

## اثر نیکل بر ساختار ناحیه کینازی گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی نوع دو

مریم توده روستا<sup>۱</sup>، دکتر نعمت‌الله غیبی\*<sup>۲</sup>، دکتر داریوش ایلغاری<sup>۳</sup>، دکتر مجید سیرتی ثابت<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت 1393/10/15 تاریخ پذیرش 1393/12/12

## چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی نوع دو در مسیر پیام‌رسانی سلولی و تنظیم فرآیندهای مهم زیستی از جمله تمایز و تکثیر سلولی نقش اساسی دارد. اختلال در انتقال پیام این گیرنده با چندین اختلال پاتولوژیکی انسانی مرتبط می‌باشد. عوامل مختلف از جمله فلزات سمی می‌توانند مسیرهای سیگنالینگ را دستخوش تغییر کنند.

**هدف:** این مطالعه به منظور اثر فلز سمی نیکل بر ساختار ناحیه کینازی رسپتور فاکتور رشد فیبروبلاستی نوع دو انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی پروتئین نوترکیب با استفاده از پلاسمید pLEICS-01، باکتری BL21 القای IPTG، الکتروفورز و ستون حاوی  $Ni^{2+}$  NTA بیان و خالص شد. سپس اثر نیکل تا غلظت ۱۰۰ میلی مولار بر ساختار ناحیه کینازی پروتئین با استفاده از تکنیک‌های دو رنگ نمایی حلقوی (CD) و اسپکتروفلوریمتری (فلوئورسانس) بررسی شد.

**یافته‌ها:** مطالعه نیکل در غلظت‌های زیر ۱۰۰ میلی مولار بر روی ساختارهای منظم دوم بدون تغییر ولی باعث تغییر جزئی در نشر ذاتی تریپتوفان در ساختار سوم می‌شود.

**نتیجه‌گیری:** ساختار اصلی و پایداری ناحیه کینازی گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی نوع دو در برابر نیکل تغییر نمی‌کند.

**کلیدواژه‌ها:** گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی، ناحیه کینازی، نیکل، سیگنالینگ

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و ششم، شماره دوم، ص 165-156، اردیبهشت 1394

آدرس مکاتبه: قزوین، بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پیراپزشکی، گروه بیوتکنولوژی، تلفن: ۰۲۸ - ۳۳۳۵۳۰۰۶

Email: gheibi.n@yahoo.com

## مقدمه

فاکتورهای رشد فیبروبلاست (FGFs) و گیرنده‌های آن‌ها (FGFRs) تنظیم‌کننده رفتارهای کلیدی سلول، مانند تکثیر، تمایز، مهاجرت و بقا می‌باشند و برای رشد و نمو جنین، تنظیم آنژیوژنز و بهبود زخم در بزرگسالان اساسی هستند (۱).

فاکتورهای رشد فیبروبلاستی در پستانداران خانواده‌ی ۱۸ عضوی هستند (FGF10 - FGF1 و FGF23 - FGF16) که همراه چهار گیرنده تیروزین کینازی (FGFR1-FGFR4) و ایزوفرم‌های آن‌ها می‌توانند ایجاد پیام کرده و رشد و نمو جنین و سوخت‌وساز بدن

بزرگسالان را تنظیم کنند (۲). قابل‌ذکر است که انتقال پیام‌های کنترل نشده فاکتورهای رشد فیبروبلاستی می‌تواند منجر به بدخیمی در انسان شود (۳). اشکال موتاسیون یافته‌ی گیرنده‌های فاکتور رشد فیبروبلاستی در سرطان‌های زیادی مانند سرطان ریه، پستان، معده، مغز، سر و گردن، پروستات، کولون، رحم، مثانه و همچنین مولتیپل میلوما شناخته شده است (۴-۶).

اختلال در انتقال پیام این گیرنده‌ها با چندین اختلال پاتولوژیکی انسانی مرتبط می‌باشد که می‌توان به سندرم‌های اسکلتی اشاره کرد، از جمله سندرم فایفر که به دلیل جهش در ناحیه کینازی پروتئین FGFR2 ایجاد می‌گردد (۴).

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین  
<sup>۲</sup> دانشیار بیوفیزیک مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین  
<sup>۳</sup> استادیار بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی قزوین  
<sup>۴</sup> دانشیار بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی شهید

مورد دیگر، فعال‌سازی پایدار فاکتور رونویسی فاکتور هسته‌ای (NF-kB) توسط مسیرهای سیگنالینگ فعال‌شده توسط فلز است که می‌تواند به فرآیندهای التهابی مزمن، بیماری‌های اتوایمیون و بیماری‌های مرتبط از جمله سرطان، منجر شود. نتایج به‌دست‌آمده نشان داده است که نیکل به میزان قابل‌توجهی سبب فعال شدن NF-kB و انتشار کموکاین IL-8 می‌شود (۱۷).

از آنجاکه برخی فلزات از جمله نیکل در غلظت‌های خیلی پایین موردنیاز در سیستم‌های بیولوژیک و در غلظت‌های بالا می‌تواند اثر سمی داشته باشد و همچنین اثرات آن بر مسیر سیگنالینگ به اثبات رسیده است (۱۰)، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر این فلز، بر ساختار ناحیه کینازی گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی نوع دو (FGFR2b) در آزمایشگاه انجام شد.

### مواد و روش‌ها

این تحقیق تجربی در سال ۳-۱۳۹۲ در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام گرفت. در این مطالعه ایمیدازول، IPTG و  $Ni^{2+}$ -NTA از شرکت سیگما، آمی‌سیلین و HEPES از شرکت مرک و باکتری ایشریشیاکلی BL21(DE3) از شرکت Invitrogen تهیه گردیدند. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از نوع خالص بودند و از شرکت سیگما و شرکت مرک تهیه شدند.

از باکتری ایشریشیاکلی BL21(DE3) جهت میزبان بیانی استفاده شد. باکتری در محیط‌های کشت Luria-Bertani برات و LB آگار در حضور ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمی‌سیلین کشت داده شد. سلول‌های مستعد (پذیرا) در حضور کلسیم کلرید تهیه شدند.

پلاسمید pLEICS-01 حاوی ژن ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b، توسط محققین با استفاده از cDNA ژن FGFR2b سالم تهیه شد و با توجه به جهش‌های مشاهده‌شده در ژن FGFR2b سلول‌های سرطانی، موتاسیون نقطه‌ای نیز در آن صورت گرفته بود. در این پروتئین، شکل فعال و نوترکیب ناحیه تیروزین کینازی پروتئین FGFR2b ایجاد شد که جهش‌های موردنظر را دارا بود.

بیان پروتئین نوترکیب با IPTG ۱ میلی مولار القاء شد، این پروتئین تا حد زیادی غیرقابل‌حل و تمایل به تجمع داشت. لذا حالیت پروتئین با تغییر در شرایط دمایی کشت از  $37^{\circ}C$  به  $20^{\circ}C$  انجام گردید. پروتئین خالص با استفاده از روش کروماتوگرافی میل ترکیبی  $Ni^{2+}$ -NT و بافر شستشو شامل ایمیدازول ۲۰۰ میلی مولار به دست آمد و در نهایت ایمیدازول به‌وسیله کیسه دیالیز از محیط پروتئین حذف گردید. ارزیابی

مطالعات اخیر نشان داده است که توسعه ژن، فعال شدن غیرطبیعی و پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPs) FGFR2 نقش مهمی در پیشرفت سرطان دارد، بنابراین، FGFR2 به‌عنوان یک هدف درمانی جدید برای سرطان‌ها به رسمیت شناخته شده است (۷).

FGFR2 یک عضو از خانواده FGFR گیرنده تیروزین کینازی است. FGFR2b و FGFR2c ایزوفرم‌های FGFR2 می‌باشند. ژن FGFR2b بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۰ می‌باشد، با وزن مولکولی ۳۸ کیلودالتون که بر روی بازوی قطعه ۲۶.۱۳ قرار دارد (۸). جهش بد معنی و یا گسترش ژنی FGFR2 در سرطان آندومتر، سرطان ریه، سرطان پستان، سرطان معده و سرطان تخمدان رخ می‌دهد (۹). عوامل متعددی از جمله فلزات سمی می‌توانند عملکرد مسیرهای سیگنالینگ را تحت تأثیر قرار دهند (۱۰).

برخی از این فلزات سمی سنگین، فلزاتی هستند که به‌صورت ترکیبات محلول سمی هستند و هیچ نقش بیولوژیکی ندارند (۱۱). فلزات سمی گاهی اوقات از عمل یک عنصر ضروری در بدن تقلید می‌کنند مانند دخالت در روند سوخت‌وساز بدن که منجر به بیماری می‌شود، از جمله آن، مداخله در مسیرهای سیگنالینگ است (۱۲). از جمله این فلزات طبق آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC)، فلز سمی نیکل و ترکیباتش می‌باشد (۱۳).

احتراق سوخت‌های فسیلی و آلودگی ناشی از صنایع نیکل، به‌عنوان منابع اولیه نیکل در محیط‌زیست می‌باشند. به‌طور خاص، منابع انتشار نیکل در هوا شامل زغال‌سنگ، سوختن نفت برای قدرت و حرارت، سوزاندن زباله و فاضلاب، صنایع تولید فولاد، معدن و آبکاری می‌باشد.

مصرف نیکل در انسان از طریق مصرف فرآورده‌های گیاهی و حیوانی است. سبزیجات مانند حبوبات، اسفناج، کاهو و آجیل حاوی نیکل بیشتری نسبت به سایر مواد غذایی می‌باشند. در حیوانات و انسان، نیکل در درجه اول از طریق ادرار و در درجه دوم از طریق بزاق و عرق دفع می‌شود (۱۳).

به‌عنوان مثال، خواص سمی فلز نیکل، منجر به تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌شود که می‌تواند سبب آسیب DNA و عوامل رونویسی مرتبط با اکسیداسیون و احیاء شود. علاوه بر آسیب به DNA، ROS می‌تواند سبب القاء چندین مسیر سیگنالینگ خارج سلولی شود (۱۴).

یکی از مکانیسم‌های احتمالی آپوپتوز و سرطان‌های ناشی از نیکل، القاء ROS توسط ترکیبات نیکل است. ROS تولیدشده به نظر می‌رسد در مسیرهای سیگنالینگ Akt (پروتئین کیناز B) درگیر باشد (۱۵-۱۶).

فلوئورسانس را در حضور نیکل و با افزایش تدریجی غلظت آن نشان داد. با تیتراسیون نیکل، تغییرات کمی در شیفیت حداکثر طول موج نشری فلوئورسانس به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر مشاهده گردید (شکل ۲).

همچنین، بررسی اثر دنا تورا سیون شیمیایی بر طول موج ماکزیمم نشر فلوئورسانس ذاتی ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b، در حضور غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار نیترا ت نیکل صورت گرفت. اثر افزایش تدریجی غلظت گوانیدین هیدروکلراید روی طول موج ماکزیمم نشر فلوئورسانس ذاتی ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در حضور حداکثر غلظت نیکل (۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار) در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که فرآیند دنا تورا سیون ناحیه کینازی در حالت طبیعی یک فرایند سه مرحله‌ای است و این دو غلظت تغییر چندانی در پایداری پروتئین نسبت به حالت طبیعی بدون حضور نیکل نشان نمی‌دهند.

به دنبال نتایج بالا، بررسی اثر دنا تورا سیون شیمیایی بر شدت نشر فلوئورسانس ذاتی ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b، تحت اثر افزایش تدریجی غلظت گوانیدین هیدروکلراید در حضور حداکثر غلظت‌های نیکل (۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار نیز، در شکل ۴-الف و ب نشان داده شده است. اثر دنا تورا سیون گوانیدین هیدروکلراید بر تغییر ساختار پروتئین با کاهش نشر ذاتی تریپتوفان در نمودارها مشهود است.

سپس با استفاده تکنیک دقیق دورنگ نمای حلقوی (CD)، آزمایش انجام شده مورد تأیید قرار گرفت. این بار، بررسی اثر نیکل در یک غلظت، بر روی ساختار دوم ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b، صورت گرفت. به منظور بررسی اثر نیکل روی ساختار دوم ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b از روش Far-UV-CD استفاده شد. در این متد نیز از گوانیدین هیدروکلراید جهت دنا تورا سیون پروتئین استفاده شد، در سه غلظت صفر، ۳ و ۶ مولار از گوانیدین هیدروکلراید و نیکل ۱۰ میلی مولار. پس از به دست آوردن نمودارهای مربوطه و نیز آنالیز آن‌ها با کمک نرم افزار مخصوص CD، داده‌های مربوط به ساختار دوم ناحیه تیروزین کینازی در شکل ۵-الف تا ج نشان داده شده‌اند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که حضور نیکل در محلول، تاثیری بر روی ساختار دوم پروتئین مورد نظر ایجاد نکرده است.

عملکرد ناحیه کینازی خالص شده توسط الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (PAGE) انجام گرفت (شکل ۱). غلظت پروتئین، با دستگاه نانودرآپ اندازه‌گیری شد که ۳ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

دو تکنیک قدرتمند اسپکتروفلوریمتر و دورنگ نمای حلقوی (CD)، به منظور بررسی اثر نیکل بر روی فعالیت‌های ساختاری و عملکردی ناحیه کینازی فاکتور رشد فیبروبلاستی نوع دو، بکار گرفته شدند.

پروتئین محلول در حضور و عدم حضور لیگاند در طول موج ۲۸۰ نانومتر تحریک و انتشار طول موج ثبت گردید. برای به دست آوردن طیف فلوئورسانس از پروتئین، لیگاند در بافر پروتئین قرار گرفت. این عملیات با غلظت‌های مختلف از لیگاند (نیکل) و در غلظت ثابت از پروتئین انجام شد.

نیکل به صورت پودر نیترا ت نیکل با فرمول  $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  مورد استفاده قرار گرفت. غلظت‌های مورد بررسی قرار گرفته نیکل در مواجهه با این پروتئین در دستگاه اسپکتروفلورومتر شامل ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار بود و در تکنیک دو رنگ نمای حلقوی که جهت تأیید نتایج اسپکتروفلوریمتری صورت گرفت، غلظت ۱۰ میلی مولار استفاده شد.

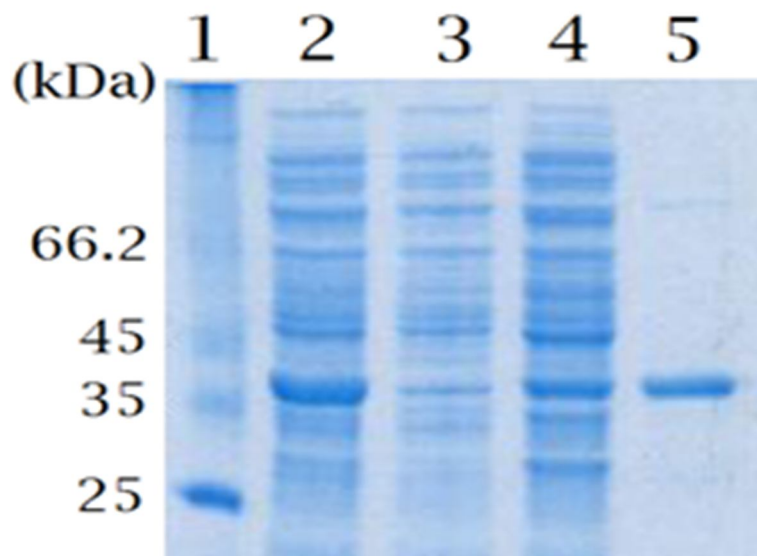
در آزمایش‌های مربوط به فلوئورسانس و CD، برای بررسی دنا تورا سیون شیمیایی، غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۶ مولار گوانیدین هیدروکلراید، جهت دنا تورا سیون پروتئین، مورد استفاده قرار گرفت.

## یافته‌ها

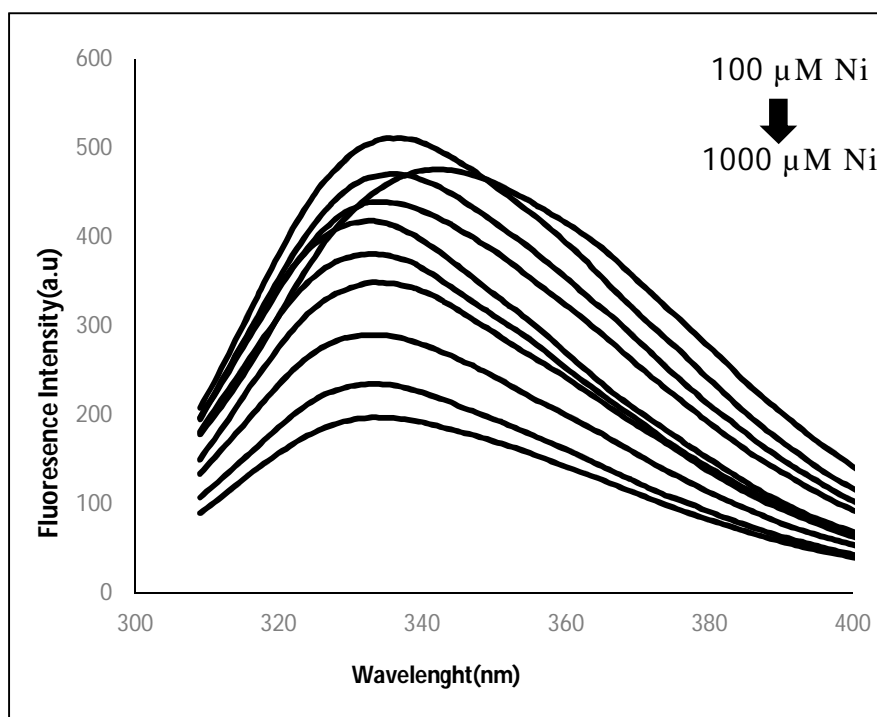
غلظت پروتئین در تمام آزمایش ۳ میلی گرم بر میلی لیتر بود. از آنجاکه بررسی اثر نیکل بر تغییرات ساختاری این پروتئین تاکنون صورت نگرفته بود، در ابتدا غلظت پایین لیگاند (میکرومولار)، مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، غلظت استفاده شده تا حدی کمک گرفته از میزان سمیت این فلز بود. در ابتدا غلظت میکرومولار لیگاند آزمایش شد که به علت عدم تغییر، غلظت به میلی مولار افزایش یافت.

در آزمایش صورت گرفته، تمام طول موج‌ها با نمودار پروتئین فاقد لیگاند (Native) مقایسه شد.

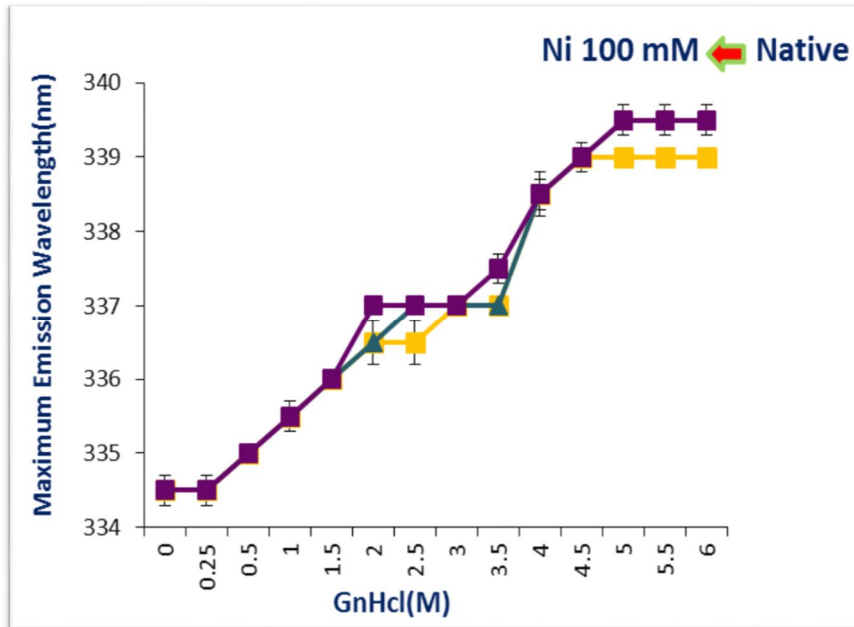
بررسی وضعیت ساختار سوم ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b، با استفاده از روش فلوئورسانس ذاتی در حضور نیکل، مورد بررسی قرار گرفت که نتایج کاهش شدت نشر



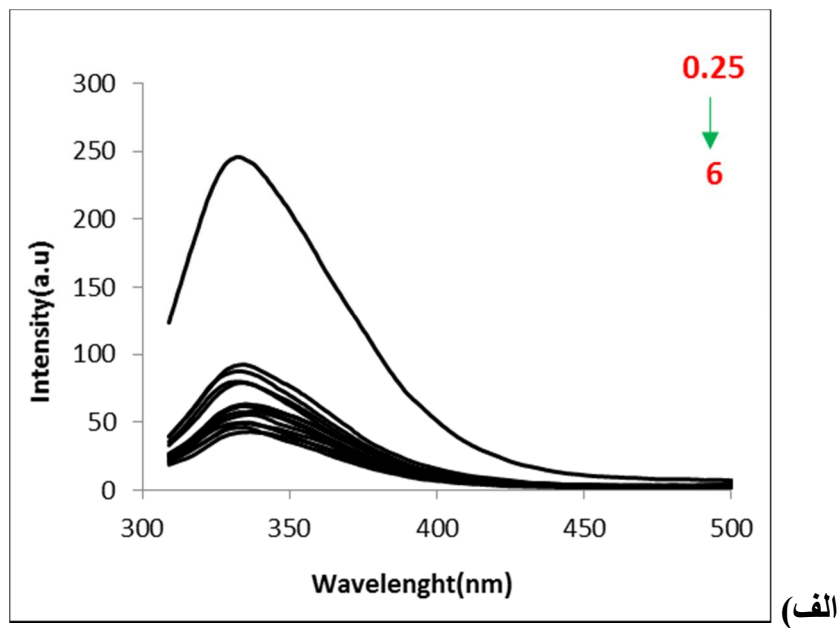
**شکل (۱):** تخلیص نمودن ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نو ترکیب FGFR2b با کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی  $\text{Ni}^{2+}$  NTA. ستون ۱: وزن مولکولی مارکر پروتئین، ستون ۲: اولین نمونه قبل از خالص سازی، ستون ۳: نمونه بعد از شستشوی اولیه ستون کروماتوگرافی و ستون ۴-۵: نمونه‌ها بعد از شستشوی ستون کروماتوگرافی با ایمیدازول با شیب غلظت ۵۰ تا ۲۰۰ میلی مولار.



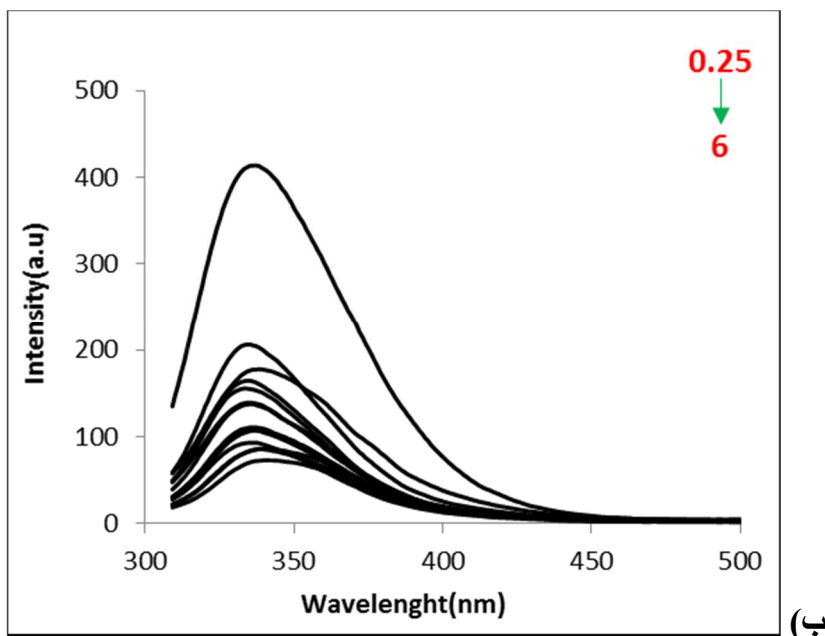
**شکل (۲):** نمودار مربوط به بررسی ساختار سوم ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نو ترکیب FGFR2b به روش فلوروسانس ذاتی. طیف فلوروسانس از نمونه پروتئینی موجود در بافر حاوی ۲۵ میلی مولار Tris-Hcl و ۱۰۰ میلی مولار NaCl با PH برابر ۷/۵ در دمای اتاق به دست آمد. طیف نشری کاهش تدریجی را در شدت فلوروسانس با افزایش غلظت نیکل از ۱۰۰ میکرو مولار تا ۱۰۰۰ میکرو مولار، نشان می دهد.



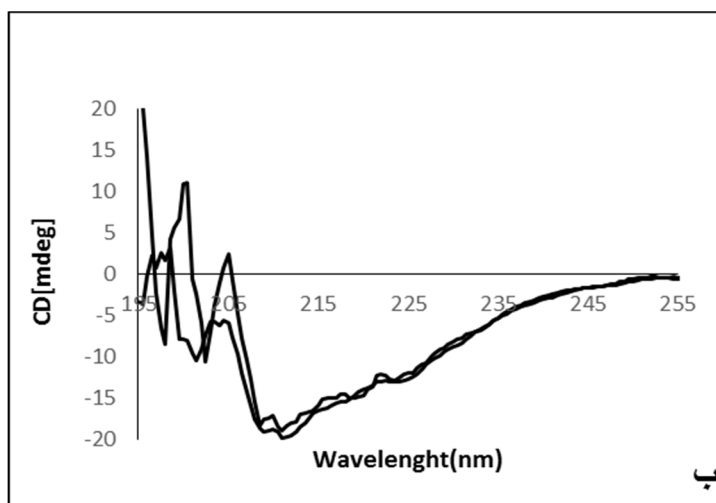
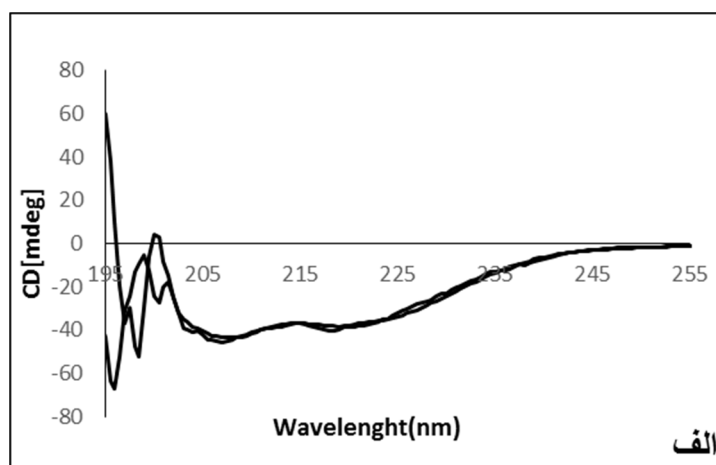
**شکل (3):** نمودار مربوط به اثر دناتوراسیون شیمیایی بر طول موج ماکزیمم نشر ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نو ترکیب FGFR2b با استفاده از روش فلوئورسانس ذاتی. شکل نشان دهنده طیف ناحیه کینازی در حضور حداکثر غلظت نیکل (۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار، می باشد. نمودارها یک مسیر آنفولدینگ سه مرحله‌ای را در حضور افزایش تدریجی غلظت گوانیدین هیدروکلراید نشان می دهند. به ترتیب از راست به چپ: نیترو، نیکل ۵۰ میلی مولار و نیکل ۱۰۰ میلی مولار.

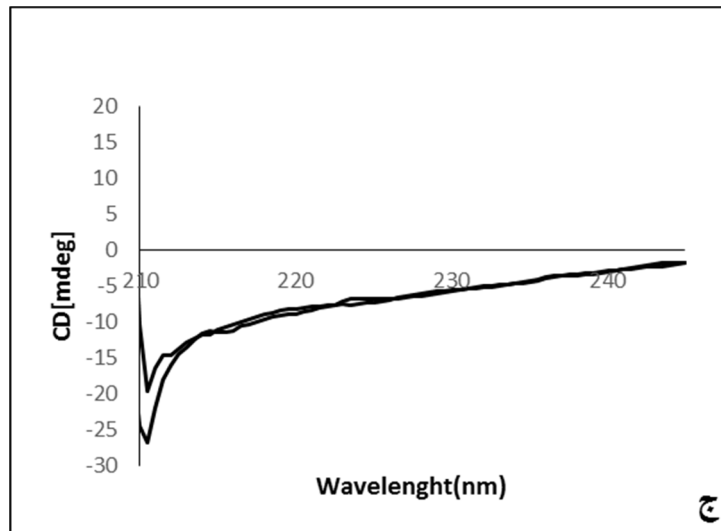


(الف)



شکل (۴): نمودارهای مربوط به اثر دناتوراسیون شیمیایی بر شدت نشر ناحیهی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b با استفاده از روش فلوئورسانس ذاتی. نمودارها کاهش شدت فلوئورسانس ذاتی را در حضور افزایش تدریجی غلظت گوانیدین هیدروکلراید نشان می‌دهند. الف و ب به ترتیب، نیکل ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار با گوانیدین هیدروکلراید ۰/۲۵ تا ۶ مولار می‌باشند.





**شکل (5):** طیف Far-UV-CD مربوط به ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b. طیف دورنگ نمای حلقوی از نمونه پروتئینی موجود در بافر حاوی ۲۵ میلی مولار Tris-Hcl و ۱۰۰ میلی مولار NaCl با pH برابر ۷/۵ در دمای اتاق به دست آمد. شکل الف، ب و ج، به ترتیب نشان دهنده‌ی طیف دورنگ نمای حلقوی مربوط به ناحیه‌ی کینازی در حضور غلظت صفر، ۳ و ۶ مولار گوانیدینوم هیدروکلراید و نیکل ۱۰ میلی مولار می‌باشد.

(۱۸) که در این مطالعه انجام شد. وزن مولکولی پروتئین‌های بیان شده در یک الگوی قبل و بعد از القای IPTG توسط SDS-PAGE، تأیید شد. همچنین از توالی پلی هیستیدین در پروتئین جهت تخلیص استفاده شده است که الگوی SDS-PAGE آن را تأیید کرد. FGFR2b با وزن مولکولی ۳۸ کیلوالتون تولید و تخلیص شد و نشان داده شد که پروتئین محلول و فعال است (شکل ۱).

همانطور که گفته شد، عوامل مختلفی بر عملکرد این پروتئین می‌توانند تأثیر بگذارند و به علت سمیت برخی فلزات و اثر آن‌ها بر مسیرهای سیگنالینگ (۱۰)، در این مطالعه اثر فلز سمی نیکل بر ناحیه کینازی FGFR2b مورد مطالعه قرار گرفت و غلظت‌های مختلف نیکل با غلظت ثابت پروتئین مورد بررسی قرار گرفت.

غلظت بیولوژیکی نیکل در بدن انسان به‌طور متداول به ترتیب در سرم یا پلاسما  $1-14 \mu\text{g/L}$ ، در خون کامل  $1-28 \mu\text{g/L}$  و در ادرار ۲۴ ساعته  $10-100 \mu\text{g/day}$  می‌باشد.

همچنین در واحد SI (International System of Units)، غلظت بیولوژیکی نیکل در سرم یا پلاسما  $17-24 \text{ nmol/L}$  و در خون کامل  $17-476 \text{ nmol/L}$  و در ادرار ۲۴ ساعته  $170-2 \text{ nmol/day}$  می‌باشد (۱۹).

با توجه به غلظت‌های ذکر شده در ابتدا غلظت انتخابی در حد میکرومولار انتخاب شد که بالاتر از حد نرمال نیکل در بدن می‌باشد ولی به علت عدم تغییر در ساختار پروتئین، غلظت به میلی مولار افزایش یافت.

## بحث و نتیجه گیری

با توجه به مطالعات قبلی، تکثیر ژن، فعال شدن غیرطبیعی و یا پلی مورفیسم نوکلئوتید FGFR2، نقش مهمی در پیشرفت سرطان دارد، بنابراین، FGFR2 به‌عنوان یک هدف درمانی جدید برای سرطان‌ها شناخته شده است (۷).

جهش بد معنی و یا تکثیر ژن FGFR2 در سرطان آندومتر، سرطان ریه، سرطان پستان، سرطان معده و سرطان تخمدان می‌تواند رخ دهد (۹). عوامل بسیاری وجود دارد که می‌تواند عملکرد FGFR2b را تحت تأثیر قرار دهد.

در این مطالعه، ناحیه کینازی فاکتور رشد فیبروبلاستی نوع دو، توسط E.coli BL21، به فرم فعال و به‌صورت محلول، بیان و تخلیص شد.

با توجه به اینکه برای مطالعه ساختاری تعامل بین پروتئین و لیگاند به پروتئین خالص در حد میلی‌گرم نیاز است، در مرحله اول، پلاسمید حاوی ژن ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در سیستم بیانی باکتری E.coli BL21 قرار گرفته و پروتئین موردنظر به دست آمد.

در این تحقیق برای ثابت کردن فعال بودن پروتئین، تعامل پروتئین با منطقه SH2 فسفولیپاز C با استفاده از روش PAGE بررسی شد که بررسی نشان داد عملکرد پروتئین فعال و قادر به برقراری ارتباط با یک پپتید حاوی منطقه SH2 می‌باشد.

یکی از روش‌های رایج، ارزیابی القای الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های بیان شده پس از القای ژن موردنظر با IPTG است

به غیر قطبی و نشر بیشتر را نشان می‌دهد. اگر چه این تغییر در ساختار نشان از فشردگی جزئی پروتئین در این محدوده غلظتی را نشان می‌دهد، این تغییر ساختار به حدی نیست که پایداری پروتئین را در شکل ۳ بطور برجسته ای متأثر نماید. از طرفی بررسی ساختار دوم پروتئین با تکنیک CD در حضور و عدم حضور یون نیکل در شکل ۵-الف - ج تغییر برجسته ای نشان نداد. اگر چه ماده گوانیدینوم هیدروکلراید بعنوان یک دنا توره کننده شیمیایی هم ساختار سوم در شکل ۴-الف و ب و هم ساختار دوم شکل ۵-الف تا ج را بصورت وابسته به غلظت متأثر می‌نماید.

در این مطالعه، ناحیه کینازی گیرنده فاکتور رشد فیروبلاستی نوع دو انسانی نو ترکیب، پروتئینی با وزن مولکولی ۳۸ کیلو دالتون تولید و تخلیص شد و تغییرات ساختاری احتمالی آن با فلز سمی نیکل مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که ساختار سوم ناحیه کینازی در حضور نیکل تغییر نمی‌کند و فلز نیکل در غلظت‌های انجام شده تغییرات قابل توجه ای در ساختار پروتئین مورد مطالعه نداشته است، هر چند در غلظت‌های بالاتر ممکن است تاثیرگذار باشد، ولی با توجه به رنج‌های نرمال ذکر شده، از نظر بیولوژیکی فاقد ارزش خواهد بود.

#### قدردانی و تشکر

نویسندگان این پژوهش از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین قدردانی می‌نمایند.

در این مطالعه از دو تکنیک اسپکتروفلوئوریمتری و دورنگ نمایی حلقوی استفاده شد. متدهای استفاده شده جهت مطالعه ساختار پروتئین و تغییرات ساختاری آن‌ها به تنهایی یا با لیگاند بسیار مناسب می‌باشند. اسپکتروفلوئوریمتری فلورسانس تکنیک قدرتمند و بسیار حساس و ابزار دقیقی برای تعیین خصوصیات پروتئین‌ها و ساختار آن‌ها نظیر ثبات، هیدرودینامیک، کینتیک و با بررسی اتصال لیگاند است (۲۰). بطور کلی ویژگی فلوئورسانس پروتئین‌ها بدلیل فلوئوروفورهای ذاتی نظیر ریشه‌های تیروزین، تریپتوفان و فنیل آلانین یا فلوئوروفورهای خارجی که در لیبیل کردن پروتئین‌ها استفاده می‌شوند، ایجاد می‌شود. در واقع این ویژگی در بسیاری از پروتئین‌ها صرفاً مربوط به اسید آمینه تریپتوفان می‌شود (۲۰-۲۲). از آنجاکه اساس این بررسی وابسته به جابجایی الکترون‌ها است روشی بسیار سریع است که می‌توان اینتراکشن بین پروتئین با یک پروتئین دیگر، اسید نوکلئیک، لیگاند‌های کوچک و فولدینگ پروتئین‌ها را مانیتور کرد (۲۱). کاهش شدت فلوئورسانس نشان می‌دهد که این اسید آمینه‌ها در پروتئین دفن شده و یا در برخورد با محلول قرار گرفته‌اند. همچنین یکی از اهداف ضروری در استفاده از این تکنیک به دست آوردن نشر طیف فلوئورسانس در پروتئین نو ترکیب است که خلوص آن از تمام عوامل مصنوعی ثابت شود (۲۲). هر دو تکنیک مورد استفاده، تأیید کننده نتایج یکدیگر بودند. چنانچه در شکل ۲ نشان داده شده است افزایش شدت نشر فلوئورسانس با افزایش غلظت نیکل تا ۱۰۰ میلی مولار تغییر محیط تریپتوفان از قطبی

#### References:

- Brooks AN, Kilgour E, Smith PD. Molecular Pathways: Fibroblast Growth Factor Signaling: A New Therapeutic Opportunity in Cancer. Clin Cancer Res 2012; 18: 1855-62.
- 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 Jr. Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. Mol Cancer Res 2010; 8(11): 1439-52.
- Kan S-h, Elanko N, Johnson D, Cornejo-Roldan L, Cook J, Reich EW et al. Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic
- craniosynostosis. Am J Hum Genet 2002; 70(2): 472-86.
- 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. Int J Mol Med 2009; 23(3): 307-11.
- Matsuda Y, Ueda J, Ishiwata T. Fibroblast growth factor receptor 2: expression, roles, and potential as a novel molecular target for colorectal cancer. Patholog Res Int 2012;2012:574768.
- The Gene Cards Human Gene Database. Developed at the Crown Human Genome Center, Department of Molecular Genetics, the Weizmann Institute of Science; 2014.



9. Katoh M. Cancer genomics and genetics of FGFR2 (Review). *Int J Oncol* 2008;33(2):233–7.
10. Leonard SS, Bower JJ, Shi X. Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Mol Cell Biochem* 2004; 255(1-2): 3-10.
11. Govind P, Madhuri S. Heavy metals causing toxicity in animals and fishes. *Res J Animal, Veterinary and Fishery Sciences* 2014;2(2):17–23.
12. Sridhar MN. Removal of toxic metals (lead &copper) from automotive industry waste water by using fruit peels. *IJAICT* 2014;1(2):188–92.
13. Nordberg FG, Fowler AB, Nordberg M and Friberg L, Editors. Handbook on the toxicology of metals. 3rd Ed. 2007. Chapter 5: 85, Chapter 35: 744-747.
14. Henkler F, Brinkmann J, Luch A. The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis Induced by Metals and Xenobiotics. German Federal Institute for Risk Assessment, Thielallee 88-92, 14195 Berlin, Germany; *Cancers* 2010, 2, 376-396.
15. Salnikow K and Zhitkovich A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: Nickel. *Chem. Res Toxicol* 2008;21, 28–44.
16. Yuan ZQ, Feldman RI, Sussman GE, Coppola D, Nicosia SV and Cheng JQ. AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: Implication of AKT2 in chemoresistance. *J Biol Chem* 2003; 278, 23432–40.
17. Freitas M, Fernandes E. Zinc, cadmium and nickel increase the activation of NF- $\kappa$ B and the release of cytokines from THP-1 monocytic cells. *Metallomics* 2011; 3(11): 1238-43.
18. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd Ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
19. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics* [Internet]. Elsevier Health Sciences; 2012 [cited 2015 May 13]. Available from: <https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=BLRUI4aHhkC&oi=fnd&pg=PT23&dq=Tietz+Textbook+of+Clinical+Chemistry+AND+Molecular+Diagnostics+4nd+Ed.+2006&ots=C2myKUehtN&sig=g3JVY38qiOgVhG75veL278TxezI>
20. Harding SE, Chowdhry BZ. *The Protein-ligand Interactions*. New York, NY, USA: Hydrodynamics and Calorimetry; Oxford University Press; 2001.
21. Ramakrishnan V, Moore PB. Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr Opin Struct Biol* 2001;11(2):144–54.
22. Garland CW, Nibler JW, Shoemaker DP. *Experiments in Physical Chemistry*, 7th Ed. Boston, MA, USA: McGraw-Hill; 2003.

## THE EFFECT OF NICKEL ON THE STRUCTURE OF KINASE REGION OF TYPE 2 FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR

Maryam Toudehrousta<sup>1</sup>, Nematollah Gheibi<sup>2\*</sup>, Darioosh Ilghari<sup>3</sup>, Majid Sirati-Sabet<sup>4</sup>

Received: 5 Jan , 2015; Accepted: 3 Mar , 2015

### Abstract

**Background & Aims:** Fibroblast growth factor receptor type II (FGFR2b) is the essential factor of cellular signal transduction that regulates important biological processes including cell proliferation and differentiation. The impairment in the signaling of these receptors is associated with several human pathology. Various factors including toxic metals can change the signaling pathways. This study was aimed to investigate the effects of Nickel as the toxic metal on the structure of FGFR2b.

**Materials & Methods:** In this study, by using plasmid pLEICS-01, BL21 bacterial, induction of IPTG, electrophoresis and column containing Ni<sup>2+</sup>-NTA the recombinant FGFR2b was expressed and purified. The effects of Ni concentrations under 100 mM on the structure of the protein kinase domain by Spectrofluorometer and Circular dichroism (CD) was studied.

**Results:** The nickel concentrations (under 100 mM) do not have a significant impact on the regular secondary structure of the protein. But they show a minor change in natural emission of tryptophan in the tertiary structure.

**Conclusion:** The main structure and stability kinase domain of the fibroblast growth factor receptor type II does not change by nickel.

**Keywords:** Fibroblast growth factor receptor, Kinase domain, Nickel, Signaling

**Tel:** +98 28 33353006

**Email:** gheibi.n@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2015; 26(2): 165 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> Master Student in Medical Biotechnology, Faculty of Paramedicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor in Biophysics, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran (Corresponding Author)

<sup>3</sup> Assistant Professor in Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor in Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran