مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۴/هفته چهارم بهمن ماه ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰

کلونینگ و بیان پروتئین کوتاه شده‌ی گیرنده‌ی عامل رشد اپیدرمی– ۱ در میزبان مخمر Pichia Pastoris

دکتر جواد زواررضا[۱]، نادر خالقی[۲]، علی حاتمی[۳]، معصومه حیدری[۴]، دکتر رضا منصوری مجومرد[۵]، دکتر محمدحسین شیخها[۶]، دکتر مجید مجرد[۷]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گیرنده‌ی عامل رشد اپیدرمی (EGFR یا Epidermal growth factor receptor) در پاتوفیزیولوژی طیف وسیعی از تومورهای جامد نظیر گلیوبلاستوما و سرطان پستان نقش اساسی بازی می‌کند. بنا بر این، مسدود کردن آبشار پیام رسانی این گیرنده توسط آنتی‌بادی، هدف مناسبی برای درمان این سرطان‌ها می‌باشد. اولین قدم در مسیر ساخت آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید پروتئین نوترکیب با خلوص بالا و الگوی گلیکوزیلاسیون مشابه پروتئین انسانی است. مخمر Pichia pastoris، یکی از بهترین میزبان‌های در دسترس برای این منظور می‌باشد.

روش‌ها: توالی کد کننده‌ی دومین خارج سلولی و بین غشایی پروتئین EGFR از رده‌ی گلیومای انسانی (A172) با استفاده از تکنیک RT-PCR (Real-time polymerase chain reaction) جداسازی گردید. این توالی، به داخل پلاسمید pPicZ alpha A کلون و به داخل سلول مخمر Pichia pastoris منتقل شد. سپس، این پروتئین با تیمار سلول با استفاده از متانول (غلظت نهایی ۰/۵ درصد) و به مدت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴، ۱۶۸ و ۱۹۲ ساعت القا شد. در نهایت، بیان آن به روش الکتروفورز Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) بررسی گردید.

یافته‌ها: با هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب واجد توالی کد کننده، قسمتی از EGFR ساخته شد. میزان پروتئین بیان شده با افزایش طول مدت القا، افزایش یافت. با این حال، پس از گذشت ۳ روز از شروع القا، پروتئین‌های ترشحی میزبان نیز در محیط کشت افزایش یافتند و بر روی ژل SDS-PAGE مشاهده شدند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، پروتئین EGFR تولید گردید که می‌تواند فرایند تولید آنتی‌بادی منوکلونال مهار کننده‌ی EGFR را به میزان چشمگیری تسریع نماید.

واژگان کلیدی: گیرنده‌ی عامل رشد اپیدرمی، رده‌ی گلیومای انسانی A172، پروتئین نوترکیب، پلاسمید pPicZ alpha A، مخمر Pichia pastoris

ارجاع: زواررضا جواد، خالقی نادر، حاتمی علی، حیدری معصومه، منصوری مجومرد رضا، شیخها محمدحسین، مجرد مجید. **کلونینگ و بیان پروتئین کوتاه شده‌ی گیرنده‌ی عامل رشد اپیدرمی– ۱ در میزبان مخمر Pichia Pastoris**. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۴): ۲۲۳۸-۲۲۳۲

مقدمه

گیرنده‌های تیروزین کینازی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیرنده‌های سطح سلولی می‌باشند که بسیاری از جنبه‌های تکثیر، تمایز، بقا و متابولیسم سلولی را تنظیم می‌کنند. در این میان، خانواده‌ی ErbB یکی از مهم‌ترین خانواده‌های گیرنده‌های عامل رشد هستند که شامل چهار عضو (ErbB1-4) می‌باشند (۱).

اعضای این خانواده، در مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی که در رشد و تمایز بافت‌های مختلف و همچنین در بیماری‌های مختلف شرکت دارند، نقش ایفا می‌نمایند (۲).

کاهش فعالیت مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی اعضای این خانواده، منجر به بیماری‌های تحلیل برنده‌ی سیستم عصبی نظیر بیماری Multiple sclerosis (MS) و بیماری Alzheimer می‌شود

۱- دانشیار، مرکز تحقیقات زیست‌فن‌آوری، پردیس بین‌الملل یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرودشت، مرودشت، ایران
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
۵- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
۶- استاد، مرکز تحقیقات زیست‌فن‌آوری، پردیس بین‌الملل یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
۷- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید مجرد
Email: mojaradm@mums.ac.ir

(۳، ۱). در مقابل، افزایش فعالیت این گیرنده‌ها و مسیرهای فرودست آن ها در طیف وسیعی از تومورهای جامد نظیر گلیوبلاستوما و سرطان پستان مشاهده می‌شود (۴).

گیرنده‌ی عامل رشد اپیدرمی (EGFR یا Epidermal growth factor receptor) اولین عضو کشف شده از این گروه است که در پاتوفیزیولوژی سرطان گلیوبلاستوما نقش اساس بازی می‌کند (۵). این پروتئین، یک گلیکو پروتئین غشاگذر می‌باشد که با اتصال به لیگاندهای مختلفی نظیر Epidermal growth factor (EGF) و Transforming growth factor alpha (TGF-α) فعال می‌شود (۷-۶). اتصال EGFR به لیگاند، منجر به اتوفسفریله شدن گیرنده‌ی کینازی و به دنبال آن، فعال شدن مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی متعددی می‌شود که در انتها، منجر به نتایج مختلفی شامل تکثیر سلولی، تمایز و بقای سلولی می‌گردد (۸).

در سلول‌های سالم و طبیعی، بیان EGFR در حدود ۴۰۰۰۰-۱۰۰۰۰۰ گیرنده در هر سلول می‌باشد؛ در حالی که این میزان درسطح سلول های تومورهای جامد، به حدود ۲×۱۰^{۶} گیرنده می رسد. افزایش بیان گیرنده، باعث تولید سیگنال قوی تر و فعالیت مسیرهای سیگنالهای فرودست می شود و در نتیجه، سلول ها به سمت متاستاز و تهاجم پیش می روند (۹). به علاوه، فعال شدن EGFR، نقش مهمی در مقاومت به شیمی‌درمانی و درمان با پرتودرمانی در سلول‌های سرطانی دارد (۱۱-۱۰).

با توجه به این مطالب، به نظر می‌رسد مسدود کردن آبشار پیام‌رسانی این گیرنده، هدف مناسبی برای درمان سرطان‌های پیش‌گفته باشد. به منظور دست‌یابی به این هدف، راهبردهای مختلفی به کار گرفته شده است. ملکول های کوچک مهار کننده، از اولین ابزاری بود که برای این منظور به کار گرفته شد. این ملکول‌ها، با مهار کردن گیرنده‌ی تیروزین کینازی باعث مسدود شدن مسیر پیام رسانی داخل سلولی می‌شود (۱۲)، اما ایراد بزرگ این ملکول ها، این است که به ساختارهای مشابه با گیرنده‌ی مورد نظر هم متصل می‌شو. از این رو، محققان آنتی‌بادی‌های منوکلونال را به عنوان راهکار مناسب در نظر گرفتند. آنتی‌بادی‌ها، با کارایی و میل ترکیبی بسیار بالایی نسبت به ملکول های مهاری کوچک عمل می‌کنند و با اتصال اختصاصی به گیرنده‌ی مورد نظر، باعث مهار مسیر پیام‌رسانی داخل سلولی می‌شوند (۱۳).

اولین قدم در مسیر ساخت آنتی‌بادی‌های منوکلونال، تولید پروتئین نوترکیب با خلوص بالا و الگوی گلیکوزیلاسیون مشابه پروتئین انسانی است. یکی از بهترین میزبان های در دسترس برای این منظور، مخمر Pichia pastoris است که علاوه بر توانایی تولید پروتئین نوترکیب به میزان بالا و به صورت ترشحی، الگوی گلیکوزیلاسیون نزدیک به انسان دارد (۱۴). از سوی دیگر، در مقایسه با سلول‌های پستانداران یا انسان، هزینه‌ی تولید پروتئین در این میزبان بسیار به صرفه است. با توجه به مطالب پیش گفته، اولین گام برای ساخت این گونه آنتی‌بادی‌ها، ساخت قطعه‌ی خارج سلولی و بین غشایی پروتئین EGFR در میزبان مخمر Pichia pastoris به صورت نوترکیب می‌باشد.

روش‌ها

کشت سلول: سلول رده‌ی گلیومای انسانی (A172) (تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران)، به عنوان منبع جداسازی توالی کد کننده‌ی ژن EGFR مورد استفاده قرار گرفت.

برای کشت این سلول از محیط کشت Roswell Park memorial institute1640 (RPMI1640) (سیگما، آلمان) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS یا Fetal bovine serum) (سیگما، آلمان) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (سیگما، آلمان) با غلظت ۱۰۰ µg/ml استفاده شد. این محیط، در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شد.

تکثیر توالی کد کننده ی EGFR: پس از رسیدن سلول ها به تراکم مناسب، با استفاده از کیت استخراج RNA (GeneAll، کره جنوبی)، تمام سلول‌ها استخراج شد و با استفاده از کیت سنتز complementary DNA (cDNA) (شرکت پارس طوس، ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، RNA به cDNA تبدیل شد.

توالی کد کننده ی دومین خارج سلولی و بین غشایی پروتئین EGFR، با استفاده از واکنش Polymerase chain reaction (PCR) تکثیر شد. پرایمر ppicEGFRf با توالی GGGGTACCCGAGCTCTTCGGGGAGCAGCG و پرایمر ppicEGFRr با توالی GGGGTACCCTCAAGAGAGCTTGGTTGG به منظور تکثیر و کلونینگ Epidermal growth factor receptor (EGFR) مورد استفاده قرار گرفت. به منظور انجام واکنش PCR، مقدار ۲ میکرولیتر از cDNA به مخلوط واکنش PCR شامل 1X بافر واکنش، ۰/۴ میکرومولار از هر یک از پرایمرها، ۵۰ میکرومولار از هر dNTP (Deoxynucleotide triphosphate) و ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم اضافه شد. در نهایت، به هر واکنش ۲ واحد آنزیم Pfu افزوده شد؛ به طوری که حجم نهایی واکنش ۵۰ میکرولیتر بود.

واکنش در ۴۰ چرخه‌ی دمایی شامل ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه و ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. به منظور دناتوراسیون اولیه و تکمیل رشته های ناتمام در انتهای واکنش، به ترتیب ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه و ۵ دقیقه در ۷۲ درجه به ابتدا و انتهای واکنش افزوده شد.

هضم آنزیمی: پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR دارای یک ناحیه ی اثر آنزیم محدودالاثر KpnI در انتهای '۵ خود بودند. از این آنزیم، برای هضم قطعه ی محصول PCR و همچنین پلاسمید pPicZαA استفاده شد. واکنش هضم بر اساس دستور شرکت سازنده انجام شد و محصولات هضم پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد، از روی ژل بریده و با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل (ساخت شرکت Bioneer، کره ی جنوبی) استخراج شدند.

تهیه ی باکتری نوترکیب حاوی پلاسمید pPicZ-EGFR: قطعه ی پلاسمید و محصول PCR هضم شده به نسبت وزنی ۳:۱ با یکدیگر مخلوط شدند و واکنش لیگاسیون انجام شد. ترکیب واکنش لیگاسیون شامل 1X بافر لیگاسیون، ۵ واحد آنزیم T4 DNA ligase و در مجموع ۰/۵ میکروگرم DNA بود. حجم نهایی واکنش، ۲۰ میکرولیتر بود و به مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه شد.

پس از اتمام زمان انکوباسیون، مقدار ۲ میکرولیتر از محصول واکنش با استفاده از روش شوک حرارتی به داخل باکتری TOP10F منتقل شدند. باکتری‌های حاصل، روی پلیت Luria broth agar (LB agar) حاوی ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک زئوسین کشت داده شد.

کلونی های حاصل، در محیط LB مایع حاوی همین غلظت از زئوسین، به مدت یک شب کشت و سپس، با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (ساخت شرکت Bioneer، کره ی جنوبی)، پلاسمید نوترکیب از این باکتری‌ها استخراج شد.

به منظور بررسی ورود قطعه ی نوترکیب در جهت درست به داخل پلاسمید، پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری‌ها با استفاده از آنزیم BamHI مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند.

انتقال پلاسمید به میزبان مخمر Pichia pastoris و القای بیان پروتئین: پلاسمیدهای به دست آمده از مرحله ی قبل، با استفاده از آنزیم PacI خطی شدند و به روش Electroporation به داخل مخمر Electroporate شدند. شرایط واکنش Electroporation شامل ولتاژ ۲ کیلوولت، مقاومت ۲۵ اهم و توان ۲۰۰ میکروفاراد بود.

محصولات Electroporation به مدت ۵ روز روی محیط کشت Yeast peptone dextrose adenine (YPDA) حاوی ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک زئوسین کشت داده شد. پس از تشکیل کلونی‌های سفید مخمر، این کلونی‌ها به محیط کشت Buffered glycerol-complex (BMGY) منتقل و در بازه‌های زمانی متعدد و دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، القای بیان پروتئین انجام شد.

به طور خلاصه، یک تک کلون از مخمر نوترکیب در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت BMGY به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی گراد با استفاده از انکوباتور شیکردار در چرخش ۲۵۰ دور در دقیقه کشت داده شد.

پس از رسیدن جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۴، با استفاده از سانتریفیوژ توده ی سلولی، مخمر جدا و در ۲۰۰ سی‌سی محیط کشت Buffered methanol-complex (BMMY) کشت داده شد. این حجم، در ۸ ظرف ۲۰۰ سی سی به میزان مساوی تقسیم شد و در شرایط قبل کشت ادامه یافت.

برای القای پروتئین در مقاطع ۲۴ ساعته، معادل ۰/۵ درصد حجم محیط به محیط متانول خالص اضافه شد. پس از گذشت هر ۲۴ ساعت، یکی از ظروف برداشته شد و با سانتریفیوژ با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه Supernatant و توده‌ی سلولی از یکدیگر جدا و در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شد.

بررسی بیان پروتئین EGFR نوترکیب با استفاده از روش Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE): مقدار ۵۰ میکرولیتر از Supernatant با حجم مساوی از بافر نمونه (2X sample buffer) 2X (حاوی ۰/۵ مولار Tris با pH = ۶/۸، ۱۰ درصد Sodium dodecyl sulfate، ۵ درصد β-mercaptoethanol و ۰/۰۲۵ رنگ Bromophenol blue) مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد.

سپس، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و تا زمان استفاده روی یخ، انکوبه شدند.

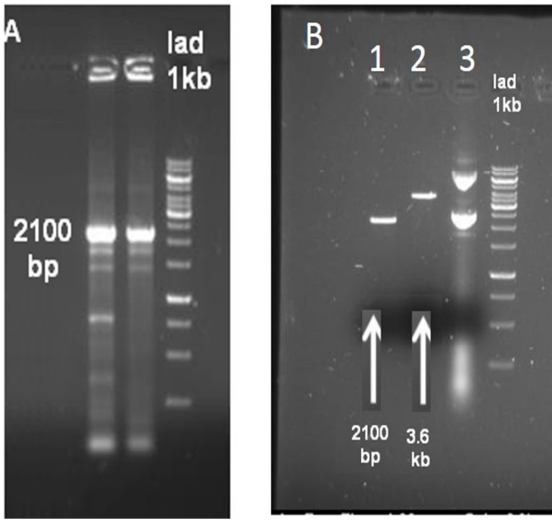
برای الکتروفورز، از ژل متراکم کننده با غلظت ۵ درصد و ژل تفکیک کننده با غلظت ۸ درصد استفاده شد. نمونه‌ها در اختلاف پتانسیل ۲۰۰ ولت به مدت ۳ ساعت الکتروفورز شدند و سپس با استفاده از رنگ Kumasi blue (بر اساس دستورالعمل استاندارد) رنگ‌آمیزی شدند.

یافته‌ها

ساخت سازه‌ی نوترکیب *pPicZ-EGFR*

با استفاده از واکنش Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) توالی کد کننده ی دومین خارج سلولی و بین غشایی پروتئین EGFR تکثیر گردید. این واکنش منجر به تولید قطعه‌ای به طول ۲۱۴۰ جفت باز شد (شکل ۱- الف).

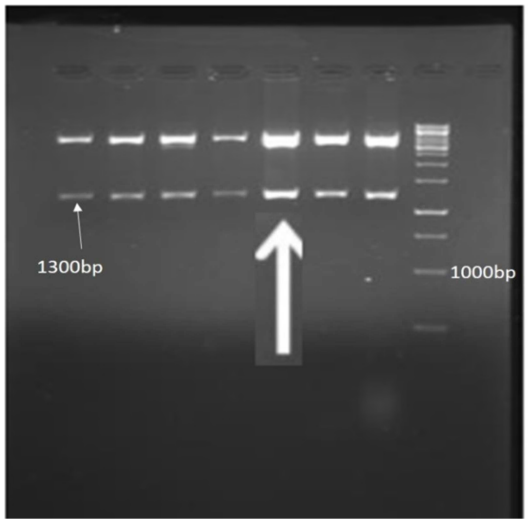
محصول PCR و پلاسمید pPicZalphaA با استفاده از آنزیم KpnI، هضم و پس از الکتروفورز، از روی ژل استخراج گردید (شکل ۱- ب). قطعه ی EGFR به داخل پلاسمید pPicZalphaA وارد و پس از انتقال باکتری TOP10F توسط این پلاسمید و استخراج پلاسمید از کلون های به دست آمده، وجود قطعه‌ی نوترکیب و جهت ورود آن، با هضم آنزیمی توسط آنزیم BamHI بررسی شد (شکل ۲).



شکل ۱. تکثیر قطعه‌ی Epidermal growth factor receptor (EGFR) با استفاده از تکنیک Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

الف- این واکنش یک باند به طور ۲۱۰۰ جفت باز تولید کرد. محصولات در حضور خط‌کش ملکولی یک کیلو بازی روی ژل الکتروفورز شد. ب- محصولات هضم EGFR و پلاسمید pPicZ alpha A از روی ژل بریده و استخراج شدند. در این شکل، الکتروفورز محصولات استخراج از ژل در حضور خط‌کش ملکولی ۱ کیلو بازی نشان داده می‌شود. لاین ۱، باند حاصل از EGFR به طول ۲۱۰۰ جفت باز، لاین ۲، باند حاصل از پلاسمید هضم شده به طول ۳۶۰۰ جفت باز و لاین ۳، پلاسمید pPicZ alpha A هضم نشده را نشان می‌دهد.

تولید قطعه‌ی ۱۱۰۰ جفت بازی در واکنش هضم آنزیمی، نشان دهنده‌ی ورود قطعه‌ی محصول PCR در جهت نامناسب و وجود قطعه‌ای ۱۳۰۰ جفت بازی، نشان دهنده‌ی ورود قطعه در جهت مناسب به داخل پلاسمید بود. کلون‌ها واجد قطعه‌ی نوترکیب در جهت مناسب بودند و برای مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۲).

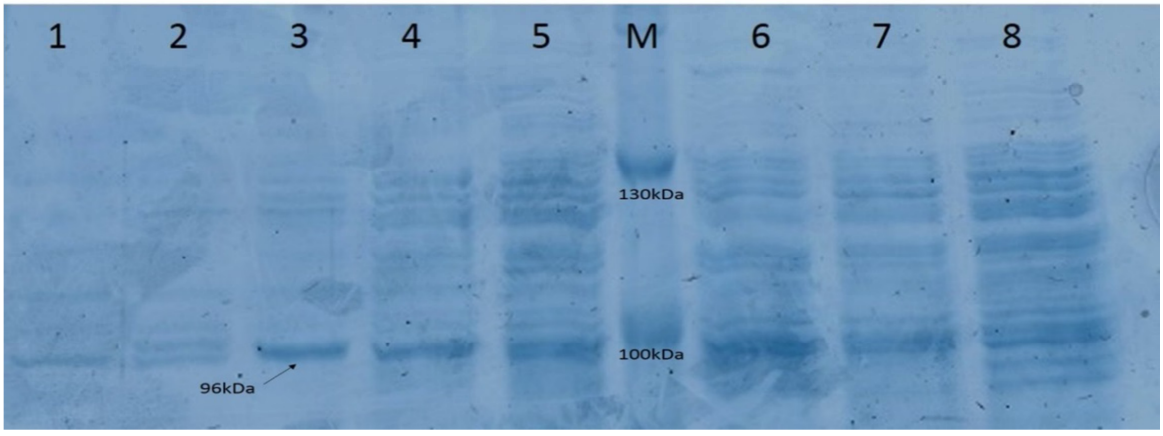


شکل ۲. بررسی جهت ورود قطعات نوترکیب به داخل پلاسمید pPicZ alpha A با استفاده از آنزیم BamHI

ایجاد باند ۱۳۰۰ جفت بازی نشان دهنده‌ی ورود قطعه در جهت درست به داخل پلاسمید است.

بیان پروتئین نوترکیب

پس از انتقال پلاسمید به داخل میزبان Pichia pastoris، بیان پروتئین القا و نتایج بر روی ژل SDS-PAGE مشاهده شد. همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود، میزان پروتئین بیان شده، با افزایش طول مدت القا، افزایش یافته است. با این حال، پس از گذشت ۳ روز از شروع القا، پروتئین‌های ترشحی میزبان نیز در محیط کشت افزایش یافتند و بر روی ژل SDS-PAGE مشاهده شدند.



شکل ۳. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات القای بیان پروتئین نوترکیب بر روی ژل (SDS-PAGE) Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis

در این الکتروفورز، از خط‌کش ملکولی پروتئین SM0671 (ساخت شرکت فرمانتاس) استفاده شد. نمونه‌های ۸-۱ معادل مدت زمان القا از روز اول تا هشتم بود. پروتئین نوترکیب حاصل با طول ۹۶ کیلودالتون، با فلش نشان داده شده است.

بحث

گیرنده‌ی عامل رشد اپیدرمی شماره‌ی ۱، از دسته گیرنده‌های غیر تیروزین کینازی می‌باشد که با اتصال به لیگاند خود، یک همودایمر با یک ملکول گیرنده‌ی فعال شده‌ی دیگر را تشکیل می‌دهد و مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی فرودست را فعال می‌کند. فعالیت این مسیرها در نهایت، منجر به تکثیر سلول، جلوگیری از آپوپتوز، القای رگ زایی، مهاجرت و تهاجم سلولی می‌شود (۱۵).

جهش‌های مختل کننده‌ی عملکرد این گیرنده اغلب از نوع از دست رفتن عملکرد است. جهش هایی که منجر به عدم اتصال لیگاند به گیرنده و یا عدم فعال سازی گیرنده به دنبال اتصال لیگاند می شوند، همگی از نوع جهش‌های منفی غالب هستند و تشکیل کمپلکس‌های فعال این گیرنده را تا ۲۵ درصد کاهش می‌دهند.

به همین دلیل، انتقال ژن کد کننده‌ی گیرنده‌ی معیوب به داخل سلول، به عنوان یکی از راهبردهای مؤثر مهار این گیرنده در تحقیقات بر روی مسیرهای زیستی فعالیت این گیرنده و همچنین، تحقیقات بالینی درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است (۱۸-۱۶).

گیرنده ی موتانت تولید شده در این مطالعه چه به صورت پلاسمید و چه به صورت پروتئین خالص شده، قابلیت استفاده در این مطالعات را دارد.

از سوی دیگر، یکی از ابزارهای جذاب در مطالعات بیولوژی سرطان، استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال بر علیه گیرنده‌ی رشد می‌باشد که با اتصال به محل اتصال لیگاند از اتصال لیگاند به گیرنده و فعال شدن آن جلوگیری می‌کند (۱۳). با وجود مزایای مهم آنتی‌بادی‌های منوکلونال، تولید این ملکول‌ها بسیار سخت و زمان‌بر است. یکی از مشکلات تولید آنتی‌بادی، وجود اپی‌توپ‌های متعدد در ساختار پروتئین است؛ چرا که در هنگام ایمونیزاسیون حیوان آزمایشگاهی، بر علیه تمام این اپی‌توپ ها آنتی‌بادی ساخته می‌شود و جداسازی آنتی‌بادی اختصاصی و مؤثر بر علیه جایگاه عملکردی، پروتئین را با مشکل مواجه می‌کند. علاوه بر این، از آن جا که با توجه به اندازه‌ی بزرگ ملکول‌های آنتی‌بادی، این ملکول‌ها توانایی عبور از غشای سلول را ندارند، آنتی‌بادی‌ها باید بر علیه دومین‌های خارج سلولی تولید شوند.

پروتئین تولید شده در این مطالعه، می تواند فرایند تولید آنتی بادی مهار کننده‌ی EGFR را به میزان چشمگیری تسریع نماید.

سیستم میزبان مورد استفاده در این مطالعه، مخمر تک سلولی Pichia pastoris بود که در مقایسه با میزبان‌های پروکاریوتی و همچنین یوکاریوتی تک سلولی دیگر، این میزبان یک سیستم بیان پروتئین ارزان، پربازده و کم دردسر است که دارای سیستم گلیکوزیلاسیون بسیار مشابه انسان می‌باشد (۲۰-۱۹). به همین دلیل، اپی‌توپ‌های پروتئین تولید شده در این میزبان، به میزان چشمگیری با اپی توپ‌های انسانی مشابه است و آنتی‌بادی‌های تولید شده بر علیه این پروتئین‌های نوترکیب دارای کارایی و اختصاصیت بسیار بالایی خواهند بود.

همچنین، این میزبان به طور اساسی فاقد اندوتوکسین و پروتئین‌های ایمنی‌زا و حساسیت‌زا می‌باشد و پروتئین تولید شده در این میزبان، پس از تخلیص و تغلیظ قابل تزریق به موجود زنده و یا مدل سلولی بدون عوارض ناخواسته خواهد بود.

بیان پروتئین نوترکیب در مقاطع زمانی مختلف، نشان دهنده‌ی افزایش مداوم غلظت پروتئین نوترکیب ترشح شده بود. با این حال، بعد از روز چهارم، غلظت پروتئین های ترشحی میزبان نیز به حدی رسید که بر روی ژل SDS-PAGE قابل مشاهده بود که این نکته، می تواند در فرایند تخلیص پروتئین نوترکیب، مشکل ایجاد کند. به همین دلیل، زمان بهینه‌ی بیان پروتئین نوترکیب ۷۲ ساعت پس از القا در نظر گرفته شد.

در این مطالعه، پروتئین اولیه ی مورد نیاز برای تحقیقات مهار سیستم پیام‌رسانی EGFR به منظور درمان سرطان‌های ناشی از پرکاری این مسیر تولید شد. علاوه بر این، در مطالعات بعدی می‌توان از این ماده برای تولید آنتی‌بادی‌ها و نانوبادی‌های منوکلونال بر علیه پروتئین EGFR استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

هزینه‌ی اجرای این مطالعه، به طور مشترک توسط دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد (به ترتیب طرح‌های پژوهشی شماره ۹۱۰۵۶۱ و ۲۵۵۲) تأمین گردید.

References

1. Bublil EM, Yarden Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. Curr Opin Cell Biol 2007; 19(2): 124-34.
2. Cohen RB. Current challenges and clinical investigations of epidermal growth factor receptor (EGFR)- and ErbB family-targeted agents in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Cancer Treat Rev 2014; 40(4): 567-77.
3. Shishodia S, Sethi G, Aggarwal BB. Curcumin: getting back to the roots. Ann N Y Acad Sci 2005; 1056: 206-17.
4. Cho HS, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. Science 2002; 297(5585): 1330-3.
5. Liffers K, Lamszus K, Schulte A. EGFR Amplification and Glioblastoma Stem-Like Cells. Stem Cells Int 2015; 2015: 427518.
6. Chen W, Zhong X, Wei Y, Liu Y, Yi Q, Zhang G, et

al. TGF-beta Regulates Survivin to Affect Cell Cycle and the Expression of EGFR and MMP9 in Glioblastoma. Mol Neurobiol 2015.
7. Becher OJ, Peterson KM, Khatua S, Santi MR, MacDonald TJ. IGFBP2 is overexpressed by pediatric malignant astrocytomas and induces the repair enzyme DNA-PK. J Child Neurol 2008; 23(10): 1205-13.
8. Inda MM, Bonavia R, Mukasa A, Narita Y, Sah DW, Vandenberg S, et al. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. Genes Dev 2010; 24(16): 1731-45.
9. Velpula KK, Dasari VR, Asuthkar S, Gorantla B, Tsung AJ. EGFR and c-Met Cross Talk in Glioblastoma and Its Regulation by Human Cord Blood Stem Cells. Transl Oncol 2012; 5(5): 379-92.
10. Zahonero C, Sanchez-Gomez P. EGFR-dependent mechanisms in glioblastoma: towards a better therapeutic strategy. Cell Mol Life Sci 2014; 71(18): 3465-88.
11. Schulte A, Liffers K, Kathagen A, Riethdorf S, Zapf S, Merlo A, et al. Erlotinib resistance in EGFR-amplified glioblastoma cells is associated with upregulation of EGFRvIII and PI3Kp110delta. Neuro Oncol 2013; 15(10): 1289-301.
12. Carrasco-Garcia E, Saceda M, Grasso S, Rocamora-Reverte L, Conde M, Gomez-Martinez A, et al. Small tyrosine kinase inhibitors interrupt EGFR signaling by interacting with erbB3 and erbB4 in glioblastoma cell lines. Exp Cell Res 2011; 317(10): 1476-89.
13. Wang Y, Pan L, Sheng XF, Chen S, Dai JZ. Nimotuzumab, a humanized monoclonal antibody specific for the EGFR, in combination with temozolomide and radiation therapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme: First results in Chinese patients. Asia Pac J Clin Oncol 2014.
14. Gong B, Cukan M, Fisher R, Li H, Stadheim TA, Gerngross T. Characterization of N-linked glycosylation on recombinant glycoproteins produced in Pichia pastoris using ESI-MS and MALDI-TOF. Methods Mol Biol 2009; 534: 213-23.
15. Sangar V, Funk CC, Kusebauch U, Campbell DS, Moritz RL, Price ND. Quantitative proteomic analysis reveals effects of epidermal growth factor receptor (EGFR) on invasion-promoting proteins secreted by glioblastoma cells. Mol Cell Proteomics 2014; 13(10): 2618-31.
16. Sarkaria JN, Yang L, Grogan PT, Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, et al. Identification of molecular characteristics correlated with glioblastoma sensitivity to EGFR kinase inhibition through use of an intracranial xenograft test panel. Mol Cancer Ther 2007; 6(3): 1167-74.
17. Kapoor GS, Christie A, O'Rourke DM. EGFR inhibition in glioblastoma cells induces G2/M arrest and is independent of p53. Cancer Biol Ther 2007; 6(4): 571-9.
18. Wu CJ, Chen Z, Ullrich A, Greene MI, O'Rourke DM. Inhibition of EGFR-mediated phosphoinositide-3-OH kinase (PI3-K) signaling and glioblastoma phenotype by signal-regulatory proteins (SIRPs). Oncogene 2000; 19(35): 3999-4010.
19. Chung D, Young J, Bomble YJ, Vander Wall TA, Groom J, Himmel ME, et al. Homologous expression of the Caldicellulosiruptor bescii CelA reveals that the extracellular protein is glycosylated. PLoS One 2015; 10(3): e0119508.
20. Miele RG, Nilsen SL, Brito T, Bretthauer RK, Castellino FJ. Glycosylation properties of the Pichia pastoris-expressed recombinant kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator. Biotechnol Appl Biochem 1997; 25 (Pt 2): 151-7.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 33, No. 364, 4th Week, February 2016

Received: 09.11.2015

Accepted: 20.01.2016

Cloning and Expression of Truncated Protein of Epidermal Growth Factor-1 (EGFR-1) in Pichia Pastoris Yeast Host

Javad Zavar-Reza PhD[1], Nader Khaleghi[2], Ali Hatami MSc[3], Masumeh Heidari[4], Reza Mansuri-Majumerd PhD[5], Mohammad Hasan Sheikhha PhD[6], Majid Mojarrad PhD[7]

Original Article

Abstract

Background: Epidermal growth factor receptor (EGFR) plays a major role in the pathophysiology of a wide variety of solid tumors such as glioblastoma and breast cancer. Therefore, blocking of signaling cascade of this receptor via specific antibodies is an appropriate therapeutic target against these cancers. The first step to make monoclonal antibodies is production of recombinant protein with high purity and glycosylation pattern similar to human protein. One of the best available hosts for this purpose is the Pichia pastoris yeast.

Methods: Coding sequence of extracellular and transmembrane domain of EGFR protein was isolated from human glioma cell line (A172) using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. This sequence was cloned into plasmid pPicZαA and transferred into Pichia pastoris yeast cells. Then, the production of recombinant protein was induced via treating of cells with methanol with final concentration of 0.5%, in several time periods, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 and 192 hours. Protein production was assessed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Findings: Partial coding sequence of EGFR was cloned in pICZαA plasmid. The results of induction of protein expression on SDS-PAGE gel showed that the protein expression increased as incubation time increased. However, after three days of induction, the secreted host proteins in the culture medium increased and got visible on SDS-PAGE gel.

Conclusion: In this study, we produced EGFR protein that can dramatically speed up production process of EGFR inhibiting monoclonal antibodies.

Keywords: Epidermal growth factor receptor (EGFR), Human glioma cell line (A172), Recombinant protein, Plasmid pPicZalphaA, Yeast, Pichia pastoris

Citation: Zavar-Reza J, Khaleghi N, Hatami A, Heidari M, Mansuri-Majumerd R, Shekhha MH, et al. **Cloning and Expression of Truncated Protein of Epidermal Growth Factor-1 (EGFR-1) in Pichia Pastoris Yeast Host.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(364): 2232-8

1- Associate Professor, Biotechnology Research Center, Yazd International Campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
2- MSc Student, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3- PhD Candidate, Department of Genetics, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran
4- MSc Student, Department of Medical Genetics, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
5- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
6- Professor, Biotechnology Research Center, Yazd International Campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
7- Assistant Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Corresponding Author: Majid Mojarrad PhD, Email: mojaradm@mums.ac.ir