



مهندسی پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA) انسانی با افزودن قطعه ژن کاسکوتین سس جهت افزایش پایداری و فعالیت آن

حیدر سیفی نبی آباد^۱، خسرو پیری^{۲*}، معصومه امینی^۳

^۱ عضو هیات علمی گیاهان دارویی دانشگاه نهاوند، نهاوند، ایران

^۲ عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

^۳ فارغ التحصیل دکتری بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۲

چکیده

پروتئین tPA یک عامل اختصاصی فیبرین است که موجب حل کردن لخته‌های خونی و جلوگیری از سکتته‌ی قلبی و مغزی می‌گردد. کاسکوتین یک پروتئاز با فعالیت و پایداری بالا می‌باشد که در گیاهانی مثل سس وجود دارد و گیاه پرازیت از آن برای نفوذ به میزبان استفاده می‌کند. هزینه تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان ۱۰ الی ۵۰ برابر کمتر از تولید همان پروتئین توسط باکتری است. اما تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان هنوز با چالش‌های مهمی از جمله عملیات پایین دستی و تخلیص، پایین بودن فعالیت و پایداری پروتئین روبرو می‌باشد. پروتئین نوترکیب tPA تولید شده در گیاهان پایداری و فعالیت پایینی دارد. هدف این تحقیق، افزایش پایداری tPA با استفاده از مهندسی پروتئین و افزودن جایگاه فعال آنزیم کاسکوتین از گیاه سس به tPA و تولید پروتئین شیمیری می‌باشد. ابتدا از گیاه سس استخراج DNA صورت گرفت و سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعه مورد نظر از ژن کاسکوتین تکثیر گردید. سپس به کمک تکنیک SOEing PCR قطعه کاسکوتین به ژن tPA متصل شد. قطعه tPA شیمیری حاصله تحت کنترل پیشبر CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS قرار گرفت. توالی افزایش دهنده Kozak و مترادف رمز کننده پپتید نشانه KDEL، به ترتیب به دو انتهای آمینی و کربوکسیلی ژن tPA افزوده شدند. سازه تهیه شده pBI(tPA) به روش انتقال ژن مبتنی بر اگروباکتریوم به ژنوم گیاه توتون منتقل و گیاهان تراریخت روی محیط حاوی کانامایسین انتخاب شدند. ارزیابی گیاهان تراریخت با استفاده از فنون RT-PCR، SDS-PAGE، وسترن بلات و زیموگرافی انجام شد. نتایج نشان داد که ژن شیمیری tPA به گیاهان توتون منتقل شده و در مقایسه با tPA نرمال فعالیت و پایداری آن بهبود یافته است. بنابراین مهندسی پروتئین و استفاده از بخش‌هایی از پروتئین‌های گیاهی با فعالیت و پایداری بالاتر جهت افزایش ماندگاری و فعالیت داروهای نوترکیب، می‌تواند راهکار جدیدی برای افزایش کارایی این داروها باشد.

کلمات کلیدی: مهندسی پروتئین، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی، شیمیری، افزایش فعالیت، کاسکوتین.

اروکیناز^۲ و فعال کننده پلاسمینوژن بافتی^۳ (t-PA) پروتئین (Chen *et al.*, 2005; Mosher, 1990). پروتئین tPA، فعال کننده اصلی پلاسمینوژن در خون می-باشد در صورتی که نقش اصلی uPA پروتئولیز وابسته به بافت است و عقیده بر این است که نقش آن در حذف فیبرین داخل عروقی نسبت به tPA، ثانویه می-باشد (Amiri *et al.*, 2015). فرایند فیبرینولیز بطور عمده در سطح فیبرین شروع شده و سپس در داخل رگ منتشر می-شود. زیرا این سطح، محل های اتصال برای تماس بهینه بین تعدادی از اجزای سیستم فیبرینولیتیک بخصوص پلاسمینوژن و tPA را مهیا می-کند. این اثر تحریکی، غلظت بالائی از پلاسمینوژن و tPA را در رسوبات فیبرین بوجود می-آورد و موجب متمرکز شدن فعالیت پلاسمین در این ناحیه می-گردد (Ausubel *et al.*, 2003; Brown, 1985). بیماری های قلبی-عروقی مثل سکته، حمله میوکاردیال حاد^۴ و ترومبومبولیسم وریدی^۵ احتمالاً اصلی ترین عامل مرگ و میر در جمعیت انسانی می-باشند (Bawon, 1985). مهمترین عامل مطرح در این شرایط، اغلب انسداد لخته ای در رگ های خونی مهم می-باشد که موجب نرسیدن خون به اندام های حیاتی (قلب و مغز) می-گردد. یک دیدگاه درمانی ترومبوز، تزریق داخل وریدی فعال کننده های پلاسمینوژن به عنوان داروی حل

در دنیای امروز تقاضا برای داروهای زیستی روز به روز در حال افزایش می-باشد و چون معمولاً قیمت این داروها، فراوانی آنها را محدود می-کند، لازم است سیستم هایی توسعه یابند که بتوانند داروهای زیستی را با قیمت مناسب در اختیار مصرف کنندگان قرار دهند (Pen *et al.*, 1992; Saify *et al.*, 2011). پروکاریوت هایی مثل اشیریشیاکولی (E.coli) با توجه به سهولت دستکاری و سادگی بیان پروتئین رایج ترین سیستم بیانی برای پروتئین های نوترکیب می-باشند (Darabi *et al.*, 2017). اما، تولید پروتئین های نوترکیب در باکتری ممکن است با مواد سمی همراه باشد که استفاده داورپی آن را محدود می-سازد. همچنین امکان تخریب پروتئولیتیک پروتئین نوترکیب یوکاریوتی در داخل باکتری ها وجود دارد. بعلاوه پروتئین نوترکیب می-تواند داخل باکتری بصورت نامحلول در آمده و منجر به تشکیل انکلوژن بادی های^۱ نامحلول گردد، که نیازمند شکل گیری مجدد و مراحل تخلیص پرزحمت و گرانیقیمتی است (Daniell, 2003; Ma *et al.*, 1999). فعال کننده های پلاسمینوژن در سیستم فیبرینولیتیک قادر به تبدیل پلاسمینوژن به فرم فعال کاتالیتیک آن (پلاسمین) می-باشند که شبکه فیبرینی همراه با لخته های خونی را هضم می-کند (شکل ۱). دو نوع اصلی فعال کننده های پلاسمینوژن وجود دارند که عبارتند از: فعال کننده پلاسمینوژن نوع

² - Urokinase type Plasminogen Activator

³ - Tissue type Plasminogen Activator

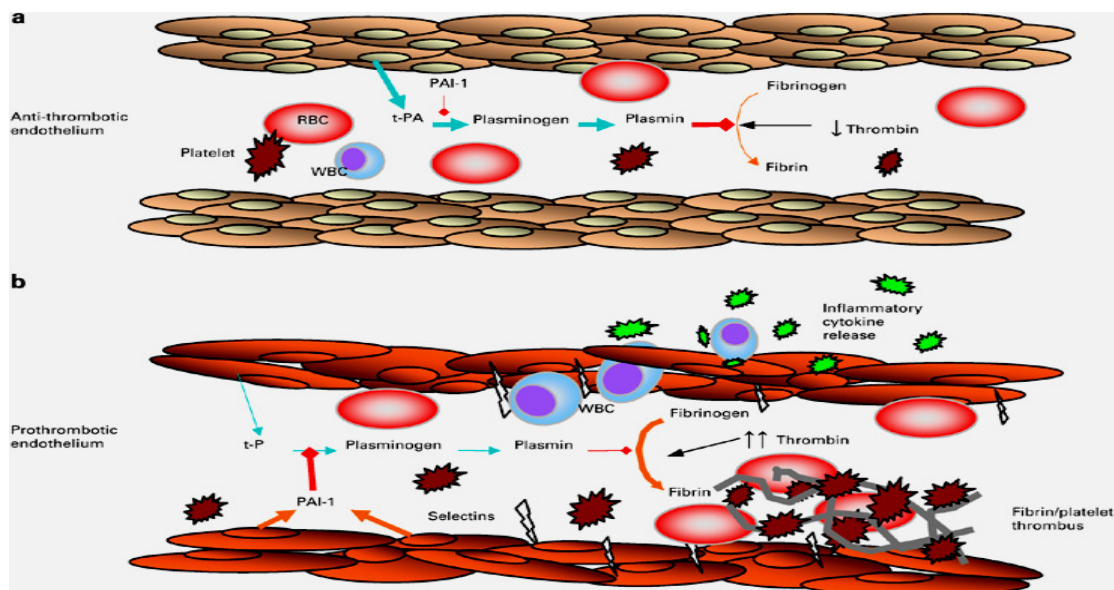
⁴ - myocardial infarction

⁵ - thromboembolism

¹ -Inclusin body

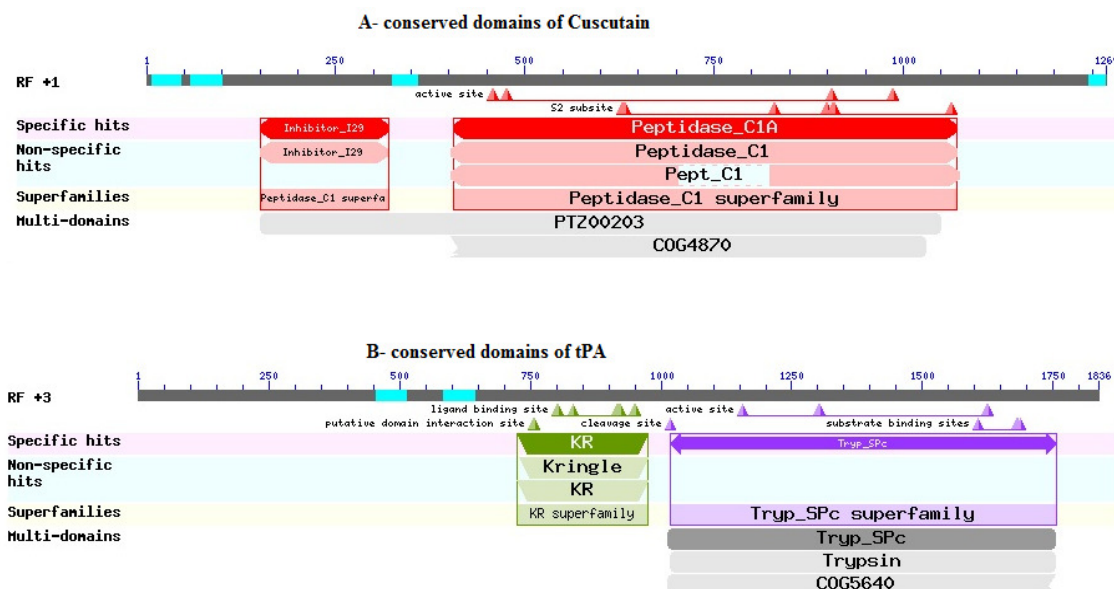
و ترشح tPA، توالی ۳۵ تائی فوق حذف و پروتئین بالغ با ۵۲۷ اسیدآمینو بدست می‌آید (Pennica *et al.*, 1983; Rouf, 1996). مطالعات نشان داده است که در گیاه سس حاوی هوستوریوم (مکینه) یکسری از ژن‌ها بیشترین بیان را نسبت به سس‌های فاقد هوستوریوم دارد، که از این ژن‌ها می‌توان به ژن کد کننده یک پروتئین‌ناز اختصاصی هوستوریومی به نام کاسکوتین اشاره کرد که پایداری و فعالیت بالایی داشته و در طول پروسه آلوده‌سازی سس نقش مهمی را ایفا می‌کند (Marc *et al.*, 2010). این ژن دارای ویژگی بیان مکانی بوده طوری که ساقه‌های سس فاقد هوستوریوم بیان بسیار کمی از این ژن را دارند در حالیکه ساقه‌های دارای هوستوریا که بعد از ۳ روز اتصال به میزبان برداشت شده بودند، بیشترین میزان بیان این ژن را دارند. این ژن یک pre-pro-protein را کد می‌کند که هر یک از زیرواحدهای این پروتئین نقش مجزایی دارد (شکل ۲). زیرواحد پروپتیدی این ژن دارای یک موتیفی به نام ERFIN-motif می‌باشد که نقش مهارکنندگی فعالیت سیستمین پروتئینازی این آنزیم را برعهده دارد. زیر واحد پروتئینازی آن نیز نقش اصلی در هضم دیواره سلولی گیاهی و نفوذ پارازیت به گیاه میزبان دارد (Marc *et al.*, 2010). با توجه به پایین بودن فعالیت و پایداری tPA نوترکیب تولیدی از طریق گیاهان (Saify *et al.*, 2011) در این مطالعه اقدام به تولید tPA شیمیری با استفاده از اتصال جایگاه فعال ژن کاسکوتین گیاهی گردید.

کننده لخته خون می‌باشد (Daniel, 2006). استرپتوکایناز یک فعال کننده پلاسمینوژن با منشاء باکتریائی است که توسط بعضی از سویه‌های استرپتوکوکوس تولید شده و در کلینیک‌ها نیز استفاده می‌شود. این دارو نسبتاً گران بوده و به دلیل منشاء غیر انسانی آن (مخمر و باکتری)، استفاده از آن با واکنش‌های نامطلوب و تب‌زا همراه است. علاوه بر این، استرپتوکایناز نه فقط پلاسمینوژن متصل به فیبرین بلکه پلاسمینوژن موجود در گردش خون را نیز فعال می‌کند که خطر خونریزی شدید وجود دارد. اما پروتئین اختصاصی عمل کرده و به لخته‌های خونی بطور نسبتاً قوی متصل می‌شود و ترجیحاً پلاسمینوژن به دام افتاده در داخل لخته‌ها را فعال می‌کند و اثر کمی روی پلاسمینوژن موجود در گردش خون یا دیگر فاکتورهای موثر در لخته خون دارد. بنابراین tPA نوترکیب احتمالاً موثرترین عامل فیبرینولیتیک است زیرا تمایل اتصال فیبرین به tPA، نه تنها فعالیت کاتالیتیک را به لخته متمرکز می‌کند بلکه کارائی کاتالیتیک tPA را نیز افزایش می‌دهد (Sandra *et al.*, 1985). از نظر بیوشیمیایی، cDNA ژن tPA دارای ۲۵۳۰ باز (بجز توالی polyA) می‌باشد که ۵۶۲ اسیدآمینو را رمز می‌کند. از ۳۵ اسیدآمینو موجود در قبل از شروع توالی پروتئین بالغ (۱- تا ۳۵-)، احتمالاً ۲۳-۲۰ اسیدآمینو آن مربوط به سیگنال پپتید آگریز می‌باشد که در ادامه آن توالی ۱۲-۱۵ اسیدآمینو ای مربوط به توالی آبدوست پروتئین قرار گرفته است. بهر حال پس از ترجمه



شکل ۱- مکانیسم عمل فیبرینولیتیک را نشان می‌دهد. فعال سازی پلازمینوژن به پلازمین در خون توسط t-PA ترشح شده از سلول‌های اندوتلیال کاتالیز می‌شود. پلازمین با اثر بر روی فیبرینوژن و تبدیل آن به فیبرین موجب باز شدن لخته خونی می‌شود.

Figure 1- Action mechanism of fibrinolysis. Activation of plasminogen to plasmin by secreted tPA from epithelial cells. Plasmin acts on fibrinogen and converts it to fibrin, therefore dissolves the clots.



شکل ۲- شماتیک بخش‌های مختلف ژن کاسکوتین (A) و ژن tPA (B).

Figure 2- Schematic of Cuscutain gene (A) and tPA gene (B).

مواد و روش ها

ناقل های ژنی و سویه های باکتری

از باکتری E.coli سویه Top10 F' و ناقل pGEM[®]-T Easy Vector برای همسانه-سازی استفاده شد. برای تراریختی گیاهان از باکتری آگروباکتریوم (Agrobacterium tumefaciens) سویه LBA4404 و پلاسمید pBI121 (Novagen) استفاده گردید.

تکثیر قطعات ژن های tPA و کاسکوتین و

ساخت قطعه شیمیری

استخراج DNA از گیاه سس توتون با استفاده از روش CTAB صورت گرفت (Saify *et al.*, 2009). سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی A و A' (جدول ۱) قطعه مربوط به جایگاه فعال آنزیم کاسکوتین (۳۰۰ bp) با برنامه دمایی واسرشت کردن ۹۴ °C برای ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه اولیه دردمای ۹۴ °C برای یک دقیقه، اتصال در ۶۱ °C به مدت یک دقیقه و بسط در ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه و بسط نهایی ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه تکثیر شد. همچنین قطعه ۱۵۰۰ bp از ابتدای tPA با چرخه دمایی مشابه کاسکوتین (تنها تفاوت دمای اتصال ۶۰ °C بود) با استفاده از آغازگرهای B و B' تکثیر گردید (شکل ۲). پس از تکثیر قطعات و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد، قطعات مورد نظر از روی ژل با استفاده از کیت بازیافت و استخراج DNA (شرکت ترموسیتیفیک) از روی ژل خالص سازی شد.

برای اتصال دو قطعه تکثیر شده نیز از روش SOEing-PCR استفاده شد. بدین صورت که از هرکدام از قطعات کاسکوتین و tPA میزان ۵ میکرولیتر در میکروتیوب ریخته شد و سپس ۱ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر DMSO، ۱۰ میکرولیتر بافر فیوژن^۱ و ۲۷/۵ میکرولیتر ddH₂O به هر میکروتیوب اضافه گردید. تکثیر قطعه شیمیری شامل دو مرحله PCR می باشد. در مرحله اول برنامه دمایی واسرشت اولیه ۹۸ °C برای ۱۰۰ ثانیه، ۵ چرخه دمای ۹۴ °C برای ۶۰ ثانیه، اتصال در ۶۰ °C به مدت ۶۰ ثانیه و بسط در ۷۲ °C به مدت ۱۲۰ ثانیه بود. پس از PCR مرحله اول به میکروتیوب ها آنزیم پلیمرز فیوژن و آغازگرهای B و A' اضافه و PCR مرحله دوم با چرخه دمایی واسرشت کردن ۹۸ °C برای ۶۰ ثانیه، ۲۵ چرخه شامل: دمای ۹۴ °C برای ۶۰ ثانیه، اتصال در ۶۰ °C به مدت ۶۰ ثانیه، بسط در ۷۲ °C به مدت ۱۲۰ ثانیه و بسط نهایی ۷۲ °C بود.

همسانه سازی ژن شیمیری tPA

پس از تکثیر و تخلیص ژن شیمیری از ژل، ژن های مورد نظر در ناقل T Easy Vector (Promaga) همسانه سازی شدند. سازه تهیه شده به سلول های مستعد E. coli منتقل گردید. به منظور شناسایی کلنی های مثبت، بر روی کلنی های سفید رشد کرده در محیط انتخابی (حاوی ۵۰

1 - Phusion buffer

پروتئین برادفورد (Bio-Rad) تعیین شد. میزان ۱۰۰ میکروگرم از پروتئین‌ها روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بارگذاری، و رنگ آمیزی کوماسی بریلینانت بلو انجام شد. آزمون زیموگرافی: مقدار ۱۰۰ میکروگرم از پروتئین استخراج شده با مقدار مساوی از بافر بارگذاری مخلوط و در ژل ۱۲٪ اکریلامید حاوی ژلاتین ۱٪ و پلاسمینوژن، با جریان ۱۰ میلی آمپر در اتاق سرد، الکتروفورز شد. سپس ژل با تریتون (۲٪/۵) به مدت یک ساعت در دمای اتاق شستشو داده شد و سپس به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در داخل گلیسین ۰/۱ مولار قرار داده شد. در نهایت، ژل با کوماسی بلو به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شده و سپس به صورت کامل رنگ بری شد. آزمون وسترن بلاتینگ: در طی این آزمون مقدار ۱۰۰ میکروگرم از پروتئین در ژل ۱۲٪ اکریلامید ران شد و سپس با استفاده از دستگاه انتقال دهنده، باندها به کاغذ نیتروسولوز منتقل شدند. سپس بلاک کردن کاغذ نیتروسولوز با استفاده از سرم آلبومین گاوی ۱۵٪ انجام شد.

پس از سه بار شستشو با بافر فسفات و تریتون، آنتی بادی اولیه tPA افزوده و به مدت ۳ ساعت شیکر شد و دوباره ۳ بار شستشو کرده و سپس آنتی بادی ثانویه افزوده شده و ۱/۵ ساعت شیکر شد. در نهایت ۳ بار دیگر شستشو داده و سوبسترای Dab را روی کاغذ نیتروسولوز اضافه نموده و حضور پروتئین موردنظر به صورت باند مشخص شد.

میلی گرم در لیتر آمپی سیلین، IPTG و X-Gal، کلنی-PCR انجام شد. سپس کلون‌های مثبت انتخاب شده با هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفته و تأیید شدند. جهت حصول اطمینان از صحیح بودن کلون‌های شناسایی شده پس از توالی‌یابی قطعات DNA هدف، آنالیزهای لازم با استفاده از برنامه BLAST و نرم افزار Clustalw صورت پذیرفت. پس از همسانه‌سازی ژن tPA در ناقل بیانی گیاهی pBI121 و تهیه سازه pBI-tPA، ژن هدف با روش مبتنی بر آگروباکتریوم به هسته سلول‌های گیاه توتون منتقل گردید و از سلول‌های تراریخت گیاهان تراریخت بدست آمده و گیاهان انتخابی در سطوح DNA، RNA و پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. استخراج RNA از برگ‌های جوان و با استفاده از کیت RNX-Plus™ شرکت سیناکلون انجام گرفت. برای سنتز cDNA، از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis شرکت ترموسایتیفیک استفاده شد و آزمون RT-PCR انجام گردید.

همسانه‌سازی tPA نرمال

در این مطالعه ژن نرمال tPA نیز به عنوان کنترل و جهت مقایسه با tPA شیمری همسانه‌سازی، و به گیاهان توتون منتقل گردید.

جهت استخراج پروتئین از روش Guy و همکاران استفاده شد. ۱۰۰ میلی گرم از نمونه‌های گیاهی برای استخراج پروتئین استفاده گردید. غلظت پروتئین با استفاده از کیت کمیت سنجی

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای مراحل PCR

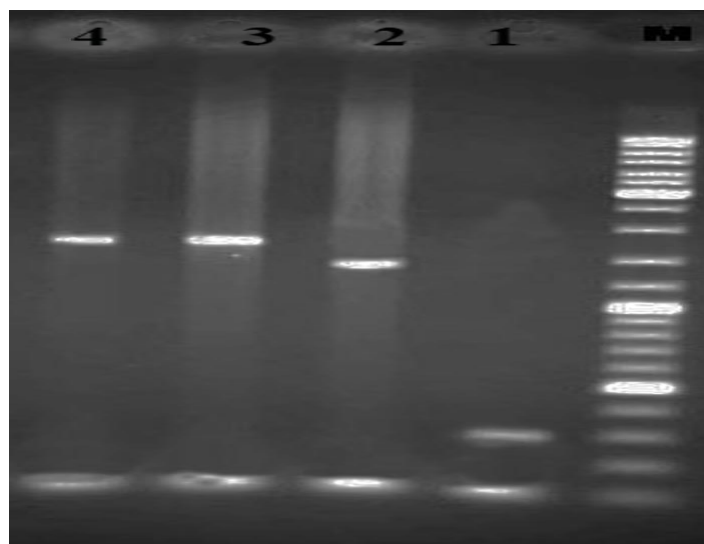
Table 1- Applied specific primers in PCR steps.

ژن Gene	نوع آغازگر Type of primer	توالی Sequence
cuscutain	A: forward	5'-TCTCCACCCCTGTTCTGGGCGAAAGAGAA-3'
	A': reverse	5'-GAGCTCCAAATTGAGAAATAGAT-3'
t-PA	B: forward	5'-GGATCCTTCTGAGCACAGGGCTGG-3'
	B' reverse	5'-AGAGGTTGTGATGTGCAGCGGCTGG-3'
rolC	C: forward	5'-TTAGCCGATTGCAAACCTTGAC-3'
	C': reverse	5'-ATCATTTGTAGCGACT-3'

نتایج و بحث

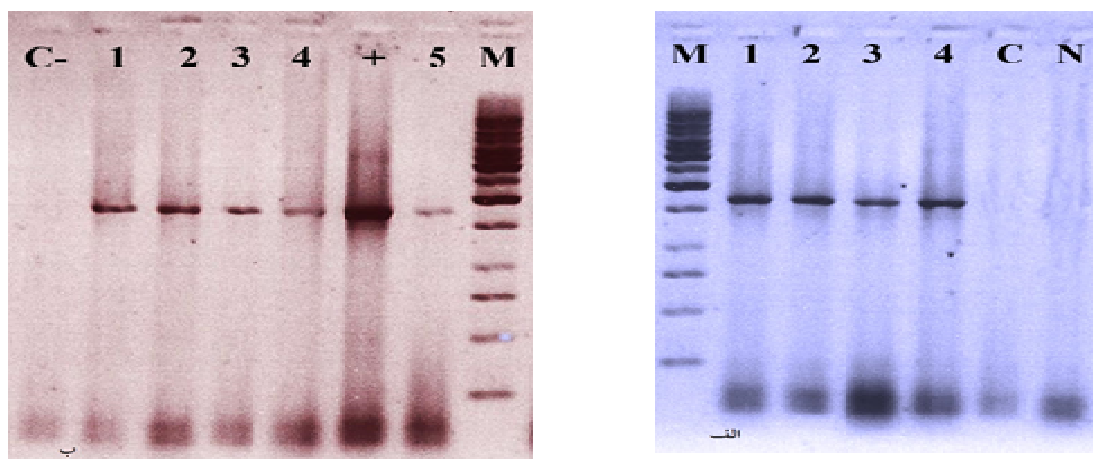
نتایج PCR روی گیاهان تراریخت نیز نشان داد که یک قطعه ۱۸۰۰ bp تکثیر می‌شود که در نمونه‌های غیر تراریخت دیده نمی‌شود (شکل ۴a). پس از استخراج RNA کل و تولید cDNA، واکنش RT-PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی موجب تکثیر باندهای ۱۸۰۰ جفت بازی گردید (شکل ۴b). بنابراین ژن‌های انتقال یافته در گیاهان تراریخت رونویسی می‌شوند.

نتایج PCR روی ژل آگارز نشان داد که قطعات تکثیر شده کاسکوتین و tPA توسط تکنیک SOEing-PCR به هم متصل، و ژن tPA شیمیری ساخته شده است (شکل ۳). نتایج غربالگری آبی/سفید، هضم با آنزیم‌های برشی، PCR و توالی‌یابی نشان داد که tPA شیمیری به درستی همسانه شده است.



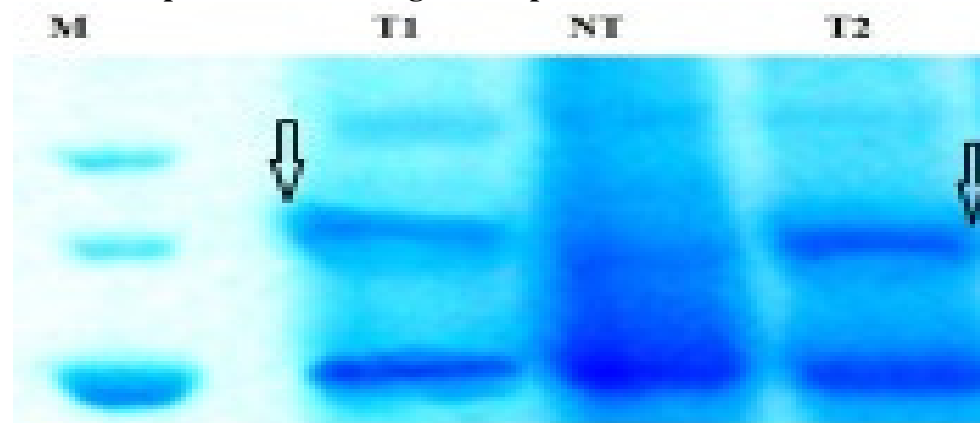
شکل ۳- ساخت قطعه tPA شیمیری: M مارکر DNA (مارکر مخلوط شرکت ژن رولر)، چاهک ۱ قطعه تکثیر شده کاسکوتین، چاهک ۲ قطعه tPA، چاهک ۳ قطعه تکثیر شده tPA شیمیری، چاهک ۴ قطعه tPA نرمال.

Figure 3- Construction of chimeric-tPA. M: DNA marker (ladder mix, Gene ruler), line 1: cuscutain segment, line 2: tPA segment, line 3: constructed chimeric-tPA, line 4: normal-tPA and line.



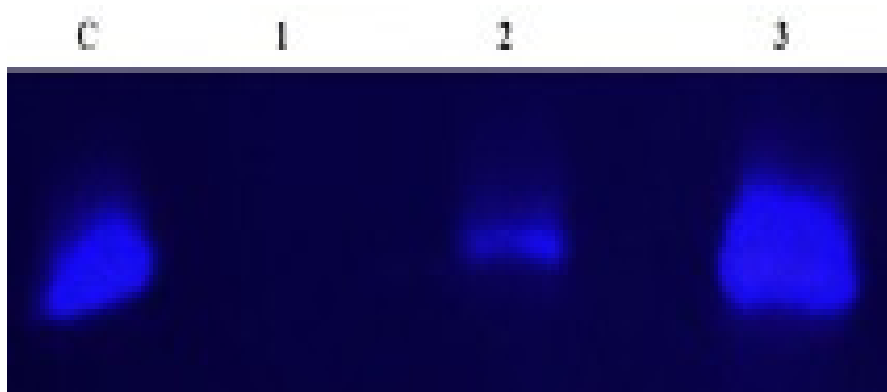
شکل ۴- الف (راست): بررسی گیاهان تراریخت با استفاده از PCR. M مارکر DNA (1kb)، چاهک ۱ و ۲ گیاهان حاوی tPA شیمیری، چاهک‌های ۳ و ۴ گیاهان حاوی tPA نرمال. چاهک C کنترل منفی (آب) و چاهک N گیاهان غیر تراریخت. ب (چپ): نتایج بررسی بیان ژن tPA با روش RT-PCR. چاهک C- کنترل منفی، چاهک‌های ۱ و ۲ گیاهان تراریخت حاوی tPA نرمال، چاهک‌های ۳ و ۴ و ۵ گیاهان تراریخت حاوی tPA شیمیری، + کنترل مثبت (پلاسمید حاوی tPA)، چاهک M مارکر ۱ کیلو بازی.

Figure 4- A (Right): Analysis of plants using PCR. M: DNA ladder (1 kb), line 1 and 2: transgenic plants containing chimeric-tPA, line 3 and 4: transgenic plants containing normal-tPA, Line C: negative control and line N is non-transgenic plants. B (Left): Results of tPA expression using RT-PCR. Line 1 and 2: transgenic plants containing normal-tPA, line 3, 4 and 5: transgenic plants containing chimeric-tPA, M: 1kb DNA ladder, and line + is plasmid containing tPA as positive control.



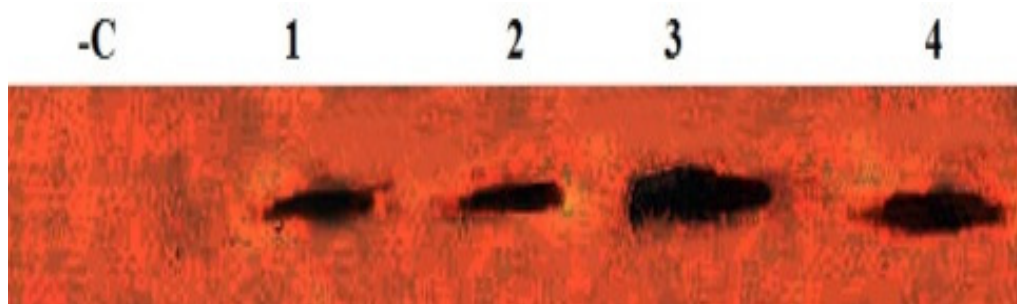
شکل ۵- آنالیز SDS-PAGE پروتئین‌های استخراج شده گیاهان تراریخت و شاهد (غیر تراریخت). M: نشانگر پروتئینی، T1: گیاه تراریخت حاوی tPA نرمال، NT: گیاه شاهد (غیر تراریخت) و T2 گیاهان تراریخت حاوی tPA شیمیری. در چاهک‌های T یک باند اضافی معادل کنترل مثبت مشاهده می‌شود، در حالی که در گیاه شاهد این باند مشاهده نگردد.

Figure 5- SDS-PAGE analysis of purified proteins from transgenic and non-transgenic plants. M is protein ladder, T1 transgenic plants containing normal-tPA, NT non-transgenic plants and T2 transgenic plants containing chimeric-tPA. In T lines an extra band was observed while not seen in non-transgenic plants.



شکل ۶ - نتایج آزمون زیموگرافی. چاهک C کنترل مثبت (داروی اکتیواز)، چاهک ۱ عصاره پروتئینی از گیاهان غیر تراریخت، چاهک ۲ عصاره پروتئینی از گیاهان تراریخت حاوی tPA نرمال و چاهک ۳ عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت حاوی tPA شیمری

Figure 6- Results of zymography. Line C is positive control (Activase drug), line 1 plant extract from non-transgenic plants, line 2 plant extract of transgenic plant containing normal-tPA and line 3 protein extract of transgenic plant containing chimeric-tPA.



شکل ۷ - نتایج وسترن بلات. چاهک -C عصاره گیاه غیر تراریخت. چاهک‌های ۱ و ۲ عصاره پروتئینی از گیاهان تراریخت حاوی tPA نرمال، چاهک ۳ عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت حاوی tPA شیمری و چاهک ۴ کنترل مثبت (داروی اکتیواز).

Figure 7- result of western blotting. Line -C is non-transgenic plants, lines 1 and 2 protein extract of transgenic plants containing normal-tPA, line 3 protein extract of transgenic plants containing chimeric-tPA and line 4 positive control (Activase drug).

انجام SDS-PAGE روی پروتئین استخراجی
 کیلودالتون (KDa) نشان دادند که برابر وزن
 پروتئین مورد نظر (tPA) می باشد (شکل ۵).

در این آزمون پروتئین های استخراج شده
 از گیاهان تراریخت، در مقایسه با گیاهان شاهد
 یک باند اضافی با وزن مولکولی حدود ۶۳-۶۵

آزمون زیموگرافی

نتایج آزمون زیموگرافی نشان داد که در محل چاهک مربوط به tPA به علت فعالیت پروتئولیتیکی اختصاصی آن زمینه آبی ژل سفید شده، در حالی که کنترل منفی (سایر پروتئین‌ها) چنین خصوصیتی را نداشته و چاهک مربوط به آنها آبی می‌ماند (شکل ۶). همچنین آزمون زیموگرافی نشان داد که با وجود بارگذاری مقدار برابر از tPA شیمری و نرمال، میزان فعالیت tPA شیمری بیشتر می‌باشد (شکل ۶ چاهک ۳). آنالیز وسترن بلات بر روی پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت نیز وجود یک باند مشخص با وزن حدود ۶۳-۶۵ کیلو دالتون را نشان داد که برابر وزن مولکولی پروتئین tPA می‌باشد. در حالی که باند مشابهی در مورد پروتئین استخراج شده از گیاهان شاهد مشاهده نگردید (شکل ۷).

امروزه از مهندسی پروتئین و تولید پروتئین‌های شیمری برای کاربردهای بیوتکنولوژی، صنعتی، پزشکی به منظور تولید پروتئین‌های دارویی (Zhou et al., 2004)، متابولیت‌های ثانویه (Hwang et al., 2013) و سوخت‌های زیستی استفاده می‌شود (Kim et al., 2011). در این مطالعه tPA نرمال و tPA شیمری جهت مقایسه میزان فعالیت و پایداری آنها با استفاده از روش آگروباکتريوم به گیاهان توتون منتقل گردیدند. گزارشات مختلفی از تاثیر جایگزینی بخش‌های پروتئینی روی میزان بیان، پایداری و فعالیت پروتئین‌های نوترکیب وجود دارد (Wu et al., 2004). بیان ژن Cry9Aa شیمری در گیاهان توتون

نشان داد که مقدار پروتئین در مقایسه با پروتئین طبیعی افزایش بیشتری داشته است (Kuvshinov et al., 2001). بیشتر مطالعات پروتئین‌های شیمری با دستکاری در ساختار خود پروتئین بوده است (Guzma'n et al., 2014)، اما در این تحقیق برای اولین بار یک قطعه از پروتئین گیاهی با یک پروتئین انسانی همجوش شده است. قطعه پروتئین گیاهی که از آنزیم کاسکونین گرفته شده است که دارای فعالیت آنزیمی قوی و پایداری بالایی می‌باشد (Marc et al., 2010). به همین علت، ژن tPA شیمری به کمک روش‌های مهندسی پروتئین سنتز و به همراه tPA طبیعی انسانی در گیاهان توتون بیان گردید. الحاق ژن انتقالی به ژنوم و رونویسی آن در گیاهان تراریخت توتون با استفاده از PCR و RT-PCR تایید شد. بعد از ساخت ژن شیمری tPA توسط روش SOEing PCR از ناقل بیانی pBI121 جهت کلونینگ و انتقال ژن شیمری به توتون استفاده گردید. این ناقل به علت دارا بودن یک سری ویژگی‌های مطلوب به میزان زیادی در انتقال ژن به گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chen et al., 2005). جهت افزایش رونویسی، ژن شیمری مورد نظر بین خاتمه دهنده NOS و پیش بر CamV 35S قرار داده شد، زیرا پیش برنده CamV 35S می‌تواند میزان بیان را در مقایسه با پیش‌برهای دیگر مانند Ubi تا ۶۰ برابر افزایش دهد (Sunil et al., 2003).

نتایج تکنیک PCR و RT-PCR روی گیاهان تراریخت، نشان از انتقال ژن شیمری tPA به گیاهان باززایی شده و رونویسی آن می‌باشد. در

تولید شده نیز به علت حضور پروتئازهای گیاهی در داخل عصاره پروتئینی و تجزیه پروتئین موردنظر شده می‌باشد (Ma *et al.*, 1999). اهمیت زیموگرافی در این است که فعالیت دامین سرین پروتئاز را بصورت باندهای مجزا روی ژل SDS-PAGE نشان می‌دهد، اما اندازه باندها در زیموگرام معادل باندهای وسترن بلات نیست. نمونه‌های گیاهی غیر تراریخت نواحی شفاف را نشان ندادند، ولی نمونه‌های تراریخت نواحی شفافی را نشان دادند که در ژل دارای پلاسمینوژن نتیجه عمل tPA می‌باشد. مبدع این روش نیز نشان داده است که پروتئازهای غیروابسته به پلاسمینوژن را می‌توان بوسیله حذف پلاسمینوژن از ماتریکس ژلاتین- پلی آکریل آمید، مشخص نمود (Huessen *et al.*, 1980). در طی تحقیق، بعضی از نمونه‌های پروتئینی گیاهی که در آنالیز زیموگرافی فعالیت نشان می‌دادند در آنالیز وسترن بلات حضور پروتئین موردنظر را اثبات نکردند که این می‌تواند اثبات کننده حساسیت بالای آنالیز زیموگرافی نسبت آنالیز وسترن بلات باشد. آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی- های مونو یا پلی کلونال، آنتی‌ژن‌های خاصی را شناسایی می‌کند. بنابراین با توجه به نتایج وسترن بلات می‌توان گفت که پروتئین شیمیری tPA به درستی بیان شده و دارای ساختار مناسبی می‌باشد که با آنتی بادی مونوکلونال عکس‌العمل نشان می‌دهد. همانطور که در شکل ۷ نیز مشاهده می‌شود علی‌الرغم بارگذاری مقادیر برابر از غلظت- های عصاره پروتئینی حاوی tPA شیمیری و

آزمایشات SDS-PAGE و وسترن بلات تنها تفاوت بین گیاهان تراریخت و غیر تراریخت وجود یک باند اضافی پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۶۳-۶۵ کیلودالتون در گیاهان تراریخت است که نشان می‌دهد ژن شیمیری منتقل شده ترجمه می‌شود (Hahn *et al.*, 2008 and Huessen *et al.*, 1993).

برای ارزیابی فعالیت سرین پروتئازی tPA از آنالیز زیموگرافی استفاده شد. نتایج نشان داد که این آزمون فوق‌العاده حساس است و مقادیر کمتر از ۸ پیکوگرم از ماتریکس متالوپروتئاز روی زیموگرام ژلاتین قابل شناسایی است که از این لحاظ با آزمون ELISA قابل مقایسه می‌باشد (Joosten *et al.*, 2003). در آزمون زیموگرافی پروتئین‌های استخراج شده از نمونه‌های گیاهی غیر تراریخت نواحی شفاف را نشان ندادند ولی نمونه‌های تراریخت نواحی شفافی را مشابه با داروی اکتیواز نشان دادند. اگرچه مقدار برابری از عصاره پروتئینی حاوی tPA شیمیری و نرمال بارگذاری شد، نتایج ژل زیموگرافی نشان داد که در مقایسه با tPA نرمال میزان نواحی شفاف در tPA شیمیری بیشتر است و این نشان می‌دهد که فعالیت و پایداری tPA شیمیری بهبود یافته است، بنابراین قطعه افزوده شده کاسکوتین به ژن tPA موجب افزایش فعالیت و یا پایداری آن شده است. در بعضی از گیاهان تراریخت با وجود تکثیر قطعه ژن شیمیری احتمالاً به دلیل قرار گرفتن ژن در ناحیه هتروکروماتینی ژنوم گیاه و یا اثرات موضعی ژن وارد شده، پروتئین موردنظر تولید نشد. عدم وجود فعالیت زیموژنی پروتئین

تولید داروهای نوترکیب مثل پایداری و فعالیت آنها می‌باشد.

سپاسگزاری

اعتبار این طرح توسط دانشگاه بوعلی سینا تامین شده است و از کلیه کسانی که در این پژوهش ما را یاری رسانده‌اند کمال قدردانی را داریم.

نرمال در وسترن بلات، اما باند مربوط به tPA شیمیری بزرگتر می‌باشد که این می‌تواند به علت پایداری بیشتر tPA شیمیری و عدم تجزیه آن باشد. نتایج tPA شیمیری در گیاهان ترارخت نوید بخش تولید این پروتئین دارویی مهم در سطح تجاری می‌باشد. همچنین می‌توان گفت که تکنولوژی پروتئین‌های شیمیری راهکار بسیار خوبی برای رفع برخی چالش‌های مهم پیش روی

منابع

- Amiri M, Jalali-Javaran M, Ehsani P, Haddad R (2014). Enhanced expression of tissue plasminogen activator via gene silencing suppressor strategy using P19 protein. *Agricultural Biotechnology Journal* 8: 1-18
- Ausubel MF, Brent R, Kingston ER, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (2003). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & sons Inc.
- Benchenane K, Lopez-Atalaya JP, Fernandez-Monreal M, Touzani O, Vivien D (2004). Equivocal roles of tissue-type plasminogen activator in stroke-induced injury. *TRENDS in Neurosciences* 27: 155-160.
- Brown M, Tyrell A (1985). Isolation of human t-PA genomic DNA clone and its expression in mouse L cells. *Gene* 33: 279-284.
- Brown M, Tyrell A, (1985). Isolation of human t-PA genomic DNA clone and its expression in mouse L cells. *Gene* 33: 279-284.
- Chen PR, Lee CC, Chang H, Tasi ChE (2005). Sesamol regulates plasminogen activator gene expression in cultured endothelial cells: a potential effect on the fibrinolytic system. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16: 59-64.
- Collen D, Lijnen HR (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 12: 3114-3124.
- Daniell H (2003). Production of human serum albumin in transgenic crops without interfering with food or feed production. *Trends Plant Science* 7: 84-91.
- Daniell H (2006). Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Journal of Biotechnology* 1: 1071-1079.
- Darabi S, Ramezani S, Ahmadabadi M (2017) Cloning of human insulin-like growth factor gene in plant expression vectors. *Agricultural Biotechnology Journal* 9: 1-16
- Guzmán K, Hernández A, Sahagún R, Vallecillo A.J, Cruz-M. I, Quiroz-Romero H. (2014). Construction and evaluation of a chimeric protein made from *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase and cathepsin L1. *Journal of Helminthology* 90: 7-13
- Hahn B, Sim J, Kim H, Ahn M, Pak H., Kim N, Kim Y (2008). Expression and characterization of human tissue-Plasminogen Activator in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology Report* 27: 209.
- Hiatt A, Ma J.K.C, Hein M, Vine N.D, Wang F, Stabila P, Van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T (1989) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 268: 716-719.

- Huessen S, Dowdle EB (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate and co-polymerized substrates. *Analytical Biochemistry* 102: 196-202.
- Hwang E. I, Kaneko M, Ohnishi Y, Horinouchi S (2003). Production of plantspecific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2699–2706.
- Joosten V, Lokman C, Cees A, Van Der Honde P, Punt J (2003). The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeast and filamentous fungi. *Microbial Cell Factories* 2: 10-25.
- Kuvshinov V, Koivu K, Kanerva A, Pehu E (2001). Transgenic crop plants expressing synthetic cry9Aa gene are protected against insect damage. *Plant Science* 160: 341–353.
- Ma S, Jevnikar AM (1999). Autoantigens produced in plants for oral tolerance therapy of autoimmune diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 464: 179-194.
- Marc B, Markus A, Hans-Lothar F, Ralf K (2010). Significance of Cuscutain, a cysteine protease from *Cuscuta reflexa*, in host-parasite interactions. *BMC Plant Biology* 10: 227.
- Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *PNAS* 89: 11745-11749.
- Mattes R (2001). The production of improved tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 27: 325-335.
- Mosher DF (1990). Blood coagulation and fibrinolysis: an overview. *Clinical Cardiology* 13(6): 5-11
- Pen J, Molendijk L, Quax WJ, Sijmons PC, Ooyen AJJ, Van Elzen PJM, Van Den Rietveld K, Hoekema A (1992). Production of active *Bacillus licheniformis* alpha-amylase in tobacco and its application in starch liquefaction. New York, N.Y.: Nature Publishing Company; *Biotechnology* 10: 292-296.
- Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HI, Goeddel DV, Collen D (1983). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E coli*. *Nature* 301: 214-221.
- Rouf SA, Moo-Young M, Chisti Y (1996). Tissue plasminogen activator: characteristic, applications and production technology. *Biotechnology Advances* 3: 239-260.
- Saify Nabiabad H, Yaghoobi MM, Jalali Javaran M, Hosseinkhani S (2011) Expression Analysis and purification of human recombinant tissue type plasminogen activator (rt-PA) from transgenic tobacco plants. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 41: 175-186.
- Sandra J, Degen F, Rajput B (1986). The human tissue plasminogen activator gene. *The journal of biological chemistry* 261: 6972-6985.
- Steen E. J, Kang Y, Bokinsky G, Hu Z, Schirmer A, McClure A, Del Cardayre S. B, Keasling J. D (2010). Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature* 463: 559–562
- Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Prasad KS, Bapat VA (2003). Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures. *Protein Expression Purification* 32(1): 10-7.
- Wu X, Jornvall H, Berndt KD, Oppermann, U (2004). Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313: 89–96.
- Zhou Z, Schnake P, Xiao L, Lal AA (2004). Enhanced expression of a recombinant malaria candidate vaccine in *Escherichia coli* by codon optimization, *Protein Expression and Purification* 34: 87–94.

Protein engineering of human tissue type plasminogen activator (tPA) using active site of plant-cuscutain enzyme to increase its permanent and activity

Saify Nabiabad H.¹, Piri Kh.*², Amiri M.³

¹ Academic staff of department of Medicinal plant production. Nahavand University. Nahavand, Iran.

² Academic staff of department of biotechnology, School of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran.

³ Phd-graduate of plant biotechnology. Department of biotechnology, School of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Abstract

tPA is a fibrinolytic agent that cause dissolves of blood clots and used in stroke and cardiovascular diseases. Cuscutain is a stable and highly active protease in plants such as dodder, and parasite plants using this enzyme to penetrate into host. Although produced cost of recombinant proteins in plants is 10-50 times less than bacteria, but production of recombinant proteins in plants has problems such as difficulty of downstream process, low stability and activity of purified recombinant proteins. To increase stability and activity of tPA using protein engineering, dodder-cuscutain active site was spliced to tPA. DNA was extracted from dodder plants and desired segments of cuscutain amplified using specific primers. Then, the segment of cuscutain was shuffled to tPA by SOEing PCR method. Constructed chimeric tPA was cloned under control of CaMV 35S promoter and NOS terminator. Kozak enhancer sequence and signal peptide sequence (KDEL) were added to amino and carbocyclic terminus, respectively. Construct of pBI(tPA) was transferred to tobacco plants using agrobacterium method and transgenic plants selected on kanamycin medium. Analysis of transgenic plants was performed by PCR, RT-PCR, SDS-PAGE, western blotting and zymography. Results of PCR showed that chimeric tPA was constructed using SOEing PCR. Analysis of transgenic plants using RT-PCR, SDS-PAGE and western blotting demonstrated that chimeric tPA is expressed. Moreover, zymography test showed that compared to normal tPA, produced chimeric tPA has more activity and stability. In conclusion increasing activity and stability of recombinant drugs using plant genes is promising.

Keywords: *chimeric, cuscutain, tissue Plasminogen Activator, tobacco, western blot, zymography.*