



## جایگزینی سیستمین ۱۱ با سرین در یکی از ایزوفرم‌های تیوردوکسین برنج (OsTrx23) با روش جهش‌زایی هدایت شده و اثر آن بر میزان دایمر شدن و فعالیت احیایی

میترا رودگرشتا<sup>۱</sup>، آذر شاه‌پیری<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

<sup>۲</sup> استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۲۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۰۴

### چکیده

تیوردوکسین (Trx) ها، پروتئین‌هایی کوچک هستند که با داشتن یک گروه تیول-دی‌سولفید در جایگاه فعالشان نقش مهمی در تنظیم اکسایش-احیای سلولی دارند. برخلاف جانوران و پروکاریوت‌ها، در گیاهان ایزوفرم‌های مختلفی Trx وجود دارد که بر اساس محل آنها در سلول در هشت زیرگروه  $\alpha$ ,  $m$ ,  $f$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $s$  و  $h$  قرار می‌گیرند. ایزوفرم‌های مختلفی از Trx h در سیتوپلاسم سلول‌های گیاهی وجود دارند. از جمله در برنج نه ایزوفرم Trx h وجود دارد که از این میان ایزوفرم‌های OsTrx20، OsTrx1، OsTrx23، OsTrx18 و علاوه بر دو اسیدآمینوی Cys در جایگاه فعال، دارای یک یا دو Cys اضافی در انتهای آمین توالی خود نیز می‌باشند. در پژوهش حاضر به منظور بررسی نقش Cys انتهای در توالی پروتئین OsTrx23، با روش جهش‌زایی هدایت‌شده Cys11 با Ser جایگزین شد. پروتئین جهش‌یافته (C11S<sub>OsTrx23</sub>) و طبیعی (Wt<sub>OsTrx23</sub>) در باکتری اشریشیاکلی سویه روزتا به صورت دگرساخت بیان و خالص‌سازی شدند و فعالیت احیایی آنزیم‌های طبیعی و جهش‌یافته در واکنش با انسولین بررسی شد. همچنین دایمر و مونومر بودن این پروتئین‌ها از طریق ران کردن آنها در دو شرایط احیاء و عدم احیاء بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده سیستمین انتهایی در OsTrx23، با ایجاد پیوند دی‌سولفیدی نقش کلیدی در دایمر شدن پروتئین دارد اما تأثیری بر فعالیت احیایی ندارد.

**کلمات کلیدی:** تیوردوکسین، جهش‌زایی هدایت‌شده، سیستمین، دایمر شدن

## مقدمه

Trx بر خلاف (2004; Gelhaye et al. 1998). های کلروپلاستی که احیای آنها وابسته به نور و با حضور فردوکسین و فردوکسین ردوکتاز صورت می‌گیرد، احیای Trx h و Trx o وابسته به NADPH بوده و با واسطه آنزیم تیوردوکسین ردوکتاز وابسته به NADPH صورت می‌گیرد (Jacquot et al. 1997; Meyer et al. 2005). چندین ایزوفرم Trx h در گیاهان عالی وجود دارد (Meyer et al. 2002). به طوری که در گیاه آرابیدوپسیس<sup>۲</sup> هشت، در گندم پنج و در جو دو ایزوفرم از Trx h وجود دارد. تیوردوکسین h نقشی اساسی در رشد و نمو گیاه دارد. نقش Trx h در جوانه‌زنی بذر غلات به خوبی مستند شده است (Shahpiri et al. 2009). علاوه بر آن حضور Trx h در آوند آبکش برنج به نقش پیام‌رسانی این پروتئین در گیاه اشاره می‌کند (Florencio et al. 1988; Gelhaye et al. 2004). در ژنوم گیاه برنج ۳۰ ژن کدکننده Trx وجود دارد که از این ۳۰ ژن، نه ژن رمزگردان Trx h می‌باشند (Nuruzzaman et al. 2008). آنالیز توالی انجام‌شده روی این نه ایزوفرم نشان می‌دهد که در بین این ایزوفرم‌ها، ایزوفرم‌های OsTrx15 و OsTrx18، OsTrx23، OsTrx20 دارای سیستمین اضافی علاوه بر دو سیستمین جایگاه فعال در قسمت انتهایی پروتئین می‌باشند (Papzan et al. 2012). برای پی بردن به نقش این سیستمین سوم در انتهای آمینی پروتئین

تیوردوکسین (Trx) در گیاهان به عنوان منبع الکترون‌دهنده به طیف وسیعی از پروتئین‌ها که در متابولیسم‌های مختلف سلولی مانند فتوسنتز، تبادلات غشایی، ترجمه، تجمع و پیچش پروتئین‌ها دخالت دارند، عمل می‌کند (Gelhaye et al. 2004). با توجه به نقش Trx در احیای بسیاری از پروتئین‌های مهم در متابولیسم سلولی، شناخت سازوکار عمل این آنزیم و چگونگی برهم‌کنش آن با پروتئین‌های هدف و یا با تیوردوکسین ردوکتاز<sup>۱</sup> به عنوان پروتئین الکترون‌دهنده موضوع مورد مطالعه بسیاری از محققان می‌باشد (Gelhaye et al. 2004). پیوند دی‌سولفیدی موجود در یک پلی‌پپتید، بین دو پلی‌پپتید در یک پروتئین و یا بین دو سیستمین موجود در یک پروتئین، نقش مهمی در پایداری ساختمان پروتئین ایفا می‌کند. Trx ها با احیای برگشت‌پذیر پیوندهای دی‌سولفیدی در بسیاری از مولکول‌های هدف، باعث تنظیم فعالیت آن‌ها می‌شوند. بر خلاف پستانداران، باکتری‌ها و قارچ‌ها، گیاهان دارای ایزوفرم‌های مختلفی از Trx می‌باشند، که بر اساس ساختمان اولیه و محل قرارگیری در سلول به هشت زیرخانواده تقسیم می‌شوند. Trx های f، m، x و y در کلروپلاست، Trx o در میتوکندری و ایزوفرم‌های Trx h در سیتوزول قرار دارند. با این حال Trx h در قسمت‌های دیگر سلولی چون هسته، شبکه آندوپلاسمی و میتوکندری شناسایی شده‌اند (Kang et al.

<sup>2</sup> Arabidopsis<sup>1</sup> Thioredoxin reductase

با Ser با Cys آمینه اسید آمینو جایگزینی (2012). استفاده از جهش‌زایی هدایت شده انجام شد (Alam et al. 2011; Cazalis et al. 2006).

جفت پرایمرهای ۳' - CGC CTCC CAC  
AAC AAG GAC GAA TTC GAC GC  
-۵' و ۳' GCG TCG AAT TCG TCC  
-۵' TTG TTG TGGGAG GCG-

(اسید آمینه‌ی تغییر یافته با قلم سیاه و زیر خط مشخص شده است) با استفاده از نرم افزار X (www.bioinformatics.org/primerx/) و

با تغییر کدون‌های رمزکننده‌ی اسید آمینه‌ی سیستمین طراحی شدند. به دلیل طویل بودن منطقه تکثیر (ژن به همراه پلاسمید)، واکنش PCR بر روی OsTrx23 - pET15b با استفاده از آنزیم pfu (فرمتاز) و پرایمرها انجام شد. واکنش PCR به مدت یک دقیقه در مرحله واسرشت سازی اولیه با دمای ۹۵ درجه سلسیوس و یک چرخه دمایی؛ ۱۸ چرخه دمایی و مدت یک دقیقه با دمای ۹۵ درجه سلسیوس، یک دقیقه با دمای اتصال ۶۰ درجه سلسیوس، یک دقیقه با دمای گسترش ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت یک چرخه دمایی به مدت ۱۲ دقیقه در مرحله گسترش نهایی با دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. برای از بین بردن پلاسمید والدی در نواحی متیله (که دارای ژن غیر جهش‌یافته می باشد)، محصول PCR به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سانتیگراد با آنزیم DpnI گرمگذاری شد.

OsTrx23، سیستمین ۱۱ در این پروتئین با سرین با روش جهش‌زایی هدایت شده جایگزین شد. پروتئین‌های جهش‌یافته و طبیعی به صورت دگرساخت در باکتری بیان شده و با استفاده از کروماتوگرافی جذبی خالص سازی شدند. دایمر شدن پروتئین‌ها با استفاده از آنالیز ژل SDS-PAGE تحت شرایط وجود و عدم وجود DTT به عنوان عامل احیا کننده بررسی شد به علاوه فعالیت احیایی پروتئین‌های طبیعی و جهش‌یافته نیز در واکنش احیایی با انسولین به عنوان سوسترا اندازه گیری شد.

#### مواد و روش‌ها

##### آنالیز توالی

توالی آمینواسیدی ایزوفرم‌های Trx h برنج از پایگاه داده ژنوم برنج (<http://rice.plantbiology.msu.edu>) گرفته شد. هم‌ردیف‌سازی توالی کدکننده‌ی OsTrx23 با توالی آمینواسیدی ایزوفرم‌های تیوردوکسین h برنج با استفاده از برنامه Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) انجام شد.

##### طراحی آغازگر و ایجاد جهش به روش جهش‌زایی هدایت‌شده

ژن رمزگردان OsTrx23 که قبلاً در ناقل بیانی pET-15b همسانه سازی شده بود به عنوان ماده اولیه ژنتیکی در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت (Papzan et al.).

حاوی ژن جهش یافته بعد از تأیید آنزیمی برای تأیید توالی ارسال شد.

### بیان و تولید پروتئین‌های نو ترکیب جهش یافته و طبیعی

پلاسمید حاوی ژن جهش یافته پس از توالی یابی به منظور تولید پروتئین جهش یافته به روش شوک الکتریکی وارد سلول‌های مستعد باکتریایی *اشریشیا کلای* سویه روزتا (DE3) شد. به دلیل حضور ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین بر روی پلاسمید pET-15b و هم‌چنین مقاومت باکتری روزتا (DE3) به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل، سلول‌های باکتری ترانسفورم شده حاوی پلاسمید جهش یافته در محیط LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) و کلرامفنیکل (۵ میلی گرم بر لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بر روی انکوباتور شیکردار با ۱۸۰ دور در دقیقه کشت شدند. میزان ۵ میلی لیتر از کشت‌های باکتریایی به ۴۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB مایع حاوی آنتی بیوتیک مناسب اضافه و جذب نوری کشت باکتریایی (۶۰۰nm) اندازه گیری شد. سپس نمونه‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه ی سلسیوس با ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند تا جذب نوری کشت باکتریایی به ۰/۶ رسید. کشت‌ها اضافه شد. در این زمان القاکننده‌ی IPTG به غلظت نهایی ۰/۱ میلی مولار به کشت‌ها اضافه و کشت باکتریایی به مدت ۴ ساعت دیگر ادامه یافت. پس از گذشت ۴ ساعت، سوسپانسیون باکتری در لوله‌های ۵۰ میلی لیتری

این آنزیم توانایی هضم رشته والدی را در نواحی متیله و همی متیله داشته، در نتیجه باعث هضم پلاسمید حاوی ژن غیر جهش یافته و تک رشته ای شدن محصول PCR خواهد شد. در حالی که DNA جهش یافته‌ی تازه سنتز شده فاقد نواحی متیله بوده توسط این آنزیم برش نمی‌یابد. پس از انتقال پلاسمید تک رشته‌ای حاوی ژن جهش یافته به باکتری *DH5α* به روش شوک الکتریکی، پلاسمید حاوی ژن جهش یافته با استفاده از سیستم همانندسازی میزبان قادر به همانند سازی و تشکیل دو رشته می باشد. با توجه به اینکه آنزیم *DpnI* پلاسمید مادری حاوی ژن طبیعی را در نواحی متیله کاملاً هضم می کند، کلونی‌های حاصل به احتمال زیادی دارای ژن جهش یافته می باشند. با این حال جهت تأیید از هضم آنزیمی استفاده شد. به منظور تأیید کلونی‌های دارای ژن جهش یافته، برش آنزیمی پلاسمید pET15b-OsTrx23 توسط آنزیم *SalI* انجام شد. آنزیم *SalI* با شناسایی دو جایگاه برش در پلاسمید حاوی ژن جهش یافته تولید دو قطعه ۷۰۰bp و ۵۴۰۰bp می کرد. در مقایسه پلاسمید حاوی ژن طبیعی تنها یک جایگاه شناسایی برای برش توسط این آنزیم داشت و بدین شکل کلونی‌های حاوی پلاسمیدهای دارای ژن جهش یافته کاملاً مشخص بودند. پلاسمید

پروتئین های غیر اختصاصی چسبیده به ستون از محلولی حاوی ۱۰٪ بافر B (ایمیدازول ۴۰۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی مولار و ۳۰ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک، pH=8) و ۹۰٪ بافر A استفاده شد. سپس جهت جدا سازی پروتئین نوترکیب حاوی His-tag از ستون، شیب غلظتی از ۱۰-۵۰٪ بافر B مورد استفاده قرار گرفت. محلول حاوی پروتئین در لوله های اپندورف ۱/۵ میلی لیتری جمع آوری شدند. پروتئین های خالص شده برای آنالیز کیفیت و خلوص بر روی ژل SDS-PAGE بارگذاری شدند. غلظت پروتئین های نوترکیب و جهش یافته با استفاده از اندازه گیری میزان جذب پروتئین در طول موج ۲۸۰ نانومتر و استفاده از قانون بیر-لمبرت تعیین شد. فعالیت پروتئین های خالص طی واکنش با انسولین به عنوان سوبسترا با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر، بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH برابر با ۶/۵، EDTA<sup>۴</sup> با غلظت ۰/۲ میلی مولار و DTT<sup>۵</sup> با غلظت ۱ میلی مولار و غلظت های ۵ میکرومولار از هر کدام از پروتئین های نوترکیب جهش یافته و طبیعی در طول موج ۶۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Beckman DU 530) اندازه گیری شد. لازم به ذکر است یک واکنش حاوی تمام ترکیبات ذکر شده در واکنش بدون حضور تیوردوکسین به عنوان واکنش کنترل در نظر گرفته شد.

به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردیدند و سپس محلول رویی لوله ها دور ریخته و رسوب حاصل در ۱۰ میلی لیتر از بافر pH=8 Tris-HCl ۱۰mM سوسپانسیون شد. دیواره سلول های باکتری با استفاده از روش امواج صوتی با دامنه ی امواج<sup>۱</sup> ۱۰۰٪ و چرخه ی<sup>۲</sup> ۶۰٪ تخریب شد و پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس، فاز رویی برای بررسی میزان بیان پروتئین های محلول بر روی ژل آکریل آمید ۱۲٪ بارگذاری گردیدند.

### خالص سازی پروتئین و اندازه گیری فعالیت آنزیم جهش یافته و طبیعی

پروتئین های نوترکیب تولید شده به دلیل داشتن منطقه رمزگردان پلی هیستیدین (His-tag) در بالادست پلاسمید pET-15b دارای دنباله ی پلی هیستیدینی در انتهای آمین می باشند. پروتئین های نوترکیب جهش یافته و طبیعی تولید شده در فاز محلول توسط ستون های His-trap (GE Healthcare) حاوی رزین نیکل و به روش کروماتوگرافی جذبی<sup>۳</sup> خالص سازی شدند. برای این منظور ابتدا بافر بارگذاری A (ایمیدازول ۱۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی مولار و ۳۰ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک، pH =8) از ستون عبور داده شد. سپس پروتئین استخراج شده از ستون عبور داده شده و برای شستشوی

<sup>۴</sup> Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

<sup>۵</sup> 1,4-Dithioerythritol

<sup>۱</sup> amplitude

<sup>۲</sup> cycle

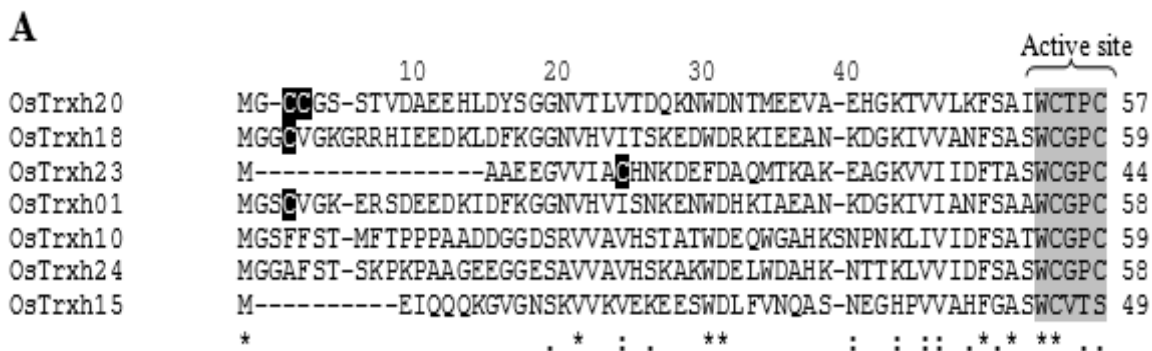
<sup>۳</sup> Affinity chromatography

نتایج و بحث

همردیف سازی و تجزیه و تحلیل توالی

مقایسه توالی آمینواسیدی بین هفت ایزوفرم OsTrxh نشان داد که از بین این ایزوفرم‌ها، OsTrx18، OsTrx23 و OsTrx15 غیر از دو

سیستین (Cys) موجود در جایگاه فعال، دارای یک سیستین اضافی در انتهای آمین می باشند. در حالیکه ایزوفرم OsTrx20 دارای دو سیستین اضافی در این انتهاست (شکل ۱).

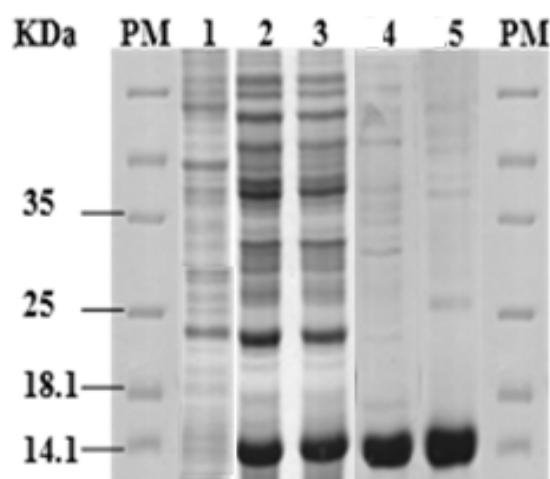


شکل ۱- آنالیز توالی و همردیف سازی OsTrx23 با Trx های h از گیاه برنج با استفاده از نرم افزار Clustal W. سیستین‌های انتهای آمین با رنگ مشکی و منطقه جایگاه فعال با رنگ خاکستری نشان داده شده است.

**Figure 1-** Sequences analysis and multiple alignment between different rice Trxh isoforms using the Clustal W software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). The active site is shown with gray box and N- terminal Cys residues are shown black.

تایید بیان پروتئین جهش یافته و طبیعی در باکتری

پس از القای باکتری‌ها با IPTG، فاز محلول پروتئین از باکتری‌ها استخراج شد و آنالیز کل پروتئین محلول بر روی ژل SDS-PAGE صورت گرفت. با توجه به وجود منطقه کد کننده پلی هیستیدین (His-) tag در بالا دست جایگاه کلون سازی در پلاسمید pET15b پروتئین‌های نوترکیب حاصل دارای دنباله پلی هیستیدین در انتهای آمینو می باشند. وزن مولکولی پیش بینی شده برای هر دو مولکول پروتئین جهش یافته و طبیعی ۱۵/۳۱ کیلودالتون و نقطه ی ایزوالکتریک آن ها ۶/۲۹ می باشد. وجود باندهای پلی پپتیدی با وزن مولکولی مورد نظر بر روی ژل، تولید پروتئین‌های نوترکیب His-C11S<sub>OsTrx23</sub> و His-Wt<sub>OsTrx23</sub> در مقایسه با سوبه کنترل را تایید کرد (شکل ۲). پروتئین‌های نوترکیب تولید شده، با استفاده از کروماتوگرافی جذبی و ستون‌های حاوی رزین نیکل (Ni<sup>2+</sup>)، خالص شدند و کیفیت خالص سازی با استفاده از SDS-PAGE بررسی شد (شکل ۲).



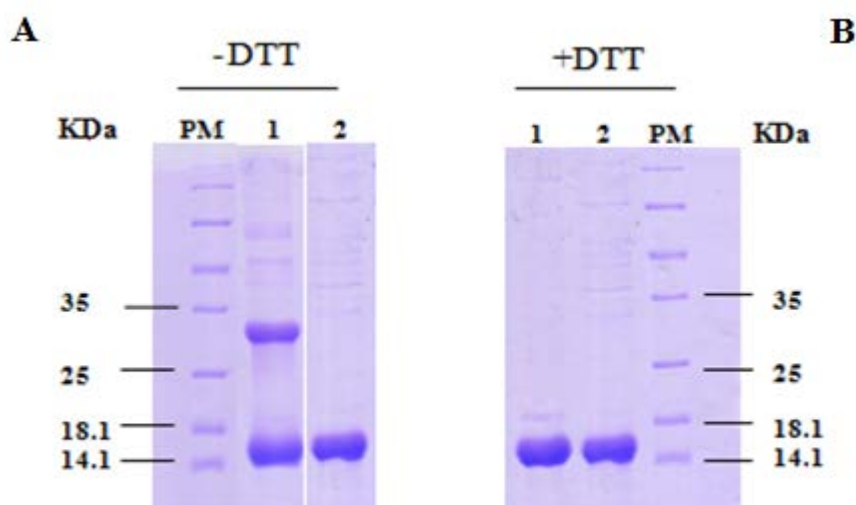
شکل ۲- آنالیز SDS-PAGE جهت تایید بیان و خالص سازی. پروتئین استخراج شده از باکتری حاوی پلاسמיד pET15b به عنوان کنترل منفی (ستون ۱)، pET15b-Wt<sub>OsTrx20</sub> (ستون ۲) و pET15b-C11S<sub>OsTrx23</sub> (ستون های ۳) ۴ ساعت پس از اضافه کردن IPTG. پروتئین های خالص سازی شده His-Wt<sub>OsTrx20</sub> و His-C11S<sub>OsTrx20</sub> (ستون های ۴ و ۵).

**Figure 2- SDS-PAGE analysis for verification of expression and purification. Total soluble protein extracted from *E. coli* harboring pET15b (lane 1), pET15b-Wt<sub>OsTrx23</sub> (lanes 2), pET15b-C11S<sub>OsTrx23</sub> (lane 3), 4 hours after addition of IPTG. Purified His-Wt<sub>OsTrx23</sub> (lane 4), and His-C11S<sub>OsTrx23</sub> (lane 5). PM: Protein Marker.**

طبیعی در شرایط عدم وجود DTT به عنوان عامل احیا کننده پیوندهای دی سولفیدی در پروتئین، پروتئین جهش یافته را تنها در فرم مونومر نشان داد. در حالیکه در این شرایط، پروتئین طبیعی به صورت مخلوطی از دو فرم مونومر و دایمر دیده شد. (شکل ۳- A). بنابراین به نظر می رسد Cys<sub>11</sub> نقش مهمی در دایمر شدن پروتئین دارد و در واقع دایمر بودن نسبی در پروتئین طبیعی نتیجه حاصل از پیوند دی سولفیدی بین دو رشته پلی پپتیدی از طریق Cys<sub>11</sub> می باشد.

بررسی میزان دایمر شدن پروتئین ها در شرایط احیا و غیر احیا با استفاده از DTT

بررسی میزان دایمر شدن پروتئین ها در نتیجه جایگزینی سیستمین انتهای آمین با سرین و تأثیر این سیستمین بر دایمر شدن پروتئین با آنالیز SDS-PAGE پروتئین های جهش یافته و طبیعی انجام شد. در شرایط حضور DTT به عنوان واسرشت کننده پیوندهای دی سولفیدی هر دو پروتئین طبیعی و جهش یافته تنها در فرم مونومر دیده شدند (شکل ۳- B). این در حالی است که آنالیز SDS-PAGE بر پروتئین های جهش یافته و



شکل ۳- آنالیز پروتئین‌های جهش‌یافته  $C11S_{OsTrx23}$  و طبیعی  $WT_{OsTrx23}$  بر روی ژل SDS-PAGE در شرایط (A) عدم حضور DTT به عنوان عامل احیا کننده. پروتئین طبیعی  $His-WT_{OsTrx23}$  (ستون ۱) و پروتئین جهش‌یافته  $His-C11S_{OsTrx23}$  (ستون ۲). (B) حضور DTT به عنوان عامل احیا کننده. پروتئین طبیعی  $His-WT_{OsTrx23}$  (ستون ۱) و پروتئین جهش‌یافته  $His-C11S_{OsTrx23}$  (ستون ۲). PM. نشانگر پروتئینی (فرمتاز).

**Figure 3-** (A) Effects of non reducing conditions on dimerization of  $WT_{OsTrx23}$ (lane 1) and  $C11S_{OsTrx23}$ (lane 2). (B) Effects of reducing condition on dimerization of  $WT_{OsTrx23}$ (lane 1) and  $C11S_{OsTrx23}$ (lane 2). PM: Protein marker (fermentas).

(1979). انسولین پروتئینی است که دو زنجیره  $\alpha$  و  $\beta$  در آن به وسیله پیوند دی سولفیدی به یکدیگر متصل شده‌اند. احیای باندهای دی سولفیدی توسط تیوردوکسین احیا شده در این واکنش منجر به رسوب زنجیره  $\beta$  شده که تشکیل این رسوب سفید و اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۶۵۰ نانومتر نشان‌دهنده‌ی پیشرفت واکنش می باشد. در این مطالعه نتایج حاصل از مقایسه فعالیت احیایی پروتئین‌های جهش‌یافته و طبیعی در واکنش حاوی DTT و انسولین نشان داد که سرعت رسوب دهی

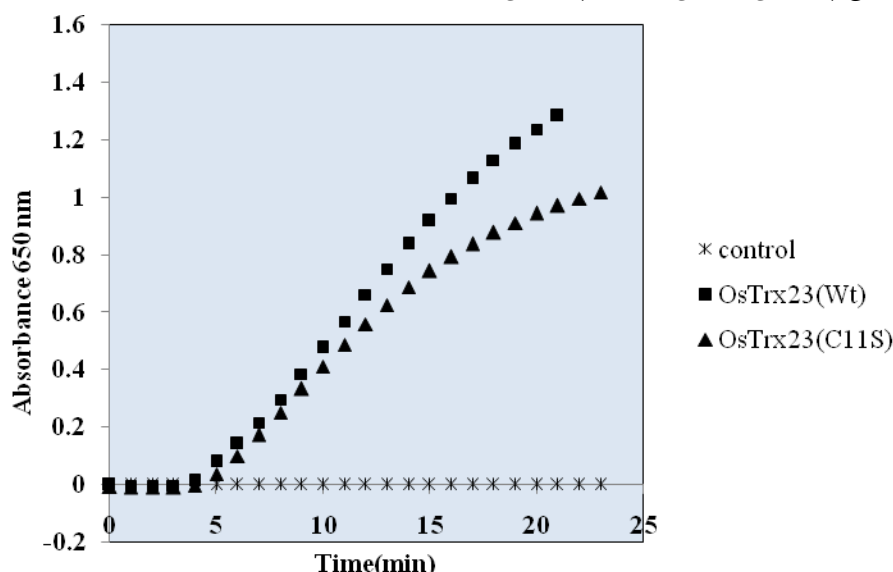
اندازه‌گیری فعالیت تیوردوکسین‌های طبیعی و جهش‌یافته در واکنش با انسولین

در سیستم NTR/Trx الکترون از NADPH به NTR و از NTR به Trx h انتقال می‌یابد. تیوردوکسین احیا شده نیز متعاقباً به عنوان عامل احیا کننده‌ی بسیاری از پروتئین‌ها قادر به احیای پیوندهای دی‌سولفیدی در آن‌ها می باشد. تحقیقات هولمگرن و همکاران در سال ۱۹۷۹ نشان داد که DTT نیز به عنوان عامل احیا کننده در محیط *in vitro* قادر به احیای باندهای دی‌سولفیدی در انسولین می‌گردد ( Holmgren )



طبیعی برای احیای انسولین وجود نداشت (شکل ۴).

انسولین حدود  $0,089 A_{650}/\text{min}$  تخمین زده شد که در هر دو واکنش تقریباً یکسان بوده و تفاوتی بین فعالیت آنزیمی پروتئین جهش یافته با پروتئین



شکل ۴- اندازه گیری فعالیت آنزیمی پروتئین جهش یافته  $C11S_{OsTrx23}$  در مقایسه با پروتئین طبیعی  $OsTrx23$  در واکنش با انسولین. واکنش شامل ۵ میکرومولار از نمونه پروتئینی و ۱ میلی گرم در میلی لیتر انسولین می باشد. پیشرفت واکنش با اندازه گیری میزان جذب در طول موج ۶۵۰ نانومتر بررسی شد. نمونه ی کنترل شامل واکنش فاقد  $Trxh$  می باشد.

**Figure 4- DTT- dependent insulin reduction assay. Comparing the activity of  $Wt_{OsTrx23}$  and  $C11S_{OsTrx23}$  proteins with insulin. 5  $\mu\text{M}$  of each protein sample was reacted with 1mg/ml of insulin and the absorbance was measured spectrophotometrically at 650 nm. Control shows the reaction containing insulin and DTT without addition  $Trx h$ .**

با جایگزینی هر اسیدآمینه ی سیستئین در جایگاه فعال  $Trx$  ها، فعالیت اکسیدوردوکتازی تیوردوکسین ها به مقدار قابل توجهی کاهش یافته یا به طور کامل از بین خواهد رفت (Alam *et al.* 2011). پیش از این حضور یک سیستئین اضافی در انتهای آمین  $Trx$  های نوع h علاوه بر دو سیستئین در جایگاه فعال، در تعداد کمی از گیاهان از قبیل صنوبر (Gelhaye *et al.* 2003)، جو (Maeda *et al.* 2003) و گندم (Cazalis *et al.* 2006) گزارش شده است. جایگزینی این سیستئین انتهایی با سرین در  $Trxh1$  از گیاه گندم نشان داد که این اسیدآمینه تأثیر اندکی روی فعالیت احیایی پروتئین داشته اما نقش اساسی در دایمر شدن پروتئین دارد (Cazalis *et al.* 2006). دایمر شدن در پروتئین ها از طریق این سیستئین های غیر احیایی و تشکیل پیوندهای دی سولفیدی درون مولکولی در  $Trxh1$  در انسان نیز مشاهده شده است (Watson *et al.* 2003). ایزوفریم

با جایگزینی هر اسیدآمینه ی سیستئین در جایگاه فعال  $Trx$  ها، فعالیت اکسیدوردوکتازی تیوردوکسین ها به مقدار قابل توجهی کاهش یافته یا به طور کامل از بین خواهد رفت (Alam *et al.* 2011). پیش از این حضور یک سیستئین اضافی در انتهای آمین  $Trx$  های نوع h علاوه بر دو سیستئین در جایگاه فعال، در تعداد کمی از گیاهان از قبیل صنوبر (Gelhaye *et al.* 2003)، جو (Maeda *et al.* 2003) و گندم (Cazalis *et al.* 2006) گزارش شده است. جایگزینی این سیستئین انتهایی با سرین در  $Trxh1$  از گیاه گندم نشان داد که این اسیدآمینه تأثیر اندکی روی فعالیت احیایی پروتئین داشته اما نقش اساسی در دایمر شدن پروتئین دارد (Cazalis *et al.* 2006). دایمر شدن در پروتئین ها از طریق این سیستئین های غیر احیایی و تشکیل پیوندهای دی سولفیدی درون مولکولی در  $Trxh1$  در انسان نیز مشاهده شده است (Watson *et al.* 2003). ایزوفریم

پروتئینی نشان داد که این سیستم نقش حیاتی در دایمر شدن پروتئین داشته اما تأثیری بر فعالیت اکسیدورداکتازی پروتئین ندارد. فعالیت احیایی پروتئین‌ها نیز با استفاده از واکنش با انسولین اندازه‌گیری شد. فعالیت هر دو پروتئین جهش‌یافته و طبیعی با سرعت تقریباً مشابه در احیای انسولین تخمین زده شد که این برابری تقریبی در فعالیت احیایی پروتئین نشان دهنده‌ی این مسئله است که برخلاف سیستم‌های موجود در جایگاه فعال Trx ها، که نقشی اساسی در فعالیت احیایی پروتئین‌ها دارند، این سیستم‌ها انتهای تأثیری بر قدرت احیایی OsTrx23 ندارد.

OsTrx23 با یک سیستم اضافی در انتهای آمین پروتئین، یکی از تیوردوکسین‌های نوع h در گیاه برنج است که تحت شرایط غیر احیا (بدون حضور DTT به عنوان عامل واسرشت کننده‌ی پروتئین) به صورت جزئی تشکیل دایمر می‌دهد. برای بررسی نقش این سیستم‌های انتهای و تأثیر آن بر دایمر شدن پروتئین در سطوح ملکولی، سیستم‌های انتهای آمین به روش جهش‌زایی هدایت شده با سرین جایگزین شد. جهش‌یافته C11S<sub>OsTrx23</sub> همانند پروتئین طبیعی Wt<sub>OsTrx23</sub> به صورت دگرساخت بیان و خالص‌سازی شد. آنالیز ژل SDS-PAGE پروتئین‌ها برای بررسی باندهای

#### منابع

- Alam A, Goyal M, Iqbal MS, Bindu S, Dey S, Maity P, Mascarenhas NM, Ghoshal N, Bandyopadhyay U, Pal CH (2011). Cysteine-3 and cysteine-4 are essential for the thioredoxin-like oxidoreductase and antioxidant activities of Plasmodium falciparum macrophage migration inhibitory factor. *Free Radical Biology and Medicine* 50(11): 1659- 1668.
- Cazalis R, Pulido P, Aussenac T, Pérez-Ruiz JM, Cejudo FJ (2006). Cloning and characterization of three thioredoxin h isoforms from wheat showing differential expression in seeds. *The Journal of Experimental Botany* 57: 2165- 2172.
- Florencio FJ, Yee BC, Jonson T, Buchanan BB (1988). An NADP/thioredoxin system in leaves: purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin h from spinach. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 266:496-507.
- Gelhaye E, Rouhier N, Gerard J, Jolivet Y, Gualberto J (2004). Thioredoxin h regulates enzymes of plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101:14545-14550.
- Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot J (2004). The thioredoxin h system of higher plant. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:265-271.
- Gelhaye E, Rouhier N, Vlamis GA, Girardet JM, Sautie PE, Sayzet M, Martin F, Jacquot JP (2003). Identification and characterization of a third thioredoxin h in poplar. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:629- 635.

- Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP (2004). The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 265- 271.
- Holmgren A, Soderberg B, Eklund O, Branden C (1975). Three dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin –S2 to 2.8 Å resolution . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72: 2305-2309.
- Holmgren A (1968). The amino acid sequence of the protein from Escherichia coli B. *European Journal of Biochemistry* 6: 475- 484.
- Holmgren A (1979). Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *The journal of biological chemistry* 254:9627-9632.
- Jacquot J, Lancelin P, Meyer JM (1997). Thioredoxins: structure and function in plant cells. *New Phytologist* 136:543-570.
- Kang S, Chae W, Seo HZ, Kim MS, Baines K, Rhee JC (1998). Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *The Journal of Biology and Chemistry* 273:6297-6302.
- Maeda K, Finnie C, Østergaard O, Svensson B (2003). Identification, cloning and characterization of two thioredoxin h isoforms, HvTrxh1 and HvTrxh2, from the barley seed proteome. *European Journal of Biochemistry* 270: 2633- 2643.
- Meyer Y, Reichheld JP, Vignols F (2005). Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynthesis Research* 86: 419- 433.
- Meyer Y, Vignols F, Reichheld JP (2002). Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods in Enzymology* 347: 394- 402.
- Nuruzzaman M, Gupta M, Zhang CH, Wang L, Xie L, Xiong L, Zhang Q, Lian X (2008). Sequence and expression analysis of the thioredoxin protein gene family in rice. *Molecular Genetics and Genomics* 280: 139- 151.
- Papzan Z, Shahpiri A (2012). Comparison of Reduction Activity of three Rice (*Oryza sativa*) Thioredoxin Isoforms in Reaction with Insulin. *Iranian Journal of Agricultural Biotechnology* 4(1): 35-48.
- Schürmann P, Jacquot JP (2000). Plant thioredoxin systems. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 371- 400.
- Shahpiri A, Svensson B, Finnie C (2009). From Proteomics to structural studies of cytosolic/mitochondrial –type thioredoxin system in Barley seeds. *Molecular Plant* 2:378-389.
- Watson WH, Pohl J, Montfort WR, Stuchlik O, Reed MS, Powis G, Jones DP (2003). Redox Potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif. *The Journal of Biology and Chemistry* 278 (35): 33408- 33415.

**Effect of substitution of Cys<sup>11</sup> by Ser on the activity and dimerization of one of rice thioredoxin isoforms (OsTrx23) using site-directed mutagenesis**

Roodgar Nashta M.<sup>1</sup>, Shahpiri A.\*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MSc; Department of Agriculture Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

<sup>2</sup>Assist. Prof., Department of Agriculture Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

**Abstract**

Thioredoxins (Trxs) are low-molecular-mass proteins with two cysteins in their active site WC(G/P)PC which are involved in reversible reduction of disulfide bonds. In contrast to animals and prokaryotes that typically possess one or a few genes encoding Trxs, higher plants contain eight different Trx types: *f*, *m*, *x*, *y*, *z*, *o*, *s*, and *h*. The cytoplasmic type Trxs (*h*-type) constitute a particularly large subgroup in higher plants. For instance, in the genome of rice (*Oryza sativa*), nine genes encoding putative Trx *h* were identified. Among these nine isoforms OsTrx20, OsTrx1, OsTrx18 and OsTrx23 have additional cys residue in N-terminal in comparison to the other OsTrx*h* isoforms. In order to study the critical role of this cysteine in OsTrx23, we replaced it with serine using site-directed mutagenesis. Both wild type and mutant proteins were heterologously expressed in Rosetta (DE3)- a strain of *Escherichia coli*. The purification of these proteins enabled us to compare their activity in reaction with insulin as substrate. In addition, the dimerization of proteins were analysed under non-reducing and reducing condition with DTT. The results show that whereas wild type OsTrx23 is present in monomer and dimer forms, the mutant OsTrx23<sub>(C11S)</sub> is dominantly in monomer form. The activity of mutant was almost similar to wild type. These results suggest that Cys11 at the N-terminal of OsTrx23 has a key role in dimerization of this protein by creating disulfide bonds.

**Keywords:** Thioredoxin, Site-directed mutagenesis, cysteine, protein dimerization.

\* Corresponding Author: Shahpiri A.

Tel: 03133913354

Email: a.shahpiri@cc.iut.ac.ir