



Cloning, Expression and Characterization of the Recombinant Protein Component of the Ectodomin Receptor of Bone Morphogenetic Protein Receptor in the Host of Prokaryotic

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Onagh B.¹ MSc,
Hasannia S.^{*1} PhD,
Heydari F.² PhD

How to cite this article

Onagh B, Hasannia S, Heydari F. Cloning, Expression and Characterization of the Recombinant Protein Component of the Ectodomin Receptor of Bone Morphogenetic Protein Receptor in the Host of Prokaryotic. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):455-463.

¹Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Animal Biotechnology Department, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116

Phone: +98 (21) 82884744

Fax: +98 (21) 82884717

hasannia@modares.ac.ir

Article History

Received: September 23, 2018

Accepted: November 5, 2018

ePublished: September 21, 2019

ABSTRACT

Bone morphogenetic proteins (BMPs) belong to the superfamily transforming growth factor-beta. These molecules play a role in fetal development and differentiation of different cells. In this regard, two homodimer molecules BMP-2 and BMP-7 play an important role in the formation of ectopic bone So that two types of recombinant form are available for ectopic use. After binding of the homodimer BMP-2 to its receptor at the cell surface, the accumulation of homodimers of type I and II receptors results in a biological response within the cell. Despite the existence of recombinant types of BMP-2 and BMP-7 due to the dangers of their use, the strategy of using monoclonal antibodies to trap endogenous types is still a priority in research programs. Instead of using monoclonal antibodies, the alternative method is to use the natural receptors of the ligand in the body. In this regard, due to the proper Kd binding of the ectodomain component of the receptor II of the BMP molecule in this project, the expression and purification of this part were attempted to trap BMP-2 endogenous. The protein component of the type II receptor ectodomain was expressed and purified by the bacterial host, which, by evaluating CD, of this recombinant protein showed a similar structure to that of the natural type. Also, its binding to the BMP-2 ligand with ELISA was evaluated and then calculated as Kd. Based on the results, the type II receptor ectodomain can be connected to the BMP-2 with a suitable binding property at the nM concentration, and in subsequent studies, it can be used as an alternative to a monoclonal antibody to Trap endogenous BMP molecules.

Keywords BMP-2; BMPRII; Monoclonal Antibody

CITATION LINKS

[1] Bone: formation by ... [2] Controlling cell fate by bone morphogenetic protein ... [3] The application of bone morphogenetic proteins to periodontal and peri-implant tissue regeneration: a literature ... [4] Bacterial expression and purification of the ovine type II bone morphogenetic protein receptor ... [5] The bone morphogenetic protein system in mammalian ... [6] Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and ... [7] Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic ... [8] Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic ... [9] A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 ... [10] Antibody-mediated osseous regeneration: a novel strategy for bioengineering bone ... [11] Antibody-mediated osseous regeneration: the early events in the healing ... [12] Effects of the orientation of anti-BMP2 monoclonal antibody immobilized on scaffold in antibody-mediated osseous ... [13] Antibody administration for bone tissue engineering: a systematic ... [14] High resolution structures of the bone morphogenetic protein type II receptor in two crystal ... [15] Development of a recombinant bacterial expression system for the active form of a human transforming growth factor β type II receptor ligand binding ... [16] Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex ... [17] The unglycosylated extracellular domain of type-II receptor for transforming growth ... [18] Characterization of the extracellular ligand-binding domain of the type II activin ... [19] Structure of the ternary signaling complex of a TGF- β superfamily ... [20] The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature ... [21] Refolding of recombinant ... [22] Advances in refolding of proteins produced ... [23] Affinity measurements by competition ... [24] Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF- β superfamily and Runx ... [25] The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone ... [26] BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for ... [27] The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue ... [28] The crystal structure of the BMP-2: BMPRII complex and the...

کلونینگ، بیان و تعیین ویژگی پروتئین نو ترکیب بخش اکتودومین گیرنده پروتئین مورفوژنتیک استخوان در میزبان پروکاریوتی

بهمن اوق MSc

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

صادق حسن‌نیا PhD

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

فرید حیدری PhD

گروه زیست‌فناوری دامی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تهران، ایران

چکیده

پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوانی (BMPs) متعلق به سوپرفامیلی فاکتور ترنسفورم‌کننده رشد بتا هستند. این مولکول‌ها در رشد و تکوین جنینی و همچنین تمایز سلول‌های مختلف نقش ایفا می‌کنند. در این خصوص دو مولکول همودایمر BMP-2 و BMP-7 نقش مهمی در تشکیل اکتوپیک استخوان دارند به‌طوری که دو نوع نو ترکیب آن به‌صورت استفاده اکتوپیک در دسترس هستند. بعد از اتصال همودایمر BMP-2 به گیرنده خود در سطح سلول، تجمع همودایمرهای نوع I و II گیرنده آن منجر به ایجاد پاسخ بیولوژیک در داخل سلول می‌شود. علی‌رغم وجود انواع نو ترکیب BMP-2 و BMP-7 به‌دلیل خطرات ناشی از استفاده از آنها هنوز استراتژی استفاده از انواع آندوژن از طریق به‌دام‌انداختن با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در محل ضایعه استخوانی در اولویت برنامه‌های تحقیقاتی است. روش جایگزین دیگر به‌جای استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده از گیرنده‌های طبیعی این لیگاند در بدن است. در این رابطه با توجه به K_d مناسب اتصال بخش اکتودومین گیرنده II مولکول BMP-2 در این پروژه اقدام به بیان و تخلیص این قسمت با هدف به‌دام‌انداختن BMP-2 آندوژن شد. قطعه پروتئینی اکتودومین گیرنده نوع II در میزبان باکتریایی بیان و تخلیص شد که با ارزیابی CD این پروتئین نو ترکیب حاکی از ساختار مشابه با نوع طبیعی آن بود. همچنین ارزیابی اتصال آن به لیگاند BMP-2 با الایزا مورد بررسی قرار گرفت و در ادامه K_d آن محاسبه شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده، بخش اکتودومین گیرنده نوع دو می‌تواند با ویژگی اتصال مناسب در غلظت نانومولار به BMP-2 متصل شود و در مطالعات بعدی می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین به‌جای آنتی‌بادی مونوکلونال برای به‌دام‌اندازی مولکول‌های BMP آندوژن مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: BMP-2، BMPR-II، آنتی‌بادی مونوکلونال

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۴

*نویسنده مسئول: hasannia@modares.ac.ir

مقدمه

پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوانی (BMPs)، متعلق به سوپرفامیلی فاکتور ترانسفورم‌کننده رشد بتا (TGF- β) هستند. این سایتوکاین‌ها اولین‌بار از طریق توانایی آنها در القای اکتوپیک تشکیل استخوان و غضروف شناسایی شدند. تاکنون از این خانواده بالغ بر ۲۰ نوع پروتئین شناخته و تعیین خصوصیت شده است که توانایی متفاوتی در القای استخوان یا غضروف دارند^[1]. BMPها، فاکتورهای رشد چندعملکردی هستند که از طریق اتصال به

گیرنده‌های نوع I و II (BMPR-I, II) نقش مهمی در تشکیل الگوی جنینی و همچنین رشد، تکوین و بقای انواع مختلفی از سلول‌ها از جمله استخوان را دارند، با این وجود نقش اصلی آنها در القای بافت استخوان است^[2,3]. مطالعات پیشین روی موش‌های ناک‌اوت‌شده نشان داده است که فقدان BMPR-I منجر به ناهنجاری‌های تکوینی شدید می‌شود، در حالی که فقدان گیرنده نوع II بیشتر برای تمایز اپی‌بلاست و القای مزودرم ضروری است^[4].

یک مولکول BMP قادر است به انواعی از گیرنده‌ها و همچنین یک گیرنده نیز می‌تواند به انواع مختلف از BMPها اتصال یابد. BMPR-II به‌صورت اختصاصی تنها به مولکول‌های BMP از جمله BMP-2، BMP-4، BMP-6، BMP-7، GDF-5، GDF-9 و BMP-15 متصل می‌شود^[5]. هر چند که این لیگاندها در شرایط طبیعی تمایل پایین‌تری برای اتصال به BMPR-II نسبت به BMPR-I دارند^[6,7]، اما مطالعات دیگری نشان داده‌اند که در شرایط افزایش بیان BMPR-II همراه با BMPR-I، تمایل این لیگاندها برای اتصال به آن به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد^[5].

پروتئین نو ترکیب (Infuse (R)، یک BMP-2 نو ترکیب انسانی (rhBMP-2) است که از سازمان غذا و داروی آمریکا برای بازسازی استخوان‌ها در موارد خاص تایید شده است. با وجود این که این دارو گزینه جدیدی برای جایگزینی پیوند استخوان اتولوگ فراهم کرده است^[8,9]، با این حال کاربرد بالینی این فاکتورهای رشد نو ترکیب با توجه به (الف) هزینه بالا تولید و نیاز به استفاده از در دوزهای فوق فیزیولوژیک آن برای استخوان‌سازی (میکروگرم در مقابل پیکوگرم)، (ب) ناتوانی در حفظ غلظت آنها در مدت‌زمان طولانی و (ج) فعالیت بیولوژیک کمتر rhBMP-2 نسبت به فرم آندوژن آن (احتمالاً به‌دلیل تفاوت در تغییرات بعد از ترجمه؛ PTMs) هنوز مورد استقبال عمومی جراحان واقع نشده است^[10].

بیشتر فرآیندهای بیولوژیک توسط ایجاد شرایط زمانی و مکانی توسط ریزمحیط خود انجام می‌شود. بنابراین استفاده از تنها یک عامل رشد اگرژن نمی‌تواند شرایط ایده‌آل برای بهبود را تضمین کند. استفاده از استراتژی بازسازی استخوانی به‌واسطه آنتی‌بادی (AMOR) جایگزینی برای rhBMP-2 اگرژن، برای به‌دام‌اندازی BMP-2های درون‌ساخت (آندوژن) در بافت هدف است که با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تثبیت‌شده روی داربست جامد قابل انجام است^[10-12]. بررسی‌های "درون شیشه" نشان داده است که تنها برخی از این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند بدون ایجاد تغییر در اتصال BMP-2 به رسیپورهایش، به BMP-2 متصل شوند. علاوه بر این، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مورد استفاده در روش AMOR، هنوز هزینه تولید بالا و احتمال پاسخ ایمنی موضعی یا سیستماتیک را در میزبان دارد^[13]. علاوه بر روش AMOR، استفاده از پروتئین‌های جایگزین آنتی‌بادی با قابلیت تثبیت بر گرافت‌های سنتتیک شاید بتواند ضمن دارابودن مزایای استفاده از آنتی‌بادی، فاقد معایب احتمالی آن باشد ولی هنوز استفاده از این نوع پروتئین‌ها به‌عنوان جایگزینی برای AMOR معرفی نشده است، از

آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شد. کلونی‌های رشد کرده حاوی وکتور نوترکیب مورد نظر برای استخراج پلاسمید در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد، سپس به کمک کیت استخراج پلاسمید GF-1 (ویوانتیس؛ مالزی) وکتور pUC-BMPR-II از باکتری *E. coli* DH5α استخراج شد.

تکثیر توالی بخش اکتودومین BMPR-II: به‌منظور ساب‌کلونینگ توالی اکتودومین BMPR-II در وکتور بیانی pET-21 b، ابتدا پرایمرهای اختصاصی به‌منظور تکثیر قطعه مورد نظر و همچنین درج جایگاه‌های برش برای دو آنزیم محدودکننده (*XhoI* و *Nde1*)، اسیدآمین سستین و توالی His-Tag طراحی شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به‌منظور تکثیر توالی مورد نظر با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده از روی وکتور pUC-BMPR-II صورت گرفت:

توالی پرایمر رفت:

5'-CCCCATATGAGCCAAAACCAAGAGCG-3'

توالی پرایمر برگشت:

5'-GGGCTCGAGTTAGCAATGATGATGATGATGATG
CGTTTCATCGCGGTTAAA-3'

توالی‌های ذکرشده برای تکثیر و انتقال ژن مورد نظر به وکتور بیانی استفاده شدند. برنامه اجرای PCR شامل ۳۰، ۳۰ و ۴۵ ثانیه به‌ترتیب برای مراحل واسرشتی، اتصال و پلیمریزاسیون برای ۳۵ چرخه انجام شد.

ساب‌کلونینگ توالی اکتودومین BMPR-II در وکتور بیانی pET-

21 b: وکتور بیانی pET-21 b به داخل باکتری *E. coli* DH5α ترانسفورم و بعد از تکثیر باکتری در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، با استفاده از کیت استخراج پلاسمید GF-1 استخراج شد. وکتور بیانی pET-21 b استخراج‌شده و قطعه حاصل از PCR از روی وکتور pUC-BMPR-II، با استفاده از دو آنزیم محدودکننده *XhoI* و *Nde1* مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. وکتور برش‌خورده pET-21 b از ژل آگارز استخراج و همراه با قطعات حاوی توالی اکتودومین BMPR-II بعد از هضم آنزیمی، عمل اتصال قطعات با استفاده از آنزیم لیگاز T4 به مدت یک شب و در دمای ۴°C انجام شد. پلاسمید نوترکیب pET-21 b/BMPR-II به روش شیمیایی به داخل باکتری *E. coli* BL21 (DE3) ترانسفورم شد. باکتری ترانسفورم‌شده روی پلیت LB Agar حاوی آمپی‌سیلین رشد داده شد. کلونی‌های مثبت حاصل از رشد باکتری ترانسفورم‌شده به روش Colony-PCR و با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده ذکرشده شناسایی شدند. به‌منظور استخراج پلاسمید، تک‌کلونی‌های تاییدشده در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد. به‌منظور تایید قطعه کلون‌شده در داخل وکتور pET-21 b، توالی‌یابی قطعه صورت گرفت.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب: یک کلونی حاوی وکتور نوترکیب pET-21 b/BMPR-II در ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تلقیح و به‌صورت شبانه در دمای ۳۷°C

جمله این پروتئین‌ها می‌توان به بخش اکتودومین BMPR-II اشاره کرد که قادر به اتصال به BMP-2 آندوژن است [14].

BMPR-II نوعی گیرنده TGF-β سرین-تروئونین‌کینازی ضروری در مسیر پیام‌رسانی BMP است. لیگندهای BMP و GDF به این گیرنده اتصال می‌یابند و این گیرنده دارای هم‌پوشانی با گیرنده Activin-II در اختصاصیت لیگاند است. کریستال‌های BMPR-II به دو فرم دیده شده که در هر دو ساختار کونفورماسیون‌های متفاوتی از لوپ A در مجاورت سطح تماس لیگاند، در اتصال با پل دی‌سولفیدی درون لوپ نشان می‌دهند. این پل دی‌سولفیدی خاص (Cys94-Cys117) تنها در گیرنده‌های BMPR-II و Activin حضور دارد که ممکن است به نحوه اتصال مشابه آنها مرتبط باشد [14].

در مطالعات قبلی برای بیان قسمت اکتودومین گیرنده‌های TGF از هر دو سیستم بیانی پروکاریوت [15, 16] و یوکاریوت [17, 18] استفاده شده است. سیستم بیانی پروکاریوت علی‌رغم سهولت کار و هزینه کمتر، در تشکیل پیوند دی‌سولفید و گلیکولیزاسیون مشکل دارد که قسمت اکتودومین گیرنده‌های TGF واجد هر دو مورد هستند. پروتئین BMPR-II دارای سه نقطه برای N-گلیکولیزاسیون است که در محل اتصال لیگاند نیست [19, 20] و همچنین تشکیل پیوند دی‌سولفید صحیح ممکن است از طریق سوبیه‌های بیانی تسهیل‌کننده تشکیل پیوند دی‌سولفید یا از طریق رفولدینگ اکسیداتیو انکلوژن‌بادی حل‌شده به دست آید [21, 22].

هدف از مطالعه حاضر کلونینگ، بیان و تعیین ویژگی توالی مربوط به بخش اکتودومین BMPR-II انسانی در باکتری /شرشیا کلی BL21 (*E. coli* BL21) به‌منظور ارزیابی توان اتصال آن به لیگاند BMP-2 است.

مواد و روش‌ها

مواد و سوبیه‌های باکتریایی: سوبیه‌های DH5α و BL21 (DE3) از باکتری /شرشیا کلی به‌ترتیب برای کلونینگ ژن و بیان پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار گرفت. آنزیم‌های محدودکننده *Nde1* و *XhoI*، آنزیم DNA پلیمرز دارای خاصیت تصحیح‌کنندگی و آنزیم DNA لیگاز T4 (ترموفیش؛ ایالات متحده آمریکا) به کار رفتند. کیت‌های مورد استفاده برای استخراج پلاسمید از باکتری و استخراج DNA از ژل آگارز (ویوانتیس؛ مالزی) تهیه شدند.

کلونینگ توالی اکتودومین BMPR-II: توالی cDNA مربوط به اکتودومین BMPR-II انسانی از پایگاه‌های داده NCBI و Ensemble استخراج شد. سپس به‌منظور بهینه‌سازی بیان اکتودومین در باکتری /شرشیا کلی، تغییرات لازم در توالی انجام گرفت. توالی مورد نظر به‌منظور سنتز و کلون در وکتور pUC به شرکت Bio Basic کانادا سفارش داده شد. بعد از دریافت، وکتور pUC حاوی توالی مورد نظر (pUC-BMPR-II)، به‌منظور تکثیر و نگهداری به داخل باکتری *E. coli* DH5α ترانسفورم شد. باکتری ترانسفورم‌شده روی پلیت LB Agar حاوی آنتی‌بیوتیک

کشت داده شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط LB مایع تازه حاوی آنتی‌بیوتیک تلقیح و در دمای ۳۷°C با دور ۲۵۰ rpm کشت داده شد. بعد از رسیدن به OD=۰/۶، به منظور القای بیان پروتئین، IPTG در غلظت نهایی یک میلی‌مولار به محیط کشت اضافه و در دمای ۳۰°C انکوبه شد. ۴ ساعت بعد از القای بیان پروتئین، کشت باکتری در دور ۳۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. بعد از لیز باکتری در بافر A (ایمیدازول: ۱۰ میلی‌مولار، سدیم‌دی‌هیدروژن فسفات: ۵۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم: ۳۰۰ میلی‌مولار، با میزان pH برابر با ۸) به کمک روش سونیکیشن و سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°C میزان بیان در کل پروتئین موجود روی ژل آکریل‌آمید به روش SDS-PAGE، الکتروفورز شد. تمامی محصول در فاز انکلوژن‌بادی بیان شد که در ادامه با کمک روش دنا تورا سیون اوره ۸ مولار به صورت محلول درآمد^[۱۷]. به منظور تخلیص پروتئین نوترکیب بیان‌شده در باکتری *E. coli BL21*، از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA (کیاژن؛ ایران) استفاده شد. بافرهای مورد استفاده به منظور تخلیص شامل بافر A (بافر تعادل که برای لیز باکتری‌ها استفاده شد)، بافر B (بافر شست‌وشو با غلظت‌های مختلف اوره برای حذف اوره؛ ایمیدازول: ۳۰ میلی‌مولار، سدیم‌دی‌هیدروژن فسفات: ۵۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم: ۳۰۰ میلی‌مولار، با میزان pH برابر با ۸) و بافر C (بافر جداکننده؛ ایمیدازول: ۲۵۰ میلی‌مولار، سدیم‌دی‌هیدروژن فسفات: ۵۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم: ۳۰۰ میلی‌مولار، با میزان pH برابر با ۸) است. پس از کالبره کردن ستون توسط بافر A، محلول رویی لیز باکتری بعد از سانتریفیوژ به ستون اضافه و سپس ستون توسط بافر B شسته شد. پس از شست‌وشو، بافر C به ستون اضافه و خروجی آن به منظور انجام مراحل بعدی جمع‌آوری شد. پروتئین تخلیص‌شده روی ژل آکریل‌آمید به روش SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت.

دو رنگ‌نمایی دورانی (CD): به منظور بررسی ساختار دوم، طیف CD پروتئین BMPR-II با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر PBS با pH=۷/۴ توسط دستگاه اسپکتروپولاریمتر JASCO J-715 گرفته شد. طیف حاصل با نرم‌افزار JASCO J-715 بدون تغییر در شکل کلی طیف اصلاح شد. نتایج به صورت بیضی‌واری مولی $[\theta]$ ($\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) و براساس میانگین وزنی آمینواسیدهای پروتئین BMPR-II و غلظت آن مورد ارزیابی قرار گرفتند. بیضی‌واری مولی به صورت $[\theta] = (\theta \times 100 \text{ MRW}) / (c \cdot l)$ محاسبه شد به طوری که c غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، l طول مسیر نور و θ بیضی‌واری اندازه‌گیری‌شده در دامنه طول موجی UV دور است.

ارزیابی فعالیت گیرنده BMPR-II در اتصال به BMP-2 به روش الایزا (ELISA): به منظور ارزیابی میزان اتصال پروتئین نوترکیب BMPR-II به لیگاند نوترکیب BMP-2، روش الایزا به کار رفت. در ابتدا پروتئین BMP-2 با غلظت‌های مختلف از ۰/۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ (PBS) برای هر چاهک محاسبه و به چاهک‌های پلیت الایزا اضافه شد.

پلیت به مدت یک شب در دمای ۴°C انکوبه شد. سپس چاهک‌ها با استفاده از بافر PBST (بافر PBS حاوی ۵% توپین-۲۰) چندین بار شسته شد. به منظور بلوکه کردن محل‌های خالی از پروتئین BMP-2 در کف چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBST حاوی BSA ۳% (آلبومین سرم گاوی؛ بافر بلوکه‌کننده) به هر چاهک اضافه و پلیت یک ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. بعد از آن چاهک‌ها سه بار توسط بافر PBST شسته شدند. در مرحله بعد پروتئین نوترکیب BMPR-II با غلظت یک میکروگرم بر میلی‌لیتر و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و پلیت به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. سپس، پلیت سه بار توسط بافر PBST شسته شد. به منظور ارزیابی میزان اتصال BMP-2 به پروتئین نوترکیب BMPR-II، آنتی‌بادی کثروگه با آنزیم HRP علیه His-Tag به کار رفت. آنتی‌بادی با غلظت ۱:۴۰۰۰ در بافر PBS رقیق و به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از یک ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷°C، آنتی‌بادی‌های متصل‌نشده توسط بافر PBST شسته شد. میزان اتصال آنتی‌بادی به His-Tag با استفاده از سوبسترای ۳، ۳، ۵، ۵- تترامتیل‌بنزیدین (TMB) اندازه‌گیری شد. به این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB به هر چاهک اضافه و پلیت در محل تاریک قرار داده شد. سپس به کمک محلول اسیدی واکنش متوقف و جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش MTT به منظور بررسی اثر سمیت پروتئین نوترکیب BMPR-II

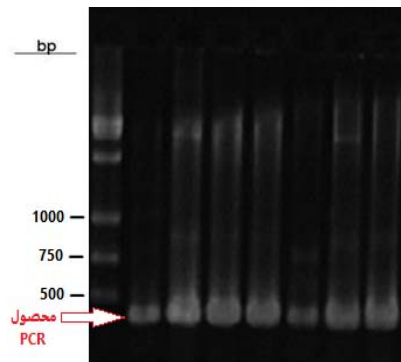
کشت سلول‌های نامیرا میوبلاستی موش (C2C12): سلول‌های C2C12 (انستیتو پاستور؛ ایران) در شرایط استریل با استفاده از محیط کشت DMEM دارای ۱۰% سرم (FBS)، ۱% از مخلوط آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین و در شرایط انکوباتور CO₂ (۵%) و دمای ۳۷°C کشت داده شد. برای تیمار سلولی، ۱۰ هزار سلول در هر خانه از پلیت ۹۶ خانه کشت سلولی کشت داده شد، و پس از ۱۲ ساعت، پروتئین نوترکیب BMPR-II با غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار، محیط کشت سلولی با محیط کشت حاوی محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعویض و آزمون سنجش بقا انجام شد.

سنجش بقای سلولی (MTT assay): پس از گذشت ۴ ساعت از تعویض محیط کشت با محیط کشت حاوی محلول MTT محیط رویی دور ریخته شده و به منظور انجام سنجش MTT به سلول‌ها محلول DMSO اضافه شد. سپس، با استفاده از الایزا ریدر میزان رنگ جذب‌شده توسط سلول‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. این آزمایش برای هر غلظت حداقل سه بار تکرار شد و در نهایت نتایج به صورت آماری با استفاده از نرم‌افزار مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین ضریب تفکیک (Ka) اکتودومین گیرنده BMPR-II با پروتئین BMP-2 با استفاده از الایزا رقابتی

در این مطالعه برای اندازه‌گیری Ka اتصال، از یک روش الیزا رقابتی استفاده شد^[۲۳] به این صورت که ابتدا غلظت ثابتی از پروتئین

ساب کلونینگ توالی اکتودومین BMPR-II در وکتور بیانی pET-21b: به منظور انتقال ژن BMPR-II به وکتور بیانی pET-21b، این وکتور و قطعه حاصل از PCR پس از برش با آنزیمهای محدودکننده Nde1 و XhoI، به کمک آنزیم T4 لیگاز به یکدیگر متصل شدند و قطعه حاصل در باکتری *BL21* (DE3) ترانسفورم شد. نتایج Colony-PCR با استفاده از پرایمرهای ژن در شکل ۳ آمده است (شکل ۴).



شکل ۳ ژل الکتروفورز Colony-PCR برای وکتور بیانی نوترکیب pET21b-BMPR-II

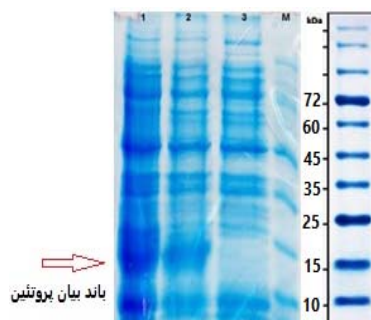
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

After Gene: MSQNQERLCAPDFYQDGLGIGESRISHENGITLCSKSGSTCYGLWERSKGDINLVQGCW
              -SQNQERLCAPDFYQDGLGIGESRISHENGITLCSKSGSTCYGLWERSKGDINLVQGCW
After Gene: SHIGDPQCHYECCVITTPPSIQNGTYRFCCSTDLGNVNFENFPPPTPLSPFHSF
              SHIGDPQCHYECCVITTPPSIQNGTYRFCCSTDLGNVNFENFPPPTPLSPFHSF
After Gene: NRDET-----
              NRDET-----
              *****
  
```

شکل ۴ مقایسه توالی BMPR-II نوترکیب در وکتور بیانی pET-21b پس از تعیین توالی با توالی BMPR-II موجود در پایگاه داده NCBI

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب: پس از تایید توالی ژن BMPR-II، کلونی حاوی پلاسمید نوترکیب در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد، سپس با رسیدن به کدورت مناسب توسط IPTG بیان پروتئین القا شد. پس از القای بیان از محیط کشت نمونه برداری شده و پس از لیز باکتری به کمک روش SDS-PAGE میزان بیان پروتئین ارزیابی شد، بهینه زمان القای بیان پروتئین نوترکیب مطابق با نتایج به دست آمده ۴ ساعت است (شکل های ۵ و ۶).



شکل ۵ کل محتوای پروتئینی در نمونه های صفر، ۲ و ۴ ساعت پس از القای بیان روی ژل SDS-PAGE. (۱) ۴ ساعت پس از القا، (۲) ۲ ساعت پس از القا، (۳) زمان صفر، (M) شاخص وزن مولکولی پروتئین (PM1500)

BMP-2 با رقت های متوالی از پروتئین نوترکیب BMPR-II در یک لوله مجاور شد تا به تعادل برسند، سپس میزان BMP-2 آزاد باقی مانده در هر یک از رقت ها پس از رسیدن به حالت تعادل، با روش الیزا غیرمستقیم که در آن پروتئین نوترکیب BMPR-II در کف پلیت کوت شده است. با رسم نمودار جذب نوری به دست آمده از الیزا غیرمستقیم برای غلظت های مختلف پروتئین نوترکیب BMPR-II می توان K_d را به دست آورد.

تعیین ضریب تفکیک (K_d): هم زمان با عمل کوتینگ پروتئین نوترکیب BMPR-II با غلظت یک میکروگرم بر میلی لیتر در دمای ۴°C به مدت یک شب، در ۸ لوله به میزان ۲۰۰ میلی لیتر از رقت های مختلف پروتئین نوترکیب BMPR-II (تهیه شده در PBS از رقت ۱۰۰ تا ۳۹/۱۰۰ نانومولار) اضافه شد، سپس به آنها ۲۰۰ میکرولیتر BMP-2 با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر افزوده شد. در لوله شماره ۹، ۴۰۰ میکرولیتر BMP-2 بدون حضور پروتئین نوترکیب BMPR-II اضافه شد (تمام لوله ها برای تعادل واکنش به مدت یک شب در دمای ۳۷°C قرار گرفتند). به منظور بررسی میزان BMP-2 موجود در هر لوله، به صورت سه تایی از محتویات لوله ها به پلیت الیزا که کوتینگ انجام شده بود، اضافه و آزمون الیزا انجام شد.

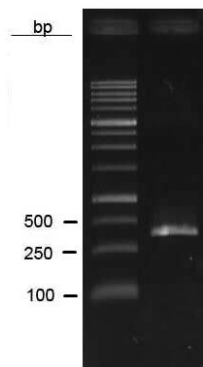
نتایج و بحث

تکثیر توالی اکتودومین BMPR-II: توالی ژن BMPR-II به صورت کلون شده در وکتور pUC57 با توالی بهینه از شرکت Bio Basic کانادا تحویل گرفته شد (شکل ۱).

سپس واکنش زنجیره ای پلی مرز به منظور تکثیر توالی اکتودومین BMPR-II در شرایط بهینه از وکتور pUC57 انجام شد. ژل الکتروفورز حضور یک باند در اندازه حدود ۴۱۳ جفت نوکلئوتید را نشان داد (شکل ۲).

ATGAGCCAAAACCAAGAGCGTCTGTGTGCATTCAAGGACCCATAC
CAACAAGACCTGGGTATCGGTGAATCCCGTATCTCTCATGAGAAC
GGTACGATCCTGTGTTCTAAAGGCTCCACGTGCTATGGCGTGTGGG
AAAAATCCAAAGGCGACATTAACCTGGTCAAACAGGGTTGCTGGA
GCCATATTGGCGATCCTCAGGAGTGTCTATTGAAGAATGCGTGG
TAACGACTACTCCTCTTCTATTGAGAATGGCACCTATCGCTTCTG
CTGCTGTAGCACTGATCTGTGTAATGTTAATTTTACCGAAAAATTT
TCCGCCGCCAGATACACGCCGCTGAGCCGCCGCACTCTTTTAAAC
CGCGATGAAACGTAA

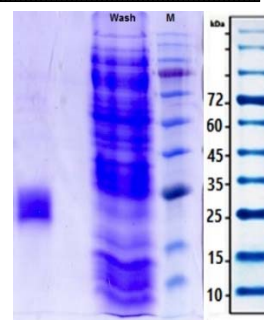
شکل ۱ توالی بهینه ژن BMPR-II کلون شده در وکتور pUC57



شکل ۲ ژل الکتروفورز ژن BMPR-II پس از PCR از روی وکتور pUC57

جدول ۱) محتوای ساختار دوم گیرنده BMPR-II

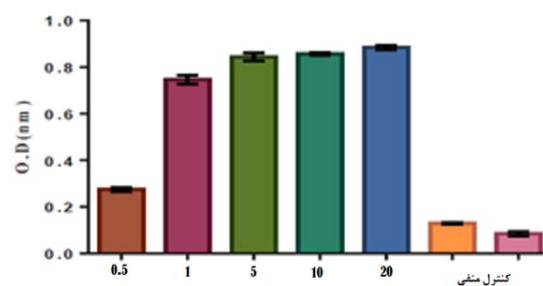
اطلاعات ساختار دوم	اطلاعات ساختار دوم	نوع ساختار دوم
به دست آمده از CD	به دست آمده از PDB	
%۱۹/۷	%۲۶/۷	صفحه بتا
%۸۰/۳	%۷۳/۷	مارپیچ آلفا
		+رندوم کوایل



شکل ۶) پروتئین نوترکیب BMPR-II تخلیص شده روی ژل SDS-PAGE. باندهای مختلف مربوط به خروجی‌های مختلف از ستون است. وزن مولکولی پروتئین نوترکیب مورد نظر در حدود ۱۶ کیلودالتون است. (M) شاخص وزن مولکولی پروتئین (PM1500)، (wash) نمونه جمع‌آوری شده بعد از شست‌وشوی ستون Ni-NTA با بافر شست‌وشو

پس از بیان پروتئین به صورت انکلوژن‌بادی، پس از حل پروتئین در اوره ۸ مولار پروتئین نوترکیب بعد از حذف اوره به کمک ستون کروماتوگرافی Ni-NTA تخلیص و درصد خلوص پروتئین نوترکیب BMPR-II استخراج شده توسط ژل آکریل‌آمید به روش SDS-PAGE بررسی شد (نمودار ۱).

دو رنگ‌نمایی دورانی (CD): طیف CD، به منظور بررسی ساختارهای دوم پروتئین نوترکیب BMPR-II و مقایسه آن با محتوای ساختار دوم همین پروتئین موجود در پایگاه داده پروتئین (PDB)، توسط دستگاه اسپکتروپولاریومتر JASCO J-715 ثبت شد. نتایج نشان داد محتوای ساختار دوم پروتئین نوترکیب در مقایسه با اطلاعات موجود در PDB تغییرات قابل ملاحظه‌ای ندارد (جدول ۱).



غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب BMPR-II بر حسب میکروگرم در میلی لیتر

نمودار ۱) ارزیابی فعالیت گیرنده BMPR-II در اتصال با BMP-2 به روش الایزا

ارزیابی فعالیت گیرنده BMPR-II در اتصال به BMP-2 به روش الایزا (ELISA): بدین منظور پس از تثبیت غلظت‌های مختلف پروتئین BMP-2 در کف پلیت، انجام مراحل شست‌وشو و خشک کردن، محل‌های خالی از آنتی‌ژن در کف چاهک‌ها توسط BSA بلوکه شد. سپس پروتئین نوترکیب به چاهک‌ها اضافه و پس از انکوباسیون، شسته شدند. آنتی‌بادی علیه His-Tag کوژوگه با آنزیم HRP به چاهک‌ها اضافه و پس از انکوباسیون شسته شدند. در مرحله آخر سوبسترای TMB به پلیت اضافه و در محل تاریک انکوبه شد. پس از تغییر رنگ محلول به آبی، به کمک محلول اسیدی واکنش متوقف شد سپس میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد جذب برای هر سه غلظت ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پروتئین BMPR-II یکسان است. بنابراین در ادامه از غلظت یک میکروگرم بر میلی‌لیتر این پروتئین استفاده شد (جدول ۲؛ نمودار ۱).

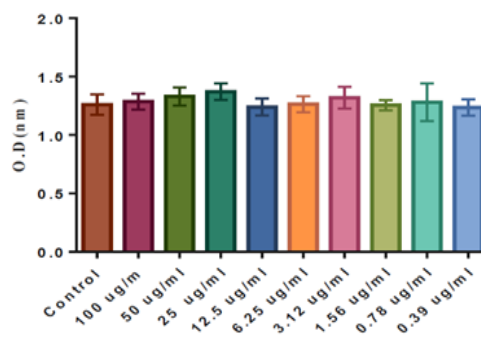
سنجش MTT به منظور بررسی اثر سمیت پروتئین نوترکیب BMPR-II تخلیص شده: برای بررسی سمیت پروتئین نوترکیب BMPR-II، تاثیر پروتئین نوترکیب روی بقا و تکثیر سلول‌های نامیرا میوبلاستی موش مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌ها C2C12 به مدت ۴۸ ساعت در معرض غلظت‌های ۰/۳۹ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروتئین قرار گرفته و پس از آن تکثیر و بقای آنها با استفاده از تست MTT ارزیابی شد. نتایج به کمک نرم‌افزار بررسی شدند. نتایج نشان می‌دهد، بقای سلولی برای سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب BMPR-II به همراه بررسی آماری داده‌های مربوط به آزمون MTT، تمامی نمونه‌ها نسبت به کنترل منفی معنی‌دار نبوده است، بنابراین پروتئین نوترکیب BMPR-II اثر سمیتی روی سلول C2C12 ندارد (جدول ۳؛ نمودار ۲).

جدول ۲) نتایج بررسی اتصال آنتی His-Tag به دنباله هیستیدینی BMPR-II با روش الایزا

نمونه	BMPR-II (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	%۳ BSA (میکرولیتر)	BMP-2 (یک میکروگرم بر میلی‌لیتر)	Anti His-Tag	OD (۴۵۰ نانومتر)
۱	۰/۵	۱۰۰	۱۰۰	۱:۴۰۰۰	۰/۲۷۴ (±۰/۰۰۸)
۲	۱	۱۰۰	۱۰۰	۱:۴۰۰۰	۰/۷۴۶ (±۰/۰۰۲)
۳	۵	۱۰۰	۱۰۰	۱:۴۰۰۰	۰/۸۴۳ (±۰/۰۱۶)
۴	۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱:۴۰۰۰	۰/۸۵۶ (±۰/۰۰۵)
۵	۲۰	۱۰۰	۱۰۰	۱:۴۰۰۰	۰/۸۸۴ (±۰/۰۰۸)
کنترل منفی (-BSA)	-	-	۱۰۰	۱:۴۰۰۰	۰/۱۲۹ (±۰/۰۰۳)
کنترل مثبت (+BSA)	-	۱۰۰	۱۰۰	۱:۴۰۰۰	۰/۰۸۴ (±۰/۰۰۸)

غلظت BMPR-2	معنی‌داری	سطح معنی‌داری	فاصله اطمینان ۹۵%	تفاوت بین میانگین‌ها	آزمون t
۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	خیر	۰/۶۱۷۱	۰/۸۸۱۶ تا ۰/۱۴۰۲	۰/۴۹۶۱ ± ۰/۲۵۸۰	غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل
۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	خیر	۰/۲۱۸۵	۰/۵۰۷۳ تا ۰/۱۹۰۳	۰/۵۲۲۷ ± ۰/۶۹۸۰	غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل
۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر	خیر	۰/۵۵۸۳	۰/۴۹۶۴ تا ۰/۲۲۷۰	۰/۵۰۲۹ ± ۰/۱۱۰۰	غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل
۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر	خیر	۰/۶۹۲۷	۰/۹۶۲۶ تا ۰/۱۳۷۹	۰/۵۰۷۶ ± ۰/۲۰۸۰	غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل
۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر	خیر	۰/۹۵۰۲	۰/۱۱۱۴ تا ۰/۱۱۷۸	۰/۴۹۶۸ ± ۰/۰۳۲۰	غلظت ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل
۳/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر	خیر	۰/۳۳۵۳	۰/۷۳۴۶ تا ۰/۱۹۱۱	۰/۵۷۳۶ ± ۰/۵۸۸۰	غلظت ۳/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل
۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر	خیر	۰/۹۳۲۸	۰/۱۰۴۴ تا ۰/۹۶۸۵	۰/۴۳۶۵ ± ۰/۰۳۸۰	غلظت ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل
۰/۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر	خیر	۰/۸۰۴۴	۰/۱۶۸۲ تا ۰/۲۱۰۲	۰/۸۲۰۳ ± ۰/۲۱۰۰	غلظت ۰/۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل
۰/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر	خیر	۰/۶۴۰۹	۰/۱۳۹۳ تا ۰/۰۹۹۳	۰/۴۹۹۳ ± ۰/۲۴۲۰	غلظت ۰/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل

با توجه به نمودار بیشترین میزان جذب نوری در الایزا رقابتی مربوط به غلظت صفر پروتئین نوترکیب BMPR-II بوده و همچنین کمترین میزان جذب نوری مربوط به غلظت ۱۰۰ نانومولار این پروتئین است. K_d معادل غلظتی از پروتئین نوترکیب BMPR-II است که ۵۰٪ جذب نوری ماکزیم مهار می‌شود که با توجه به نمودار غلظتی برابر با ۴/۹ نانومولار به دست آمد که معادل اتصال پروتئین نوترکیب BMPR-II با BMP-2 است.



غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب BMPR-II

نمودار ۲) ارزیابی بقای سلولی برای سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب BMPR-II به روش MTT

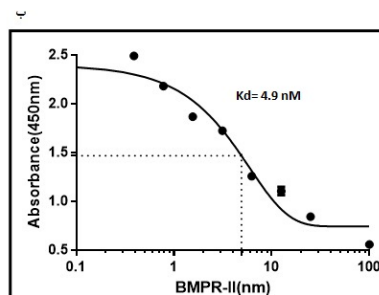
بحث

بازسازی و توسعه استخوان توسط تعدادی از واسطه‌ها، شامل *Wnts*، فاکتورهای رشد فیبروبلاستی، پروتئین‌های *hedgehog* و فاکتورهای رشد شبه‌انسولین تنظیم می‌شوند [24, 25]. استخوان‌های بالغ دارای توان بازسازی ذاتی هستند و BMP‌ها به‌عنوان واسطه‌های اصلی این فرآیند شناخته شده‌اند [26, 27]. BMP‌ها همچنین عوامل رشد و تمایز نیز نامیده می‌شوند که طی تشکیل استخوان نقش‌های مختلفی دارند. تجویز برخی از BMP‌ها، از جمله BMP-2، BMP-4 و BMP-7 می‌تواند موجب آغاز آبشار ترمیمی شود و فرآیند بازسازی استخوان را میانجی‌گری کند. BMP-2، BMP-4 و BMP-7 از اعضای خانواده $TGF-\beta$ هستند، که به گیرنده‌های هترومیریک نوع I و II متصل می‌شوند [27]. فرم فعال زیست‌شناختی BMP‌ها به‌صورت هوموآپایمر است. ساختار BMP‌ها مانند، دست چپ کمی پیچ‌خورده است که برای آنها و دیگر پروتئین‌های خانواده $TGF-\beta$ دو نوع اپی‌توپ درگیر در اتصال به گیرنده‌ها در نظر گرفته می‌شود، اپی‌توپ "wrist" که از اسیدآمینه‌های هر دو مونومر تشکیل شده که به اکتودومین گیرنده نوع I متصل می‌شود و اپی‌توپ "knuckle" که متشکل از اسیدآمینه‌های یکی از مونومرها بوده که برخلاف اپی‌توپ "wrist" به اکتودومین گیرنده نوع II متصل می‌شود [28]. اخیراً، rhBMP-2 و rhBMP-2 برای ترمیم و بازسازی نقایص استخوانی مورد تایید سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) قرار گرفته‌اند. با این حال، چندین معضل کاربردی برای استفاده از این فاکتورهای رشد نوترکیب وجود دارد که شامل نیاز به دوز فوق فیزیولوژیک این فاکتورهای رشد، برخی از عوارض جانبی بالقوه جدی و هزینه بالای آنها هستند. بنابراین فرایر و همکاران استراتژی AMOR را به‌عنوان یک استراتژی

تعیین ضریب تفکیک (K_d) اکتودومین گیرنده BMPR-II با پروتئین BMP-2 با استفاده از الایزا رقابتی: بعد از انجام الایزا غیرمستقیم برای بررسی میزان BMP-2 موجود در هر لوله به‌صورت سه‌تای از محتویات لوله‌ها به پلیت الایزا که کویتینگ انجام شده و نتایج زیر به دست آمد (نمودار ۳).

الف

BMPR-II(nm)	Absorbance(450nm)		
100	0.582	0.561	0.539
25	0.862	0.832	0.845
12.5	1.121	1.062	1.141
6.25	1.231	1.301	1.251
3.13	1.722	1.695	1.763
1.56	1.901	1.851	1.861
0.78	2.156	2.195	2.201
0.39	2.502	2.485	2.496
0	2.352	2.365	2.423



نمودار ۳) تعیین K_d : الف) مقادیر جذب اندازه‌گیری شده در الایزا رقابتی، ب) نمودار جذب نوری به‌دست‌آمده از الایزا غیرمستقیم برای غلظت‌های مختلف پروتئین (نانومولار) نوترکیب BMPR-II که به کمک آن K_d را به دست آمد.

آماري/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ فرید حیدری (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)

منابع مالی: منابع مالی این تحقیق توسط دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است.

منابع

- 1- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science. 1965;150(3698):893-9.
- 2- ten Dijke P, Korchynskyi O, Valdimarsdottir G, Goumans MJ. Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. Mol Cell Endocrinol. 2003;211(1-2):105-13.
- 3- Sasikumar KP, Elavarasu S, Gadagi JS. The application of bone morphogenetic proteins to periodontal and peri-implant tissue regeneration: a literature review. J Pharm Bioallied Sci. 2012;4(Suppl 2):S427-30.
- 4- Mace PD, Cutfield JF, Cutfield SM. Bacterial expression and purification of the ovine type II bone morphogenetic protein receptor ectodomain. Protein Expr Purif. 2007;52(1):40-9.
- 5- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. Endocr Rev. 2004;25(1):72-101.
- 6- ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzén P, Laiho M, Miyazono K, et al. Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. Science. 1994;264(5155):101-4.
- 7- Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, et al. Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. Proc Natl Acad Sci. 1995;92(17):7632-6.
- 8- Garrison KR, Donell S, Ryder J, Shemilt I, Mugford M, Harvey I, et al. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review. Health Technol Assess. 2007;11(30):1-150, iii-iv.
- 9- McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE® Bone Graft). Int Orthop. 2007;31(6):729-34.
- 10- Freire MO, You HK, Kook JK, Choi JH, Zadeh HH. Antibody-mediated osseous regeneration: a novel strategy for bioengineering bone by immobilized anti-bone morphogenetic protein-2 antibodies. Tissue Eng Part A. 2011;17(23-24):2911-8.
- 11- Freire MO, Kim HK, Kook JK, Nguyen A, Zadeh HH. Antibody-mediated osseous regeneration: the early events in the healing response. Tissue Eng Part A. 2013;19(9-10):1165-74.
- 12- Ansari S, Freire M, Choi MG, Tavari A, Almohaimeed M, Moshaverinia A, et al. Effects of the orientation of anti-BMP2 monoclonal antibody immobilized on scaffold in antibody-mediated osseous regeneration. J Biomater Appl. 2015;30(5):558-67.
- 13- Hosseinpour S, Rad MR, Khojasteh A, Zadeh HH. Antibody administration for bone tissue engineering: a systematic review. Curr Stem Cell Res Ther. 2018;13(4):292-315.
- 14- Mace PD, Cutfield JF, Cutfield SM. High resolution structures of the bone morphogenetic protein type II receptor in two crystal forms: implications for ligand

جایگزین برای رویکرد فعلی تجویز فاکتورهای رشد گزارش کردند.^[10] که در آن آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه BMP-2 قادر بودند BMP‌های داخل بدن را در محل آسیب به دام انداخته و به‌صورت موثری در ترمیم و بازسازی آسیب‌های استخوانی عمل کنند، اما تنها برخی از این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند بدون ایجاد تغییر در اتصال BMP-2 به رسپتورهایش، به BMP-2 متصل شوند. علاوه بر این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند پاسخ‌های ایمنی موضعی یا سیستماتیک در میزبان ایجاد کنند. هدف ما در این مطالعه استفاده از پروتئین‌های جایگزین آنتی‌بادی با قابلیت تثبیت بر گرفت‌های سنتتیک است. از جمله این پروتئین‌ها می‌توان اکتودمین BMPR-II اشاره کرد که ضمن اتصال مناسب با لیگاند BMP-2 موجب پاسخ ایمنی در بدن میزبان نمی‌شود. همچنین مطالعات قبلی نشان داده است که برای شروع فرآیند ترمیم شکستگی BMP-2 لازم است و وقتی با BMP-4 و BMP-7 ترکیب می‌شود توان این فرآیند افزایش می‌یابد. بنابراین می‌توان به یکی دیگر از مزایای استفاده از پروتئین‌ها اکتودمین BMPR-II در توان آنها در اتصال و به دام‌انداختن BMP-2، BMP-4 و BMP-7 در محل آسیب، اشاره کرد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که پروتئین‌های نوترکیب BMPR-II بیان‌شده، توان اتصال و به دام‌انداختن BMP-2 با ضریب تفکیک (K_d) را دارند. همچنین این پروتئین نوترکیب در مقایسه با کنترل اثر سمیت معنی‌داری برای سلول ندارد. با توجه به اتصال مناسب این گیرنده نوترکیب با لیگاند BMP-2، از آنجایی که همه دایمرهای BMP به‌طور کامل درگیر در اتصال با همه اجزای گیرنده طبیعی به مانند آنچه که در سلول وجود دارد، نیستند.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد، این پروتئین نوترکیب بتواند باعث تجمع موثر مولکول‌های BMP-2 در محل ضایعه استخوانی شود ولی این موضوع که آیا این اتصال باعث کاهش فعالیت موثر یا رقابت با گیرنده‌های BMP-2 سطح سلول می‌شود نیازمند مطالعه در "محیط زنده" است.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از کلیه اساتید و پژوهشگران دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت‌مدرس که در تحقیق حاضر همکاری نموده‌اند، سپاسگزاری می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: نتایج مندرج در این مقاله از صحت و اصالت علمی برخوردار هستند و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران اعم از پایان‌نامه، کتاب، مقاله و غیره استفاده شد، رعایت کامل امانت شده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: بهمن اونیق (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روشناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۵۰٪)؛ صادق حسن‌نیا (نویسنده دوم)، روشناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر

Opin Biotechnol. 1998;9(2):157-63.

22- Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. Curr Opin Biotechnol. 1998;9(5):497-501.

23- Martineau P. Affinity measurements by competition ELISA. In: Kontermann R, Dubel S, editors. Antibody engineering. Volume 1. 2nd Edition. Berlin: Springer; 2010. p. 657-65.

24- Miyazono K, Maeda S, Imamura T. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF- β superfamily and Runx proteins. Oncogene. 2004;23(24):4232-7.

25- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell. 2002;108(1):17-29.

26- Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. Nat Genet. 2006;38(12):1424-9.

27- Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. Nat Biotechnol. 2003;21(9):1025-32.

28- Nickel J, Dreyer MK, Kirsch T, Sebald W. The crystal structure of the BMP-2: BMPR-IA complex and the generation of BMP-2 antagonists. J Bone Joint Surg Am. 2001;83-A Suppl 1(Pt 1):S7-14.

binding. Biochem Biophys Res Commun. 2006;351(4):831-8.

15- Boesen CC, Motyka SA, Patamawenu A, Sun PD. Development of a recombinant bacterial expression system for the active form of a human transforming growth factor β type II receptor ligand binding domain. Protein Expr Purif. 2000;20(1):98-104.

16- Kirsch T, Nickel J, Sebald W. Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2. FEBS Lett. 2000;468(2-3):215-9.

17- Goetschy JF, Letourneur O, Cerletti N, Horisberger MA. The unglycosylated extracellular domain of type-II receptor for transforming growth factor-beta. A novel assay for characterizing ligand affinity and specificity. Eur J Biochem. 1996;241(2):355-62.

18- Greenwald J, Le V, Corrigan A, Fischer W, Komives E, Vale W, et al. Characterization of the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor. Biochemistry. 1998;37(47):16711-8.

19- Allendorph GP, Vale WW, Choe S. Structure of the ternary signaling complex of a TGF- β superfamily member. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(20):7643-8.

20- Greenwald J, Groppe J, Gray P, Wiater E, Kwiatkowski W, Vale W, et al. The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. Mol Cell. 2003;11(3):605-17.

21- Clark EDB. Refolding of recombinant proteins. Curr