

بیان و تخلص ناحیه‌ی کینازی پروتئین نو ترکیب گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاستی نوع 2b و بررسی تغییرات ساختاری آن بر اثر برهم‌کنش آن با گالیک اسید

فائزه سید عطاران^۱، دکتر داریوش ایلغاری^۱، دکتر نعمت‌اله غیبی^۳، دکتر مهدی سهمانی^۴، دکتر حسین پیری^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاستی 2b (FGFR2b یا Fibroblast growth factor receptor 2b) در مسیر پیام‌رسانی سلولی و تنظیم فرایندهای مهم زیستی نظیر تمایز و تکثیر سلولی نقش اساسی دارد. تغییرات ژنتیک نظیر جهش نقطه‌ای در ناحیه‌ی تیروزین کینازی FGFR2b با سرطان پستان، تخمدان و پروستات در ارتباط است. این مطالعه، به منظور بیان و خالص‌سازی مقدار مناسبی از ناحیه‌ی کینازی FGFR2b انسانی و بررسی تغییرات ساختاری آن با گالیک اسید انجام شد.

روش‌ها: بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) ۱ میلی‌مولار در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد القا و با استفاده از الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریلامید در حضور سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) یا SDS-PAGE ارزیابی شد. پروتئین بیان شده با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص شد و فعال بودن نمونه‌ی پروتئین بعد از دیالیز بررسی شد. طیف فلورسانس و دنا تورا سیون شیمیایی پروتئین خالص شده، در حضور غلظت‌های مختلف گالیک اسید سنجیده شد.

یافته‌ها: بررسی SDS-PAGE قبل و بعد از القا شدن نشان داد که پروتئین بیان شده در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد محلول است. همچنین، تأیید کرد که پروتئین خالص شده است. بررسی طیف‌سنجی فلورسانس، افزایش شدت نشر را با افزایش تدریجی غلظت گالیک اسید نشان داد. دنا تورا سیون شیمیایی ساختار سوم زیر واحدهای ناحیه‌ی کینازی را در حضور گالیک اسید تغییر داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، ناحیه‌ی کینازی گیرنده‌ی نو ترکیب عامل رشد فیبروبلاستی 2b که یک پروتئین ۳۸ کیلو دالتونی است، تولید و خالص گردید. تغییرات ساختار سوم دومین کینازی، موجب ناپایدار شدن آن در حضور گالیک اسید گردید. این ناپایداری در سطح مولکولی، می‌تواند موجب اختلال در مسیر پیام‌رسانی سلول شود.

واژگان کلیدی: گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاست نوع ۲، گالیک اسید، اسپکترومتری فلورسانس

ارجاع: سید عطاران فائزه، ایلغاری داریوش، غیبی نعمت‌الله، سهمانی مهدی، پیری حسین. بیان و تخلص ناحیه‌ی کینازی پروتئین نو ترکیب گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاستی نوع 2b و بررسی تغییرات ساختاری آن بر اثر برهم‌کنش آن با گالیک اسید. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛

۳۳ (۳۶۲): ۲۱۵۱-۲۱۴۳

مقدمه

گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاستی (FGFR یا Fibroblast growth factor receptor) در مسیر پیام‌رسانی سلول، نقش کلیدی در تنظیم فرایندهای زیستی از جمله تکثیر سلولی، بقا، مهاجرت و تمایز سلولی ایفا می‌کنند (۱). متابولیسم سلولی، ترمیم بافتی، رگ‌زایی و توسعه‌ی مراحل جنینی، از جمله وظایفی هستند که

در دوران جنینی و بزرگ‌سالی در بدن توسط این گیرنده‌ها با اتصال به عوامل رشد فیبروبلاستی (FGF یا Fibroblast growth factor) انجام می‌شوند (۲). عوامل رشد فیبروبلاستی در پستانداران شامل خانواده‌ای از ۱۸ عضو هستند که از طریق چهار گیرنده‌ی تیروزین کینازی (FGFR1 تا FGFR4) ایجاد پیام می‌کنند (۳). مشخص شده است که انتقال پیام کنترل نشده‌ی عوامل رشد

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران

۲- استادیار، گروه بیوشیمی و ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۳- دانشیار، گروه زیست‌فن‌آوری پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۴- دانشیار، گروه بیوشیمی و ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین پیری

Email: hosseinpiry@gmail.com

تغییرات ژنتیک در این گیرنده با سرطان‌های اندومتریال، تخمدان و پستان در ارتباط است (۱۴). قابل ذکر است که نوع جهش یافته‌ی گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاستی در تعدادی از سرطان‌ها گزارش شده است که با افزایش پیام مرتبط با این گیرنده، ارتباط دارد (۱۵). با توجه به بررسی انجام شده در متون علمی، گزارشی به دست نیامد که در آن، با استفاده از روش مطالعه‌ی حاضر، این پروتئین نوترکیب بیان شده باشد.

قابل ذکر است که تهیه‌ی ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین FGFR2b، به صورت خالص این امکان را فراهم کرد که در مطالعات بتوان اطلاعاتی راجع به ساختار و نیز بررسی برهم‌کنش پروتئین و لیگاند از جمله اثر مهار کننده‌های مختلف را روی ناحیه‌ی کینازی این پروتئین به دست آورد. بنا بر این، مطالعه‌ی حاضر با هدف بیان خالص‌سازی و بررسی اثر برهم‌کنش با فلاونوئیدها از جمله گالیک اسید مقدار مناسبی از ناحیه‌ی کینازی FGFR2b انسانی انجام شد.

روش‌ها

در این تحقیق، ایمیدازول، Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) و Ni^{2+} -NTA و (Dimethyl sulfoxide) DMSO و گالیک اسید از شرکت Sigma، آمپی‌سیلین و HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid] از شرکت Merck و باکتری Escherichia coli BL21 (DE3) از شرکت Invitrogen تهیه شدند. بقیه‌ی مواد شیمیایی مورد استفاده از نوع خالص بودند و از شرکت‌های Sigma و Merck تهیه شدند. از باکتری Escherichia coli BL21 (DE3) حاوی پلاسمید pLEICS-01 جهت میزبان بیانی استفاده شد. باکتری در محیط‌های کشت Luria-Bertani broth و LB آگار (Luria broth agar) در حضور ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد.

پلاسمید pLEICS-01 که حاوی ژن ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b بود، توسط محقق با استفاده از cDNA (complementary DNA) ژن FGFR2b سالم تهیه شد؛ که با توجه به جهش‌های مشاهده شده در ژن FGFR2b سلول‌های سرطانی، موتاسیون نقطه‌ای در آن انجام شده بود. در این پروتئین نوترکیب، با انتقال الگوی موتاسیون مشاهده شده در گیرنده‌ی بیان شده در سلول سرطانی به نوع طبیعی پروتئین، شکل فعال و نوترکیب ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین FGFR2b ایجاد شد که دارای جهش حذفی، جهش افزایش عملکرد، جهش از دست دادن عملکرد و Amplification بوده است (۱۶).

پلاسمید pLEICS-01 که حاوی ژن ناحیه‌ی تیروزین کینازی

فیبروبلاستی، می‌تواند به بدخیمی در انسان منجر شود (۴). گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاستی به خانواده‌ای از گیرنده‌های تیروزین کینازی متعلق هستند که همه‌ی آن‌ها یک بخش داخل غشایی، یک ناحیه‌ی خارج سلولی متصل شونده به لیگاند و یک ناحیه‌ی داخل سلولی با خاصیت تیروزین کینازی دارند (۵-۶).

اتصال عامل رشد فیبروبلاستی به گیرنده‌ی خود، باعث جفت شدن گیرنده و به دنبال آن فسفریلاسیون اسید آمینه‌ی تیروزین موجود در ناحیه‌ی کینازی می‌شود که به دنبال آن، قسمت انتهایی کربوکسیل گیرنده فسفریله می‌شود و در نتیجه، گیرنده فعال می‌گردد. این گیرنده‌ها دو سوبسترای اصلی داخل سلولی به اسامی FRS1 و FRS2 (Fibroblast growth factor receptor substrate) دارند. با فسفریله شدن اسید آمینه‌ی تیروزین در ناحیه‌ی انتهایی کربوکسیل گیرنده، مکانی برای برهم‌کنش با ناحیه‌ی SH2 (Src homology 2) از سوبسترای اول فراهم می‌شود که آنزیم فسفولیپاز C نوع گاما (PLC γ یا Phospholipase C) است و بدین ترتیب، فسفریله و فعال می‌گردد که به دنبال آن، مسیر فسفوانیزوتید ۳ کیناز Akt و فعال می‌شود یا این که این گیرنده‌ها از طریق فسفریله کردن سوبسترای دوم خود مسیر Mitogen-activated protein kinases (MAPK) را فعال می‌کنند و بدین ترتیب، در انتقال پیام سلولی مشارکت می‌نمایند (۳).

اشکال موتاسیون یافته‌ی گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاستی در سرطان‌های متعددی از جمله سرطان پستان، معده، پروستات، کولون، رحم و Multiple myeloma شناخته شده است (۷-۹).

اختلال در انتقال پیام این گیرنده‌ها، با چندین اختلال آسیب‌شناسی انسانی مرتبط است، از جمله سندرم‌های اسکلتی مانند سندرم Pfeiffer که به دلیل جهش در ناحیه‌ی کینازی پروتئین FGFR2 ایجاد می‌شود (۱۰).

مشخص شده است که اختلال تنظیمی مسیر پیام‌رسانی گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاستی (که می‌تواند ناشی از تغییرات ژنتیک باشد)، با ایجاد سرطان ارتباط تنگاتنگی دارد و این امر، این گروه از کینازها را به عنوان یک هدف درمانی جالب توجه در درمان سرطان مطرح می‌کند (۱۱-۱۲).

در سال‌های اخیر، چندین مهار کننده‌ی گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاستی ارایه شده است که نشان دهنده‌ی سطح بالای توجه محققان به این گیرنده‌ها با رویکرد ضد سرطانی آن‌ها است (۷). پروتئین FGFR2b تمایل بالایی به اتصال با لیگاندهای FGF10، FGF7، FGF3، FGF1 و FGF2 دارد. ژن FGFR2b روی بازوی بلند کروموزوم شماره‌ی ۱۰ انسان (10q26) قرار گرفته است و ۲۱ اگزون دارد (۱۳).

جدا شد. غلظت پروتئین مورد نظر که شامل ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b بود، توسط دستگاه NanoDrop با استفاده از ضریب خاموشی $1\text{cm}^{-1} \times 0.0116$ در طول موج ۲۸۰ نانومتر به دست آمد که بر اساس توالی اسید آمینه محاسبه شده بود.

پروتئین بیان شده با قطعه‌ی پپتیدی دارای ناحیه‌ی SH2 و نیز قطعه‌ی پپتیدی دارای ناحیه‌ی SH2 که در آن دو اسید آمینه‌ی آرژینین به آلانین تبدیل شده بود و فاقد توانایی اتصال به ناحیه‌ی کینازی پروتئین مورد نظر بود (جهت شاهد منفی)، مجاور گردید و با بررسی الگوی حاصل از PAGE، نتایج ارزیابی شد (۱۷). داده‌ها با استفاده از آزمون‌های One-way ANOVA و Tukey در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ بررسی شد.

تعیین غلظت پروتئین: با استفاده از دستگاه NanoDrop غلظت پروتئین اندازه‌گیری شد. در این محاسبه، وزن مولکولی پروتئین به میزان ۳۸ کیلوالتون اعمال شد.

مطالعات اسپکتروسکوپی فلوروسنس: برای بررسی ساختار سوم پروتئین تخلیص شده در شرایط متفاوت، از روش فلوروسنس ذاتی استفاده شد. اندازه‌گیری شدت فلوروسنس ذاتی، با دستگاه اسپکتروفلوریمتر واریان کری اکلپس (Varian Cray. Eclipse) مدل Bio 700، حاوی کووت کوارتز (Quartz cuvettes) با طول مسیر ۱۰ میلی‌متر صورت گرفت. طول موج تحریک پروتئین، ۲۸۰ نانومتر و طول موج نشی ۳۵۰-۳۰۰ نانومتر بود. به منظور از بین بردن اثر پس‌زمینه‌ی بافر حاوی پروتئین روی شدت فلوروسنس، سیستم با استفاده از یک محلول بلانک (Blank solution) صفر شد. پروتئین با غلظت ۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. غلظت پروتئین در همه‌ی محلول‌های مورد آزمایش ثابت نگه داشته شد. به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ی پروتئینی داخل کووت ۴۰۰ میکرولیتری ریخته شد و با بافر، به حجم نهایی رسید.

به منظور بررسی اثر گالیک اسید روی شدت فلوروسنس پروتئین، چندین محلول حاوی غلظت‌های ثابت از پروتئین در حضور غلظت‌های متفاوت از محدوده‌ی ۵۰۰-۲۵ میکرومولار از گالیک اسید، به طور جداگانه تهیه شد و اثر هر کدام در شرایط طبیعی بررسی گردید. همچنین، با اضافه کردن میزان مناسبی از بافر به هر نمونه، حجم نهایی محلول به میزان ۴۰۰ میکرولیتر نگه داشته شد. سپس طیف نشی بعد از گذشت زمان Incubation به مدت ۲۰ دقیقه گرفته شد. آزمایش‌های اولیه در جهت تعیین حداقل و حداکثر غلظتی از گالیک اسید که روی طیف نشی فلوروسنس اثر می‌گذاشت، صورت گرفت. طیف نشی حاصل از پروتئین در حضور و عدم حضور گالیک اسید با هم مقایسه شد. هر آزمایش دو بار برای هر طیف نشی تکرار شد.

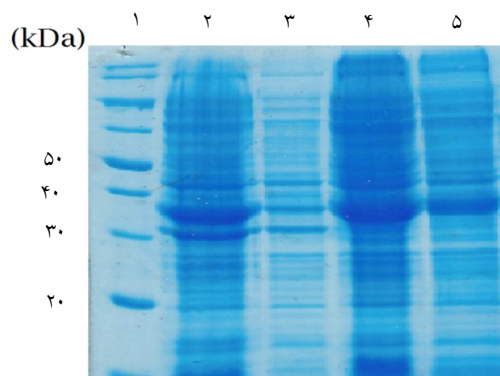
پروتئین نوترکیب FGFR2b بود، به باکتری مستعد Escherichia coli BL21 جهت بیان ژن مورد نظر انتقال داده شد. باکتری‌های تراریخته‌ی حاوی ژن مورد نظر، در محیط مناسب کشت داده شدند و بیان ژن مورد نظر توسط IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار القا گردید. نمونه‌برداری قبل از القا، ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد از القا انجام و با استفاده از روش SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) بیان پروتئین مورد نظر ارزیابی شد.

جهت ارزیابی حلالیت پروتئین بیان شده، ابتدا محیط کشت دارای باکتری‌های تراریخته‌ی حاوی ژن مورد نظر، سانتریفیوژ شدند. این باکتری‌ها تحت تأثیر القا توسط IPTG به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفته بودند. جهت ارزیابی حلالیت پروتئین بیان شده پس از القا در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه محیط‌های کشت در سانتریفیوژ با شتاب ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند و رسوب سلولی حاصل با اضافه نمودن ۱۰ میلی‌لیتر بافر لیز سلولی احیا گردید و سپس سلول‌ها به مدت ۲ دقیقه با استفاده از Sonicator که روی شرایط ۲۰ ثانیه روشن و ۲۰ ثانیه خاموش و بالاترین ولتاژ تنظیم شده بود، Sonicate و لیز شدند.

به منظور آنالیز SDS-PAGE از لایزت سلولی حاصل به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به عنوان لایزت کل سلولی، جمع‌آوری شد و همچنین، به مدت ۲۰ دقیقه باقیمانده‌ی لایزت، در سانتریفیوژ با شتاب ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. آن گاه، مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ و رسوب حاصل که در حضور بافر لیز کننده توسط Sonicator لیز شده بود، به روش SDS-PAGE ارزیابی گردید. بافر لیز کننده، حاوی ۲۵ میلی‌مولار Tris-HCl (Tris hydrochloride) و ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید با pH برابر ۸ بود. جهت افزایش حلالیت پروتئین بیان شده، از کشت ۲۴ ساعته در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده شد.

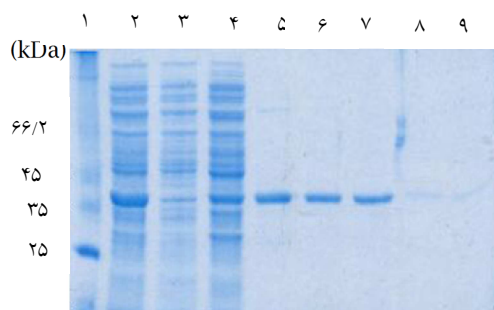
به منظور خالص‌سازی پروتئین بیان شده، رسوب حاوی باکتری‌های تراریخته‌ی دارای ژن مورد نظر، در بافر لیز کننده به مدت یک ساعت با شتاب ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بافر لیز کننده، حاوی ۲۵ میلی‌مولار HEPES، ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید و گلیسرول (۱۰ درصد) با pH برابر ۸ بود. محلول شفاف به دست آمده، روی ستون حاوی Ni²⁺-NTA قرار داده شد و پروتئین‌ها با یک شیب غلظتی از ایمیدازول شسته شدند. میزان خلوص پروتئین مورد نظر خارج شده از ستون، توسط روش SDS-PAGE ارزیابی شد.

بعد از مخلوط نمودن نمونه‌های به دست آمده که حاوی پروتئین مورد نظر خالص شده بودند، ایمیدازول با استفاده از دیالیز از محیط



شکل ۲. مقایسه‌ی حلالیت ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b (Fibroblast growth factor receptor 2b) در دو دمای ۲۰ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد. ستون ۱: نشانگر پروتئینی با دامنه‌ی وسیع (Bio Basic Inc, Cat No: BSM0661). ستون‌های ۲ و ۳: به ترتیب نمونه‌ی لیز شده با کتری و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ستون‌های ۴ و ۵: به ترتیب نمونه‌ی لیز شده با کتری و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد

الگوی الکتروفورز، خالص‌سازی ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی Ni²⁺-NTA را نشان می‌دهد (شکل ۳).



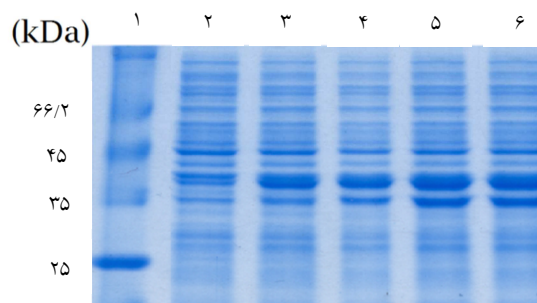
شکل ۳. خالص‌سازی ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b (Fibroblast growth factor receptor 2b) با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی Ni²⁺-NTA. ستون ۱: نشانگر پروتئینی با دامنه‌ی وسیع (Bio Basic Inc, Cat No: BSM0661). ستون ۲: نمونه‌ی اولیه قبل از خالص‌سازی، ستون ۳: نمونه‌ی بعد از شستشوی اولیه‌ی ستون کروماتوگرافی و ستون‌های ۴-۹: نمونه‌ها بعد از شستشوی ستون کروماتوگرافی با ایمیدازول با شیب غلظت ۲۰-۵۰ میلی‌مولار

جهت خارج نمودن ایمیدازول از محلول حاوی پروتئین، بعد از تخلیص، پروتئین مورد نظر دیالیز شد و جهت اطمینان از وجود پروتئین و کمیت آن بعد از دیالیز SDS-PAGE انجام شد (شکل ۴).

مطالعات دناتوراسیون شیمیایی با استفاده از اسپکتروسکوپی فلوروسنس: به منظور ارزیابی پایداری Conformation پروتئین تخلیص شده، غلظت‌های متفاوت از گوانیدین هیدروکلراید بین ۰-۶ مولار تهیه شد. طول موج تحریکی روی ۲۸۰ نانومتر تنظیم شد. در حضور حداکثر غلظت مؤثر مشاهده شده در طیف نشری فلوروسنس، یعنی ۵۰۰ میکرومولار از گالیک اسید، دناتوراسیون شیمیایی انجام گرفت. چندین محلول حاوی پروتئین با غلظت ثابت به میزان ۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر حاوی ۲۵ میلی‌مولار Tris-Hcl (Tris-hydrochloride) و ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl با pH برابر ۷/۵ تهیه شد. غلظت نهایی گوانیدین هیدروکلراید در هر محلول به میزان ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵ و ۶ مولار بود. طیف نشری در حضور ۵۰ میکرومولار از گالیک اسید به طور جداگانه ثبت شد. در نهایت، طول موج بیشینه‌ی هر نشر برای رسم نمودار در غلظت‌های متفاوت دناتوره کننده استفاده گردید. هر آزمایش دو بار تکرار شد.

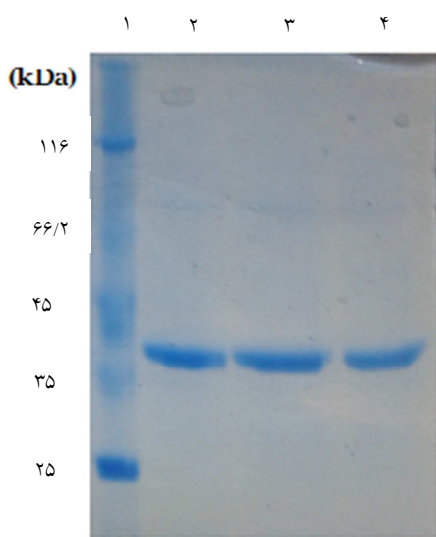
یافته‌ها

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



شکل ۱. بیان ژن ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b (Fibroblast growth factor receptor 2b) در باکتری Escherichia coli BL21. ستون ۱: نشانگر پروتئینی با دامنه‌ی وسیع (Bio Basic Inc, Cat No: BSM0661). ستون ۲: نمونه‌ی لیز شده‌ی باکتری دارای حامل نوترکیب قبل از القا با IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) با غلظت ۱ میلی‌مولار و ستون‌های ۳-۶: نمونه بعد از القا با IPTG به ترتیب در فاصله‌ی زمانی ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد

مقایسه‌ی نمونه‌های حاصل از لیز سلول و مایع رویی نشان داد که پروتئین بیان شده، نامحلول بود و در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد پروتئین مورد نظر در حالت محلول به دست آمد (شکل ۲).



شکل ۵. نتایج SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-)

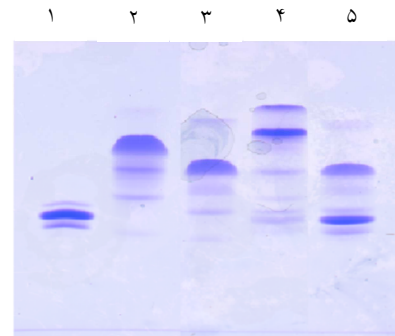
(polyacrylamide gel electrophoresis) بعد از دیالیز.

ستون ۱، نشانگر پروتئینی با دامنه‌ی وسیع

(Bio Basic Inc, Cat No: BSM0661) و ستون ۲ به

بعد نشان دهنده‌ی نمونه‌ی دیالیز شده می‌باشد.

با استفاده از روش فلوروسنس ذاتی، وضعیت ساختار سوم ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در حضور گالیک اسید بررسی شد. نتایج، افزایش شدت نشر فلوروسنس را در حضور گالیک اسید و با افزایش تدریجی غلظت آن‌ها نشان داد. با تیتراسیون گالیک اسید، تغییرات کمی در شیف‌ت حداکثر طول موج نشری فلوروسنس به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر مشاهده گردید (شکل ۶).



شکل ۴. بررسی عملکرد ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b (Fibroblast growth factor receptor 2b) خالص

شده. ستون ۱: ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b.

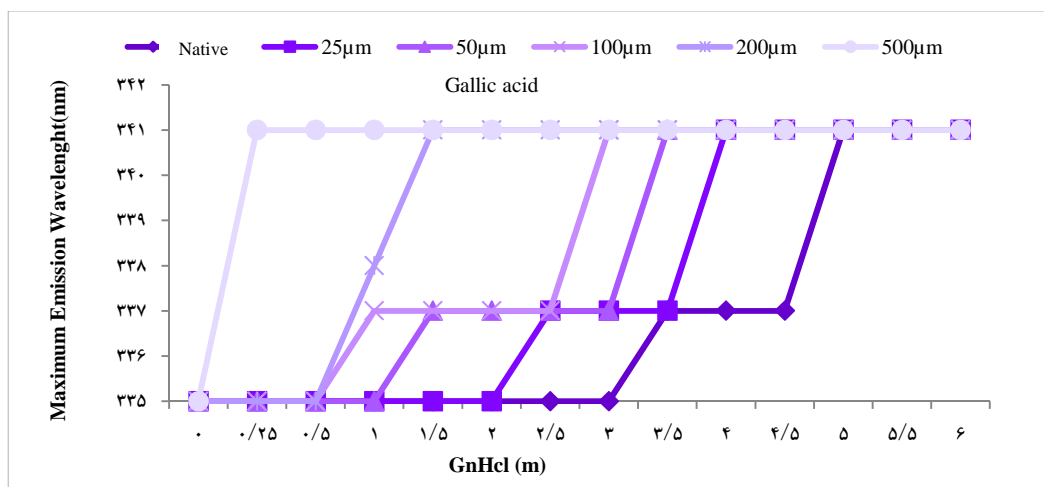
ستون ۲: پپتید دارای ناحیه‌ی SH2 (Src homology 2).

ستون ۳: پپتید دارای ناحیه‌ی SH2 جهش یافته، ستون ۴: مجموعه‌ی

پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه‌ی SH2 و ستون ۵: مخلوط حاوی

پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه‌ی جهش یافته‌ی SH2

الگوی حاصل از PAGE مشخص کرد که ناحیه‌ی کینازی پروتئین مورد نظر با پپتیدی که دارای ناحیه‌ی SH2 بود، تعامل برقرار کرد (ستون ۴ شکل ۵) و مجموعه‌ی حاصل، دارای الگوی الکتروفورزی متفاوت از هر کدام از دو جزء به تنهایی بود (ستون‌های ۱ و ۲ شکل ۵). در حالی که الگوی الکتروفورزی مخلوط حاوی پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه‌ی جهش یافته‌ی SH2 بود که توانایی اتصال به ناحیه‌ی کینازی پروتئین مورد نظر را نداشت (ستون ۵ شکل ۵). با الگوی الکتروفورزی، هر کدام از دو جزء به تنهایی یکسان بود (ستون‌های ۱ و ۳ شکل ۵) که نشان دهنده‌ی عدم اتصال پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه‌ی جهش یافته‌ی SH2 بود.



شکل ۶. افزایش شدت نشر فلوروسنس در حضور گالیک اسید ۲۵-۵۰۰ میکرولیتر و با افزایش تدریجی غلظت (۰-۶ مولار) GuHCl

(Guanidine hydrochloride) و Native بدون حضور گالیک اسید

بحث

در این مطالعه، ناحیه‌ی کینازی گیرنده‌ی نوترکیب عامل رشد فیبروبلاستی 2b در باکتری *Escherichia coli* BL21 بیان و به صورت محلول و فعال خالص شد. اگر چه ترکیب‌های مؤثری برای مهار پروتئین کینازها شناسایی شده‌اند، اما مکانیسم مولکولی دقیق این مهارکننده‌ها، در مهار فعالیت پروتئین کینازی به روشنی مشخص نیست (۱۸).

از آن جا که برای انجام مطالعه‌های ساختاری یا بررسی برهم‌کنش بین پروتئین و لیگاند به تهیه‌ی پروتئین خالص شده در حد میلی‌گرم نیاز است. در این مطالعه، در مرحله‌ی اول پلاسمید حاوی ژن ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b تحت سیستم بیانی باکتری *Escherichia coli* BL21 قرار گرفت و پروتئین مورد نظر به دست آمد. یکی از مشکلاتی که حین تولید پروتئین ممکن است با آن مواجه شویم نامحلول بودن پروتئین به دلیل تجمع توده‌های غیر فعال پروتئینی به شکل اجسام توده‌ای است. یک علت این امر، می‌تواند بیان بیش از حد پروتئین در سیتوپلاسم باکتری باشد که رفع این مشکل، از نظر زیست‌فناوری اهمیت به‌سزایی دارد. چندین روش برای به حداقل رساندن تشکیل اجسام توده‌ای و دست‌یابی به پروتئین محلول وجود دارد؛ از جمله تغییر متغیرهایی نظیر درجه‌ی حرارت، میزان بیان و غلظت ماده‌ی القاکننده. از بین این روش‌ها، مهم‌ترین کار تغییر شرایط رشد باکتری است (۱۹).

در این مطالعه، محلول نمودن پروتئین هدف در دماهای مختلف حلالیت بررسی شد که در نهایت در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به صورت محلول درآمد. در مطالعه‌ی Meinander و همکاران اثر دما، غلظت القاکننده و بیان هم‌زمان چاپرون‌ها (Chaperones) را بر روی حلالیت پروتئین بیان شده در باکتری *Escherichia coli* بررسی کردند. در مطالعه‌ی آن‌ها، کاهش دما بیان پروتئین را به صورت محلول دو برابر کرد (۲۰). در مطالعه‌ی حاضر نیز با کاهش میزان دما افزایش حلالیت پروتئین مشاهده شد. بررسی القای الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های بیان شده، پس از القای ژن مورد نظر با IPTG در این پژوهش انجام شد.

همان گونه که اشاره شد، گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاستی 2b در تنظیم فرایندهای بیولوژیکی حیاتی از جمله تکثیر سلولی نقش حیاتی دارد. در مطالعه‌ی حاضر با استفاده از روش‌های اسپکتروسکوپی، از جمله مطالعات فلوروسنس تغییرات مشاهده شده بر روی ساختار سوم ناحیه‌ی کینازی، در حضور و عدم حضور ترکیبات گالیک اسید بررسی شد. در مطالعه‌های مختلف به منظور بررسی اثر گالیک اسید روی تکثیر سلولی در محیط کشت سلولی از غلظت‌های متفاوتی از گالیک اسید استفاده شده است. به عنوان مثال،

شماری از مطالعه‌ها نشان داده‌اند که استفاده از گالیک اسید در غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند باعث القای مرگ سلولی در فعالیت سلول‌های کبدی شود. در این مطالعه، از حداکثر غلظت گالیک اسید استفاده شد تا اثر افزایش غیر طبیعی غلظت گالیک اسید در رشد سلول‌های سرطانی را تقلید کند (۲۱).

غلظت پروتئین در مطالعه‌ی حاضر، وابسته به تکنیک استفاده شده در این نوع مطالعه است. به منظور انجام مطالعه‌ی فلوروسنس، غلظت مورد نیاز پروتئین ۰/۲-۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیاز است (۲۲) که در این مطالعه، از غلظت ۰/۳۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین مورد نظر استفاده شد.

نتایج این مطالعه، افزایش شدت نشر فلوروسنس را در حضور و نیز با افزایش تدریجی غلظت گالیک اسید نشان داد. هر چند با تیراسیون گالیک اسید، تغییراتی در شیفت منحنی حداکثر طول موج نشری فلوروسنس به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر مشاهده شد. در مطالعه‌ی ای که توسط Gorinstein و همکاران انجام شد، تغییرات ساختاری پروتئین‌های سرم انسان (HSP یا Human serum protein) با استفاده از روش‌های فلوروسنس اسپکتروسکوپی بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که شدت نشر فلوروسنس کاهش یافته و همچنین حداکثر طول موج نشری شیفت پیدا کرده است که این نتایج Unfold شدن پروتئین را نشان می‌دهد (۲۳). در مقایسه با نتیجه‌ی حاصل از مطالعه‌ی حاضر، می‌توان گفت که افزایش شدت نشر فلوروسنس ناحیه‌ی کینازی در حضور گالیک اسید، باعث پنهان شدن اسید آمینه‌های تریپتوفان انتهایی در ساختار پروتئین می‌شود.

به منظور مطالعات بیشتر و بررسی هر چه بیشتر تغییرات مشاهده شده، دنا تراسیون شیمیایی فلوروسنس در حضور گالیک اسید انجام شد. این مطالعات در حضور حداکثر غلظت مؤثر گالیک اسید و در حضور افزایش تدریجی غلظت گوانیدین هیدروکلراید انجام گرفت (۲۴). در مطالعه‌ی حاضر نیز گوانیدین هیدروکلراید باعث دناتورده شدن ناحیه‌ی کینازی شد.

نتایج حاصل از دنا تراسیون شیمیایی نشان داد که فرایند Unfolding ناحیه‌ی کینازی در حالت طبیعی یک فرایند سه مرحله‌ای است. وجود دو حالت گذار در این فرایند، نشان دهنده‌ی Unfold شدن هر Subdomain به طور جداگانه و در غلظت‌های متفاوت از گوانیدین هیدروکلراید است.

بر اساس نتایج، در حین دناتوراسیون تغییرات به وجود آمده روی ساختار سوم موجب ناپایدار شدن آن در حضور گالیک اسید می‌شود. در مطالعات مختلفی گزارش شده است که بعضی از فلاونوئیدها، می‌توانند فعالیت‌های اجزای داخل سلولی مسیر پیام‌رسانی را تغییر دهند (۲۵).

کینازی اثربخش است. با این وجود، مطالعات بیشتری با استفاده از روش‌های دیگر، برای کشف مکانیسم مولکولی دقیق تأثیرات گالیک اسید در سرطان نیاز است.

بررسی ساختار و دینامیک حد واسط‌های مسیر Folding نه تنها به فهم ساز و کار تاخوردگی طبیعی پروتئین‌ها کمک می‌کند؛ بلکه هم در حوزه‌ی بیوتکنولوژی و هم در روشن‌تر کردن علل بسیاری از بیماری‌های مربوط نقش به‌سزایی دارد.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های مالی و فنی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و همچنین، مدیریت محترم گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان در اجرا و به نتیجه رسیدن این طرح، قدردانی می‌گردد. این مقاله، حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان و به عنوان بخشی از طرح تحقیقاتی با کد ۲۲۷ مصوب مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین می‌باشد.

در این مطالعه، بر اساس نتایج به دست آمده، ناحیه‌ی کینازی گیرنده‌ی نوترکیب عامل رشد فیروبلاستی 2b که یک پروتئین ۳۸ کیلودالتونی است، تولید و خالص گردید و نشان داده شد که پروتئین مورد نظر به صورت محلول و فعال است و می‌توان از آن جهت بررسی برهم‌کنش پروتئین و لیگاند، از جمله اثر مهار کننده‌های مختلف استفاده نمود.

علاوه بر این، اثر ناپایداری فلاونوئیدها از جمله گالیک اسید روی ناحیه‌ی کینازی گیرنده‌ی نوترکیب عامل رشد فیروبلاستی 2b می‌تواند در سطح مولکولی و درون سلول موجب اختلال در مسیر پیام‌رسانی سلول شود و فرایندهای بیولوژیکی سلولی را دستخوش تغییر نماید. همچنین، نتایج این پژوهش با مطالعات قبلی که کاربرد گالیک اسید را به عنوان یک درمان جانبی در سرطان پیشنهاد می‌کنند، مطابقت دارد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که در درمان سرطان‌هایی که مکانیسم به وجود آورنده‌ی آن‌ها اختلال در مسیر پیام‌رسانی سلول به واسطه‌ی گیرنده‌های عامل رشد فیروبلاستی است، استفاده‌ی هم‌زمان از فلاونوئیدها از جمله گالیک اسید در کنار مهار کننده‌های

References

- Matsunaga S, Okigaki M, Takeda M, Matsui A, Honsho S, Katsume A, et al. Endothelium-targeted overexpression of constitutively active FGF receptor induces cardioprotection in mice myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46(5): 663-73.
- Zhao WM, Wang L, Park H, Chhim S, Tanphanich M, Yashiro M, et al. Monoclonal antibodies to fibroblast growth factor receptor 2 effectively inhibit growth of gastric tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2010; 16(23): 5750-8.
- Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(3): 235-53.
- Haugsten EM, Wiedlocha A, Olsnes S, Wesche J. Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Mol Cancer Res* 2010; 8(11): 1439-52.
- Kalinina J, Dutta K, Ilghari D, Beenken A, Goetz R, Eliseenkova AV, et al. The alternatively spliced acid box region plays a key role in FGF receptor autoinhibition. *Structure* 2012; 20(1): 77-88.
- Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010; 141(7): 1117-34.
- Gartside MG, Chen H, Ibrahim OA, Byron SA, Curtis AV, Wellens CL, et al. Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. *Mol Cancer Res* 2009; 7(1): 41-54.
- Grose R, Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16(2): 179-86.
- Jain VK, Turner NC. Challenges and opportunities in the targeting of fibroblast growth factor receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012; 14(3): 208.
- Lew ED, Bae JH, Rohmann E, Wollnik B, Schlessinger J. Structural basis for reduced FGFR2 activity in LADD syndrome: Implications for FGFR autoinhibition and activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(50): 19802-7.
- Knights V, Cook SJ. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther* 2010; 125(1): 105-17.
- Katoh Y, Katoh M. FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics (Review). *Int J Mol Med* 2009; 23(3): 307-11.
- Katoh M. FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2009; 13(7): 477-82.
- Katoh M. Cancer genomics and genetics of FGFR2 (Review). *Int J Oncol* 2008; 33(2): 233-7.
- Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, Powell MA, Mallon MA, Davies H, et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene* 2007; 26(50): 7158-62.
- Lew ED, Furdul CM, Anderson KS, Schlessinger J. The precise sequence of FGF receptor autophosphorylation is kinetically driven and is disrupted by oncogenic mutations. *Sci Signal* 2009; 2(58): ra6.
- Bae JH, Lew ED, Yuzawa S, Tome F, Lax I, Schlessinger J. The selectivity of receptor tyrosine kinase signaling is controlled by a secondary SH2 domain binding site. *Cell* 2009; 138(3): 514-24.
- Kunii K, Davis L, Gorenstein J, Hatch H, Yashiro M, Di BA, et al. FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and ErbB3 signaling for growth

- and survival. *Cancer Res* 2008; 68(7): 2340-8.
19. Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2005; 115(2): 113-28.
 20. Meinander N, Jeppsson M, Sogaard M. Optimisation of the solubility of the recombinant itk kinase domain in *Escherichia coli*. In: Merten OW, Mattanovich D, Lang C, Larsson G, Neubauer P, Porro D, et al., editors. *Recombinant protein production with prokaryotic and eukaryotic cells. A comparative view on host physiology*. New York, NY: Springer; 2001. p. 159-70.
 21. Sambrook JF, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
 22. Scheim DE. Cytotoxicity of unsaturated fatty acids in fresh human tumor explants: concentration thresholds and implications for clinical efficacy. *Lipids Health Dis* 2009; 8: 54.
 23. Gorinstein S, Goshev I, Moncheva S, Zemser M, Weisz M, Caspi A, et al. Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes. *J Protein Chem* 2000; 19(8): 637-42.
 24. Jana S, Chaudhuri TK, Deb JK. Effects of guanidine hydrochloride on the conformation and enzyme activity of streptomycin adenylyltransferase monitored by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry (Mosc)* 2006; 71(11): 1230-7.
 25. Lu Y, Jiang F, Jiang H, Wu K, Zheng X, Cai Y, et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *Eur J Pharmacol* 2010; 641(2-3): 102-7.

Expression and Purification of the Recombinant Kinase Domain of FGFR2b and Study of its Structural Changes Due to the Interaction with Gallic Acid

Faezeh Seyyed-Attaran¹, Dariush Ilghari PhD², Nematollah Gheibi PhD³, Mehdi Sahmani PhD⁴,
Hossein Piri PhD²

Original Article

Abstract

Background: FGFR2b plays a significant role in cell signaling pathway, regulating several key biological processes including cellular differentiation and proliferation. Genetic alterations of the tyrosine kinase domain of FGFR2b, such as point mutations, occur in breast, ovarian and prostate cancer. This study aimed to express and purify the human FGFR2b kinase domain and to analyze its structural changes upon interaction with Gallic acid (GA).

Methods: Expression of recombinant protein was induced with 1mM IPTG at 37 °C and analyzed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The protein was purified via affinity chromatography and the protein sample was dialyzed and then used to be analyzed via SDS-PAGE. Chemical denaturation and intrinsic fluorescence spectra of the purified proteins were carried out via adding different concentrations of Gallic acid.

Findings: Comparison between pre- and post-induction samples via SDS-PAGE analysis showed that the expressed protein was soluble at 20 °C. Additionally, its purity was confirmed. The intrinsic fluorescence spectra of kinase domain in the presence of Gallic acid showed an increase in fluorescence intensity and maximum emission wavelength.

Conclusion: Regarding to the results, the recombinant kinase domain of FGFR2b (38 kDa) was expressed, solubilized and purified. Changing in tertiary structural kinase domain reflects a conformational change within the protein that is important for the biological function of FGFR2b.

Keywords: Receptor, Fibroblast growth factor 2, Gallic acid, Spectrometry, Fluorescence

Citation: Seyyed Attaran F, Ilghari D, Gheibi N, Sahmani M, Piri H. **Expression and Purification of the Recombinant Kinase Domain of FGFR2b and Study of its Structural Changes Due to the Interaction with Gallic Acid.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(362): 2143-51

1- Department of Biology, School of Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2- Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center AND Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

3- Associate Professor, Department of Biophysics and Biotechnology, School of Paramedical Sciences AND Cellular and Molecular Research Centre, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

4- Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center AND Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Corresponding Author: Hossein Piri, Email: hosseinpiri@gmail.com