

بررسی تأثیر جهش در ناحیه پروپیتید بر بیان فاکتور IX انسانی

شکوفه حسن آبادی، جعفر وطن‌دوست* و مجید مومنی مقدم

سبزوار، دانشگاه حکیم‌سبزواری، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۷

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۵

چکیده

فاکتور IX به عنوان یک فاکتور انعقاد خون و وابسته به ویتامین K، برای عملکرد بیولوژیک خود نیاز به تغییرات پس از ترجمه از جمله گاما‌کربوکسیلاسیون دارد. گاما‌کربوکسیلاسیون توسط آنزیمی به نام گاما‌کربوکسیلاز کاتالیز می‌شود و پروپیتید پروتئین‌های وابسته به ویتامین K، اولین مکان شناسایی گاما‌کربوکسیلاز می‌باشند. اسیدهای آمینه خاص در این توالی پروپیتیدی مسئول تفاوت تمایل آنزیم برای گاما‌کربوکسیلاز هستند. هرچه میزان ثابت مهارتی بیشتر شود تمایل آنزیم کم و پروتئین به طور کامل گاما‌کربوکسیله می‌شود. مشخص شده است که در بین پروتئین‌های وابسته به ویتامین K، پروترومبین کمترین تمایل به آنزیم گاما‌کربوکسیلاز و در نتیجه بیشترین میزان گاما‌کربوکسیلاسیون را دارد. لذا در این مطالعه سازه بیانی PMT-FIX-M واجد cDNA فاکتور IX جهش یافته در اسید آمینه ۱۳-H (به P) بر اساس پروپیتید پروترومبین ساخته شد. میزان بیان و فعالیت فاکتور IX نوترکیب جهش یافته و طبیعی در زمان‌های مختلف بعد از ترانسفکشن توسط الیزا و انعقاد بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت و فعالیت فاکتور IX و در نتیجه گاما‌کربوکسیلاسیون فاکتور IX جهش یافته بیشتر از فاکتور IX طبیعی است.

واژه‌های کلیدی: فاکتور IX، گاما‌کربوکسیلاز، پروپیتید، پروترومبین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۴۴۰۱۳۳۲۹، پست الکترونیکی: j.vatan@hsu.ac.ir

مقدمه

فعال سازی و ناحیه کاتالیتیکی است (۲). توالی پری پیتید و پروپیتید با ۴۶ اسید آمینه مشهور به پری پرولیدرمی باشد که از اسید آمینه آرژنین واقع در موقعیت ۱- تا میتوین در موقعیت ۴۶- را در برمی گیرد. بعد از حذف پری پرولیدر در سلول‌های کبدی، فاکتور IX بالغ که به صورت زیموژن وارد جریان خون می‌شود، از اسید آمینه ۱ (تیروزین) شروع و به اسید آمینه ۴۱۵ خاتمه می‌یابد (۱۹). زیموژن فاکتور IX در هنگام نیاز توسط فاکتور IXa یا VIIIa برش می‌خورد و به شکل دو زنجیره فعال تبدیل می‌شود.

فاکتور IX همانند فاکتورهای انعقادی VII، X، پروترومبین، پروتئین C، Z و S جزء پروتئین‌های وابسته به ویتامین K (VKD) می‌باشند و برای عملکرد بیولوژیکی خود، نیاز به تغییرات پس از ترجمه از جمله گاما‌کربوکسیلاسیون دارند

فاکتور IX انسانی یک فاکتور انعقاد خون است که نقص عملکردی یا فقدان ارثی آن باعث بیماری هموفیلی B (کریسمس) می‌شود (۱۴). هرچند این بیماری روی مردان تأثیر می‌گذارد، اما زنان حامل آلل بیماری با سطوح فعالیت فاکتور IX کاهش یافته نیز ممکن است برخی خونریزیها را تجربه کرده باشند (۵). فاکتور IX بالغ گلیکوپروتئینی است تک زنجیره با طول ۴۱۵ اسید آمینه و با وزن مولکولی حدود ۵۷ کیلو دالتون که از پردازش پروتئین پیش ساز پری پرو فاکتور IX با ۴۶۱ اسید آمینه حاصل می‌شود. این پروتئین پیش ساز دارای چندین ناحیه است که به ترتیب از انتهای آمینی به کربوکسی شامل ناحیه پری پیتید یا پیتید راهنما، ناحیه پروپیتید، ناحیه گلا (GLA)، نواحیهای شبه فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، ناحیه

است. جایگاه شناسایی گاما کربوکسیلاز درون پروپیتید بلافاصله مجاور سیگنال پپتید قرار گرفته است و این پروپیتید است که اتصال سوبسترا را به گاما کربوکسیلاز میانجی‌گری می‌کند. پروپیتید پروتئینهای VKD با وجود رزیدوهای حفاظت شده توالیهای مختلفی دارند که اتصال و فعالیت آنزیم را کنترل می‌کنند (۸). فنیل آلانین ۱۶-، آلانین ۱۰-، آرژنین ۴- و ۱- تقریباً غیر قابل تغییر هستند و رزیدوی ۲- به طور کلی یک آرژنین یا لیزین است. آمینو اسیدهای آب‌گریز در رزیدوهای ۶-، ۷- و ۱۷- نیز حفظ شده‌اند. سایر نواحی حفاظت نشده از جمله ناحیه ۱۱- تا ۱۵- می‌تواند بر تمایل سوبسترا به آنزیم اثر گذار باشد (۱۷). در واقع اسیدهای آمینه خاص در توالی پروپیتیدی مسئول تفاوت تمایل برای گاما کربوکسیلاز هستند. پروپیتیدهایی که با میل و تمایل بالا به سوبسترا متصل می‌شوند در مقایسه با پروپیتیدهایی که با میل و تمایل کم یا متوسط متصل می‌شوند فعالیت گاما کربوکسیلازی کمتری دارند (۳). به عبارت دیگر هرچه میزان ثابت مهار (Inhibition constant / Ki) بالاتر برود تمایل برای آنزیم کم می‌شود و پروتئین به طور کامل گاما کربوکسیله می‌شود اما هرچه Ki کوچکتر شود تمایل برای آنزیم زیاد می‌شود و پروتئین به طور کامل گاما کربوکسیله نمی‌گردد (۳). میزان Ki به ترتیب از کوچک به بزرگ عبارتند از فاکتور X، VII، پروتئین S، فاکتور X، پروتئین C، پروترومبین (جدول ۱) (۳).

جدول ۱- همولوژی توالی ناحیه پروپیتید و میزان Ki در پروتئینهای وابسته به ویتامین k (۱۷). پروترومبین بیشترین Ki و بنابراین کمترین تمایل به اتصال به آنزیم و بیشترین سرعت گاما کربوکسیلاسیون را دارد.

	-18	-16	-10	-6	-1	K _i (nM)													
Factor X	S	L	F	I	R	R	Q	A	N	N	I	L	A	R	V	T	R	2.6 ± .12	
Matrix Gla Protein	N	P	F	I	N	R	R	N	A	N	T	F	I	S	P	Q	Q	R	5.8 ± 1.4
Factor VII	R	V	F	V	T	Q	E	E	A	H	G	V	L	H	R	R	R	R	11.1 ± 0.8
Protein S	A	N	F	L	S	K	Q	Q	A	S	Q	V	L	V	R	K	R	R	12.2 ± 2.3
PRGP1	R	V	F	L	T	G	E	K	A	N	S	I	L	K	R	Y	P	R	12.8 ± 0.1
Factor IX	T	V	F	L	D	H	E	N	A	N	K	I	L	N	R	P	K	R	33.6 ± 4.5
Protein C	S	V	F	S	S	S	E	R	A	H	Q	V	L	R	I	R	K	R	230 ± 18
Prothrombin	H	V	F	L	A	P	Q	Q	A	R	S	L	L	Q	R	V	R	R	277 ± 122

هدفمند در قسمت پروپیتید فاکتور IX براساس پروپیتید پروترومبین است تا شاهد کاهش میزان Ki و افزایش

(۱۸). پروپیتید در این پروتئینها در برگیرنده توالی شناسایی آنزیم گاما کربوکسیلاز است و گاما کربوکسیلاز با اتصال به توالی پروپیتیدی ۱۸ اسید آمینه ای روی پروتئینهای VKD، اسید گلوتامیکهای ویژه ناحیه گلا را به رزیدوهای گاما کربوکسی اسید گلوتامیک تبدیل می‌کند. پروپیتید نه تنها در اتصال سوبسترا به آنزیم واسطه است بلکه آنزیم را فعال (۱۲) و در بالا بردن کارایی کربوکسیلاسیون نقش ایفاء می‌کنند (۱). در واقع پروپیتید تغییرات فضایی خاصی را القاء می‌کند تا فعالیت بیشتری را در جایگاه فعال کربوکسیلاز تثبیت کند. همچنین جهشهایی مانند جهش در اسید آمینه ۱۰- پروپیتید که باعث کاهش فعالیت آنزیم و در نتیجه کاهش فعالیت فاکتور IX می‌شوند می‌توانند منجر به مشکلات خونریزی دهنده و حساسیت به وارفارین شود (۱۵).

آنالیز پروتئینهای پلاسمایی VKD نشان می‌دهد که همگی مانند فاکتور IX ابتدا به عنوان مولکولهای پیش ساز سنتز می‌شوند و شامل هر دو توالی آب‌گریز پری و پروپیتید هستند. اگر چه توالی پری پپتید (سیگنال پپتید) در میان این پروتئینها متفاوت است، ولی همولوژی قابل توجهی در ناحیه پروپیتید دارند. پروپیتید تمام این پروتئینها شامل ۲ جایگاه تشخیص می‌باشد (۸)؛ یک جایگاه تشخیص گاما کربوکسیلاز برای کربوکسیلاسیون مستقیم این پروتئینها در انتهای آمینی پروپیتید (۱۰) و جایگاه تشخیص دوم که مربوط به پروپیتیداز است در انتهای کربوکسیلی قرار گرفته

با توجه به اینکه Ki پروترومبین بیشتر از فاکتور IX می‌باشد لذا هدف از این تحقیق در این کار ایجاد جهشهای

از بانک اطلاعاتی NCBI جهت دستیابی به توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی فاکتورهای انعقادی استفاده شد. رسم نمودارها و بررسی آماری مقادیر با استفاده از برنامه Excel انجام شد. برای بررسی توالیهای حاصل از تعیین توالی از برنامه های Blast و Chromas استفاده گردید. جهت طراحی پرایمرها از برنامه رایانه ای Gene 3.4 Runner استفاده گردید (جدول ۲) و به وسیله شرکت DNAزیست سنتز شدند. از برنامه آنالین Restriction map viewer جهت بررسی نقشه هضم آنزیمی توالیها و به منظور ترسیم پلاسمیدها از برنامه Plasmid5 استفاده شد. برای بررسی آب‌گیری از برنامه ExpASy-ProtScale استفاده شد.

کربوکسیلاسیون در فاکتور IX باشد. از طرفی انتظار بر این است که افزایش کربوکسیلاسیون، میزان فاکتور IX فعال سنتز شده را افزایش دهد.

مواد و روشها

محیط کشت اشنایدر دروزوفیلایی و پنی سیلین/ استرپتومایسین از شرکت سیگما خریداری گردید. همه آنزیمهای مورد استفاده، کیت استخراج پلاسمید، کیت استخراج از ژل و مواد PCR از شرکت سیناژن خریداری شد. سلولهای دروزوفیلایی اشنایدر ۲ (S2) از شرکت Invitrogen خریداری شد.

جدول ۲- لیست پرایمر های استفاده شده برای تکثیر فاکتور IX واجد جهش

نام پرایمر	توالی پرایمر
KF1	5GGGGTACC CAAACAGCGCGTGAACATG3
XR2	5CCGCTCGAGAATCCATCTTTCATTAAGTGAGC3
F2	5ACGCCAACAAAATCTGAATC3
RM13	5TTGTTGGCGTTTTCAGGATC3

استفاده می‌شود و نواحی با ارزش مثبت آب‌گیری می‌باشند.

همه آزمایشات در دو یا سه تکرار انجام شد و مقایسه میانگینها با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

تکثیر cDNA فاکتور IX واجد جهش با PCR و SOE-PCR: جهت ساخت cDNA فاکتور IX واجد جهش در ناحیه ۱۳- پروپیتید از روش SOEing PCR و الگوی اولیه PMT-FIX حاصل کار وطن دوست و همکاران (۲۱) استفاده شد. در تمامی تکثیرها و ساخت قطعات نوترکیب، ابتدا تکثیر با آنزیم Taq و پس از به دست آمدن شرایط بهینه، واکنش PCR با آنزیم Pfu انجام می‌شد. برای دستیابی به فاکتور IX واجد جهش در ناحیه پروپیتید نیازمند دو قطعه بوده که قطعه A در برگیرنده توالی پری پرو فاکتور IX (۱۳۳جفت باز) و قطعه B در برگیرنده ادامه توالی رمز کننده فاکتور IX انسانی (۱۲۹۲جفت باز) می‌باشد. قطعه A با استفاده از جفت پرایمر KF1/M13 و قطعه B با استفاده از جفت پرایمر F2/XR2 تکثیر یافت.

بررسی آب‌گیری: برای بررسی میزان آب‌گیری اسیدهای آمینه ناحیه پروپیتید از برنامه ExpASy-ProtScale استفاده شد. ناحیه آب‌گیری نقش تعیین کننده ای در کارایی پپتیدهای نشانه و انتقال پروتئین به سمت مسیر ترشحی دارد. از آنجایی که پروپیتید پروتئینهای انعقادی VKD باهم همولوژی دارند و در برخی نقاط حفاظت شده می‌باشند لذا به بررسی میزان آب‌گیری پروپیتید تمام فاکتورهای انعقادی VKD مثل فاکتور X، VII، IX و پروترومبین پرداخته شد. در واقع آب‌گیری این اسیدهای آمینه بر اساس معیار آب‌گیری Kyte-Doolittle تعریف شده است. معیار Kyte-Doolittle به طور گسترده برای تشخیص نواحی آب‌گیری در پروتئینها

پلاسمید واکنش هضم آنزیمی برای آن انجام داده شد. همچنین برای تأیید کلونینگ و بررسی عدم وجود جهش در فاکتور IX کلون شده، این پلاسمید نوترکیب با استفاده از یک جفت پرایمر عمومی MT Forward و BGH- Reverse بر اساس روش سنگر توسط شرکت ژن فناوریان تعیین توالی گردید.

کشت و ترآلایی سلولهای S2: کشت و ترآلایی سلولهای S2 طبق پروتکل شرکت Invitogen با کمی تغییرات انجام شد که قبلاً توسط وطن دوست و همکاران توضیح داده شده است (۲۰ و ۲۱).

ارزیابی بیان و فعالیت فاکتور IX نوترکیب: به منظور بررسی وجود فاکتور IX در محیط کشت سلولهای ترآلوده شده، محیط کشت سلولها در روزهای اول، دوم و سوم پس از افزودن ویتامین K₁ (۵μg/ml) (۶ و ۷) و القاء با سولفات مس (۵۰۰μg/ml)، جمع آوری شد و پس از سانتریفیوژ، محلول رویی در ۲۰- درجه سانتی گراد فریز گردید. آنتی ژن فاکتور IX نوترکیب انسانی بیان شده در محیط کشت سلولهای ترآلوده شده با روش ساندریجی الایزا بر روی میکروپلیتها که با آنتی بادیهای پلی کلونال ضد فاکتور IX که در کیت الایزا مهیا شده بود آشکار شد. OD مشاهده شده نسبت مستقیم با غلظت فاکتور IX انسانی دارد و غلظت نمونه مجهول براساس نمونه استاندارد محاسبه می شود. براساس دستورالعمل کیت الایزا، نمودار استاندارد باید با استفاده از پلاسمای طبیعی سیراته رسم گردد. برای رسم نمودار، پلاسمای طبیعی انسانی با رقتهای ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۴۰۰ و ۱/۸۰۰ که به ترتیب نشان دهنده ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۶/۲۵ درصد مقدار فاکتور IX در یک میلی لیتر پلاسمای طبیعی انسانی می باشد، تهیه شد. بر اساس میزان جذب مربوط به هر رقت از پلاسمای طبیعی انسانی در طول موج ۴۵۰nm نمودار استاندارد الایزا رسم گردید.

حجم مخلوط نهایی واکنش به ۲۵ μL که شامل Buffer A (۲۰۰mM) dNTP، ۱/۵μl MgCl₂ (۵۰mM)، ۲/۵μl (1X) ۱/۵μl، ۱μl از هر یک از پرایمرها (10 pmol)، (-PMT) ng DNA (۵۰FIX) ۱μl و آنزیم *Pfu* پلیمرز (۰/۵ u) بود. نمونه ها برای تکثیر نهایی مطابق برنامه سیکل حرارتی، ۴ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد جهت واسرشت اولیه، ۳۰ سیکل به صورت ۳ دقیقه در ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه، ۱ یا ۲ دقیقه به ترتیب برای قطعه A و B در ۷۲ درجه و به منظور تکثیر نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. محصول A و B به ترتیب بر روی ژل آگارز ۱ درصد و ۱/۵ درصد در بافر TAEIX منتقل شدند.

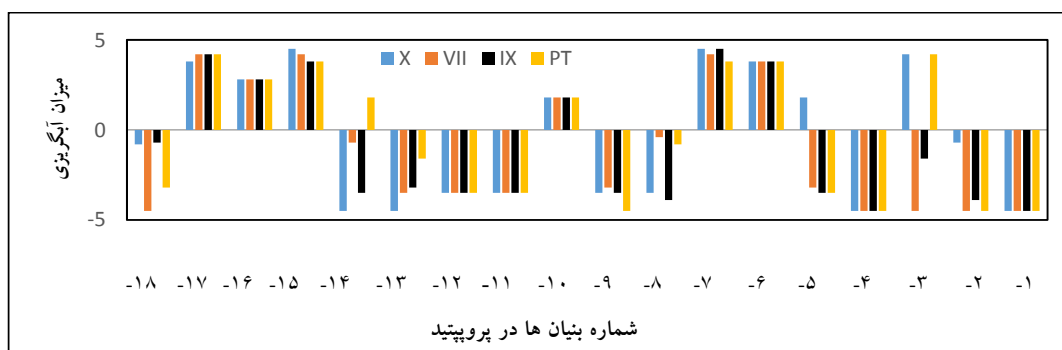
PCR سوم در حضور دو الگوی A و B در دو مرحله انجام شد. در ۵ چرخه اول به دلیل اینکه باید دو الگو همپوشان شوند دمای اتصال توالیهای مکمل این دو پرایمر (۲۵ درجه سانتی گراد) به عنوان دمای اتصال در نظر گرفته شد و سپس در ۳۰ چرخه بعدی PCR با اضافه کردن پرایمرهای KF1/XR2 در دمای ۶۰ درجه انجام گرفت. محصول حاصل بر روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر TAEIX منتقل شد.

ساخت سازه pMT-hFIX.M13: برای ساخت سازه بیانی pMT-hFIX.M13 cDNA فاکتور IX باید با انتهای 5' *Xho I* و *Kpn I* 3' تکثیر گردد. بعد از تکثیر cDNA فاکتور IX جهش یافته با SOE-PCR، برش محصول SOE-PCR با آنزیمهای *Xho I* و *Kpn I*، تخلیص از ژل و همچنین برش پلاسمید pMT-V5-His A با آنزیمهای *Xho I* و *Kpn I*، عمل اتصال بین cDNA و پلاسمید pMT-V5-His صورت گرفت که منجر به ساخت پلاسمید pMT-hFIX.M13 گردید. به دنبال ترانسفورم کردن باکتریهای مستعد *Ecoli/DH5α* به روش شوک حرارتی، کلنیهای مثبت با کلنی - PCR انتخاب شدند. پلاسمید حاوی فاکتور IX جهش یافته از کلنیهای مثبت استخراج و برای تأیید

جمع‌آوری شده از هر نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر از پلاسما فاکتور IX و ۱۰۰ میکرولیتر از PTT فعال شده مخلوط و دقیقاً ۳ دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر کلسیم کلرید mM ۲۵ از قبل گرم شده در ۳۷ درجه به آن اضافه و زمان انعقاد اندازه‌گیری گردید. فعالیت انعقادی هر نمونه بر اساس نمودار استاندارد تعیین شد (۲۰ و ۲۱).

نتایج

بررسی آب‌گیری: پس از اینکه به بررسی آب‌گیری پروپیتید پروتئینهای انعقادی VKD بر اساس معیار آب‌گیری Kyte-Doolittle پرداخته شد مشخص گردید که در برخی بنیانها مانند ۱-، ۴-، ۶-، ۱۰-، ۱۱-، ۱۲-، ۱۶- و ۱۷- میزان آب‌گیری فاکتور IX با پروترومبین یکسان می‌باشد. در بین بنیانهای غیریکسان باقی مانده فقط بنیان ۱۳- نظم خاصی را نشان می‌دهد (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه آب‌گیری اسیدهای آمینه پروپیتید پروتئینهای انعقادی VKD بر اساس معیار آب‌گیری Kyte-Doolittle. در برخی بنیانها میزان آب‌گیری فاکتور IX با پروترومبین یکسان می‌باشد و در بین بنیانهای غیریکسان باقی مانده فقط بنیان ۱۳- نظم خاصی را نشان می‌دهد.

برگیرنده ادامه توالی رمزکننده فاکتور IX انسانی به طول bp ۱۲۹۲ با جفت پرایمر F2 و XR2 از الگوی pMT-hFIX تکثیر شدند.

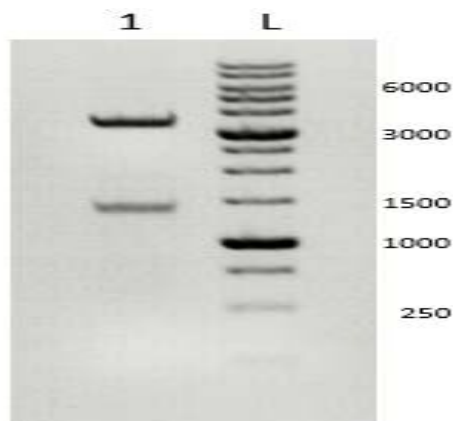
دو محصول اولیه B و A توسط توالیهای مکمل که در انتهای پرایمر M13 و ابتدای پرایمر F2 است به یکدیگر متصل شدند لذا پس از انجام واکنش SOE قطعه ۱۴۱۹ جفت بازی حاصل از اتصال دو قطعه مورد انتظار است که

از آزمایش (Activated partial thromboplastine) APTT نیز برای بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور IX در محیط کشت استفاده گردید. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت انعقادی فاکتور IX از پلاسماهایی استفاده می‌شود که واجد تمامی فاکتورهای لازم در این مسیر انعقادی بوده ولی فاقد فاکتور IX است. بنابراین زمان انعقاد این پلاسما در مقایسه با استاندارد طولانی بوده، ولی در صورت اضافه کردن نمونه مورد آزمایش به این پلاسما و وجود فاکتور IX در این نمونه مدت این زمان کاهش می‌یابد. در این روش از پلاسماهای سیراته افراد نرمال (حدود ۳۰ نفر) که با یکدیگر مخلوط گردیده بود به عنوان استاندارد استفاده گردید. فعالیت این فاکتور در پلاسماهای این افراد که به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شده باشد (۱۰۰ mU/ml) (۱۰۰ درصد) در نظر گرفته می‌شود.

برای تعیین فعالیت بیولوژیکی فاکتور IX بیان شده توسط سلولهای ترانژوده شده ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت

تهیه و تکثیر cDNA فاکتور IX واجد جهش در ناحیه پروپیتید: با توجه به اینکه هدف ایجاد جهش در اسید آمینه ۱۳- پروپیتید فاکتور IX و تغییر اسید آمینه هیستیدین به پرولین بود لذا توالی رمزکننده فاکتور IX در دو قطعه همپوشان A و B با SOE-PCR تکثیر شد. قطعه A در برگیرنده توالی پری پرو فاکتور IX به طول bp ۱۳۳ با استفاده از جفت پرایمر KF1 و M13 و قطعه B در

ترانسفکت و القاء شده مشخص گردید که فعالیت فاکتور IX مترشحه از سلولهای ترانسفکت شده با PMT-FIX به ترتیب در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت ۳۶، ۶۲ و ۱۱۹ mU/ml می باشد. در حالی که این مقادیر برای سلولهای ترانسفکت شده با PMT-FIX-M13 به ترتیب ۵۵، ۸۶ و ۱۶۵ می باشد (شکل ۴).

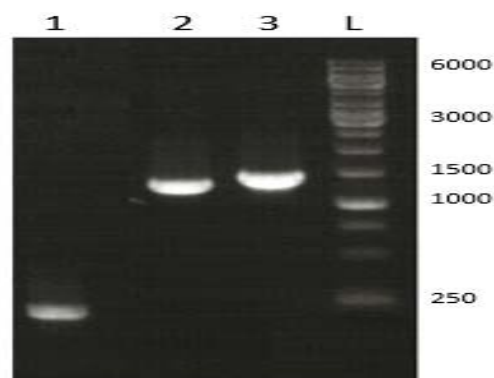


شکل ۳- نتایج حاصل از برش آنزیمی سازه PMT-hFIX-M13 و ایجاد قطعاتی با طول تقریبی ۱۴۰۰ و ۳۵۰۰ جفت باز (ردیف ۱). L: مارکر ۱Kb

آزمون t گروههای مستقل نشان داد که بین گروههای PMT-FIX و PMT-FIX-M در ۷۲ ساعت اختلاف معناداری وجود دارد ($P < 0.05$).

پس از نرمال سازی برحسب یک میلیون سلول، غلظت فاکتور IX مترشحه از سلولهای ترانسفکت شده با PMT-FIX به ترتیب در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت ۲۰۴، ۳۶۷ و ۴۳۸ ng/ml/10⁶ cell می باشد. در حالی که این مقادیر برای سلولهای ترانسفکت شده با PMT-FIX-M به ترتیب ۳۲۷، ۴۲۵ و ۵۲۵ ng/ml/10⁶ cell می باشد (شکل ۵). آزمون t گروههای مستقل برای الایزا نشان داد که بین گروههای PMT-FIX و PMT-FIX-M در هر سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معناداری وجود دارد ($P < 0.05$) (شکل ۵).

نتایج الکتروفورز محصولات حاکی از آن بود که قطعه مورد نظر ساخته شده است (شکل ۲).

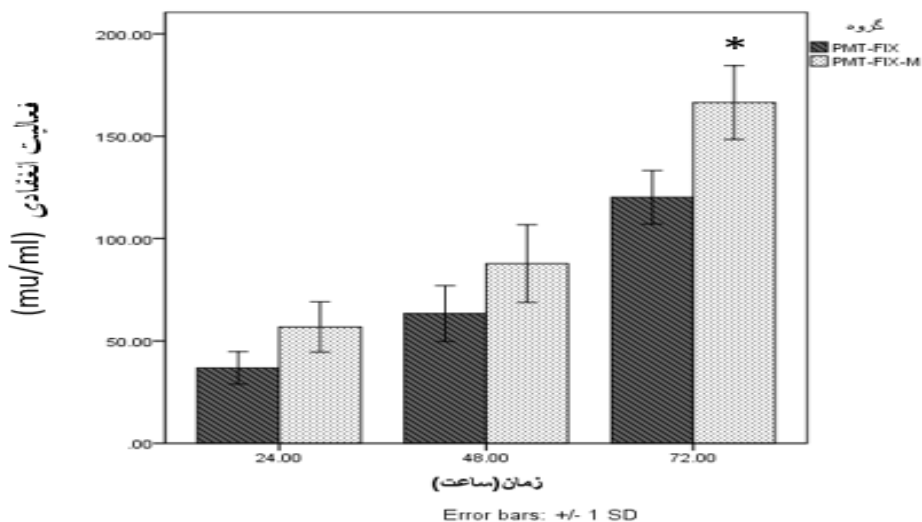


شکل ۲- الگوی الکتروفورزی محصولات PCR و SOE-PCR

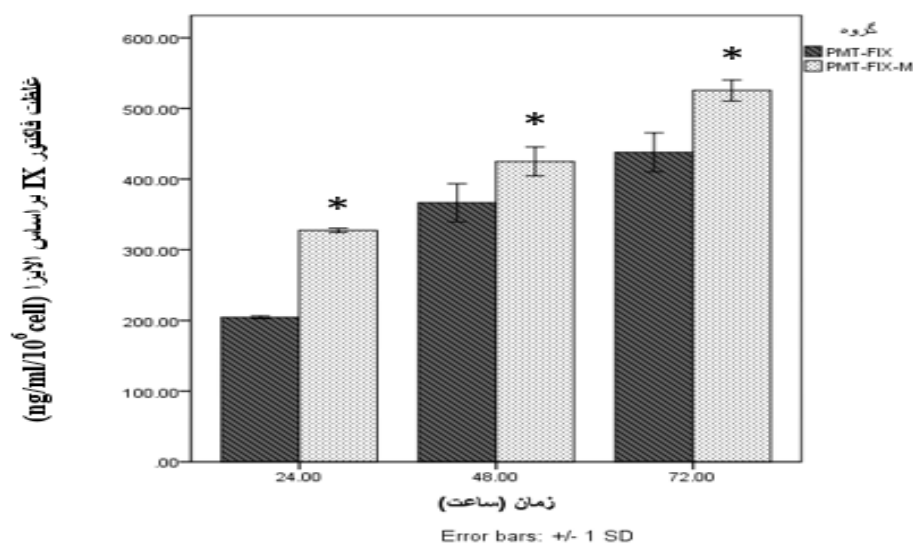
ردیف ۱؛ قطعه A با ۱۳۳ جفت باز، ردیف ۲؛ قطعه B با ۱۲۹۲ جفت باز، ردیف ۳؛ قطعه فاکتور IX جهش یافته با ۱۴۱۹ جفت باز، L- مارکر ۱Kb

ورود cDNA فاکتور IX جهش یافته درون پلاسمید pMT/V5 - HisA پس از تأیید کلنی صحیح با روش کلنی PCR، برای تأیید ساخت سازه PMT-hFIX.M13 و همسانه سازی فاکتور IX جهش یافته، هضم آنزیمی صورت گرفت. در هضم آنزیمی با Kpn1 و Xho1 انتظار می رفت فاکتور IX از پلاسمید خارج شده و قطعات حدود ۱۴۰۰ و ۳۵۰۰ جفت بازی مشاهده شود (شکل ۳). پس از تأیید به روش هضم آنزیمی به منظور تأیید نهایی همسانه سازی، تعیین توالی پلاسمید نوترکیب نیز نشان دهنده صحت کلونینگ، عدم وجود جهش در فاکتور IX و تغییر کدون اسید آمینه ۱۳- پروپتید می باشد.

ارزیابی و بیان فاکتور IX نوترکیب: محیطهای کشت حاصل از ترانسفکشن سلولهای S2، در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ جمع آوری و برای آزمون انعقاد و الایزا مورد استفاده قرار گرفت. پس از بررسی و مقایسه فعالیت انعقادی فاکتور IX نوترکیب در محیط کشت سلولهای S2



شکل ۴- مقایسه فعالیت انعقادی فاکتور IX در سلولهای ترانسفکت شده PMT-FIX با PMT-FIX-M بر حسب $\mu\text{g/ml}$. ستاره نشان دهنده معنی داری نمونه‌ها در مقایسه با کنترل با استفاده از آنالیز واریانس است ($P < 0/05$)



شکل ۵- نمودار غلظت فاکتور IX با الیزا در سلولهای ترانسفکت شده PMT-FIX یا PMT-FIX-M بر حسب $\text{ng/ml}/10^6\text{cell}$. ستاره نشان دهنده معنی داری نمونه‌ها در مقایسه با کنترل با استفاده از آنالیز واریانس است ($P < 0/05$)

بحث

ثابت کردند که جایگزینی توالی سیگنال و پروپیتید پروتئینهای VKD با آنهایی که واکنش بهتری با آنزیم گاما کروموسیلز دارند اثر زیادی بر بیان پروتئینهای نوترکیب دارد (۱۱). Camire و همکاران نیز ثابت کردند زمانی که در فاکتور X از پروپیتید پروترومبین استفاده می‌شود فاکتور X نوترکیب تقریباً به طور کامل و ۵۰ برابر بیشتر گاما کروموسیلز می‌شود، لذا این فرضیه داده شد که

از آنجایی که پروپیتید اولین ناحیه شناسایی کروموسیلز می‌باشد و پروپیتیدهای مختلف گرایشهای متفاوتی برای کروموسیلز دارند لذا یکی از راهکارهای افزایش بیان فاکتور IX، تغییر اسید آمینه‌های ناحیه پروپیتید براساس پروپیتید فاکتورهای است که تمایل کمتری به آنزیم کروموسیلز دارند. در این راستا خورشیدی و همکاران

پس هم باردار بودن هم آب‌گریزی در عملکرد پروپیتید تأثیر می‌گذارد.

نتایج براساس نمودار مقایسه‌ای میزان آب‌گریزی Kyte-Doolittle (شکل ۱) نشان می‌دهد که نواحی ۱۱-، ۱۲-، ۱۵-، ۱۶- و ۱۷- در فاکتور IX و پروترومبین از نظر آب‌گریزی مشابه می‌باشند. از سه اسید آمینه باقی مانده یعنی ۱۳-، ۱۴- و ۱۸- براساس نمودار آب‌گریزی پروتئینهای VKD در اسید آمینه ۱۴- و ۱۸- هم نظم خاصی وجود ندارد. از طرفی Huber و همکارانش در سال ۱۹۹۰ قبلاً نشان داده بودند که اسید آمینه ۱۴- نقشی در کربوکسیلاسیون ندارد (۹). همچنین نتایج آب‌گریزی نشان می‌دهد که هرچه میزان Ki بیشتر می‌شود میزان آب‌گریزی در اسید آمینه ۱۳- پروتئینهای انعقادی بیشتر می‌شود. لذا انتظار بر این است که اگر اسید آمینه هیستیدین در فاکتور IX با اسید آمینه پرولین پروترومبین در جایگاه ۱۳- جایگزین شود احتمال افزایش Ki، کاهش تمایل آنزیم گاما کربوکسیلاز به پروپیتید و افزایش کربوکسیلاسیون فاکتور IX وجود دارد.

Vermeer و همکارانش نیز در ۱۹۹۰ نشان دادند که بار نیز در ناحیه پروپیتید تأثیر گذار می‌باشد اظهار داشتند که به طور قابل توجهی ۳ تا ۵ رزیدو قبل از موقعیت ۱۰- به مانند رزیدوی ۹- و ۸- زنجیره جانبی قطبی و باردار می‌باشد (۲۲). پس این احتمال وجود دارد که علاوه بر آب‌گریزی و نوع اسیدهای آمینه میزان بار چند اسید آمینه کناری نیز در این ناحیه تأثیر گذار باشد. از طرفی به دلیل اینکه برآیند بار ناحیه ۱۰- تا ۱۶- در فاکتور IX، ۲- می‌باشد و لذا بار این ناحیه با پروترومبین متفاوت است احتمالاً اسیدهای آمینه باردار مجاور نیز مؤثر باشند. از طرفی Stanley و همکارانش در سال ۱۹۹۹ نشان داده‌اند که اگر در پروترومبین اسید آمینه $P \rightarrow H$ تبدیل شود تأثیر چندانی در کربوکسیلاسیون ندارد این در تأیید نتایج این

پروپری پروترومبین سوسترای بهتری برای آنزیم گاما کربوکسیلاز می‌باشد. از آنجایی که بر اساس جدول ۱ آنزیم گاما کربوکسیلاز بیشترین تمایل و کمترین Ki را برای فاکتور X و کمترین تمایل و بیشترین Ki را برای پروترومبین دارد لذا این فرضیه تأیید می‌شود که پروپیتید پروترومبین سوسترای بهتری برای آنزیم گاما کربوکسیلاز می‌باشد (۳).

از طرفی بنا بر مطالعات Higgins-Gruber میزان Kd در پروتئینهای VKD از کوچک به بزرگ به ترتیب شامل فاکتور X، IX و پروترومبین است و هرچه Kd بیشتر باشد، محصول بیشتری تولید می‌شود، لذا جایگزینی پروپیتید پروترومبین باعث تولید محصول بیشتری می‌شود (۸).

در فاکتور IX و پروتئین C انسانی با کمک جهش‌های اختصاصی در مکان متوجه شدند فرمهایی که فاقد رزیدوهای ۱- تا ۱۸- بودند، کربوکسیله نشدند (۲۲). Vermeer و همکارانش نیز مشخص کرده بودند که اسیدهای آمینه ۱۱- تا ۱۸- نقش مهمی در گاما کربوکسیلاسیون دارد و فقدان این نواحی باعث عدم گاما کربوکسیلاسیون و در نتیجه عدم فعالیت فاکتور IX می‌شود (۲۲). از طرفی Czerwiec و همکارانش نشان دادند که پپتیدی که شامل اسیدهای آمینه ۱+ تا ۱۸+ (فاقد پروپیتید) باشد، سوسترای ضعیفی برای آنزیم گاما کربوکسیلاز است و Km معادل با ۱/۸ را نشان می‌دهد. Km پایین یعنی زمان بسیار کم و یا غلظت بسیار کمی از سوسترای برای رسیدن به نصف اشباع یا نصف سرعت ماکزیمم لازم است (۴). افزودن اسیدهای ۱- تا ۸- (قسمت به شدت باردار پیش ماده) Km را تقریباً ۳ برابر کاهش داد در حالی که افزودن اسیدهای آمینه ۱- تا ۱۴- که شامل اسیدهای آمینه آب‌گریز بین موقعیت ۸- و ۱۴- بودند، Km را ۴۵ برابر کاهش داد. پس اسیدهای آمینه آب‌گریز که در ناحیه پروپیتید قرار دارند از عناصر ساختاری مهم در جایگاه شناسایی گاما کربوکسیلاسیون هستند (۴).

تحقیق اثبات می‌کند که اسیدهای آمینه دیگر نیز تأثیر گذارند (۱۶).

نتایج ارزیابی فعالیت انعقادی و غلظت فاکتور IX جهش یافته به ترتیب ۱/۵ و ۱/۲ برابر بیشتر از فاکتور IX سالم است. این بدان معناست که تغییر اسیدآمینه ۱۳-(H→P) با افزایش میزان آب‌گریزی از ۳/۲- به ۱/۶- (۱۳) باعث افزایش Ki فاکتور IX، کاهش تمایل آنزیم به سوبسترا و افزایش گاما‌کربوکسیلاسیون شده است که منجر به افزایش میزان انعقاد و فعالیت فاکتور IX می‌گردد. از طرفی با افزایش Ki، مصرف سوبسترا در واحد زمان بیشتر صورت می‌گیرد لذا Kd نیز افزایش می‌یابد و باعث تولید بیشتر محصول می‌گردد که با نتایج الیزا مطابق است. نتایج با بررسی برآیند بار اسیدهای آمینه در ناحیه ۱۰- تا ۱۶- در فاکتور IX و پروترومبین نشان می‌دهد که برآیند بار به ترتیب ۲- و صفر است. لذا هرچند تغییر اسیدآمینه ۱۳- باعث افزایش فعالیت انعقادی و بیان فاکتور IX از طریق افزایش گاما‌کربوکسیلاسیون گردیده است، احتمالاً اسیدهای آمینه باردار مجاور نیز در بیان بیشتر تأثیر گذار بوده‌اند.

نتیجه‌گیری کلی

از آنجایی که تغییر اسیدآمینه ۱۳- در پروپتید فاکتور IX براساس پروپتید پروترومبین باعث افزایش میزان فعالیت و بیان فاکتور IX در سلولهای حشرات شده است، لذا این

منابع

1. Bandyopadhyay P, Clark K, Stevenson B, Rivier J, Olivera B, et al. 2006. Biochemical characterization of Drosophilay-glutamyl carboxylase and its role in fly development. *Insect mol biol* 15:147-56.
2. Bowen DJ. 2002. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 55:127-44.
3. Camire RM, Larson PJ, Stafford DW, High KA. 2000. Enhanced γ -carboxylation of recombinant factor X using a chimeric construct containing the prothrombin propeptide. *Biochemistry* 39:14322-9.
4. Czerwiec E, Kalume DE, Roepstorff P, Hambe B, Furie B, et al. 2006. Novel γ -carboxylglutamic acid-containing peptides from the venom of *Conus textile*. *FEBS Journal* 273:2779-88.
5. Goodeve A. 2015. Hemophilia B: molecular pathogenesis and mutation analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 13:1184-95.
6. Haddad Mashadrizeh A.A ZA, Hosseini S. J, Sabouni. F. 2009. In silico investigation and

نتیجه گرفته می‌شود که چون پروپتید پروترومبین کمترین تمایل را به آنزیم گاما‌کربوکسیلاز دارد سوبسترای بهتری برای آنزیم گاما‌کربوسیلایز می‌باشد و تغییر پروپتید فاکتور IX احتمالاً باعث افزایش میزان Ki آن شده و آن را به سوبسترای بهتری برای آنزیم گاما‌کربوسیلایز تبدیل کرده است که این به نوبه خود باعث گاما‌کربوسیلایسون بیشتر فاکتور IX شده است. افزایش فعالیت و بیان فاکتور IX هم تأیید کننده این موضوع می‌باشد زیرا زمانی فاکتور IX فعال در سلول تولید می‌شود که فاکتور IX گاما‌کربوکسیله باشد.

هر چند روشهای جدید ژن درمانی هموفیلی امیدوار کننده است (۲۳) اما در روش جایگزین درمانی، بررسی روشهایی که منجر به تولید بیشتر با هزینه کمتر فاکتور IX نوترکیب شود یک ضرورت است. از آنجا که ۷۰-۸۰ درصد از بیماران هموفیلی B در کشورهای در حال توسعه زندگی می‌کنند و با توجه به هزینه‌های بالای فاکتور IX نوترکیب و یا مشتق از پلاسما از درمان بازمانده‌اند به طوری که تا سال ۲۰۱۴ تنها ۲۸۰۰۰ از ۱۴۰۰۰۰ بیمار هموفیلی B در جهان به وسیله جایگزین درمانی فاکتور IX درمان شده‌اند (۲۴). افزایش فعالیت و بیان فاکتور IX تولیدی در این مطالعه می‌تواند به بهبود روشهای تولیدی و کاهش هزینه تولید کمک مؤثری کند.

- synchronous application of introns 1 and 2 of human beta-globin to increase the expression of human coagulation Factor IX. *Iranian Journal of Biology* 21:918.
7. Haddad Mashadrizheh A.A. ZA, Sabouni F, and Hemmat J. . 2008. Analysis of the Non-Coding Region of the Human Factor VIII Gene in Comparison with Selected Regions of the Intron 1 of Human Factor IX *Iranian journal of Biology* 21:549.
 8. Higgins-Gruber SL, Mutucumarana VP, Lin P-J, Jorgenson JW, Stafford DW, Straight DL. 2010. Effect of vitamin K-dependent protein precursor propeptide, vitamin K hydroquinone, and glutamate substrate binding on the structure and function of γ -glutamyl carboxylase. *J Biol Chem* 285:31502-8.
 9. Huber P, Schmitz T, Griffin J, Jacobs M, Walsh C, et al. 1990. Identification of amino acids in the gamma-carboxylation recognition site on the propeptide of prothrombin. *J Biol Chem* 265:12467-73.
 10. Jorgensen MJ, Cantor AB, Furie BC, Brown CL, Shoemaker CB, Furie B. 1987. Recognition site directing vitamin K-dependent γ -carboxylation resides on the propeptide of factor IX. *Cell* 48:185-91.
 11. Khorshidi S, Zomorodipour A, Behmanesh M, Vatandoost J, Bos MH. 2015. Functional expression of the human coagulation factor IX using heterologous signal peptide and propeptide sequences in mammalian cell line. *Biotechnol lett* 37:1773-81.
 12. Knobloch JE, Suttie J. 1987. Vitamin K-dependent carboxylase. Control of enzyme activity by the "propeptide" region of factor X. *J Biol Chem* 262:15334-7.
 13. Kyte J, Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* 157:105-32.
 14. Orlova N, Kovnir S, Vorobiev I, Gabibov A. 2012. Coagulation factor IX for hemophilia B therapy. *Acta naturae* 4:62.
 15. Sekhri A, Lisinschi A, Furqan M, Palaniswamy C, Mukhi N, et al. 2014. The Conundrum of "Warfarin Hypersensitivity": Prolonged Partial Thromboplastin Time From Factor IX Propeptide Mutation. *American journal of therapeutics*.
 16. Stanley TB, Humphries J, High KA, Stafford DW. 1999. Amino acids responsible for reduced affinities of vitamin K-dependent propeptides for the carboxylase. *Biochemistry* 38:15681-7.
 17. Stanley TB, Jin D-Y, Lin P-J, Stafford DW. 1999. The propeptides of the vitamin K-dependent proteins possess different affinities for the vitamin K-dependent carboxylase. *J Biol Chem* 274:16940-4.
 18. Tie J-K, Zheng M-Y, Pope RM, Straight DL, Stafford DW. 2006. Identification of the N-linked glycosylation sites of vitamin K-dependent carboxylase and effect of glycosylation on carboxylase function. *Biochemistry* 45:14755-63.
 19. Tuddenham EDG, Cooper DN. 1994. Factor IX and haemophili B. In *The Molecular Genetics of Haemostasis and its Inherited Disorders*. Oxford University Press; New York, USA:87-111.
 20. Vatandoost J, Zomorodipour A. 2015. Optimization of transfection and stable expression of human factor IX in Drosophila S2 cells. *Journal of cellular and molecular research* 27:598-610.
 21. Vatandoost J, Zomorodipour A, Sadeghizadeh M, Aliyari R, Bos MH, Ataei F. 2012. Expression of biologically active human clotting factor IX in Drosophila S2 cells: γ -carboxylation of a human vitamin K-dependent protein by the insect enzyme. *Biotechnol Progr* 28:45-51.
 22. Vermeer C. 1990. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem J* 266:625.
 23. Zhang R, Wang Q, Zhang L, Chen S. 2015. Optimized human factor IX expression cassettes for hepatic-directed gene therapy of hemophilia B. *Frontiers of medicine* 9:90-9.
 24. Zhao J, Xu W, Ross JW, Walters EM, Butler SP, et al. 2015. Engineering protein processing of the mammary gland to produce abundant hemophilia B therapy in milk. *Scientific reports* 5.

Study of propeptide mutation effect on the human factor IX expression

Hassanabadi Sh., Vatandoost J. and Momeni Moghadam M.

Biology Dept., Hakim Sabzevari University, Sabzevar, I.R. of Iran

Abstract

Factor IX as a vitamin K-dependent blood coagulation factor requires post-translational modifications such as gamma carboxylation for its biological function. Gamma carboxylation catalyzed by an enzyme called gamma carboxylase and propeptide of vitamin K dependent proteins is first recognition site of gamma carboxylase. Specific amino acids within these propeptide sequences are responsible for differences in affinity for the gamma carboxylase. Increases of K_i result in decrease of enzyme affinity but fully gamma carboxylation of protein. Since the gamma carboxylase enzyme have least affinity for prothrombin, in this study the pMT-FIX-M13 expression vector constructed contains mutant factor IX cDNA in amino acid -13 (H to P) on the basis of prothrombin propeptide. The expression and activity of the normal and mutant recombinant factor IX were investigated by ELISA and APTT after various times of transfection. The results showed that the concentrations and activity of factor IX and so gamma carboxylation in mutant factor IX is more than normal factor IX.

Key words: Coagulation factor IX, gamma carboxylase, propeptide, prothrombin