داوود شمس، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، دانشکده علوم و فناوری های نوین،تهران davoud.shams۲۴@gmail.com
دکتر طاهره ناجی،استاد راهنما و مدیرگروه علوم سلولی مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی

بیان و خالص سازی FGF21 و تاثیر آن بر حیوانات ازمایشگاهی

فاکتور

رشد فیبروبلاستی (FGF) یک خانواده بزرگ فاکتور رشد پلی پپتیدی را تشکیل می دهد که در موجوداتی اعم از نماتودها و انسان وجود دارد. مهره داران ۲۲ عضو از خانواده فاکتورهای رشد فیبروبلاستی با وزن مولکولی بین ۱۷ تا ۳٤ کیلو دالتون را دارند. در میان گونه های متفاوت مهره داران، FGFها اسیدهای امینه هایی دارند که به صورت کاملا conserve اند. این فاکتور تمایل بسیار بالایی برای اتصال به پروتئوگلیکان هپارین سولفات دارد و از طرفی برای اینکه یکی از چهار گیرنده ی FGF در سطح سلول فعال شود، این فاکتور نیاز دارد تا به هپاران سولفات متصل شود. در طول دوران رشد و نمو جنین FGF نقش های گوناگونی را در تنظیم تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول ها بازی می کند. در ارگانیسم های بالغ FGF ها به عنوان فاکتور های هموستاتیک، ترمیم بافت و در پاسخ به آسیب ها عملکرد دارد. هنگامی که FGF بیان بی موقع داشته باشد، می تواند در پاتوژنز سرطان مشارکت کند.(۱) FGF۲۱ توانایی تنظیم هموستازی گلوکز را دارد. اگر چه اکثر خانواده FGF از طریق مکانیسم های اتوکرین و پاراکرین رشد و تکثیر سلولی را تنظیم می کنند، اعضای سوپر فامیلی FGF۱۹ که شامل FGF۱۵/FGF۱۹،FGF۲۱ و FGF۲۳ آن را تشکیل می دهند ویژگی بسیار کمی برای متصل شدن به هپارین سولفات دارند. بنابراین می توانند به صورت فاکتورهای اندوکرین به داخل گردش خون رها بشوند. در سوپر فامیلی FGF۱۹ , FGF۲۱ و FGF۲۳ برای فعال کردن گیرنده FGF، بجای هپارین سولفات به پروتئین Transmembrane به نام Klotho نیاز دارند. FGF۲۱ یک تنظیم کننده متابولیکی است و مکانیسم سوخت و ساز قند و متابولیسم چربی را بهبود می دهد.(۵) FGF۲۱ در جوندگان که از لحاظ ژنتیکی در معرض دیابت هستند باعث می شود میزان گلوکز پلاسما و تری گلیسرید به حد طبیعی نزدیک شود. برای کشف خاصیت درمانی FGF۲۱ در گونه ی پستانداران اصلاح نشده ژنتیکی, که در نتیجه توانایی اثر بخشی در انسان را نشان خواهد داد بررسی صورت گرفت. بنابراین برای مطالعه عملکرد زیستی این فاکتور آن را بر روی پستانداران به غیر از انسان اثر دادند. وقتی که برای مدت ٦ هفته به صورت روزانه ان را برای Rhesus Monkeys دیابتی تجویز کردند، مشاهده کردند که FGF۲۱ موجب کاهش چشمگیر و سریع در میزان گلوکز پلاسما، فروکتوزامین، انسولین، تریگلیسیرید و گلوکاگون شد. این اطلاعات از توسعه FGF۲۱ برای درمان دیابت و دیگر بیماری های متابولیکی حمایت می کند.(٦) برای رسیدن به هدف بیان پروتئین مورد نظر، پژوهشگران همیشه به دونبال راه کارهایی بوده اند و لزا از استراتژی های مختلفی استفاده می کنند. بیان مشترک چاپرون ها در باکتری برای بدست آوردن پروتئین با تاخوردگی مناسب یکی از راه کارها است. چاپرون با اتصالی که با قسمت ابگریز پروتئین هدف برقرار می کند موجب می شود تا پروتئین ها به صورت اجسام انکلوژن تجمع نیابند.(۳) ارسال پروتئین نوترکیب به فضای پریپلاسمی جهت جلوگیری از تشکیل اجسام انکلوژن و تاخوردگی مناسب پروتئین ها و همچنین کاهش تاثیر پروتئازها بر روی پروتئین، انجام می گیرد.(٤) استفاده از برچسب ها یا Tag یکی دیگر از این استراتژی ها است. از برچسب ها جهت افزایش بیان و خالص سازی ساده, افزایش حلالیت، حفاظت پروتئین از پروتئولیز و ... استفاده می شود.(۷) یکی از استراتژی های به دست آوردن بیان بالای و خالص سازی مناسب از FGF۲۱، بیان آن در باکتری E.Coli با استفاده از اتصال SUMO به سازه مورد نظر است. بیان بالا و خالص سازی FGF21 در باکتری کار سختی است زیرا اجسام اینکلوژن در باکتری ایجاد می شود که موجب خالص سازی سخت و ایجاد پروتئین های غیر عملکردی می شود. SUMO (Small Ubiqui-

(tin-Related Modifier در سلول های یوکاریوتی پروتئین هایی هستند که به صورت برگشت پذیر به پروتئین هدف متصل می شوند. Sumoylation به عنوان یک فرایند برگشت پذیر پس از ترجمه است که در بسیاری از فرایندهای سلولی مانند انتقالات هسته-سیتوپلاسم، اپوپتوز، پایداری پروتئین ها، فعال سازی پروتئین ها، پاسخ به استرس و فرایند پیشرفت سلولی نقش دارد. در سال های اخیر، SUMO تبدیل به یک ابزار موثر بیوتکنولوژی شده و به عنوان یک سیستم ادغامی با پروتئین هدف برای افزایش بیان پروتئین های محلول و کاهش تخریب پروتئولیتیک معرفی شده است که توسط سیستم های بیانی سنتی بیان نمی توان به آن دست پیدا کرد. تا به امروز توانسته اند پروتئین هایی مانندSARS virus , EGF, MMP13, و KGF2 را با استفاده از این استراتژی ادغامی، بیان بالا و خالص سازی مناسبی را داشته باشند. اقای Ren با استفاده از یک حامل تجاری حاوی برچسب SUMO که 21FGF را در ان کلون کرده و بیان بالایی از پروتئین محلول را توانست نشان بدهد. با این حال سطح بالایی از خالص سازی را با استفاده از Ni-NTA تمایلی را نتوانست ارائه کند. بنابراین سازه ای را ساختند و قطعه SUMO و 21FGF و آن سازه را در داخل وکتور کلون کردند و سپس بیان و خالص سازی را انجام دادند. (۲) در سال های اخیر گزارش های بسیاری در مورد SUMO به عنوان یک برچسب بیانی مطرح شده است. سطح بیان پروتئین های متصل شده با متالوتئونین, GST و SUMO ۳۸,٤٪ کل پروتئین های مایع رویی از ارگانیسم بوده است.(۸) اطلاعات به دست آمده در این مطالعه که SUMO و FGF21 را به یکدیگر متصل کرده اند، میزان غلظت SUMO-FGF21 را بیش از ۲۵٪ از کل پروتئین محلول نشان می دهد. بیان پروتئین ها ممکن است امیخته با وزن مولکولی، ساختمان امینواسید، عملکرد پروتئین ها و ... باشد. از آنجایی که پروتئین ایزوله را طی دو مرحله خالص سازی نمودند، درصد خالص سازی را به ٪۹٦.۵ رساندند. این مسئله گویای این موضوع است که خالص سازی دو مرحله ای می تواند خلوص FGF21 را بهبود ببخشد و نسبت به خالص سازی یک مرحله ای بسیار موفقیت آمیز است.(۹) نتایج نشان داد که این روش جدید میزان 21FGF بدست امده به مقدار قابل توجهی افزایش یافته است و خالص سازی بسیار ایده الی را ارائه می دهد. برای دست یابی به این امر با ابتدا پرایمرهایی را طراحی کردند که دارای جایگاه برش خاصی باشد و با استفاده از PCR ژن مورد نظر را تکثیر دادند پس محصول انتهایی PCR که 21SUMO-FGF هست را طوری طراحی کرده اند که حاوی جایگاه برش برای آنزیم های محدود کننده Xho1 و Nde1 باشد و در وکتور بیانی pET – ۲۰b، کلون کردند. توالی پلاسمید نوترکیب به وسیله تعیین توالی خودکار تایید شد. نتایج نشان داد که طول توالی21SUMO-FGF به اندازه (546 bp FGF21 و 318 bp SUMO) 864 bp در تطابق با توالی قبلی است. توالی 21SUMO-FGFدر بانک ژنی با شماره دسترسی GU456634 موجود است. القا توسط IPTG موجب می شود که بیان SUMO-FGF در سطح بالایی صورت بگیرد. پروتئین فیوژ شده توسط DEAE سفارز FF و کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA خالص سازی شد. هنگامی که برش توسط پروتئاز SUMO صورت گرفت، درصد خلوص 21FGF با کارایی بالا توسط (HPLC) نشان داد که بیش از ٪۹٦ است با میزان اندو توکسین پایین (<1.0 EU/ml). نتایج آزمایش ها بر روی حیوانات با تزریق (STZ) در محیط ازمایشگاهی مشخص شد که 21FGF موجب کاهش غلظت گلوکز پلاسما می شود. این مطالعه نشان داد که SUMO، زمانی که با FGF21 ادغام شد، موجب ارتقا سطح بیان FGF۲۱ محلول در باکتری E.Coli می شود. SUMO به عنوان یک ناحیه جدید مولکولی چاپرون، عملکرد پروتئین نوترکیب را افزایش می دهد و خالص سازی مناسب تری را برای پروتئین موجب می شود. از این استراتژی می توان به عنوان یک مرجع برای بیان و خالص سازی دیگر پروتئین ها استفاده کرد.(۲)

1- David MO, Nobuyuki I. Fibroblast growth factors. Genome Biology. 2001; 2(3): 3005.1-3005.12

2- Huiyan W, Yechen X, Lianjun F, Hongxin Z, Yaofang Z, Xiaoshan W, Yuxia Q, Yadong H, Hongchang G, Xiaokun L. High-level expression and purification of soluble recombinant FGF21 protein by SUMO fusion in Escherichia coli. BMC Biotechnology. 2010; 10(14): 1-9

۳- فرزانه م, حسن م, مونا ع.ب.بیان همزمان ترکیبات GrpE / Dnaj / DnaK / GroES / GroES,GroEL / GroEL با فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی در باکتری اشرشیاکلی به منظور کاهش پروتئین های نامحلول نوترکیب. مجله پزشکی جندی شاپور. ۱۳۸۸; ۵(۲): ٦۲-۵۵