

کلونینگ و تولید نوترکیب آنزیم گرانزیم M انسانی

نرگس خازه^۱، دکتر محمد پاژنگ^۲، دکتر فرامرز مهرنژاد^۳، دکتر نادر چاپارزاده^۴

نویسنده مسوول: تبریز، دانشگاه شهیدمدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی pazhang@azaruniv.ac.ir
دریافت: ۹۳/۹/۲ پذیرش: ۹۴/۱/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: گرانزیم M یکی از اعضای خانواده سیرین پروتئازهاست که در لنفوسیت های T سیتوتوکسیک و سلول های NK بیان می شود. گرانزیم M یک القاکننده آپوپتوز در سلول های توموری هدف می باشد. بنابراین با توجه به اهمیت گرانزیم M در آپوپتوز، هدف از این تحقیق تولید آنزیم فعال به لحاظ زیستی است.

روش بررسی: قطعه cDNA مربوط به گرانزیم M فعال به درون ناقل بیانی pET21a(+) کلون و ناقل نوترکیب جهت بیان پروتئین، به سلول های مستعد با روش شوک حرارتی منتقل گردید. جهت بیان بالای پروتئین، شرایط القا بهینه گردید و سپس آنالیز پروتئین توسط SDS-PAGE انجام گرفت. سپس انکلوژن بادی های تولیدی در بافر حاوی اوره ۸ مولار حل شده و با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل - آگارز خالص شد. فعالیت پروتئازی گرانزیم M با استفاده از سوبسترای کازئین و با روش اسپکتروفتومتری (طیف سنجی) سنجیده شد.

یافته ها: گرانزیم M نوترکیب در باکتری E.coli به صورت انکلوژن بادی تولید شد و بهترین سطح بیان در دمای ۲۲ درجه با غلظت ۱ میلی مولار از IPTG در طول ۵ ساعت بود. با استفاده از ستون نیکل - آگارز و شیب غلظت اوره، گرانزیم M به طور همزمان با تاخوردن، خالص گردید. نتایج حاصل از تعیین فعالیت نشان داد که آنزیم در حضور سوبسترای کازئین فعال بوده و فعالیت ویژه اش ۷۱ واحد بر میلی گرم است. فعال بودن گرانزیم M نشان دهنده این بود که آنزیم تاخوردگی درستی پیدا کرده است.

نتیجه گیری: با توجه با اینکه گرانزیم M می تواند هدفی بالقوه برای داروهای ضد سرطان باشد، بنابراین روش پیشنهادی در این تحقیق می تواند تسهیل کننده مطالعه بیشتر بر روی این آنزیم باشد.

واژگان کلیدی: گرانزیم M، آپوپتوز، کازئین، فعالیت پروتئازی، انکلوژن بادی

مقدمه

یکی از چالش های بیان پروتئین های نوترکیب انسانی و همچنین توده هایی متراکم به نام انکلوژن بادی است (۱).
در باکتری E. coli تولید پروتئین هایی غیر فعال و نامحلول جهت جلوگیری از تاخوردگی اشتباه پروتئین های نوترکیب

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهیدمدنی آذربایجان

۲- دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهیدمدنی آذربایجان.

۳- دکترای تخصصی بیوفیزیک، استادیار گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران

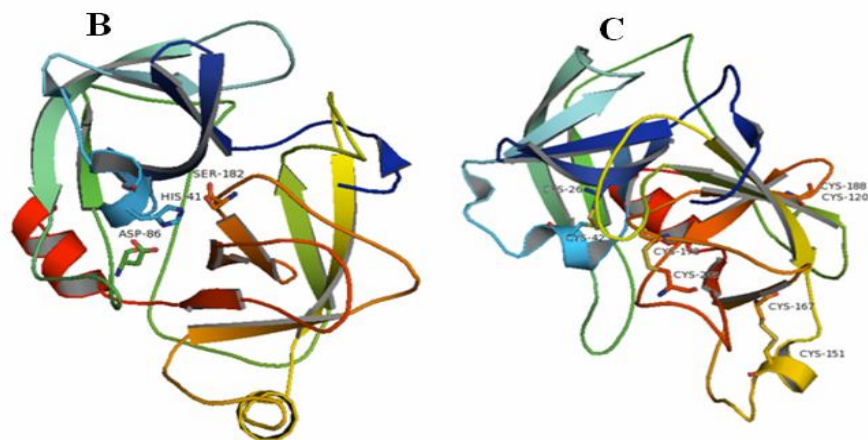
۴- دکترای تخصصی فیزیولوژی گیاهی، دانشیار گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهیدمدنی آذربایجان

خصوصاً زمانی که حاوی پیوند دی سولفیدی باشند، روش‌های مختلفی وجود دارد که از میان آن‌ها می‌توان به استفاده از توالی pelB برای جهت‌دهی پروتئین نو ترکیب به فضای پری پلاسمی (۲ و ۳)، اضافه نمودن تیوردوکسین (پروتئینی که باعث ایجاد پیوندهای دی سولفیدی صحیح می‌شود) به قسمت N-ترمینال پروتئین نو ترکیب (۴ و ۲) و یا استفاده از سوش‌های بهینه شده جهت بیان پروتئین اشاره کرد (۵). با وجود این مشاهده شده که با استفاده از این روش‌ها نیز ممکن است تاخوردگی به‌طور کارایی رخ ندهد. با توجه به این که تولید پروتئین‌های انسانی با تاخوردگی صحیح می‌تواند به لحاظ دارویی و پزشکی مهم باشد بنابراین تلاش جهت ایجاد پروتئین‌هایی با تاخوردگی صحیح حایز اهمیت است. گرانزیم‌ها (آنزیم‌های گرانولی) خانواده‌ای از سرین پروتئازهای بسیار مشابه هستند که توسط لنفوسیت‌های سیتوتوکسیک ترشح شده و با ورود به سلول‌های هدف

(سلول‌های توموری و یا آلوده به ویروس) باعث القای آپوپتوز در آن‌ها می‌شوند (۶). در انسان ۵ نوع گرانزیم و در موش ۱۰ نوع از آن‌ها وجود دارد (۷). گرانزیم‌های انسانی شامل انواع A, B, H, K و M بوده و انواع موشی شامل A, B, C, D, E, F, G, K, M, N می‌باشند (۳). گرانزیم M اولین بار در سلول‌های NK موش صحرایی شناسایی شد. این آنزیم سوبستراهای پروتئینی خود را بعد از رزیدوهای آلفاتیک و طویل متیونین، نورلوسین و لوسین برش می‌دهد و به همین دلیل به Met-ase نیز معروف است. در سال ۲۰۱۱ نیز خصوصیت آنزیمی گرانزیم M از موش و انسان بررسی گردید (۳). گرانزیم M انسانی ۲۵۷ آمینواسید دارد. آمینواسیدهای ۱ تا ۲۵ N-ترمینال آن، توالی هدف‌دهی به شبکه آندوپلاسمی بوده و بعد از ورود به این اندامک حذف می‌شود. در نتیجه آنزیم بالغ دارای ۲۳۲ آمینواسید بوده و وزن مولکولی آن ۲۵ کیلو دالتون می‌باشد (۸) (شکل ۱A).

A

MEACVSSLLVLALGALSVGSSFGTQIIIGGREVIPHSRPMASLQNRNGSHLCGGVLVHPKWVLT
AAHCLAQRMAQLRLVGLHTLDSPLTFHIKAAIQHPRYKVPVPALENDLALLQLDGKVKPSRTIR
PLALPSKRQVVAAGTRCSMAGWGLTHQGGRLSRVLELDLQVLDTRMCNNSRFWNGSLSPSM
VCLAADSKDQAPCKGDSGGPLVCGKGRVLAVLSFSSRVCTDIFKPPVATAVAPYVSWIRKVTG
RSA



شکل ۱: A: توالی آمینواسیدی گرانزیم M، آمینواسیدهای نشان داده شده بصورت پررنگ توالی هدف دهی به شبکه آندوپلاسمی بوده و در آنزیم بالغ وجود ندارند. B: سه تایی کاتالیتیک در جایگاه فعال گرانزیم M، C: پیوندهای دی سولفیدی در ساختار گرانزیم M، شکل‌های B و C با استفاده از کد 2ZGC: PDB و با استفاده از نرم افزار SPDBV تهیه شده اند.

به صورت انکلوژن بادی تولید می شود و دارای چهار پیوند دی سولفیدی است که روند تاخوردن آن را در این باکتری با مشکل مواجه می کند. لذا در کارهایی که تا به حال انجام شده است، جهت تشکیل پیوندهای دی سولفیدی و تسهیل تا خوردن گرانزیم M، از اتصال توالی pelB به انتهای آمینوی پروتئین جهت تشکیل پیوند دی سولفیدی استفاده شده است که چندان موفقیت آمیز نبوده است (۵). در این مطالعه سعی شد cDNA گرانزیم M به وکتور بیانی مناسب انتقال داده شده و با انتقال ناقل حاوی ژن به میزبان مناسب، آنزیم مورد نظر بیان شود. سپس روشی آسان جهت خالص سازی، تاخوردن و بررسی فعالیت ارایه گردد.

روش بررسی

مواد: آنزیم های محدود الاثر، DNA پلیمراز و آنزیم T4 DNA Ligase از شرکت Fermentas تهیه و کازئین، اوره و سایر مواد از شرکت Merck خریداری گردید. **تکثیر cDNA گرانزیم M:** قطعه ی cDNA کدکننده ی گرانزیم M که در ناقل pPIC9 قرار داشت در طی یک همکاری با گروه سلولی و مولکولی دانشگاه موناخ استرالیا از پروفیسور بیرد تحویل گرفته شد. ناقل pPIC9 توسط کیت استخراج پلاسمید شرکت Bioneer استخراج و سپس به عنوان الگو در واکنش PCR قرار گرفت. در این مطالعه بر اساس توالی استاندارد cDNA گرانزیم M پرایمرهای اختصاصی رفتی و برگشتی توسط نرم افزار Generunner طراحی گردید. پرایمر رفتی 3' GGAATTCATATGATCATCGGGGCGGGGAG (5' دارای جایگاه شناسایی و برش آنزیم NdeI و پرایمر برگشتی 3' CGCAAGCTTAGCTGATCGGCCGGTGACC (5' دارای این جایگاه برای آنزیم HindIII می باشد. جهت تکثیر قطعه مورد نظر با پرایمرهای مذکور واکنش PCR صورت پذیرفت.

ساختار کریستالی گرانزیم M انسانی در سال ۲۰۰۹ توسط وانگ و همکارانش تعیین شد (۵). ساختار کلی حاوی چهار مارپیچ α و سیزده صفحه ی β می باشد که به دو دمین تقسیم شده است. همان طور که در شکل ۱B مشاهده می شود، جایگاه فعال (سه تایی کاتالیتیکی) حاوی رزیدوهای Ser182، His41 و Asp86 بوده و در شکافی مابین دمین ها قرار دارد. همچنین گرانزیم M در ساختار خود چهار پیوند دی سولفیدی (شکل ۱C) دارد که به پایدار ماندن آنزیم کمک می کنند (۵) (شکل ۲B). گرانزیم M یک الفاکننده ی آپوپتوز در سلول های توموری است که در طی عمل آن، تورم سلولی سریع، تشکیل واکوئل های سیتوپلاسمی بزرگ، متراکم شدن کروماتین، قطعه قطعه شدن هسته، و در نهایت لیز سلول ها رخ می دهد (۹). گرانزیم M سوبستراهای ماکرومولکولی خاصی را برش می دهد که از میان آن ها می توان به سورواپوین (۱۰)، نوکلئوپلاسمین (۱۱)، ICAD (مهارکننده ی DNase فعال شده توسط کاسپاز) (۱۲)، PARP (پلی-ADP-ریبوز-پلی مرز) (۱۳)، PI9 (۱۴)، HSP75 (۱۵)، Ezrin و α -توبولین (۱۶) اشاره کرد. سوبستراهای مصنوعی برای شناسایی آنزیم در طول جداسازی، تعیین فعالیت آنزیم و تعیین ویژگی آن به کار می روند (۶). سوبستراهای مصنوعی که تاکنون برای مطالعه ی گرانزیم M استفاده شده اند شامل پپتیدتئوآسترها، نیتروآنیلیدها و آمینومتیل کومارین ها می باشند (۱۷). با توجه به نقش پروتئین گرانزیم M انسانی در القای آپوپتوز در سلول های سرطانی (۸) می توان آن را به عنوان یک آنزیم هدف بالقوه برای داروهای ضد سرطان در نظر گرفت. از طرفی دیگر این آنزیم به صورت نو ترکیب ساخته شده و توسط کارخانه های بزرگ شیمیایی و داروسازی همچون سیگما به فروش می رسد. بنابراین تولید آن به لحاظ علمی و تجاری می تواند حایز اهمیت باشد. گرانزیم M انسانی در /شریشیاکلی

همسانه‌سازی cDNA گرانزیم M در ناقل بیانی؛ بعد از تکثیر قطعه مورد نظر (cDNA آنزیم)، این قطعه توسط آنزیم‌های برشی NdeI و HindIII در طی واکنش هضم دوگانه به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد مورد هضم قرار گرفت. ناقل مورد استفاده در این تحقیق، pET21a(+) توسط دو آنزیم فوق با همان شرایط ذکر شده مورد هضم قرار گرفت. بعد از تخلیص محصولات ژنی و ناقل، واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase صورت پذیرفت. محصول واکنش الحاق با استفاده از روش شوک الکتریکی به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سوش TOP10 منتقل گردید. باکتری‌های ترانسفورم شده به پلیت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین منتقل و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه، جهت ایجاد کلونی قرار داده شد. جهت گزینش کلونی‌های دارای ناقل نوترکیب، از کلونی‌های حاصل نمونه برداری شده و از آن‌ها به‌عنوان الگوی واکنش PCR استفاده شد، سپس PCR (یا واکنش کلونی - PCR) انجام گرفت. بعد از انتخاب کلونی حاوی ناقل نوترکیب، ناقل استخراج شده و جهت تایید اولیه‌ی ورود ژن در آن، ناقل تحت تاثیر آنزیم‌های Nde I و Hind III قرار گرفت (هضم دوگانه). در نهایت ناقل مورد نظر با استفاده از پرایمر پروموتور T7 توسط شرکت Bioneer تعیین توالی گردید.

بیان، خالص‌سازی و تا خوردگی مجدد گرانزیم M؛ ناقل نوترکیب از طریق واکنش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* سوش BL21 منتقل و کلونی‌های حاوی قطعه‌ی مورد نظر از طریق واکنش کلونی PCR مشخص گردید به منظور بیان ژن مورد نظر، پس از کشت شبانه‌ی کلونی‌های جداسازی شده، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از باکتری‌های رشد یافته به طور جداگانه در دو فلاسک، حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط LB (نسبت ۱ به ۱۰۰) و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تلقیح شد. پس از رسیدن به $OD = 0.6$ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ماده‌ی القاکننده‌ی IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به دو محیط

کشت افزوده شد. سپس یکی از فلاسک‌ها در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و دیگری در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شده و طی بازه‌های زمانی مختلف (۱۶ و ۱۲ و ۵ و ۲ ساعت بعد از القا) از آن‌ها نمونه برداری شد تا شرایط بهینه بیان به دست آید. (نتایج مربوط به زمان‌های مختلف بعد از القا، نشان داده نشده است). سپس نمونه‌های القا شده و القا نشده جمع‌آوری شده و با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰۰g باکتری‌های حاوی پروتئین نوترکیب از مایع رویی (سوپرناتانت) جدا شده و بیان پروتئین در آن‌ها با الکتروفورز SDS-PAGE (ژل بالا ۴ درصد و ژل پایین ۱۵ درصد) آنالیز شد. به منظور اندازه‌گیری قطعات پروتئین بر روی ژل از اندازه‌نمای پروتئین شرکت فرمتاز (Cat.No.SMO671) استفاده شد. جهت تخلیص و تاخوردگی مجدد پروتئین، بعد از بیان پروتئین، انکلوژن بادی‌های حاصل از بیان در طی چندین مرحله سونیکاسیون جمع‌آوری و در نهایت با استفاده از بافر حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار Glycine, Tris-HCl (pH 8) ۵۰ میلی‌مولار، ۲-Mercapto Ethanol ۱ میلی‌مولار و ۸ Urea مولار حل شدند. از آن جایی که پروتئین مورد نظر دارای دنباله‌ی هیستیدینی بود، خالص‌سازی و تا خوردگی مجدد با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل-آگارز به‌طور همزمان انجام گرفت. جهت تا خوردن تدریجی پروتئین متصل به ستون نیکل-آگارز شستشوی ستون در ۵ مرحله‌ی متوالی با استفاده از ۵ بافر شستشوی دارای ۳۰ میلی‌مولار Tris-HCl 20mM, NaCl 100mM, Imidazole با pH ۸ و غلظت‌های متفاوت از او، انجام گرفت. در بافرهای شستشو غلظت او به ترتیب ۲، ۴، ۶، ۸ و صفر مولار بود. اولین بافر شستشو حاوی او به ۸ مولار بوده و آخرین بافر شستشوی مورد استفاده فاقد او به ۰ بود. همچنین لازم به ذکر است چون پروتئین نوترکیب گرانزیم M حاوی پیوند دی‌سولفیدی است، جهت ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی صحیح، در بافر شستشوی حاوی ۸ و ۶ میلی‌مولار او،

جهت بررسی غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. در این روش ۵۰ میکرولیتر از محلول پروتئینی به ۲/۵ میلی‌لیتر از معرف برادفورد (محلول حاوی کوماسی بریلیانت بلو G250، اتانول و اسید فسفریک) اضافه و جذب نمونه حاصل در طول موج ۵۹۵ نانومتر بررسی گردید. سپس با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA) غلظت پروتئین محاسبه گردید.

یافته‌ها

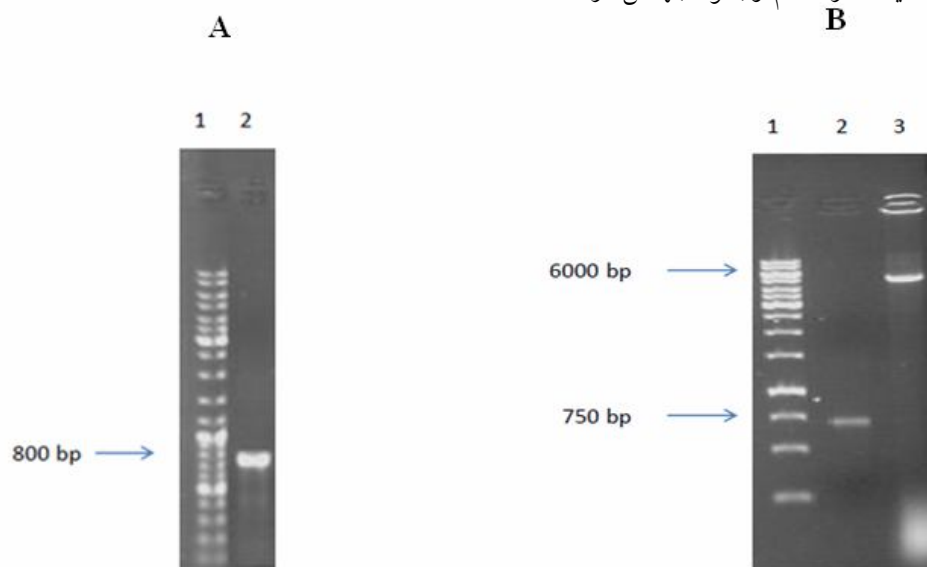
تکثیر cDNA گرانزیم M و همسانه‌سازی توالی مربوط به گرانزیم M بالغ در ناقل بیانی: جهت همسانه‌سازی گرانزیم M، علیه توالی نوکلئوتیدی آنزیم بالغ پرایمر طراحی و سپس با واکنش PCR توالی مورد نظر تکثیر شد. همان‌طور که در شکل ۲A مشاهده می‌گردد، توالی مورد نظر با کارایی بالایی تکثیر یافته و ۷۱۸ جفت باز طول دارد. محصول واکنش PCR (خالص شده) و ناقل بیانی pET21a(+) تحت تاثیر هضم با دو آنزیم NdeI و HindIII قرار گرفتند. بعد از خالص‌سازی محصولات حاصل از هضم و اطمینان از خلوص آن‌ها (شکل ۲B) واکنش الحاق صورت پذیرفت. بعد از الحاق، ناقل‌های نو ترکیب ساخته شده به باکتری *E. coli* سوش TOP10 منتقل گردیدند. ظهور کلونی‌ها بر روی محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، نشان‌دهنده انتقال موفق ناقل به باکتری مستعد بود. جهت گزینش کلونی‌های دارای ناقل نو ترکیب، واکنش کلونی PCR برای تعدادی از کلونی‌ها انجام گرفت و نتایج حاصل از واکنش PCR وجود باند اختصاصی با اندازه تقریبی ۷۱۸ جفت باز را بر روی ژل آگارز نشان داد که تاییدکننده وجود ناقل نو ترکیب حاوی cDNA گرانزیم M در کلونی‌های مورد نظر بود (شکل ۳A). پس از استخراج ناقل بیانی ساخته شده، حضور توالی الحاق یافته با استفاده از واکنش هضم دوگانه توسط آنزیم‌های NdeI و HindIII مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از

DTT (دی‌تیو تری‌تول) با غلظت ۵ میلی‌مولار استفاده شد. در نهایت پروتئین مورد نظر با استفاده از بافر جداکننده (۲۵۰ میلی‌مولار 20mM Tris-HCl, NaCl 100mM, Imidazole) و pH: ۸، جدا و از طریق الکتروفورز SDS-PAGE آنالیز گردید.

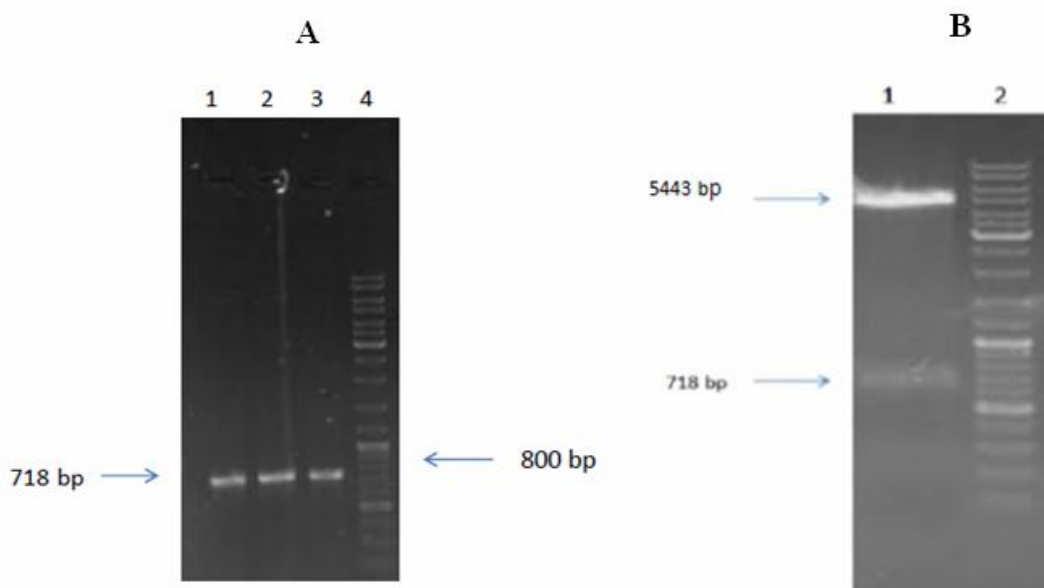
تعیین فعالیت آنزیم: پس از دیالیز پروتئین خالص با استفاده از کیسه دیالیز با قطر منافذ ۱۰ کیلو دالتون علیه بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار (pH ۷/۵)، جهت تعیین فعالیت پروتئینی گرانزیم M از سوبسترای کازئین استفاده گردید. به ۴۰۰ میکرولیتر محلول کازئین ۱ درصد در بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار (pH ۷/۵) ۱۰۰ میکرولیتر محلول گرانزیم M خالص‌شده اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید سپس به منظور توقف واکنش آنزیمی ۵۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۵ درصد (وزنی به حجمی) به آن افزوده شد. در این آزمایش از نمونه کنترل منفی (کازئین ۱ درصد + تری کلرواستیک اسید) استفاده گردید. پس از سانتیفریوژ، میزان جذب محلول رویی در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و در نهایت بر اساس نمودار استاندارد تیروزین، فعالیت اختصاصی گرانزیم M محاسبه گردید. لازم به ذکر است جهت حصول به زمان بهینه عمل آنزیم، آنزیم در زمان‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه با استفاده از سوبسترای کازئین تعیین فعالیت شد و با توجه به خطی بودن فعالیت آنزیم علیه زمان در بازه ۲۰ تا ۹۰ دقیقه، نقطه‌ی میانی آن یعنی زمان یک ساعت جهت تعیین فعالیت آنزیم انتخاب شد. هر واحد عمل آنزیمی مقدار آنزیمی است که توانایی جدا کردن یک میکرومول تیروزین از کازئین را در واحد زمان (دقیقه) داشته باشد. بعد از به دست آوردن فعالیت آنزیم، فعالیت ویژه‌ی آن از تقسیم فعالیت آنزیم بر غلظت آن محاسبه گردید (فعالیت ویژه قبل از تخلیص به دلیل غیرفعال بودن آنزیم قبل از تخلیص همزمان با تاخوردن، محاسبه نشد). تعیین غلظت پروتئین:

توالی وارد شده، ناقل ساخته شده تعیین توالی گردید. نتایج تعیین توالی نشان داد که ژن در ناقل بیانی وارد شده و فاقد جهش می باشد.

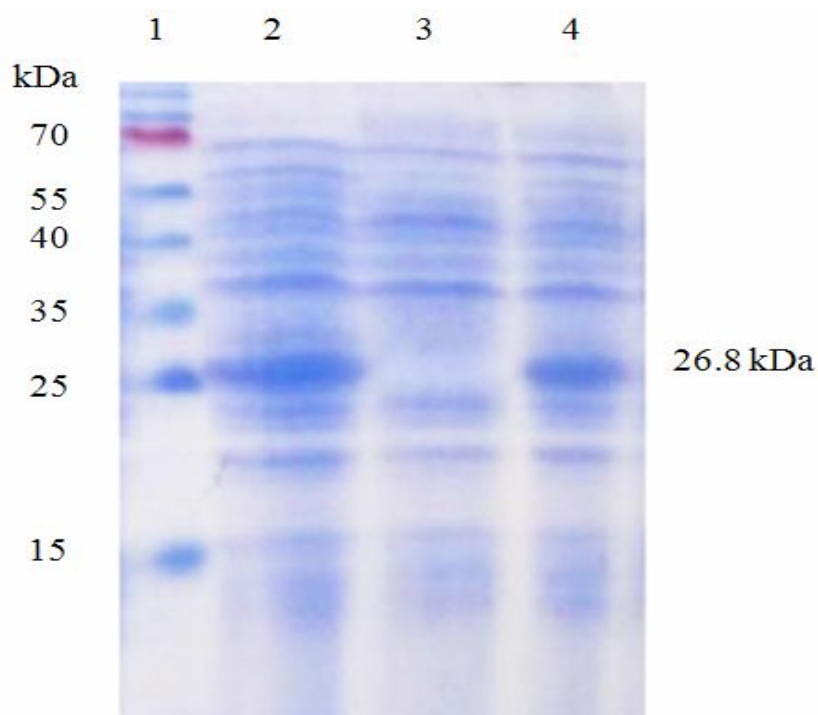
الکتروفورز ژل آگارز، وجود دو باند با اندازه های ۵۴۴۳ و ۷۱۸ جفت بازی را نشان داد که تاییدکننده ی صحت وجود ژن در ناقل نو ترکیب بود (شکل ۳B). در نهایت جهت تایید ورود ژن به ناقل و اطمینان از عدم وجود جهش در



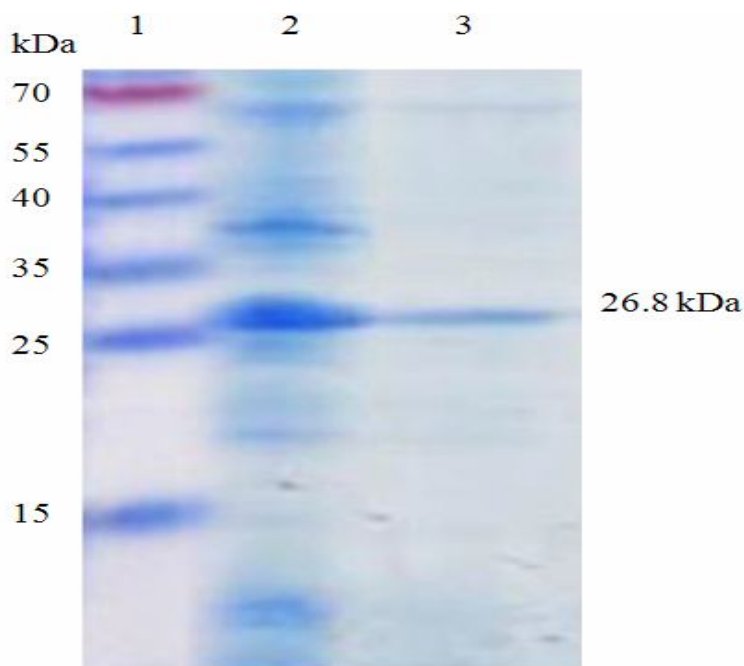
شکل ۲: A: نتیجه ی الکتروفورز محصولات PCR ۱. اندازه نمای DNA؛ ۲. cDNA گرانزیم M تکثیر یافته، B: نتیجه ی الکتروفورز cDNA و وکتور تخلیص شده. ۱. اندازه نمای DNA؛ ۲ و ۳ به ترتیب، محصول هضم دوگانه و خالص شده cDNA گرانزیم M و ناقل بیانی pET21a(+)



شکل ۳: A: نتیجه ی الکتروفورز محصولات PCR. ۱، ۲ و ۳. محصولات کلونی PCR. ۴. اندازه نمای DNA. B: نتیجه ی الکتروفورز حاصل از واکنش هضم دوگانه. ۱. ناقل نو ترکیب برش یافته و قطعه جدا شده از آن (قطعه الحاق یافته) و ۲. اندازه نمای DNA



شکل ۴: نتیجه‌ی SDS-PAGE حاصل از بیان پروتئین گرانزیم M. ۱: اندازه نمای پروتئین (اندازه مربوط به ۱۰ کیلو دالتون از ژل خارج شده است)، ۲: نمونه‌ی القاشده در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳: نمونه‌ی القاشده، ۴: نمونه‌ی القاشده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد.



شکل ۵: نتیجه‌ی SDS-PAGE حاصل از مرحله‌ی خالص‌سازی؛ ۱: اندازه نمای پروتئین (لازم به ذکر است اندازه مربوط به ۱۰ کیلو دالتون از ژل خارج شده است)، ۲: انکلوژن‌بادی‌های حل شده (تخلیص نشده)، ۳: محصول خالص‌سازی

حاصل از شرایط تاخوردن گفته شده در قسمت مواد و روش‌ها دارای بهترین فعالیت (فعالیت اختصاصی ۷۱ واحد بر میلی‌گرم) بود. این آزمایش نشان می‌دهد که آنزیم به درستی تاخورده، فعالیت پروتئازی خود را به دست آورده و بر روی کازئین عمل نموده است.

بحث

بیان ژن‌های کلون‌شده در باکتری‌ها، به‌طور گسترده‌ای در صنایع مختلف از جمله صنعت داروسازی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی، و در پژوهش‌ها جهت تولید پروتئین با هدف مطالعات ساختاری و بیوشیمیایی استفاده می‌گردد. باکتری‌ها به‌عنوان کارخانه‌ی تولید پروتئین عمل کرده و پروتئین‌های نوترکیب را در زمانی کوتاه با هزینه‌ای کم‌تر تولید می‌کنند (۱۸). پروتئین‌های انسانی مختلفی تا به حال در سیستم بیانی /شریشیاکلی بیان شده‌اند. با این حال مشکل عمده در این نوع سیستم‌ها تا خوردن اشتباه پروتئین یا تشکیل پیوندهای دی سولفیدی اشتباه (در پروتئین‌های حاوی چند سیستئین) است (۴ و ۲۰). جهت رفع این مشکل‌ها روش‌های مختلفی از جمله اضافه نمودن توالی‌های کمکی و یا بهینه سازی شرایط تاخوردن در آزمایشگاه وجود دارد، و و ال و همکاران مشاهده نمودند که اضافه نمودن توالی *pelB* نمی‌تواند در تا خوردن صحیح گرانزیم M موثر باشد (۵). همچنین دیده شده است که افزودن *pelB* به پروتئین فاکتور رشد اپیدرمی انسان (hEGF) باعث کاهش بیان شده است (۲). بنابراین اضافه نمودن *pelB* جهت تولید گرانزیم M مناسب به نظر نمی‌رسد. از طرف دیگر اضافه کردن توالی تیوردوکسین به پروتئین‌ها باعث افزایش مراحل خالص‌سازی می‌شود، زیرا اول بایستی با هضم پروتئازی پروتئین اضافه شده (تیوردوکسین) به پروتئین نوترکیب خالص شده را جدا کرده، سپس پروتئین نوترکیب را دوباره خالص نمود

بیان، خالص‌سازی و تاخوردگی مجدد گرانزیم M: پس از القای باکتری‌های *E. coli* BL21(DE3) حاوی وکتور نوترکیب و بررسی فاکتورهای مختلف دخیل در بیان پروتئین، از جمله زمان و دمای القا و همچنین غلظت‌های مختلف القاکننده، سوسپانسیون‌های سلولی در طی چندین مرحله از طریق SDS-PAGE مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج حاصل از SDS-PAGE باند پروتئینی ۲۶/۸ کیلودالتونی را در نمونه‌های القا شده نشان داد، در حالی که نمونه‌ی القا نشده فاقد آن بود و همین امر تاییدی بر بیان گرانزیم M بود (شکل ۴). بهترین سطح بیان در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، غلظت ۱ میلی‌مولار از IPTG به مدت ۵ ساعت می‌باشد. علاوه بر این نتایج نشان داد که پروتئین گرانزیم M در باکتری به‌صورت انکلوژن بادی تولید می‌گردد (پروتئین نوترکیب تولید شده محلول نبوده و به همراه لاشه‌های سلولی در سانتریفیوژ رسوب می‌کرد). انکلوژن بادی‌های حل شده از طریق ستون نیکل-آگارز خالص و همزمان به حالت طبیعی خود درآمدند. پس از اتمام مراحل خالص‌سازی نمونه‌ها از طریق SDS-PAGE آنالیز شدند. نتایج نشان داد که خالص‌سازی با کارایی بالایی انجام گرفت و باند پروتئینی مورد نظر با اندازه ۲۶/۸ کیلودالتون مشاهده گردید (شکل ۵). لازم به ذکر است که جهت حصول به شرایط تاخوردن مجدد آنزیم، شیب غلظت‌های مختلف از اوره و همچنین دی‌تیوتریتول استفاده شد تا شرایط بهینه حاصل گردد.

تعیین فعالیت اختصاصی گرانزیم M: بدیهی است که خالص‌سازی و تا خوردن مجدد، زمانی ارزشمند خواهد بود که آنزیم حاصل به لحاظ زیستی فعال باشد. جهت تعیین فعالیت پروتئازی گرانزیم M از سوبسترای کازئین استفاده گردید. قابل ذکر است که در طی بررسی شرایط مختلف تاخوردن، فعالیت گرانزیم M‌های حاصل از هر کدام از شرایط، مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که آنزیم

نتیجه گیری

در نهایت می‌توان گفت که در این مطالعه با بهینه‌سازی شرایط تا خوردن، روشی یک مرحله‌ای (خالص سازی به همراه تا خوردن) جهت تولید گرانزیم M انسانی فعال پیشنهاد شد. بنابراین می‌توان گفت روش به کار رفته در این تحقیق بدون اضافه نمودن توالی خاصی (تیوردوکسین و pelB) به پروتئین باعث ایجاد تا خوردگی صحیح در پروتئین شد، بنابراین مشکلات مربوط به آن‌ها را (کاهش بیان و افزایش مراحل خالص سازی) را نخواهد داشت. از طرف دیگر نتایج مربوط به تعیین فعالیت نشان داد که این آنزیم می‌تواند کازئین را تخریب نماید بنابراین می‌توان از کازئین به عنوان سوستر در مطالعه‌ی بیشتر این آنزیم بهره جست. این مطالعه می‌تواند در جهت کشف فعال کننده‌های آنزیم گرانزیم M (آنزیم القا کننده ی آپوپتوز) باشد که با فعال نمودن آن بتوان القای آپوپتوز را در سلول‌های توموری افزایش داد. بنابراین گرانزیم M می‌تواند هدفی بالقوه برای داروهای ضد سرطان باشد. با این حال جهت مقایسه‌ی میزان کارایی آنزیم تولیدی در این تحقیق با آنزیم تولیدی شرکت‌های معتبری همچون سیگما، به مطالعه‌ی مقایسه‌ای خصوصیات آنزیمی با استفاده از سوسترهای سنتزی و همچنین کازئین نیاز است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از مساعدت‌های گروه بیوتکنولوژی کشاورزی و از حمایت‌های مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

(۲۰۱۹). در این تحقیق ناقل بیانی حاوی cDNA گرانزیم M انسانی (بالغ بدون توالی کمکی در تا خوردن) ساخته شده و پروتئین نو ترکیب در /شریشیاکلی بیان شد. محصول به دست آمده از بیان پروتئین به صورت انکلوژن بادی بود، بنابراین با توجه به روش اشاره شده در این تحقیق، سعی شد که شرایط تا خوردن آنزیم همزمان با خالص سازی (با استفاده از بافرهای شستشوی مختلف حاوی مقادیر مختلفی از اوره و همچنین به کار بردن ماده احیا کننده ی دی‌تیوتریتول) بهینه گردد و گرانزیم M به درستی تا خوردگی صحیح را کسب کند. نتیجه الکتروفورز ژل SDS-PAGE نشان داد که آنزیم خالص شده است و همچنین نتیجه تعیین فعالیت با سوسترای کازئین تایید نمود که گرانزیم M خالص شده فعال است. بنابراین با توجه به فعال بودن گرانزیم می‌توان دریافت که پروتئین تا خوردگی بیولوژیک (فعال به لحاظ زیستی) و صحیح خود را کسب نموده است. جهت تعیین فعالیت گرانزیم M از سوسترهای سنتزی همچون پپتید تیواسترها نیز می‌توان استفاده نمود اما سوسترهای سنتزی نسبت به سوسترای گرانزیم M که پروتئین‌ها هستند سوسترهای کوچکی بوده و بنابراین خصوصیات آنزیمی محاسبه شده با آن‌ها می‌تواند با خصوصیت طبیعی گرانزیم M متفاوت باشد. در مقابل تعیین فعالیت گرانزیم M با سوسترای پروتئینی (کازئین) خصوصیات آنزیمی مشابه با خصوصیات طبیعی آنزیم در سلول به دست می‌دهد. به این دلیل است که در تحقیق بر روی آنزیم‌های پروتئاز معمولاً از کازئین استفاده می‌شود (۲۱). علاوه بر این کازئین ماده‌ای است که به وفور یافت شده و هزینه کار با آن به مراتب کمتر از سوسترهای سنتزی است.

References

1- Vallejo LF, Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial

inclusion body proteins. *Microb Cell Fact.* 2004; 3: 11.

2- Ferrer Soler L, Cedano J, Querol E, de Llorens

- R. Cloning, expression and purification of human epidermal growth factor using different expression systems. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 788: 113-23.
- 3- de Poot SA, Westgeest M, Hostetter DR, et al. Human and mouse granzyme M display divergent and species-specific substrate specificities. *Biochem J.* 2011; 437: 431-42.
- 4- Huang L, Ching CB, Jiang R, Leong SS. Production of bioactive human beta-defensin 5 and 6 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. *Protein Expr Purif.* 2008; 61: 168-74.
- 5- Wu L, Wang L, Hua G, et al. Structural basis for proteolytic specificity of the human apoptosis-inducing granzyme M. *J Immunol.* 2009; 183: 421-9.
- 6- Kam CM, Hudig D, Powers JC. Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1477: 307-23.
- 7- Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol.* 2008; 26: 389-420.
- 8- de Koning PJ, Kummer JA, Bovenschen N. Biology of granzyme M: a serine protease with unique features. *Crit Rev Immunol.* 2009; 29: 307-15.
- 9- Kelly JM, Waterhouse NJ, Cretney E, et al. Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *J Biol Chem.* 2004; 279: 22236-42.
- 10- Hu D, Liu S, Shi L, Li C, Wu L, Fan Z. Cleavage of survivin by granzyme M triggers degradation of the survivin-X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) complex to free caspase activity leading to cytolysis of target tumor cells. *J Biol Chem.* 2010; 285: 18326-35.
- 11- Cullen SP, Afonina IS, Donadini R, et al. Nucleophosmin is cleaved and inactivated by the cytotoxic granule protease granzyme M during natural killer cell-mediated killing. *J Biol Chem.* 2009; 284: 5137-47.
- 12- Lu H, Hou Q, Zhao T, et al. Granzyme M directly cleaves inhibitor of caspase-activated DNase (CAD) to unleash CAD leading to DNA fragmentation. *J Immunol.* 2006; 177: 1171-8.
- 13- Bladergroen BA, Meijer CJ, ten Berge RL, et al. Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-hodgkin and hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood.* 2002; 99: 232-7.
- 14- Mahrus S, Kisiel W, Craik CS. Granzyme M is a regulatory protease that inactivates proteinase inhibitor 9, an endogenous inhibitor of granzyme B. *J Biol Chem.* 2004; 279: 54275-82.
- 15- Hua G, Zhang Q, Fan Z. Heat shock protein 75 (TRAP1) antagonizes reactive oxygen species generation and protects cells from granzyme M-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2007; 282: 20553-60.
- 16- Bovenschen N, de Koning PJ, Quadir R, Broekhuizen R, Damen JM, Froelich CJ, et al. NK

cell protease granzyme M targets alpha-tubulin and disorganizes the microtubule network. *J Immunol.* 2008; 180: 8184-91.

17- Rukamp BJ, Kam CM, Natarajan S, et al. Subsite specificities of granzyme M: a study of inhibitors and newly synthesized thiobenzyl ester substrates. *Arch Biochem Biophys.* 2004; 422: 9-22.

18- Clark EDB. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol.* 1998; 9: 157-63.

19- Huang HW, Mohan SK, Yu C. The NMR solution structure of human epidermal growth factor (hEGF) at physiological pH and its

interactions with suramin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 402: 705-10.

20- Haghi F, Peerayeh SN, Siadat SD, Montajabiniat M. Cloning, expression and purification of outer membrane protein PorA of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Infect Dev Ctries.* 2011; 5: 856-62.

21- Pazhang M, Khajeh K, Ranjbar B, Hosseinkhani S. Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin. *J Biotechnol.* 2006; 127: 45-53.

Cloning and Production of Recombinant Human Granzyme M Enzyme

Khazeh N¹, Pazhang M¹, Mehrnejad F², Chaparzadeh N¹

¹Dept. of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

²Dept. of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

Corresponding Author: Pazhang M, Dept. of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

E-mail: mpazhang@yahoo.com

Received: 23 Nov 2014 **Accepted:** 12 Apr 2015

Background and Objective: Granzyme M is a member of a granule serine proteases family, which is mainly expressed by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. Granzyme M appears to be a potent inducer of tumor cell apoptosis. With respect to the importance of Granzyme M in the apoptosis, the aim of this work is the production of the biologically active enzyme.

Materials and Methods: The cDNA fragment of active hGzm M, was cloned into bacterial expression vector pET21a (+). Recombinant plasmid was transformed into competent cells via heat shock method for protein expression. Induction condition was optimized to obtain high yield of recombinant protein and then protein expression analysis was done by SDS-PAGE. Produced inclusion bodies were dissolved in buffer solution containing Urea (8M) and then purified by Ni-Agarose Affinity Chromatography. The protease activity of granzyme M was assayed by spectrophotometric method, using casein as substrate.

Results: Recombinant granzyme M was expressed as inclusion bodies in *E. coli* and expression of protein at 22°C with 1Mm IPTG during 5 hours provided the best protein expression level. Granzyme M was purified and refolded simultaneously by Ni-Agarose Affinity Chromatography using a concentration gradient of Urea. Results of the enzyme activity determination showed that the enzyme is active in the presence of casein and its specific activity is 71 U/mg. The activity of granzyme M showed that the enzyme was refolded properly.

Conclusion: In this study a simple method was suggested to produce granzyme M and to determine the enzymatic activity of this enzyme which is involved in cancer cell apoptosis. This enzyme could be a potential target for anticancer drugs and the proposed method in this work facilitates studies on granzyme M.

Key words: Granzyme M, Apoptosis, Casein, Protease activity, Inclusion bodies