غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر به چاهک‌ها اضافه شد و پس از شستشو با PBST با حجم ۱۰۰ میکرولیتر، آنتی بادی Anti-Human IgG میکرولیتر، ۱۰۰ کانزوجه به HRP به هر چاهک اضافه شده و در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت و نیم انکوبه شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر TMB^۱ و H_2O_2 به هر چاهک اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ نرمال به هر چاهک اضافه شد. در نهایت جذب چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

۳- نتایج

۱-۳ طراحی و همسانه سازی ژن pET-21a- Ina_K

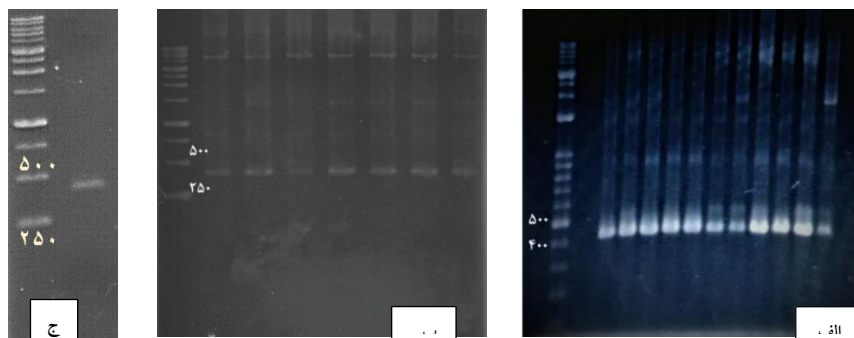
537-TEV-VEvhh10

طراحی از سازه ژنی pET-21a- Ina_K 537-TEV-VEvhh10 با استفاده از نرم افزار Snapgene.v5.1.5 به صورت شماتیک در شکل ۱ ارائه شده است.

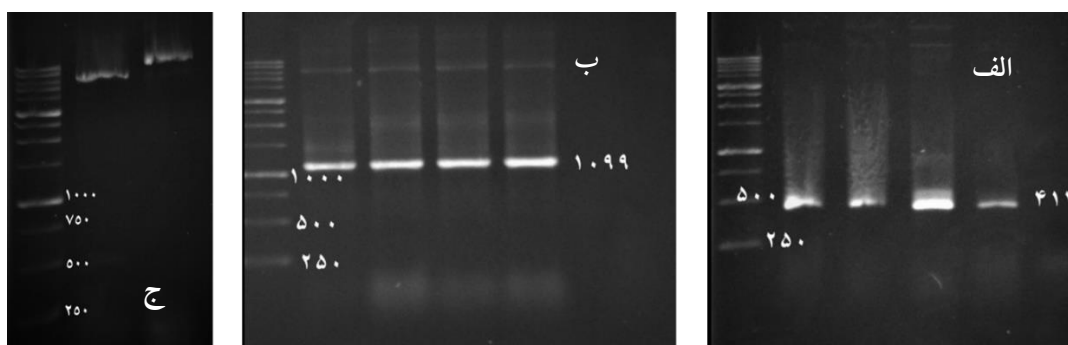


شکل ۱ الف) طراحی و سنتز سازه pET-21a- Ina_K 537-TEV-VEvhh10. ب) تصویر شماتیک پلاسمید pET-21a حاوی Ina_K 537 که به صورت خطی طبق برش با آنزیم‌های *XhoI* و *HindIII* طراحی شد و محصول نهایی PCR (TEV-VEvhh10) در قسمتی که جایگاه برش آنزیم پروتئاز TEV که قبل از توالی VEVhh10 است اضافه شد که طول آن ۴۰۲ جفت باز است. ج) شکل شماتیکی بیان سطحی VEVhh10 با استفاده از پروتئین هسته‌زایی یخ در میزبان *E. coli*

^۱ Tetramethylbenzidine



شکل ۲ الف) محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز گرادیان با آنزیم *Taq* پلیمرز. چاهک‌ها به ترتیب از چپ به راست DNA Ladder، محصولات PCR برای دماهای Annealing ۶۴، ۶۲، ۶۱، ۵۹، ۵۸، ۵۷، ۵۵، ۵۳، ۵۲، ۵۱ درجه سانتی‌گراد. ب) گرادیان PCR آنزیم پلیمرز *pfu*. چاهک‌ها به از چپ به راست DNA ladder، دماهای Annealing ۶۱ تا ۶۷ درجه سانتی‌گراد. ج) محصول PCR آنزیم *pfu* پس از هضم دوگانه و پاکسازی محصول



شکل ۳ بررسی پلاسمیدها با پرایمرهای اختصاصی VHH الف) و پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator ب) حاصل از استخراج‌های مختلف. ج) تایید فرایند الحاق ژن VHH به پلاسمید pET-21a حاوی INP، به ترتیب از سمت چپ DNA ladder، هضم دوگانه پلاسمید با آنزیم‌های (*HindIII*, *XhoI*) و نمونه کنترل مثبت حاوی پلاسمید بدون هضم دوگانه

لینکر INP با فرایند هضم توسط آنزیم‌های برشی *HindIII* و *XhoI* خطی شد و برای فرایند الحاق خالص شد. پس از الحاق، محصول مورد نظر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ ساعت انکوبه و وارد باکتری شد. محصول ترانسفرم بر روی پلیت آمپی‌سیلین کشت داده شد. نمونه‌های مثبت جدا شده و با استفاده از colony PCR از نظر ورود ژن تأیید شدند. سپس در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شده و از پلاسمید استخراج شده بعنوان الگو برای تکثیر ژن هدف و سازه ژنی حاوی INP استفاده شد. سپس، بر روی محصول

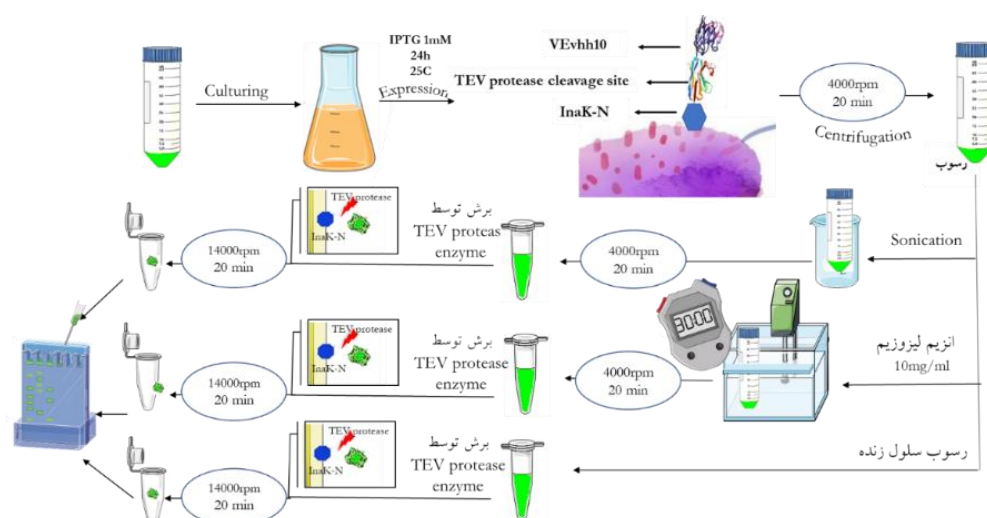
ابتدا پلاسمید pComb3X حاوی توالی ژن VEvh10 به شماره LC010469 در بانک اطلاعاتی GenBank ثبت شده که از باکتری *E. coli* TG توسط کیت (Gene All) استخراج شده است. سپس پلاسمید، به‌عنوان الگویی برای تکثیر ژن هدف توسط دستگاه ترمو سایکلر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن هدف، *Taq* DNA polymerase (شکل ۲-الف) و *pfu* polymerase (شکل ۲-ب) استفاده شد. پس از فرایند تکثیر، محصول PCR بوسیله هضم آنزیمی به منظور ایجاد انتهای چسبان آماده و خالص شد (شکل ۲-ج). همچنین، وکتور pET-21a حاوی

باشد. برای بررسی بیان سطحی VHH، رسوب باکتری پس از بیان به ۳ قسمت تقسیم شد. بروی قسمت اول سونیکاسیون انجام شد قسمت دوم با آنزیم لیزوزیم هضم شد و قسمت سوم به صورت سلول کامل باقی ماند (شکل ۴). هر کدام از این بخش‌ها با آنزیم پروتئاز TEV نیز تیمار شد و نتایج حاصل در ژل الکتروفورز SDS-PAGE غیراحیایی نشان داده شد (شکل ۴). ظهور باند در محدوده ۳۳ کیلوالتون در SDS-PAGE برای رسوب و سوپ باکتری لیز شده که با IPTG القا شده است در مقایسه با نمونه شاهد نشان دهنده بیان این پروتئین است. چاهک‌های ۱، ۳ و ۵ باند مربوطه به پروتئین بیان شده سطحی در حضور TEV پروتئاز است که نشان می‌دهد باند TEV پروتئاز ضعیف و باند اضافی ۱۹ کیلوالتون مربوط به INP ظاهر شده است در حالی که چاهک‌های ۲، ۴ و ۶ باندهای مربوط به پروتئین بیان شده سطحی در عدم حضور TEV پروتئاز هستند که این باندها نسبت به حالت قبلی قوی تر است. همچنین به دلیل عدم برش با TEV پروتئاز باند مربوط به INP ظاهر نشده است. این نتایج حاکی از آن است که بیان سطحی VEvh10 موفقیت آمیز بوده است (شکل ۵).

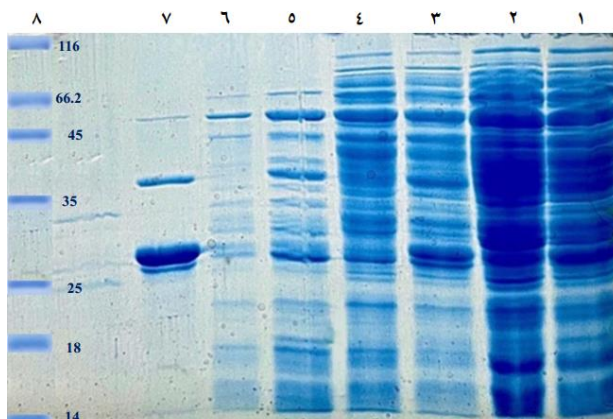
استخراج پلاسمید، PCR با پرایمرهای Forward و Reverse ژن VEvh10 (شکل ۳-الف) و همین طور Forward و T7 Reverse پروموتور و ترمیناتور پلاسمید قرار داده شد (شکل ۳-ب). پلاسمید بوسیله آنزیم‌های *HindIII* و *XhoI*، هضم دوگانه آنزیمی شد و ژن مورد نظر بروی ژل مشاهده شد (شکل ۳-ج) پس از بررسی، نتایج حاکی از موفقیت و تأیید کلونینگ بود.

۲-۳ تأیید بیان سطحی

سازه Ina_K 537-TEV-VEvh10 از سه قسمت تشکیل شده است؛ ۵۳۷ جفت باز ابتدایی ژن مربوط به InaK از باکتری *Pseudomonas syringae* با عدد دسترسی KCTC1832 که پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۱۹ کیلوالتون را کد می‌کند، ژن مربوط به مونوبادی VEvh10 با عدد دسترسی LC010469 که به اندازه ۳۷۲ جفت باز می‌باشد و پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۱۴ کیلوالتون را کد می‌کند و توالی کدکننده مربوط به جایگاه برش آنزیم پروتئاز TEV با ۲۱ جفت باز. بنابراین وزن مولکولی سازه نو ترکیب InaK-N _TEV Protease Cleavage Site _VEvh10 در حدود ۳۳ کیلوالتون می



شکل ۴ شمای کلی روند انجام شده برای بررسی نمایش سطح سلولی EVvh10 در باکتری *E. coli*



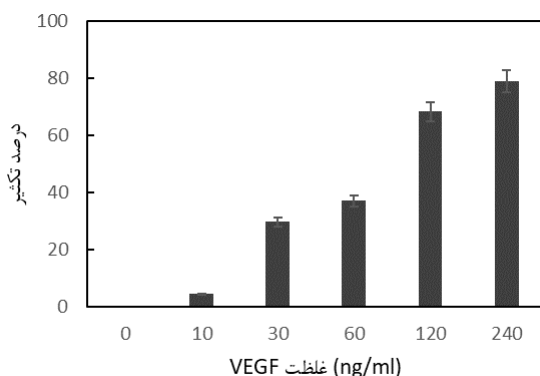
شکل ۵ ستون (۱، ۳، ۵) شامل رسوب سلول زنده، سونوکیت و لیز شده با وجود آنزیم پروتئاز، نمونه ستون (۲، ۴، ۶) رسوب سلول زنده، سونوکیت و لیز شده بدون آنزیم پروتئاز، ستون ۷ (TEV پروتئاز) و ستون ۸ مارکر پروتئین

۳-۳ بررسی اتصال VHH به VEGF

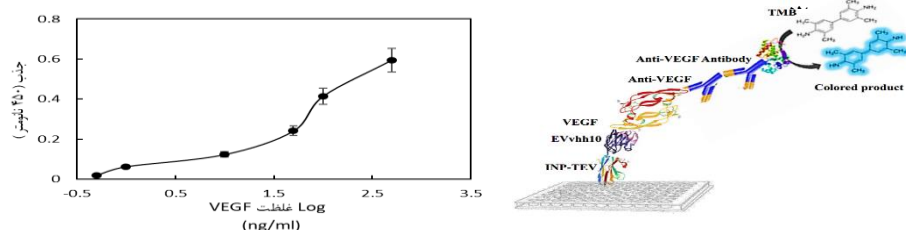
پیش از بررسی قابلیت اتصال VHH بیان شده در سطح باکتری ابتدا فعالیت $VEGF_{8-109}$ نوترکیب تولید شده، از طریق اثر آن روی رشد و تکثیر سلول‌های اندوتلیال رگی بندناف انسانی به روش MTT بررسی شد. همانطور که در شکل ۶ مشخص است تکثیر سلول‌ها با افزایش غلظت $VEGF_{8-109}$ نوترکیب به خوبی انجام شده به طوری که در غلظت ۲۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از آن، جمعیت سلولی به حدود ۸۰ درصد نسبت به نمونه‌ای که فاقد $VEGF_{8-109}$ می‌باشد رسیده است. بنابراین VEGF نوترکیب تولید شده

دارای فعالیت زیستی بوده و می‌تواند در تست‌های سنجش VHH استفاده شود.

برای بررسی توانایی اتصال $VEvhh10$ به VEGF از تست ایمنی مبتنی بر ELISA مطابق روش ذکر شده، استفاده شد (شکل ۷-الف). نتایج حاصل از منحنی دوز-پاسخ $EVvhh10$ بیان شده در سطح باکتری با استفاده از روش ELISA (شکل ۷-ب) نشان داد که با افزایش غلظت VEGF تعداد بیشتری از مولکول‌های ضد VEGF به آن متصل شده که این امر منجر به افزایش جذب نوری می‌شود.



شکل ۶ اثر غلظت $VEGF_{8-109}$ نوترکیب بر رشد سلول‌های اندوتلیال رگی بندناف در غلظت‌های مختلف



شکل ۷ الف) طرح شماتیک سنجش ایمنی مبتنی بر ELISA برای سنجش غلظت VEGF با استفاده از سلول باکتری نمایش سطحی (EVvhh10). ب) منحنی دوز-پاسخ EVvhh10 بیان شده در سطح باکتری الیزا برای تشخیص VEGF.

۴- بحث

ریزی سلولی، موجب افزایش تکثیر و مهاجرت و بقای سلول‌ها می‌شوند [۲۷، ۲۸].

فاکتورهای رشد متعددی در القاء پدیده رگ‌زایی نقش ایفا می‌کنند که مهمترین و کلیدی ترین آنها فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF) است. بیان این پروتئین همودایمر در تمامی شرایط پاتولوژیک به شدت افزایش می‌یابد. ۶۰ درصد سلول‌های سرطانی نیز با چنین راهکاری یعنی بیان و تولید بالای VEGF، رشد و متاستاز تومور را فراهم می‌کنند. این فاکتور آنژیوژنیک ضمن القاء تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال، افزایش نفوذپذیری رگی، القاء بیان پروتئازها و گیرنده‌های آنها شرایط لازم برای وقوع رگ‌زایی را فراهم می‌کند [۹]. با توجه به نقش اساسی VEGF به‌عنوان حیاتی‌ترین فاکتور دخیل در پدیده رگ‌زایی، این مولکول در زمره اهداف درمانی کلیدی قرار گرفته و مطالعات بسیاری در زمینه مهار آن انجام شده است. از استراتژی‌های مهار VEGF می‌توان به تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه VEGF و گیرنده‌های آن، طراحی موتانت‌های آنتاگونیست VEGF، آنتاگونیست گیرنده VEGF، گیرنده‌های محلول، مهارکننده‌های گیرنده‌های تیروزین کینازی، استراتژی‌های آنتی‌سنس و تولید آپتامر علیه VEGF اشاره کرد. فعالیت VEGF به اتصال آن به گیرنده خود ارتباط دارد. VEGF از طریق اتصال به دو گیرنده تیروزین کینازی (VEGFR-I Flt-1) و (Flk, KDR)

طبق آمارهای جهانی، سرطان یکی از مشکلاتی است که جامعه جهانی دست به گریبان آن است [۱۴]. علیرغم پیشرفت‌های بسیاری که در درمان و کنترل این بیماری حاصل شده است، هنوز نیاز به توسعه درمان‌های جدید در آن احساس می‌شود. چون سلول‌های سرطانی دارای مکانیسم‌های متنوعی برای فرار از درمان‌های توسعه‌یافته هستند. یکی از راهکارهایی که امروزه بسیار مورد توجه واقع شده است، مهار فرآیند رگ‌زایی است. گسترش سلول‌های توموری منوط به توسعه و ایجاد سیستم‌های رگی جدید است. پس از اینکه سلول‌های توموری به میزان کافی رشد خود کردند، در مرکز تومور به علت کاهش فشار اکسیژن و کمبود مواد غذایی، همچنین عدم دفع مواد زائد دچار مرگ می‌شوند. پس از این مرحله اگر سیستم رگی به سمت تومور گسترش پیدا کند، تومور رشد کرده و می‌تواند مراحل رشد خود را کامل کند. با توجه به اینکه این نیاز حیاتی (گسترش سیستم رگی)، تقریباً در طیف وسیعی از سرطان‌ها مشترک است، هدف مناسبی برای از بین بردن تومورهای تشکیل شده به شمار می‌آید. سلول‌های توموری به‌منظور ایجاد و توسعه سیستم رگی به سمت خود، اقدام به ترشح فاکتور رشد VEGF می‌کنند که با اثر بر سلول‌های اندوتلیال، موجب راه‌اندازی آبشارهای پیام‌رسانی در آنها شده و با تغییر الگوی برنامه

کامل، به علت خصوصیات استثنائی که از خود نشان می‌دهد، تمامی مشکلات مطرح شده در آنتی‌بادی‌های معمول و قطعات مهندسی شده را هموار کرده است. پایداری و حلالیت بالا، تولید آسان تر، اندازه کوچک، مقاومت قابل توجه نسبت به حرارت، دترجنت‌ها و پروتئازها، همولوژی زیاد با قطعه VHH انسانی، تمایل بالا به آنتی‌ژن، سهولت روند انسانی کردن و مهندسی آن به شکل‌های چند ظرفیتی از ویژگی‌های منحصر به فرد این آنتی‌بادی‌ها است. به دلیل اندازه مولکولی کوچک VHH‌ها در مقایسه با سایر آنتی‌بادی‌ها انتظار می‌رود نفوذ آن‌ها به تومورها و شبکه‌های چشم بیشتر باشد. از طرف دیگر مشخص شده، بیان VEGF در سلول‌های توموری مغز افزایش یافته و رگ‌زایی را در تومور مربوطه القا می‌کند. از میان آنتی‌بادی‌ها و قطعات منتج از آنها VHH‌ها تنها گزینه‌ای هستند که از سد خونی مغزی عبور می‌کنند. از اینرو گمان می‌رود VHH‌های با توان مهار VEGF قادر باشند رگ‌زایی را در تومورهای مغزی نیز مهار کنند [۱۵، ۳۳-۳۵].

با توجه به اهمیت فوق‌العاده مهار رگ‌زایی در درمان سرطان و سایر بیماری‌ها، موفقیت چشم‌گیر آنتی‌بادی مونوکلونال علیه VEGF در این زمینه و برتری VHH‌ها نسبت به سایر آنتی‌بادی‌ها و قطعات متصل شونده به آنتی‌ژن مشخص شده است. در این پژوهش برای تولید آنتی‌بادی VHH با اختصاصیت و تمایل بالا بر علیه VEGF در سیستم باکتری، سیستم بیان سطحی با استفاده از لینکر INP بکار گرفته شد. استفاده از سیستم نمایش سطحی دارای مزایای متعددی از جمله صرف هزینه پایین، بیان آسان و همچنین سهولت در کنترل شرایط بیان آن می‌باشد [۳۶].

در سال‌های اخیر، گزارش شده است که سیستم نمایش سطح سلولی محدودیت کمتری از نظر اندازه پروتئین‌هایی

VEGFR-II، القاء دایمیریزاسیون و فسفریلاسیون آن‌ها نقش بیولوژیک خود را ایفا می‌کند [۳، ۲۹، ۳۰]. در سال‌های اخیر درمان هدفمند به وسیله آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بسیار مورد توجه بوده و از مهم‌ترین و موفق‌ترین راهکارها در درمان بدخیمی‌های خونی^۱ و تومورهای توپر^۲ می‌باشد. از میان مکانیسم‌هایی که به وسیله آن‌ها آنتی‌بادی‌های مونوکلونال سلول‌های توموری را از بین می‌برند، می‌توان به تأثیر مستقیم آنتی‌بادی بر سلول توموری (به‌عنوان مثال از طریق بلوکه کردن گیرنده)، مکانیسم‌های کشنده سلولی به وسیله سیستم ایمنی و یا اثر اختصاصی یک آنتی‌بادی بر رگ‌زایی تومور اشاره کرد [۳۰].

با وجود مزایایی که آنتی‌بادی‌ها به‌عنوان داروهای زیستی در درمان هدفمند سرطان از خود نشان می‌دهند، معایبی نیز نظیر ایمونوژنیسیته، هزینه بالای تولید، اندازه بزرگ و به تبع آن عدم نفوذ مؤثر به بافت‌های توموری دارند [۱۴، ۱۵]. از ویژگی‌هایی که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای مؤثر واقع شدن در درمان سرطان باید داشته باشند، اختصاصیت، حلالیت بالا، پایداری و اندازه کوچک است. تلاش‌های بسیاری در راستای تولید قطعات آنتی‌بادی با اندازه کوچک، ضمن حفظ ویژگی اتصال به آنتی‌ژن صورت گرفته است که از دستاوردهای آنها تولید قطعاتی مانند scFv^۳ و Fab^۴ است. این قطعات نسبت به آنتی‌بادی‌های معمول برتری‌هایی مانند افزایش نفوذ توموری، کاهش ایمونوژنیسیته، تسهیل و تسریع تولید را دارند. اما به لحاظ جنبه‌های پایداری، بازده بیان، تجمع و مقاومت نسبت به پروتئازها نیازمند ارتقای بیشتری هستند [۱۵، ۳۱، ۳۲].

در خانواده شترسانان ایمونوگلوبولین‌های منحصر به فردی در سیستم ایمنی جاندار وجود دارند که فاقد زنجیره سبک هستند. دومین VHH این آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین ضمن حفظ توانایی اتصال به آنتی‌ژن در حد آنتی‌بادی

³ Single-Chain Variable Fragment

⁴ Fragment Antigen-Binding

¹ Haematological Malignancies

² Solid Tumor

به همین دلیل در این پژوهش از وضعیت انتهای آمینی InaK که حاوی ۵۳۷ جفت باز ابتدایی از Ina-K می‌باشد به‌عنوان موتیف لنگری برای نمایش VEvh10 در سطح سلول باکتری استفاده شده است [۱۳، ۲۲، ۳۸]. پژوهشی که در سال ۲۰۱۵ توسط شاهنگیان و همکاران در گروه تحقیقاتی، انجام شد. فازهای نمایش دهنده آنتی‌بادی‌های تک دومینی علیه ناحیه متصل شونده به گیرنده VEGF با توانایی اتصال به نواحی عملکردی کلیدی آن طراحی و ساخته شد. پس از تهیه کتابخانه نمایش فاژی^۱ نانوآبدی، غنی‌سازی^۲ و غربالگری^۳ VHH‌های رقابت‌کننده با VEGFR-II با استفاده از ELISA^۴ رقابتی انجام شد. VHH‌های مونوکلونالی که بیشترین تمایل اتصال به دومین متصل شونده به گیرنده VEGF را دارا بودند، تعیین توالی شدند و براساس فراوانی تکرارشان به ترتیب VEvh1، VEvh2 و VEvh3 (VEvh10) نام‌گذاری شدند. توالی ژن کدکننده آنها با شماره دسترسی به ترتیب LC010467، LC010468 و LC010469 در بانک اطلاعاتی GenBank ثبت شده است [۱۶].

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از سیستم نمایش سطحی و استفاده از لینکر INP برای بیان VEvh10 گزینه مناسبی است. این سیستم نیاز به تلاشی کردن سلول‌ها و روش‌های زمانبر و پرهزینه کروماتوگرافی را به طور کامل حذف می‌کند. با استفاده از این سیستم می‌توان پروتئین‌هایی که مستعد تجمع به فرم اجسام توده‌ای بوده (مانند VEvh10) یا دارای پیوند دی‌سولفیدی هستند را با کیفیت مطلوبی بیان کرد.

همچنین نتایج الیزا و تست تکثیر سلول (تست زنده‌مانی) مؤید این مطلب است که VEvh10 با تمایل بالا به ناحیه اتصال به گیرنده VEGF متصل می‌شود. در نهایت اطلاعات حاصل از این مطالعه، VEvh10 را به‌عنوان

که قادر به نمایش آنها هستند، داشته و نقصی در رشد سلول میزبان ایجاد نمی‌کنند. با این حال سیستم نمایش سطحی مبتنی بر INP مزیت‌های فراوانی نسبت به سایر سیستم‌های نمایش در سطح سلول دارند. بیان پروتئین‌های متصل به INP نه تنها منجر به از هم پاشیدگی ساختار غشا و یا نقص در رشد میزبان نمی‌شود، بلکه امکان بیان پایدار و انتقال تراغشایی در عرض غشای سلول باکتریایی را نیز فراهم می‌آورد [۲۲ و ۱۹ و ۱۳].

علاوه بر این طول ناحیه تکراری مرکزی در (INP) قابل حذف است. بنابراین امکان تولید پروتئین‌های الحاقی با طول کوتاه‌تر برای نمایش در سطح سلول فراهم می‌شود [۲۲].

با وجود محدودیتی که بیشتر سیستم‌های بیان سطحی از نظر اندازه پروتئین‌ها دارند، سیستم‌هایی که بر پایه INP هستند می‌توانند پروتئین‌هایی به بزرگی ۶۰ کیلودالتون را بیان کنند. INP به‌طور گسترده برای توسعه کاتالیست‌های زیستی سلولی استفاده می‌شود؛ زیرا که اولاً محدودیتی نسبت به اندازه پروتئین هدف جهت نمایش یافتن در سطح سلول ندارد و ثانیاً برای انتقال و نمایش سطحی پروتئین‌های در بردارنده چندین کوفاکتور یا محتوای پیوند دی‌سولفیدی مناسب است.

مطالعات انجام شده در مورد انواع واریانت‌های INP از وجود واریانت‌های متنوعی از این پروتئین لنگری Ina-K، Ina-Q، Ina-V، Ina-X و Ina-Z حکایت دارد. از میان این وار یا نت ها، Ina-K دارای بیشترین میزان کاربرد در سیستم‌های بیان سطحی می‌باشد. از سوی دیگر بررسی‌های انجام گرفته نشان داد که استفاده از کل توالی ژنی Ina-K در بیان سطح سلولی موفقیت آمیز نمی‌باشد و باعث ایجاد مشکل در نمایش سازه نوترکیب مذکور در سطح سلول باکتری می‌شوند [۳۷].

⁴ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

¹ Phage Display Library

² Panning

³ Screening

[10] Ferrara, N., (2004) *Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress*. Endocrine reviews. 25(4): p. 581-611.

[11] Bergers, G. and L.E. Benjamin, (2003) *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nature reviews cancer. 3(6): p. 401-410.

[12] Dreves, J., (2008) *VEGF and angiogenesis: implications for breast cancer therapy*. European Journal of Cancer Supplements. 6(6): p. 7-13.

[13] van Bloois, E., et al., (2011) *Decorating microbes: surface display of proteins on Escherichia coli*. Trends in biotechnology. 29(2): p. 79-86.

[14] Deschacht, N., et al., (2010) *A novel promiscuous class of camelid single-domain antibody contributes to the antigen-binding repertoire*. The Journal of Immunology. 184(10): p. 5696-5704.

[15] Cortez-Retamozo, V., et al., (2004) *Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate*. Cancer research. 64(8): p. 2853-2857.

[16] Shahangian, S.S., et al., (2015) *A conformation-based phage-display panning to screen neutralizing anti-VEGF VHHs with VEGFR2 mimicry behavior*. International journal of biological macromolecules. 77: p. 222-234.

[17] Bu, D., et al., (2013) *Expression and purification of a novel therapeutic single-chain variable fragment antibody against BNP from inclusion bodies of Escherichia coli*. Protein expression and purification. 92(2): p. 203-207.

[18] Yuasa, N., T. Koyama, and Y. Fujita-Yamaguchi, (2014) *Purification and refolding of anti-T-antigen single chain antibodies (scFvs) expressed in Escherichia coli as inclusion bodies*. BioScience Trends. 8(1): p. 24-31.

[19] Lee, S.Y., J.H. Choi, and Z. Xu, (2003) *Microbial cell-surface display*. Trends in biotechnology. 21(1): p. 45-52.

[20] Park, S.J. and J.R. Cochran, (2009) *Protein engineering and design*.: CRC press.

[21] Li, Q., et al., (2012) *Molecular characterization of an ice nucleation protein variant (inaQ) from Pseudomonas syringae and the analysis of its transmembrane transport activity in Escherichia coli*. International journal of biological sciences. 8(8): p. 1097.

[22] Bao, S., et al., (2015) *Construction of a cell-surface display system based on the N-terminal domain of ice nucleation protein and its application in identification of mycoplasma adhesion proteins*. Journal of applied microbiology. 119(1): p. 236-244.

[23] Laemmli, U.K., (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. nature. 227(5259): p. 680-685.

[24] Rezaei, S., et al., (2020) *Soluble overexpression, high-level production and purification of receptor binding domain of human*

کاندیدی مناسب برای مهار VEGF معرفی می‌کند که قادر است با بلوکه کردن مهمترین جایگاه عملکردی VEGF، اتصال آن را به گیرنده خود مهار کرده و به تبع آن مانع وقوع آبخشار پیام‌رسانی آن شود. تأیید این پیشنهاد نیازمند مطالعات و بررسی‌های بیشتر است.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس برای فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی کمال تشکر را دارند.

۵- منابع

[1] Matsumoto, T. and L. Claesson-Welsh, (2001) *VEGF receptor signal transduction*. Science's STKE, (112): p. re21-re21.

[2] Terman, B.I., et al., (1994) *VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor*. Growth Factors. 11(3): p. 187-195.

[3] Lange, C., et al., (2016) *Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases*. Nature Reviews Neurology. 12(8): p. 439-454.

[4] Ferrara, N., (2004) *Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy*. The oncologist. 9(S1): p. 2-10.

[5] Crawford, Y. and N. Ferrara, (2009) *VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies*. Cell and tissue research. 335(1): p. 261-269.

[6] Keyt, B.A., et al., (1996) *Identification of Vascular Endothelial Growth Factor Determinants for Binding KDR and FLT-1 Receptors: GENERATION OF RECEPTOR-SELECTIVE VEGF VARIANTS BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS (*)*. Journal of Biological Chemistry. 271(10): p. 5638-5646.

[7] Wiesmann, C., et al., (1997) *Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor*. Cell. 91(5): p. 695-704.

[8] Sousa Moreira, I., P. Alexandrino Fernandes, and M. Joao Ramos, (2007) *Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition-a critical review*. Anti-cancer agents in medicinal chemistry (formerly current medicinal chemistry-anti-cancer agents). 7(2): p. 223-245.

[9] Ghavamipour, F., et al., (2014) *Development of a highly-potent anti-angiogenic VEGF 8-109 heterodimer by directed blocking of its VEGFR-2 binding site*. The FEBS journal. 281(19): p. 4479-4494.

- recombinant antibodies*. *Molecular Immunology*. 44(6): p. 1307-1315.
- [32] Revets, H., P. De Baetselier, and S. Muyldermans, (2005) *Nanobodies as novel agents for cancer therapy*. *Expert opinion on biological therapy*. 5(1): p. 111-124.
- [33] Unciti-Broceta, J.D., et al., (2013) *Novel therapy based on camelid nanobodies*. *Therapeutic delivery*. 4(10): p. 1321-1336.
- [34] Chakravarty, R., S. Goel, and W. Cai, (2014) *Nanobody: the "magic bullet" for molecular imaging?* *Theranostics*. 4(4): p. 386.
- [35] Veggiani, G. and A. de Marco, (2011) *Improved quantitative and qualitative production of single-domain intrabodies mediated by the co-expression of *Erv1p* sulfhydryl oxidase*. *Protein expression and purification*. 79(1): p. 111-114.
- [36] Narang, A.S. and R.I. Mahato, (2010) *Targeted delivery of small and macromolecular drugs*: CRC press.
- [37] Kotrba, P., (2011) *Microbial biosorption of metals—general introduction*, in *Microbial biosorption of metals*. Springer. p. 1-6.
- [38] Kwak, Y.-D., S.-K. Yoo, and E.-J. Kim, (1999) *Cell surface display of human immunodeficiency virus type 1 gp120 on Escherichia coli by using ice nucleation protein*. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 6(4): p. 499-503.
- VEGF8-109 in E. coli*. *Process Biochemistry*. 96: p. 228-238.
- [25] Ramakrishnan, S., et al., (1996) *Free alanine, aspartic acid, or glutamic acid reduce the glycation of human lens proteins*. *Glycoconjugate journal*. 13(4): p. 519-523.
- [26] Bradford, N., (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of a protein isolated from red cell membranes*. *Anal. Biochem*. 72(248): p. e254.
- [27] Griffioen, A.W. and G. Molema, (2000) *Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation*. *Pharmacological reviews*. 52(2): p. 237-268.
- [28] Cao, Y. (2004) *Antiangiogenic cancer therapy*. in *Seminars in cancer biology*. Elsevier.
- [29] Tabernero, J., (2007) *The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents*. *Molecular cancer research*. 5(3): p. 203-220.
- [30] Scott, A.M., J.D. Wolchok, and L.J. Old, (2012) *Antibody therapy of cancer*. *Nature reviews cancer*. 12(4): p. 278-287.
- [31] Quintero-Hernández, V., et al., (2007) *The change of the scFv into the Fab format improves the stability and in vivo toxin neutralization capacity of*

Cell-surface displayed expression of single domain antibody against VEGF in *E. coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein (INP)

Salim Alhafyan¹, Zeynab Rezaei², S. Shirin Shahangian³, Reza H. Sajedi^{4*}

1- Ph.D student of Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Ph.D student of Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

4- Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

sajedi_r@modares.ac.ir

Receipt: 2023/01/24

Accepted: 2023/02/19

Abstract

Angiogenesis is involved in many physiological and pathological processes, including tumor growth, and VEGF is considered as the most important factor in this process. Nowadays, the production of single-domain antibodies (VHH) with the characteristic of inhibiting growth factors in cancer tumors is one of the new strategies for cancer treatment. In the previous research, it was found that camel VHHs isolated from phage display against VEGF play an essential role in inhibiting it. Here, the VHH that had the highest affinity for the VEGF was selected. Ice nucleation protein (INP) was used as anchoring motif for surface expression of *E. coli*, owing to the efficiency of its N terminal domain, this system is used to express the VHH. Accordingly, a construct harboring the first 537 nucleotide of InaK gene and nucleotide fragments of TEV protease recognition site and VEvh10 was designed to express this protein in the surface display of *E. coli* cells. The results showed that the INP anchor is a suitable candidate for promoting the surface expression of VEvh10 in *E. coli*. After expression of VEvh10, isolation and purification were performed using centrifugation and washing, and its binding to VEGF was investigated. The results showed that VEvh10 successful bind to VEGF and it can be used for therapeutic applications and clinical diagnosis of patients in the future.

Keyword: Bacterial Surface Display, Ice Nucleation Protein (INP), VHH, Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF)