کلونینگ شکل جدیدی از فعال کننده پلاسمینوژن انسانی نوترکیب در سیستم یوکاریوتیک

راضیه نظری*[۱] و نوشین داودی[۲]

[۱] قم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، گروه میکروبیولوژی

[۲] تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۱۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۴/۶

چکیده

پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن (tPA) به عنوان عامل ترومبولیتیک برتر جهت درمان بیماریهایی نظیر انفارکتوس میوکارد حاد شناخته شده و امروزه بهبود ویژگیهای فارماکوکینتیک آن مورد توجه قرار گرفته است. Reteplase(K2S) مشتقی از مولکول tPA می باشد که نیمه عمر و مقاومت آن به مهارکننده نسبت به مولکول tPA طبیعی افزایش چشمگیری را نشان می دهد. در این تحقیق هدف اصلی کلونینگ و بیان فرم K2S ژن tPA در سیستم یوکاریوتیک *Leishmania tarentolae* می باشد که جدیداً به عنوان میزبان مناسب جهت کلونینگ و بیان ژنهای یوکاریوتیک معرفی شده است. کاست بیانی واجد فرم K2S از پروتئین tPA همراه با توالی signal sequence حاصل از اسید فسفاتاز ترشحی لیشمانیا و دو قطعه از لوکوس زیرواحد کوچک ریبوزومی rRNA که در نوترکیبی همولوگ مورد نیاز است طی پروسه الکتروپوریشن به داخل سلولهای *L. tarentolae* وارد گردید. تست PCR تشخیصی ادغام کاست بیانی K2S در سایت 18srRNA را نشان داد. تست زیموگرافی روی سوپرناتانت کشت سلولهای ترانسفکت *L .tarentolae* نشان داد که این سلولها قادر به تولید پروتئین نوترکیب K2S به صورت خارج‌سلولی با فعالیت سرین پروتئازی مناسب خود می باشند و بنابراین مشخص شد که پروتئین rK2S تولید شده در سلولهای *L .tarentolae* از لحاظ بیولوژیکی فعال بوده و در این سیستم فولدینگ مناسب خود را یافته اند. با توجه به این که محیطهای کشت این سیستم بیانی یوکاریوتیک ساده و ارزان قیمت می باشد و همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که *L .tarentolae* می تواند به عنوان یک سیستم مناسب جهت تولید rK2S مورد استفاده قرار گیرد، لذا می توان امید داشت که با تولید و بهینه سازی بیان rK2S در این سیستم بتوان هزینه تولید این دارو را به حداقل رساند.

واژه های کلیدی: Reteplase، *L. tarentolae* و tPA

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۵۱-۷۷۸۰۰۰۱ پست الکترونیکی: nazari1102002@yahoo.com

مقدمه

پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن (tPA) یکی ازعوامل ترومبولیتیکی است که جهت درمان بیماریهایی نظیر انفارکتوس میوکارد حاد، امبولیسم ریوی مورد استفاده قرار می گیرد. این ترکیب تمایل بالایی به فیبرین داشته، در تجزیه لخته های فیبرینی در جریان خون نقش دارد و به این دلیل به عنوان عامل ترومبولیتیک برتر شناخته شده است (۱). پروتئین tPA واجد ۵۲۷ اسید آمینه بوده و وزن مولکولی آن ۷۲ کیلو دالتون می باشد. این پروتئین از پنج ناحیه Finger، EGF، Kringle 1,2 و ناحیه پروتئازی تشکیل شده است. نیمه عمر tPA حدودا ۴-۳ دقیقه می باشد (۸). به دلیل اهمیتtPA امروزه تحقیقات گسترده ایی روی اصلاح ویژگیهای فارماکوکینتیک آن و ساخت اشکال جدیدtPA با کارآییهای کلینیکی مطلوب متمرکز شده است(۷). در این راستا تلاش در جهت ساخت مشتقی از مولکول tPA می باشد که نسبت به مولکول tPA طبیعی، نیمه عمر بیشتری داشته و در ضمن

Archive of SID
www.SID.ir

مقاومت بیشتری نیز به مهارکننده داشته باشد. Reteplase (K2S) شکلی از مولکول tPA طبیعی است که تنها واجد ناحیه Kringle 2 و ناحیه پروتئازی از مولکول tPA طبیعی می باشد. وزن مولکولی این مولکول kDa ۳۹ بوده و واجد ۹ پیوند دی سولفیدی است که در فولدینگ صحیح مولکول نقش دارند. به دلیل حذف نواحی Finger و EGF، حذف هپاتیک مولکول کاهش یافته و به این ترتیب نیمه عمر پلاسمایی آن به ۱۸- ۱۴دقیقه افزایش می یابد. توالی ژنتیکی فرم K2S ژن tPA که برای اولین بار در *E. coli* کلون گردید و مشاهده شد که پروتئین نوترکیب K2S به صورت اینکولوژن بادیهای غیر فعال در *E. coli* تولید می گردد (۳، ۶). در واقع تولید پروتئینهای یوکاریوتیک که بیش از دو پیوند دی سولفیدی دارند پیچیده بوده و به میزبانهای یوکاریوتیکی مناسب نیاز دارند(۵). *Leishmania tarentolae* یکی از سیستمهای نوین مطرح شده جهت کلونینگ و بیان پروتئینهای انسانی می باشد. این ارگانیسم انگل نوعی مارمولک به نام *Tarentola annularis* بوده و در انسان غیر بیماری زا می باشد. استفاده از این سیستم مانند سیستمهای بیان باکتریایی آسان بوده و در ضمن سیستم مناسبی برای Modification، Folding و Expression پروتئینهای یوکاریوتیک همراه با تغییرات پس از ترجمه ای پیشرفته (مشابه پستانداران) می باشد(۲). در این تحقیق هدف اصلی کلونینگ و بیان توالی شکل K2S واجد توالی مربوط به ناحیهKringle 2 و ناحیه پروتئازی از ژن tPA در سیستم یوکاریوتیک *L.tarentolae* می باشد. در مرحله بعد نشان داده شد که سلولهای ترانسفکت *L.tarentolae* محصول این تحقیق قادر به تولید پروتئین نوترکیب K2S در شکل فعال خود به صورت خارج سلولی می باشند.

مواد و روشها

تکثیر ژن *K2S* و کلونینگ آن: قطعه K2S ژن tPA با استفاده از پرایمر های اختصاصی و PCR از پلاسمید pTZ57R- tPA (۹) به عنوان الگو تهیه گردید. پرایمر Forward به نام F-K2S با توالی 5'-ACAGGCGCCTCTTACCAAGGAAACAGTGAC TGCTAC-3' حاوی سایت Kas I و پرایمر Reverse به نام R-K2S با توالی 5'-ACACTCGAGTCACACCACCACCACCACCACC GGTCGCATGTTGTCACG-3' حاوی سایت Xho I و یک کدون خاتمه ، برای قطعه K2S اختصاصی بوده و براساس توالی ژن tPA انسانی (GenBank accession number 101047) طراحی گردید. شرایط PCR به صورت باز شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۶۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه به صورت ۳۰ سیکل و طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR در وکتور pGEM-T Easy vector (promega) کلون گردید. پلاسمید های نوترکیب pGEM T vector-K2S طی واکنش هضم آنزیمی با آنزیمهای تحدیدی Kas I/Xho I (Biolab) مورد تأیید قرار گرفت و به منظور بررسی صحت توالی قطعه K2S کلون شده جهت تعیین توالی ارسال گردید. برای بیان ژن K2S در سلولهای میزبان *L. tarentolae* از وکتور بیانی اختصاصی لیشمانیا (pF_4splmsapx1.4hyg Jena Bioscience) استفاده شد. قطعه K2S طی واکنش هضم آنزیمی با آنزیمهای Kas I/Xho I از پلاسمید های نوترکیب pGEM T vector-K2S خارج و در سایت Xho Kas I/I وکتور بیانی اختصاصی لیشمانیا pF_4splmsapx1.4hyg کلون گردید. حضور ژن K2S در پلاسمید های نوترکیب pF_4splmsapx1.4hyg-K2S با استفاده از واکنش هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت.

ترانسفکشن سلولهای *L.tarentolae*: سلولهای *L tarentolae* روی محیط Brain heart infusion broth (شرکت Difco, USA) واجد ۱۵ µg/ml همین (شرکتSigma,UK) در ۲۶ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. پلاسمیدهای

Archive of SID

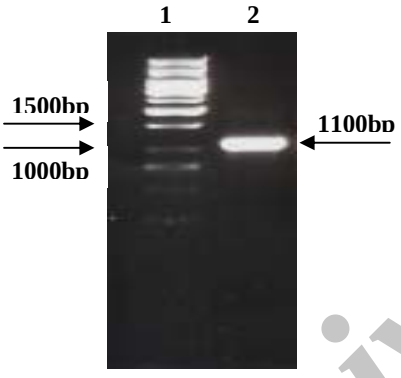
www.SID.ir

pF4splmsapx1.4hyg-K2S با استفاده از آنزیم Swa I (Fermentas) طی واکنش هضم آنزیمی جهت ترانسفکشن و ورود به سلولهای *L. tarentolae* خطی شدند. پس از رسیدن سلولهای *L .tarentolae* به فاز لگاریتمی رشد و تعداد10^8cells/ml ، حدودا 10 µg پلاسمید واجد قطعه K2S طی پروسه الکتروپوریشن وارد سلولها گردید. کلونهای نوترکیب به صورت کلنیهای تک روی محیط نیمه جامد BHI واجد 50µg/ml هیگرومایسین B (Sigma) بعد از ۵ روز انتخاب و DNA ژنومیک آنها تخلیص گردید. ادغام کاست بیانی واجد قطعه K2S درون ژنوم سلولهای نوترکیب *L. tarentolae* طی واکنش PCR تشخیصی با استفاده از پرایمر های 5'- hyg forward CATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCG-3' ، 5'- Reverse ssu CTGCAGGTTCACCTACAGCTAC-3' و DNA ژنومیک سلولها، مورد تأیید قرار گرفت.

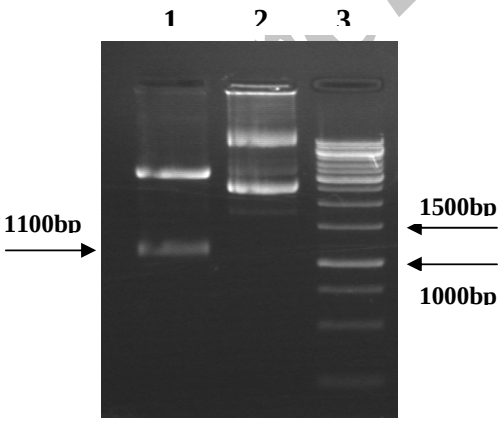
بررسی بیان پروتئین نوترکیب *K2S* توسط سلولهای نوترکیب *L. tarentolae* : برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب K2S توسط سلولهای ترانسفکت *L. tarentolae* و ارزیابی فعالیت بیولوژیک آن از تست زیموگرافی استفاده شد. در این تست از ژلهای پلی آکریلامید SDS (۱۲ درصد) واجد پلاسمینوژن (chromogenix) و ژلاتین (Sigma) به عنوان سوبسترا جهت ارزیابی فعالیت پروتئولیتیک K2S نوترکیب استفاده شد. نمونه ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد و جریان ثابت 8 mA الکتروفورز گردید. سپس ژلها با تریتون X-100 ۲/۵ درصد به مدت یک ساعت در دمای اطاق شستشو یافت. در مرحله بعد ژلها درگلایسین 0.1 M NaOH/ (pH=8.3) به مدت ۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. نهایتا ژلها با استفاده از روش کوماسی بریلیانت بلو رنگ آمیزی و رنگ زدایی شد.

نتایج

کلونینگ ژن *K2S* : با استفاده از پرایمر های اختصاصی K2S طی واکنش PCR، ژن K2S که محصولی با سایز 1100 bp می باشد، ایجاد گردید(شکل ۱) و در وکتور pGEM-T Easy vector کلون و در سلولهای *E. coli* از طریق ترانسفورمیشن وارد گردید. سلولهای ترانسفورم شده با روش Blue-White screening غربال و چند کلنی سفید جهت تخلیص پلاسمید انتخاب شد. خروج قطعه 1100 bp از پلاسمیدهای نوترکیب pGEM T vector-K2S طی واکنش هضم آنزیمی با آنزیمهای Kas I/Xho I ، کلونینگ ژن K2S در این پلاسمیدها را مورد تأیید قرار داد (شکل۲).



شکل۱ – تکثیر ژن K2S با PCR. ستون ۱: مارکر وزن مولکولی. ستون ۲: تکثیر ژن K2S با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آن



شکل ۲ – تأیید کلونینگ محصول PCR در وکتور pGEM – Tvector با روش هضم آنزیمی. ستون ۱ : هضم پلاسمید با آنزیمهایKasI/XhoI . ستون ۲ : پلاسمید هضم نشده همان کلون.

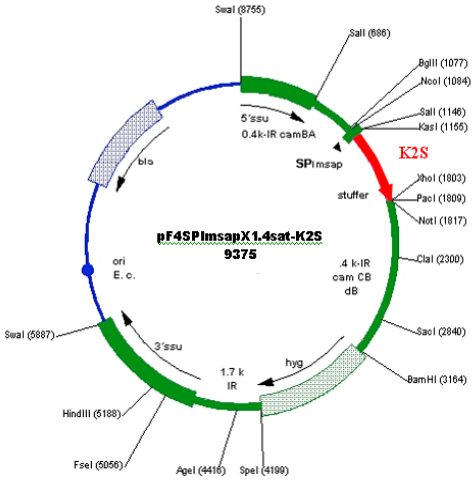
ستون ۳: مارکروزن مولکولی

Archive of SID
www.SID.ir

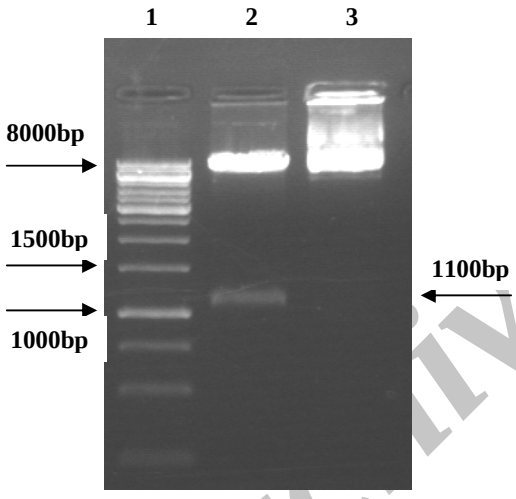
نتایج تعیین توالی ژن K2S و مقایسه آن با توالی ژن tPA انسانی در NCBI نشان داد که توالی ژن K2S حاصل با توالی بخش مشابه از ژن tPA انسانی کاملاً یکسان می باشد. در وکتور بیانی اختصاصی لیشمانیا که جهت بیان ژن K2S در سلولهای *L tarentolae* مورد استفاده قرار گرفت، توالی signal sequence حاصل از اسید فسفاتاز ترشحی *L. mexicana* قرار دارد که با کلونینگ ژن K2S در سایت Kas I/Xho I وکتور، این توالی در سر ژن K2S قرار گرفته و سبب بیان پروتئین K2S به صورت ترشحی به سوپرناتانت محیط کشت سلولها می گردد. همچنین در طرفین کاست بیانی این وکتور قطعاتی از لوکوس rRNA (5'ssu و 3'ssu) قرار دارد که جهت نوترکیبی همولوگ کاست بیانی در این لوکوس مورد استفاده قرار می گیرد (شکل ۳). جهت تأیید کلونینگ ژن K2S در پلاسمیدهای pF_4splmsapx1.4hyg از واکنش هضم آنزیمی با آنزیمهای تحدیدی Kas I/Xho I استفاده شد. در نتیجه این واکنش قطعه 1100 bp مربوط به ژن K2S از پلاسمیدهای حاصل از کلونینگ آزاد شد که سبب تأیید کلونینگ ژن K2S در پلاسمیدهای pF_4splmsapx1.4hyg و ایجاد پلاسمیدهای pF_4splmsapx1.4hyg-K2S گردید (شکل۴).

جهت تأیید بیشتر مجددا از واکنش هضم آنزیمی روی پلاسمیدهای pF_4splmsapx1.4hyg-K2S با آنزیمهای NcoI/SpeI استفاده و نتیجه واکنش آزاد شدن قطعه 3400bp را نشان داد که سبب تأیید مجدد کلونینگ ژن K2S در این پلاسمیدها گردید (شکل ۵).

جهت آماده سازی وکتور بیانی واجدK2S برای انجام نوترکیبی همولوگ در محل 18ssurRNA ژنوم سلولهای *L. tarentolae*، ابتدا وکتور مربوطه با استفاده از آنزیم SwaI تیمارگردید. سپس قطعه مورد نظر از طریق الکتروپوریشن وارد سلول انگل گردید. سلولهایی از *L. tarentolae* که پدیده نوترکیبی همولوگ در آنها رخ می دهد، مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به هیگرومایسین را نشان می دهند.



شکل ۳ – نقشه وکتور بیان کننده اختصاصی لیشمانیا pF_4splmsapx1.4hyg

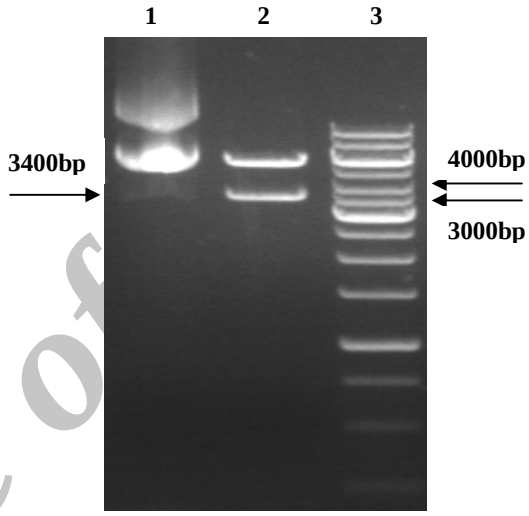


شکل ۴ – تأیید کلونینگ ژن K2S در وکتور pF_4splmsapx1.4hyg با روش هضم آنزیمی ستون۱: مارکروزن مولکولی. ستون ۲ : هضم پلاسمید با آنزیمهای KasI/XhoI. ستون ۳ : پلاسمید هضم نشده همان کلون.

کلونهای حاصل غربال شده و DNA ژنومیک از آنها تخلیص گردید. جهت **تأیید انجام نوترکیبی همولوگ وادغام کاست ژنی بیان کننده** K2S : در سایت 18ssurRNA ژنوم سلولهای ترانسفکت، PCR با استفاده از پرایمرهای Forward ژنhyg در داخل سازه ساخته شده و پرایمر Reverse ازسایت 18ssurRNA داخل ژنوم انگل انجام گرفت. در صورت ادغام کاست ژنی بیان کننده K2S

Archive of SID
www.SID.ir

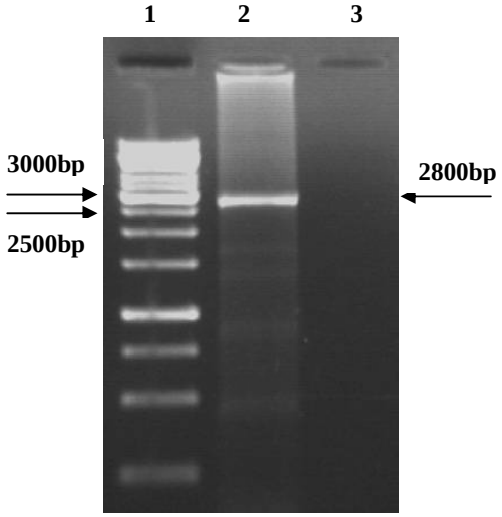
در سایت 18ssurRNA و با استفاده از پرایمرهای مذکور قطعه kb ۲/۸ تکثیر می یابد. در نتیجه PCR فوق در چندین کلون قطعه kb ۲/۸ بدست آمد که تاییدی بر انجام نوترکیبی همولوگ و ادغام سازه ژنی در محل یکسان در تمامی کلونها می باشد. بر روی ژنوم سلولهای ترانسفکت نشده نیز PCR با استفاده از پرایمرهای **فوق گذاشته شد که نتیجه** PCR منفی بود (شکل۶).



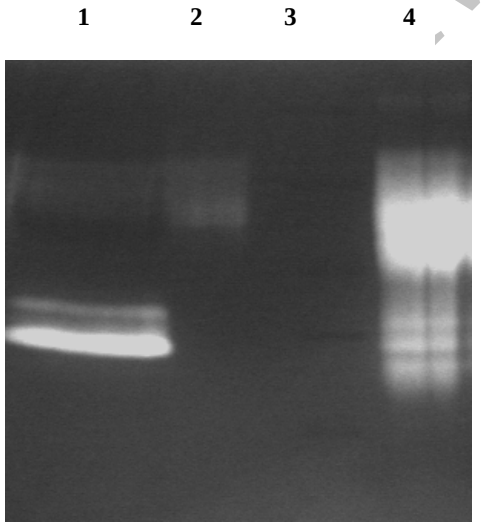
شکل۵ – تأیید مجدد کلونینگ ژن K2S در وکتور pF4splmsapx1.4hygبا روش هضم آنزیمی ستون ۱ : پلاسمید هضم نشده. ستون ۲ : هضم پلاسمید با آنزیمهای Nco I/Spe Iستون۳: مارکروزن مولکولی.

بیان پروتئین نوترکیب *K2S* توسط سلولهای نوترکیب: با استفاده از تست زیموگرافی پروتئین نوترکیب K2S و فعالیت بیولوژیک آن در سوپرناتانت کشت سلولهای ترانسفکت *L .tarentolae* مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور سوپرناتانت کشت سلولهای ترانسفکت و والد جهت کنترل در این تست استفاده شد. نتایج تست زیموگرافی هاله شفافی با وزن مولکولی حدوداً kDa ۴۰ را در سوپرناتانت کشت سلولهای ترانسفکت نشان داد که تولیدrK2S نوترکیب تولیدی در شکل فعال را در سوپرناتانت کشت سلولهای ترانسفکت مورد تأیید قرار داد.

در ستون مربوط به سوپرناتانت کشت سلولهای ترانسفکت نشده هیچ باندی مشاهده نگردید (شکل۷).



شکل ۶ – تأیید اینتگریشن کاست ژنی بیان کننده K2S در ژنوم لیشمانیا با روش PCR . ستون ۱:مارکروزن مولکولی. ستون ۲:نتیجه PCR با پرایمرهایhyg forward و ssu reverse روی DNA ژنومیک سلولهای ترانسفکت ستون ۳: نتیجه PCR با پرایمرهای hyg forward و ssu reverse روی DNA ژنومیک سلولهای ترانسفکت نشده.



شکل ۷ – بررسی بیان و فعالیت بیولوژیکی پروتئین نوترکیب با تست زیموگرافی. ستون ۱ سوپرناتانت کشت سلولهای ترانسفکت. ستون ۲ سوپرناتانت کشت سلولهای ترانسفکت نشده. ستون ۳ مارکروزن مولکولی پروتئین. ستون ۴ نمونه استاندارد tPA

www.SID.ir

بحث

فعال کننده های پلاسمینوژن عوامل فیبرینولیتیکی هستند که عملکرد آنها تبدیل پلاسمینوژن به عامل فیبرینو لیتیک طبیعی پلاسمین می باشد. پلاسمین با تجزیه فیبرین موجود در لخته ، سبب تجزیه لخته می گردد. در بیماریهای ترومبولیتیک نظیر سکته میوکاردیال، امبولیسم ریوی و ..... که عامل اتیولوژیک اساسی بیماری، نقص و یا در موارد شدیدتر انسداد کامل رگهای خونی توسط لخته خونی می باشد، استفاده از فعال کننده های پلاسمینوژن جهت درمان این بیماریها کاربرد یافته است که در میان آنها فعال کننده پلاسمینوژن بافتی Tissue –type plasminogen activator (tPA) به دلیل تمایل بالا به فیبرین و عملکرد اختصاصی آن، به عنوان عامل ترومبولیتیک برتر شناخته شده است (۱). امروزه با استفاده از مهندسی پروتئین ویژگیهای فارماکوکینتیک tPA اصلاح و بهبود یافته و نسلهای جدیدی از این دارو ایجاد گشته است(۱). Reteplase (K2S) عامل ترومبولیتیک نسل سوم یک موتانت حذفی نوترکیب مشتق ازمولکول tPA طبیعی بوده و به دلیل حذف دومینهای Finger و EGF که بر اساس مدارک موجود این دومینها در حذف سریع هپاتیک مولکول tPA نقش دارد، حذف هپاتیک مولکول کاهش یافته و متعاقب آن نیمه عمر پلاسمایی این مولکول به ۱۸-۱۴ دقیقه در مقایسه با نیمه عمر ۴-۳ دقیقه ای مولکول طبیعی (tPA) افزایش یافته است. Reteplase آنتی ژنیک نبوده و با هیچیک از علائم آلرژی مرتبط نمی باشد و بنابراین استفاده مجدد آن در یک فرد مشکلی نخواهد داشت. همچنین نیمه عمر بالای Reteplase سبب کاهش در مرگ و میر بیماران مبتلا به انفارکتوس میوکاردیال حاد گشته است(۷). در تحقیق حاضر به دلیل ویژگیهای مطلوب Reteplase ، ابتدا با طراحی پرایمر های خاص سه دومین ابتدایی مولکول tPA طبیعی حذف و ژن کد کننده Reteplase ساخته شد. جهت کلونینگ و بیان ژن K2S در سلولهای میزبان *L tarentolae*. که تنها توالی مربوط به دو دومین Kringle 2 و دومین پروتئازی را از مولکول tPA طبیعی در بر می گرفت از وکتور بیانی اختصاصی لیشمانیا تحت عنوان pF_4splmsapx1.4hyg استفاده شد. یکی از دلایل استفاده از این وکتور جهت بیان پروتئین نوترکیب در این تحقیق این است که پس از قرارگیری ژن K2S در آن، یک توالی 60bp مربوط به Signal sequence اختصاصی لیشمانیا مشتق از اسید فسفاتاز ترشحی لیشمانیا در ابتدای ژن قرار گرفته و به این ترتیب پروتئین نوترکیب به صورت ترشحی تولید و به محیط کشت سلولهای *L. tarentolae* راه یافته و پروسه تخلیص پروتئین آسان می گردد.

از مزایای دیگر وکتور بیانی انتخابی در این تحقیق، حضور سکانسهای 5´ssu و 3´ssu ژن 18srRNA سلول *L tarentolae*. در این وکتور در طرفین کاست ژنی بیان کننده K2S در آن می باشد که به این ترتیب کاست بیانی فوق با ژن سابیونیت کوچک ریبوزومی (18ssurRNA) در ژنوم سلول انگل نوترکیبی همولوگ را انجام داده و کاست بیانی K2S در ژنوم در ناحیه 18ssurRNA اینتگره می گردد. بالا بودن میزان رونویسی ژن 18ssurRNA در سلول، سبب افزایش بیان ژن هدف قرار گرفته در این ناحیه خواهد شد.

در این تحقیق وکتور ابتدا قبل از ورود به سلول طی واکنش هضم آنزیمی برش یافته، بخشهای غیر ضروری حذف و توالیهای مورد نیاز جهت انجام نوترکیبی همولوگ درطرفین کاست ژنی بیان کننده K2S آزاد گردید. سپس وکتور آماده شده از طریق الکتروپوریشن به داخل سلولهای *L tarentolae* وارد گردید. سلولهایی از *L tarentolae* که نوترکیبی همولوگ در آنها رخ می دهد، مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به هیگرومایسین را نشان می دهند. با آزمایش PCR تشخیصی انجام نوترکیبی همولوگ و ادغام کاست ژنی بیان کننده K2S در ژنوم سلولهای ترانسفکت نیز مورد تأیید قرار گرفت. نتایج فوق کارآیی وکتور بیانی اختصاصی لیشمانیا واجد ژن K2S، که در این تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

ساخته شده و تحت عنوان pF4splmsapx1.4hyg-K2S نامگذاری شده است را جهت کلونینگ کاست بیانیK2S در ناحیه 18ssurRNA ژنوم سلولهای *L. tarentolae* را به اثبات می رساند که با نتایج Breitling و همکارانش در مورد کلونینگ ژن اریتروپوئیتین در سال ۲۰۰۲ همخوانی دارد(۲). در ادامه جهت بررسی حضور پروتئین نوترکیب K2S (rK2S) و فعالیت بیولوژیک آن از **تست** زیموگرافی استفاده شد. در این تست جهت ارزیابی فعالیت پلاسمینوژنولیتیک rK2S از پلاسمینوژن و ژلاتین در ساخت ژلهای پلی آکریلامید استفاده شد زیرا rK2S نوترکیب تولیدی فعال با فعالیت پلاسمینوژنولیتیک، پلا سمینوژن را به پلاسمین تبدیل کرده و پلاسمین حاصل با فعالیت پروتئولیتیک خود ژلاتین را هیدرولیز می کند که درنتیجه این واکنش هاله شفافی ناشی از هیدرولیز ژلاتین در زمینه آبی رنگ ژل مشاهده می گردد. در این تست سوپرناتانت کشت سلولهای ترانسفکت و ترانسفکت نشده *L. tarentolae* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تست زیموگرافی نشان داد که سلولهای ترانسفکت *L tarentolae*. هاله شفافی را در یک زمینه آبی رنگ ایجاد می کند که نشان دهنده تولید پروتئین نوترکیب K2S به صورت خارج سلولی توسط این سلولها و فعالیت سرین پروتئازی rK2S می باشد. از طرف دیگر الکتروفورز سوپرناتانت کشت سلولهای ترانسفکت نشده هاله شفافی را روی ژل زیموگرافی ایجاد نکرد که تأییدی بر نتایج فوق بود. این یافته ها نشان داد که پروتئین نوترکیب K2S انسانی تولید شده در سلولهای *L. tarentolae* از لحاظ بیولوژیک فعال بوده و بنابراین در این سیستم فولدینگ مناسب را جهت فعالیت خود یافته است که این نتایج با یافته های Flamme و همکارانش که گونه های لیشمانیا قادر به تولید سایتوکینهای پستانداران مانند IL-2 در شکل فعال خود می باشند مطابقت دارد (۴). همچنین نتایج این تحقیق با یافته های Breitling و همکارانش که چندین پروتئین انسانی را به طور موفقیت آمیز در *L .tarentolae* بیان نمودند نیز همخوانی دارد(۲). بنابراین در این تحقیق نشان داده شد که حذف سه دومین N–ترمینال پروتئین tPA هیچ تأثیر منفی روی ناحیه فعال دومین سرین پروتئازی ندارد. علاوه بر این دومینهای Kringle 2 و سرین پروتئازی نیز فولدینگ صحیحی یافته و فعالیت بیولوژیک آنها مستقل از سه دومین N–ترمینال پروتئین tPA طبیعی است که این نتایج با یافته های kohnert و همکارانش مطابقت دارد(۶). از طرف دیگر در این تحقیق نشان داده شد که *L tarentolae* می تواند به عنوان یک میزبان مناسب جهت تولید rK2S و سایر پروتئینهای انسانی نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد. در ضمن از آنجایی که این ارگانیسم روی محیطهای کاملاً تعریف شده و ارزان قیمت رشد می یابد، بنابراین پروتئین نوترکیب تولیدی در این سیستم هزینه کمتر و حداقل احتمال آلودگی با ویروسهای پاتوژنیک را خواهد داشت که به دلیل استفاده از سرم در کشتهای سلولی پستانداران مشاهده می گردد.

منابع

1- Baruah D، Rajendra N، Chaudhari M ، Kadam S (2006) Plasminogen activators:A comparison.Vascular pharmacology، 44:1-9.

2- Brietling R، Klingner S, Callewaert N، Pietrucha R، Geyer A، Ehrlich G، Hartung R(2002) Non-Pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. Protein Expression and purification، 25:209-218.

3- Dormiani K, Khazaie Y, Mir mohammad sadeghi H, Rabbani M, Moazen F (2007) Cloning and expression of a human tissue plasminogen activator variant: K2S in *Escherichia coli.* Pak J Biol, 10(6):946-949

4-Flamme L, Buckner S.F, Swindle J, Ajioka J, Voorhis w (1995) Expression of mammalian cytokines by *Trypanosoma cruzi* indicates unique signal sequence requirements and processing. Mol Biochem Parasitol, 75:25-31.

Archive of SID
www.SID.ir

5- Hockney R (1994) Recent developments in heterologous protein in *Escherichia coli.*Trends biotechnology, 12(11):456-463.

6- Kohnert U، Rudolph R، Verheijen J (1992) Biochemical properties of the kringle 2 and protease domains are maintained in the refolded t-PA deletion variant BM 06.022. Protein engineering,5:93-100.

7- Mattes R (2001) The production of improved tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 27(4):325-334.

8- Rouf S, Mooyoung M, Chisti Y (1996) Tissue type plasminogen activator: Characteristics, application and production technology. Biotechnology Advances, 14(3): 239-266.

9- Soleimani M, Mahboudi F, Davoudi N ، Amanzadeh A، Azizi M، Adeli A، Rastegar H، Barkhordari F، Mohajer B (2007) Expression of tissue-type plasminogen activator in the trypanosomatid protozoan *Leishmania tarentolae*. Biotechnol Appl Biochem, 48:55-61.

Cloning of new form of human tissue plasminogen activator (K2S) in eukaryotic system

Nazari R.[1] , Davoudi N.[2], and Barkhordari F.[2]

[1]Microbiology Dept., Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, I.R. of IRAN

[2]Biotechnology Research Center, Pasture Institue, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Tissue plasminogen activator (tPA) protein was found as superior therombolytic agent for treatment of diseases such as acute myocardial infarction and efforts is currently focused to improve the tPA molecule and thereby it's pharmacokinetic properties. Reteplase (K2S) is a derivative tPA that has a longer half-life and greater resistance to inhibitor than the natural tPA molecule. The aim of this research is cloning and expression of K2S form of the tPA cDNA in eukaryotic system *L. tarentolae* which is recently has been introduced as a suitable host for expression eukaryotic genes. K2S form of tPA cDNA amplified by PCR and has cloned at ssurRNA (18s) site of *L. tarentolae* genome by homologous recombination. Diagnostic PCR analysis showed integration of K2S expression cassette in 18srRNA gene. Performance of zymography analysis on culture supernatant of transfected *L. tarentolae* showed serine protease activity of the rK2S protein produced and demonstrate that rK2S protein produced in *L. tarentolae* cells was biologically active. Hence, *L. tarentolae* is the first useful biotechnologically eukaryotic organism and simple nutrient requirements; we hope to reduce the production cost of this protein by cloning of K2S gene in this system.

Key words: tPA, Reteplase, *L.tarentolae*

Archive of SID

www.SID.ir