Expression, purification and evaluation of the recombinant human fibroblast growth factor receptor 2b kinase domain

M. Moghadasi[*] D. Ilghari[**] N. Gheibi[***] M. Sirati-Sabet[****] F. Khabbaz[*****] H. Piri[**]

*M.Sc. Student of Medical Biotechnology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
**Assistant Professor of Clinical Biochemistry, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
***Associate Professor of Biophysics, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
****Associate Professor of Biochemistry, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
*****M.Sc. in Biochemistry, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Abstract

Background: Fibroblast growth factor receptor 2b (FGFR2b) plays an important role in cell signaling pathway and regulating several key biological processes including cellular differentiation and proliferation. Genetic alterations (e.g. point mutation in FGFR2b tyrosine kinase domain) are associated with breast cancer, ovarian cancer, and endometrial cancer.

Objective: The aim of this study was to express and purify the recombinant human FGFR2b kinase domain.

Methods: This experimental study was conducted in Qazvin University of Medical Sciences during 2013. Recombinant pLEICS-01 vectors containing the FGFR2b tyrosine kinase domain gene were transformed into E. coli BL21 (DE3). Recombinant protein expression was induced with 1mM IPTG and analyzed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The recombinant protein was purified by Ni^{2+}-NTA affinity chromatography. After dialysis, the protein activity was evaluated by interaction with the wild type and mutant SH2 domains of phospholipase C (PLC) using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Data were analyzed using One-way ANOVA and Tukey's test.

Findings: Pre and post-induction SDS-PAGE analysis showed that the expressed protein was soluble at 20 ºC. SDS-PAGE analysis also confirmed that no contamination and bacterial proteins were co-eluted with the purified protein. PAGE method results confirmed that the purified protein was in an active state.

Conclusion: With regards to the results, the recombinant FGFR2b kinase domain-a 38 kDa protein-was expressed and purified in an active and soluble state.

Keywords: Fibroblast Growth Factor Receptors, Proteins, Isolation and Purification, Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Corresponding Address: Dariush Ilghari, Department of Clinical Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Shahid Bahonar Blvd., Qazvin, Iran
Email: d.Ilghari@gmail.com
Tel: +98-281-3324971
Received: 11 Nov 2013
Accepted: 7 Jan 2014

بیان، تخلیص و بررسی عملکرد ناحیه کینازی گیرنده نوترکیب عامل رشد فیبروبلاستی 2b انسانی

معصومه مقدسی* دکتر داریوش ایلغاری** دکتر نعمت‌الله غیبی*** دکتر مجید سیرتی ثابت**** فرهاد خباز***** دکتر حسین پیری**

* دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
** استادیار بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
*** دانشیار بیوفیزیک مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
**** دانشیار بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
***** کارشناس ارشد بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

آدرس نویسنده مسؤول: قزوین، بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی،گروه بیوشیمی و ژنتیک، تلفن ۳۳۲۴۹۷۱- ۰۲۸۱
Email: d.Ilghari@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۷

چکیده

زمینه: گیرنده عامل رشد فیبروبلاستی 2b (FGFR2b) در مسیر پیام‌رسانی سلولی و تنظیم فرایندهای مهم زیستی از جمله تمایز و تکثیر سلولی نقش اساسی دارد. تغییرات ژنتیکی نظیر جهش نقطه‌ای در ناحیه تیروزین کینازی FGFR2b با سرطان پستان، تخمدان و رحم در ارتباط است.

هدف: مطالعه به منظور بیان و خالص‌سازی مقدار مناسبی از ناحیه کینازی FGFR2b انسانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۲ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. پلاسمید pLEICS-01 که حاوی ژن ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b بود به باکتری مستعد اشرشیاکلی BL21 جهت بیان ژن مورد نظر انتقال داده شد. بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از IPTG یک میلی‌مولار القا و با استفاده از الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل آمید در حضور SDS (SDS-PAGE) ارزیابی شد. پروتئین بیان شده با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی توسط ستون حاوی Ni^{2+}-NTA خالص شد. فعال بودن نمونه پروتئین بعد از دیالیز توسط تعامل با ناحیه SH2 فسفولیپاز C (PLC) طبیعی و موتان توسط روش PAGE بررسی شد. داده‌ها با آزمون‌های آماری واریانس یک طرفه و توکی تحلیل شدند.

یافته‌ها: بررسی SDS-PAGE قبل و بعد از القا شدن نشان داد که پروتئین بیان شده در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد محلول بود. همچنین بررسی SDS-PAGE تأیید کرد که پروتئین خالص شده عاری از آلودگی بود و پروتئین‌های باکتریایی نداشت. نتایج PAGE فعال بودن پروتئین خالص شده را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: باتوجه به یافته‌ها، ناحیه کینازی گیرنده نوترکیب عامل رشد فیبروبلاستی 2b که یک پروتئین ۳۸ کیلودالتونی است، تولید و خالص شد که به صورت محلول و فعال بود.

کلیدواژه‌ها: گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاست، پروتئین‌ها، جداسازی و خالص‌سازی، الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید

مقدمه:

گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاستی (FGFR) در مسیر پیام‌رسانی سلول، نقش کلیدی در تنظیم فرآیندهای زیستی از جمله تکثیر سلولی، بقا، مهاجرت و تمایز سلولی ایفا می‌کنند.[۱] متابولیسم سلولی، ترمیم بافتی، رگ‌زایی و توسعه مراحل جنینی از جمله وظایفی هستند که در دوران جنینی و بزرگ‌سالی در بدن توسط این گیرنده‌ها با اتصال به عوامل رشد فیبروبلاستی (FGF) انجام می‌شوند.[۲]

عوامل رشد فیبروبلاستی در پستانداران، خانواده‌ای ۱۸ عضوی هستند که از طریق چهار گیرنده تیروزین کینازی (FGFR1 تا FGFR4) ایجاد پیام می‌کنند.[۳]

مشخص شده است که انتقال پیام کنترل نشده عوامل رشد فیبروبلاستی می‌تواند به بدخیمی در انسان منجر شود.[۴]

گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاستی به خانواده‌ای از گیرنده‌های تیروزین کینازی متعلق هستند که همه آن‌ها یک بخش داخل غشایی، یک ناحیه خارج سلولی متصل شونده به لیگاند و یک ناحیه داخل سلولی با خاصیت تیروزین کینازی دارند.[۵و۶] اتصال عامل رشد فیبروبلاستی به گیرنده خود باعث جفت شدن گیرنده و به دنبال آن، فسفریلاسیون اسید آمینه تیروزین موجود در ناحیه کینازی می‌شود که متعاقب آن قسمت انتهای کربوکسیل گیرنده فسفریله می‌شود و در نتیجه گیرنده فعال می‌گردد. این گیرنده‌ها دو سوبسترای اصلی داخل سلولی به اسامی FRS1 و FRS2 دارند. با فسفریله شدن اسید آمینه تیروزین در ناحیه انتهای کربوکسیل گیرنده، مکانی برای برهم‌کنش با ناحیه SH2 از سوبسترای اول فراهم می‌شود که آنزیم فسفولیپاز C نوع گاما (PLCγ) است و بدین ترتیب PLCγ فسفریله و فعال می‌گردد. سپس مسیر فسفواینوزیتید ۳ کیناز و Akt فعال می‌شوند یا این که این گیرنده‌ها از طریق فسفریله کردن سوبسترای دوم خود مسیر MAPK را فعال می‌کنند و بدین ترتیب در انتقال پیام سلولی مشارکت می‌نمایند.[۳] شکل‌های موتاسیون یافته گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاستی در سرطان‌های زیر شناخته شده است: سرطان ریه، پستان، معده، مغز، سر و گردن، پروستات، کولون، رحم، مثانه و مولتیپل میلوما.[۷-۹] اختلال در انتقال پیام این گیرنده‌ها با چندین اختلال آسیب‌شناسی انسانی مرتبط است، از جمله سندرم‌های اسکلتی مانند سندرم فایفر که به دلیل جهش در ناحیه کینازی پروتئین FGFR2 ایجاد می‌شود.[۱۰]

مشخص شده است که اختلال تنظیمی مسیر پیام‌رسانی گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاستی (که می‌تواند ناشی از تغییرات ژنتیکی باشد) با ایجاد سرطان ارتباط تنگاتنگی دارد و این امر این گروه از کینازها را به عنوان یک هدف درمانی جالب توجه در درمان سرطان مطرح می‌کند.[۱۱و۱۲] در سال‌های اخیر چندین مهارکننده یرنده عامل رشد فیبروبلاستی ارایه شده است که نشان‌دهنده سطح بالای توجه محققان به این گیرنده‌ها با رویکرد ضد سرطانی آن‌هاست.[۷]

پروتئین FGFR2b تمایل بالایی به اتصال با لیگاندهای FGF1, FGF3, FGF7, FGF10 و FGF22 دارد. ژن FGFR2b روی بازوی بلند کروموزوم شماره ده انسان (10q26) قرار گرفته است و ۲۱ اگزون دارد.[۱۳] تغییرات ژنتیکی در این گیرنده با سرطان‌های اندومتریال، تخمدان و پستان در ارتباط است.[۱۴] قابل ذکر است که نوع جهش یافته گیرنده عامل رشد فیبروبلاستی در تعدادی از سرطان‌ها گزارش شده است که با افزایش پیام مرتبط با این گیرنده ارتباط دارد.[۱۵] در بررسی متون علمی گزارشی به دست نیامد که در آن با استفاده از روش ذکر شده در این مطالعه این پروتئین نوترکیب بیان شده باشد. از آن جا که تهیه ناحیه تیروزین کینازی پروتئین FGFR2b به صورت خالص این امکان را فراهم می‌کند که در مطالعه‌های بعدی بتوان اطلاعاتی راجع به ساختار و نیز بررسی برهم‌کنش پروتئین و لیگاند از جمله اثر مهارکننده‌های مختلف را روی ناحیه کینازی این پروتئین به دست آورد، بنابراین مطالعه حاضر با هدف بیان و خالص‌سازی مقدار مناسبی از ناحیه کینازی FGFR2b انسانی انجام شد.

❋ مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۲ در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. در این تحقیق ایمیدازول، IPTG و Ni^{2+}-NTA از شرکت سیگما، آمپی‌سیلین و HEPES از شرکت مرک و باکتری اشرشیاکلی BL21(DE3) از شرکت Invitrogen تهیه شدند. بقیه مواد شیمیایی مورد استفاده از نوع خالص بودند و از شرکت‌های سیگما و مرک تهیه شدند.

از باکتری اشرشیاکلی BL21(DE3) جهت میزبان

بیانی استفاده شد. باکتری در محیط‌های کشت لوریا-برتانی براث و LB آگار در حضور ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد. سلول‌های مستعد (پذیرا) در حضور کلسیم کلرید تهیه شدند.

پلاسمید pLEICS-01 که حاوی ژن ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b بود توسط محقق با استفاده از cDNA ژن FGFR2b سالم تهیه شد که با توجه به جهش‌های مشاهده شده در ژن FGFR2b سلول‌های سرطانی، موتاسیون نقطه‌ای در آن انجام شده بود. در این پروتئین نوترکیب با انتقال الگوی موتاسیون مشاهده شده در گیرنده بیان شده در سلول سرطانی به نوع طبیعی پروتئین، شکل فعال و نوترکیب ناحیه تیروزین کینازی پروتئین FGFR2b ایجاد شد که دارای جهش‌های مورد نظر بود.

پلاسمید pLEICS-01 که حاوی ژن ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b بود به باکتری مستعد اشرشیاکلی BL21 جهت بیان ژن مورد نظر انتقال داده شد. نتیجه بیان این ژن با واسطه حامل بیانی انتخاب شده، تولید پروتئین نوترکیب همراه با دنباله پلی‌هیستیدین بود. باکتری‌های تراریخته حاوی ژن مورد نظر در محیط مناسب کشت داده شدند و بیان ژن مورد نظر توسط IPTG با غلظت یک میلی‌مولار القا گردید. نمونه‌برداری قبل از القا و همچنین یک، دو، سه و چهار ساعت بعد از القا انجام شد. بیان پروتئین مورد نظر با استفاده از روش الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) ارزیابی شد.

جهت ارزیابی حلالیت پروتئین بیان شده، ابتدا محیط کشت دارای باکتری‌های تراریخته حاوی ژن مورد نظر سانتریفیوژ شدند. این باکتری‌ها تحت تأثیر القا توسط IPTG به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بودند. سپس مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ و رسوب حاصل که در حضور بافر لیزکننده توسط سونیکاتور لیز شده بود، توسط روش SDS-PAGE ارزیابی گردید.

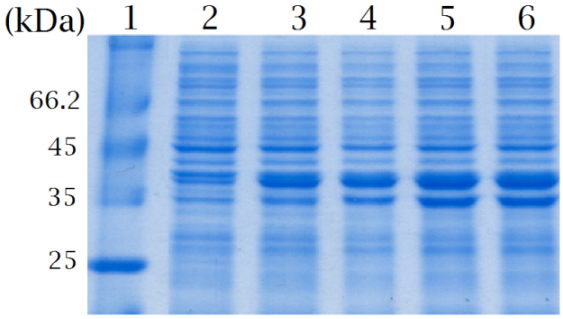
بافر لیزکننده حاوی ۲۵ میلی مولار Tris-HCl و ۱۰۰ میلی مولار سدیم کلرید با pH برابر ۸ بود. جهت افزایش حلالیت پروتئین بیان شده از کشت ۲۴ ساعته در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

به منظور خالص‌سازی پروتئین بیان شده، رسوب حاوی باکتری‌های تراریخته دارای ژن مورد نظر در بافر لیزکننده به مدت یک ساعت در ۱۳۵۰۰ (دور در دقیقه) و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بافر لیزکننده حاوی ۲۵ میلی مولار HEPES، ۱۰۰ میلی مولار سدیم کلرید و گلیسرول (۱۰ درصد) با pH برابر ۸ بود. محلول شفاف به دست آمده روی ستون حاوی Ni^{2+}-NTA قرار داده شد و پروتئین‌ها با یک شیب غلظتی از ایمیدازول (۵۰ تا ۲۰۰ میلی مولار) شسته شدند. میزان خلوص پروتئین به دست آمده از ستون توسط روش SDS-PAGE ارزیابی شد. بعد از مخلوط نمودن نمونه‌های به دست آمده که حاوی پروتئین خالص مورد نظر بودند، ایمیدازول با استفاده از دیالیز از محیط جدا شد. غلظت پروتئین مورد نظر که شامل ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b بود، توسط دستگاه نانودراپ با استفاده از ضریب خاموشی $41160\ M^{-1}cm^{-1}$ در طول موج ۲۸۰ نانومتر به دست آمد که براساس توالی اسید آمینه محاسبه شده بود.

جهت بررسی عملکرد ناحیه کینازی پروتئین مورد نظر از اتصال این مکان با ناحیه SH2 موجود در سوبسترای گیرنده عامل رشد فیبروبلاستی (پروتئین فسفولیپاز C) استفاده شد. نتایج توسط الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل آمید (PAGE) ارزیابی گردید. بدین منظور پروتئین بیان شده با قطعه پپتیدی دارای ناحیه SH2 و نیز قطعه پپتیدی دارای ناحیه SH2 که در آن دو اسید آمینه آرژینین به آلانین تبدیل شده بود و فاقد توانایی اتصال به ناحیه کینازی پروتئین مورد نظر بود (به عنوان شاهد منفی) مجاور گردید و نتایج با بررسی الگوی حاصل از PAGE ارزیابی شد.[۱۶] داده‌ها با آزمون‌های آماری واریانس یک طرفه و توکی در سطح $P<0/05$ تحلیل شدند.

❋ یافته‌ها:

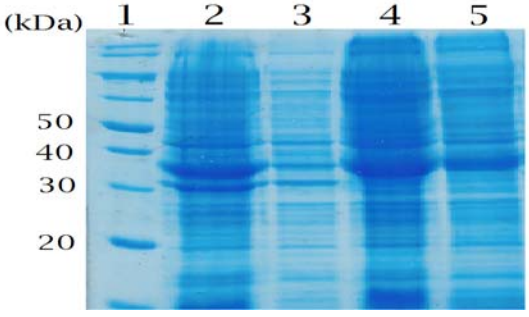
نتایج SDS-PAGE نشان داد که بعد از القا توسط IPTG، پروتئین نوترکیب مورد نظر با اندازه تقریبی ۳۸ کیلودالتون بیان شد و بهترین میزان بیان ۳ تا ۴ ساعت بعد از القا بود (شکل شماره ۱).



شکل ۱- بیان ژن ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در باکتری اشرشیاکلی

ستون ۱= وزن مولکولی
ستون ۲= نمونه لیز شده باکتری دارای حامل نوترکیب قبل از القا با IPTG با غلظت یک میلی‌مولار
ستون‌های ۳ تا ۶= نمونه بعد از القا با IPTG به ترتیب در فاصله زمانی یک، دو، سه و چهار ساعت بعد

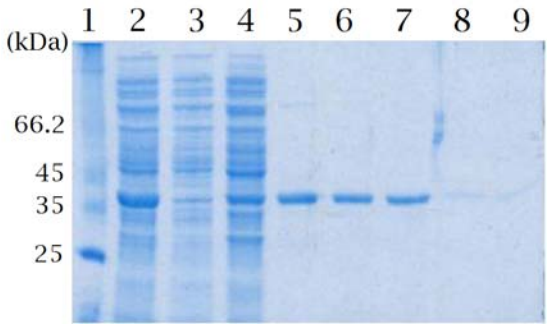
مقایسه نمونه‌های حاصل از لیز سلول و مایع رویی نشان داد که پروتئین بیان شده نامحلول بود ودر دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، حالت محلول به دست آمد (شکل شماره ۲).



شکل ۲- مقایسه حلالیت ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در دو دمای ۲۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد

ستون ۱= وزن مولکولی
ستون‌های ۲ و ۳= به ترتیب نمونه لیز شده باکتری و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد
ستون‌های ۴ و ۵= به ترتیب نمونه لیز شده باکتری و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد

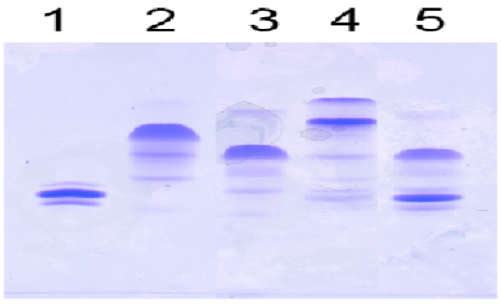
الگوی الکتروفورز نشان داد پروتئین مورد نظر با درجه خلوص مناسبی خالص شده بود (شکل شماره ۳).



شکل ۳- خالص‌سازی ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b با استفاده ازستون کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی Ni^{2+}-NTA

ستون ۱= وزن مولکولی
ستون ۲= نمونه اولیه قبل از خالص‌سازی
ستون ۳= نمونه بعد از شستشوی اولیه ستون کروماتوگرافی
ستون‌های ۴ تا ۹= نمونه‌ها بعد از شستشوی ستون کروماتوگرافی با ایمیدازول با شیب غلظت۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌مولار

الگوی حاصل از PAGE مشخص کرد که ناحیه کینازی پروتئین مورد نظر با پپتید که دارای ناحیه SH2 تعامل برقرار کرد (ستون چهارم شکل شماره ۴) و مجموعه حاصل دارای الگوی الکتروفورزی متفاوت از هر کدام از دو جزء به تنهایی بود (ستون اول و دوم شکل شماره ۴). در حالی که الگوی الکتروفورزی مخلوط حاوی پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه جهش یافته SH2 بود که توانایی اتصال به ناحیه کینازی پروتئین مورد نظر را نداشت (ستون پنجم شکل شماره ۴). با الگوی الکتروفورزی، هر کدام از دو جزء به تنهایی یکسان بود (ستون اول و سوم شکل شماره ۴) که نشان‌دهنده عدم اتصال پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه جهش یافته SH2 بود.



شکل ٤- بررسی عملکرد ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b خالص شده

ستون ۱= ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b
ستون ۲= پپتید دارای ناحیه SH2
ستون ۳= پپتید دارای ناحیه SH2 جهش یافته
ستون ۴= مجموعه پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه SH2
ستون ۵= مخلوط حاوی پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه جهش یافته SH2

❋ بحث و نتیجه‌گیری:

در این مطالعه ناحیه کینازی گیرنده نوترکیب عامل رشد فیبروبلاستی 2b در باکتری اشرشیاکلی BL21 بیان و به صورت محلول و فعال خالص شد. اگرچه ترکیب های مؤثری برای مهار پروتئین کینازها شناسایی شده‌اند، اما مکانیسم مولکولی دقیق این مهارکننده‌ها در مهار فعالیت پروتئین کینازی به روشنی مشخص نیست.[۱۷]

از آنجا که برای انجام مطالعه‌های ساختاری یا بررسی برهم کنش بین پروتئین و لیگاند به تهیه پروتئین خالص شده در حد میلی‌گرم نیاز است، در این مطالعه در مرحله اول پلاسمید حاوی ژن ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b تحت سیستم بیانی باکتری اشرشیاکلی BL21 قرار گرفت و پروتئین مورد نظر به دست آمد. آماده‌سازی اولیه پروتئین به دست آمده نشان داد که حلالیت پایین آن به بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین نیاز دارد. یکی از مشکلاتی که حین تولید پروتئین ممکن است با آن مواجه شویم، نامحلول بودن پروتئین به دلیل تجمع توده‌های غیرفعال پروتئینی به شکل اجسام توده‌ای است. علت این امر می‌تواند بیان بیش از حد پروتئین در سیتوپلاسم باکتری باشد که رفع این مشکل از نظر زیست فن‌آوری اهمیت بسزایی دارد. اگر علت نامحلول بودن پروتئین بیان بیش از اندازه آن باشد با کاهش دادن سطح بیان پروتئین می‌توان به این مشکل غلبه کرد. چندین روش برای به حداقل رساندن تشکیل اجسام توده‌ای و دست‌یابی به پروتئین محلول وجود دارد؛ از جمله تغییر متغیرهایی نظیر درجه حرارت، میزان بیان، متابولیسم میزبان و غلظت ماده القاکننده، تغییرات مهندسی روی پروتئین هدف مثل استفاده از اتصال دنباله مناسب و نیز بیان همزمان چاپرون‌ها با پروتئین. از بین این روش‌ها مهم‌ترین کار، تغییر شرایط رشد باکتری است مانند رشد دادن باکتری در درجه حرارت پایین‌تر یا در محیط کشتی که از نظر مواد مورد نیاز باکتری غنی نباشد.[۱۸]

در این مطالعه محلول نمودن پروتئین هدف در دماهای مختلف بررسی شد که در نهایت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به صورت محلول در آمد. ماینادر و همکاران اثر دما، غلظت القاکننده، دنباله گلوتاتیون اس ترانسفراز (GST)، دنباله پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP) و بیان همزمان چاپرون‌ها را بر روی حلالیت پروتئین بیان شده در باکتری اشرشیاکلی بررسی کردند. در مطالعه آن‌ها کاهش دما بیان پروتئین را به صورت محلول دو برابر کرد، در حالی که کاهش غلظت IPTG تأثیر کمی در بیان پروتئین به صورت محلول داشت.[۱۹] در مطالعه حاضر نیز با کاهش میزان دما، افزایش حلالیت پروتئین مشاهده شد.

با توجه به مطالعه‌های قبلی، برای دست‌یابی به پروتئینی که عملکرد طبیعی خود را داشته باشد، در این مطالعه از ژن موتاسیون یافته‌ای استفاده شد که پروتئین را به شکل فعال تولید می‌کند. در آن مطالعه‌ها جهت فعال‌سازی ناحیه تیروزین کینازی این گیرنده از الگوی موتاسیون ژن‌هایی استفاده شد که مسئول افزایش پیام در یک سری از سرطان‌های انسانی و اختلال های اسکلتی بودند.[۲۰] جهش‌های ژنتیکی که به تغییر شکل فضایی ناحیه کینازی به شکل فعال منجر می‌شوند و در پروتئین مورد مطالعه در این پژوهش نیز وجود داشتند، شامل

موتاسیون بیماری‌زای اسید آمینه گلوتامات شماره ۵۶۵ به آلانین (E565A) است که در ایجاد سندرم فایفر نقش دارد[۲۱] و دیگری موتاسیون اسید آمینه لیزین شماره ۶۶۰ به گلوتامات (K660E) است که در سرطان اندومتر نقش دارد.[۱۵]

در این مطالعه برای اثبات فعال بودن پروتئین تولید شده، برهم‌کنش آن با ناحیه SH2 پروتئین فسفولیپاز C توسط روش PAGE بررسی شد. این ارزیابی نشان داد که پروتئین مذکور از نظر عملکرد فعال بود و توانست با پپتید دارای ناحیه SH2 تعامل برقرار کند. قابل ذکر است در اغلب موارد پروتئین‌هایی که به صورت تجاری تولید می‌شوند طی یک فرآیند تغییر آرایش فضایی مجدد (ریفولدینگ) به شکل فعال خود در می‌آیند که در برخی از موارد این فرآیند بسیار هزینه‌بر و طاقت‌فرساست. لذا در این پژوهش برای دست‌یابی به پروتئینی که آرایش فضایی و عملکرد طبیعی خود را داشته باشد، از همان ابتدا پروتئین به صورت فعال تولید شد.

یکی از روش‌های متداول که در کتاب کلونینگ مولکولی به آن اشاره شده است و به طور گسترده در مقاله‌ها از آن استفاده می‌شود، بررسی القای الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های بیان شده پس از القای ژن مورد نظر با IPTG است[۲۲] که در این پژوهش نیز انجام شد. بررسی وزن مولکولی پروتئین‌های بیان شده قبل و بعد از القا توسط IPTG در الگوی SDS-PAGE می‌تواند تأییدی در این مورد باشد. همچنین با توجه به وجود دنباله پلی هیستیدین در ابتدای پروتئین مورد نظر، برای خالص‌سازی پروتئین بیان شده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی استفاده شد. بررسی الگوی SDS-PAGE مواد حاصل بعد از خالص‌سازی می‌تواند تأییدی در این مورد باشد. علاوه بر این، اتصال پروتئین خالص شده به فسفولیپاز C را می‌توان به دلیل حضور پروتئین مورد نظر با شکل طبیعی خود دانست.

در این مطالعه ناحیه کینازی گیرنده نوترکیب عامل رشد فیبروبلاستی 2b (که یک پروتئین ۳۸ کیلودالتونی است) تولید و خالص شد و مشخص گردید پروتئین مورد نظر به صورت محلول و فعال است و می‌توان در مطالعه‌های بعدی از آن جهت بررسی برهم‌کنش پروتئین و لیگاند از جمله اثر مهارکننده‌های مختلف استفاده کرد.

❋ سپاس‌گزاری:

از شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین جهت حمایت مالی از این پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه قدردانی می‌شود.

❋ مراجع:

1. Matsunaga S, Okigaki M, Takeda M, et al. Endothelium-targeted overexpression of constitutively active FGF receptor induces cardioprotection in mice myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol 2009 May; 46 (5): 663-73

2. Zhao WM, Wang L, Park H, et al. Monoclonal antibodies to fibroblast growth factor receptor 2 effectively in hibit growth of gastric tumor xenografts. Clin Cancer Res 2010 Dec 1; 16 (23): 5750-8

3. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. Nat Rev Drug Discov 2009 Mar; 8 (3): 235-53

4. Haugsten EM, Wiedlocha A, Olsnes S, Wesche J. Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. Mol Cancer Res 2010 Nov; 8 (11): 1439-52

5. Kalinina J, Dutta K, Ilghari D, et al. The alternatively spliced acid box region plays a key role in FGF receptor autoinhibition. Structure 2012 Jan 11; 20 (1): 77-88

6. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. Cell 2010 Jun 25; 141 (7): 1117-34

7. Gartside MG, Chen H, Ibrahimi OA, et al. Loss-of-function fibroblast growth factor

receptor-2 mutations in melanoma. Mol Cancer Res 2009 Jan; 7 (1): 41-54
8. Grose R, Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. Cytokine Growth Factor Rev 2005 Apr; 16 (2): 179-86
9. Jain VK, Turner NC. Challenges and opportunities in the targeting of fibroblast growth factor receptors in breast cancer. Breast Cancer Res 2012 Jun 19; 14 (3): 208
10. Lew ED, Bae JH, Rohmann E, et al. Structural basis for reduced FGFR2 activity in LADD syndrome: Implications for FGFR autoinhibition and activation. Proc Natl Acad Sci U S A 2007 Dec 11; 104 (50): 19802-7
11. Knights V, Cook SJ. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. Pharmacol Ther 2010 Jan; 125 (1): 105-17
12. Katoh Y, Katoh M. FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics (Review). Int J Mol Med 2009 Mar; 23 (3): 307-11
13. Katoh M. FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol 2009; 13 (7): 1-6
14. Katoh M. Cancer genomics and genetics of FGFR2 (Review). Int J Oncol. 2008 Aug; 33 (2): 233-7
15. Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. Oncogene 2007 Nov 1; 26 (50): 7158-62
16. Bae JH, Lew ED, Yuzawa S, et al. The selectivity of receptor tyrosine kinase signaling is controlled by a secondary SH2 domain binding site. Cell 2009 Aug 7; 138 (3): 514-24
17. Kunii K, Davis L, Gorenstein J, et al. FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival. Science. Cancer Res 2008 Apr 1; 68 (7): 2340-8
18. Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. J Biotechnol 2005 Jan 26; 115 (2): 113-28
19. Meinander NQ, Jeppsson M, Sogaard M. Optimisation of the solubility of the recombinant Itk kinase domain in Escherichia coli. In: Merten OW, editor. Recombinant protein production with prokaryotic and eukaryotic cells - a comparative view on host physiology. 2nd ed. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2001. 159-70
20. Chen H, Ma J, Li W, et al. A molecular brake in the kinase hinge region regulates the activity of receptor tyrosine kinases. Mol Cell 2007 Sep 7; 27 (5): 717-30
21. Zankl A, Jaeger G, Bonafe´ L, et al. Novel mutation in the tyrosine kinase domain of FGFR2 in a patient with Pfeiffer syndrome. Am J Med Genet A 2004 Dec 15; 131 (3): 299-300
22. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001. Appendix 8, [Vol 3]