

مقایسه بیان دایمی و القایی داروی نو ترکیب رتپلاز در میزبان اشریشیا کلی (BL21 (DE3

مهرنوش فتحی رودسری^{1*}، عسل اخویان²، نادر مقصودی^{3*}

1- استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

2- کارشناسی ارشد، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

3- استاد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

* شهرک پژوهش، کیلومتر 15 اتوبان تهران کرج، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

mfathi@nigeb.ac.ir , maghsoudin@gmail.com

(دریافت مقاله: 93/7/4 پذیرش مقاله: 93/11/28)

چکیده- فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA)، پروتئینی با وزن مولکولی 65 کیلودالتون و از خانواده سرین پروتئازهاست. این پروتئین به طور طبیعی و با مقیاس کم توسط سلول‌های اندوتلیال عروق ترشح می‌شود و تبدیل شدن پلاسمینوژن به پلاسمین و حل شدن لخته‌های خونی را به عهده دارد. این پروتئین به طور تریقی در زمان حملات قلبی جهت رفع لخته خونی تجویز می‌شود. یکی از مشتقات این پروتئین به نام "رتپلاز" نسخه‌ای جهش یافته از فعال کننده پلاسمینوژن انسانی است که 137 اسید آمینه آن حذف شده است. این دارو در باکتری اشریشیا کلی بیان می‌شود و فاقد تغییرات پس از ترجمه از جمله گلیکوزیلاسیون می‌باشد. به دلیل وجود نه باند دی‌سولفید، بیان این پروتئین در سیستم باکتریایی مشکلات زیادی دارد و اغلب منجر به ایجاد توده‌های پروتئینی غیرمحلول (inclusion body) می‌شود. خوردگی مجدد و تبدیل پروتئین غیرفعال به فرم فعال آن فرایندی طولانی و دشوار است و برای پروتئین‌های دارای ساختار پیچیده و باندهای دی‌سولفید متعدد، بازده پایینی دارد. در گزارش حاضر با تغییر ترادف تنظیمی، فرم محلول و فعال آنزیم رتپلاز در باکتری اشریشیا کلی BL21 تولید شده است. بیان القایی رتپلاز تحت کنترل پروموتور T7 منجر به رسوب پروتئین در داخل سلول گردید، در حالی که استفاده از یک پروموتور دایمی با قدرت کمتر، فرم فعال آنزیم را در سیتوزول ایجاد کرد.

کلیدواژگان: رتپلاز، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی، بیان دایمی، بیان القا شونده، فرم فعال.

1- مقدمه

لخته‌های خونی می‌شود. پلاسمینوژن اکتیواتورها به دو دسته مستقیم و غیرمستقیم تقسیم می‌شوند. داروهایی مانند آلتپلاز، رتپلاز، تنکتپلاز، لانوتپلاز و اوروکیناز جزو فعال کننده های مستقیم قرار می‌گیرند. این عوامل بسیار اختصاصی عمل کرده و ضمن بریدن باند پپتیدی Arg561-val562 پلاسمینوژن را به پلاسمین تبدیل

عوامل فیبرینولیتیک که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرند، از خانواده سرین پروتئازها هستند. این آنزیم‌ها سبب تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین (یک عامل فیبرینولیتیک طبیعی) می‌شوند. پلاسمین به نوبه خود سبب شکسته شدن فیبرینوژن و فیبرین موجود در

می‌کنند [2,1].

آلتپلاز اولین فعال کننده پلاسمینوژن بافتی است که به صورت نوترکیب در دهه 80 تولید شده و جزو نسل دوم ترومبولیتیک‌ها محسوب می‌شود. آلتپلاز دارای وزن مولکولی 68 کیلودالتون و 572 اسیدآمینه است. این مولکول دارای یک دمین Fibronctin finger، یک دمین EGF، دو دمین Kringle 1 و Kringle 2 و در نهایت یک دمین پروتئازی است. آلتپلاز در سلول‌های CHO بیان می‌شود و گلیکوزیله می‌باشد. از مهمترین مشکلات این دارو، نیمه عمر کوتاه آنست (3-8 دقیقه) که به دلیل جذب کبدی از جریان خون به سرعت حذف می‌شود [3,1].

رتپلاز یک فعال کننده پلاسمینوژن نوترکیب دیگر است که دارای یک حذف بزرگ است. این مولکول با 355 اسید آمینه وزنی معادل 39 کیلودالتون دارد. پلی پپتید نهایی تنها دارای دمین‌های Kringle 2 و پروتئازی است و در میزبان اشریشیاکلی بیان می‌شود. این دارو فاقد زنجیره‌های کربوهیدراتی بوده و به همین دلیل حذف کبدی آن از جریان خون بسیار کاهش یافته است. نیمه عمر این دارو 14-18 دقیقه تخمین زده می‌شود. به علاوه دارای پتانسیل ترومبولیتیک بیشتری نسبت به آلتپلاز است [4,3].

با وجود اندازه کوچکتر، رتپلاز دارای 9 باند دی‌سولفید از مجموع 17 باند دی‌سولفید مولکول اولیه (آلتپلاز) است. بنابراین بیان رتپلاز در *E. coli* با دو مشکل عمده روبروست: 1- وجود باندهای دی‌سولفید متعدد 2- وجود کدون‌های نادر در توالی ژن مولد فعال کننده پلاسمینوژن بافتی. هر دو این عوامل سبب می‌شوند که پلی پپتیدهای در حال ساخت نتوانند تاخوردگی مناسب خود را پیدا کرده و به صورت تجمعات غیر محلول پروتئینی رسوب نمایند [6,5]. از روش‌های مختلفی برای کاهش میزان تجمع پروتئین نامحلول استفاده می‌شود که از آن جمله

می‌توان به استفاده از میزبان‌های باکتریایی دستورزی شده با سیتوزول اکسیدکننده، کاهش دما، استفاده از مولکول‌های شیمیایی تسهیل کننده تاخوردگی (چپرونهای شیمیایی) و ... اشاره نمود. همچنین ثابت شده است که نوع و شدت بیان پروتئین نیز در تاخوردگی آن تاثیرگذار است. به عنوان مثال تولید ناگهانی حجم بالایی از پروتئین‌های دشوار، احتمال تاخوردگی نامناسب و ایجاد رسوب نامحلول را بسیار افزایش می‌دهد. تغییر شدت بیان یک پروتئین به کمک تغییر توالی‌های تنظیمی (پروموتور و اپراتور) راه حل ساده‌ای است که در مورد برخی از محصولات نوترکیب بازده تولید فرم فعال را افزایش می‌دهد [8,7].

در مقاله حاضر، ژن رتپلاز که به طور سنتتیک و با ترجیح کدونی باکتری اشریشیاکلی ساخته شده است، تحت کنترل دو پروموتور مختلف دائمی و القا شونده قرار گرفته است. بیان القایی پروتئین تحت تاثیر پروموتور قوی T7 و بیان دائمی تحت تاثیر یک پروموتور سنتتیک به نام PCE انجام گرفته است. نتایج نشان می‌دهد که استفاده از پروموتور دائمی سبب می‌شود بخشی از آنزیم رتپلاز بیان شده در باکتری میزبان به فرم محلول و فعال تولید شود.

2- مواد و روشها

2-1- مواد

آنزیم‌های محدودگر، T4 ligase از Fermentas، مستر میکس آماده PCR از Amplicon، آنزیم پلیمرز تصحیح کننده pfu از INTRON، کوکتل مهارکننده پروتئازی از Roche و کلیه نمک‌ها از Merck و Sigma خریداری شدند. کیت PLAT Chromogenic activity assay از کمپانی Abnova تهیه شد.

2-2- ساخت ناقلین بیانی

برای ساخت ناقل بیانی با پروموتور القایی از pET-21a

اشریشیاکلی DH5 α جهت تأیید صحت مراحل کلونینگ تعیین توالی گردید.

2-2- بیان رتپلاز در باکتری اشریشیاکلی BL21 (DE3)

دو پلاسمید T7-ret و PCE-ret به سلول‌های مستعد شده شیمیایی BL21 (DE3) ترنسفرم شدند. انتخاب کلون‌ها بر روی محیط Lauria-Bertani (LB) دارای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (100 $\mu\text{g/mL}$) انجام گرفت. تک کلون‌های مورد نظر به صورت شبانه در محیط کشت مایع رشد داده شدند. در این حالت دمای انکوباتور بر روی 37 °C و شیک بر روی 180 rpm تنظیم گردید. سپس 200 μL از کشت شبانه جهت تلقیح 20 mL محیط کشت تازه دارای آنتی‌بیوتیک استفاده شد. در مورد باکتری دارای پلاسمید T7-ret، پس از رسیدن سلول‌ها به OD_{600nm}=0.8، IPTG با غلظت نهایی 1 mM به محیط کشت اضافه شد. در زمان‌های 0، 2، 4 و 20 ساعت پس از القا، 1 mL از محیط کشت برداشته شد.

در مورد باکتری دارای پلاسمید PCE-ret، پس از تلقیح در زمان‌های 0، 8 و 20 ساعت بعد نمونه‌برداری انجام گرفت.

2-3- سنجش میزان بیان پروتئین

نمونه‌های برداشته شده حین فرایند بیان پروتئین با سانتریفوژ (5000 rpm، 5 min) رسوب داده شدند. محیط کشت رویی دور ریخته شد و سلول‌ها در بافر لیز (100 mM Tris، 20 mM EDTA) معلق شدند. سپس سونیکاسیون به صورت 5 سیکل 30 ثانیه‌ای با فاصله 10 ثانیه انجام گرفت. برای جلوگیری از ایجاد گرما، کل مراحل سونیکاسیون بر روی یخ انجام گرفت. فاز محلول سلولی (سوپرناتانت) از رسوب سلول‌ها (IB) توسط سانتریفوژ (13000 rpm، 30 min، 37 °C) جداسازی شد. نمونه‌ها پس از مخلوط شدن با بافر نمونه و جوشانده شدن به مدت 5 دقیقه، بر روی ژل 10% SDS-PAGE

استفاده شد. ژن رتپلاز با استفاده از پرایمر رفتی:

3' ret-F 5' CATATGCTCTTACCAGGGTAACAGC و برگشتی:

ret-R 5' AAGCTTCGGGCGCATGTTATCGC 3' تکثیر شد. پرایمر ها به ترتیب دارای سایت‌های برشی *HindIII* و *NdeI* بودند. واکنش PCR به صورت زیر انجام شد: دناتوراسیون اولیه در 95 °C برای مدت 5 دقیقه، 30 سیکل به صورت 95 °C برای مدت 45 ثانیه، 66 °C برای مدت 45 ثانیه و 72 °C برای مدت یک دقیقه و در نهایت 72 °C برای مدت 10 دقیقه. محصول PCR با دو آنزیم گفته شده هضم گردید و در ناقل pET-21a که پیشتر با آنزیم‌های مشابه بریده شده بود، کلون گردید. این پلاسمید از این پس T7-ret خوانده می‌شود.

برای تهیه ناقل بیانی با پروموتور دائمی، ابتدا پروموتور دائمی با پرایمرهای رفتی:

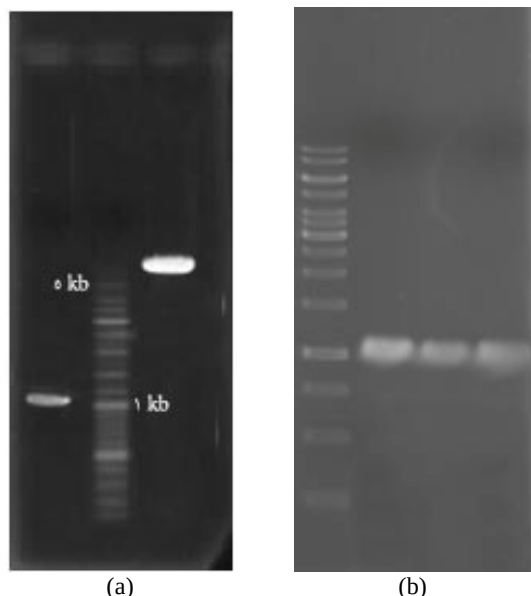
pro-F 5' AGATCTTCATGTTTGACAGCTTATCAT 3' و پرایمر برگشتی:

pro-R 5' GAATTCCTTAATTCTATTATGTGAT 3' تکثیر شد. پرایمرها به ترتیب دارای جایگاه برش برای *EcoRI* و *BglIII* هستند. واکنش PCR به صورت زیر انجام شد: دناتوراسیون اولیه در 95 °C برای مدت 5 دقیقه، 30 سیکل به صورت 95 °C برای مدت 45 ثانیه، 64 °C برای مدت 45 ثانیه و 72 °C برای مدت 5 دقیقه انجام گرفت. قطعه تکثیر شده با دو آنزیم ذکر شده هضم گردید و در ناقل pET-21a که پیشتر با دو آنزیم مذکور برش یافته بود، کلون گردید. سپس ژن رتپلاز با پرایمر رفتی:

5' GAATTCATGTCTTACCAGGGTAACA 3' و برگشتی:

5' AAGCTTCGGGCGCATGTTATCGC 3' تکثیر شد و پس از برش آنزیمی در ناقل دارای پروموتور PCE کلون گردید. در این حالت پرایمر رفتی دارای جایگاه برش *EcoRI* و پرایمر برگشتی دارای جایگاه برش *HindIII* می‌باشد. این پلاسمید از این پس PCE-ret خوانده می‌شود. هر دو پلاسمید پس از تکثیر در باکتری

واکنش PCR بر روی پلاسمیدهای استخراج شده مؤید حضور ژن رتپلاز در این ناقل است (شکل 1b).



شکل 1 (a) ژن رتپلاز در ستون سمت چپ و پلاسمید pET-21a در ستون سمت راست مارکر دیده می شود. ناقل به طول 5/5 کیلوباز و ژن به طول 1065 نوکلئوتید بر روی ژل آگاروز 1% مشاهده می شود. (b) کلونی PCR بر روی سه کلونی دارای پلاسمید pET-ret. ژن رتپلاز به طول 1065 نوکلئوتید، در هر سه کلونی تکثیر شده است که نشان دهنده وجود پلاسمید نو ترکیب می باشد.

برای ساخت ناقل PCE-ret و بیان دائمی آنزیم رتپلاز نیز از ناقل pET-21a استفاده شد تا تنها تفاوت میان دو ناقل در توالی پروموتری آنها بوده و سایر مشخصات مطرح شده برای ناقلین از جمله تعداد نسخه و توالی اسکلت یکسان بماند. با برش pET-21a توسط دو آنزیم *Bgl*III و *Eco*RI، پروموتور T7 جدا گردید. پروموتور PCE که با پرایمرهای دارای جایگاه برش برای آنزیم های مشابه تکثیر و سپس هضم شده بود، در این ناقل کلون گردید (شکل 2a). پس از استخراج پلاسمیدهای مذکور، وجود قطعه کد کننده پروموتور PCE توسط واکنش PCR تایید شد (شکل 2b). سپس ژن رتپلاز تکثیر و پس از برش با

الکتروفورز شدند. ژل ها با رنگ کو ماسی - بلو R-250 برای مدت 2 ساعت رنگ آمیزی و سپس رنگ زدایی شدند.

4-2- تعیین فعالیت آنزیمی رتپلاز

فعالیت آنزیم رتپلاز توسط کیت PLAT chromogenic activity assay و مطابق دستور کار ارایه شده در آن تعیین گردید. این کیت قادر به سنجش میزان تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین در اثر فعالیت آنزیم رتپلاز است. میزان پلاسمین تولید شده از طریق یک سوبسترای اختصاصی که قادر به آزادسازی کروموفور pNA می باشد، کمی سازی می شود. به طور خلاصه، برای هر استاندارد یا نمونه، 60 μl از محلول رقیق سازی به همراه 10 μl از پلاسمینوژن و 10 μl از سوبسترای پلاسمین با هم مخلوط شده و به هر چاهک از پلیت 96 خانه اضافه شد. سپس 20 μl از استانداردها یا نمونه مورد بررسی به هر چاهک افزوده شده و پلیت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد برای مدت 12 ساعت انکوبه گردید. در نهایت جذب در 405 nm خوانده شد.

3- نتایج

3-1- ساخت ناقلین بیانی با پروموتور القایی و دائمی

برای بیان رتپلاز به صورت القایی از ناقل pET-21a استفاده شد. ژن رتپلاز که به طور سنتتیک و با ترجیح کدونی میزبان اشریشیاکلی تهیه شده بود، با پرایمرهای دارای جایگاه های برش *Hind*III و *Nde*I تکثیر و در ناقل مذکور کلون گردید. به این ترتیب ژن رتپلاز پایین دست پروموتور T7 قرار گرفته و با ماده القا کننده IPTG قابل بیان است. شکل 1a ناقل pET-21a و همچنین ژن رتپلاز - که ابتدا تکثیر و سپس با دو آنزیم گفته شده بریده شده اند - را نشان می دهد. پس از انجام لیگاسیون و تراریختی به سلول های مستعد، ناقل T7-ret خالص سازی گردید.

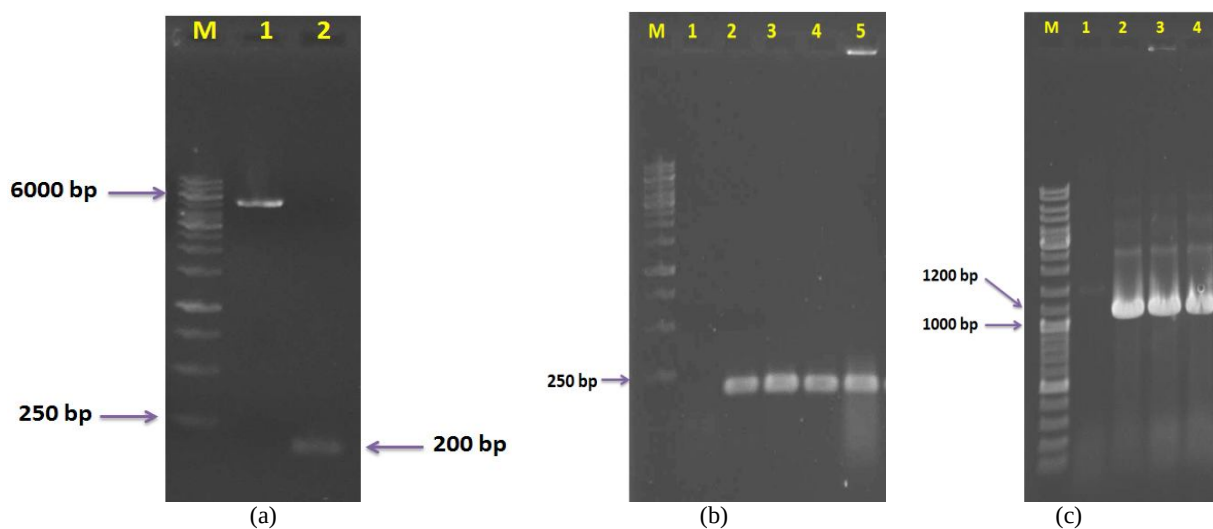
افزوده می‌شود. در فاز محلول سلولی (سوپرناتانت) هیچ باند پروتئینی که بیان رتپلاز را نشان دهد، دیده نمی‌شود. به نظر می‌رسد که کل پروتئین نوترکیب در بیان القایی در رسوب سلولی تجمع می‌یابد (شکل 3b).

برای انجام بیان با پروموتور دائمی، پلاسمید PCE-ret وارد میزبان *E. coli* BL21 (DE3) گردید. پس از تلقیح محیط کشت جدید با کشت شبانه، به طور همزمان رشد باکتری ها و بیان پروتئین رتپلاز آغاز شد. بررسی رسوب سلولی پس از 8 و 20 ساعت از زمان تلقیح نشان می‌دهد که در این حالت نیز رتپلاز بیان شده و در رسوب سلولی تجمع می‌یابد. میزان بیان و تجمع رتپلاز در بیان دائمی به مراتب کمتر از بیان القایی است (شکل 4a). بررسی فاز محلول سلولی نیز بیان بالای هیچ لکه پروتئینی را در ساعات مختلف نشان نمی‌دهد، اما در نواحی 39 kDa لکه‌های پروتئینی ضعیفی دیده می‌شود (شکل 4b).

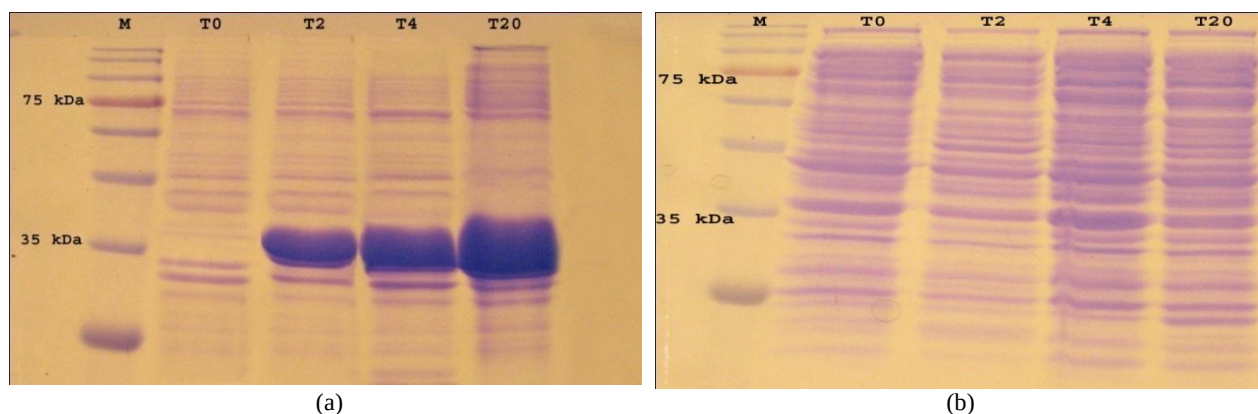
دو آنزیم *HindIII* و *EcoRI* پایین دست پروموتور PCE قرار گرفته و ناقل PCE-ret تولید گردید. شکل 2c نتایج کلونی-PCR بر روی ناقل PCE-ret و تکثیر قطعه پروموتور-ژن رتپلاز را نشان می‌دهد. قطعه تکثیر شده طولی معادل مجموع پروموتور و ژن را شامل می‌شود که صحت انجام فرایند کلونینگ را نشان می‌دهد.

2-3- بیان دائمی و القایی رتپلاز

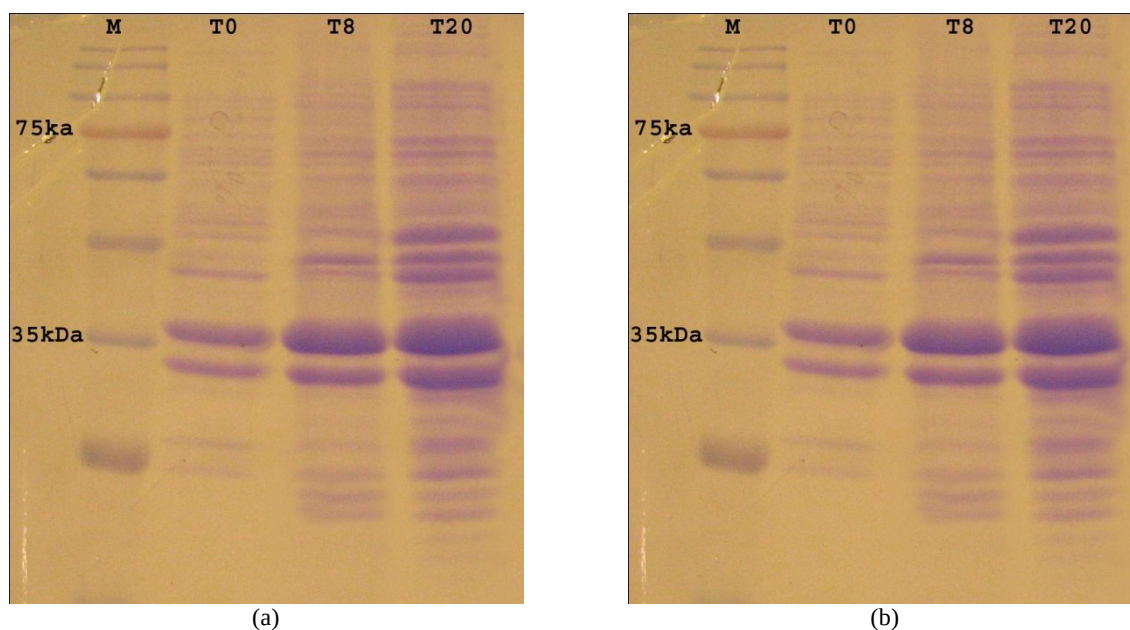
برای انجام بیان القایی، ناقل T7-ret به میزبان *E. coli* BL21 (DE3) ترانسفرم شد. پس از انتخاب کلون مناسب و تلقیح، باکتری‌ها تا رسیدن به $OD_{600nm}=0.8$ رشد داده شدند و سپس القای بیان با افزودن IPTG آغاز شد. شکل 3a رسوب بدست آمده از سلول‌ها را در ساعات مختلف نشان می‌دهد. یک باند پروتئینی واضح با وزن مولکولی 39 کیلوالتون بیان شده که با افزایش زمان بر میزان آن



شکل 2 (a) بررسی کیفیت و صحت قطعه پروموتری PCE و pET21a پس از برش و خالص سازی بر روی ژل آگارز 1%. ستون M: مارکر 1kb، ستون شماره 1: وکتور خالص شده، ستون شماره 2: پروموتور تکثیر شده به طول 200 bp. (b) تکثیر قطعه پروموتری با الگو قرار دادن ناقل pET-21a دارای پروموتور PCE که نشان دهنده صحت انجام کلونینگ می‌باشد. ستون M: مارکر 1 kb، ستون شماره 1: کنترل منفی. ستون شماره 2 تا 5: پلاسمید استخراج شده از کلون‌های دارای ناقل pET-21a با پروموتور دائمی. (c) بررسی تکثیر قطعه PCE-رتپلاز در طی کلونی PCR با پرایمر ابتدای پروموتور و انتهای ژن به وسیله الکتروفورز ژل آگارز 1%. ستون M: مارکر میکس، ستون شماره 1: کنترل منفی. ستون شماره 2 تا 4: تکثیر قطعه ژنی مورد نظر در طی کلونی-PCR که نشان دهنده صحت انجام فرایند کلونینگ است.



شکل 3 بیان القایی آنزیم رتپلاز در باکتری اشریشیاکلی BL21 (DE3) در زمان شروع القا (T_0) و 2 (T_2)، 4 (T_4)، 20 (T_{20}) ساعت پس از افزودن القا کننده IPTG. (a) بررسی رسوب سلولی به دست آمده که باند رتپلاز با وزن 39 کیلودالتون را نشان می‌دهد. میزان بیان پروتئین نو ترکیب با افزایش زمان القا بیشتر شده است. (b) سوپرناتانت به دست آمده از نمونه‌های باکتری. باند حاصل از بیش بیان رتپلاز در هیچکدام از نمونه‌ها دیده نمی‌شود.



شکل 4 بیان دایمی آنزیم رتپلاز در باکتری اشریشیاکلی BL21 (DE3) در زمان شروع القا (T_0) و 8 (T_8) و 20 (T_{20}) ساعت پس از تلقیح پیش کشت به محیط کشت جدید. (a) رسوب سلولی به دست آمده موید بیان رتپلاز با وزن 39 کیلودالتون است. میزان بیان پروتئین نو ترکیب با افزایش زمان القا بیشتر شده است. (b) سوپرناتانت به دست آمده از نمونه‌های باکتری. لکه پروتئینی مشخص حاصل از بیان بالای رتپلاز به صورت محلول دیده نمی‌شود.

3-3- تعیین فعالیت آنزیمی رتپلاز

مطابق آنچه که در شکل‌های 3 و 4 دیده می‌شود، در سوپرناتانت مربوط به سلول‌های القا کننده بیان رتپلاز، هیچ لکه پروتئینی مشخصی با وزن 39 kDa دیده

نمی‌شود، حال آنکه لکه‌های پروتئینی ضعیف با وزن مشابه رتپلاز در سوپرناتانت سلول‌های بیان کننده دایمی رتپلاز وجود دارد. برای بررسی بیشتر، فعالیت آنزیمی رتپلاز برای سوپرناتانت سلول‌ها مورد سنجش قرار

گرفت. همان گونه که در جدول 1 ذکر شده است، سنجش فعالیت آنزیمی رتپلاز برای پروموتور القا شونده، فعالیت بسیار اندک و نزدیک به صفر را نشان می دهد. با افزایش زمان بیان تا 20 ساعت، بیان فرم فعال آنزیم تغییری را نشان نمی دهد. این درحالیست که در بیان دایمی رتپلاز، پس از 8 ساعت، فعالیت آنزیمی رتپلاز قابل تشخیص است و با افزایش زمان بیان پروتئین به 20 ساعت، میزان بیان فرم فعال نیز در حد قابل توجهی افزایش می یابد.

جدول 1 بررسی میزان فعالیت بیولوژیک رتپلاز در سوپرناتانت باکتری های بیان کننده رتپلاز به صورت القایی و دایمی

plasmid	Activity (IU/mL)	
	T4/T8 ³	T20 ³
T7-ret ¹	1.9±0.09	2.4±0.11
PCE-ret ²	6.5±0.31	12.9±0.54

(1) T7-ret پلاسمید القا شونده با IPTG برای بیان رتپلاز

(2) PCE-ret پلاسمید دایمی بیان کننده رتپلاز

(3) T₄ میزان فعالیت پس از 4 ساعت برای پلاسمید T7-ret، T₈ میزان فعالیت پس از 8 ساعت برای پلاسمید PCE-ret، T₂₀ میزان فعالیت پس از 20 ساعت برای دو پلاسمید T7-ret و PCE-ret

4- بحث

داروهای ترومبولیتیک نقش مهمی در درمان بیماری هایی مانند انفارکتوس میوکاردینال حاد، آمبولی ریوی، ترومبوز شریانی و وریدی و بسیاری دیگر از مشکلات قلبی و عروقی دارند. فعال کننده های پلاسمینوژن بافتی جزو این دسته از داروها قرار می گیرند که امروزه به صورت نو ترکیب تولید شده و در دسترس بیماران است [9-11]. رتپلاز اولین tPA نو ترکیب غیرگلیکوزیده است که در باکتری *E. coli* تولید می شود. این پروتئین به دلیل حذف سه دمین، طولی به مراتب کوتاهتر از tPA نو ترکیب کامل (آلتپلاز) دارد. این عامل ترومبولیتیک از سال 1996 مورد تایید FDA قرار گرفته و در حال حاضر توسط چند شرکت داروسازی معتبر تولید می شود. نه تنها رتپلاز دارای نیمه عمر مناسب و قابل قبولی است (14-18 دقیقه)

بلکه آزمایش های بالینی نشان داده اند که رتپلاز اثرگذاری سریعتر و کاملتری نسبت به سایر داروهای ترومبولیتیک دارد، به علاوه عوارض جانبی آن خفیفتر از آلتپلاز است [12-14].

تاکنون گزارش های متعددی از بیان این پروتئین در باکتری *E. coli* منتشر شده است. پروتئین حاصل از این بیان، پایدار است، اما به دلیل تاخوردگی نامناسب به صورت رسوب پروتئینی غیرفعال تولید می شود. رتپلاز به دلیل ساختار پیچیده و وجود باندهای دی سولفید متعدد، مستعد تجمع و رسوب در داخل سلول است، زیرا شرایط احیایی سیتوزول باکتری اجازه ایجاد باندهای دی سولفید صحیح را میان 18 سیستئین موجود در ساختار پروتئین نمی دهد [15]. همچنین تاخوردگی مجدد پروتئین های رسوب یافته در داخل سلول و تبدیل آنها به فرم فعال و محلول نیز در مورد رتپلاز دشوار است. نه تنها انجام مرحله تاخوردگی مجدد زمان فرایند تولید را افزایش می دهد، بلکه مشکلاتی مانند تاخوردگی ناقص یا عدم حذف کامل عوامل دنا توره کننده و دترجنت مورد استفاده در فرایند، سبب کاهش کارایی و بازده تولید می شود [16]. به همین دلیل گزارش های متعددی از بیان رتپلاز در سیستم های بیانی دیگر مانند باسیلوس سوبتیلیس [17]، علف دریایی لامیناریا ژاپونیکا [18]، سیستم های بیانی پستانداران [19-21]، مخمرهای پیکیا پاستوریس [22, 23] و پیکیا متانولیکا [24]، سیستم های قارچی [25] و سلول های حشرات [26] وجود دارد. با تمام این تلاش ها، همچنان رتپلاز مورد مصرف در بازار، به دلیل مزایای سیستم باکتریایی مانند هزینه پایین، سرعت تولید بالا و سادگی ژنتیکی میزبان در باکتری اشیریشیاکلی به حالت غیرفعال تولید شده و در نهایت در شرایط *in vitro* به حالت محلول و فعال تبدیل می شود [27, 28].

حذف مرحله خوردگی مجدد و تولید فرم فعال آنزیم رتپلاز در باکتری *E. coli* از اهداف مهم در تولید این

5- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران برای حمایت مالی از پروژه حاضر، اعلام می‌دارند.

6- منابع

- [1] Collen, D., Lijnen, H. R. (2005) Thrombolytic agents. *Thromb. Haemost.* 93, 627-30
- [2] Kunadian, V., Gibson, C. M. (2012) Thrombolytics and myocardial infarction. *Cardiovasc. Ther.* 30, 81-88.
- [3] Kunadian, V., Gibson, C. M. (2011) Recombinant tissue type plasminogen activators: Time matters. *Drug Today.* 47, 559-570.
- [4] Baruah, D. B., Dash, D. R., Chaudhari, M. R., and Kadam, S. S. (2006) Plasminogen activators: A comparison. *Vasc. Pharmacol.* 44, 1-9.
- [5] Long, X., Gou, Y., Luo, M., Zhang, S., Zhang, H., Bai, L., Wu, S., He, Q., Chen, K., Huang, A., Zhou, J., and Wang, D. (2015) Soluble expression, purification, and characterization of active recombinant human tissue plasminogen activator by auto-induction in *E. coli*. *BMC Biotechnol.* 15, 2-9.
- [6] Lee, H. J., Im, H. (2010) Soluble expression and purification of human tissue-type plasminogen activator protease domain. *Bull. Korean Chem. Soc.* 31, 2607-2612.
- [7] Baneyx, F., Mujacic, M. (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 22, 1399-1408.
- [8] Marco, A. (2009) Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb. Cell. Fact.* 8, 1-18.
- [9] Feied, C., Handler, J. A. (2004) Thrombolysis therapy, www.emedicine.com/emerg/topic831.htm.
- [10] Rho, J. P., Stan, L., (2004) *Handbook of pharmaceutical biotechnology*, Wiley, USA, PP 65-78.
- [11] Ouriel, K. (2002) *Reviews in cardiovascular medicine*, PP 110-132.
- [12] Ouriel, K., Welch, E. I., and Shortell, C. K. (1995) Comparison of streptokinase, urokinase and recombinant tissue plasminogen activator in an in vitro model of venous thrombosis. *J. Vasc. Surg.* 22, 593-597.
- [13] Ouriel, K., Gray, B., Daniel, D. G., and Olin,

داروی نو ترکیب به شمار می‌رود. یکی از راه‌کارهای افزایش میزان حلالیت پروتئین‌های نو ترکیب دشوار، تغییر سطح بیان ژن است. زمانی که از یک پروموتر قوی برای بیان استفاده می‌شود، حجم بالایی از پروتئین نو ترکیب در یک زمان تولید می‌شود. با توجه به ظرفیت محدود سلول میزبان برای تاحوردگی و وجود غلظت‌های بالا از مولکول‌های فاقد تاحوردگی مناسب، احتمال برهمکنش نواحی آبگریز و نهایتاً رسوب پروتئین افزایش می‌یابد. با کاهش قدرت پروموتر، از تجمع ناگهانی پلی پپتیدهای فاقد تاحوردگی ممانعت به عمل آمده و فرصت بیشتری برای دستیابی به پیچش مناسب، محیاست. به همین دلیل در پروژه حاضر سعی شده است که پروموتر القایی و قوی T7 با یک پروموتر دائمی با قدرت متوسط (PCE)، در بیان فرم فعال آنزیم رتپلاز مقایسه شوند. همانگونه که در نتایج مشاهده شد، پروموتر القا شونده T7 قادر به بیان مقادیر قابل توجه از رتپلاز به صورت نامحلول می‌باشد. در بیان به کمک پروموتر دائمی PCE نیز آنزیم رتپلاز به صورت نامحلول در باکتری رسوب می‌کند اما میزان آن به مراتب کمتر از بیان با پروموتر T7 می‌باشد. بررسی میزان فعالیت بیولوژیک سوپرناتانت سلول‌ها نشان می‌دهد که بیان القا شونده رتپلاز قادر به تولید فرم محلول و فعال این آنزیم نیست، در صورتی که استفاده از پروموتر دائمی قادر است بخشی از پروتئین نو ترکیب را به صورت فعال و محلول در سیتوزول تولید کند. وجود فعالیت در سوپرناتانت سلول‌ها نشان می‌دهد که راه‌کار اتخاذ شده با کاهش میزان تولید پروتئین نو ترکیب، اجازه پیچش مناسب بخشی از آن را فراهم کرده است. کاهش حجم تولید توانسته است سبب فعال باقی ماندن بخشی از مولکول‌های غنی از پیوند دی سولفید رتپلاز حتی در شرایط احیایی سیتوزول باکتری BL21 (DE3) از طریق کاهش میان کنشهای ناخواسته شود.

- [21] Li, X. K., Lijnen, H. R., Nelles, L., Van Hoef, B., Stassen, J. M., and Collen, D. (1992) Biochemical and biologic properties of rt-PA del(K296-G302), a recombinant human tissue-type plasminogen activator deletion mutant resistant to plasminogen activator inhibitor-1. *Blood*. 79, 417–429.
- [22] Shu-guang, F., Ju, C., Li, H., Ying-ping, Z., and Si-liang, Z. (2006) Degradation of reteplase expressed by recombinant *Pichia pastoris*. *J. East China Univ. Sci. Technol.* 3, 2006–2012.
- [23] Shu-guang, F., Huang, C. J., and Ying-ping, Z., (2007) Effects of temperature on expression of rPA in *Pichia pastoris*. *Ind. Microbiol.* 34, 11–15.
- [24] Jie, J., Cheng-Ying, J., and Lian-Xiang, D. (2007) Cloning of rPA gene and expression of the gene in *Pichia methanolica*. *J. South China Univ. Sci. Technol.* 12, 1-8.
- [25] Wiebe, M. G., Karandikar, A., and Robson, G. D. (2001) Production of tissue plasminogen activator (t-PA) in *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Bioeng.* 76, 164–174.
- [26] Farrell, P. J., Behie, L. A., and Iatrou, K. (1999) Transformed lepidopteran insect cells: new sources of recombinant human tissue plasminogen activator, *Biotechnol. Bioeng.* 64, 426–433.
- [27] Martegani, E., Forlani, N., Mauri, I., Porro, D., Schleuning, W. D., and Alberghina, L., (1999) Expression of high levels of human tissue plasminogen activator in yeast under the control of an inducible GAL promoter. *Appl. Microbiol. Biot.* 37, 604–608.
- [28] Zhao, Y., Ge, W., Kong, Y., and Zhang, C. (2003) Cloning, expression and renaturation studies of reteplase, *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 989–992.
- J., (2000) Complication associated with the use of urokinase and recombinant tissue thrombolysis for catheter directed peripheral arterial and venous thrombolysis. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 11, 295-8.
- [14] Nordt, T. K., Bode, C. (2003) Thrombolysis: newer thrombolytic agents and their role in clinical medicine. *Heart*. 89, 1358-62.
- [15] Sorensen, H. P., Mortensen, K. K. (2005) Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 4, 1-8.
- [16] Rajan, R. S., Tsumoto, K., Tokunaga, M., Tokunaga, H., Kita, Y., and Arakawa, T. (2011) Chemical and pharmacological chaperones: application for recombinant protein production and protein folding diseases. *Curr. Med. Chem.* 18, 1-15.
- [17] Wang, L. F., Hum, W. T., Kalyan, N. K., Lee, S. G., Hung, P. P., and Doi, R. H. (1989) Synthesis and refolding of human tissue-type plasminogen activator in *Bacillus subtilis*. *Gene*. 84, 127–133.
- [18] Zhang, Y., Jiang, P., and Gao, J. (2008) Recombinant expression of rt-PA gene (encoding Reteplase) in gametophytes of the seaweed *Laminaria japonica*. *Science in China*. 51, 1116–1120.
- [19] Spellman, M. W., Basa, L. J., and Leonard, C. K. (1989) Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 264, 14100–14111.
- [20] Parekh, R. B., Dwek, R. A., and Rudd, P. M. (1989) N-glycosylation and in vitro enzymatic activity of human recombinant tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells and a murine cell line. *Biochemistry*. 28, 670–7679.