

طراحی کاست ژنی، کلونینگ و بیان پلی پپتید شبه الاستین نو ترکیب به منظور تولید بیومتریال کاربردی در مهندسی بافت

محمد رضا سلیمان^۱ (M.Sc.)، مصطفی خلیلی^۲ (M.Sc.)، علیرضا سلیمان میگونی^۱ (M.Sc.)، هادی محمدزاده قاشقایی^۱ (M.Sc.)، ادیب زنده دل^۴ (Ph.D.)، مریم باعزم^۵ (Ph.D.)

۱- گروه علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خمین، خمین، ایران

۲- مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزش و پژوهش در طب انتقال خون، تهران، ایران

۳- مرکز منطقه‌ای انتقال خون اراک، اراک، ایران

۴- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۵- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

چکیده

سابقه و هدف: پلی پپتید شبه الاستین (Elastin-like polypeptide, ELP) بیومتریال مصنوعی برگرفته از توالی پنتاپپتید Val-Pro-Gly-Xaa-Gly (VPGXG) الاستین ماتریکس خارج سلولی (ECM) است. پلیمرهای پروتئینی که از واحدهای تکراری اسیدهای آمینه طبیعی و غیرطبیعی پدید می‌آیند، به‌عنوان رده‌ای جدید از بیومواد شناخته می‌شوند. ویژگی‌های منحصر به فرد ELP همانند تولید بر پایه بیان ژنتیکی در انواع رده‌های میزبانی (به‌عنوان مثال باکتری‌ها و سلول‌های یوکاریوت)، تحریک پذیری تحت تاثیر عوامل محیطی، زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری مولکول‌های ELP باعث جذابیت استفاده از آن در بیوتکنولوژی و پزشکی می‌گردد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، الیگومر یزاسیون ساختار ژن ۳۳۰ جفت باز مونومری GRGDS-ELP (بیان‌کننده ۲۱ پنتاپپتید) تا تولید ژن تریمر ۹۹۰ جفت بازی (بیان‌کننده ۶۳ پنتاپپتید فیوژن) درون وکتور کلونینگ pUC انجام گرفت. پس از تایید ساختار ژنی با سکوئنسینگ، ساختار ژنی به وکتور بیانی MOD-pET ساب کلون گشته و به میزبان E.coli انتقال یافت.

یافته‌ها: بیان پروتئین نو ترکیب توسط IPTG القاء گشت و صحت پروتئین نو ترکیب توسط PAGE-SDS و سترن بلاتینگ تایید گردید.

نتیجه‌گیری: با روش به کار رفته ELP جهت مطالعات بعدی به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: الاستین، پپتیدها، پروتئین‌های نو ترکیب، نانو ساختارها، مهندسی بافت

مقدمه

دارویی، بیوسنسورها و انتقال‌دهنده‌های پیام، راه خود را در بیوتکنولوژی پیدا کرده‌اند [۱]. بهبود طراحی و تولید داربست‌های حمایت‌کننده رشد سلول و بافت، از عوامل مهم پیشرفت فعلی در مهندسی بافت است، به نحوی که

بیومتریال‌های طبیعی و مصنوعی با قرار گرفتن در سطح مشترک علوم زیستی و کاربردهای گوناگون در حوزه علوم مواد هم‌چون ساخت بیومتریال‌های مهندسی بافت، ناقل‌های

به علت کنترل دقیق در سنتز حاصل از کد شدن بر پایه اطلاعات ژنتیکی و قابلیت کنترل ویژگی‌هایی هم چون ساختار اولیه پلیمر، توالی، طول زنجیره و شیمی فضایی مولکول، از دیدگاه دانش علوم مواد دارای جذابیت می‌باشد. هم چنین، این مواد دارای ویژگی‌های مکانیکی، شیمیایی و بیولوژی مفیدی می‌باشند که باعث جذابیت استفاده از این مواد در شرایط آزمایشگاهی (in vivo) به عنوان بیومتریال در ساختارهای مهندسی بافت می‌گردد [۱۲-۱۴]. قابلیت فیوژن کردن پلی پپتید شبه الاستین با توالی‌ها و بلوک‌های پروتئینی زیست فعال مانند داروها، ساپتوکین و فاکتورهای رشد و موتیف‌های اتصال سلولی سبب گردیده است تا بیومتریال کاربردی برای مهندسی بافت فراهم آید.

GRGDS توالی از اسیدهای آمینه گلیسین - آرژنین - گلیسین - آسپارژین - سرین (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) از موتیف‌های شناخته شده اتصال سلولی است که در اتصال سلول به کلاژن، ویتروکتین، استئوپونکتین، فیبرونکتین و تتناکتین C مؤثر است [۱۵-۱۷]. توالی GRGDS یکی از مؤثرترین موتیف‌های شناخته شده است که برای تحریک اتصال سلول‌ها بر سطح مواد مصنوعی کاربرد دارد، به نحوی که یکی از پرکاربردترین مواد سنتزی برای پوشاندن سطوح، جهت افزایش واکنش‌های بیولوژی است. این توالی قادر است تمایل و اختصاصیت به رسپتور را هنگامی که در میان سایر توالی‌های پروتئین است، حفظ کند [۱۸-۲۰].

در این مطالعه بر آن شدید تا با استفاده از ابزارهای مهندسی ژنتیک، بیوپلیمری فیوژن از پلی پپتید شبه الاستین و توالی اتصال سلولی (GRGDS-ELP)، به صورت زیست فعال برای اهداف مطالعاتی آتی مهندسی بافت تهیه نماییم.

مواد و روش‌ها

مواد. در این مطالعه از آنزیم‌های محدودالتر BglII, SfiI, BamHI, EcoRI (restriction enzyme) و pflMI و آنزیم آلکان فسفاتاز ساخت شرکت Fermentas، آنزیم‌های T4 DNA Ligase و pfu DNA polymerase

بیومتریال‌ها در کنار سلول و سیگنال‌های مولکولی، از بخش‌های اصلی مهندسی بافت شناخته می‌شوند [۲]. بیوپلیمرهای مبتنی بر پروتئین، جایگزینی مطمئن برای ترکیبات شیمیایی سنتز شده می‌باشند که به صورت معمول در پزشکی و بیوتکنولوژی کاربرد دارند [۳]. پلیمرهای پروتئینی که از واحدهای تکراری اسیدهای آمینه طبیعی و غیرطبیعی پدید می‌آیند، به عنوان رده‌ای جدید از بیومواد شناخته می‌شوند [۴، ۵]. پروتئین الاستین انسانی از اجزای پروتئین‌های اصلی ماتریکس خارج سلولی است که عامل مهم ایجاد حالت ارتجاعی و مقاومت در بسیاری از بافت‌های پیوندی مهره‌داران از جمله: دیواره رگ‌های خونی، ریه، لیگامنت، تاندون، پوست و غضروف‌ها می‌باشد [۶]. الاستین توسط آنزیم لایزین اکسیداز یا دیگر اعضاء خانواده آنزیم loxlike از طریق پیوند پروتئین‌های پیش‌ساز خود (تروپوالاستین) ایجاد می‌گردد. طول و ساختار تروپوالاستین بستگی به پیرایش متناوب (splicing alternative) حین سنتز آن دارد، به صورتی که طول پروتئین تروپوالاستین در نهایت به ۷۰ - ۶۰ کیلودالتون می‌رسد که حاوی کم‌تر از ۸۰۰ زیرواحد اسیدآمینه‌ای می‌باشد [۷، ۸].

توالی تروپوالاستین دارای دو دمین غالب است: ۱) توالی هیدروفیلیک که حاوی پیوندهای متقاطع فراوان بین اسیدهای آمینه آلانین و لایزین می‌باشد، ۲) توالی هیدروفوبیک که حاوی اسیدهای آمینه غیرقطبی از جمله والین (V)، پرولین (P)، آلانین (A) و گلیسین (G) است. این ساختار هیدروفوب، به صورت توالی تکرارهای چهارتایی، پنج‌تایی و شش‌تایی VPGG، VPGVG و APGVGV می‌باشد. این دمین هیدروفوب، باعث خاصیت الاستیسیته مولکول الاستین می‌شود [۹، ۶]. پلی پپتید شبه الاستین (ELP: Elastin like protein)، بیوپلیمری مصنوعی، برگرفته از دمین هیدروفوب تروپوالاستین با توالی poly (Val-Pro-Gly-Xaa-Gly) است که زیرواحد Xaa می‌تواند هر نوع اسیدآمینه‌ای به جزء پرولین باشد [۱۰، ۱۱]. پلی پپتید شبه الاستین، گروهی از این نوع بیوپلیمرهای برگرفته از ساختار پروتئین الاستین می‌باشند که

برش با آنزیم‌های REI و REII (EcoRI و BamHI)، دو انتهای چسبان، مکمل با وکتور pUC18 خطی شده با همین آنزیم‌ها را می‌کند. ژن‌های insert و وکتور خطی شده پس از جداسازی و تخلیص از ژل آگارز توسط کیت تخلیص DNA (Roche, Germany)، توسط آنزیم T4 DNA لیگاز در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت به یک‌دیگر ملحق شدند. ساختار وکتور حاصله توسط روش شوک حرارتی به سلول میزبان مستعد شده با روش شیمیایی CaCl₂ منتقل گردید. باکتری‌های ترانسفورم شده با بررسی کلونی‌های سفید و آبی به روی پلیت حاوی X-gal و مقاومت به آمپی‌سیلین شناسایی شدند. تایید نهایی باکتری‌های ترانسفورم شده، توسط PCR colony بر اساس جدول ۲ انجام گرفت با این تفاوت که از آنزیم Taq پلیمرز استفاده شد و زمان بسط (extention) 45 ثانیه در نظر گرفته شد. صحت نهایی توالی حاصل از PCR colony توسط sequencing تایید گردید.

الیگومریزه کردن ژن **ELP**. پس از انجام اولین مرحله، ساختار وکتور pUC18 ابتدایی حاوی ELP[(V₇-I₃)₂-GRGDS]₁ برای به هم پیوستن ژن‌های ELP مونومری تا رسیدن به طول مورد نظر ایجاد گردید. در طی هر مرحله از Recursive directional ligation (RDL) وکتور حاصله از دور قبل به عنوان ماده اولیه در طی مراحل بعدی RDL استفاده گردید. به عنوان مثال، ساختار ژنی ELP[(V₇-I₃)₂-GRGDS]₂ با متصل شدن قطعه insert حاوی ژن بیان‌کننده ۲۰ پنتاپپتید ELP درون وکتور حاوی قطعه مشابه با روش زیر ایجاد گردید. وکتور pUC18 حاوی یک کپی از ژن مونومری ELP[(V₇-I₃)₂-GRGDS]₁ توسط آنزیم pfIMI به صورت خطی در آمده و با آنزیم آلکان فسفاتاز دفسفریله گردید. در نهایت وکتور خطی شده، از ژل آگارز توسط کیت استخراج شد. برای ایجاد ژن insert مکمل وکتور خطی شده، PCR با کمک پرایمرهای جدول ۱ و آنزیم pfu DNA پلیمرز و وکتور pUC18- ELP[(V₇-I₃)₂-GRGDS]₁ ایجاد شده در مرحله قبل به عنوان الگو با انجام مراحل ذکر شده در جدول ۲ با زمان Extention (بسط) ۱ دقیقه‌ای، انجام گرفت. محصول

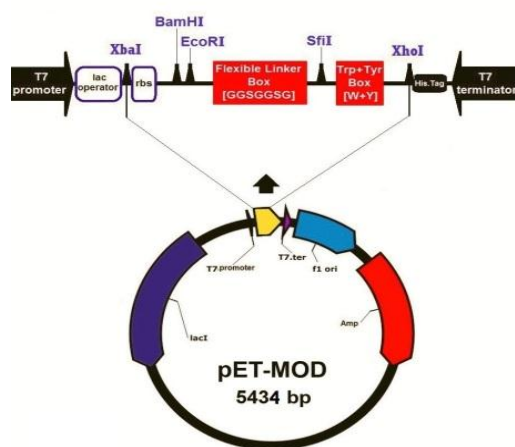
ساخت شرکت Vivantis و از سویه 21BL E. coli (DE3) جهت بیان پروتئین نو ترکیب استفاده شده است.

طراحی و سنتز ژن مونومری **ELP**. ژن مونومری سنتتیک بیان‌کننده پلی‌پپتید شبه الاستین به همراه توالی اتصال سلولی GRGDS با فرمول کلی ELP[(I₁-V_v)₂-GRGDS]_n طراحی شد. به صورتی که حروف V (والین) و I (ایزولوسین) درون پراتز، کد تک حرفی اسید آمینه جای‌گذاری شده در جایگاه چهارم یا همان اسید آمینه مهمان (X_{aa}) پنتامر ELP و حروف v و i مشخص‌کننده تعداد تکرارهای پنتامر (VPGX_{aa}G) نسبت به زیرواحدهای (I&V) جای‌گرفته در ژن مونومر ELP می‌باشد. طول کلی پروتئین بیانی منطبق با Open reading frame (ORF) reading frame ژن GRGDS+ELP که مشخص‌کننده کل تکرارهای پنتاپپتید است، با حرف n مشخص گردیده است. ژن سنتتیک مونومری استفاده شده در این مطالعه با فرمول ELP[(V₇-I₃)₂-GRGDS]₁ و ORF بیانی منطبق با طول ۲۰ تکرار از پنتاپپتید ELP در کنار ۱ واحد GRGDS با طول برابر ۳۶۱ جفت باز، حاوی نسبت ۷/۳ از اسید آمینه‌های والین به ایزولوسین در جایگاه‌های X_{aa} مولکول ELP طراحی شد. در دو انتهای ۵' و ۳' ژن، چهار ناحیه شناسایی آنزیم محدودالتر جای‌گذاری شده است. محل شناسایی آنزیم‌های REI و REII (EcoRI و BamHI) برای الحاق ژن سنتتیک درون وکتور pUC18 و دو محل شناسایی آنزیم‌های REIII و REIV (BglII و pflIMI) درون دو جایگاه REI و REII برای الیگومریزه کردن ژن ELP در انتهای ژن جای‌گذاری شده است. ژن طراحی شده توسط شرکت بیوماتیک (Canada-Biomatik) سنتز گردید.

کلونینگ ژن مونومری **ELP** در وکتور کلونینگ pUC18. تکثیر ژن سنتزی با کمک آنزیم pfu پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۰/۲ میکرومولار از هر یک از پرایمرهای جدول ۱، ۲۰۰ میکرومولار از هر یک از دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP)، ۳ میکرولیتر از محلول پلاسمیدی تخلیص شده، ۱/۵ میلی‌مولار یون منیزیم و بافر، طبق برنامه جدول ۲ انجام گرفت. ژن مونومری پس از

شده توسط سرور expasy.org/protpara مورد بررسی قرار گرفتند.

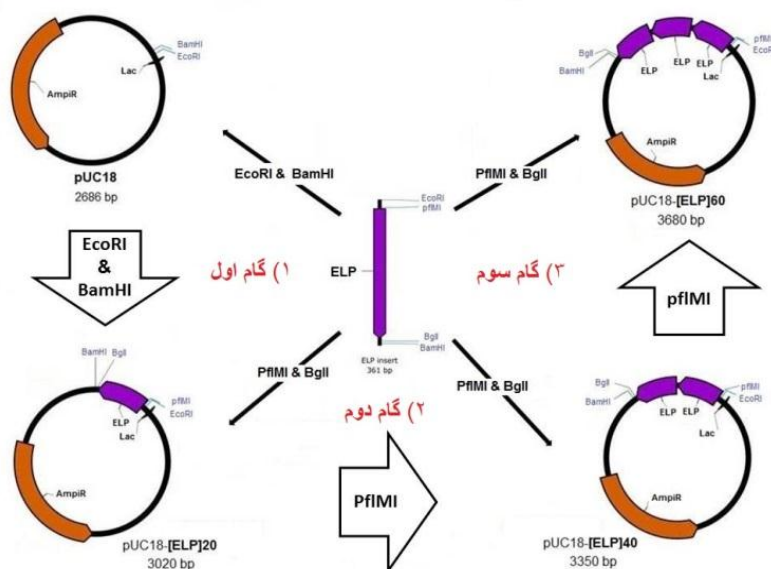
بیان و بررسی پروتئین‌های نوترکیب. میزبان E.coli - B21 (DE3) پس از انتقال وکتور [ELP(V_v^(۱,۲,۳))-pET-MOD I_۱]-GRGDS] جهت بیان پروتئین نوترکیب استفاده گردید. به صورت کلی، کشت میزبان در ارلن حاوی ۱۰۰ ml/μg و Terrific Broth از محیط کشت ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۲۲۰ آمپی‌سیلین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۲۲۰ دور در دقیقه انجام گرفت. بعد از این‌که OD ۶۰۰ به ۰/۶ رسید، القا سنتز پروتئین با اضافه کردن ۱ میلی‌مول Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) انجام گرفت و ادامه انکوباسیون باکتری‌ها در شرایط مذکور جهت سنتز پروتئین‌های نوترکیب ادامه یافت. برای بررسی میزان پروتئین‌های نوترکیب بیان شده، نمونه‌های باکتری به میزان ۱ میلی‌لیتر برداشته شد و پس از سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از محلول رویی جدا و در محلول لودینگ بافر Sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. سپس نمونه‌ها بر روی ژل ۱۳٪ SDS-PAGE بارگیری گردید. پس از اتمام الکتروفورز، بررسی پروتئین‌ها توسط رنگ‌آمیزی منفی ژل توسط ۴ ZnSO_۴ انجام گرفت [۲۱].



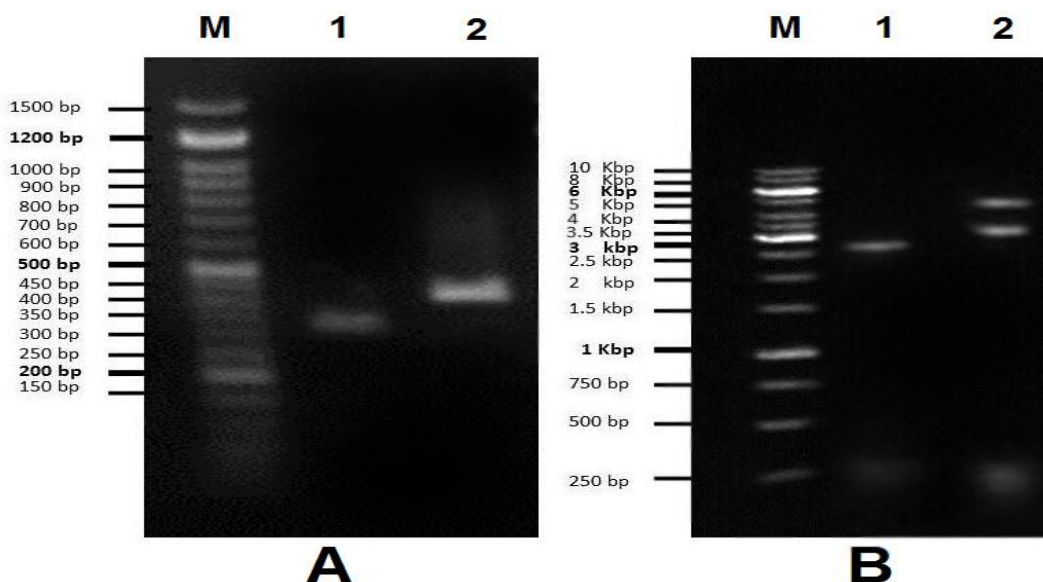
شکل ۱. تصویر شماتیک وکتور pET-MOD

PCR حاصله با آنزیم‌های BglII و pflMI به صورت دو تایی برش خورده و سپس از ژل آگارز استخراج گردید. در نهایت ژن insert ایجاد شده و وکتور خطی به هم متصل گشته و به میزبان E.coli - B21 (DE3) انتقال یافتند. روش توضیح داده شده در بالا برای ساخت ELP[(V_v-I₃)₂-GRGDS]₃-pUC18 نیز تکرار گردید. سلول‌های ترانسفورم شده در نهایت توسط colony PCR و سکوئسینگ محصول PCR، و همچنین با کمک برش آنزیم‌های محدودالثر و بررسی قطعه حاصله مورد تایید قرار گرفتند.

بهینه‌سازی، ساب کلونینگ و بررسی بیوانفورماتیکی ژن‌های ELP الیگومریزه شده در وکتور pET-MOD. از وکتور بیانی pET-MOD تولید شده در مطالعات قبلی، برای بیان ژن ELP الیگومریزه استفاده شد. این وکتور از طریق بهینه‌سازی و جابه‌جایی توالی ما بین دو جایگاه شناسایی آنزیم XbaI و XhoI در وکتور pET32(+), که یک وکتور بیانی پر کاربرد بر پایه T7-promoter است، ایجاد گردید. وکتور بیانی pET-MOD با آنزیم SfiI دایجست شده و پس از دفسفریله شدن، خطی گردید. بعد از انجام الکتروفورز، وکتور خطی از ژل آگارز با کیت تخلیص گردید. پس از الیگومریزه کردن ژن ELP، توالی‌های حاصل تولید شده درون وکتور pUC18 از طریق برش با آنزیم‌های BglII و pflMI برش خورده و قطعات ۳۳۰، ۶۶۰ و ۹۹۰ نوکلئوتیدی، از درون ژل آگارز توسط کیت تخلیص شدند. در سه واکنش مجزا، وکتور خطی شده pET-MOD با آنزیم SfiI و ژن‌های کدکننده ELP، از طریق آنزیم T7-Ligase به یک‌دیگر ملحق و وکتورهای نوترکیب حاصله به میزبان E.coli - BL21 ترانسفورم شدند. سلول‌های ترانسفورم شده در نهایت توسط colony PCR و سکوئسینگ محصول PCR بررسی شد. به منظور بررسی صحت ساختار و ORF ژن‌های فیوژن ELP از نرم‌افزار PC plasmaDNA (version 1.4.2) استفاده گردید. در نهایت مشخصات فیزیکی و شیمیایی توالی‌های نوترکیب پیش‌بینی



شکل ۳. تصویر شماتیک از مراحل الیگومر شدن ژن ELP



شکل ۴. ستون M: مارکر، ستون ۱: قطعه ۳۵۵ bp نوکلئوتیدی حاصل از برش با آنزیم های EcoRI و BamHI، ستون ۲: قطعه ۴۴۱ bp نوکلئوتیدی محصول PCR با آنزیم pfu DNA پلیمرز (A). ستون M: مارکر، ستون ۱: وکتور pUC18 دایجست شده با آنزیم های EcoRI و BamHI، ستون ۲: وکتور pUC18 تخلیص شده با تکنیک miniprep (B).

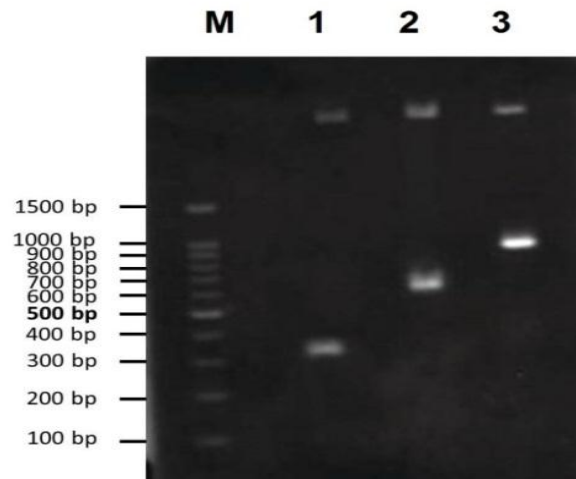
بیان و تایید ژن های ELP کلون شده در وکتور pET-MOD پس از برش قطعات ژنی پدید آمده درون وکتور کلونینگ pUC-۱۸، این قطعات در ناحیه مکمل حاصل از برش با آنزیم SfiI درون وکتور بیانی pET-MOD قرار گرفتند. سه وکتور [PET-ELP[(V₇-I₃)₂-GRGDS]] حاصل، از طریق شوک حرارتی به باکتری های مستعد شده به روش شیمیایی E.coli-B21 انتقال یافته و تولید پروتئین های

نوترکیب از طریق القاء با IPTG صورت گرفت. ۲۴ ساعت پس از القاء بیان پروتئین های نوترکیب، سلول ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه از محیط کشت جدا و دیواره باکتری ها توسط سونیکاتور تخریب شدند. بررسی تولید پروتئین نوترکیب از طریق تکنیک های SDS-PAGE و وسترن بلات انجام گرفت و وجود هر سه پروتئین های فیوزن وکتور (V₇-I₃)_(1,2,3) تایید شد (شکل ۶).

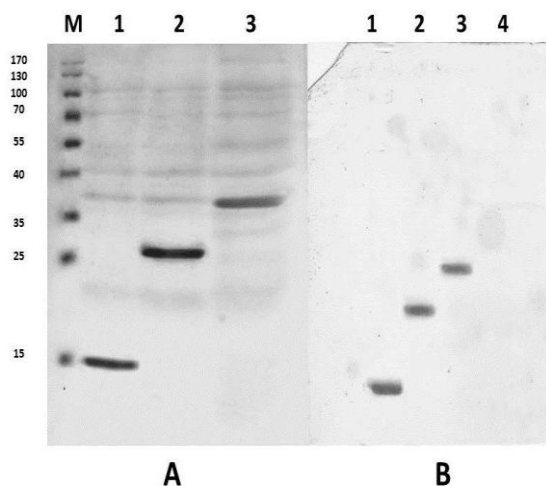
پس از برش قطعات ژنی پدید آمده درون وکتور کلونینگ pUC-۱۸، این قطعات در ناحیه مکمل حاصل از برش با آنزیم SfiI درون وکتور بیانی pET-MOD قرار گرفتند. سه وکتور [PET-ELP[(V₇-I₃)₂-GRGDS]] حاصل، از طریق شوک حرارتی به باکتری های مستعد شده به روش شیمیایی E.coli-B21 انتقال یافته و تولید پروتئین های

طریق رشد و جایگزینی سلول‌های آسیب‌دیده در بستری متناسب با جایگاه بافت و سلول‌های هدف صورت گیرد. داربست‌ها به گونه‌ای طراحی و ساخته می‌شوند که به صورت موقت جایگزین ماتریکس خارج سلولی شده و توانایی القاء تکثیر و اتصال سلول‌ها را داشته باشند. علاوه بر این، از داربست‌ها به عنوان ناقل‌های داروها، فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و آنزیم‌ها عمل می‌کنند [۲۲-۲۵]. در این مطالعه با ترکیب دو زیر واحد زیست فعال و بخش پشتیبانی‌دهنده فیزیکی بیومتریالی متعادل از نظر ساختمان به دست آمد.

ELP مولکولی برگرفته از توالی الاستین است که به علت دارا بودن ویژگی‌های گوناگون به عنوان بخش پشتیبان بیوفیزیکی برای ساختار بیومتریال انتخاب گردید: (۱) ELPs به صورت ژنتیکی کد می‌شود و سنتز آن وابسته به ژن‌هایی است که در میزبان‌های متفاوت (سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی) قابلیت بیان دارند. قابلیت کد شدن بر پایه اطلاعات ژن‌ها باعث می‌گردد تا کنترل کاملی بر توالی اسید آمینه و وزن مولکولی پروتئین بیان شونده آن وجود داشته باشد؛ در صورتی که در بیومتریال‌ها و داربست‌های سنتتیک و طبیعی چنین قابلیت وجود ندارد، (۲) بیان ELP توسط پلاسمید در میزبان کنترل می‌شود و امکان میزان بالای (۵۰۰ mg/l) آن وجود دارد (در مهندسی بافت به مقدار بالایی از پلیمر نیاز می‌باشد)، (۳) تخلیص ELP نوترکیب از سلول‌های میزبان بدون نیاز به تجهیزات کروماتوگرافی و با استفاده از تکنیک‌های ساده و ارزان قابل انجام می‌باشد. ELP تحت تاثیر حرارت، تغییر فاز برگشت‌پذیر وابسته به دما می‌دهد، به این صورت که مولکول‌های ELPs با خاصیت خود تجمع‌ی هیدروفوبیکالی با افزایش دمای بالاتر از دمای تغییر (Transition temperature: Tt)، مایع چسبناکی از مولکول‌ها را به نام coacervate تشکیل می‌دهند. این تغییر فاز برگشت‌پذیر مولکول‌های ELP امکان جداسازی آن را از محلول با استفاده از سانتریفیوژ می‌دهد، (۴) توانائی تغییر در سازه پروتئین ELP به منظور ایجاد ماده ویسکوالاستیک از طریق ایجاد پیوندهای متقاطع وجود دارد، (۵) سازگاری



شکل-۵: ستون M: مارکر، ستون ۱: قطعه ۳۳۰ جفت بازی حاصل از برش وکتور ۱ $pUC18-ELP[(V_7-I_3)_2-GRGDS]$ با آنزیم های $pfiMI$ و $BglI$. ستون ۲: قطعه ۶۶۰ جفت بازی حاصل از برش وکتور ۲ $pUC18-ELP[(V_7-I_3)_2-GRGDS]$ با آنزیم های $pfiMI$ و $BglI$. ستون ۳: قطعه ۹۹۰ جفت بازی حاصل از برش وکتور ۳ $pUC18-ELP[(V_7-I_3)_2-GRGDS]$ با آنزیم های $pfiMI$ و $BglI$



شکل-۶: تایید پروتئین تولید شده با استفاده از تکنیک SDS-PAGE (A) و تکنیک وسترن بلات (B). M: مارکر، ستون ۱: عصاره سلول‌های حاوی پلاسمید ۱ $pET-MOD-ELP[(V_7-I_3)_2-GRGDS]$. ستون ۲: عصاره سلول‌های حاوی پلاسمید ۲ $pET-MOD-ELP[(V_7-I_3)_2-GRGDS]$. ستون ۳: عصاره سلول‌های حاوی پلاسمید ۳ $pET-MOD-ELP[(V_7-I_3)_2-GRGDS]$. ستون ۴: کنترل منفی (سلول فاقد پلاسمید بیانی).

بحث و نتیجه‌گیری

در مهندسی بافت هدف ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده بیمار با استفاده از داربست‌های زیستی مناسب می‌باشد تا از این

(TRAIL) به صورت RGD-TRAIL-ELP استفاده و نشان دادند که ELP علاوه بر افزایش محلولیت پروتئین، تگ مناسبی جهت تخلیص پروتئین از طریق روش غیر کروماتوگرافی است [۴۰].

در این مطالعه، با استفاده از مهندسی ژنتیک، توالی ژن مونومر سنتتیک بیان‌کننده فیوژن ELP و GRGDS به صورت متوالی درون وکتور کلونینگ pUC18 جای گرفت. پس از کلونینگ پشت سر هم توالی‌ها، ژن‌های الیگومریزه شده بیان‌کننده ۲۰، ۴۰ و ۶۰ پنتاپپتید ELP، درون وکتور بیانی pET-MOD سواب کلون گردید. ژن مونومری GRGDS+ELP برای متصل شدن به یک‌دیگر و افزایش طول سازه پلی‌پپتیدی با سه رویکرد طراحی گردید: (۱) هنگام اتصال ژن‌ها جهت‌گیری سر به ته خود را حفظ نمایند، (۲) این اتصال باعث ایجاد هیچ‌گونه زیرواحد اضافی در ناحیه اتصال نشود، (۳) سایت‌های شناسایی اصلی از REI و REII در دو انتهای ژن دایمر شده حفظ گردد ولی هیچ سایت شناسایی آنزیمی در ناحیه داخلی ناحیه اتصال ایجاد نگردد.

پس از القاء سلول‌های E.coli حامل پلاسمید نوترکیب پروتئین‌های فیوژن نوترکیب بیان شدند و با بررسی از طریق ژل SDS-PAGE و وسترن بلات مورد تایید قرار گرفت. بررسی اندازه پروتئین‌های نوترکیب در مقایسه با اندازه مولکولی پیش‌بینی شده توسط ابزارهای بیوانفورماتیکی (جدول ۳) نشان داد که پروتئین‌های فیوژن ELP، حرکتی نسبتاً کندتر از میزان پیش‌بینی شده درون ژل SDS-PAGE نشان می‌دهد. این افزایش غیر متعارف در مشاهده در پروتئین‌های ELP در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است [۴۲، ۴۱، ۴]. نتایج نشان داد که الیگومریزاسیون توالی ELP روشی قدرتمند جهت تولید پلیمر پپتیدی با طول‌های متفاوت است. علاوه بر آن در این مطالعه نشان داده شده است که جایگزینی اسید آمینه‌های تکراری و هیدروفوبیک ایزولوسین و والین در پنتامر ELP به جهت کاهش دمای Tt تأثیری در بیان پروتئین نوترکیب نمی‌گذارد. پروتئین‌های نوترکیب حاصل ابزار مناسبی جهت استفاده به عنوان بیومتریال در تحقیقات آتی می‌باشد.

زیستی، زیست تخریب‌پذیری و ایمونوژن نبودن آن، ELP را برای مهندسی بافت بسیار مناسب نموده است [۲۶، ۲۸-۲۸].

در مطالعات گوناگون اتصال گروه‌های فعال زیستی هم‌چون توالی اتصال سلولی RDEV [۲۹]، (KGF) Keratinocyte growth factor [۳۰]، insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4) [۳۱]، like-peptide1 (GLP-1) [۳۲]، p21Waf1/Cip1-derived inhibitory peptide (p21) cell cycle [۳۳]، لاکتوفورین (L12) [۳۴] و ...، به توالی ELP قابلیت فیوژن شدن و کاربردهای متنوع زیستی این ماده را نشان می‌دهد.

در این مطالعه در کنار توالی‌های تکراری پنتامر ELP در بیومتریال نوترکیب، از توالی پنتامر GRGDS به عنوان بخش زیست فعال در ساختار بیومتریال به کار برده شد. معمولاً این توالی توسط گیرنده‌های اینترگرین‌های بتا ۱ - آلفا ۵ و بتا ۳ - آلفا ۵ شناسایی می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که این توالی حداکثر توسط ۱۲ گیرنده شناسایی می‌گردد [۳۵، ۳۶]. توالی GRGDS با اتصال به اینترگرین‌های سطح سلولی، باعث چهار واکنش آبشاری می‌گردد که عبارتند از: واکنش اتصال سلولی، تحریک پخش شدن سلول‌ها، تشکیل اسکلت اکتینی و تشکیل اتصالات سطحی که برای انتقال سیگنال مرتبط با رفتار سلولی و چرخه سلولی اهمیت دارد [۳۷]. Nicol و همکاران از توالی پلیمری‌های حاصل از اتصال متقاطع کوالانته توالی‌های X20-poly-(GVGVP) با توالی [GRGDS] حاصل شده، جهت اتصال و افزایش رشد اندوتلیال آئورت گاوی و فیبروبلاست نیچ لیگامنتی گاوی استفاده کردند. مطالعه آن‌ها نشان داد که پلیمر ELP بدون توالی شناسایی، توانایی کمی در اتصال سلول‌ها دارد و ELP زیست فعال به منظور مهندسی پیوند بافت رگی ضروری است [۳۸]. Liu و همکاران از پلیمر پگیله شده ELP-RGD به منظور بررسی اتصال، پخش شدن و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بند باف انسانی استفاده کردند [۳۹]. Huang و همکاران از پروتئین نوترکیب فیوژن Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

[17] Hwang DS, Sim SB, Cha HJ. Cell adhesion biomaterial based on mussel adhesive protein fused with RGD peptide. *Biomaterials* 2007; 28: 4039-4046.

[18] Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003; 24: 4385-4415.

[19] Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem* 1987; 262: 17294-17298.

[20] Blindt R, Vogt F, Astafieva I, Fach C, Hristov M, Krott N, et al. A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 1786-1795.

[21] Ferreras M, Gavilanes JG, García-Segura JM. A permanent Zn²⁺ reverse staining method for the detection and quantification of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1993; 213: 206-212.

[22] Abdelaal OA, Darwish SM. Fabrication of tissue engineering scaffolds using rapid prototyping techniques. *WASET* 2011; 59: 577-585.

[23] Silva R, Fabry B, Boccaccini AR. Fibrous protein-based hydrogels for cell encapsulation. *Biomaterials* 2014; 35: 6727-6738.

[24] McDaniel JR, Callahan DJ, Chilkoti A. Drug delivery to solid tumors by elastin-like polypeptides. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62: 1456-1467.

[25] Abdelaal OA, Darwish SM. Fabrication of tissue engineering scaffolds using rapid prototyping techniques. *World Academy of Science, Engineering and Technology, Int J Mechanical, Aerospace, Industrial, Mechatronic and Manufacturing Engineering* 2011; 5: 2317-2325.

[26] Nettles DL, Chilkoti A, Setton LA. Applications of elastin-like polypeptides in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62: 1479-1485.

[27] Simnick AJ, et al. Biomedical and biotechnological applications of elastin-like polypeptides. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* 2007; 47: 121-154.

[28] Altunbas A, Pochan DJ. Peptide-based and polypeptide-based hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Top Curr Chem* 2012; 310: 135-167.

[29] Girotti A, Reguera J, Rodríguez-Cabello JC, Arias FJ, Alonso M, Matestera A. Design and bioproduction of a recombinant multi (bio) functional elastin-like protein polymer containing cell adhesion sequences for tissue engineering purposes. *J Mater Sci Mater Med* 2004; 15: 479-484.

[30] Koria P, Yagi H, Kitagawa Y, Megeed Z, Nahmias Y, Sheridan R, Yarmush ML. Self-assembling elastin-like peptides growth factor chimeric nanoparticles for the treatment of chronic wounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 1034-1039.

[31] Minato A, Ise H, Goto M, Akaike T. Cardiac differentiation of embryonic stem cells by substrate immobilization of insulin-like growth factor binding protein 4 with elastin-like polypeptides. *Biomaterials* 2012; 33: 515-523.

[32] Amiram M, Luginbuhl KM, Li X, Feinglos MN, Chilkoti A. Injectable protease-operated depots of glucagon-like peptide-1 provide extended and tunable glucose control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 2792-2797.

[33] Ryu JS, Raucher D. Anti-tumor efficacy of a therapeutic peptide based on thermo-responsive elastin-like polypeptide in combination with gemcitabine. *Cancer Lett* 2014; 348: 177-184.

[34] Massodi I, Thomas E, Raucher D. Application of thermally responsive elastin-like polypeptide fused to a

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از امکانات مالی و حمایت‌های حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شد. بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی و اعضای محترم آن تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

[1] Chow D, Nunalee ML, Lim DW, Simnick AJ, Chilkoti A. Peptide-based biopolymers in biomedicine and biotechnology. *Mater Sci Eng R Rep* 2008; 62: 125-155.

[2] O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 2011; 14: 88-95.

[3] Bandiera AI, Sist P, Urbani R. Comparison of thermal behavior of two recombinantly expressed human elastin-like polypeptides for cell culture applications. *Biomacromolecules* 2010; 11: 3256-3265.

[4] Meyer DE, Chilkoti A. Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: examples from the elastin-like polypeptide system. *Biomacromolecules* 2002; 3: 357-367.

[5] Chilkoti A, Dreher MR, Meyer DE. Design of thermally responsive, recombinant polypeptide carriers for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 1093-1111.

[6] Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. *Adv Protein Chem* 2005; 70: 437-461.

[7] Kagan HM, Sullivan KA. Lysyl oxidase: preparation and role in elastin biosynthesis. *Methods Enzymol* 1981; 82: 637-650.

[8] Liu JM, Davidson JM. The elastogenic effect of recombinant transforming growth factor-beta on porcine aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 154: 895-901.

[9] Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 261-272.

[10] Floss DM, Schallau K, Rose-John S, Conrad U, Scheller J. Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends Biotechnol* 2010; 28: 37-45.

[11] Meyer DE, Chilkoti A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nature Biotechnol* 1999; 17: 1112-1115.

[12] MacEwan SR, Chilkoti A. Applications of elastin-like polypeptides in drug delivery. *J Control Release* 2014; 190: 314-330.

[13] Saxena R, Nanjan MJ. Elastin-like polypeptides and their applications in anticancer drug delivery systems: a review. *Drug Deliv* 2015; 22: 156-167.

[14] Kyle S, Aggeli A, Ingham E, McPherson MJ. Production of self-assembling biomaterials for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2009; 27: 423-433.

[15] Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1983; 309: 30-33.

[16] Christensen T, Trabbic-Carlson K, Liu W, Chilkoti A. Purification of recombinant proteins from *E. coli* at low expression levels by inverse transition cycling. *Anal Biochem* 2007; 360: 166-168.

- [39] Liu JC, Tirrell DA. Cell response to RGD density in cross-linked artificial extracellular matrix protein films. *Biomacromolecules* 2008; 9: 2984-2988.
- [40] Huang K, Duan N, Zou W, Zhang C, Lai Y, Shen P, Hua Z. Fused hydrophobic elastin-like-peptides (ELP) enhance biological activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Protein Pept Lett* 2015; 22: 1000-1006.
- [41] MacEwan SR, Hassouneh W, Chilkoti A. Non-chromatographic Purification of Recombinant Elastin-like Polypeptides and their Fusions with Peptides and Proteins from *Escherichia coli*. *J Vis Exp* 2014; 88.
- [42] McPherson DT, Xu J, Urry DW. Product purification by reversible phase transition following *escherichia coli* expression of genes encoding up to 251 repeats of the elastomeric pentapeptide GVGVP. *Protein Expr Purif* 1996; 7: 51-57.
- lactoferrin-derived peptide for treatment of pancreatic cancer. *Molecules* 2009; 14: 1999-2015.
- [35] Lin HT, Chiou SH, Kao CL, Shyr YM, Hsu CJ, Tarng YW, et al. Characterization of pancreatic stem cells derived from adult human pancreas ducts by fluorescence activated cell sorting. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4529-4535.
- [36] Takagi J. Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 403-406.
- [37] Chen CS, Alonso JL, Ostuni E, Whitesides GM, Ingber DE. Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307: 355-361.
- [38] Nicol A, Channe Gowda D, Urry DW. Cell adhesion and growth on synthetic elastomeric matrices containing ARG-GLY-ASP-SER-3. *J Biomed Material Res* 1992; 26: 393-413.

Gene cassette design, cloning and expression of recombinant elastin like polypeptide to produce a functional biomaterial in tissue engineering

Mohammad Reza Soleyman (M.Sc)¹, Mostafa Khalili (M.Sc)^{2,3}, Alireza Soleyman Meigoni (M.Sc)¹, Hadi Mohammadzadeh Ghasghaii (M.Sc)¹, Adib Zendedel (Ph.D)⁴, Maryam Baazm (Ph.D)^{*5}

1 - Basic Science Dept., Khomein Branch, Islamic Azad University, Khomein, Iran

2 - Blood Transfusion Research Center, High institute for research and education in transfusion medicine, Tehran, Iran

3 - Arak Regional Blood Transfusion Center, Arak, Iran

4 - Dept. of Anatomy, School of Medicine, Rasht University of Medical Sciences, Rasht, Iran

5 - Dept. of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received: 1 Aug 2015; Accepted: 11 Apr 2015)

Introduction: Elastin-like polypeptide (ELP) is an artificial biopolymer and a pentapeptide with repeating motif of Val-Pro-Gly-Xaa-Gly (VPGXG). The structure is derived from extracellular cellular matrix (ECM) elastin. Protein-based polymers, which are composed of repeat units of natural or unnatural amino acids, have recently emerged as a promising new class of materials. The unique properties of ELPs such as being genetically encoded in a heterologous host (e.g., bacteria or eukaryotic cell), excitability under the influence of environmental factors, biocompatibility and biodegradability made them popular in a wide variety of biomedical applications.

Materials and Methods: In this study, 330bp GRGDS-ELP monomer gene (expressing 21 pentapeptide) was oligomerized into the cloning vector pUC to produce 990bp trimer gene (expressing 63 fusion pentapeptide). After confirming gene structure by sequencing, the gene sequence was subcloned into pET-MOD expression vector and transduced into the E.coli.

Results: Recombinant protein expression was induced by IPTG and the accuracy of the recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting.

Conclusion: With mentioned method, ELP was obtained for further studies.

Keywords: Elastin, Peptides, Recombinant protein, Nanostructures, Tissue Engineering

* Corresponding author. Tel: +98 9166621131

dr.baazm@arakmu.ac.ir