Expression of recombinant S100A8 subunit and evaluation of Ca effect on its tertiary structure

F. Nemati Nikoo* N. Gheibi** K. Goodarzvand Chegini***

*M.Sc. in Biology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
**Associate Professor of Biophysics, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
***Assistant Professor of Biochemistry, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Abstract

Background: S100A8 as a subunit of calprotectin heterodimer plays a role in inflammatory processes and cancer.

Objective: The aim of this study was to express recombinant S100A8 and to evaluate Ca effect on its tertiary structure.

Methods: This experimental study was performed in Qazvin University of medical sciences, 2013. Recombinant S100A8 subunit was expressed in pET15b, E. coli BL21 (DE3) system as a his-tagged protein. The protein purification process was accomplished under both native and denaturing conditions using Ni-NTA column and different concentrations of imidazole. The expression and homogeneity of recombinant protein was analyzed using sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The tertiary structure of S100A8 was studied in the absence and presence of Ca using fluorescence spectrometry.

Findings: The highest expression of S100A8 with apparent molecular weight of 8 kDa was found in denaturing conditions. In the purification process, the most purified S100A8 was seen with a gradient of 150 and 200 mM imidazole. The maximum fluorescence emission of S100A8 was observed at 330 nm in the presence and absence of calcium. Emission intensity was decreased in the presence of different concentrations of calcium.

Conclusion: Changes in tertiary structure of S100A8 subunit in the presence of calcium may affect the protein function and may contribute to understand the role of this protein in cancer and inflammatory processes.

Keyword: Fluorescence Spectrometry, Calcium, Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Plasmids, Proteins

Corresponding Address: Koorosh Goodarzvand Chegini, Department of Biochemistry, Qazvin University of Medical Sciences, Shahid Bahonar Blvd., Qazvin, Iran
Email: kgvand@ymail.com
Tel: +98-28-33336001-6
Received: 11 Jan 2014
Accepted: 19 May 2014

Archive of SID

www.SID.ir

بیان زیر واحد S100A8 نوترکیب و اثر کلسیم بر ساختار سوم آن

فاطمه نعمتی نیکو* دکتر نعمت‌اله غیبی** دکتر کوروش گودرزوند چگینی***

* کارشناس ارشد زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران
** دانشیار بیوفیزیک مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
*** استادیار بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

آدرس نویسنده مسؤول: قزوین، بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، گروه بیوشیمی، تلفن ۶-۳۳۳۳۶۰۰۱- ۰۲۸
Email: kgvand@ymail.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۲۹

چکیده

زمینه: S100A8 به عنوان یکی از زیر واحدهای سازنده هترودایمر کالپروتکتین در بسیاری از فرآیندهای وابسته به التهاب و سرطان ایفای نقش می‌کند.

هدف: مطالعه به منظور تولید S100A8 به صورت نوترکیب و تعیین اثر کلسیم بر ساختار سوم آن انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۲ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. ابتدا زیر واحد S100A8 در پلاسمید pET15b نوترکیب و میزبان E. Coli BL21 (DE3) به صورت پروتئین دارای his-tag بیان شد. فرآیند تخلیص پروتئین در دو حالت محلول و نامحلول، با استفاده از ستون نیکل و غلظت‌های مختلف ایمیدازول انجام شد. بیان و خلوص پروتئین نوترکیب از طریق الکتروفورز SDS-PAGE ارزیابی شد. ساختار سوم S100A8 با استفاده از روش طیف سنجی فلورسانس، در حضور و عدم حضور کلسیم بررسی گردید.

یافته‌ها: در حالت نامحلول بیش‌ترین پروتئین S100A8 با وزن مولکولی ۸ کیلودالتون بیان شد. در فرآیند تخلیص، خالص‌ترین پروتئین محلول با استفاده از غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول به دست آمد. در طول موج ۳۳۰ نانومتر، بیش‌ترین میزان نشر فلورسانس S100A8 در حضور و عدم حضور کلسیم مشاهده شد و شدت نشر در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: تغییر ساختار سوم زیرواحد S100A8 در حضور کلسیم، ممکن است عملکرد پروتئین را تحت تأثیر قرار داده و به درک نقش این پروتئین در فرآیندهای التهابی و سرطان کمک نماید.

کلیدواژه‌ها: طیف سنجی فلورسانس، کلسیم، پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز، پلاسمیدها، پروتئین‌ها

مقدمه:

کالپروتکتین از خانواده S100 پروتئین‌ها به عنوان نشان‌گر التهابی و یک پروتئین متصل شونده به روی و کلسیم است که قسمت عمده آن روی غشای نوتروفیل، مونوسیت و ماکروفاژ است. از نظر ساختار یک هترودایمر با دو جایگاه اتصال به کلسیم در هر زنجیره است. زنجیره سبک (۸ کیلودالتون با ۹۳ آمینواسید) با نام‌های MRP8/S100A8/P8/L1L شناسایی می‌شود. در حضور کلسیم، زنجیره سبک S100A8 توانایی اتصال غیر کووالان با زنجیره سنگین S100A9 را دارد و ساختار هترودایمر کالپروتکتین را ایجاد می‌کند.[1] S100A8 نقش‌های زیر را دارد: ضد میکروبی، شبه سایتوکاینی، ضد تکثیر، رگ‌زایی، اتصال سلولی، تنظیم ایمنی، التهاب و شرکت‌کننده در فرآیند سرطان. مقادیر بالای S100A8 در روند التهاب وجود دارد و ارتباط بین التهاب و سرطان‌زایی نیز شناخته شده است. با وجود خواص ضد توموری S100A8 و احتمال استفاده از آن به عنوان ابزار درمانی سرطان، برخی پاسخ‌های آغازکننده تومور نیز توسط آن شناسایی شده‌اند.[2و3] تخلیص پروتئین

Archive of SID

www.SID.ir

S100A8 از نوتروفیل‌ها و سایر سلول‌های حاوی آن، کاری پر زحمت و کم بازده است و مقدار پروتئین لازم برای امر تحقیق را برآورده نخواهد کرد. از سوی دیگر، عملکرد زیستی این پروتئین تنها در حضور کلسیم انجام می‌شود و بررسی ساختار پروتئین در حضور و عدم حضور کلسیم می‌تواند بیان‌گر تغییرات ساختاری و در نهایت عملکردی این پروتئین باشد. بنابراین با کمک پروتئین نوترکیب و بررسی اثر یون کلسیم بر ساختار آن، می‌توان مسیرهای مولکولی وابسته به S100A8 را مشخص کرد و این گام می‌تواند اهداف بالقوه جدیدی برای پیشبرد درمان سرطان و واکنش‌های التهابی مربوط به آن پیش روی ما بگذارد. لذا مطالعه حاضر با هدف تولید S100A8 نوترکیب و تعیین اثر کلسیم بر ساختار سوم آن انجام شد.

❋ مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی با تکیه بر روش‌های زیست فناوری در سال ۱۳۹۲، در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد.

در این مطالعه از پلاسمید pET15b نوترکیب حامل ژن S100A8 موجود در آزمایشگاه و تهیه شده در مطالعه قبلی، به عنوان منبع S100A8 استفاده شد. از باکتری E. coli BL21(DE3) به عنوان میزبان جهت بیان S100A8 نوترکیب استفاده گردید. IPTG، LB broth و ایمیدازول از شرکت Sigma (آمریکا)، آمپی‌سیلین از شرکت Roche (آلمان) و نمک‌های سدیم هیدروژن فسفات مونو بازیک و دی بازیک، سدیم کلراید و کلسیم کلراید از شرکت Merck (آلمان) تهیه شدند. از پلازمید حاوی ژن S100A8 به میزان ۲ میکرولیتر به ۵۰ میکرولیتر باکتری E. coli BL2 (DE3) مستعد (competent)، اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون روی یخ، به مدت ۲ دقیقه در دمای ۳۷ تا ۴۲ درجه و بلافاصله برای ۱ تا ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر محیط کشت تازه به سوسپانسیون باکتری و پلاسمید اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه و دور G ۴ انکوبه شد. انکوباسیون تا زمانی ادامه یافت که جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۵ رسید، در این زمان، باکتری‌ها جهت تولید پروتئین توسط IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار القا شدند.

در فواصل زمانی ۱، ۲ و ۳ ساعت پس از القا، ۵۰ میکرولیتر از محیط القا شده، جهت بررسی بیش‌ترین میزان بیان پروتئین برداشته شد و پس از هر نمونه‌برداری سوسپانسیون حاوی پروتئین، به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه و دور G ۲۵۰۰ سانتریفوژ شد. جهت لیز باکتری‌ها، به رسوب حاصله بافر PBS (سدیم هیدروژن فسفات دی بازیک ۸ میلی‌مولار، سدیم هیدروژن فسفات مونو بازیک ۲ میلی‌مولار، سدیم کلراید ۱۵۴ میلی‌مولار و pH=۷/۲) اضافه شد. پس از همگن و لیز نمودن مخلوط حاصله، سانتریفوژ در دمای ۴ درجه و دور G ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه ادامه یافت. بخش مایع حاصله که حاوی پروتئین محلول بود، جدا گردید و به رسوب باقی‌مانده از سانتریفوژ جهت استخراج پروتئین نامحلول، بافر B (Tris هیدروکلراید ۱۰ میلی‌مولار، سدیم هیدروژن فسفات مونوبازیک ۱۰۰ میلی‌مولار، اوره ۸ مولار و pH=۸) اضافه و تمامی مراحل انجام شده برای استخراج پروتئین محلول نیز تکرار شد. در نهایت، پروتئین محلول استخراج شده با استفاده از ستون نیکل و غلظت‌های مختلف از بافر ایمیدازول B (Hepes ۲۵ میلی‌مولار، ایمیدازول ۱۰ میلی‌مولار، سدیم کلراید ۱۰۰ میلی‌مولار و pH=۷/۵) تخلیص گردید. پس از مرحله القا و تخلیص پروتئین، جهت اطمینان از وجود کمی و کیفی پروتئین S100A8، از روش ژل الکتروفورزیس استفاده شد. به ۳۰ میکرولیتر از نمونه‌های برداشته شده پس از القا و تخلیص، ۱۰ میکرولیتر سمپل بافر ۴X اضافه شد و پس از قرار دادن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه، نمونه‌ها روی ژل قرار گرفت. شدت باندهای حاصله از الکتروفورز روی ژل، پس از مرحله تخلیص پروتئین، بیش‌ترین میزان بیان پروتئین تخلیص شده با غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار از ایمیدازول بود. بنابراین ۵۰ میلی‌لیتر از S100A8 تخلیص شده با این غلظت‌ها در ۵ لیتر بافر دیالیز (سدیم

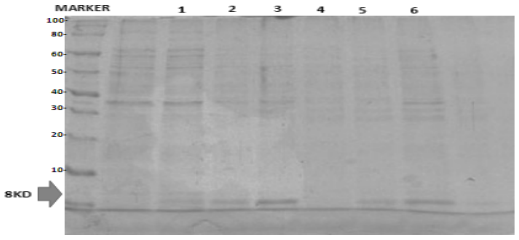
Archive of SID

www.SID.ir

هیدروژن فسفات مونو بازیک ۲۵ میلی‌مولار، سدیم کلراید ۱۰۰ میلی‌مولار و pH=۶/۵) به مدت ۸ ساعت قرار گرفت و در نهایت غلظت ۰/۱ میکروگرم در میکرولیتر (۱ میکرومولار) با استفاده از اسپکتروسکوپی نانودراپ برای S100A8 حاصله به دست آمد. شدت فلورسانس در ۴۰۰ میکرولیتر مخلوط S100A8 رقیق شده با بافر دیالیز توسط دستگاه اسپکتروفلوریمتر Cary-Bio700 با طول موج تحریکی ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر، در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف از کلسیم کلراید ۱۰ میلی‌مولار اندازه‌گیری گردید. به این منظور ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه پروتئینی با ۲۰۰ میکرولیتر از بافر دیالیزرقیق شده و با محاسبات استوکیومتری در ۵ غلظت از کلسیم کلراید، ۰/۰۰۵ تا ۰/۳۵ میلی‌مولار، میزان نشر فلورسانس بررسی شد.

❋ یافته‌ها:

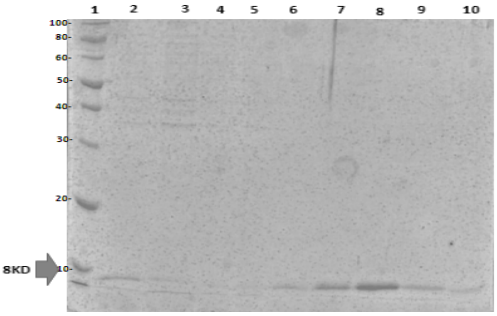
استخراج S100A8 با وزن مولکولی ۸ کیلودالتون در دو حالت محلول و نامحلول روی ژل مشخص شد، که بیش‌ترین میزان تولید پروتئین مربوط به حالت نامحلول بود. همچنین ژل الکتروفورزیس نمونه‌ها در ساعت‌های مختلف پس از القای باکتری‌ها با IPTG، بیان‌گر بیش‌ترین میزان تولید پروتئین پس از انکوباسیون ۳ ساعته و کم‌ترین مقدار آن پس از ۱ ساعت انکوباسیون بود (شکل شماره ۱).



شکل ۱- SDS PAGE از نمونه‌های نرمالایز شده S100A8 در ساعت‌های مختلف پس از القا

(نمونه‌های پروتئین نامحلول از ۱ تا ۳ به ترتیب مربوط به ساعت‌های اول تا سوم پس از القا، نمونه‌های پروتئین محلول از ۴ تا ۶ به ترتیب مربوط به ساعت‌های اول تا سوم پس از القا)

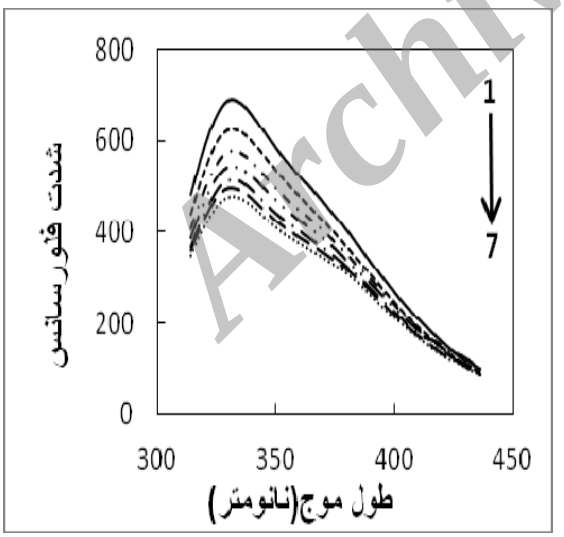
بیش‌ترین و خالص‌ترین میزان S100A8 پس از شستشوی پروتئین از ستون نیکل، با غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول به دست آمد و بازده تولید پروتئین، حصول غلظت ۱ میکرومولار بود (شکل شماره ۲).



شکل ۲- SDS PAGE از تخلیص S100A8 در غلظت‌های مختلف ایمیدازول

۴ و ۵=۵۰ میلی‌مولار، ۶=۷۵ میلی‌مولار، ۷=۱۰۰ میلی‌مولار، ۸=۱۵۰ میلی‌مولار، ۹=۲۰۰ میلی‌مولار و ۱۰=۱ مولار

بیش‌ترین میزان نشر فلورسانس S100A8 در حضور و عدم حضور کلسیم، در طول موج ۳۳۰ نانومتر به دست آمد که با حضور غلظت‌های مختلف کلسیم، شدت نشر کاهش داشت (شکل شماره ۳).



شکل ۳- ساختار سوم S100A8 بدون حضور کلسیم (۱) و در حضور غلظت‌های ۰/۰۵ تا ۰/۳۵ میلی‌مولار کلسیم (به ترتیب از ۲ تا ۷)

Archive of SID

www.SID.ir

❋ بحث و نتیجه‌گیری:

در این مطالعه S100A8 نوترکیب تولید گردید و اثر کلسیم بر ساختار آن سبب تغییر در ساختار سوم پروتئین و کاهش شدت نشر فلورسانس در ۳۳۰ نانومتر شد. حفظ ساختار طبیعی و عملکردی پروتئین با به دست آمدن بیش‌ترین نشر در طول موج ۳۳۰ نانومتر مشخص شد. کلسیم نیز با کاهش شدت نشر آن و تغییر موقعیت اسید آمینه‌های فلوروفور ساختار S100A8 را تغییر داد و زمینه تغییر در عملکرد آن را فراهم کرد.

مدت زمان لازم برای انکوباسیون پس از القا با IPTG با درجه حرارت محیطی که انکوباسیون در آن انجام می‌شود ارتباط دارد. با افزایش درجه حرارت، مدت زمان کم‌تری برای تولید پروتئین توسط باکتری‌ها نیاز است؛ به طوری که در دمای ۳۷ درجه پس از ۳ ساعت انکوباسیون، بیش‌ترین حجم پروتئین تولید می‌شود. میزان تولید پروتئین به تراکم سلول‌ها در محیط کشت نیز وابسته است که با بررسی میزان جذب نوری آن می‌توان زمان مناسب برای شروع مدت انکوباسیون را مشخص کرد.[۴] با توجه به آن که هدف از تولید پروتئین، نوع محلول یا غیرمحلول آن باشد، می‌توان دمای مناسب برای انکوباسیون را مشخص کرد. البته در بیش‌تر موارد، هدف تولید پروتئین محلول است؛ چرا که تحت شرایط طبیعی، پروتئین محلول با سرعت مطلوب در باکتری تولید می‌شود و از نظر ساختاری و عملکردی بهینه است و روند تولید و تخلیص آن نیز آسان‌تر و سریع‌تر است.[۵] جهت افزایش پروتئین محلول می‌توان از روش‌های زیر استفاده کرد: ایجاد سیستم‌های سرد جهت القا، کاهش غلظت IPTG، استفاده از Tag‌ها و افزایش غلظت چاپرون‌ها.[۶و۷] همچنین مشخص شده است در صورت القای باکتری‌ها در مرحله‌ای که جذب نوری آن‌ها در ۶۰۰ نانومتر، ۰/۱ باشد و دمای انکوباسیون ۴ درجه در نظر گرفته شود، بازده تولید پروتئین محلول، سه برابر زمانی خواهد بود که میزان جذب ۰/۶ باشد.[۸]

حصول غلظت ۱ میکرومولار از پروتئین خالص S100A8 نیاز این تحقیق را برآورده کرد و می‌توان این بازده را در صورت نیاز، افزایش داد. در روش فلورسانس، به دست آمدن بیش‌ترین شدت نشر در طول موج ۳۳۰ تا ۳۴۰ نانومتر بیان‌گر طبیعی بودن ساختار پروتئین است.[۹] اضافه شدن لیگاند کلسیم، کاهش شدت نشر را به دنبال داشت، بدون آن که انحرافی در بیش‌ترین طول موج نشر به وجود آید و این بیان‌گر تغییر ساختار پروتئین در جهتی است که بتواند عملکرد طبیعی خود را داشته باشد. بنابراین در حضور کلسیم، تریپتوفان به عنوان اسید آمینه فلوروفور به گونه‌ای در پروتئین تغییر موقعیت می‌دهد که سبب بروز نشر فلورسانس کم‌تر از پروتئین می‌شود و این تغییر، زمینه را برای فعالیت‌های ضد میکروبی، ضد التهابی و پاسخ به عفونت‌ها توسط S100A8 فراهم می‌کند. این لیگاند با تغییر در ساختار و جابه‌جایی آمینواسیدهای آروماتیک از محیط هیدروفوب به سطح پروتئین، بر عملکرد زیستی آن مؤثر است. علاوه بر این، پیوند لیگاند به پروتئین می‌تواند اطلاعات ساختاری فراوانی از پروتئین در اختیار قرار دهد.[۹] جهش در آمینواسیدهای متصل شونده به کلسیم سبب مهار یا کاهش فعالیت‌های S100A8 می‌شود و مانعی برای اتصال این زیر واحد جهت تولید هترودایمر کالپروتکتین خواهد بود. کلسیم با تغییر در نحوه قرارگیری آمینواسیدهای آروماتیک چون هیستیدین، افزایش پایداری و ثبات در عملکرد این پروتئین را موجب می‌شود.[۱۰]

به طور کلی، تولید نوترکیب S100A8 و بررسی اثر لیگاندهایی چون کلسیم بر ساختار و عملکرد آن، با هدف شناسایی مکانیسم‌های مولکولی وابسته به این پروتئین در بیماری‌های التهابی و سرطانی، آینده روشن‌تری را برای کنترل این بیماری‌ها پیش روی خواهد گذاشت.[۱۱] این مطالعه می‌تواند نگرش جدیدی را به سوی تولید و استفاده از داروهای طبیعی و بی‌خطر جهت مهار سرطان و فرآیندهای مربوط به آن مطرح کند.

Archive of SID

www.SID.ir

❁ سپاس‌گزاری:

از شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین جهت تأمین هزینه‌های لازم برای انجام این طرح تحقیقاتی قدردانی می‌شود.

❁ مراجع:

1. Srikrishna G. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. J Innate Immun 2012; 4 (1): 31- 40

2. Meucci G, D'Incà R, Maieron R, et al. Diagnostic value of faecal calprotectin in unselected outpatients referred for colonoscopy: a multicenter prospective study. Dig Liver Dis 2010 Mar; 42 (3): 191-5

3. Kostakis ID, Cholidou KG, Kallianidis K, et al. The role of calprotectin in obstetrics and gynecology. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2010 Jul; 151 (1): 3-9

4. San-Miguel T, Pérez-Bermúdez P, Gavidia I. Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in E. coli is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. Springerplus 2013 Dec; 2 (1): 89

5. Cheng CH, Lee WC. Protein solubility and differential proteomic profiling of recombinant Escherichia coli overexpressing double-tagged fusion proteins. Microb Cell Fact 2010 Aug 28; 9: 63

6. Wu JM, Wang SY, Fu WC. Lower temperature cultures enlarge the effects of vitreoscilla hemoglobin expression on recombinant Pichia pastoris. Int J Mol Sci 2012 Oct 15; 13 (10): 13212-26

7. Babaeipour V, Shojaosadati S, Maghsoudi N. Maximizing production of human interferon-γ in HCDC of recombinant E.coli. Iran J Pharm Res 2013 Summer; 12 (3): 563-72

8. Collins T, Azevedo-Silva J, da Costa A, et al. Batch production of a silk-elastin-like protein in E.coli BL21 (DE3): key parameters for optimization. Microb Cell Fact 2013 Feb 27; 12: 21

9. Champaiboon C, Sappington KJ, Guenther BD, et al. Calprotectin S100A9 calcium-binding loops I and II are essential for keratinocyte resistance to bacterial invasion. J Biol Chem 2009 Mar 13; 284 (11): 7078-90

10. Yousefi R, Imani M, Ardestani SK, et al. Human calprotectin: effect of calcium and zinc on its secondary and tertiary structures, and role of pH in its thermal stability. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2007 Oct; 39 (10): 795-802

11. Chakraborty R, Wieland CN, Comfere NI. Molecular targeted therapies in metastatic melanoma. Pharmgenomics Pers Med 2013 Jun 7; 6: 49-56

Archive of SID

www.SID.ir