

بیان پروتئین نو ترکیب TGF β 1 در گیاه توتون و بررسی تأثیر پروتئاز فورین در پردازش فرم نهفته‌ی این پروتئین

سارا خوارزمی، امین باقی زاده* و مسعود ترکزاده ماهانی

ایران، کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۳

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

چکیده

TGF β 1، یک پروتئین تنظیمی چندکاره است که در طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی مداخله می‌نماید. این پروتئین، ابتدا به صورت یک فرم پیش ساز غیرفعال، حاوی ۳۹۰ اسید آمینه سنتز می‌شود که قبل از اتصال به گیرنده‌های TGF β 1، تحت تأثیر برش پروتئولیتیکی، فرم بالغ TGF β 1 از پروپیتید آن جدا می‌گردد. فرم بالغ این پروتئین شامل ۱۱۲ اسید آمینه از انتهای C ترمینال فرم غیرفعال آن است. در این مطالعه، در ابتدا توانایی دو سویه‌ی GV3101 (pMP90RK) و GV3101 (pMP90RK) آگروباکتریوم برای ترانسفورماسیون گیاه *Nicotiana benthamiana* با ناقل بیان pTRAcK-ERH، به وسیله‌ی ساخت سازه کنترل pTRAcK/ C/JG138 (حاوی GFP)، بررسی گردید و نتایج حاصل با تکنیک وسترن بلات و تصویربرداری کانفوکال ارزیابی شد. سپس، به منظور بیان موقت پروتئین TGF β 1 از فرم پیش ساز آن در گیاه توتون، سازه‌های نو ترکیب pTRAcK/ DCF6 و pTRAcK/ DCF7، به ترتیب دارای توالی نگهدارنده شبکه آندوپلاسمی (SEKEDL) و فاقد این توالی طراحی و ساخته شدند. این سازه‌ها به تنهایی و در ترکیب با سازه‌ی نو ترکیب دیگری که حاوی ژن رمز کننده‌ی پروتئاز فورین بود، به گیاهان توتون مایه‌زنی شدند. نتایج حاصل نشان داد که هر دو سازه با موفقیت در گیاه توتون بیان می‌شوند. هرچند پردازش کارآمدتر فرم پیش ساز پروتئین TGF β 1 در گیاهان مایه‌زنی شده با سازه‌ی pTRAcK/ DCF7، نشان می‌دهد که تجمع فرم پیش ساز این پروتئین در شبکه آندوپلاسمی از پردازش آن جلوگیری می‌کند. همچنین، در این تحقیق مشخص شد که برش پروتئولیتیکی شبیه به پروتئاز فورین، بین TGF β 1 بالغ و پروپیتید آن، در *N. benthamiana* اتفاق نمی‌افتد.

واژه‌های کلیدی: پروتئاز فورین، پروتئین نو ترکیب TGF β 1، پردازش فرم نهفته‌ی TGF β 1، گیاه توتون

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۱۴۱۴۱۵۶، پست الکترونیکی: A.baghizadeh@kgut.ac.ir

مقدمه

مهار آنها نقش مهمی را ایفا می‌کند (۶). این پروتئین، در ابتدا به صورت یک فرم پیش ساز غیرفعال، حاوی ۳۹۰ اسید آمینه سنتز می‌شود که از دو بخش سیگنال پیتید (۲۹ اسید آمینه از انتهای N ترمینال) و توالی پروپیتید- TGF β 1 (Pro-TGF β 1) تشکیل شده است. این پروتئین قبل از اینکه بوسیله سلول‌ها ترشح شود، تحت تأثیر چندین مرحله‌ی پردازش درون سلولی قرار می‌گیرد. مهمترین مرحله‌ی پردازش، شکاف پروتئولیتیکی حاصل از فعالیت اندوپیتیداز فورین در توالی پروپیتید است که سبب برش

TGF β (Transforming growth factor β) یک خانواده از سایتوکین‌های مهم است و متعلق به ابرخانواده بزرگ TGF β (TGF β superfamily) می‌باشد. این سایتوکین در پستانداران دارای سه ایزوفورم TGF β 1، TGF β 2 و TGF β 3 است که از طریق دو گیرنده‌ی غشایی I و II پیام خود را به داخل سلول ارسال می‌کند (۴، ۷). ایزوفورم TGF β 1، یک پروتئین تنظیمی چند کاره است که در طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند تحریک و مهار رشد و تمایز سلولی، پیشرفت سیکل سلولی، رشد سلولهای سرطانی و

توالی پروتئینی در اسید آمینه‌ی ۲۷۸ گردیده و منجر به رهاسازی توالی‌های LAP (Latency-associated protein) و فرم بالغ $TGF \beta 1$ می‌شود. فرم بالغ این پروتئین شامل ۱۱۲ اسید آمینه از انتهای C ترمینال توالی پیش ساز (فرم غیرفعال) آن است که یک پروتئین هومودایمر با وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون را ایجاد می‌کند. این پروتئین شامل ۹ اسید آمینه سیستمین می‌باشد که یکی از آنها، زیر واحدهای مونومر این پروتئین را به یکدیگر متصل می‌نماید (۳، ۱۱، ۱۲). به علت دخالت این پروتئین در فرآیندهای بیولوژیکی متفاوت و کاربرد کلینیکی آن در تست کردن روش‌های درمانی، تا کنون تلاش‌های زیادی برای تولید پروتئین نوترکیب $TGF \beta 1$ در سیستم‌های بیانی مختلف صورت گرفته است اما به دلیل پیچیده بودن ساختار این پروتئین و روش‌های خالص سازی آن، دست یافتن به مقادیر زیاد این پروتئین نوترکیب رضایت بخش نبوده است (۱۰، ۱۸، ۱۹). در دو دهه‌ی گذشته، استفاده از گیاهان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد توجه محققان قرار گرفته است. توانایی گیاهان در انجام تغییرات پس از ترجمه‌ی پروتئین، همانند N گلیکوزیلاسیون و تشکیل باندهای دی سولفیدی، تولید ارزان پروتئین نوترکیب در مقیاس بالا و کاهش خطر آلودگی پروتئین نوترکیب با پاتوژن‌های انسانی، آنها را به عنوان کارخانه‌ی مناسبی جهت تولید فاکتورهای رشد تبدیل نموده است (۱۸). در این مطالعه، توانایی گیاه *N. benthamiana* در بیان و پردازش پروتئین نوترکیب $TGF \beta 1$ از توالی رمز کننده فرم غیر فعال این پروتئین مورد بررسی قرار گرفت و نیز تأثیر بیان همزمان پروتئاز فورین در پردازش پروتئین $TGF \beta 1$ حفظ شده در شبکه آندوپلاسمی و پروتئین ترشح شده ارزیابی گردید.

مواد و روشها

طراحی و ساخت سازه‌های نوترکیب: به منظور بیان موقت پروتئین $TGF \beta 1$ در گیاه توتون، از توالی رمز

کننده‌ی فرم پیش ساز این پروتئین و ناقل بیان pTRAcK-ERH (Fraunhofer Institute, Germany) استفاده شد و سازه‌های نوترکیب DCF6، DCF7 و DCF17 مطابق زیر طراحی و ساخته شدند. همچنین سازه‌های نوترکیب DCI5 (حاوی توالی رمز کننده پروتئاز فورین) و CJG138 (حاوی ژن GFP) به شرح زیر ساخته شدند.

طراحی سازه‌ی نوترکیب DCF6 و ساخت سازه‌ی بیانی pTRAcK/ DCF6: جهت طراحی سازه‌ی DCF6، در ابتدا توالی سیگنال ترشحی (۲۹ اسید آمینه) از انتهای آمینی توالی رمز کننده‌ی فرم پیش ساز پروتئین $TGF \beta 1$ (NM_000660.5, NP_000651.3) حذف شد. سپس توالی باقیمانده ($TGF \beta 1$ -LAP)، در پایین دست سیگنال LPH موجود در ناقل بیان pTRAcK-ERH که خود در هدایت پروتئین نوترکیب به سمت شبکه آندوپلاسمی در مسیر ترشحی داخل سلول، نقش مهمی را ایفاء می‌کند قرار داده شد. برای قرارگیری پروتئین $TGF \beta 1$ در شبکه آندوپلاسمی، از توالی سیگنال SEKDEL در انتهای کربوکسیل سازه‌ی نوترکیب DCF6، استفاده شد. همچنین به منظور شناسایی پروتئین نوترکیب بیان شده، توالی tag His در انتهای آمینی توالی رمز کننده‌ی فرم پیش ساز پروتئین $TGF \beta 1$ ، قرار داده شد (شکل ۱). تکثیر قطعه‌ی ۱۱۷۰ جفت بازی سازه‌ی DCF6، با استفاده از آغازگر رفت $DCF6^R$ و برگشت $DCF6^{R2}$ و انجام شد. در واکنش PCR، از یک سازه‌ی نوترکیب حاوی توالی‌های رمز کننده‌ی فرم پیش ساز پروتئین $TGF \beta 1$ و tag His به عنوان الگو استفاده گردید. سپس محصول PCR برش داده شده با آنزیم *DpnI*، با روش SLIC (Sequence and ligation independent cloning) به درون ناقل بیان pTRAcK-ERH (هضم شده با آنزیم‌های *XhoI* و *NcoI*) همسانه سازی شد.

طراحی سازه‌ی نوترکیب DCF7 و ساخت سازه‌ی بیانی pTRAcK/ DCF7: سازه‌ی نوترکیب DCF7 مشابه سازه‌ی

DCF6 طراحی شد، با این تفاوت که در سازهی DCF7، توالی SEKDEL از انتهای کربوکسیل سازهی مورد نظر حذف گردید (شکل ۱). به منظور ساخت سازهی pTRAcK/ DCF7، قطعهی ۱۱۵۲ جفت بازی سازهی DCF7 با استفاده از آغازگرهای DCF6^F و DCF7^R (جدول ۱) تکثیر گردید و پس از هضم با آنزیم *DpnI*، با روش SLIC به درون ناقل بیان pTRAcK-ERH (هضم شده با آنزیمهای *XhoI* و *NcoI*) همسانه سازی شد.

طراحی سازهی نو ترکیب DCI5 و ساخت سازهی بیانی pTRAcK/ DCI5
به منظور طراحی سازهی نو ترکیب DCI5، در ابتدا توالی سیگنال پپتید (۲۴ اسید آمینه) از انتهای آمینی توالی رمز کنندهی پروتئاز فورین (۷۹۴ اسید آمینه، X17094.1) حذف شد و توالی باقیمانده در پایین دست سیگنال LPH موجود در ناقل بیان pTRAcK-ERH قرار داده شد. همچنین توالیهای His tag و SEKDEL به ترتیب در پایین دست توالی رمز کننده پروتئاز فورین قرار گرفتند (شکل ۱). جهت ساخت سازهی pTRAcK/ DCI5، در ابتدا قطعهی ۲۳۳۵ جفت بازی DCI5، با استفاده از آغازگر رفت DCI5^F و آغازگر برگشت DCI5^R (جدول ۱) تکثیر گردید (از پلاسمید حاوی توالی رمز کنندهی پروتئاز فورین، خریداری شده از کمپانی addgene، به عنوان الگو در انجام واکنش PCR استفاده شد). سپس قطعهی تکثیر شده به درون سایت *NcoI* و *NotI* ناقل pTRAcK-ERH همسانه سازی گردید.

طراحی سازهی نو ترکیب DCF17 و ساخت سازهی بیانی pTRAcK/ DCF17
در طراحی این سازه، توالی رمز کنندهی فرم پیش ساز پروتئین TGF β1 در پایین دست توالی رمز کنندهی پروتئاز فورین، قرار داده شد و یک سایت قابل شناسایی فورین (Furin recognition site) (R-H-R-R)، در محل اتصال این دو توالی تعبیه شد. لازم به ذکر است، توالی سیگنال پروتئاز فورین در این سازه حذف شد و توالی رمز کنندهی پروتئاز فورین

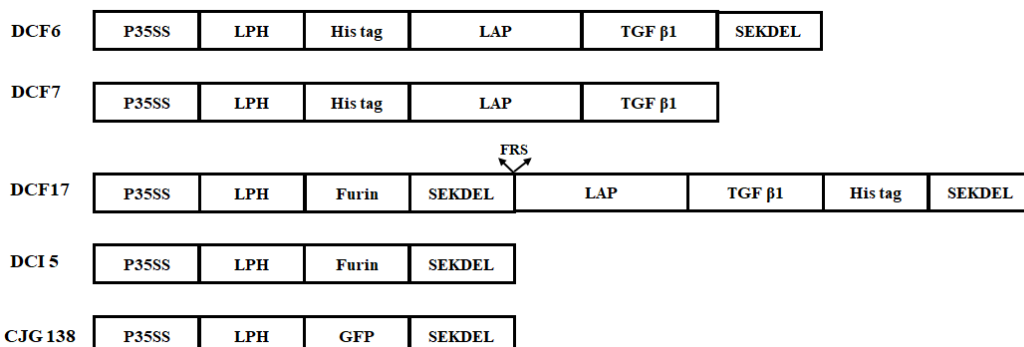
در پایین دست سیگنال LPH قرار داده شد. به منظور نگهداری پروتئین TGF β1 و پروتئاز فورین در شبکه آندوپلاسمی، دو توالی سیگنال SEKDEL به ترتیب در انتهای کربوکسیل توالی رمز کنندهی فورین و انتهای کربوکسیل سازهی نو ترکیب DCF17 و قبل از توالی His tag قرار داده شد (شکل ۱). به منظور ساخت سازهی pTRAcK/ DCF17، در ابتدا قطعهی ۱۱۷۸ جفت بازی از انتهای کربوکسیل سازه DCF17 (بجز توالی فورین)، با استفاده از آغازگرهای رفت DCF17^{F1} و DCF17^{F2} و آغازگر برگشت DCF17^R (جدول ۱) تکثیر شد و پس از هضم با آنزیم *DpnI*، با روش SLIC به درون ناقل بیان نو ترکیب pTRAcK/ DCI5 (هضم شده با آنزیم *NotI*) همسانه سازی گردید.

طراحی سازهی نو ترکیب CJG138 و ساخت سازهی بیانی pTRAcK/ CJG138
در این سازه توالی رمز کنندهی ژن GFP در پایین دست سیگنال LPH و بالا دست توالی SEKDEL قرار داده شد (شکل ۱). برای ساخت سازهی بیانی pTRAcK/ CJG138، قطعهی ۷۸۷ جفت بازی سازه CJG138، با استفاده از آغازگر فوردارد CJG138^F و آغازگرهای برگشت CJG138^{R1} و CJG138^{R2} (جدول ۱) تکثیر گردید و پس از هضم با آنزیم *DpnI*، با روش SLIC به درون ناقل pTRAcK-ERH (هضم شده با آنزیمهای *XhoI* و *NcoI*) همسانه سازی شد.

در نهایت پلاسمیدهای نو ترکیب حاصل، با روش شوک حرارتی به درون سلولهای مستعد *E. Coli* (NEB Turbo) ترانسفورم شدند و کلونهای صحیح (حاوی سازههای مورد نظر) با روش تعیین ترادف تأیید گردیدند.

ترانسفورماسیون گیاهان توتون با آگروباکتریوم حاوی سازههای نو ترکیب: سازههای نو ترکیب تأیید شده، به طور جداگانه به درون دو سویهی GV3101 و GV3101 (pMP90RK) آگروباکتریوم ترانسفورم شدند و پس از تهیه سوسپانسیون باکتری، برای مایه زنی گیاه *N. benthamiana*

با روش آگرواینفیلتریشن، استفاده گردیدند (۱). نمونه برداری از گیاهان مایه زنی شده ۳، ۵ و ۷ روز پس از آگرواینفیلتریشن انجام شد. استخراج پروتئین، بلافاصله بعد از برداشت نمونه‌های برگ انجام شد.



شکل ۱- شکل شماتیک سازه‌های بیانی.

جدول ۱- نام و خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمرز

Primers	Annealing Temperature (°C)	Size (nt)	Constructs	Sequences from 5' to 3'
DCF6 ^F	62	50	DCF6	GGCACTGCAGGTGTTCACTCCACCATCACCACCATCACC ATCAC ² CTGAG
DCF6 ^{R1}	62	46	DCF6	CTAGAGCTCATCTTTCTCA ¹ GAAGAGCACTTGCAGCTCCGC ACGATC
DCF6 ^{R2}	62	53	DCF6	TCTAGAGGATCCGAGCTCGAGCTAGAGCTCATCTTTCTCA ¹ GAAGAGCACTTGC
DCF7 ^R	62	49	DCF7	TCTAGAGGATCCGAGCTCGAGCTAAGAGCACTTGCAGCTC CGCACGATC
DCI5 ^F	62	43	DCI5	GCTCACATGTCACAGGGCCAGAAGGTCTTACCAACACGT GGG
DCI5 ^R	62	45	DCI5	AAGTCGCGGCCGCGAGGGCGCTCTGGTCTTTGATAAAGGC GGTCC
DCF17 ^{F1}	62	76	DCF17	CTCGCGGCCGCTTCAGAAAAGGACGAATTG ¹ CGGCACAGA AGG ³ CTGAGCACAAGCAAGACCATCGACATGGAACCTGG
DCF17 ^{F2}	62	37	DCF17	GACCAGAGCGCCCTCGCGGCCGCTTCAGAAAAGGACG
DCF17 ^R	62	52	DCF17	TGGTGATGGTGATGAGCGGCCGCGGATCCACGCGGAACCA GAGAGCACTTGC
CJG138 ^F	62	51	CJG138	GGCACTGCAGGTGTTCACTCCATGGCTATGGTGTTCAAAG GCGAAGAATCG
CJG138 ^{R1}	62	57	CJG138	CTAGAGCTCATCTTTCTCAGA ¹ TTTGTACAGTTCATCCATGC CCAGGGTAATACCAGC
CJG138 ^{R2}	62	42	CJG138	CTC TAG AGG ATC CGA GCT CGA GCT AGA GCT CAT CTT TCT CAG

در جدول ۱، توالی SEKDEL با شماره ۱، توالی His tag با شماره ۲ و سایت قابل شناسایی فورین (FRS) با شماره ۳ مشخص شده است.

مانند dsRNA ها و siRNA ها، از شروع فرآیند خاموشی جلوگیری می‌کند (۱۷). پس از تهیه سوسپانسیون باکتری، این آگروباکتریوم به نسبت مساوی ۱:۱ یا ۱:۱، با سویه‌های آگروباکتریوم حاوی سازه‌های نو ترکیب مخلوط گردید و به گیاهان توتون مایه‌زنی شد.

در فاصله‌ی زمانی برداشت تا انجام استخراج پروتئین، نمونه‌های برگ بر روی یخ قرار داده شدند. این آزمایش در دو تکرار انجام شد و از آگروباکتریوم حاوی ژن رمزکننده‌ی بازدارنده خاموشی p19، برای جلوگیری از فرآیند خاموشی ژن پس از نسخه برداری (PTGS) (Post transcriptional gene silencing) استفاده گردید. پروتئین مهارکننده‌ی خاموشی p19، با مهار آغازکننده‌های PTGS

استخراج پروتئین نوترکیب از برگ گیاهان مایه زنی شده: در ابتدا ۱ تا ۱/۲ گرم از بافت برگ نمونه های جمع آوری شده در ازت مایع پودر گردید و با ۲-۳ میلی لیتر بافر استخراج (NaCl 8 g/L, KCL 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.44 g/L, KH₂PO₄ 0.24 g/L, pH 7.4.) مخلوط شد. عصاره ی گیاه از یک توری عبور داده شد و سوسپانسیون حاصل با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ °C، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. عصاره ی خام استخراج شده از گیاه، حاوی پروتئین محلول کل (Total soluble proteins) بود که در آزمایشات بعدی به منظور بررسی بیان پروتئین نوترکیب استفاده شد.

آنالیز بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از تکنیک وسترن بلات:

پس از انجام الکتروفورز، باندهای پروتئین از ژل به غشاء PVDF منتقل شدند و بررسی بیان پروتئین نوترکیب TGF β1 با استفاده از آنتی بادیهای Anti-His6-Peroxidase و Polyclonal rabbit anti-TGFβ1 antibody (Roche) انجام شد. همچنین از آنتی بادی anti-GFP (Santa Cruz) برای آنالیز بیان پروتئین GFP استفاده گردید. در نهایت، پروتئین های مورد نظر به صورت باندهای آبی رنگ (حاصل از فعالیت HRP متصل به آنتی بادی، در حضور سوبسترای TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)) بر روی غشاء PVDF، ظاهر شدند.

بررسی بیان پروتئین GFP با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال:

سه روز پس از مایه زنی گیاه توتون با آگروباکتریوم حاوی pTRAcK/ CJG138، قطعه ی برگي کوچکی از برگ های آگرواینفیلتریت شده جدا گردید و بیان پروتئین GFP در برگ، با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال بررسی گردید.

نتایج

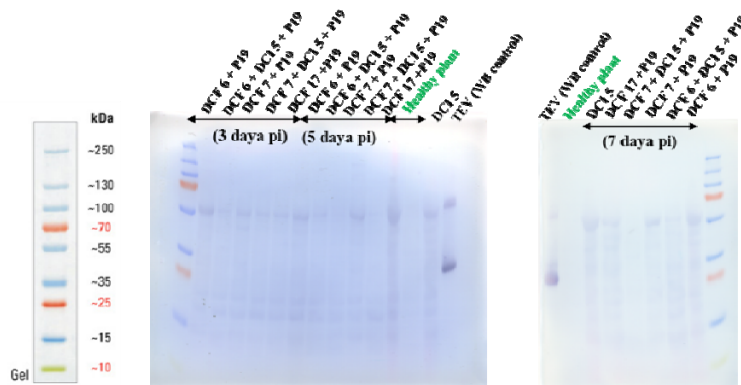
بررسی بیان پروتئین نوترکیب TGF β1 در گیاهان مایه

زنی شده با سویه ی GV3101 حاوی سازه های نوترکیب:

به منظور بررسی توانایی گیاه توتون (*N. benthamiana*) در بیان پروتئین TGF β1 و پردازش این پروتئین از توالی رمز کننده ی فرم پیش ساز آن، سازه های بیان pTRAcK/ DCF6 و pTRAcK/ DCF7 به طور جداگانه، به درون سویه ی GV3101 آگروباکتریوم ترانسفورم شدند. سپس به همراه آگروباکتریوم حاوی ژن رمز کننده ی بازدارنده خاموشی p19، به درون برگ های گیاه توتون مایه زنی گردیدند. بیان پروتئین مورد نظر، ۳، ۵ و ۷ روز پس از مایه زنی به وسیله ی وسترن بلات ارزیابی گردید. نتایج وسترن بلات با دو آنتی بادی Anti-His (شکل ۲) و anti-TGF β1 (نتایج نشان داده نشده است) از پروتئین استخراج شده از برگ های مایه زنی شده، به ظاهر نشان داد که این سازه ها قادر به بیان پروتئین TGF β1 در گیاه توتون نمی باشند (باندهای پروتئینی ضعیف مشاهده شده در شکل ۲، مربوط به پروتئین مورد نظر نیست). همچنین نتایج حاصل از آلودگی همزمان گیاه توتون با هر یک از سازه های مذکور به همراه سویه ی GV3101 حاوی پروتئاز فورین نشان داد که پروتئاز فورین، تأثیری در بیان و پردازش پروتئین TGF β1 ندارد. نتایج مشابهی نیز از بیان سازه pTRAcK/ DCF17 در گیاهان مایه زنی شده با سویه ی GV3101 آگروباکتریوم حاصل گردید. با توجه به نتایج حاصل، دو فرضیه مطرح شد: (۱) سویه ی GV3101 آگروباکتریوم (حاوی ناقل های نوترکیب pTRAcK) قادر به ترانسفورماسیون کارآمد گیاه توتون نمی باشد (۲) ترانسفورماسیون گیاه توتون به خوبی انجام شده است اما سازه های نوترکیب، قادر به بیان پروتئین TGF β1، در گیاه توتون نیستند. از این رو، به منظور بررسی توانایی سویه ی GV3101 آگروباکتریوم در ترانسفورماسیون توتون، سازه بیانی pTRAcK/ CJG 138، حاوی ژن رمز کننده ی GFP، به درون این سویه منتقل گردید و به برگ توتون مایه زنی شد. اگرچه نتایج وسترن بلات، با استفاده از آنتی بادی anti-GFP، باند ضعیفی را در محدوده ی مورد نظر (۳۲ kDa) نشان داد.

احتمالاً سویه‌ی مذکور، قادر به ترانسفورماسیون کارآمد گیاه توتون نمی‌باشد.

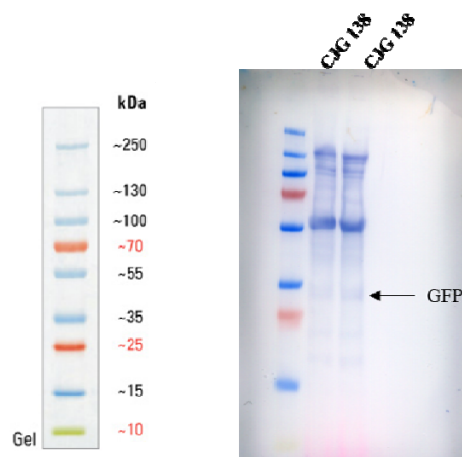
نشان داد (شکل ۳)، اما حضور پروتئین GFP در سلول‌های برگ، با میکروسکوپ فلورسنت قابل مشاهده نبود. در مجموع، بر اساس نتایج حاصل می‌توان اظهار داشت که



شکل ۲- نتایج حاصل از آنالیز وسترن بلات (آنتی‌بادی anti-His) از پروتئین استخراج شده از گیاهان مایه‌زنی شده با سویه GV3101 (حاوی سازه‌های نوترکیب) ۳، ۵ و ۷ روز پس از مایه‌زنی

GV3101 (pMP90RK). حاوی CJG 138 pTRAc/

(کنترل)، نشان داد که پروتئین GFP، ۳ روز پس از مایه‌زنی، در گیاه توتون بیان می‌شود (شکل ۴-۱). همچنین تصویر برداری کانفوکال از نمونه‌ی برگ گیاه مزبور، تجمع سطح بالای پروتئین GFP را در شبکه آندوپلاسمی نشان داد (شکل ۴-۲). قرار گیری پروتئین GFP در شبکه آندوپلاسمی، به دلیل حضور توالی SEKDEL در انتهای کربوکسیل توالی رمزکننده‌ی GFP می‌باشد. بیان موفق GFP در نمونه‌های مایه‌زنی شده با سویه‌ی نوترکیب GV3101 (pMP90RK)، نشان داد که این سویه‌ی آگروباکتریوم برای ترانسفورم کارآمد گیاه توتون با ناقل بیان pTRAc مناسب می‌باشد. از این رو سازه‌های pTRAc/ DCF7، pTRAc/ DCF6، pTRAc/ DCF17 و pTRAc/ DCF15 به درون سویه‌ی GV3101 (pMP90RK) ترانسفورم شدند و بیان پروتئین TGF β 1، ۳ روز پس از مایه‌زنی، در گیاهان مایه‌زنی شده با سازه‌های DCF6، DCF7، DCF15 + DCF7، DCF6 + DCF15 و DCF17 به وسیله‌ی وسترن بلات (آنتی‌بادی Anti-His) ارزیابی گردید. همانطور که در شکل ۵ دیده می‌شود، در نمونه حاصل از گیاهان مایه‌زنی شده با سازه DCF6، یک

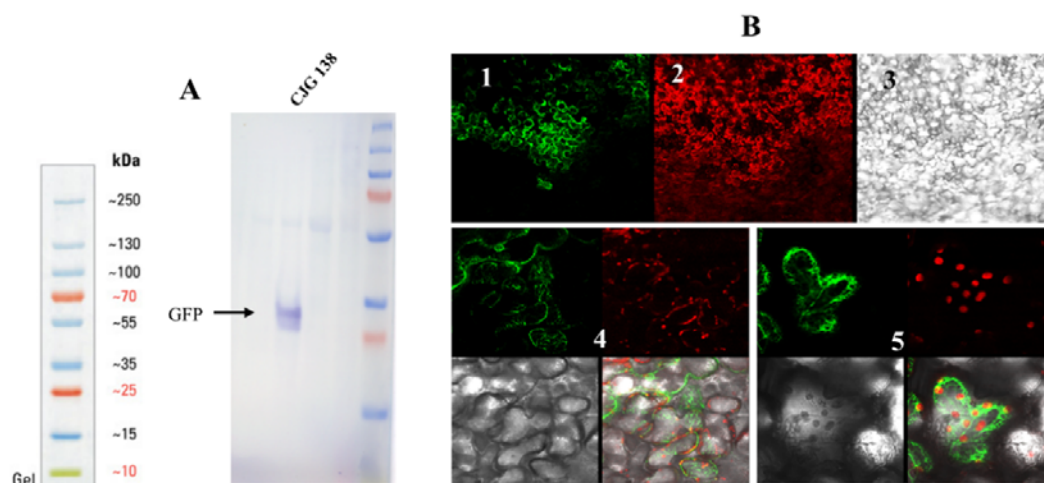


شکل ۳- نتایج حاصل از آنالیز وسترن بلات (آنتی‌بادی anti-GFP) از پروتئین استخراج شده از گیاهان مایه‌زنی شده با سویه GV3101 حاوی سازه‌ی بیانی CJG 138

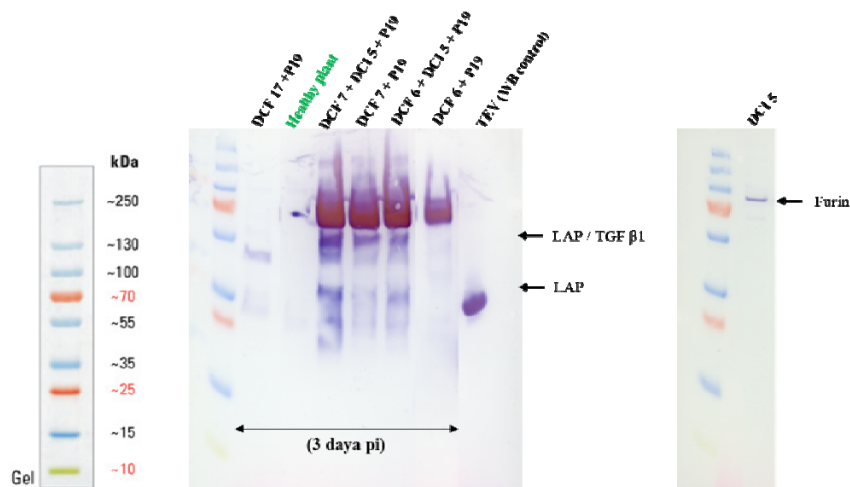
بررسی بیان پروتئین نوترکیب TGF β 1 در گیاهان مایه زنی شده با سویه‌ی GV3101 (pMP90RK) حاوی سازه‌های نوترکیب: در آزمایش دیگری، سازه‌های نوترکیب مذکور، به درون سویه‌ی GV3101 (pMP90RK) آگروباکتریوم منتقل شدند و برای مایه زنی گیاه توتون استفاده گردیدند. نتایج وسترن بلات حاصل از نمونه پروتئینی به دست آمده از گیاه مایه‌زنی شده با سویه‌ی

در نتایج وسترن بلات علاوه بر باند حدوداً ۷۰ کیلو دالتونی، دو باند در محدوده‌های ۵۵ و ۳۵ کیلو دالتون مشاهده گردید که به ترتیب مربوط به LAP/ TGF β 1 و LAP بود (شکل ۵). مشاهده این باندها نشان داد که احتمالاً بخشی از پروپیتید بیان شده، به درستی گلیکوزیله می‌شود و به درون شبکه ترانس-گلژی منتقل می‌شود، جاییکه تحت تاثیر پروتئاز فورین، LAP از TGF β 1 جدا گردیده است، اما همچنان با برهمکنش‌های غیرکووالانسی به یکدیگر متصل هستند. این در حالی است که نتایج حاصل از مایه‌زنی گیاهان با سازهی DCF7 به تنهایی، در مقایسه با سازهی DCF6، علاوه بر باند تقریباً ۷۰ کیلو دالتونی، باند ۵۵ کیلو دالتونی مربوط به پروپیتید TGF β 1 را نشان داد (شکل ۵). حضور باند ۵۵ کیلو دالتونی، در نتایج وسترن بلات نشان می‌دهد که به دلیل فقدان توالی سیگنال SEKDEL، در سازهی DCF7، مقدار بیشتری از پروپیتید بیان شده از این سازه، به درستی گلیکوزیله شده است و در مسیر ترشح وارد شبکه ترانس گلژی می‌شود، اما در آنجا به تنهایی قادر به پردازش و تولید فرم بالغ TGF β 1 نمی‌باشد.

باند در محدوده‌ی تقریباً ۷۰ کیلو دالتون مشاهده می‌شود. این باند احتمالاً مربوط به ساختار LAP/ TGF β 1 است که از فولدینگ صحیحی برخوردار نمی‌باشد. به طور کلی، انجام اصلاحات پس از ترجمه در ساختار LAP/ TGF β 1، یک فرآیند پیچیده است که در چندین مرحله کنترل می‌شود. ترشح دایمرهای فعال TGF β 1، در مرحله‌ی اول مستلزم دایمر شدن پروپیتید LAP/ TGF β 1 در شبکه آندوپلاسمی است (۹). همچنین این ساختار در سه اسید آمینه در موقعیت‌های ۸۲، ۱۳۶ و ۱۷۶ N گلیکوزیله می‌شود (۲، ۱۶). نگهداری این ساختار (نهفته) در شبکه آندوپلاسمی و دستگاه سیس-گلژی، سبب می‌شود که ترشح آن به درون شبکه ترانس-گلژی به آهستگی انجام شود و فقط پروتئین‌هایی به ترانس-گلژی ترشح شوند که به درستی گلیکوزیله شده‌اند (۵، ۱۴). بنابراین مشاهده باند تقریباً ۷۰ کیلو دالتونی، در گیاهان آلوده شده با سازهی DCF6، احتمالاً نشان دهنده‌ی پروپیتید LAP/ TGF β 1 است که به درستی گلیکوزیله نشده است و به دلیل حضور توالی SEKDEL در انتهای کربوکسیل این سازه به درون شبکه آندوپلاسمی برگشت داده شده است. زمانیکه سازهی DCF6 به همراه پروتئاز فورین به گیاه توتون مایه‌زنی شد،



شکل ۴- نتایج حاصل از آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی anti-GFP (A)، و تصویر برداری میکروسکوپ کانفوکال (B) از نمونه‌های برگ گیاه توتون مایه‌زنی شده با سویی (GV3101 (pMP90RK) حاوی سازهی نو ترکیب CJG 138) ۳ روز پس از مایه‌زنی. ۱: پروتئین GFP در شبکه آندوپلاسمی، ۲: اتوفلورسانس کلروفیل به رنگ قرمز، ۳: عکس برداری با نور سفید (Bright field)، ۴ و ۵: مشابه موارد ۱، ۲ و ۳، اما با بزرگنمایی بیشتر



شکل ۵: نتایج حاصل از آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی anti-His از نمونه‌های پروتئین استخراج شده از گیاهان مایه‌زنی شده با سویه GV3101::pMP90RK (حاوی سازه‌های نو ترکیب)، ۳ روز پس از مایه‌زنی.

مشاهده گردید (شکل ۵). به علاوه، به منظور بررسی امکان بیان همزمان پروپیتید LAP/ TGF β 1 و پروتئاز فورین از یک سازه‌ی نو ترکیب در گیاه توتون و نیز بررسی توانایی این سازه در پردازش فرم نهفته پروتئین TGF β 1، سازه‌ی pTRAcK/ DCF17 به درون آگروباکتریوم ترانسفورم شد و پروتئین استخراج شده از گیاهان مایه‌زنی شده، به وسیله‌ی وسترن بلات ارزیابی گردید. اما نتایج حاصل از بیان این سازه، رضایت بخش نبود (شکل ۵).

بحث

در میان سیستم‌های بیان یوکاریوتی، گیاهان به دلیل دارا بودن محیط سلولی مناسب برای انجام تغییرات پس از ترجمه و توانایی ایجاد فولدینگ صحیح در محصول پروتئینی، حائز اهمیت هستند. از میان ایزوفرم‌های مختلف پروتئین TGF β ، تا کنون، تنها بیان ایزوفورم TGF β 3 در کلروپلاست گیاه *N. tabacum* گزارش شده است. هرچند، پروتئین بیان شده در این سیستم، از فولدینگ صحیحی برخوردار نبوده است (۸). همچنین، همزمان با انجام تحقیق حاضر، Wilber و همکاران در سال ۲۰۱۶، بیان

در صورتیکه، آلودگی همزمان گیاه توتون با هر دو سازه‌ی بیان DCF7 و پروتئاز فورین، منجر به آزاد شدن فرم بالغ TGF β 1، از پروپیتید آن گردیده است که به صورت دو باند ۵۵ کیلو دالتون (LAP/ TGF β 1) و ۳۵ کیلو دالتون (LAP) در نتایج وسترن بلات مشاهده می‌شود (شکل ۵).

بررسی تأثیر پروتئاز فورین در پردازش فرم نهفته پروتئین TGF β 1: نتایج وسترن بلات، حاصل از آلودگی همزمان گیاهان توتون با سازه‌های حاوی فرم پیش ساز پروتئین TGF β 1 (DCF6 و DCF7) به همراه سازه‌ی DCI5 (حاوی توالی رمز کننده‌ی پروتئاز فورین)، در مقایسه با گیاهان آلوده شده در غیاب این پروتئاز، نشان داد که پردازش فرم نهفته TGF β 1 در گیاه توتون، تنها در صورت بیان پروتئاز فورین امکان پذیر می‌باشد. بنابراین، این نتایج نشان می‌دهند که فعالیت پروتئازی، شبیه به پروتئاز فورین در گیاه *N. benthamiana* وجود ندارد. لازم به ذکر است در این آزمایشات به منظور اطمینان از بیان پروتئاز فورین، یک گیاه توتون تنها با آگروباکتریوم حاوی سازه‌ی DCI5 مایه‌زنی شد و بیان این پروتئین با تکنیک وسترن بلات ارزیابی گردید. پروتئین بیان شده به صورت یک باند حدوداً ۹۸ کیلو دالتونی در نتایج وسترن بلات

پروتئین TGF β 1 فعال را از توالی رمز کننده‌ی فرم پیش ساز آن، در گیاه توتون گزارش نمودند (۱۸).

در تحقیق حاضر، توانایی گیاه *N. benthamiana* در بیان موقت پروتئین TGF β 1 با استفاده از ناقل بیان pTRAc-ERH مورد بررسی قرار گرفت و پردازش این پروتئین از توالی رمز کننده‌ی فرم پیش‌ساز آن، با مقایسه‌ی پروتئین تجمع یافته در شبکه آندوپلاسمی و پروتئین ترشح شده، در حضور و غیاب پروتئاز فورین ارزیابی گردید. نتایج حاصل نشان داد که فعالیت پروتئازی شبیه به پروتئاز فورین در گیاه *N. benthamiana* وجود ندارد. این نتایج مشابه نتایج Wilber و همکاران بود. آنها نشان دادند که برش پروتئولیتیکی، حاصل از فعالیت پروتئاز فورین، در این گیاه اتفاق نمی‌افتد (۱۸). مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که پروتئاز فورین انسانی، یک پروتئین غشایی است که در ابتدا به صورت یک فرم پیش‌ساز (۱۰۴ کیلو دالتون) سنتز می‌شود و سپس با شکاف پروپیتید، در نتیجه‌ی یک فرایند اتوکاتالیتیکی داخل مولکولی، در شبکه آندوپلاسمی به فرم بالغ (۹۸ کیلو دالتون) تبدیل می‌شود. ایجاد این شکاف در پروپیتید، برای خارج شدن فورین از شبکه آندوپلاسمی لازم است. اگرچه این شکاف برای فعال‌سازی فورین ضروری است اما کافی نیست و همچنان پروپیتید به فرم بالغ متصل است. جدا شدن پروپیتید از فرم فعال این پروتئین، با ایجاد شکاف دوم در محیط اسیدی شبکه ترانس گلژی صورت می‌گیرد و سبب رها شدن فرم فعال فورین می‌گردد. مشخص شده است که با نگه داشتن فورین در شبکه آندوپلاسمی به وسیله‌ی توالی KDEL، فورین قادر به ایجاد شکاف در پروپیتید سابسترین‌ها نمی‌باشد و احتمالاً تنها در شبکه ترانس گلژی دارای فعالیت می‌باشد (۱۳، ۱۵). با توجه به مطالب ذکر شده و نتایج به دست آمده، می‌توان اظهار داشت که مسیر پردازش فورین در گیاه مشابه انسان است و از آنجائیکه در انتهای کربوکسیل توالی رمز کننده‌ی فورین، در سازه‌ی DCI5، توالی SEKDEL قرار داده شده بود، کارایی پردازش

فورین بیان شده، کاهش یافته و تنها بخشی از آن که به شبکه ترانس گلژی وارد شده است، به درستی پردازش گردیده و قادر به شکاف LAP از TGF β 1 است. مقایسه‌ی نتایج حاصل از گیاهان آلوده شده با سازه‌های DCF6 + DCI5 و DCF7 + DCI5 نیز نشان داد که نگهداری پروتئین TGF β 1 -LAP در شبکه آندوپلاسمی سبب کاهش پردازش فرم پیش‌ساز پروتئین TGF β 1 می‌گردد. احتمالاً با حفظ فرم پیش‌ساز پروتئین در شبکه آندوپلاسمی، این پروتئین قادر نمی‌باشد به درون شبکه ترانس-گلژی، جائیکه پروتئاز فورین دارای فعالیت است، منتقل شود و تنها بخشی از پروتئین که وارد شبکه ترانس-گلژی شده است، به درستی پردازش می‌گردد.

در بخش دیگری از این تحقیق، توانایی بیان همزمان TGF β 1 / LAP و پروتئاز فورین از یک سازه‌ی نو ترکیب در گیاه توتون به وسیله‌ی ساخت سازه‌ی DCF17 بررسی گردید. اما به دلیل طراحی نادرست این سازه، نتایج حاصل از بیان آن رضایت بخش نبود. علاوه بر اینکه، توالی KDEL موجود در انتهای کربوکسیل توالی‌های فورین و فرم پیش‌ساز پروتئین TGF β 1، از پردازش صحیح پروتئاز فورین و پروتئین TGF β 1 در این سازه جلوگیری نموده است، مطالعات انجام شده روی ساختار پروتئاز فورین نشان داد که این پروتئاز یک پروتئین غشایی است که از طریق دمین‌های سیتوپلاسمیک (Cytoplasmic domain) و ترانس ممبرین (Transmembrane domain) به غشاء شبکه ترانس گلژی متصل شده و در آنجا قرار می‌گیرد و به فرم فعال پروتئاز تبدیل می‌شود. این دمین‌ها در انتهای کربوکسیل توالی رمز کننده‌ی پروتئاز فورین قرار دارند در حالیکه دمین کاتالیتیک (Catalytic domain) و سایت فعال‌سازی آن در انتهای آمینی قرار گرفته است (۱۳). بنابراین از آنجائیکه در سازه‌ی نو ترکیب ساخته شده، توالی رمز کننده‌ی فرم پیش‌ساز پروتئین TGF β 1 در انتهای کربوکسیل پروتئاز فورین قرار گرفته است، احتمالاً از دسترس دومین کاتالیتیک این پروتئاز، خارج بوده و پروتئاز

فناوری در قالب یک دوره تحقیقاتی کوتاه مدت در دانشگاه LMU مونیخ، آزمایشگاه دکتر Serena Schwenkert و شرکت Crelux انجام شد. ناقل بیان این پروژه از آزمایشگاه پروفیسور Rainer Fischer از موسسه تحقیقاتی Fraunhofer تهیه گردید. بدین وسیله از تمامی این عزیزان نهایت سپاس و قدردانی به عمل می آید.

فورین قادر به انجام فعالیت پروتئولیتیکی، در سایت قابل شناسایی نبوده و در نتیجه نتایج رضایت بخشی از بیان پروتئین TGF β 1 به وسیلهی این سازه در گیاه توتون حاصل نگردید.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی وزارت علوم، تحقیقات و

منابع

1. Boes, A., Reimann, A., Twyman, R. M., Fischer, R., Schillberg, S., Spiegel, H. (2016). A plant-based transient expression system for the rapid production of malaria vaccine candidates. *Vaccine Design: Methods and Protocols, Volume 2: Vaccines for Veterinary Diseases*: 597-619.
2. Brunner, A.M., Lioubin, M.N., Marquardt, H., Malacko, A.R., Wang, W.C., Shapiro, R.A., Neubauer, M., Cook, J., Madisen, L., Purchio, A.F. (1992). Site-directed mutagenesis of glycosylation sites in the transforming growth factor-beta 1 (TGF beta 1) and TGF beta 2 (414) precursors and of cysteine residues within mature TGF beta 1: effects on secretion and bioactivity. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 6(10): 1691-1700.
3. Cerletti, N. (2000). Process for the production biologically active dimeric protein. Google Patents.
4. Daopin, S., Piez, K.A., Ogawa, Y., Davies, D.R. (1992). Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science*, 257(5068): 369-373.
5. Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E., Leduc, R. (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *The Journal of biological chemistry*, 270(18): 10618-10624.
6. Elliott, R.L., Blobe, G.C. (2005). Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(9): 2078-2093.
7. Frank, S., Madlener, M., Werner, S. (1996). Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *The Journal of biological chemistry*, 271(17): 10188-10193.
8. Gisby, M.F., Mellors, P., Madesis, P., Ellin, M., Lavery, H., O'Kane, S., Ferguson, M.W., Day, A. (2011). A synthetic gene increases TGFbeta3 accumulation by 75-fold in tobacco chloroplasts enabling rapid purification and folding into a biologically active molecule. *Plant Biotechnology Journal*, 9(5): 618-628.
9. Gray, A.M., Mason, A.J. (1990). Requirement for activin A and transforming growth factor-PI pro-regions in homodimer assembly, *Science*, 247: 1328-1330.
10. Kim, Y.V., Gasparian, M.E., Bocharov, E.V., Chertkova, R.V., Tkach, E.N., Dolgikh, D.A., Kirpichnikov, M.P. (2015). New Strategy for High-Level Expression and Purification of Biologically Active Monomeric TGF- β 1/C77S in *Escherichia coli*. *Molecular biotechnology*, 57(2): 160-171.
11. Martelossi Cebinelli, G.C., Paiva Trugilo, K., Badaro Garcia, S., Brajao de Oliveira, K. (2016). TGF-beta1 functional polymorphisms: a review. *European cytokine network*, 27(4): 81-89.
12. Munger, J.S., Harpel, J.G., Gleizes, P.E., Mazzieri, R., Nunes, I., Rifkin, D.B. (1997). Latent transforming growth factor- β : structural features and mechanisms of activation. *Kidney international*, 51(5): 1376-1382.
13. Nakayama, K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *The Biochemical journal*, 327: 625-635.
14. Oida, T., Weiner, H.L. (2010). Overexpression of TGF-ss 1 gene induces cell surface localized glucose-regulated protein 78-associated latency-

- associated peptide/TGF-ss. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 185(6): 3529-3535.
15. Rehemtulla, A., Dorner, A.J., Kaufman, R.J. (1992). Regulation of PACE propeptide-processing activity: requirement for a post-endoplasmic reticulum compartment and autoproteolytic activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89: 8235-8239.
 16. Sha, X., Brunner, A.M., Purchio, A.F., Gentry, L.E. (1989). Transforming growth factor beta 1: importance of glycosylation and acidic proteases for processing and secretion. Molecular endocrinology (Baltimore, Md.), 3(7): 1090-1098.
 17. Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. Plant Journal, 33: 949-56.
 18. Wilbers, R.H., Westerhof, L.B., Raaij, D.R., Adrichem, M., Prakasa, A.D., Lozano-Torres, J.L., Bakker, J., Smant, G., Schots, A. (2016). Co-expression of the protease furin in *Nicotiana benthamiana* leads to efficient processing of latent transforming growth factor- β 1 into a biologically active protein. Plant biotechnology journal, 14(8): 1695-1704.
 19. Zou, Z., Sun, P.D. (2004). Overexpression of human transforming growth factor- β 1 using a recombinant CHO cell expression system. Protein expression and purification, 37(2): 265-272.

Expression of recombinant TGF β 1 protein in tobacco plant and investigation of the effect of Furin protease on processing of the latent form of this protein

Dept. of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences,
Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

Abstract

TGF β 1 is a multifunctional protein that is involved in several biological processes. This protein is initially synthesized as 390 amino acids biologically inactive latent precursor that prior to binding to the TGF β receptors; undergo proteolytic cleavage, to separate mature form of TGF- β 1 from its propeptide. The mature form of this protein comprise of the C-terminal 112 amino acids from its precursor. In this study, the potential of two *Agrobacterium* GV3101 and GV3101 (pMP90RK) strains were first investigated for the transformation of *Nicotiana benthamiana* with pTRAcK-ERH expression vector by creating the pTRAcK/CJG138 (including GFP) as a control construct. The results were analyzed by western blot technique and confocal imaging. Then, in order to transient expression of TGF β 1 from its precursor sequence in the tobacco plant, recombinant pTRAcK/ DCF6 and pTRAcK/ DCF7 constructs (containing endoplasmic reticulum retention signal (SEKEDL) and the lacking of this sequence, respectively) were designed and generated. Tobacco plants agro-infiltrated with these constructs alone or in combination with another recombinant construct; harbouring the coding sequence for Furin protease. Results showed that the both of these constructs were successfully expressed in tobacco plants. However, more efficient processing of TGF β 1 precursor in infiltrated plants with pTRAcK/ DCF7 construct show that the accumulation of TGF β 1 precursor in endoplasmic reticulum prevent to its processing. In addition, in this research was revealed that a Furin-like cleavage between the mature TGF β 1 and its propeptide does not occur in *N. benthamiana*.

Key words: Furin protease, TGF β 1 recombinant protein, TGF β 1 latent processing, tobacco plant