Nerve growth factor, clinical applications and production of the recombinant protein

M. Zangi[1], H. Ofoghi[1]

[1] Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran

Corresponding Address: Hamideh Ofoghi, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology, Ehsani Rad St., Enqelab St., Parsa Sq., Ahmadabad Mostoufi Rd., Azadegan Highway, Tehran, Iran
Tel: +98-56276326-7, Email: Ofoghi@irost.ir
Received: 21 May 2016; Accepted: 2 Jan 2017

✵Abstract

The mammalian neurotrophin family proteins, nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) and neurotrophin-4/5 (NT-4/5) are known as neuronal survival factors. NGF, one of the most important cytokines, is composed of 118 amino acids. NGF is involved in the growth and differentiation of neural cells of the vertebrate peripheral sympathetic nerve as well as basal forebrain cholinergic neurons which degenerate in Alzheimer's disease. In addition, it is implicated in the regulation of synaptic transmission and synaptogenesis in the central nervous system. NGF is produced by a variety of immune cells, including B cells, T cells, monocytes and mast cells as well as nervous system and binds through two distinct receptors, TrkA and $p75^{NTR}$ which signaling through them leads to the neuronal differentiation and cell death respectively. Considering the importance of this protein as a drug, NGF has been proposed for the treatment of neuron degenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's and multiple sclerosis.
To produce enough protein for research and clinical applications, genetic engineering techniques are used to produce recombinant forms. To date, there are no reports about the systems for production of the recombinant human NGF in an effective, low cost, with industrial production. Plants as a safe host generally offer major advantages such as free of animal pathogens, low costs, the ability to produce a protein similar to natural protein, and industrial production in large scale. Then they are suitable for the production of recombinant human NGF.

Keywords: Nerve growth factor, Neurotrophin, Recombinant protein
Citation: Zangi M, Ofoghi H. Nerve growth factor, clinical applications and production of recombinant protein. J Qazvin Univ Med Sci. 2017; 20 (6): 53-70.

فاکتور رشد عصب، کاربرد بالینی و تولید پروتئین نوترکیب

مریم زنگی[۱]، دکتر حمیده افقی[۱]

[۱] پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: تهران، بزرگراه آزادگان، جاده احمدآباد مستوفی، میدان پارسا، خیابان انقلاب، خیابان احسانی‌راد، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی
تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۳

چکیده

پروتئین‌های خانواده نوروتروفین در پستانداران شامل فاکتور رشد عصب (NGF)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)، نوروتروفین-۳ (NT-3) و نوروتروفین-۴/۵ (NT-4/5) هستند که به‌عنوان فاکتورهای بقای سلول‌های عصبی شناخته شده‌اند. فاکتور رشد عصب یکی از مهم‌ترین سیتوکین‌هاست که از ۱۱۸ اسید آمینه تشکیل شده است. این فاکتور در رشد و تمایز سلول‌های عصبی سمپاتیک محیطی مهره‌داران و نورون‌های کولینرژیک بازال قدامی مغز که در بیماری آلزایمر تحلیل می‌روند، نقش اساسی ایفا می‌کند. به‌علاوه در تنظیم انتقال سیناپتیک و سیناپتوژنز در سیستم عصبی مرکزی نیز اهمیت حیاتی دارد. فاکتور رشد عصب به‌وسیله انواع سلول‌های ایمنی نظیر لنفوسیت‌های B، لنفوسیت‌های T، منوسیت‌ها و ماست‌سل‌ها همانند سیستم عصبی تولید شده و با اتصال به دو گیرنده مجزا باعث پیام‌رسانی می‌شود. پیام‌رسانی از طریق گیرنده‌های مجزای تیروزین‌کیناز A و p75NTR به ترتیب به تمایز نورونی و مرگ سلولی منجر می‌شود. با توجه به اهمیت در نظر گرفتن این پروتئین به عنوان یک دارو، فاکتور رشد عصب به‌عنوان دارو جهت درمان بیماری‌های ناشی از تخریب نورون‌های عصبی نظیر آلزایمر، پارکینسون و مالتیپل اسکلروز مطرح شده است. برای تهیه میزان کافی از این فاکتور به منظور مصارف تحقیقاتی و بالینی از روش‌های مهندسی ژنتیک بهره گرفته می‌شود تا فاکتور نوترکیب تولید شود. تا به امروز سیستم‌هایی برای تولید فاکتور رشد عصب انسانی نوترکیب مؤثر با هزینه کم و با قابلیت تولید صنعتی گزارش نشده است. گیاهان به‌عنوان یک میزبان بی‌خطر از مزایای عمده نظیر عدم وجود پاتوژن‌های حیوانی، ارزان بودن، توانایی تولید پروتئینی مشابه با پروتئین طبیعی و تولید صنعتی در مقیاس بالا، برخوردار هستند. بنابراین، گزینه مناسبی برای تولید پروتئین نوترکیب فاکتور رشد عصب هستند.

کلیدواژه‌ها: فاکتور رشد عصب، نوروتروفین، پروتئین نوترکیب

مقدمه:

فاکتور رشد عصب (Nerve Growth Factor, NGF) پروتئینی است که اولین بار در سال ۱۹۵۴ شناسایی شد و امروزه شناخته شده‌ترین عضو خانواده نوروتروفین‌هاست. این فاکتور در سیر تمایز سلول‌های عصبی از سلول‌های بنیادی جنینی نقش اساسی ایفا می‌کند و در توسعه و بقای سیستم عصبی مرکزی و محیطی، تنظیم رشد آکسون‌ها و تنظیم فعالیت نورون‌های بالغ به‌ویژه نورون‌های کولینرژیک اهمیت حیاتی دارد، لذا به‌عنوان دارو جهت درمان بیماری‌های ناشی از تخریب نورون‌ها نظیر آلزایمر مطرح شده است.[۱و۲]

این پروتئین کوچک ترشحی به‌عنوان مولکول پیام‌رسان عمل می‌کند و برای رشد، حفظ، بقا و تمایز سلول‌های عصبی مهم است. همچنین بر فعالیت سلول‌های سیستم ایمنی و غدد داخلی تأثیرگذار است و گیرنده‌های آن در اندام‌های ایمنی بیان می‌شوند و امکان تمایز سلولی و تنظیم پاسخ‌های ایمنی را در سلول‌های ایمنی فراهم می‌کنند.[۲] فاکتور رشد عصب بر بقا، تمایز و ویژگی‌های ظاهری سلول‌های بنیادی خون‌ساز، گرانولوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها نیز تأثیرگذار است.[۳-۶] غلظت فاکتور رشد عصب در بافت‌ها طی

التهاب تغییر می‌کند و واسطه‌های التهاب باعث القای ساخت فاکتور رشد عصب در انواعی از سلول‌ها می‌شوند. افزایش تولید فاکتور رشد عصب در بافت‌های ملتهب بیماران التهابی و خودایمنی گزارش شده است، اما دلیل و تأثیر آن بر پاسخ‌های التهابی کاملاً شناخته شده نیست.[۷] فاکتور رشد عصب همچنین در توسعه بیماری‌های قلبی- عروقی، عصبی، آلزایمر، دیابت، بهبود زخم و به‌همراه گیرنده‌های خود در کنترل تکثیر و مرگ سلولی سایر سلول‌ها دخیل است و این امر باعث شده در تحقیق‌های سرطان مورد توجه قرار گیرد.[۸]

مولکول کامل فاکتور رشد عصب متشکل از زیرواحدهای آلفا، بتا و گاما بوده که فعالیت نوروتروفیک آن به زیرواحد بتا (حدود ۲۶/۵ کیلودالتون) مربوط است. ژن فاکتور رشد عصب بتای انسانی اولین بار از کتابخانه ژنومی با استفاده از فاکتور رشد عصب بتای موش به‌عنوان پروب جداسازی شد. نسخه‌برداری و ترجمه ژن فاکتور رشد عصب بتا به تشکیل پری- پرو- پروتئین با ۲۴۱ اسید آمینه منجر می‌شود که بخش پری آن از ۱۸ اسید آمینه تشکیل شده و طی انتقال به شبکه آندوپلاسمی برداشته می‌شود، بخش پرو نیز از ۱۰۳ اسید آمینه تشکیل شده و از آنجا که فاکتور رشد عصب به مسیر ترشحی تنظیمی (way Regulated secretary path) وارد نمی‌گردد، این ناحیه احتمالاً در بخش ترانس شبکه گلژی توسط سرین پروتئاز فورین برداشته می‌شود. توالی پری در انتقال پروتئین به شبکه آندوپلاسمی نقش دارد، اما نقش پرو کاملاً مشخص نیست، نقش این توالی در برخی از پروتئین‌ها کمک به تاخوردن بخش بالغ است.[۹] فاکتور رشد عصب بتا همودایمر غیرکوالانتی است که مونومر آن ۱۱۸ اسید آمینه، ۶ سیستئین و ۳ پل دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای دارد.[۱۰]

فاکتور رشد عصب انسانی با نمونه موشی هم‌شکلی داشته و تنها در ۱۲ اسید آمینه با آن تفاوت دارد. فاکتور رشد عصب جدا شده از موش مخلوط ناهمگنی از دایمرهای مختلف است که برای مصارف درمانی نامناسب و بهتر است از شکل انسانی این پروتئین برای درمان استفاده شود.[۱۱] آزمایش‌های حیوانی و بالینی مرحله دو نشان داده‌اند که فاکتور رشد عصب انسانی نوترکیب می‌تواند درمان مناسبی برای دیابت و نوروپاتی‌های مرتبط با ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) باشد، اما آزمایش‌های بالینی مرحله سه مؤید این نتایج نبوده که می‌تواند به‌دلیل کافی نبودن دوز توصیه شده و نیز نیاز به حضور فاکتورهای نوروتروفیک مختلف باشد.[۱و۱۲]

یکی از موانع اصلی گسترش استفاده از فاکتور رشد عصب انسانی در تحقیق‌ها، عدم امکان تولید آن به میزان کافی و با قیمت پایین است. چرا که تهیه آن به‌صورت طبیعی از طریق استخراج از بافت انسانی ممکن نیست، بنابراین تولید نوترکیب آن مد نظر قرار گرفته است. به علت پیچیدگی مراحل تبدیل پلی‌پپتید پیش‌ساز به پروتئین بالغ و همچنین ساختار فضایی پیچیده این پروتئین و وجود سه پیوند دی‌سولفیدی، سیستم پروکاریوتی به ویژه باکتری اشریشیاکلی قادر به تولید پروتئین فعال نیست و به سیستم بیانی یوکاریوتی جهت تولید آن نیاز است.[۱۳] بیان در سلول‌های مخمر نیز کارایی ندارد و به علت تاخوردگی ناصحیح، پروتئین حاصله فعالیت زیستی کامل ندارد،[۱۴] در حال حاضر فاکتور رشد عصب انسانی نوترکیب با قابلیت دارا بودن فعالیت زیستی در سلول‌های پستانداران نظیر سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO)، سیستم بیانی باکولو ویروس، سلول گیاهی و گیاه تراریخت تولید شده است.[۱۳-۱۶]

با توجه به مطالب ذکر شده، در این مقاله ساختار و اهمیت فاکتور رشد عصب انسانی و اثرات بالینی آن با جزئیات مربوطه بررسی و راهکارهای مناسب و کاربردی جهت تولید آن به‌شکل نوترکیب پیشنهاد شده است.

نوروتروفین‌ها

نوروتروفین‌ها در بقا، تمایز، عملکرد و ترمیم سلول‌های عصبی (نورون) نقش مهمی دارند. آن‌ها رشد آکسون در نورون‌های حسی، ترمیم عصب در پاسخ به آسیب و

شاخه‌زایی جانبی پایانه‌های عصبی را تنظیم می‌کنند. نقش ضروری نوروتروفین‌ها در توسعه و حفظ سیستم‌های عصبی مرکزی و محیطی، کنترل بقای سلولی و تمایز نورون‌های حسی باعث شده است در درمان بیماری‌های حاصل از انحطاط سیستم عصبی مورد توجه بسیار قرار گیرند. نوروتروفین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌های هموداِیمر و مرتبط از لحاظ ساختار و عملکرد هستند و انواع آن عبارتند از: شامل فاکتور رشد عصب، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز، نوروتروفین-۳ و نوروتروفین-۴/۵ و نوروتروفین ۶ هستند. توالی تمام نوروتروفین‌ها حدود ۵۰ درصد با یکدیگر یکسان است و مسئول پیام‌رسانی بین جمعیت‌های مجزا اما دارای همپوشانی از نورون‌ها هستند.[۱۷]

این مولکول‌ها با اتصال به دو دسته گیرنده‌های غشا گذر، گیرنده نوروتروپین p75 ($p75^{NTR}$) و خانواده گیرنده‌های تیروزین‌کیناز (شامل تیروزین‌کیناز A، تیروزین‌کیناز B و تیروزین‌کیناز C) اثر خود را اعمال می‌کنند. برخلاف گیرنده غیراختصاصی $p75^{NTR}$ که تمایل یکسانی برای تمام نوروتروفین‌ها دارد، هر گیرنده تایروزین‌کیناز به‌صورت اختصاصی به نوروتروفین خاصی متصل می‌شود.[۱۸]

همانند سایر پروتئین‌های ترشحی، نوروتروفین‌ها نیز از پیش‌سازهایی تشکیل شده‌اند که پرونوروتروفین‌های ۳۰ تا ۳۵ کیلودالتونی هستند و در اثر بریده شدن پروتئولیتیکی به تولید پروتئین‌های بالغ (۱۲ تا ۱۳ کیلودالتون) منجر می‌شوند. مطالعه همپستد و همکاران نشان داد که این پیش‌سازها از نظر عملکردی غیرفعال و به مرگ سلولی منجر می‌شوند. مطالعه آن‌ها سه یافته اصلی به‌همراه داشت: ۱) پرونوروتروفین‌ها با تمایل زیادی به گیرنده $p75^{NTR}$ که تصور می‌شد یک گیرنده نوروتروفینی با تمایل پایین باشد، متصل می‌شوند. در حالی‌که نوروتروفین‌های بالغ ترجیحاً به گیرنده‌های تیروزین‌کیناز متصل و لذا پرونوروتروفین‌ها و نوروتروفین‌های بالغ، هر کدام گیرنده‌های اختصاصی خود را دارند. ۲) نتیجه برهم‌کنش نوروتروفین‌های بالغ با گیرنده‌های تیروزین‌کیناز بقای سلولی است، در حالی‌که اتصال proNGF و proBDNF به $p75^{NTR}$ به مرگ سلولی منجر می‌گردد. ۳) proNGF و proBDNF را می‌توان با پروتئازهای خارج سلولی مانند ماتریکس متالو پروتئیناز ۷ و پلاسمین تیمار و فاکتور رشد عصب و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز بالغ تولید کرد.[۱۹] این نتایج مطابق با نتایج سایر مطالعه‌ها، نشان می‌دهد پرونوروتروفین‌ها ترشحی هستند و به‌عنوان مولکول‌های پیام‌رسان عمل می‌کنند و از همه مهم‌تر، بریده شدن آنزیمی پرونوروتروفین‌ها مکانیسم مهمی است که عملکرد نوروتروفین‌ها را کنترل می‌کند.[۲۰و۲۱]

اثر متضاد و متقابل نوروتروفین‌ها بر بقای سلولی باعث گردیده مدل یین‌یانگ برای عمکرد نوروتروفین‌ها مطرح شود. در این مدل ساده، عملکرد دوتایی نوروتروفین‌ها به هر دو شکل نوروتروفین‌ها (پرو در مقابل بالغ) و گیرنده فعال شده، بستگی دارد.[۲۱]

از آنجا که پرونوروتروفین‌ها بیش‌تر مولکول‌هایی پیام‌رسان هستند تا پیش‌سازهایی غیرفعال، برای درک کامل عملکرد آن‌ها باید مقصد نهایی پرونوروتروفین‌ها درون سیستم عصبی معین شود. تحقیق‌ها نشان داده‌اند شماری از سلول‌ها به‌طور انتخابی شکل پرو را بیان و ترشح می‌کنند؛ برای مثال، سلول‌های شوان به‌طور غالب proNGF و proBDNF را ترشح می‌کنند که نشان می‌دهد برش داخل سلولی پرونوروتروفین‌ها در این سلول‌ها کم‌تر کارایی دارد.[۲۲] علاوه بر این بیان پرونوروتروفین‌ها به‌صورت دینامیکی تنظیم می‌شود؛ برای مثال: بیان شکل پرو (pro) در شرایط آسیب مانند بیماری آلزایمر، صدمه‌های مغزی و تحلیل شبکیه افزایش پیدا می‌کند.[۲۱]

(پرو) نوروتروفین‌ها پس از ساخت در شبکه آندوپلاسمی باید به درستی تاخورده و به مسیر ترشحی دایمی (Constitutive secretory pathway) یا تنظیمی وارد و به بخش سلولی مناسب انتقال داده شوند. سه

سرنوشت نهایی برای پرونوروتروفین‌ها وجود دارد: برش داخل سلولی و به‌دنبال آن ترشح؛ ترشح و به‌دنبال آن برش خارج سلولی و ترشح بدون برش یافتن. پرونوروتروفین‌های بریده نشده با اتصال و فعال کردن $p75^{NTR}$، پیام‌رسانی می‌کنند. علاوه بر اتصال با $p75^{NTR}$، پرونوروتروفین‌های ترشحی ممکن است در خارج از سلول تجزیه شوند. توالی ناحیه پرونوروتروفین‌ها هم‌سان و میان مهره‌داران، حفاظت شده است که بیان‌گر نقش مهم آن‌ها در پردازش‌های داخل سلولی است. مطالعه‌های اخیر نشان داده‌اند که ناحیه پرو در نوروتروفین‌ها برای انتقال و ترشح داخل سلولی ضروری است و در نتیجه بر عملکرد نوروتروفین‌ها تأثیر بسیار مهمی دارد.[۲۳]

از آنجا که پرونوروتروفین‌ها ترشحی هستند، شناسایی پروتئازهای خارج سلولی که پرونوروتروفین‌ها را می‌برند و چگونگی تنظیم آن‌ها امری ضروری به‌نظر می‌رسد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که چندین ماتریکس متالو پروتئیناز (MMP) نظیر MMP3 و MMP7 مولکول‌های proNGF و proBDNF را می‌برند. البته مهم‌ترین پروتئازی که پرونوروتروفین‌ها را می‌برد، سرین پروتئاز پلاسمین است؛ آنزیمی که معمولاً به‌صورت زیموژن غیرفعال (پلاسمینوژن) بیان و فعال‌سازی آن نیازمند بُرش پروتئولیتیکی توسط فعال‌کننده پلاسمینوژن بافت (Tissue plasminogen activator, tPA) است. پلاسمینوژن و فعال‌کننده آن در سیستم عصبی بیان می‌شوند. در مغز، پلاسمینوژن منحصراً در سلول‌های عصبی بیان و در فضای خارج سلولی به ویژه در شکاف سیناپسی وجود دارد. فعال‌کننده پلاسمینوژن بافت از پایانه‌های آکسون به فضای خارج سلولی ترشح و این ترشح به فعالیت عصبی با بسامد بالا بستگی دارد. بنابراین به‌نظر می‌رسد فعال‌کننده پلاسمینوژن بافت یک عامل مهم برای تحریک آبشار فعال‌کننده پلاسمینوژن بافت- پلاسمین- پرونوروتروفین باشد.[۲۴]

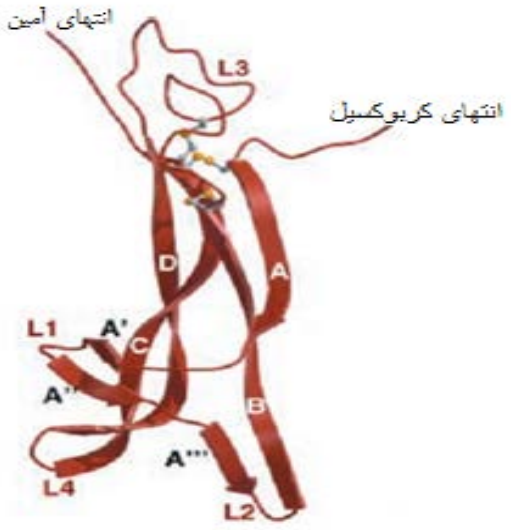
ساختار و مکانیسم فاکتور رشد عصب

فاکتور رشد عصب اولین عضو کشف شده از خانواده نوروتروفین‌هاست که برای رشد و حفظ فنوتیپ نورون‌ها در سیستم عصبی محیطی و عملکرد نورون‌های کولینرژیک در سیستم عصبی مرکزی ضروری است. این فاکتور در دهه ۱۹۵۰ توسط ریتا لوی- مونتالچینی و همکاران کشف و خالص‌سازی شد و مهم‌ترین عضو از خانواده نوروتروفین‌هاست که علاوه بر نقش در توسعه سلول‌های نورونی، بر سلول‌های غیرنورونی نیز تأثیرگذار است.[۱]

فاکتور رشد عصب، فاکتور نوروتروفیک مورد نیاز برای رشد و بقای نورون‌های حسی و اعصاب سمپاتیک است. علاوه بر این، فاکتور رشد عصب بتا به رشد، تمایز و حیات نورون‌های کولینرژیک سیستم عصبی مرکزی کمک می‌کند و بدون وجود فاکتور رشد عصب، سلول‌های عصبی به سوی مرگ سلولی پیش می‌روند. فاکتور رشد عصب همچنین باعث رشد، طویل شدن و انشعاب آکسون می‌شود. از فاکتور رشد عصب انسانی می‌توان در درمان نوروپاتی‌های سیستم محیطی و مرکزی مانند بیماری آلزایمر استفاده کرد. در آلزایمر، فقدان حافظه نتیجه از بین رفتن نورون‌های کولینرژیک است.[۲۵] به‌دلیل عملکرد نوروتروپیک بنیادی، محققان زیادی قابلیت‌های درمانی بالقوه فاکتور رشد عصب را در درمان بیماری‌های ناشی از تحلیل سیستم عصبی مثل بیماری آلزایمر و پارکینسون مورد ملاحظه قرار داده‌اند.[۲۵]

در سال ۱۹۹۱، ساختار فاکتور رشد عصب به کمک کریستالوگرافی اشعه ایکس مشخص و نشان داده شد که مونومر فاکتور رشد عصب شکلی کشیده دارد و بخش مرکزی آن از دو جفت صفحه‌های بتا ناموازی و چرخان تشکیل شده است. در یک سمت سه لوپ سنجاق‌سری و در سمت دیگر موتیف، گره سیستئین وجود دارد که شکل تاخورده را پایدار و مولکول‌ها را در آرایش فضایی خود قفل می‌کند. در شکل فعال زیستی، دو مونومر به‌صورت موازی در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند و تشکیل هموداپمر می‌دهند.[۱۰] موتیف گره سیستئین که برای اولین بار در فاکتور رشد عصب مشاهده شد از سه پیوند دی‌سولفیدی

تشکیل شده است که دو تای آن به‌همراه اسکلت پروتئین (که سیستئین‌ها را به‌هم متصل می‌کند) حلقه‌ای بسته را تشکیل و پیوند سوم دی‌سولفیدی به درون آن نفوذ می‌کند[۲۶] (شکل شماره ۱).



شکل ۱- ساختار مونومر فاکتور رشد عصب براساس روش مک‌دونالد و همکاران. انتهاها و نواحی لوپ مانند L1 تا L4 با قرمز و اسیدهای آمینه سیستئین تشکیل‌دهنده موتیف گره سیستئین در نزدیکی بالای مولکول با رنگ طوسی و زرد به‌صورت گوی و میله نمایش داده شده‌اند

فاکتور رشد عصب را می‌توان از غدد بزاقی زیر فک موش به‌صورت ترکیب با فاکتور رشد عصب آلفا و فاکتور رشد عصب گاما به‌دست آورد (در این ترکیب، فاکتور رشد عصب مدنظر به‌صورت فاکتور رشد عصب بتا است).[۲۷] فاکتور رشد عصب (UniProt ID: P01138) به‌صورت پری- پرو- پپتید (۲۴۱ اسید آمینه) بیان می‌شود که بخش پری آن، پپتید نشانه ۱۸ اسید آمینه‌ای است و طی انتقال به شبکه آندوپلاسمی برداشته می‌شود. سپس پردازش‌های بعدی بر روی انتهای N و C بخش "پرو" انجام می‌شود (برداشته شدن بخش "پرو" و دو اسید آمینه انتهایی). بنابراین بخش بالغ آن از ۱۱۸ اسید آمینه تشکیل شده است.[۲۸] (شکل شماره ۲).

MSMLFYTLIT AFLIGIQAEP HSESNVPAGH TIPQAHWTKL QHSLDTALRR ARSAPAAAIA ARVAGQTRNI TVDPRLFKKR RLRSPRVLFS TQPPREAADT QDLDFEVGGA APFNRTHRSK RSSSHPIFHR GEFSVCDSVS VWVGDKTTAT DIKGKEVMVL GEVNINNSVF KQYFFETKCR DPNPVDSGCR GIDSKHWNSY CTTTHTFVKA LTMDGKQAAW RFIRIDTACV CVLSRKAVRR A

شکل ۲- توالی پروتئین فاکتور رشد عصب انسانی (Human Nerve Growth Factor , hNGF) (UniProt ID: P01138)، آمینواسیدهای قهوه‌ای رنگ کُدکننده بخش pre، آمینواسیدهای آبی کُدکننده بخش pro و آمینواسیدهای قرمز کُدکننده بخش بالغ پروتئین

اتصال فاکتور رشد عصب باعث فسفوریلاسیون ناحیه کینازی گیرنده تیروزین‌کیناز A (TrkA) می‌شود و گیرنده تیروزین‌کیناز A فسفریله، آبشار پیام‌بر ثانویه را راه‌اندازی می‌کند و در نتیجه موجب دامنه‌ای از تغییرات عملکردی در فعالیت نورون می‌شود. گیرنده‌های نوروتروفین تیرزین‌کیناز A، تیرزین‌کیناز B و تیرزین‌کیناز C ساختار مشترکی دارند و بخش خارج سلولی آن‌ها شامل: یک خوشه غنی از سیستئین (ناحیه ۱)، سه تکرار غنی از لوسین (ناحیه ۲)، خوشه دوم غنی از سیستئین (ناحیه ۳) و دو ناحیه مشابه ایمنوگلوبین (ناحیه‌های ۴ و ۵). بخش خارج سلولی به‌وسیله تک مارپیچ درون غشایی به ناحیه داخل سلولی تیروزین‌کیناز متصل می‌شود. ناحیه‌های کیناز به شدت هم‌سان هستند و بیش از ۷۵ درصد تشابه در توالی آن‌ها مشاهده می‌شود. در حالی‌که بخش خارج سلولی واگراتر هستند و حدود ۵۰ تا ۵۵ درصد شباهت بین توالی آن‌ها دیده می‌شود.[۲۶]

فاکتور رشد عصب علاوه بر نقش اصلی و مهم خود به‌عنوان فاکتور رشد و بقا، قادر به مرگ انواع خاصی از سلول‌ها از طریق پیام‌رسانی به کمک گیرنده نوروتروفینی p75 ($p75^{NTR}$) است. در مقایسه با سه گیرنده تیروزین‌کیناز، اطلاعات کمی در رابطه با $p75^{NTR}$ وجود دارد. فعالیت زیستی که از طریق این گیرنده به راه می‌افتد به نوروتروفین متصل شده به لیگاند و نوع گیرنده تیروزین‌کیناز بیان شده بر سطح سلول بستگی دارد.

فاکتور رشد عصب متصل به $p75^{NTR}$ منجر به مرگ سلول‌های فاقد گیرنده تیروزین‌کیناز A می‌شود؛ در حالی‌که در حضور گیرنده تیروزین‌کیناز A، اتصال فاکتور رشد عصب به این گیرنده افزایش و موجب بقای سلول می‌گردد.[۲۹]

تشکیل پری- پرو- نوروتروفین

تمام نوروتروفین‌ها به‌صورت پیش‌سازهای پری-پرو- نوروتروفین (با طول حدود ۲۴۰ تا ۲۶۰ اسید آمینه) تولید و بعد از پردازش بیش‌تر، در نهایت به‌صورت پروتئین‌های همودایمر بالغ که طول هر مونومر ۱۱۸ تا ۱۲۹ اسید آمینه می‌باشد، به فضای خارج سلولی ترشح می‌شوند.[۱۰]

توالی پری یا پپتید نشانه در هدایت ساخت پروتئین در حال تولید به ریبوزوم‌های متصل به شبکه آندوپلاسمی نقش دارد و به ورود زنجیره پلی‌پپتید تازه تشکیل شده به درون شبکه آندوپلاسمی منجر می‌شود. نظیر دیگر پروتئین‌های ترشحی، پپتید نشانه بلافاصله پس از ورود به شبکه آندوپلاسمی جدا و پرو- نوروتروفین باقی‌مانده به‌صورت خود به خودی، همودایمرهایی که به‌طور غیرکووالان به‌هم متصل هستند را در شبکه آندوپلاسمی تشکیل می‌دهد. در این مرحله، هترودایمرهایی از مونومرهای نوروتروفین متفاوت نیز می‌توانند تولید شوند. سپس پرو- نوروتروفین‌ها در شبکه آندوپلاسمی از طریق وزیکول‌های انتقالی فاقد پوشش به دستگاه گلژی منتقل و در نهایت در چین‌خوردگی‌های غشای ناحیه ترانس‌گلژی تجمع می‌یابند. در این ایستگاه مرکزی دسته‌بندی پروتئین داخل سلولی، دو نوع مختلف از وزیکول‌های ترشحی تولید و با کوکتل‌های نوروپپتید مختلف پُر می‌شوند. این دو نوع وزیکول ترشحی با توجه به مکانیسم‌های ترشحی مربوطه خود مشخص می‌شوند. گرانول‌های مسیر ترشحی دایمی، وزیکول‌های کوچک با قطر ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند که به‌طور پیش فرض به حاشیه سلول منتقل و سپس در این محل می‌توانند با غشای پلاسمایی ادغام شوند و محتویات خود را در غیاب وجود هرگونه مکانیسم‌های تحریک‌کننده رها کنند. این مسیر دایمی در تمام انواع سلول‌ها وجود دارد. وزیکول‌های مسیر تنظیمی نسبتاً بزرگ با قطر ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر هستند که از ناحیه ترانس‌گلژی جوانه می‌زنند و با غشای پلاسمایی ادغام می‌شوند.[۳۰]

مسیرهای ترشحی

پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌هایی که به تازگی ساخته شده‌اند، از شبکه آندوپلاسمی و از طریق دستگاه گلژی توسط وزیکول‌های انتقالی (که طی فرایند اگزوسیتوز با غشای پلاسمایی ادغام می‌شوند) به سطح سلول هدایت می‌گردند. هر مولکولی که در طول این مسیر حرکت می‌کند، اغلب در حین عبور از نظر شیمیایی تغییر می‌یابد.

پروتئین‌ها از شبکه آندوپلاسمی (محل ساخت و تغییر پروتئین‌ها) به دستگاه گلژی (جایگاه پردازش بیش‌تر و ذخیره‌سازی آن‌ها) و سپس به غشای پلاسمایی منتقل می‌شوند. هنگامی که پروتئینی از یک قسمت به قسمت دیگری می‌رود، از نظر تاخوردگی صحیح و الگوی مناسب ارزیابی می‌شود؛ به‌طوری که پروتئین‌های دارای ساختار صحیح که اکثریت را تشکیل می‌دهند از سطح غشا ترشح و بقیه در سلول تجزیه می‌شوند.[۳۰]

تغییر کووالانی پروتئین‌ها در شبکه آندوپلاسمی

بیش‌تر پروتئین‌هایی که وارد شبکه آندوپلاسمی می‌شوند، از نظر شیمیایی تغییر می‌کنند. پیوندهای دی‌سولفیدی در اثر اکسیداسیون زنجیره‌های جانبی سیستئینی ایجاد می‌شوند. پیوندهای دی‌سولفیدی در سیتوزول تشکیل نمی‌شوند؛ زیرا سیتوزول محیطی احیاکننده دارد.

بسیاری از پروتئین‌هایی که به مجرای داخلی یا غشای شبکه آندوپلاسمی وارد می‌شوند، با اتصال کووالان زنجیره‌های جانبی الیگوساکاریدی توسط آنزیم‌های گلیکوزیله‌کننده موجود در شبکه آندوپلاسمی به گلیکوپروتئین تبدیل می‌شوند. الیگوساکاریدهای واقع بر روی پروتئین‌ها، اعمال مختلفی انجام می‌دهند؛ نظیر حفظ پروتئین‌ها در مقابل تخریب، نگه‌داری پروتئین در

شبکه آندوپلاسمی تا پیدا کردن تاخوردگی صحیح و هدایت پروتئین به سوی اندامک صحیح.

الیگوساکارید ابتدا به لیپید خاصی به نام دولیکول (Dolichol) اضافه می‌گردد که در غشای شبکه آندوپلاسمی قرار دارد و سپس به گروه آمین (NH_2) زنجیره جانبی آسپاراژین واقع در پروتئین منتقل می‌شود. این عمل بلافاصله بعد از این‌که آسپاراژین هدف طی فرایند انتقال پروتئین به مجرای داخلی شبکه آندوپلاسمی راه یافت، انجام می‌شود. به اتصال زنجیره‌های جانبی الیگوساکاریدی به گروه NH_2 آسپاراژین پروتئین، اتصال آمینی گفته می‌شود که رایج‌ترین نحوه اتصال در گلیکوپروتئین‌هاست.[۳۰]

پردازش نوروتروفین‌ها در سلول

پردازش نوروتروفین‌ها شامل: گلیکوزیلاسیون آمین در ناحیه پرو، سولفاته شدن این الیگوساکاریدها و برش ناحیه پرو و تبدیل آن به نوروتروفین بالغ است. دیده شده که در چند رده سلولی، گلیکوزیلاسیون آمین در فاکتور رشد عصب و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز پیش‌نیازی برای بیان کارآمد نوروتروفین‌ها، خروج پرونوروتروفین‌ها از شبکه آندوپلاسمی و همچنین حفظ نوروتروفین‌ها از تخریب درون‌سلولی است. در یک مطالعه نشان داده شد که گلیکوزیلاسیون فاکتور رشد عصب توسط جهش در آسپاراژین‌های پذیرنده، مهار می‌شود و این امر نشان‌دهنده گلیکوزیلاسیون آمین در ناحیه "پرو" پروتئین فاکتور رشد عصب است.[۳۱] پروتئین‌های فاکتور رشد عصب و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز حاصله گلیکوزیله نیستند و به‌نظر می‌رسد مهار گلیکوزیلاسیون ناحیه پرو و بیان نوروتروفین‌ها را کاهش می‌دهند، اما متوقف نمی‌کنند.[۲۵]

مشابه بسیاری از پروتئین‌های ترشحی، برش ناحیه "پرو" در نوروتروفین‌ها به‌وسیله پرو- پروتئین کانورتازها (PC1/3, PC2, PC4, PC5/6, PC7) به‌همراه آنزیم PACE4 (آنزیم برش‌دهنده اسید آمینه) و فورین انجام می‌شود. فعالیت این سرین پروتئازها به غلظت یون کلسیم در حدود ۱۰ میکرومولار و pH در حدود ۵ تا ۷ وابسته است که به‌طور معمول در بخش ترانس شبکه گلژی و گرانول‌های ترشحی وجود دارد.[۳۲]

پروتئین کانورتازها با توجه به جایگاه درون سلولی خود به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند: گروه کانورتازهای ویژه در سلول‌ها با مسیر ترشحی تنظیمی که همه آن‌ها فاقد ناحیه درون غشایی هستند و هدف وزیکول ترشحی تنظیمی قرار دارند؛ از قبیل PC1/3، PC2، PC4 و PC5/6A. گروه دوم شامل: PACE4، PC5/6B، PC7 و فورین که به‌طور عمده یک ناحیه درون غشایی در نزدیکی پایانه C دارد و به‌صورت اختصاصی در بخش ترانس شبکه گلژی، اندوزوم‌ها و در موارد نادر در وزیکول‌های ترشحی دایمی نیز یافت می‌شود.[۳۳]

فورین در تمام بافت‌ها به مقدار فراوان بیان می‌شود، در حالی که پرو- پروتئین کانورتازهای PC1 و PC2 اغلب در سلول‌های عصبی موجود هستند. همه این کانورتازها معمولاً در بالادست یک جفت (و یا حتی یک) اسید آمینه (Arg-Arg یا Lys-Arg) در پایانه C ناحیه پرو، بُرش می‌زنند.[۳۴]

فورین فراوان‌ترین پروتئین کانورتاز در تمام سلول‌هایی است که فقط مسیر ترشحی دایمی دارند. فورین به‌طور فراوان در نورون‌های قشری و هیپوکامپ بیان می‌شود و همه پرونوروتروفین‌ها می‌توانند با فورین پردازش شوند. از آنجا که فورین در بخش ترانس شبکه گلژی وجود دارد، تمام نوروتروفین‌ها به‌وسیله این کانورتاز در شبکه گلژی همه انواع سلول‌ها، حداقل تا حدی پردازش می‌شوند. با این حال، پردازش فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز توسط فورین نسبت به پردازش فاکتور رشد عصب و نوروتروفین-۳ کم کارآمدتر است.[۳۵] مطالعه‌ها نشان داده‌اند که فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز حساسیت کم‌تری به بُرش به‌وسیله فورین در بخش ترانس شبکه گلژی دارد و چندین گزارش نیز نشان داده است که به‌طور کلی پردازش پروتئین‌های ترشحی تنظیمی به‌وسیله فورین ناکارآمدتر از بُرش به‌وسیله پروتئین

کانورتازهای خاص مسیر ترشحی تنظیمی است.[۳۶]

هنگامی که پروتئین در سلولی که تنها دارای مسیر ترشحی دایمی و فاقد پروتئین کانورتازهای مسیر ترشحی تنظیمی (PC1/3، PC2، PC4، PC5/6A) می‌باشد، بیان می‌شود منجر به بُرش ناقص پیش‌سازهایی که به‌طور معمول هدف مسیر تنظیمی هستند، می‌گردد. پروتئین کانورتازهای PC1/3 و PC2 به‌جای تجمع در بخش ترانس شبکه گلژی، به‌طور عمده در وزیکول‌های ترشحی تنظیمی قرار می‌گیرند که نشان می‌دهد حداقل بخشی از پردازش پرونوروتروفین‌ها در مسیر تنظیمی در وزیکول و قبل از رهایی انجام می‌شود. قابل توجه است که بُرش کارآمد پرونوروتروفین‌ها پیش نیاز ترشح نوروتروفین‌ها نیست و نشان داده که pro-NGF و pro-BDNF از رده‌های سلولی خاصی که بیان ژن فاکتور رشد عصب و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در آن‌ها زیاد است، نیز ترشح می‌شوند. این پرونوروتروفین‌ها نظیر پروتئین بالغ مربوطه دارای فعالیت نوروتروفیک قابل توجه در اتصال به گیرنده‌های تیروزین‌کیناز می‌باشند. pro-NGF نسبت به NGF بالغ، اتصال کارآمدتری به گیرنده‌های p75 نشان می‌دهد.[۳۷]

کاربرد بالینی فاکتور رشد عصب

با استفاده از فناوری مدرن DNA نوترکیب، ژن‌های کُدکننده فاکتور رشد عصب موشی و انسانی بر روی بازوی کوتاه پروکسیمال کروموزوم ۱ شناسایی شدند. اخیراً پروتئین فاکتور رشد عصب نوترکیب موشی و انسانی تولید و برای مطالعه‌های پایه و بالینی استفاده شده است. مطالعه لوی- مونتالچینی در اوایل دهه ۱۹۷۰ نشان داد که فاکتور رشد عصب علاوه بر اثر روی نورون‌های عصبی سمپاتیک و حسی بر روی انواع سلول‌های دیگر نیز تأثیر می‌گذارد؛ برای مثال اثر فاکتور رشد عصب بر دستگاه عصبی مرکزی و توانایی این فاکتور به‌عنوان یک عامل کموتروپیک.[۳۸] یافته‌های لوی- مونتالچینی نشان داد در هنگام تنش، فاکتور رشد عصب به میزان زیاد در جریان خون و هیپوتالاموس بیان می‌شود و احتمالاً می‌تواند در پاسخ‌های هومئوستاتیک دخیل باشد.[۳۹] اخیراً فاکتور رشد عصب در درمان زخم‌های نوروتروفیک قرنیه انسان و زخم‌های فشاری با موفقیت استفاده شده است.[۴۰و۴۱] در حال حاضر، فاکتور رشد عصب و فاکتورهای مشابه دیگر به‌دلیل اثرات احتمالی آن‌ها در ترمیم نورون‌های آسیب‌دیده، التهاب اعصاب و نوروایمونوپاتولوژی، موضوع‌های با اهمیت و قابل توجهی هستند.

مطالعه‌ها نشان داد فاکتور رشد عصب باعث افزایش تولید مجدد سلول‌های اعصاب محیطی در موش، افزایش ترمیم میلین و افزایش بیان آن در بیماری‌های التهابی گردیده که منجر به سرکوب التهاب می‌گردد در درمان مالتیپل اسکلروزیس (MS) سودمند است. این فاکتور در اختلال‌های روانی مختلف مانند جنون، افسردگی، شیزوفرنی، اوتیسم، سندروم رت، بی‌اشتهایی عصبی و پُرخوری عصبی نیز نقش داشته و تنظیم اشتباه پیام‌رسانی آن با بیماری آلزایمر در ارتباط می‌باشد.[۴۲] در بیماران مبتلا به آلزایمر مشاهده شده که میزان فاکتور رشد عصب در کورتیکال و ساب‌کورتیکال افزایش می‌یابد. در بیماری آلزایمر انحطاط سیستم عصبی منجر به اختلال در پیام‌رسانی پروتئین فاکتور رشد عصب به نواحی خاصی از مغز می‌گردد که این اختلال می‌تواند ناشی از تولید و یا استفاده غیرمعمول از گیرنده‌ها در مغز باشد. درمان نوین ارایه شده برای بیماری آلزایمر، تزریق پروتئین فاکتور رشد عصب و در نتیجه تحریک گیرنده‌های آن است که باعث افزایش جریان خون و حافظه کلامی می‌گردد.[۴۲و۴۳]

مطالعه‌ها نشان داده‌اند که فاکتور رشد عصب در سایر سیستم‌های فیزیولوژیکی و بافت‌ها مانند سیستم ایمنی نیز ایفای نقش می‌کند. سلول‌های ایمنی خونی، پروتئین فاکتور رشد عصب را تولید و مصرف می‌کنند.[۴۴] ارزیابی سطح نوروتروفین‌ها در سیستم عصبی محیطی در احساس‌های عاشقانه نشان داد که سطح فاکتور رشد عصب به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد و رابطه مستقیم مثبتی بین میزان پروتئین فاکتور رشد عصب و

شدت احساس‌های عاشقانه وجود دارد؛ اگرچه مکانیسم این افزایش مشخص نیست.[۴۵] ابتدا به‌نظر می‌رسید اثر این مولکول به سیستم عصبی محیطی محدود باشد، اما بعدها مشخص گردید که نقش بسیار مهمی در مغز دارد.[۴۶] برخلاف تصورهای قبلی، مغز ساختار سختی ندارد و به‌طور پیوسته در حال تغییر است و فاکتور رشد عصب به بقای نورون‌ها (که از سن ۱۰ و ۱۵ سالگی شروع به از دست رفتن می‌کنند) کمک می‌کند.[۴۷و۴۸]

تولید پروتئین فاکتور رشد عصب نوترکیب در سیستم‌های بیانی متفاوت

از آن‌جا که فاکتور رشد عصب نمی‌تواند به‌وسیله استخراج از بافت‌های انسانی تولید شود، فنون مختلفی برای تولید فاکتور رشد عصب انسانی نوترکیب توسعه یافته که اغلب به تولید مؤثر مولکول منجر نشده‌اند. فناوری‌های DNA نوترکیب امکان تولید گسترده‌ای از پروتئین‌های نوترکیب انسانی را برای کاربردهای درمانی فراهم می‌کنند؛ البته برای تولید فاکتور رشد عصب نوترکیب با استفاده از ارگانیسم‌های مختلف تلاش‌های زیادی شده ولی تاکنون نتایج مورد انتظار ایجاد نشده است.

پیش‌ساز این پروتئین (pre-pro-NGF) پلی‌پپتیدی واجد ۲۴۱ آمینواسید است که آمینواسیدهای ۱ تا ۱۸، توالی شناسایی جهت اتصال و ورود به شبکه آندوپلاسمی (pre)، آمینواسیدهای ۱۹ تا ۱۲۱، توالی pro و ۱۲۲ تا ۲۴۱، توالی پروتئین بالغ هستند و طی تغییرات پس از ترجمه در سلول، پروتئین بالغ از پیش‌ساز آن حاصل می‌شود.[۴۹-۵۱] پروتئین‌های نوترکیب فاکتور رشد عصب تولید شده در میزبان‌های مختلف مزایا و معایب دارند که در زیر به آن‌ها اشاره می‌شود:

تولید فاکتور رشد عصب در پروکاریوت‌ها

در سال ۱۹۹۱، نگرو و همکاران پروتئین فاکتور رشد عصب بتا را در اشریشیاکلی بیان کردند. پروتئین نوترکیب بیان شده ۳ درصد کل پروتئین سلول را تشکیل می‌داد که ۰/۲ درصد آن محلول بود.[۵۲] این روش دارای معایب استفاده از سیستم پروکاریوتی است، بنابراین برای تولید پروتئین‌های یوکاریوتی با تاخوردگی صحیح، بعد از مرحله تخلیص به چند مرحله تاخوردگی مجدد سخت در شرایط در شیشه (*in vitro*) نیاز است. اگرچه مدل‌های زیادی برای تولید پروتئین‌های خارجی در سیستم‌های پروکاریوتی وجود دارند، مطالعه‌ها نشان داده‌اند که عدم موفقیت تولید فاکتور رشد عصب انسانی نوترکیب در اشریشیاکلی به‌دلیل ناتوانی باکتری در ایجاد بُرش‌های پروتئولیتیک صحیح و پردازش صحیح پیش‌ساز فاکتور رشد عصب است، همچنین بیان ناحیه DNA کُدکننده پروتئین بالغ به ساخت پروتئین غیرفعال و تولید اجسام توده‌ای منجر می‌شود. فقدان فعالیت زیستی به‌دلیل عدم تشکیل باندهای دی‌سولفید صحیح در سیتوزول احیایی پروکاریوت است. به علاوه، محلول کردن اجسام توده‌ای و تاخوردگی مجدد پروتئین به‌شکل ساختار سوم فعال زیستی در مقایسه با هزینه زیاد تولید و تخلیص، به تولید اندک محصول و فعالیت زیستی پایین منجر می‌شود.[۴۹]

ساخت و ترشح فاکتور رشد عصب انسانی در مخمر ساکارومیسس‌سرویزیه

کانایا و همکاران در سال ۱۹۹۰، DNA کُدکننده فاکتور رشد عصب انسان که به‌طور شیمیایی ساخته شده بود را وارد ساکارومیسس سرویزیه کردند. آن‌ها از آغازگر ژن کُدکننده فسفوگلیسرات‌کیناز (PGK) مخمر و توالی نشانه ژن کُدکننده عامل جفت‌گیری آلفای مخمر (MFαl) برای ترشح پروتئین نوترکیب به‌داخل محیط کشت استفاده کردند. پروتئین ترشح شده از محیط کشت تخلیص و فعالیت زیستی آن بر روی سلول‌های PC12 (Rat pheochromocytoma) بررسی گردید و غلظت پروتئین تولید شده در محیط کشت با استفاده از SDS-PAGE، ۱۰ میکروگرم بر لیتر تخمین زده شد. فعالیت فاکتور رشد عصب نوترکیب در مقایسه با فاکتور رشد عصب استاندارد کم بود؛ یعنی نیاز به ۲ میکروگرم از فاکتور رشد عصب نوترکیب، در مقابل ۱۰ نانوگرم از فاکتور رشد عصب استاندارد، برای تحریک رشد آکسون‌ها

نیاز بود.[۱۴]

ساخت رشد عصب انسانی در سیستم بیانی سلول‌های حشرات

بارنت و همکاران در سال ۱۹۹۰ از سلول‌های حشره‌ای با نام علمی اسپودوپترا فراگیپردا (Sf-9, Spodoptera frugiperda) آلوده شده با باکولوویروس نوترکیب برای بیان ژن فاکتور رشد عصب انسانی نوترکیب استفاده کردند. در طی عفونت رده سلولی اسپودوپترا فراگیپردا با ویروس نوترکیب، فاکتور رشد عصب انسانی درون مایع کشت ترشح و میزان بیان در طی ۷ روز پس از عفونت به ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید. در تیمار سلول‌های PC12 و سلول‌های نوروبلاستومای انسانی (SH-SYBY) با پروتئین فاکتور رشد عصب انسانی نوترکیب تولید شده، رشد آکسون‌ها مشاهده شد.[۱۵] مشکل تولید با استفاده از این سیستم، نیاز به محیط کشت پُرهزینه بود.[۵۳]

بیان فاکتور رشد عصب انسانی در شیر خرگوش

شیائو و همکاران در سال ۲۰۰۷ از خرگوش به‌عنوان حیوان مدل برای تولید فاکتور رشد عصب بتای انسانی با استفاده از تزریق آدنوویروس‌های نوترکیب حاوی ژن فاکتور رشد عصب بتا به داخل غدد شیری خرگوش استفاده کردند. پس از تزریق، پلی‌پپتیدی با وزن مولکولی ۱۳/۲ کیلودالتن در شیر خرگوش تشخیص و میزان بیان پروتئین نوترکیب به ۳۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید. فعالیت زیستی فاکتور رشد عصب بتای نوترکیب با استفاده از سلول‌های PC12 تأیید شد. آن‌ها ادعا کردند میزان بیان فاکتور رشد عصب بتا در شیر به‌طور قابل توجهی بیش‌تر از مقدار تولید شده با استفاده از سایر سیستم‌های بیانی بود. اما به هر حال، این فناوری تنها در یک دوره کوتاه می‌تواند به بیان پروتئین منجر شود.[۵۴]

بیان فاکتور رشد عصب انسانی در شیر بز

شیائو و همکاران در سال ۲۰۰۸ برای تولید فاکتور رشد عصب، سازه آدنوویروس نوترکیب حاوی ژن فاکتور رشد عصب بتای انسانی را به داخل غدد شیری بز تزریق کردند. حداکثر میزان بیان فاکتور رشد عصب بتای نوترکیب در این روش، ۱۹۶/۸ میلی‌گرم بر لیتر بود. فعالیت زیستی فاکتور رشد عصب بتای نوترکیب در مقایسه با فاکتور رشد عصب بتای تجاری با استفاده از سلول‌های PC12 بررسی و به‌طور کامل نشان داد تزریق آدنوویروس نوترکیب به داخل غدد شیری بز به‌عنوان یک روش کارآمد برای تولید مقدار زیاد فاکتور رشد عصب بتا معرفی شد، اما مشکل استفاده از این سیستم نیز بیان پروتئین تنها در یک دوره کوتاه بود.[۵۵]

بیان فاکتور رشد عصب انسانی در سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان خرگوش

بو- شنگ فن و جی- یو لو در سال ۲۰۱۰ بیان ژن فاکتور رشد عصب انسانی نوترکیب را در سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان خرگوش (rMSCs; Rabbit mesenchymal stem cells) گزارش کردند. حامل نوترکیب حاوی ژن فاکتور رشد عصب بتا ساخته و به داخل سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان خرگوش منتقل شد. بیان ژن خارجی به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای معکوس رونویسی پلیمراز، آزمایش الیزا و وسترن‌بلاتینگ مشخص و فعالیت زیستی پروتئین نوترکیب تولید شده با استفاده از سلول‌های PC12 تأیید شد. حداکثر میزان بیان پروتئین نوترکیب ۱۲۶/۸۰۱۲ پیکوگرم بر $۱۰^{۶}$ سلول بود. مشکل استفاده از این روش نیاز به محیط کشت استریل گران‌قیمت و عدم امکان استفاده در مقیاس صنعتی بود.[۵۶]

بیش از یک دهه، برای تولید فاکتور رشد عصب بتای انسانی نوترکیب (rhNGF-β- زیرواحد عملکردی فاکتور رشد عصب انسانی) به‌وسیله رویکردهای ژنتیکی در میزبان‌های پروکاریوت مانند اشریشیاکلی و یوکاریوت‌هایی چون مخمر، حشره و سلول‌های پستانداران تلاش‌های زیادی شده است. اما مقدار فاکتور رشد عصب بتای انسانی نوترکیب تولید شده به‌وسیله روش‌های مهندسی ژنتیک برای بررسی‌های پزشکی کافی نبود. اگرچه استفاده از حیوان‌های تراریخت به‌عنوان روشی برای تولید

فاکتور رشد عصب بتای انسانی نوترکیب تا حد زیادی مورد توجه قرار گرفته، اما ساخت یک حیوان تراریخت به منظور تولید فاکتور رشد عصب بتای انسانی نوترکیب، پُرهزینه و ناکارآمد است. بنابراین تولید این فاکتور به روش اقتصادی و کارآمد هنوز به‌صورت یک چالش مطرح می‌باشد.

در اواخر دهه ۸۰ میلادی فناوری تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان باعث کشف سیستم بیان گیاهی شد که قادر به تولید پروتئین‌های دارویی ارزان‌تر و ایمن‌تر بود.[۵۷] در سال ۱۹۹۰، اولین پروتئین درمانی نوترکیب (آلبومین سرم انسانی) در برگ و کشت‌های سوسپانسیون سلول گیاه سیب زمینی و تنباکو بیان شد. از آن زمان تاکنون، صدها پروتئین نوترکیب در انواع متنوعی از گیاهان با موفقیت بیان شده‌اند.[۵۸] از بین ارگانیسم‌های مختلف برای تولید پروتئین‌های درمانی، گیاهان به دلایل زیر به‌عنوان سیستم بیانی مناسب شناخته شده‌اند: قیمت کم‌تر محصولات تولیدی نسبت به سیستم‌های جانوری تراریخت، عدم وجود عوامل بیماری‌زای انسانی در سیستم‌های گیاهی از قبیل پریون‌ها و ویروس‌ها، ایجاد تغییرات پس از رونویسی در پروتئین نوترکیب، افزایش پایداری پروتئین نوترکیب با هدفدار شدن برای مسیر ترشحی یا هدایت پروتئین‌ها به بخش‌های خاص از قبیل اندامک‌ها و حذف مرحله خالص‌سازی در هنگام خوراکی بودن بافت گیاهی حاوی پروتئین نوترکیب.[۵۹-۶۶]

اگرچه توانایی گیاهان در تولید و بیان پروتئین‌های مختلف به اثبات رسیده است، با این حال فقط تعداد کمی از این محصولات تا به امروز تجاری شده‌اند.[۶۷] مهم‌ترین سیتوکین‌های تولید شده در گیاهان به روش موقت که تاکنون برای استفاده بالینی تأیید شده و در خط تولید قرار گرفته‌اند عبارتند از: اریتروپوئیتین، فاکتور محرک رشد کلنی گرانولوسیت- ماکروفاژ، اینترفرون آلفا، اینترفرون بتا و فاکتور رشد سلول بنیادی (SCF)[۶۸] (جدول شماره ۱).

جدول ۱- سیتوکین‌های نوترکیب بیان شده در گیاهان به روش موقت

سیتوکین	گیاه میزبان	روش ترانسفورماسیون	میزان بیان پروتئین
اریتروپوئیتین	نیکوتیانا بنتامیانا	آگروباکتریوم انفیلتراسیون	۵۲ میکروگرم بر گرم
فاکتور محرک رشد کلنی گرانولوسیت- ماکروفاژ	نیکوتیانا بنتامیانا	ترانسفورماسیون ویروسی	۲درصد پروتئین محلول کل
اینترلوکین-۳	نیکوتیانا بنتامیانا	آگروباکتریوم انفیلتراسیون	۰/۱۴۴ میلی‌گرم بر گرم
اینترفرون آلفا	لاکتوکا ساتیوا	آگروباکتریوم انفیلتراسیون	۰/۳۹۳ میلی‌گرم بر گرم
اینترفرون بتا	لاکتوکا ساتیوا	آگروباکتریوم انفیلتراسیون	$۳/۱\times۴^{-۱۰}$ واحد بر میلی‌لیتر
فاکتور رشد شبه انسولین ۱ انسانی	نیکوتیانا بنتامیانا	آگروباکتریوم انفیلتراسیون	۰/۲۵ میلی‌گرم بر گرم
فاکتور رشد سلول بنیادی	نیکوتیانا بنتامیانا	آگروباکتریوم انفیلتراسیون	۰/۲ میلی‌گرم بر گرم

❋بحث و نتیجه‌گیری:

تولید فاکتور رشد عصب به‌دلیل کاربرد آن در رشد، تکامل و حفظ حیات سلول‌های عصبی به‌ویژه نورون‌ها، مهندسی بافت و محیط کشت سلول‌های بنیادی با کمک فناوری نوترکیب برای اهداف درمانی- بالینی و تحقیقاتی دارای اهمیت وافری است. پروتئین مذکور به‌عنوان دارو برای درمان بیماری‌هایی با تخریب نورون‌های عصبی از قبیل آلزایمر، پارکینسون و اسکلروز به‌کار می‌رود.

آن‌چه تا امروز در مقاله‌ها گزارش شده است نشان می‌دهد که سیستمی برای تولید فاکتور رشد عصب انسانی نوترکیب مؤثر، مقرون به صرفه و با قابلیت استفاده در مقیاس صنعتی وجود ندارد. در حقیقت همه سیستم‌های پیشنهاد شده برای تولید پروتئین مشکلاتی نظیر هزینه در تولید صنعتی و یا کسب مجوز برای تجاری‌سازی محصول دارند یا موجب تولید پروتئین با تاخوردگی ناصحیح می‌شوند و بنابراین عملکرد فعال زیستی برای

کاربرد دارویی ندارند.[۱۳] از این رو استاندارد کردن تولید پروتئین فاکتور رشد عصب انسانی نوترکیب به روشی مؤثر با تاخوردگی مولکولی صحیح، تکرارپذیر با هزینه کم و با تولید پیوسته مورد نیاز است.

به‌نظر می‌رسد که در سال‌های آینده راکتورهای زیستی گیاهی جای‌گزین سایر سیستم‌های مورد استفاده شود. با این وجود باید توجه کرد که توانایی بالای تولید پروتئین‌های دارویی در گیاهان فقط در صورتی محقق می‌شود که تولیدهای حاصل، استانداردهای کیفی لازم و همچنین درجه کیفی دارویی را داشته باشند تا بتوانند تأیید نهادهای نظارتی را کسب و استفاده از آن‌ها در آزمایش‌های بالینی و در درمان، معمول گردد. برای رسیدن به این اهداف باید فناوری‌های مربوط به بهبود عملکرد از نظر کمی را توسعه داد، از کیفیت و پایداری محصولات مطمئن شد و همچنین مراحل تخلیص و پردازش فرآورده به خوبی انجام گیرد.[۶۹] در کشورهای پیشرفته تلاش پُرشتابی جهت تولید زیست‌داروها از منابع گیاهی در حال انجام است. در حال حاضر چندین پروتئین نوترکیب در بازار وجود دارند که عمده‌ترین آن‌ها عبارتند از: اریتروپویتین، عامل محرک کلونی گرانولوسیت، هورمون رشد انسانی، انسولین، اینترفرون آلفا و واکسن هپاتیت B.

از سیستم‌های ساده یوکاریوتی مانند مخمرها نیز می‌توان برای تولید پروتئین نوترکیب استفاده کرد. عمده‌ترین مشکل این سیستم‌ها، ناتوانی در انجام تغییرات پس از ترجمه به‌خصوص گلیکوزیلاسیون است که برای تولید پروتئین عملکردی، بسیار مهم بوده و در مخمر متفاوت از یوکاریوت‌های عالی‌تر انجام می‌شود. به‌علاوه مقدار تولید پروتئین‌های نوترکیب در مخمر کم است و تولید آن در مقیاس وسیع مقرون به صرفه نیست. در رابطه با استفاده از کشت سلول‌های جانوری جهت تولید پروتئین‌های درمانی نوترکیب نیز کنترل دقیق وضعیت محیط کشت برای اطمینان از خلوص محصولات الزامی است، چرا که این سلول‌ها به خصوص وقتی در مقیاس صنعتی کشت می‌شوند، نسبت به تغییرات محیطی بسیار حساسند.[۷۰و۷۱]

فاکتورهای مهمی از قبیل عدم وجود عوامل بیماری‌زای انسانی در سیستم‌های گیاهی، انجام تغییرات پس از ترجمه، ارزان بودن و امکان استفاده در مقیاس صنعتی با سهولت و با هزینه کم باعث شده که گیاهان به‌عنوان مناسب‌ترین میزبان برای تولید پروتئین‌های دارویی و درمانی نوترکیب مطرح شوند.[۷۲] انتخاب گونه میزبان، سیستم بیان مورد استفاده و روش تولید پروتئین باید با دقت بسیار انجام شود و علاوه بر بررسی مورد به مورد، باید اثرات متقابل این عوامل بر روی همدیگر را نیز در نظر گرفت. همچنین برای افزایش سطح تولید پروتئین خارجی در گیاهان، راهبردهایی مانند انتخاب آغازگر قوی، بهینه‌سازی کُدون برای بیان در میزبان گیاهی و استقرار پروتئین خارجی در اندامک خاص، چالش‌های عمده و مهمی هستند که باید به آن توجه کرد.[۶۲و۷۳]

در مطالعه‌ای که هم‌اکنون در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران در حال انجام است پروتئین فاکتور رشد عصب انسانی در گیاه به روش موقت بیان شده است[۷۴و۷۵] که امروزه به‌عنوان یک روش قابل صنعتی شدن مورد توجه شرکت‌های بزرگ تجاری تولیدکننده پروتئین‌ها و داروهای نوترکیب قرار گرفته است.

❋مراجع:

1. Aloe L, Rocco ML, Bianchi P, Manni L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. J Transl Med 2012 Nov 29; 10: 239. doi: 10.1186/1479-5876-10-239.

2. Manni L, Rocco ML, Bianchi P, Soligo M, Guaragna M, Barbaro SP, et al. Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications. Growth Factors 2013 Aug; 31 (4): 115-22. doi: 10.3109/08977194.2013. 804073.

3. Bracci-Laudiero L, Celestino D, Starace G, Antonelli A, Lambiase A, Procoli A, et al. CD34-positive cells in human umbilical cord blood express nerve growth factor and its specific receptor TrkA. J Neuroimmunol 2003 Mar; 136 (1-2): 130-9.
4. Beigelman A, Levy J, Hadad N, Pinsk V, Haim A, Fruchtman Y, et al. Abnormal neutrophil chemotactic activity in children with congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): the role of nerve growth factor. Clin Immunol 2009 Mar; 130 (3): 365-72. doi: 10.1016/j.clim.2008.09.005.
5. Noga O, Peiser M, Altenähr M, Knieling H, Wanner R, Hanf G, et al. Differential activation of dendritic cells by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. Clin Exp Allergy 2007 Nov; 37 (11): 1701-8.
6. Ma W, Dumont Y, Vercauteren F, Quirion R. Lipopolysaccharide induces calcitonin gene-related peptide in the RAW264. 7 macrophage cell line. Immunology 2010 Jul; 130 (3): 399-409. doi: 10.1111/j.1365-2567. 2009.03239.x.
7. Scuri M, Samsell L, Piedimonte G. The role of neurotrophins in inflammation and allergy. Inflamm Allergy Drug Targets 2010 Jul; 9 (3): 173-80.
8. Molloy NH, Read DE, Gorman AM. Nerve growth factor in cancer cell death and survival. Cancers (Basel) 2011 Feb 1; 3 (1): 510-30. doi: 10.3390/cancers3010510.
9. Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, et al. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. Biochem J 1996 Mar 15; 314 (Pt 3): 951-60.
10. McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, Gunning J, Wlodawer A, Blundell TL. New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. Nature 1991 Dec 5; 354 (6352): 411-4.
11. Capsoni S, Covaceuszach S, Ugolini G, Spirito F, Vignone D, Stefanini B, Amato G, Cattaneo A. Delivery of NGF to the brain: intranasal versus ocular administration in anti-NGF transgenic mice. J Alzheimers Dis 2009; 16 (2): 371-88. doi: 10.3233/JAD-2009-0953.
12. Allard S, Leon WC, Pakavathkumar P, Bruno MA, Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC. Impact of the NGF maturation and degradation pathway on the cortical cholinergic system phenotype. J Neurosci 2012 Feb 8; 32 (6): 2002-12. doi: 10.1523/ JNEUROSCI.1144-11.2012.
13. Galba P, Pozzi CM, Stile MR, Puja E, Audia E. Production of NGF in plant. United States patent application US 13/121, 556. 2009 Jul 2.
14. Eiko K, Takako H, Fumiko O, Keiko H, Masafumi N, Masao T, et al. Synthesis and secretion of human nerve growth factor by Saccharomyces cerevisiae. Gene 1989 Nov; 83 (1): 65-74. doi: 10.1016/0378-1119(89) 90404-6.
15. Barnett J, Baecker P, Routledge-Ward C, Bursztyn-Pettegrew H, Chow J, Nguyen B, et al. Human β nerve growth factor obtained from a baculovirus expression system has potent in vitro and in vivo neurotrophic activity. Exp Neurol 1990 Oct; 110 (1): 11-24.
16. Iwane M, Kitamura Y, Kaisho Y, Yoshimura K, Shintani A, Sasada R, et al. Production, purification and characterization of biologically active recombinant human nerve growth factor. Biochem Biophys Res Commun 1990 Aug 31; 171 (1): 116-22.
17. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. Annu Rev

Neurosci 2001; 24 (1): 1217-81.
18. Bradshaw, Ralph A. Functioning of transmembrane receptors in signaling mechanisms. 1st ed. London: Academic Press, 2011 Apr; 5 (133): 277-85. doi: 10.1016/B978-0-12-374145-5.00041-3
19. Hwang JJ, Park MH, Choi SY, Koh JY. Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc. Role of metalloproteinases. J Biol Chem 2005 Mar 25; 280 (12): 11995-2001.
20. Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H, Garcia KC. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. Neuron 2007 Jan 4; 53 (1): 25-38.
21. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. Nat Rev Neurosci 2005 Aug; 6 (8): 603-14.
22. Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF, Petrecca K, Fawcett JP, Seidah NG, et al. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. J Neurosci 1999 Mar 15; 19 (6): 2069-80.
23. Lim KC, Tyler CM, Lim ST, Giuliano R, Federoff HJ. Proteolytic processing of proNGF is necessary for mature NGF regulated secretion from neurons. Biochem Biophys Res Commun 2007 Sep 28; 361 (3): 599-604.
24. Cuello AC, Bruno MA, Allard S, Leon W, Iulita MF. Cholinergic involvement in Alzheimer's disease. A link with NGF maturation and degradation. J Mol Neurosci 2010 Jan; 40 (1-2): 230-5. doi: 10.1007/ s12031-009-9238-z.
25. Cattaneo A, Calissano P. Nerve growth factor and Alzheimer's disease: new facts for an old hypothesis. Mol Neurobiol. 2012 Dec; 46 (3): 588-604. doi: 10.1007/s12035-012-8310-9.
26. Wiesmann C, de Vos AM. Nerve growth factor: structure and function. Cell Mol Life Sci 2001 May; 58 (5-6): 748-59.
27. Shooter EM. Early days of the nerve growth factor proteins. Annu Rev Neurosci 2001; 24: 601-29.
28. Lonka-Nevalaita L, Lume M, Leppänen S, Jokitalo E, Peränen J, Saarma M. Characterization of the intracellular localization, processing, and secretion of two glial cell line-derived neurotrophic factor splice isoforms. J Neurosci 2010 Aug 25; 30 (34): 11403-13. doi: 10.1523/JNEUROSCI. 5888-09.2010.
29. Mantyh PW, Koltzenburg M, Mendell LM, Tive L, Shelton DL. Antagonism of nerve growth factor-TrkA signaling and the relief of pain. Anesthesiology 2011 Jul; 115 (1): 189-204. doi: 10.1097/ALN.0b013e 31821b1ac5.
30. Braakman I, Bulleid NJ. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. Annual review of biochemistry. 2011 Jul; 7 (80): 71-99.
31. Heymach JV, Krüttgen A, Suter U, Shooter EM. The regulated secretion and vectorial targeting of neurotrophins in neuroendocrine and epithelial cells. J Biol Chem 1996 Oct 11; 271 (41): 25430-7.
32. Seidah NG, Chrétien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. Brain Res 1999 Nov 27; 848 (1-2): 45-62.
33. Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. Nat Rev Mol Cell Biol 2002 Oct; 3 (10): 753-66.
34. Zhou A, Webb G, Zhu X, Steiner DF. Proteolytic processing in the secretory

pathway. J Biol Chem 1999 Jul; 274 (30): 20745-8.
35. Farhadi HF, Mowla SJ, Petrecca K, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. J Neurosci 2000 Jun 1; 20 (11): 4059-68.
36. Galanopoulou AS, Kent G, Rabbani SN, Seidah NG, Patel YC. Heterologous processing of prosomatostatin in constitutive and regulated secretory pathways. Putative role of the endoproteases furin, PC1, and PC2. J Biol Chem 1993 Mar 15; 268 (8): 6041-9.
37. Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. Prog Neurobiol 2003 Apr; 69 (5): 341-74.
38. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor: its role in growth, differentiation and function of the sympathetic adrenergic neuron. Prog Brain Res 1976; 45: 235-58.
39. Levi-Montalcini R. The saga of the nerve growth factor. 1st ed. Singapore: World Scientific, 1997. Print.
40. Landi F, Aloe L, Russo A, Cesari M, Onder G, Bonini S, et al. Topical treatment of pressure ulcers with nerve growth factor: a randomized clinical trial. Ann Intern Med 2003 Oct 21; 139 (8): 635-41.
41. Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. N Engl J Med 1998 Apr 23; 338 (17): 1174-80.
42. Riikonen R, Vanhala R. Levels of cerebrospinal fluid nerve-growth factor differ in infantile autism and Rett syndrome. Dev Med Child Neurol 1999 Mar; 41 (3): 148-52.
43. Barbosa IG, Huguet RB, Neves FS, Reis HJ, Bauer ME, Janka Z, et al. Impaired nerve growth factor homeostasis in patients with bipolar disorder. World J Biol Psychiatry 2011 Apr; 12 (3): 228-32. doi: 10.3109/ 15622975.2010.518629.
44. McKelvey L, Shorten GD, O'Keeffe GW. Nerve growth factor-mediated regulation of pain signalling and proposed new intervention strategies in clinical pain management. J Neurochem. 2013 Feb; 124 (3): 276-89. doi: 10.1111/jnc.12093.
45. Emanuele E. NGF and romantic love. Arch Ital Biol 2011 Jun; 149 (2): 265-8. doi: 10.4449/aib.v149i2.1367.
46. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor and the neuroscience chess board. Arch Ital Biol 2003 Mar; 141 (2-3): 85-8.
47. Ling-bing HE, Yan WANG, Ge WANG, Chao CHEN, Shu-gui CAO. Expression and Purification of Active Recombinant Human Nerve Growth Factor from Escherichia coli. Chem Res Chinese U 2007 Mar; 23 (2): 237-40. doi: 10.1016/ S1005-9040(07)60050-6.
48. McArthur JC, Yiannoutsos C, Simpson DM, Adornato BT, Singer EJ, Hollander H, et al. A phase II trial of nerve growth factor for sensory neuropathy associated with HIV infection. AIDS Clinical Trials Group Team 291. Neurology 2000 Mar 14; 54 (5): 1080-8.
49. Thomas DR, Walmsley AM. The effect of the unfolded protein response on the production of recombinant proteins in plants. Plant Cell Rep 2015 Feb; 34 (2): 179-87. doi: 10.1007/s00299-014-1680-x.
50. Barnett J, Baecker P, Routledge-Ward C, Bursztyn-Pettegrew H, Chow J, Nguyen B, et al. Human beta nerve growth factor obtained from a baculovirus expression system has

potent in vitro and in vivo neurotrophic activity. Exp Neurol 1990 Oct; 110 (1): 11-24.
51. Colangelo AM, Finotti N, Ceriani M, Alberghina L, Martegani E, Aloe L, et al. Recombinant human nerve growth factor with a marked activity in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2005 Dec 20; 102 (51): 18658-63.
52. Negro A, Martini I, Bigon E, Cazzola F, Minozzi C, Skaper SD, et al. Synthesis of the biologically active β-subunit of human nerve growth factor in Escherichia coli. Gene 1992 Jan 15; 110 (2): 251-6.
53. Nguyen B, Jarnagin K, Williams S, Chan H, Barnett J. Fed-batch culture of insect cells: a method to increase the yield of recombinant human nerve growth factor (rhNGF) in the baculovirus expression system. J Biotechnol 1993 Nov; 31 (2): 205-17.
54. Xiao B, Li QW, Feng B, Han ZS, Gao DW, Li J, et al. High-level expression of recombinant human nerve growth factor beta in milk of nontransgenic rabbits. J Biosci Bioeng 2008 Apr; 105 (4): 327-34. doi: 10.1263/jbb.105.327.
55. Xiao B, Li Q, Feng B, Han Z, Gao D, Zhao R, et al. Expression of recombinant human nerve growth factor beta in milk of goats by recombinant replication-defective adenovirus. Appl Biochem Biotechnol 2009 Jun; 157 (3): 357-66. doi: 10.1007/s12010-008-8346-5.
56. Fan BS, Lou JY. Recombinant expression of human nerve growth factor beta in rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. Mol Biol Rep 2010 Dec; 37 (8): 4083-90. doi: 10.1007/s11033-010-0068-4.
57. Howard JA, Hood EE. Commercial plant-produced recombinant protein products: Case Studies. 1st ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. Print.
58. Łojewska E, Kowalczyk T, Olejniczak S, Sakowicz T. Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins. Protein Expr Purif 2016 Apr; 120: 110-7. doi: 10.1016/j.pep.2015.12.018.
59. Santos RB, Abranches R, Fischer R, Sack M, Holland T. Putting the spotlight back on plant suspension cultures. Front Plant Sci 2016 Mar 11; 7: 297. doi: 10.3389/fpls.2016.00297.
60. Thomas DR, Walmsley AM. The effect of the unfolded protein response on the production of recombinant proteins in plants. Plant Cell Rep 2015 Feb; 34 (2): 179-87. doi: 10.1007/s00299-014-1680-x.
61. Fischer R, Schillberg S, Hellwig S, Twyman RM, Drossard J. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. Biotechnol Adv 2012 Mar-Apr; 30 (2): 434-9. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.007.
62. Ofoghi H, Yavari F, Nazarain F. Tissue specific expression of human calcitonin gene in potato tubers by an organ specific promoter. Iranian Journal of Biotechnology 2012 Apr; 10 (2): 79-86. [In Persian]
63. Kordbacheh F, Ofoghi H, Akbarzadeh A, Salmanian AH. High level expression and chloroplast targeting of human calcitonin (hCT) in transgenic tobacco plants. Transgenic Plant Journal 2011; 5 (1): 57-61.
64. Xu J, Dolan MC, Medrano G, Cramer CL, Weathers PJ. Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. Biotechnol Adv 2012 Sep-Oct; 30 (5): 1171-84. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.020.
65. Bosch D, Castilho A, Loos A, Schots A, Steinkellner H. N-glycosylation of plant-produced recombinant proteins. Curr Pharm

Des 2013; 19 (31): 5503-12.
66. Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV. Advances in plant molecular farming. Biotechnol Adv 2011 Mar-Apr; 29 (2): 210-22. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010. 11.004.
67. Horn ME, Woodard SL, Howard JA. Plant molecular farming: systems and products. Plant Cell Rep 2004 May; 22 (10): 711-20.
68. Burlakovskiy MS, Yemelyanov VV, Lutova LA. Plant-producers of recombinant cytokines (Review). Prikl Biokhim Mikrobiol 2016 Mar-Apr; 52 (2): 149-67.
69. Yusibov V, Streatfield SJ, Kushnir N. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond. Hum Vaccin 2011 Mar; 7 (3): 313-21.
70. Schillberg S, Emans N, Fischer R. Antibody molecular farming in plants and plant cells. Phytochemistry Reviews 2002 Jan; 1 (1): 45-54. doi: 10.1023/A: 1015880218651
71. Sekhon BS. Biopharmaceuticals: an overview. Thai J Pharm Sci 2010; 34: 1-19.
72. HajianB, PiriK, NazeriS, OfoghiH. Agrobacterium-mediated transfer of β-Glucoronidase gene (gusA) to water mint (Mentha aquatica L.). J Med Plants Res 2011 Mar 4; 5 (5): 842-7.
73. Ofoghi H, Moazami N, Ivanov I. Comparison of tobacco etch eirus and tobacco mosaic virus enhancers for expression of human calcitonin gene in transgenic potato plant. Key Engineering Materials 2005; 277-279: 7-11.
74. Zangi M, Ofoghi H, Ehsani P, Amini-Bayat Z. Effect of codon optimization on expression of human nerve growth factor. In: Archives of Neuroscience: 8th International Association of Neurorestoratology and 12th GCNN Congress 2015 Apr; Tehran, Iran. p. 135-6.
75. Zangi M, Ofoghi H, Ehsani P, Amini-Bayat Z. Production of human nerve growth factor by genetic engineering. In: Archives of Neuroscience: 8th International Association of Neurorestoratology and 12th GCNN Congress 2015 Apr; Tehran, Iran. p. 136-7.