

بیان و تخلیص فاکتور رشد مشتق از پلاکت و ارزیابی عملکرد آن در اتصال به فیبرینوژن

مریم ملاصالحی¹، بهاره دبیر منش²، صادق حسن نیا^{3*}

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

2- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

3- استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: hasannia@modares.ac.ir

دریافت: 1402/4/22

پذیرش: 1402/9/11

چکیده

فرایند ترمیم زخم، یک فرایند پیچیده و پویا است که انواع سلول‌ها و مسیرهای متابولیکی مختلف را درگیر می‌کند. این فرایند از سه فاز اصلی شامل فاز التهابی، تکثیر سلولی و بازسازی بافتی تشکیل شده است. بهبود موفقیت‌آمیز زخم به تنظیم دقیق و هماهنگی بین عوامل درگیر بستگی دارد. تا سال‌های پیشین استراتژی درمان زخم‌های مزمن به آماده‌سازی زخم، برداشتن بافت نکروزه‌شده، کنترل عفونت و التهاب محدود بود، اما اکنون استفاده از فاکتورهای رشد در جهت تسریع روند درمانی و بهبود زخم تأیید شده است. از اولین انواع فاکتورهای رشد نو ترکیب که در درمان زخم‌های دیابتی به تأیید جهت مصرف انسانی رسیده است، فاکتور رشد نو ترکیب انسانی PDGF-BB می‌باشد. به استناد گزارش‌های آمده در مطالعه‌های مختلف، PDGF به عنوان یک واسطه‌ی مهم در فرایند ترمیم زخم به کاهش التهاب، تسریع بهبودی، تکثیر سلولی، رگ‌زایی و بازسازی بافت کمک می‌کند. در این مطالعه، ژن PDGF-B در وکتور بیانی pET 21(a+) سنتز و در میزبان *E. coli* Shuffle تحت پروموتور T7 کلون شد. پس از بیان، خالص‌سازی با استفاده از ستون نیکل آگارز انجام گرفت. از آنجایی که پروتئین نو ترکیب تخلیص‌شده دنباله هیستگ دارد، با روش وسترن بلا تینگ با آنتی‌بادی آنتی هیستگ باند پروتئینی تأیید و صحت تشکیل پیوند دی‌سولفیدی با روش المان و SDS-PAGE بررسی شد. برای بررسی فعالیت پروتئین تخلیص‌شده، آزمایش‌های تکثیر سلولی، مهاجرت و اتصال به پروتئین ماتریکس خارج سلولی انجام شد. نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام‌شده در این مطالعه نشان می‌دهد که PDGF به صورت دایمر بیان شده و پیوندهای دی‌سولفیدی به‌طور کامل تشکیل می‌شود. بیان این پروتئین در میزبان باکتریایی Shuffle که قادر به تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی است، منجر به حفظ ساختار پروتئین شده است. با توجه به نتایج مطالعه‌های برون‌تنی¹ پروتئین تخلیص‌شده هر دو فعالیت اصلی، یعنی تکثیر سلولی و همچنین قابلیت اتصال به پروتئین‌های ماتریکس سلولی دارد که این دلیلی بر فعال‌بودن پروتئین و تشکیل ساختار صحیح آن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ترمیم زخم، فاکتور رشد مشتق از پلاکت، بیان، کلونینگ.

1- مقدمه

فرایند ترمیم زخم مجموعه‌ای از رویدادهای پیچیده و بسیار منسجم در جهت ترمیم ساختارهای عملکردی بافتی از دست رفته به دلیل تروما، عوارض پس از جراحی، سوختگی، بیماری یا موارد دیگر است. این فرایند، نیازمند تعامل بسیاری از انواع سلول‌ها با یکدیگر از جمله سلول‌های التهابی، فیبروبلاست‌ها، کراتینوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال و همچنین دخالت انواع سایتوکین‌ها، فاکتورهای رشد و انواع آنزیم‌ها می‌باشد [1]. ترمیم زخم شامل مراحل متفاوت و فرایندهای پیچیده‌ای مانند هومئوستاز، التهاب، تکثیر، بازسازی و بلوغ است [2]. اختلال در یک یا چند فرایند سلولی منجر به شکست در فرایند ترمیم زخم می‌شود. با توجه به اینکه در بسیاری از کشورهای دنیا به خصوص آمریکا، تعداد بیماران با زخم‌های مزمن مانند زخم پای‌دیابتی رو به افزایش است و درمان‌های مختلف فعلی، کارایی و اثربخشی بالایی ندارند، نیاز به روش‌های جدید درمانی احساس می‌شود. امروزه درمان با واسطه فاکتورهای رشد، یک روش امیدوارکننده است که استفاده از آن رو به افزایش است. به‌طور کلی فاکتورهای رشد با تأثیر بر عملکردهای متعدد سلولی مانند تکثیر، مهاجرت، تشکیل عروق و سایر فرایندهایی که در روند ترمیم زخم مزمن دچار بی‌نظمی شده‌اند، به روند بهبود زخم کمک می‌کنند. در میان فاکتورهای رشد، خانواده فاکتورهای رشد مشتق از پلاکت (PDGFs) در بسیاری از فرایندهای ترمیم بافت نقش به‌سزایی دارند [3]. به‌نحوی که در سال 1997، فاکتور رشد نوترکیب PDGF-BB با نام تجاری Regranex® برای درمان زخم پای نوروژنیک دیابتی از سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) تأییدیه دریافت کرده است. فاکتور رشد پلاکتی یک گلیکوپروتئین کاتیونی و مقاوم به گرما با وزن ملکولی حدود 30 کیلودالتون است. این پروتئین از دو زنجیره پلی‌پپتیدی تشکیل شده است که این دو زنجیره با پیوندهای دی‌سولفیدی به هم متصل هستند [4].

PDGF، محرک بسیاری از فرایندهای متابولیک از جمله سنتز کلاژن، فعالیت کلاژناز، کموتاکسی فیبروبلاست‌ها و سلول‌های ماهیچه صاف می‌باشد. مطالعات برون‌تنی نشان داد که PDGF از پلاکت‌های موجود در محل آسیب ترشح می‌شود. بنابراین این فاکتور رشد نقش مهمی در شروع فرایند ترمیم زخم دارد. در واقع آزاد شدن این پروتئین از سایر سلول‌ها برای ادامه روند ترمیم لازم است [5]. PDGF به‌عنوان یک واسطه مهم در بهبود زخم، نه تنها به‌وسیله پلاکت‌ها بلکه به‌وسیله ماکروفاژهای فعال، سلول‌های ماهیچه صاف شریان آسیب‌دیده، سلول‌های اندوتلیال تحریک‌شده با ترومبین، فیبروبلاست‌های فعال و کراتینوسیت‌ها نیز تولید می‌شود [6]. این پروتئین از چهار زنجیره پلی‌پپتیدی A، B، C و D ساخته شده است که برای تولید ایزوفرم‌های همو و هتروداایمر به‌صورت AA، AB، BB، CC و DD ترکیب می‌شوند [7؛ 8]. از میان ایزوفرم‌های PDGF، همودایمر BB در ترمیم زخم با تشکیل بافت گرانوله² و به‌کارگیری سلول‌های بنیادی نقش حیاتی دارد [9].

نتایج مطالعه‌ها بر فاکتورهای رشد نشان داده است که بیشتر آنها قابلیت اتصال به پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی (ECM) مانند فیبرونکتین، فیبرینوژن، ویترونکتین، لامینین، تناسین C و ... از ناحیه متصل‌شونده به هپارین³ آنها را دارند. عملکرد مهم ECM در مورفوژنز و ترمیم بافت به‌عنوان منبع ذخیره‌کننده، پایدارکننده و در نهایت رهاسازی آهسته فاکتورهای رشد است که فرایندهای تکثیر سلولی، تمایز و مورفوژنز را کنترل می‌کند، به‌گونه‌ای که فعل و انفعالات فاکتورهای رشد با ECM منجر به کنترل غلظت محلی، سیگنال‌دهی، انتشار و جلوگیری از اتلاف آنها می‌شود. آزمایش‌ها نشان داده است که PDGF-BB قابلیت اتصال به فیبرینوژن، فیبرونکتین، ویترونکتین، استئوپونین و تناسین C را دارد [9؛ 10]. از آنجایی که تولید پروتئین به روش نوترکیب در سیستم باکتریایی یک

2 Granulation tissue
3 Heparin binding domain

روش سودآور است، بنابراین تولید انواع پروتئین‌ها از جمله فاکتورهای رشد نیز در سیستم بیانی باکتریایی امکان‌سنجی شده است. در ارتباط با تولید انواع نو ترکیب PDGF، آزمایش‌ها نشان داده است که گلیکوزیلاسیون PDGF برای فعالیت بیولوژیکی آن ضروری نیست و این ویژگی مهم امکان تولید این پروتئین را در سیستم‌های باکتریایی فراهم می‌کند [6]. در مطالعه حاضر بیان و تخلیص PDGF-BB در باکتری *E. coli* SHuffle با غلظت حدود 350 میکروگرم بر میلی‌لیتر انجام شد. با توجه به پیوندهای دی‌سولفیدی درون و بین‌رشته‌ای این پروتئین، انتخاب سویه بیانی SHuffle یک گزینه مناسب می‌توانست باشد که با انجام آزمایش‌های برون‌تنی مانند آزمایش تکثیر، مهاجرت سلولی و امکان اتصال به فیبرینون فعالیت این پروتئین نو ترکیب در سیستم بیانی باکتریایی ارزیابی و تأیید شد.

2- مواد و روش‌ها

1-2 مواد

در این مطالعه تمام مواد شیمیایی از شرکت مرک⁴ (آلمان) خریداری شده است. آنزیم‌های برشگر از شرکت ترموفیشرساینتیفیک⁵ (آمریکا)، ایزوپروپیل بتا دی 1 تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) از شرکت مرک پودر فیبرینون از شرکت هایفن بیومد⁶ (فرانسه)، آنتی‌بادی اولیه خرگوشی بر علیه ناحیه 15-300 انتهای N ترمینال زنجیره بتا فیبرینون از شرکت سانتاکروز بیوتکنولوژی⁷ (آمریکا)، آنتی‌بادی ثانویه ضد آنتی‌بادی خرگوشی کوئزوگه و سویسترا و سترن بلات از شرکت دی ان ای بیوتک⁸ (ایران)، آنتی‌بادی آنتی هیستگ از شرکت سیستمین ژن (ایران)، وبسترای الایزا از شرکت بیورد⁹

(آمریکا) و کیت استخراج پلاسمید از شرکت ژن آل¹⁰ (کره جنوبی) خریداری شده است.

2-2 تعیین و طراحی توالی PDGF-BB نو ترکیب

نخست توالی ژنی PDGF-BB انسانی از بانک اطلاعات NCBI با کد 5155 برداشته شد و به وسیله نرم‌افزار آنالین کدون یوزیج¹¹ شرکت ژن اسکریپت بیوتک¹² (آمریکا) برای استفاده در باکتری *E. coli* بهینه‌سازی شد. توالی ژن در وکتور pET21a (+) بین دو آنزیم برشگر *XhoI* و *NdeI* قرار داده شد. در این طراحی دنباله هیستیدینی وکتور استفاده شد. در نهایت توالی حاصل شده به وسیله شرکت ژن اسکریپت بیوتک ساخته شد.

2-3 بیان PDGF-BB نو ترکیب

پلاسمید حاوی سازه ارسالی در باکتری *E. coli* سویه DH5α با کیت استخراج پلاسمید، استخراج و به باکتری *E. coli* سویه شافل¹³ ترانسفورم شد. باکتری شافل در محیط کشت لوریا برتانی¹⁴ (سدیم کلرید 1 درصد، پپتون 1 درصد و عصاره مخمر 0/5 درصد) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت نهایی 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر در شرایط بیانی مختلف کشت داده شد. شرایط بهینه رشد این باکتری پس از رسیدن به OD 0/5-0/6 در طول موج 600 نانومتر با غلظت نهایی 1 میلی‌مولار IPTG در دمای 30°C، با دور شیکر 180rpm به مدت چهار ساعت به دست آمد. با توجه به اینکه پروتئین مستعد تشکیل اینکلوژن بادی¹⁵ بود، از اوره برای جلوگیری از ایجاد آن استفاده شد. بنابراین رسوب باکتریایی در بافر لیز (سدیم کلرید 500 میلی‌مولار، سدیم فسفات 50 میلی‌مولار، اوره 3 مولار با pH نهایی 7/5) به مدت یک ساعت در دمای 4°C به صورت دورانی روی دستگاه روتاتور قرار گرفت.

10 GeneAll
11 Codon usage
12 GenScript Biotech
13 SHuffle
14 Luria Bertani
15 Inclusion body

4 Merk
5 Thermo Fisher Scientific
6 HYPHEN BioMed
7 Santa Cruz Biotechnology
8 DNA Biotech
9 Bio-Rad

سپس به مدت 5 دقیقه روی یخ (10 سیکل، هر سیکل شامل 10 ثانیه سونیکه و 20 ثانیه استراحت) سونیکه شد. عصاره باکتریایی به دست آمده با دور 12000g به مدت 15 دقیقه در دمای 4°C سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصل شده از رسوب جدا و نمونه ها با استفاده از SDS-PAGE با ژل 12/5 درصد و رنگ آمیزی کوماسی برلیانت بلو R250 به روش لاملی¹⁶ ارزیابی شد.

4-2 تخلیص PDGF-BB نو ترکیب

به دلیل داشتن دنباله هیستیدینی در ساختار پروتئین برای تخلیص از روش کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل آگارز استفاده شد. نخست ستون با 10 برابر حجم با بفر لیز به تعادل رسید و پس از تخلیه بافر تعادل، سوپرناتانت حاصل از لیز باکتری، روی ستون ریخته و به مدت 15 دقیقه در تماس با رزین قرار گرفت. سپس ستون با 20 میلی لیتر از هریک از بافرهای شستشو (سدیم کلرید 500 میلی مولار، سدیم فسفات 50 میلی مولار، اوره 3 مولار و غلظت های 25، 50 و 75 میلی مولار ایمیدازول با pH نهایی 7/5) شستشو داده شد. در نهایت پروتئین با بافر جداکننده (سدیم کلرید 500 میلی مولار، سدیم فسفات 50 میلی مولار، اوره 3 مولار و غلظت 250 میلی مولار ایمیدازول با pH نهایی 7/5) خارج شد. برای حذف اوره و ایمیدازول، پروتئین تخلیص شده در مرحله اول در برابر بافر PBS حاوی اوره 2 مولار به مدت 3 ساعت، سپس در مرحله دوم در مقابل بافر PBS حاوی اوره 1 مولار به مدت 3 ساعت و در نهایت در مقابل بافر PBS فاقد اوره به مدت 5 ساعت در دمای 4°C دیالیز شد.

5-2 وسترن بلات¹⁷

برای تأیید بیان و تخلیص پروتئین، روش وسترن بلات با آنتی بادی بر هیستگ انجام شد. در این روش پس از انجام ژل الکتروفورز SDS-PAGE، ژل از تانک خارج و

ساندویچ وسترن براساس روش شرکت بیورد¹⁸ با غشای PVDF بسته شد. فرایند انتقال به مدت سه ساعت در دمای 4°C با شدت 200 میلی آمپر انجام گرفت. سپس غشای PVDF از دستگاه خارج و با بافر بلاک (BSA 5 درصد در PBS) به مدت یک شبانه روز در دمای 4°C بلاک شد. در مرحله بعد، غشا با بافر شستشو حاوی 0/05 درصد تئوین (تئوین 20-PBS) برای حذف اینترکشن های ناخواسته شسته و سپس در مقابل آنتی بادی بر هیستگ (که با رقت 1:1000 رقیق شده بود) به مدت 2 ساعت در دمای 37°C انکوبه شد. پس از گذشت این زمان، غشا با بافر شستشو سه بار هر بار به مدت 5 دقیقه شسته و سپس در مجاورت سوبسترا DAB قرار گرفت. پس از ظهور باند، غشا با آب مقطر شسته و نگهداری شد.

6-2 بررسی تشکیل پیوند دی سولفیدی

6-2-1 روش المان¹⁹

برای بررسی تشکیل پیوند دی سولفیدی آزمایش المان انجام شد. در این آزمایش 50 میکرولیتر از نمونه خالص شده، به 500 میکرولیتر از بافر سدیم فسفات 100 میلی مولار (pH 8) حاوی 100 میلی مولار EDTA اضافه شد. برای رسم منحنی استاندارد نیز، غلظت های مختلف محلول سیستئین هیدروکلرید (150 و 100، 75، 50، 25 میکرومولار) در بافر سدیم فسفات 100 میلی مولار (pH 8) حاوی 100 میلی مولار EDTA ساخته و سپس به تمام نمونه ها 10 میکرولیتر از معرف المان (DTNB-5، 5) ((Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) اضافه شد و پس از 15 دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب نمونه در طول موج 412 نانومتر خوانده شد. برای تهیه معرف المان، 1 میلی گرم ترکیب DTNB به وسیله بافر سدیم فسفات 100 میلی مولار (pH 8) حاوی 100 میلی مولار EDTA به حجم 250 میکرولیتر رسانده شد.

18 Bio-Rad
19 Ellman

16 Laemmli
17 Western Blot

2-6-2 روش الکتروفورز

با توجه به اینکه پیوند دی‌سولفیدی بین مونومرهای PDGF-BB تشکیل می‌شود، علاوه بر تست المان تشکیل پیوند دی‌سولفیدی با ژل SDS-PAGE با بافر نمونه احیایی و غیراحیایی نیز بررسی شد. در این حالت نمونه یک بار با بافر احیایی حاوی بتامرکاپتواتانل و یک بار با بافر غیراحیایی روی ژل 12/5 درصد آکریل آمید برده شد.

2-7-2 بررسی تکثیر سلولی (MTT assay)

اثر فاکتور رشد PDGF-BB بیان شده بر زنده‌مانی و تکثیر رده سلولی L929 (NCTC clone 929) براساس استاندارد ایزو (ISO10993-5: 2009) انجام شد. 1×10^4 عدد سلول داخل هریک از چاهک‌های پلیت کشت سلولی 96 خانه تلقیح و سپس پلیت به مدت 24 ساعت (دمای 37°C ، غلظت CO_2 5 درصد، رطوبت 90 درصد) انکوبه شد. 100 میکرولیتر از غلظت‌های مختلف پروتئین (100-10 میکروگرم بر میلی‌لیتر) در سه تکرار به هریک از چاهک‌ها اضافه شد و به مدت 24 ساعت با همان شرایط انکوبه شد. 10 میکرولیتر معرف MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium) با غلظت 5 میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پلیت نمونه به مدت 2-4 ساعت (دمای 37°C ، غلظت CO_2 5 درصد، رطوبت 90 درصد) انکوبه شد. محلول MTT حذف و رسوب بنفش رنگ حاصل در DMSO حل شد. پلیت 96 خانه به مدت 30 دقیقه روی شیکر قرار گرفت و جذب در طول موج 570 نانومتر خوانده شد.

2-8-2 بررسی مهاجرت سلولی

یک روز قبل از شروع آزمایش، پلیت کشت سلولی 12 چاهکی با رده سلول‌های L929 به مدت 24 ساعت (دمای 37°C ، غلظت CO_2 5 درصد، رطوبت 90 درصد) کشت شد. محیط‌های کشت تیمار (حاوی پروتئین فاکتور رشد نوترکیب PDGF-BB در محیط کشت پایه) و شاهد به صورت سه بار تکرار به هر چاهک اضافه شدند. با نوک

سمپلر 10-0/5 میکرولیتری، خراشی در مرکز هر چاه ایجاد شد. سپس مهاجرت روی هر نمونه با میکروسکوپ بررسی شد تا زمانی که زخم‌ها بسته شدند.

2-9-2 بررسی اتصال به فاکتور رشد PDGF-BB به

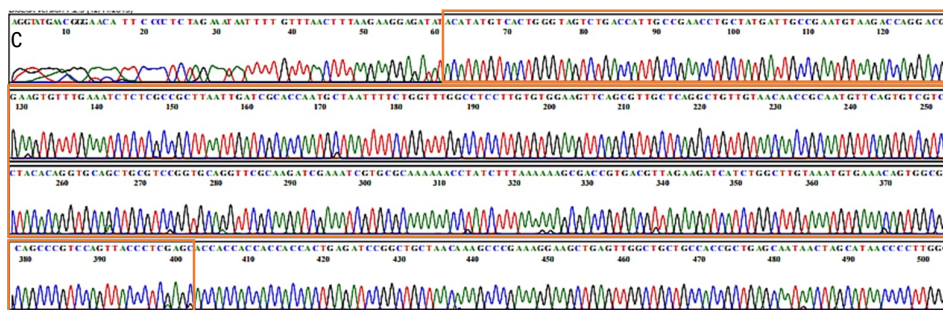
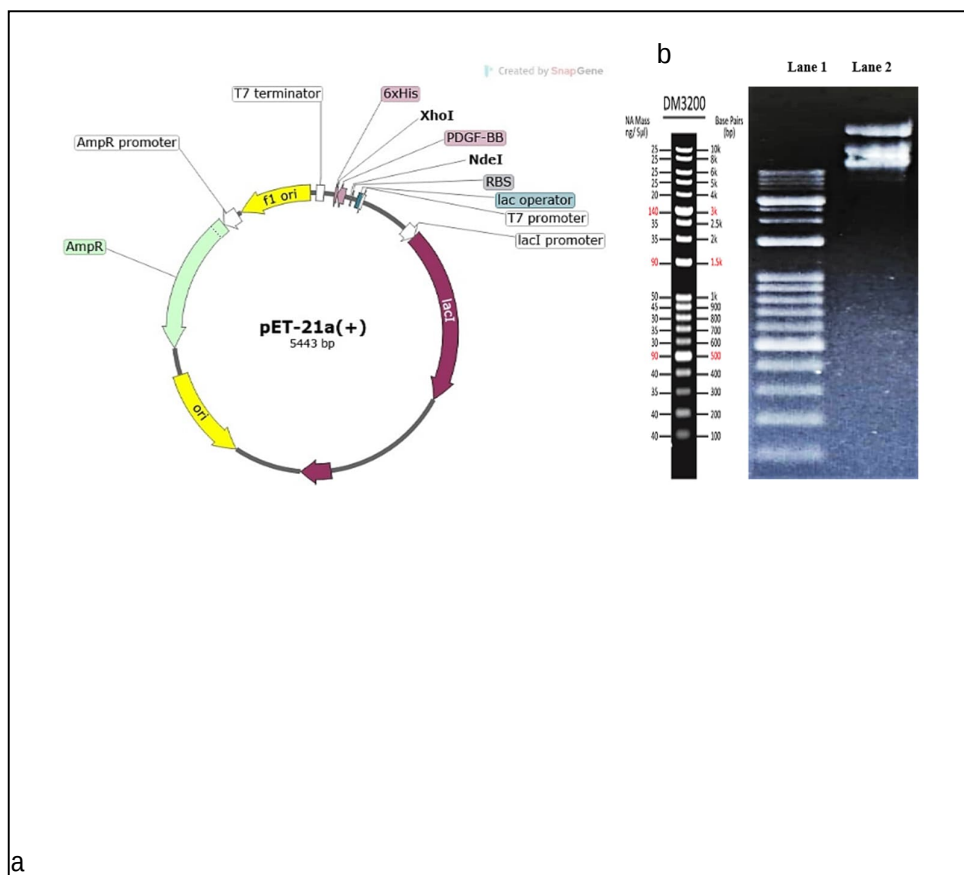
فیبرینوژن با روش الایزا

نخست پلیت پلی‌استایرن 96 چاهکی برای تثبیت نمونه، با 100 میکرولیتر پروتئین نوترکیب PDGF-BB (10 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت یک شبانه روز در دمای 4°C ، انکوبه و پس از تثبیت نمونه، پلیت سه بار با بافر PBS شستشو شد. پلیت با BSA 5 درصد در PBS به مدت سه ساعت در دمای 37°C بلاک شد. پس از 3 بار شستشو با توین-20 PBS، پروتئین فیبرینوژن با سری غلظت (0.5، 1، 2، 3، 4، 5 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه و به مدت دو ساعت در دمای 37°C ، انکوبه شد. پلیت 5 بار با توین-20 PBS شسته شد. آنتی‌فیبرینوژن به عنوان آنتی‌بادی اولیه به مدت دو ساعت در دمای 37°C ، انکوبه و در آخر پلیت با آنتی‌بادی ثانویه که همان آنتی-بادی ضد IgG خرگوشی است که با HRP کونژوگه شده است به مدت دو ساعت در دمای 37°C انکوبه شد. سوبسترا TMB براساس روش شرکت بیورد آماده و به هریک از چاهک‌ها اضافه شد. در آخر واکنش با اسید سولفوریک 1 نرمال متوقف و میزان جذب همه چاهک‌ها در طول موج 450 نانومتر با پلیت ریدر مدل Epoch شرکت بیوتک²⁰ (آمریکا) خوانده شد.

3- نتایج

3-1- ترانسفورم پلاسمید حاوی ژن به سویه بیانی E. coli SHuffle

همان‌طور که در شکل 1 نشان داده شده است، پلاسمید حاوی ژن از میزبان *E. coli* DH5 α استخراج و به باکتری بیانی *E. coli* شافل منتقل شد. صحت توالی به وسیله توالی‌یابی بررسی و سپس شرایط بیان بهینه شد.

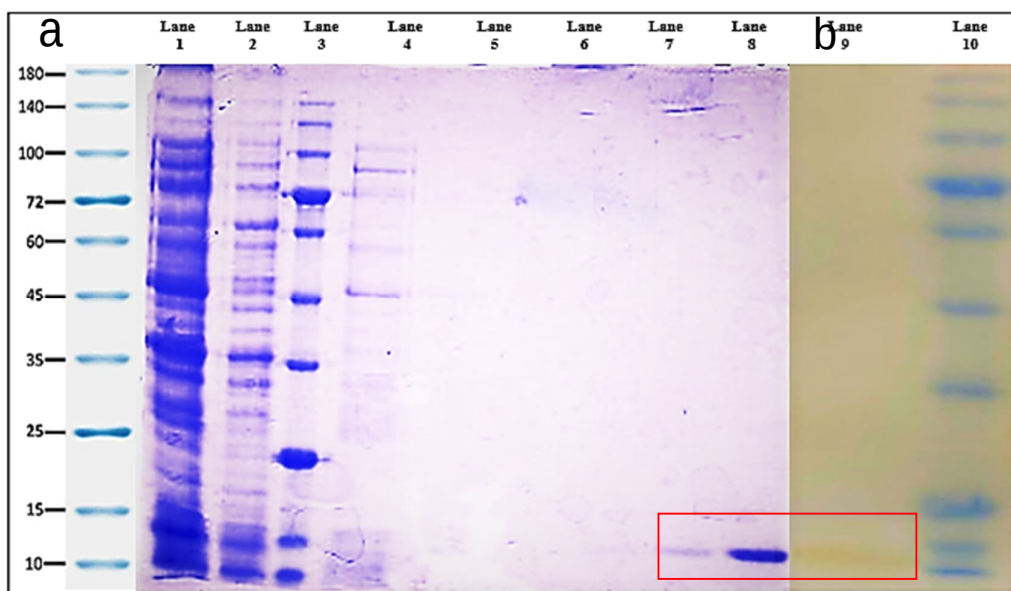


شکل 1 الف - نقشه پلاسمید: ژن PDGF-BB بین دو آنزیم برشگر *XhoI* و *NdeI* قرار دارد و دنباله هیستیدینی در بخش C ترمینال می باشد؛ ب- ژل آگارز یک درصد: استخراج پلاسمید از میزبان *E. coli* DH5a برای کلون به سویه بیانی Shuffle؛ ج- تعیین توالی: توالی ژن کلون شده.

پس از استخراج از باکتری با بافر لیز به وسیله ستون نیکل آگارز با غلظت 350 میکروگرم بر میلی لیتر تخلیص و وسترن بلات با آنتی بادی آنتی هیستگ برای تأیید تخلیص روی پروتئین نوترکیب تخلیص شده گذاشته شد (شکل 2-ب).

2-3 بیان و تخلیص پروتئین PDGF-BB

نتیجه ژل الکتروفورز نشان داده می دهد که این پروتئین در دمای 30 درجه به مدت چهار ساعت با غلظت 1 میلی - مولار IPTG و دور شیکر 180rpm در بیشترین غلظت بیان می شود (شکل 2-الف). پروتئین نوترکیب تولید شده



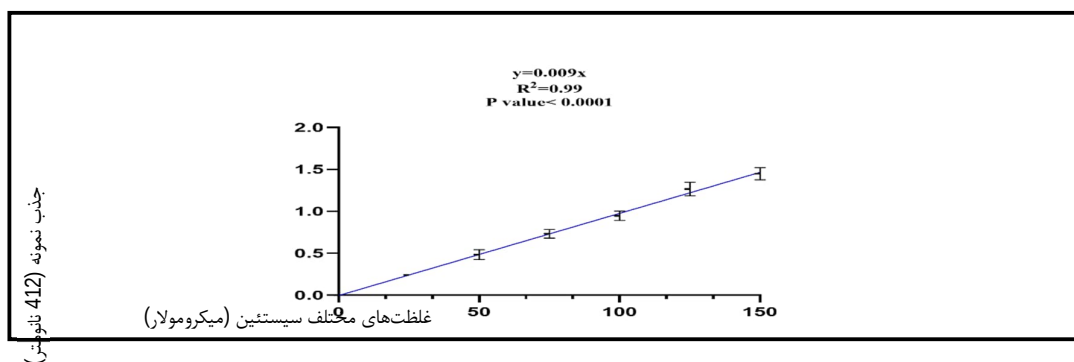
شکل 2 ژل SDS-PAGE پروتئین نو ترکیب PDGF-BB (الف). L1 عصاره خام محلول حاصل از بیان پروتئین در 30 درجه با غلظت یک مولار IPTG به مدت چهار ساعت. L2 اولین خروجی از ستون که نشان می‌دهد بخش زیادی از پروتئین به ستون متصل شده است، L3 مارکر پروتئینی. L4,5,6,7 نمونه‌های خروجی بعد از شستشو با بافر شستشو با غلظت‌های 25, 50, 75, 100 میلی مولار ایمیدازول. L8 خروج پروتئین تخلیص شده با بافر حاوی ایمیدازول 250 میلی - مولار با غلظت 350 میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد. وسترن بلات نمونه برای تأیید بیان (ب). L9 نمونه تخلیص شده و L10 مارکر پروتئینی می‌باشد.

3-3-3 تأیید تشکیل پیوند دی سولفیدی

3-3-3-1 روش المان

پروتئین نو ترکیب PDGF-BB دو پیوند دی سولفیدی بین رشته‌ای و سه پیوند دی سولفیدی درون رشته‌ای دارد. در روش المان با استفاده از معرف DTNB تشکیل پیوندهای دی سولفیدی بررسی می‌شود. در صورت تشکیل باند دی سولفیدی گروه سولفیدریل آزاد وجود ندارد و معرف، تغییر رنگ نمی‌دهد. در صورت تشکیل نشدن باند دی سولفیدی، معرف با گروه‌های

سولفیدریل آزاد سیستئین‌ها وارد واکنش شده و تغییر رنگ مشاهده می‌شود. در این آزمایش از غلظت‌های مختلف نمونه کنترل (که همان آمینواسید سیستئین است) استفاده و منحنی استاندارد برای این غلظت‌ها رسم شد. (شکل 3). در ادامه جذب نمونه حاوی پروتئین PDGF-BB خوانده شد و در منحنی قرار گرفت که جذب نمونه‌ها تقریباً برابر با صفر بود که این موضوع نشان‌دهنده تشکیل پیوند دی سولفیدی است.



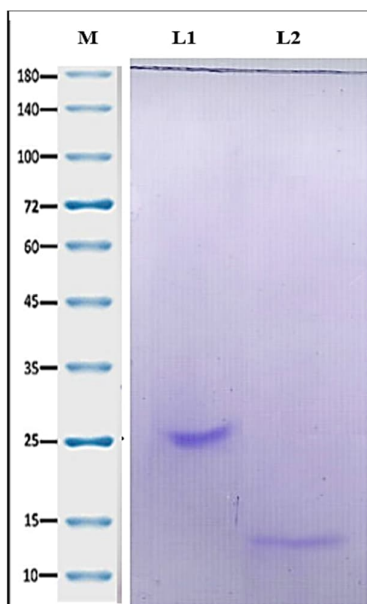
شکل 3 نمودار منحنی استاندارد سیستمین در غلظت‌های مختلف در حضور معرف است. در قسمت جدول نیز جذب نمونه‌های PDGF-BB تخلیص شده آورده شده است که با توجه به اینکه در PDGF پیوند دی‌سولفیدی تشکیل شده بود و سیستمین آزادی وجود ندارد، جذب نمونه‌ها در حد صفر بود.

نام نمونه	جذب در 412nm
نمونه شاهد (blank)	0/082
تکرار 1 نمونه	0/081
تکرار 2 نمونه	0/093
تکرار 3 نمونه	0/088

شوند. از آنجائی که زیرواحدهای PDGF-BB همو دایمر است در صورت تشکیل پیوند دی‌سولفیدی در بافر غیر احیائی (فاقد 2-مرکاپتواتانول) وزن ملکولی دو برابر نمونه در بافر احیائی (حاوی 2-مرکاپتواتانول) خواهد بود (شکل 4).

3-3-2- روش الکتروفورز

2-مرکاپتواتانول جهت احیاء پیوندهای دی‌سولفیدی پروتئین در الکتروفورز ژل پلی آکریل‌امید کاربرد و منجر به شکستن پیوندهای دی‌سولفیدی بین مولکولی بین زیر واحدهای می شود و به زیر واحدهای یک پروتئین اجازه می‌دهد، تا به‌طور مستقل در SDS-PAGE از هم جدا



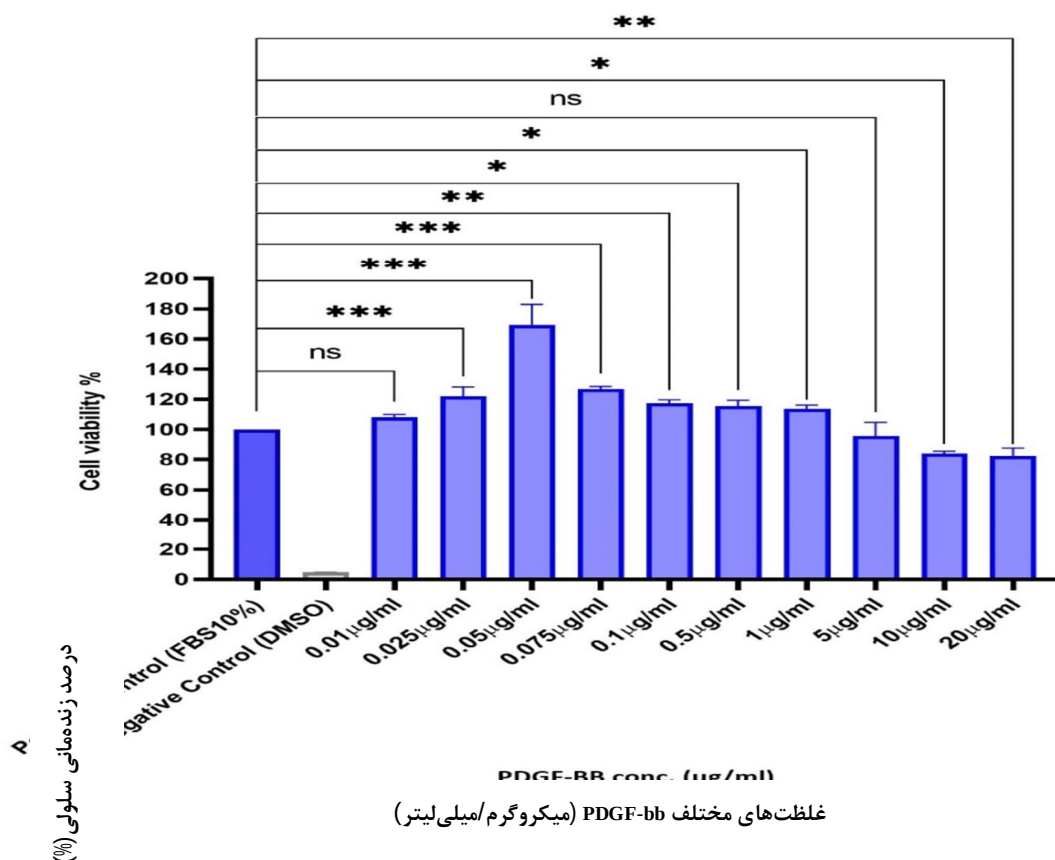
شکل 4 ژل SDS-PAGE برای نمونه PDGF-BB با بافر نمونه احيایی و غير احيایی: M مارکر پروتئينی، L1 نمونه در بافر غير احيایی و L2 نمونه در بافر احيایی است. همان‌طور که مشخص است، با تشکیل پیوند دی‌سولفیدی بین دو رشته، نمونه در بافر غير احيایی وزنی حدود دوبرابر به نسبت نمونه در بافر احيایی دارد.

4-3 بررسی تکثیر سلولی به روش MTT

نتایج بررسی تکثیر سلولی بر رده سلولی L929 نشان داد که در حضور پروتئین PDGF-BB تخلص‌شده، سلول‌ها قابلیت زنده‌مانی در غلظت‌های بین 0/025-1 میکروگرم بر میلی‌لیتر را دارند و در غلظت‌های بالاتر اثر مهاری بر زنده‌مانی سلولی دارند (شکل 5). درواقع بررسی نتایج نشان می‌دهد که در طول 24 ساعت در حضور پروتئین نو ترکیب PDGF-BB در غلظت‌های بین 0/0-025/1 میکروگرم بر میلی‌لیتر، سلول‌ها تکثیر شده و درصد زنده‌مانی از نمونه کنترل مثبت که همان محیط کشت کامل حاوی 10 درصد سرم جنین گاوی (FBS) بیشتر شده است.

شکل 5 بررسی تکثیر سلولی با روش MTT. غلظت های 0/01 تا 20 میکروگرم بر میلی‌لیتر PDGF-BB در محیط کشت پایه (DMEM بعلاوه L-گلوتامین) بررسی شد. از محیط کشت کامل (DMEM، L-گلوتامین و

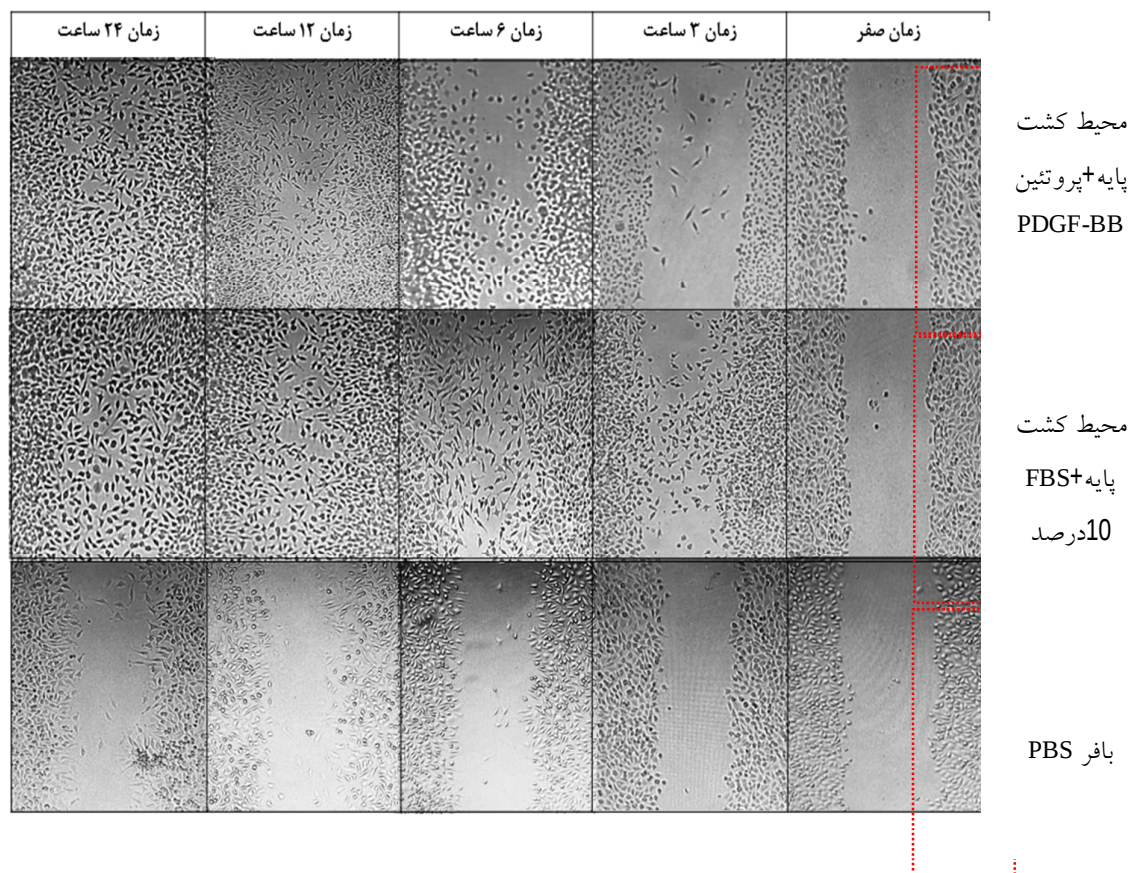
10 FBS درصد) به‌عنوان کنترل مثبت و DMSO به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. همان‌طور که مشخص است، در غلظت 0/05 میکروگرم بر میلی‌لیتر بالاترین درصد زنده‌مانی دیده می‌شود (برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار گراف پد²¹ استفاده شد. در این بررسی میانگین زنده‌مانی نمونه کنترل مثبت 100 درصد در نظر گرفته شد و اختلاف میانگین رشد نمونه‌ها با کنترل مثبت مقایسه شد (میانگین اختلاف بین داده‌ها در $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ معنادار در نظر گرفته شد).



5-3 بررسی مهاجرت سلولی

برای بررسی اثر فاکتور رشد در مهاجرت رده سلولی L929 با روش ایجاد خراش، PDGF-BB تخلیص شده با غلظت نهایی 0/05 میکروگرم بر میلی لیتر در محیط کشت پایه (DMEM، L-گلوتامین) آماده و از محیط کشت کامل (DMEM، L-گلوتامین و FBS 10 درصد) به عنوان کنترل مثبت و از بافر PBS به عنوان کنترل منفی در

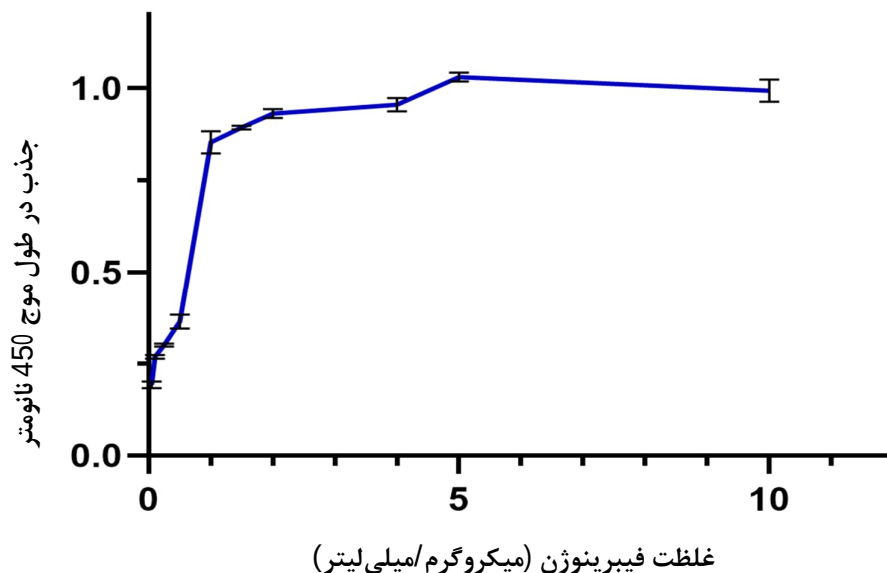
آزمایش استفاده شد. از خراش ایجاد شده در ته چاهک‌ها در ساعت مختلف (6، 12، 24) عکس‌برداری انجام شد که نتایج نشان داد فاکتور رشد PDGF-BB تخلیص شده اثری تقریباً مشابه با محیط کشت کامل حاوی 10 درصد FBS را در القای ترمیم خراش دارد. در واقع هر چه قدر توانایی سلول‌ها در مهاجرت و تهاجم بالاتر باشد، آن ناحیه خراش داده شده سریع‌تر پر می‌شود (شکل 6).



شکل 6 بررسی مهاجرت سلولی با روش زخم: در ردیف اول مهاجرت سلول‌های L929 در حضور نمونه تخلص PDGF-BB با غلظت 0/05 میکروگرم در محیط کشت پایه بدون FBS در ساعت‌های مختلف دیده می‌شود. از ساعت 6 مهاجرت شروع شده و در 12 ساعت زخم ایجاد شده تقریباً بسته شده و بعد از گذشت 24 ساعت مرز زخم نیز تشخیص داده نمی‌شود. در ردیف وسط مهاجرت سلول‌های L929 در حضور محیط کشت کامل حاوی FBS به عنوان کنترل مثبت و در ردیف آخر مهاجرت سلولی در حضور بافر PBS بدون محیط کشت به عنوان کنترل منفی دیده می‌شود. همان‌طور که نشان داده شده است، در کنترل مثبت از ساعت 3 شروع به ترمیم خراش شده است و پس از 24 ساعت اثری از خراش دیده نمی‌شود. در کنترل منفی که نمونه بدون مواد مغذی

است، سلول‌ها ثابت باقی مانده و تغییری در خراش ایجاد نشده است.

3-6 بررسی عملکرد اتصال به فیبرینوژن به روش الایزا
برای بررسی اتصال PDGF-BB تخلص شده به فیبرینوژن از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. همان‌طور که نتایج الایزا نشان می‌دهد (شکل 7)، با افزایش غلظت فیبرینوژن، جذب افزایش پیدا کرده است که این موضوع نشان‌دهنده اتصال فیبرینوژن به PDGF-BB است، زیرا در این آزمایش آنتی‌بادی استفاده شده بر علیه فیبرینوژن است و با توجه به اینکه PDGF-BB در کف چاهک‌ها تثبیت شده است در صورت اتصال فیبرینوژن به PDGF-BB، اتصال آنتی‌بادی انجام می‌شود.



شکل 7 بررسی اتصال با روش الایزا: نتایج آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت فیبرینوژن، جذب در طول موج 450 نانومتر (که ناشی از اتصال فیبرینوژن به PDGF-BB است) افزایش پیدا می‌کند. البته افزایش جذب تا زمانی ادامه دارد که جایگاه‌های PDGF-BB به اشباع برسد. از این نقطه به بعد مقدار جذب، عددی تقریباً ثابت است که با افزایش غلظت تغییری نخواهد کرد.

4- بحث و نتیجه‌گیری

امروزه زخم‌های مزمن به صورت چشمگیری در حال افزایش می‌باشند. این مسئله به یکی از موضوعات مهم پزشکی تبدیل شده است، زیرا درمان‌های موجود برای زخم‌های مزمن مؤثر نیستند. زخم‌های مزمن به دلیل طولانی بودن مدت زمان و هزینه‌های بالا، یک مشکل اقتصادی بزرگ برای جوامع ایجاد می‌کند. در مطالعات گذشته به استفاده از فاکتورهای رشد برای تسریع فرایند ترمیم زخم اشاره شده است و فاکتورهای رشدی مانند BMP-2 و PDGF-BB توانسته‌اند از سازمان غذا و دارو ایالات متحده آمریکا مجوز مصرف انسانی دریافت کنند [11].

ترمیم زخم یک فرایند پویا و تعاملی است و به‌خوبی سازمان‌دهی می‌شود که البته نیازمند محیط مطلوب و رگ-

زایی مناسب است. فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF-BB) که نقش مهمی در روند بهبود زخم دارد، به یکی از اهداف جذاب در پزشکی بازساختی برای درمان ترمیم زخم تبدیل شده است [12]. PDGF-BB یک میتوژن برای سلول‌های مزانشیمی از جمله استئوبلاست‌ها و فیبروبلاست‌های لته و پرئودنتال است. پلاکت‌های در حال تجزیه، استئوبلاست‌ها، فیبروبلاست‌های ماهیچه صاف، سلول‌های اندوتلیال، ماکروفاژها و کراتینوسیت‌ها توانایی تولید این فاکتور را دارند. این پروتئین برای روند بهبود زخم در بسیاری از جنبه‌ها مانند رگ‌زایی، تنظیم التهاب، تحریک تکثیر و مهاجرت سلولی، رسوب کلاژن و غیره تأثیر می‌گذارد [13]، برای مثال PDGF-BB می‌تواند تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تقویت کند و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال عروقی را

تحریک کند [14]. منگ و همکاران نیز گزارش دادند که PDGF می‌تواند تمایز سلول‌های بنیادی عروقی چند توان را به سلول‌های ماهیچه صاف القا کند [15]. PDGF-BB یک گلیکوپروتئین با دو زنجیره پلی‌پپتیدی است که از طریق دو پیوند دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند. بررسی‌ها بر پروتئین نوترکیب PDGF در مقایسه با پروتئین طبیعی نشان داده است که گلیکوزیلاسیون PDGF-BB نقشی در اتصال آن به گیرنده ندارد [16]. در- نتیجه این پروتئین نیاز به سیستم‌های پرهزینه یوکاریوتی مانند مخمر و اصلاحات پس از ترجمه ندارد. بنابراین می‌تواند در سیستم‌های باکتریایی (که یکی از راه‌های تولید مقرون‌به‌صرفه پروتئین‌ها است) تولید شود. در مطالعه حاضر، پروتئین نوترکیب PDGF-BB در سیستم باکتریایی *E. coli* سویه SHuffle بیان و با ستون نیکل آگارز تخلص شد. سیستم باکتری *E. coli* برای تولید صنعتی چندین نوع پروتئین نوترکیب از سوی سازمان غذا و دارو آمریکا مجوز GRAS را دریافت کرده است. با توجه به وجود پیوندهای دی‌سولفیدی در این پروتئین، استفاده از میزبانی که امکانات لازم برای تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی را داشته باشد، ضروری است و سویه SHuffle (که یک سویه مهندسی شده برای پروتئین‌های نوترکیب با پیوند دی‌سولفیدی است) این امکان را برای این مطالعه فراهم کرد. همچنین سیستم ستون نیکل آگارز یکی از راه‌های تخلص صنعتی پروتئین‌های نوترکیب است [7]. برای بررسی فعالیت سلولی، آزمایش تکثیر سلولی برای پروتئین تخلص‌شده با روش MTT انجام شد. در بررسی فنگ و همکاران در سال 2021 اثر PDGF-BB بر زنده‌مانی سلولی HBVSMC و افزایش بیان miR-552 نشان داده شد. در این بررسی دیده شد که PDGF-BB در غلظت 0/05 میکروگرم بر میلی‌لیتر، اثر بالایی بر زنده‌مانی سلولی و تکثیر سلولی دارد [17]. نتایج بررسی حاضر نیز نشان داد که پروتئین نوترکیب PDGF-

BB در غلظت‌های بین 0/025-0/1 میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر بیشتری بر رشد سلولی به نسبت کنترل مثبت (که محیط کامل حاوی FBS 10 درصد است) دارد. بررسی مهاجرت سلولی با روش خراش یا scratch نیز برای اطمینان از عملکرد فاکتور رشد نوترکیب بیان‌شده گذاشته شد، زیرا یکی از ویژگی‌های فاکتور رشد مشتق از پلاکت القا تکثیر سلولی است. سنجش خراش در شرایط آزمایشگاهی روشی آسان، کم‌هزینه و بهینه برای اندازه‌گیری مهاجرت سلولی است. مراحل اولیه شامل ایجاد یک «خراش» در تک لایه سلول، گرفتن تصاویر در آغاز و در فاصله‌های منظم در طول مهاجرت سلول تا بستن خراش و مقایسه تصاویر برای تعیین کمیت نرخ مهاجرت سلول‌ها است [18]. چن و همکاران در سال 2021 نشان دادند که پروتئین PDGF-BB نوترکیب انسانی (rhPDGF-BB) قابلیت ترمیم زخم در آزمایش خراش را پس از 24 ساعت دارد. نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان می‌دهد که فاکتور رشد نوترکیب بیان‌شده قابلیت ترمیم کامل زخم را پس از گذشت 24 ساعت همانند کنترل مثبت که حاوی محیط کامل و FBS است، دارد [19]. سرم جنین گاوی (FBS) یک محیط طبیعی است که در کشت‌های سلولی استفاده می‌شود. این محیط حاوی مقادیر زیادی مواد مغذی و فاکتورهای رشد موردنیاز برای رشد سلول است و درواقع شرایط بهینه موردنیاز سلول‌ها را برای رشد فراهم می‌کند [20]. اتصال فاکتورهای رشد به ECM به حضور کنترل‌شده آنها در محل زخم کمک می‌کند. در زمان بروز آسیب و ایجاد زخم، لخته فیبرینی یکی از ارکان مهم در ترمیم زخم است. در سال 2009 موگفورد و همکاران مشاهده کردند که فرمول فیبرینوژن-ترومبین همراه با فیبروبلاست‌ها و PDGF-BB باعث بهبود زخم پوستی می‌شود [21]. فاکتور رشد پلاکتی با افزایش گرانولاسیون بافتی به ترمیم زخم کمک می‌کند. در سال 2014 مارتینو و همکارانش

- [6] Ghasemi, Y. *et al.* (2020) 'Cloning, expression, and purification of human PDGF-BB gene in *Escherichia coli*: new approach in PDGF-BB protein production', *Gene Reports*, 19, 100653.
- [7] Chen, P.H. *et al.* (2013) 'Platelet-derived growth factors and their receptors: structural and functional perspectives', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1834(10), 2176–2186.
- [8] Westermark, B. and Heldin, C.H. (1993) 'Platelet-derived growth factor structure, function and implications in normal and malignant cell growth', *Acta Oncologica*, 32(2), 101–105.
- [9] Martino, M.M. *et al.* (2014) 'Matrix enhances tissue healing', *Science*, 343, 885–889.
- [10] Martino, M.M. and Hubbell, J.A. (2010) 'The 12th–14th type iii repeats of fibronectin function as a highly promiscuous growth factor-binding domain', *The FASEB Journal*, 24(12), 4711–4721.
- [11] Deptuła, M. *et al.* (2020) 'Development of a peptide derived from platelet-derived growth factor (PDGF-BB) into a potential drug candidate for the treatment of wounds', *Advances in Wound Care*, 9(12), 657–675.
- [12] Zhang, Z. *et al.* (2021) 'PDGF-BB/SA/Dex injectable hydrogels accelerate BMSC-mediated functional full thickness skin wound repair by promoting angiogenesis', *Journal of Materials Chemistry B*, 9(31), 6176–6189.
- [13] Cooke, J.W. *et al.* (2006) Effect of RhPDGF-BB delivery on mediators of periodontal wound repair. *Tissue Eng*;12(6):1441-50.
- [14] Zhang, M. *et al.* (2018) 'The effects of platelet-derived growth factor-bb on bone marrow stromal cell-mediated vascularized bone regeneration', *Stem Cells International*. 31; 3272098.
- [15] Meng, X. *et al.* (2018) 'Oxidation prevents hmgbl inhibition on PDGF induced differentiation of multipotent vascular stem cells to smooth muscle cells: a possible mechanism linking oxidative stress to atherosclerosis', *Biomed Research International*, 23; 4019814.
- [16] Devare, S.G. *et al.* (1984) 'Expression of the PDGF-related transforming protein of simian sarcoma virus in *E. coli*', *Cell*, 36(1), 43–49.
- [17] Feng, M. *et al.* (2022) 'ATF4 promotes brain vascular smooth muscle cells proliferation, نشان دادند که فاکتور رشد مشتق از پلاکت از محل دمین اتصالی به هپارین قابلیت اتصال به فیبرین / فیبرینوژن را دارد [9]. این مطالعه نشان داد که این قسمت از فیبرینوژن (که در آغاز زنجیره بتا فیبرین / فیبرینوژن پس ناحیه برش ترومبین قرار دارد) قابلیت اتصال به انواع فاکتورهای رشد را دارد. در بررسی حاضر، اتصال فاکتور رشد نوترکیب بیان شده به فیبرینوژن با روش الیزا ارزیابی شد. نتایج به دست آمده از بررسی اتصال با روش الیزا مشخص کرد که پروتئین نوترکیب PDGF-BB تخلیص شده در این مطالعه قابلیت اتصال به فیبرینوژن را دارند.
- به طور کلی نتایج این بررسی نشان داد که پروتئین PDGF-BB بیان شده در باکتری *E. coli* فعالیت تکثیر سلولی در 24 ساعت اول کشت را دارد. نتایج آزمایش الیزا در مقابل پروتئین فیبرینوژن نشان داد که نمونه نوترکیب PDGF بیان شده در سویه باکتری علاوه بر دارا بودن فعالیت تکثیری در سطح سلولی به دلیل حفظ ساختار اصلی خود، قابلیت اتصال به پروتئین فیبرینوژن را دارد.

منابع

- [1] Vaidyanathan, L. (2021) 'Growth factors in wound healing', *Biomedical and Pharmacology Journal*, 14(3), 1469–1480.
- [2] Locatelli, L. *et al.* (2021) 'Platelets in wound healing: what happens in space?', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 1–11.
- [3] Jian, K. *et al.* (2022) 'PDGF-BB derived supramolecular hydrogel for promoting skin wound healing', *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 1–9.
- [4] Moore, C. A. (2017). 'Aptamer-based biosensor for platelet-derived growth factor-BB using fluorescence resonance energy transfer', Texas State University, San Marcos, Texas.
- [5] Lynch, S.E. *et al.* (1987) 'Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors.', *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 84(21), 7696–7700.

- [20] Liu, S. *et al.* (2023) 'fetal bovine serum, an important factor affecting the reproducibility of cell experiments', *Scientific Reports*, 13(1), 1–8.
- [21] Mogford, J.E. *et al.* (2009) 'Fibrin sealant combined with fibroblasts and platelet-derived growth factor enhances wound healing in excisional wounds', *Wound Repair and Regeneration*, 17(3), 405–410.
- invasion and migration by targeting mir-552-ski axis', *Plos ONE*, 17(7), 1–14.
- [18] Liang, C.C. *et al.* (2007) '*In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro', *Nature Protocols*, 2(2), 329–333.
- [19] Chen, L. *et al.* (2021) 'Inhibition of PDGF-BB reduces alkali-induced corneal neovascularization in mice', *Molecular Medicine Reports*, 23(4), 1–11.

Expression and purification of platelet-derived growth factor and evaluation of its function in binding to fibrinogen

Maryam Molasalehi¹, Bahareh Dabirmanesh², sadegh HasanNia^{3*}

1- Department of Biochemistry, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2- Associate Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3- Professor Department of Biochemistry, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

*corresponding author : hasannia@modares.ac.ir

Received: 2023/7/13

Accepted: 2023/12/2

Abstract

The wound healing process is a complex and dynamic process that involves different types of cells and metabolic pathways. This process consists of three main phases, including the inflammatory phase, cell proliferation, and tissue regeneration. Successful wound healing depends on careful regulation and coordination between the factors involved.

Until recent years, the strategy of treating chronic wounds was limited to wound preparation, removal of necrotic tissue, and control of infection and inflammation, but recently the use of growth factors has been approved to accelerate the healing process and heal the wound. Human recombinant growth factor PDGF-BB is one of the first types of recombinant growth factors that have been approved in the treatment of diabetic wounds. Various studies have reported that PDGF as an important mediator in the wound healing process helps to accelerate healing and reduce inflammation, cell proliferation, angiogenesis, and tissue regeneration. In this study, the PDGF-B gene was synthesized in the pET 21(a+) expression vector and cloned in the *E. coli* SHuffle host under the control of the T7 promoter. After expression, purification was done using a nickel agarose column. Since the purified recombinant protein has a His-tag sequence, the protein band was confirmed by western blotting with an anti-His-tag antibody, and the correctness of disulfide bond formation was checked by the Ellman method and SDS-PAGE. To investigate the activity of the purified protein, cell proliferation, migration, and binding to extracellular matrix protein, experiments were performed. The results of this study showed that PDGF is expressed as a dimer with complete disulfide bonds. The expression of this protein in the SHuffle bacterial host, which is capable of forming disulfide bonds, probably led to the maintenance of the protein structure. The results of in vitro studies showed that the purified protein has both main activities, i.e., cell proliferation and the ability to bind to cell matrix proteins.

Key Words: Wound healing, platelet-derived growth factor, expression, cloning.