

بررسی الگوهای بیان High temperature requirement A2 (HtrA2) در رده‌ها و



بافت‌های سلولی مختلف و تولید آن در میزبان پروکاریوتی

سمیرا شاطریان^۱، سعید نژاوند^{۱*}، علی مطاع^۲ و محمد پاژنگ^۱

^۱ ایران، تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، تبریز، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی و آزمایشگاه‌های بالینی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۳

چکیده

HtrA2 سرین پروتئاز میتوکندریایی است که تقریباً در همه بافت‌ها بیان می‌شود و تحت شرایط استرسی این پروتئاز به یک فاکتور پروآپوپتوزی تبدیل می‌شود و در القای آپوپتوز شرکت می‌کند. این پروتئین احتمالاً دارای فعالیت چایرونی نیز بوده و در تاخوردن مناسب پروتئین‌ها نقش دارد. با توجه به اهمیت آنزیم HtrA2 در القای آپوپتوز و ارتباط آن با برخی بیماری‌ها، الگوی بیان پروتئین HtrA2 در رده‌های سلولی طبیعی و برخی رده‌های بیماری بررسی شد. نتایج PCR نشان داد که ژن HtrA2 در سلول‌های طبیعی معده بیان می‌شود ولی در سلول‌های سرطانی معده بیان نمی‌شود. هم‌چنین در سلول‌های سرطانی ریه و سلول‌های آدنوکارسینومای کولون انسان (رده سلولی SW480) نیز بیان دیده شد. با توجه به بیان متفاوت ژن HtrA2 در رده‌های سلولی طبیعی و بیماری، الگوی مشخصی که نشان‌دهنده ارتباط بیان این پروتئاز با بیماری باشد مشاهده نگردید. در مرحله بعد با توجه به اهمیت HtrA2، قطعه cDNA مربوط به آنزیم HtrA2 درون حامل pET21a(+) کلون و حامل‌نوترکیب به سلول‌های مستعد E.coli سویه TOP10 منتقل شدند. در نهایت بیان پروتئین توسط SDS-PAGE آنالیز شد. سپس پروتئین تولید شده توسط ستون نیکل-آگارز خالص‌سازی شد و فعالیت پروتئازی آن توسط سوبسترای کازئین و با روش اسپکتروفتومتری سنجیده شد. نتایج نشان داد که آنزیم تولید شده فعال است و بنابراین HtrA2 تولید شده ساختار طبیعی داشته و می‌توان از آن در جهت تحقیقات بعدی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: HtrA2، آپوپتوز، کازئین، SDS-PAGE، بیان، فعالیت پروتئازی

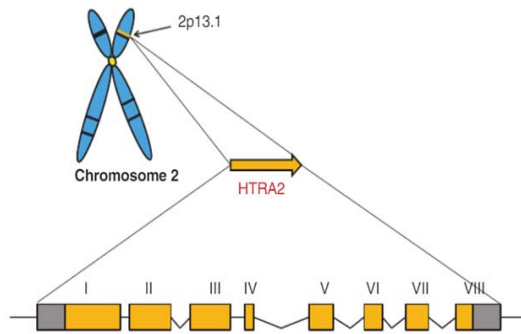
* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۷۱۲۳۵۶۰، پست الکترونیکی: saeed.najavand@gmail.com, S.najavand@azaruniv.ac.ir

مقدمه

مناسب سلول، حفظ هموستازی بافت و تنظیم پاسخ‌های ایمنی نیاز می‌باشند (۱). شکل اصلی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول آپوپتوز است که در آن سلول دچار یک سری تغییرات مولکولی، بیوشیمیایی و ریخت‌شناختی (morphological) می‌شود (۲۸). سلول‌ها شامل مخلوطی از پروتئین‌های پروآپوپتوزی و ضدآپوپتوزی هستند. زمانی که تعادل بین این پروتئین‌ها تغییر کند، سلول آماده ورود به آپوپتوز می‌شود. تحریک مولکول‌های پروآپوپتوزی و یا

هموستازی عبارت از وضعیت ثابت و پایدار در سلول می‌باشد. برخی عوامل که بعضاً هم‌قابل تشخیص نیستند، می‌توانند هموستازی را به هم زده و موجب تغییر در ثبات و پایداری سلول گردند. برخی از تغییرات و صدمات سلولی قابل برگشت بوده و برخی دیگر موجب مرگ سلولی می‌گردند (۱۲). مسیرهای سلولی شامل انیوکیز (Anoikis)، آپوپتوز (Apoptosis) (نیازمند انرژی) و نکروز (Necrosis) (بدون نیاز به انرژی) است که برای عملکرد

تنظیمی و نشانگر (signal) باشد. دمین پروتئازی از نوع کیموتریپسین می‌باشد (۲۴). HtrA₂ بهترین عضو شناخته شده از خانواده HtrA است که تحت شرایط فیزیولوژیک در حفظ هموستازی میتوکندری شرکت می‌کند. در شرایط پاسخ به آسیب‌های سلولی ناشی از استرس، فعالیت حفاظتی آن به فعالیت پروآپتوزی تبدیل می‌شود. ژن HtrA₂ انسانی بر روی بازوی بلند کروموزم ۲ (2p 13.1) واقع شده است (شکل ۱) (۲۷). این ژن ۸ آگزون دارد و پلی پپتیدی با ۴۵۸ اسیدآمینو را کد می‌کند. جرم مولکولی HtrA₂ ۵۰ کیلو دالتون است و توسط ریبوزوم‌های سیتوزولی بیان می‌شود (۳، ۱۹ و ۳۰).

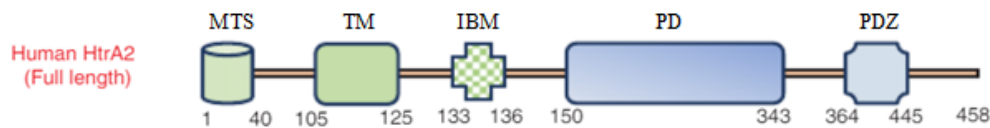


شکل ۱- جایگاه قرارگیری ژن HtrA₂ در کروموزم ۲ (۲۷)

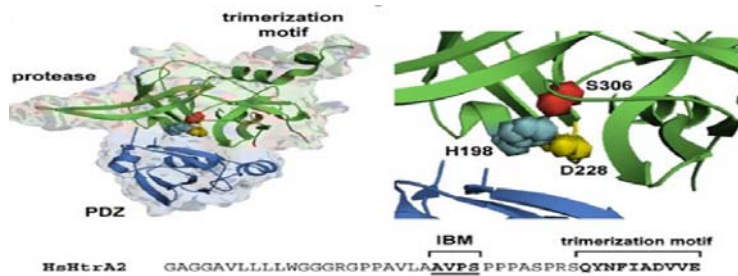
پروتئین HtrA₂ با طول کامل در انتهای آمین خود، یک توالی هدف دهی به میتوکندری Mitochondria Targeting Sequence (MTS) را دارد که منجر به قرارگیری پروتئین در میتوکندری می‌شود. یک دمین درون غشایی intermembrane (TM) و یک موتیف Ala-Val-Pro-Ser (AVPS) متصل به پروتئین اتصال IAP Binding IAP Protein (IBM) دارد. دمین کاتالیزی حفاظت شده سرین پروتئازی به صورت سرین ۳۰۶، آسپاراتات ۲۲۸، هیستیدین ۱۹۸ (His 198, Asp 228, Ser 306) می‌باشد که دمین پروتئولیتیک (PD) نام دارد (شکل ۲) با حذف پروتئولیتیک ناحیه انتهای آمین، HtrA₂ به فرم بالغ تبدیل می‌شود (۳۶).

مهار فاکتورهای ضدآپتوزی بستگی به نوع سلول و محرک دارد. دو مسیر اصلی آپتوز، مسیر خارجی، مسیر وابسته به گیرنده‌های مرگ و مسیر داخلی، مسیر میتوکندریایی می‌باشد (۲۹). در مسیر میتوکندریایی، تحریک روند آپتوز با آزاد شدن Second Mitochondria-derived Activator of Caspases and Direct IAP-Binding protein with Low PI high temperature (SMAC/DIABLO) و سرین پروتئاز requirement A2 (HtrA₂) از میتوکندری صورت می‌گیرد. نقش این فاکتورها خنثی کردن اعمال مهارکننده‌های آپتوز از قبیل X-Linked Inhibitor Of Apoptosis (XIAP)، CIAP1 و CIAP2 می‌باشد (۲۷ و ۲۸). HtrA پروتئازها هم در یوکاریوت‌ها و هم در پروکاریوت‌ها حضور دارند. این پروتئازها اولین بار در باکتری‌ها به عنوان پروتئین پری‌پلاسمیک کشف شدند. مدل غشایی از این خانواده degradation of periplasmic proteins protease (Deg P) (باکتریایی است که در باکتری اشرشیاکلیشناسایی شد و نشان داده شد که سرین پروتئازی القا شده با شوک حرارتی بوده و به همراه فعالیت چاپرونی برای بقای باکتری در دماهای بالاتر ضروری است (۲۴). این پروتئاز، پروتئین‌های تانخورده، بدتاخورده یا غیرطبیعی را تجزیه کرده و می‌تواند به عنوان چاپرونی جهت حفاظت ساختار پروتئین عمل کند. در بسیاری از گونه‌های باکتریایی بیماری‌زا، فقدان عملکرد HtrA به کاهش بیماری‌زایی آن‌ها منجر می‌شود که به دلیل افزایش آسیب پذیری باکتری‌ها نسبت به استرس یا کاهش در ترشح فاکتورهای بیماری‌زا می‌باشد. بنابراین پروتئاز HtrA باکتری‌های بیماری‌زا، هدف خوبی برای اهداف درمانی است. در انسان چهار همولوژی از پروتئاز HtrA شناسایی شده است و مشخص شده که در فیزیولوژی سلول نقش مهمی دارند و شامل HtrA₁، HtrA_{2/omi}، HtrA₃ و HtrA₄ می‌باشند (۲۴ و ۳۱). خانواده HtrA از طریق دمین PDZ انتهای کربوکسیل، از سایر سرین پروتئازها قابل تشخیص است. دمین انتهای آمین این خانواده متغیر است و می‌تواند شامل توالی‌های

فرم فعال HtrA₂ ۳۶ kDa وزن مولکولی دارد. ساختار تریمر این پروتئین وزن مولکولی معادل ۱۱۰kDa دارد که دارای ساختار هرمی شکل می‌باشد. (شکل ۳) (۲۳ و ۳۶).



شکل ۲- دمین‌های ساختاری در پروتئاز HtrA2



شکل ۳- ساختار دمین PDZ و موتیف تریمریزاسیون

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی انواع سلول‌ها و بافت‌های انسانی سالم و بیمار، به منظور بررسی الگوی بیان این پروتئین صورت گرفت. در مرحله بعد، همسانه‌سازی و بیان ژن HtrA2 در میزبان اشرشیاکلی (*E. coli*) به منظور تخمین وزن مولکولی و تعیین فعالیت پروتئازی آن صورت پذیرفت. مطالعات مربوط به ساختار پروتئین و نیز مطالعات مربوط به خصوصیات چاپرونی احتمالی این پروتئین هم‌اکنون در حال انجام است.

مواد و روشها

تکنیک قطعه ژنی HtrA2 از منابع سلولی مختلف: طبق مطالعات انجام شده، منابع زیادی به نقش این پروتئین در بیماری‌های عصبی، هانتینگتون، آلزایمر و سرطان‌ها پرداخته‌اند (۱۸ و ۲۰). از طرفی، به دلیل اینکه منابع کمتری به نقش این پروتئین در سرطانی‌هایی مثل سرطان ریه و معده پرداخته‌اند و همچنین به دلیل در دسترس بودن و سهولت تهیه سلول‌های سرطانی معده و ریه باعث شد به عنوان نمونه‌هایی برای تحقیق و بررسی نقش و عملکرد این پروتئین انتخاب شوند. در این مطالعه، بافت‌های طبیعی و سرطانی معده و ریه و سلول‌های آدنوکارسینوما کولون

HtrA2 پروتئینی هست که در هموستازی میتوکندری و در نتیجه حفظ بقای سلول نقش دارد. HtrA2 با مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در ارتباط می‌باشد. توسط فعالیت کاسپازها در آپوپتوز و توسط مکانیسم ناشناخته غیر وابسته به کاسپاز در مرگ سلولی شرکت می‌کند. این پروتئین در انیوکیز و مرگ سلولی نکروز نیز دخیل است. این احتمال وجود دارد که این پروتئین دارای فعالیت چاپرونی نیز باشد و در تاخوردن پروتئین‌ها شرکت نماید. عدم عملکرد در مسیر مرگ سلولی منجر به حذف معیوب سلول‌های آسیب دیده شده و می‌تواند به عنوان منشا تغییرات نئوپلاستیک عمل کند (۲۴)، به طوری که تغییر بیان HtrA2 در بسیاری از بیماری‌ها نظیر سرطان، آلزایمر، هانتینگتون، ارتريت دیده شده است. به دلیل نقش HtrA2 در القای آپوپتوز، این پروتئین می‌تواند به عنوان هدف دارویی برای درمان برخی بیماری‌ها و از بین بردن سلول‌های سرطانی مورد توجه قرار گیرد (۱۸، ۲۰، ۲۲ و ۳۱). با توجه به اهمیت پروتئین HtrA2 در مسیر آپوپتوز و ارتباط داشتن آن با برخی از بیماری‌ها از جمله سرطان، مطالعه این پروتئین در سطوح مختلف امری ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه پس از طراحی و تهیه پرایمرهای اختصاصی HtrA2، ابتدا

روی cDNA های سنتز شده از منابع سلولی مختلف استفاده گردید.

همسانه سازی قطعه ژنی HtrA2 در ناقل بیانی pET21a(+): ناقل (vector) Pmd-HtrA2 حاوی قطعه ژنی HtrA2 از شرکت سینوبیولوژیکال (Sino Biological) تهیه گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از جفت آغازگر مختص همسانه‌سازی با برنامه دمایی ذکر شده بر روی حامل Pmd-HtrA2 به عنوان الگو انجام پذیرفت. توالی و مشخصات جفت آغازگر اختصاصی قطعه ژنی و جفت آغازگر اختصاصی همسانه‌سازی همراه با اندازه محصول PCR در جدول (۱) آمده است.

جدول ۱- توالی و مشخصات مربوط به آغازگرهای اختصاصی قطعه ژنی و آغازگرهای مختص همسانه‌سازی (جایگاه برش آنزیم ها در جدول مشخص شده است)

آغازگرها و توالی های مربوط به آنها		تعداد جفت باز	اندازه محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز
جفت آغازگر اختصاصی همسانه‌سازی	آغازگر رفتی GGAATTCATATGCGCCGCTCCCTAGC ↑ NdeI	۲۸	۹۷۵ جفت باز
	آغازگر برگشتی CCGCTCGAGTTCTGTAACCTCAGGGGTCAC ↑ XhoI	۳۰	
جفت آغازگر اختصاصی قطعه ژنی	آغازگر رفتی ATGGCTGCTCCGAGGGCGGG	۲۰	۱۳۷۷ جفت باز
	آغازگر برگشتی CTATTCTGTCACCTCAGGGGTCAC	۲۴	

محصول واکنش الحاق با استفاده از روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد (competent cells) باکتری *E. coli* سوش TOP10 منتقل گردید. باکترهای ترانسفرم شده به پلیت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین منتقل و به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷°C قرار گرفت. برای تایید حضور ناقل‌های نوترکیب در کلونی‌های تکثیر یافته، ابتدا تعدادی از کلونی‌ها انتخاب شده و بر روی آن‌ها ژل کراکینگ انجام پذیرفت. در ژل کراکینگ، بافر کراکینگ (NaOH, SDS, EDTA) بافر تخریب کننده است که دیواره سلولی باکتری را لیز کرده و محتویات داخل سلول از جمله DNA ژنومی و پلاسمید از سلول آزاد می‌شوند. با الکتروفورز کردن این

انسان (رده سلولی SW480) که قبلاً توسط آزمایشگاه‌های بالینی گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه (از هر بافت تعداد ۵ نمونه) و مورد تایید نیز بودند آماده و cDNA مربوط به این سلول‌ها با استفاده از کیت استخراج RNA و سنتز cDNA شرکت Bioneer تهیه گردید. برای تکثیر قطعه ژنی HtrA2، دو جفت آغازگر رفت و برگشت مختص قطعه ژنی توسط نرم افزار generunner طراحی شد (جدول ۱) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز Polymerase chain reaction (PCR) با یک برنامه دمایی تنظیم شده و دمای اتصال ۶۰°C انجام گردید. از هر دو جفت آغازگر برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر

بعد از تکثیر قطعه ژنی کد کننده آنزیم HtrA2، قطعه مورد نظر توسط آنزیم‌های برشگر NdeI و XhoI تهیه شده از شرکت سیناکلون، به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۳۷°C برش یافت. در این مطالعه از حامل بیان پET21a(+) برای همسانه‌سازی قطعه ژنی HtrA2 استفاده گردید. پET21a(+) نیز با شرایط ذکر شده توسط دو آنزیم NdeI و XhoI در معرض هضم قرار گرفت. پس از تخلیص قطعه ژنی و ناقل هضم شده توسط کیت استخراج از ژل (شرکت Bionner)، واکنش الحاق (Ligation) توسط آنزیم T4 DNA Ligase صورت گرفت و واکنش الحاق به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴°C انجام پذیرفت. سپس

تریس حل شد و pH محلول بر روی ۷/۵ تنظیم گردید. به نمونه اصلی ۴۰۰ میکرولیتر از سوبسترا و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه ریخته شد و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور ۴۰ درجه قرار گرفتند. در این آزمایش کنترل منفی شامل ۴۰۰ میکرولیتر سوبسترا بود. بعد از ۶۰ دقیقه نمونه‌ها از انکوباتور خارج و به نمونه اصلی ۵۰۰ میکرولیتر بافر TCA به عنوان مهار کننده فعالیت آنزیم و به کنترل منفی ۵۰۰ میکرولیتر مهار کننده به همراه ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم اضافه گردید. در ادامه همه نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه به دمای 20°C - درجه منتقل شدند، سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و بعد از اتمام سانتریفیوژ، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر گرفته شد. بعد از خوانش جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر، جهت تبدیل جذب به مولاریته از منحنی استاندارد تیروزین استفاده شد و در نهایت فعالیت آنزیم HtrA2 محاسبه گردید (شکل ۱۰).

نتایج

نتایج حاصل از تکثیر قطعه ژنی HtrA2 مربوط به بافت‌ها و رده‌های سلولی مختلف: نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به قطعه ژنی HtrA2 که توسط هر دو جفت آغازگر طراحی شده برای ژن انجام شده است در شکل (۴) نشان داده شده است. حضور قطعه ۹۷۵ جفت بازی و ۱۳۷۷ جفت بازی نشان دهنده حضور و بیان ژن HtrA2 در رده یا بافت سلولی مربوطه می‌باشد (در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از cDNA رده یا بافت سلولی مربوطه به عنوان الگو استفاده شده است).

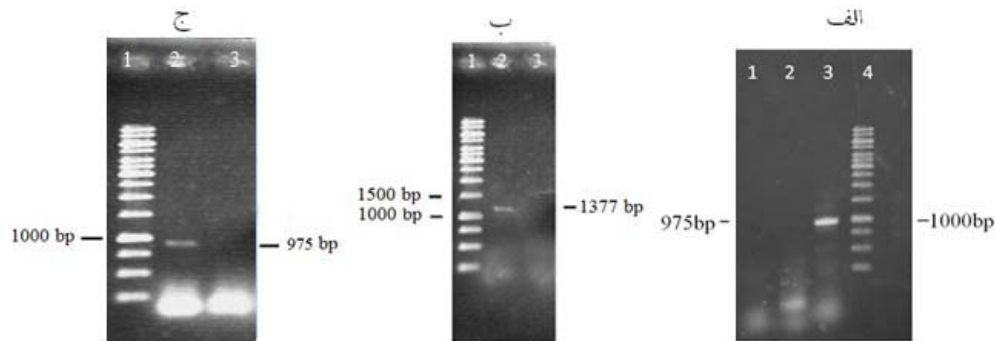
همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، ژن HtrA2 در سلول‌های طبیعی معده بیان شده ولی در سلول‌های سرطانی معده بیان نشده است. همچنین وجود قطعه ۱۳۷۷ جفت بازی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به سلول‌های سرطانی ریه نیز علتی بر بیان این ژن در سلول‌های سرطانی ریه می‌باشد. در رده سلولی SW480

عصاره سلولی می‌توان با توجه به اندازه باندهای ظاهر شده بر روی ژل آگارز، پلاسمیدهایی که احتمالاً دارای قطعه ژنی هستند را مشاهده نمود (۱۷). از کلونی‌های تایید شده توسط ژل کراکینگ برای انجام واکنش کلونی PCR استفاده گردید. در نهایت از کلونی‌های تایید شده در مرحله کلونی PCR استخراج پلاسمید صورت گرفت و حامل‌های نو ترکیب توسط آغازگرهای پروموتور T7 تعیین توالی شدند (شرکت Bionner).

بیان و تخلیص آنزیم HtrA2: در این مرحله، پس از انتقال باکتری‌های ترانسفورم (Transformed bacteria) شده به سلول‌های مستعد BL21(DE3) و ظاهر شدن کلونی‌ها در پلیت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، بر روی تعدادی از کلونی‌ها کشت اولیه انجام پذیرفت. برای بررسی تولید پروتئین نو ترکیب، نمونه‌ها با دو القاگر لاکتوز (۴ mM) و IPTG (۱ mM) القا شدند و در فواصل زمانی ۶، ۲۱ و ۳ ساعت و دمای 25°C و 30°C و 33°C ، بیان پروتئین HtrA2 مورد بررسی قرار گرفت. بعد از سانتریفیوژ به رسوبات حاصل هم حجم آن‌ها، بافر لیز اضافه گردید. پس از اضافه شدن بافر لیز، می‌توان پروتئین‌های محلول درون سلولی باکتری را از رسوب باکتریایی با عمل سونیکاسیون جدا نمود. سونیکاسیون در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه به تعداد ۵ بار، روی یخ صورت گرفت. نمونه‌های حاصل از سونیکاسیون، سانتریفیوژ و محلول رویی حاوی پروتئین HtrA2 جداسازی گردید. با توجه به وجود دنباله‌ی هیستیدینی در پروتئین بیان شده از ستون تمایلی نیکل آگارز برای تخلیص پروتئین بیان شده استفاده شد و نمونه‌های خالص شده در این مرحله از طریق SDS-PAGE و سنجش فعالیت آنزیم در مجاورت با سوبسترا آنالیز شدند (۱۰ و ۲۱).

تعیین فعالیت آنزیم: در این مرحله، سنجش فعالیت آنزیمی از نمونه تخلیص شده صورت گرفت به این صورت که ۰/۲ گرم سوبسترای کازئین در ۲۰ ml بافر

نیز حضور قطعه ۹۷۵ جفت بازی نشان دهنده بیان این ژن در سلول‌های آدنوکارسینومای کولون انسان می‌باشد.

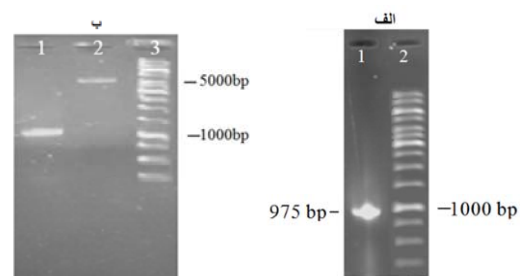


شکل ۴- نتیجه PCR از قطعه HtrA2/omi (الف) چاهک اول بلانک، چاهک دوم محصول PCR از cDNA بافت سرطانی معده، چاهک سوم محصول PCR مربوط به cDNA بافت طبیعی معده (اندازه قطعه حدود ۹۷۵ جفت باز می‌باشد) و چاهک چهارم اندازه نمای DNA (ب) چاهک اول اندازه نمای DNA چاهک دوم محصول PCR از بافت سرطانی ریه (۱۳۷۷ جفت باز) می‌باشد، چاهک سوم بلانک، (ج) چاهک اول اندازه نمای DNA، چاهک دوم PCR با cDNA مربوط به رده سلولی SW480 (۹۷۵ جفت باز)، چاهک سوم بلانک

پس از هضم آنزیمی قطعه ژنی و حامل توسط آنزیم‌های برشگر NdeI و XhoI، محصولات بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شدند و به منظور خالص سازی قطعه ژنی و حامل جهت بستن واکنش الحاق، محصولات هضم از ژل آگارز استخراج گردیدند. نتایج استخراج قطعه ژنی HtrA2 و حامل pET21a(+) هضم شده توسط آنزیم‌های برشگر از ژل آگارز در شکل ۵ ب نشان داده شده است.

بعد از انجام واکنش الحاق، محصول واکنش الحاق به سلول‌های مستعد اشرشیاکلی سویه Top10 انتقال یافته و پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C کلونی‌ها در پلیت نمایان شدند. پس از مشاهده کلونی‌ها، برای تأیید نو-ترکیب بودن کلونی‌ها و اطمینان از قرار گرفتن صحیح قطعه ژنی HtrA2 درون حامل pET21a(+) از کلونی‌های حاصل ژل کراکینگ به عمل آمد. بعد از انجام الکتروفورز در ژل کراکینگ، یک بانده سفید رنگی در نزدیکی چاهک‌ها دیده می‌شود که مربوط به پروتئین‌های چسبیده به DNA هستند که این پروتئین‌های چسبیده به DNA مانع از حرکت DNA در ژل می‌شود. بانده دوم مربوط به ژنوم باکتری می‌باشد. بانده سوم مربوط به حامل می‌باشد که احتمالاً حامل نوترکیب مد نظر ما در این ناحیه قرار گیرد و

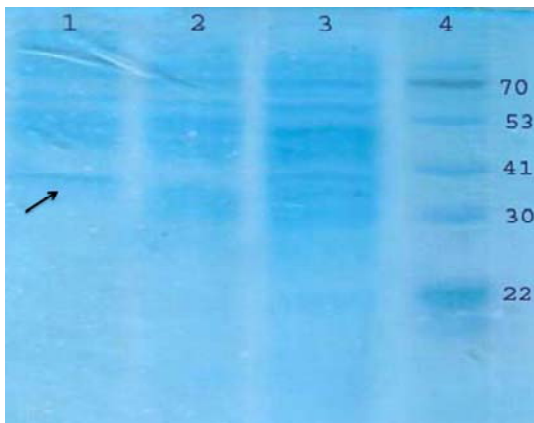
نتایج مربوط به همسانه‌سازی قطعه ژنی HtrA2 در ناقل بیانی pET21a(+) در مرحله همسانه‌سازی، پس از تکثیر قطعه HtrA2 توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای مختص همسانه‌سازی، یک قطعه ۹۷۵ جفت بازی مشاهده گردید. به منظور حذف قطعات و مواد آنزیم‌های اضافی، خالص سازی محصول PCR انجام پذیرفت (شکل ۵ الف).



شکل ۵- الف) خالص سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به قطعه ژنی HtrA2/omi (چاهک اول محصول خالص شده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به قطعه ژنی HtrA2/omi (۹۷۵ جفت باز)، چاهک دوم اندازه نمای DNA). ب) نتیجه استخراج حامل pET21a(+) و قطعه ژنی HtrA2/omi از ژل (چاهک اول بانده مربوط به قطعه ژنی HtrA2/omi برش خورده توسط هر دو آنزیم برشگر (حدود ۱۰۰۰ جفت باز)، چاهک دوم بانده مربوط به حامل pET21a(+) برش خورده توسط هر دو آنزیم برشگر (حدود ۵۵۰۰ جفت باز)، چاهک سوم اندازه نمای DNA)

همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود وجود باندهای ۹۷۵ جفت بازی نشان‌دهنده حضور قطعه ژنی HtrA2 در کلونی‌های ترانسفرم شده می‌باشد.

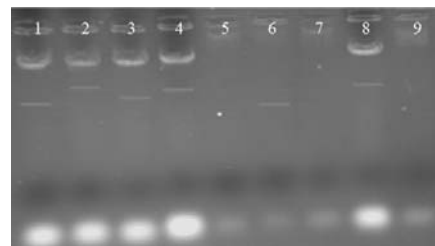
بیان و تخلیص HtrA2/omi: در مرحله بیان، حامل‌های نوترکیب تایید شده در مرحله همسانه‌سازی به سلول‌های مستعد BL21 منتقل شدند و پس از غربالگری، کلونی‌های حاوی حامل نوترکیب برای بیان آماده شدند. برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب، القا توسط غلظت ۴ میلی مولار لاکتوز و ۱ میلی مولار IPTG در زمان‌های مختلف و در دماهای ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۳°C صورت گرفت. دمای ۳۰°C و ۶ ساعت انکوباسیون پس از القا با لاکتوز ۴ میلی مولار و ۱ میلی مولار IPTG به عنوان شرایط بهینه در نظر گرفته شدند. شکل ۸ نتایج مربوط به بیان HtrA2 در شرایط مختلف را در ژل الکتروفورز نشان می‌دهد.



شکل ۸- ژل SDS-PAGE بیان پروتئین HtrA2 با القاکننده‌های لاکتوز و IPTG (چاهک اول نمونه القا شده با لاکتوز بعد از ۶ ساعت (باند ۳۶ کیلوالتونی با پیکان مشخص شده است)، چاهک دوم نمونه بدون القا بعد از ۶ ساعت، چاهک سوم نمونه القا شده با IPTG بعد از ۶ ساعت، چاهک چهارم اندازه نمای پروتئین)

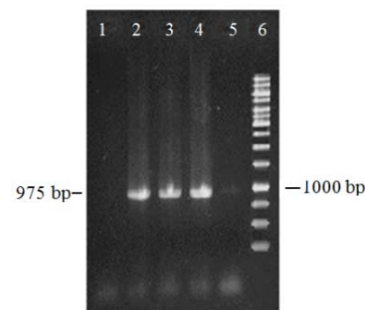
نتایج حاصل از SDS-PAGE حضور پروتئین ۳۶ کیلو دالتونی در نمونه‌های القا شده را نشان می‌دهد. بهترین سطح بیان مربوط به نمونه‌های القا شده با غلظت ۱ میلی مولار IPTG و ۴ میلی مولار لاکتوز، به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۰°C می‌باشد (شکل ۹). دلیل استفاده از دو نوع

بخش سفید رنگ در انتهای ژل مربوط به RNAها می‌باشند (۱۷). شکل ۶ نتایج مربوط به ژل کراکینگ تعدادی از کلونی‌های مرحله قبل را که به طور تصادفی انتخاب شده بودند را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده است باند مربوط به حامل‌های حاصل از تخریب کلونی‌های ترادیمی شده در چاهک‌های ۲، ۴ و ۸ نسبت به باند حامل pET21a(+) بدون قطعه ژنی (چاهک ۱) در موقعیت بالاتری قرار گرفته اند و احتمالاً نشان دهنده حضور قطعه ژنی HtrA2 در حامل‌های مربوطه می‌باشند.



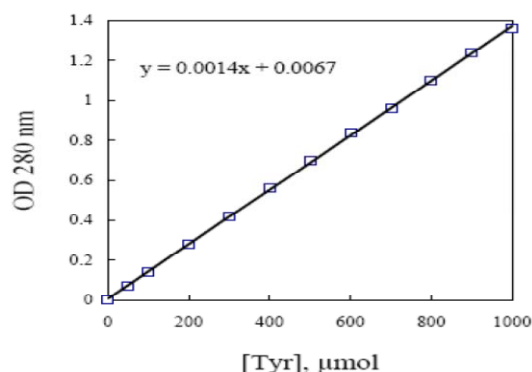
شکل ۶- نتیجه مربوط به ژل کراکینگ تعدادی از کلونی‌های ترانسفرم شده (چاهک ۱ باند مربوط به حامل pET21a(+) بدون قطعه ژنی، چاهک‌های ۲ تا ۹ باند مربوط به حامل‌های حاصل از تخریب کلونی‌های ترانسفرم شده).

پس از ژل کراکینگ، کلونی‌هایی که احتمال داده می‌شد دارای حامل نوترکیب باشند انتخاب و جهت تایید کامل‌تر، کلونی PCR بر روی آن‌ها انجام گرفت. شکل ۷ نتیجه کلونی PCR از تعدادی از کلونی‌های ترانسفرم شده با حامل نوترکیب را نشان می‌دهد.



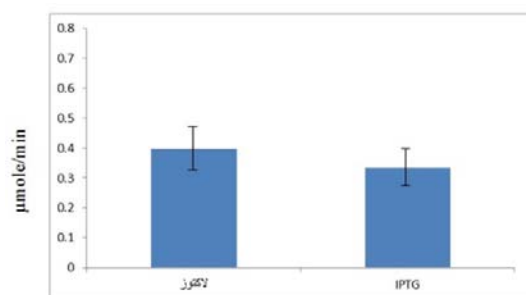
شکل ۷- نتیجه الکتروفورز کلونی PCR. (چاهک اول و پنجم از کلونی ترانسفرم شده با ناقل pET21a(+) بدون قطعه ژنی، چاهک دوم تا چهارم مربوط به کلونی PCR از کلونی‌های ترادیمی شده با حامل‌های نوترکیب، چاهک ششم اندازه نمای DNA)

خط نمودار استاندارد تیروزین، فعالیت آنزیم ۰/۳۹۷ میکرومول در دقیقه محاسبه گردید.



شکل ۱۰- منحنی استاندارد تیروزین

همچنین اختلاف جذب نمونه اصلی القا شده با IPTG و نمونه کنترل در واحد زمان (به ازای دقیقه) برابر با ۰/۴۳ بوده و فعالیت آنزیم برابر با ۰/۳۳۴ میکرومول در دقیقه محاسبه گردید (شکل ۱۱).



شکل ۱۱- تعیین فعالیت آنزیمی HtrA2 (در نمونه القا شده با لاکتوز میزان فعالیت آنزیم معادل ۰/۳۹۷ میکرومول در دقیقه و در نمونه القا شده با IPTG میزان فعالیت آنزیم معادل ۰/۳۳۴ میکرومول در دقیقه محاسبه گردید)

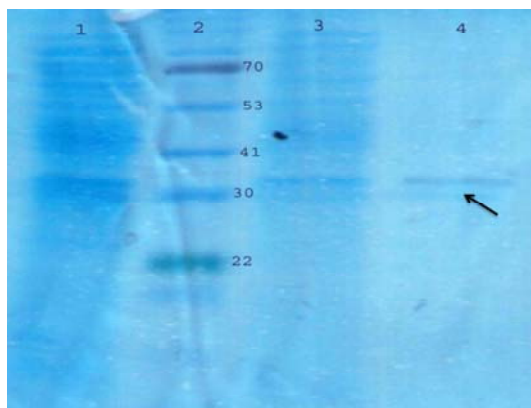
بررسی فعالیت آنزیم هم در دمای ۲۵°C و هم در دمای ۴۰°C انجام گرفت. به طوری که آنزیم در دمای ۴۰ درجه فعالیت بیشتری از خود نشان داد (نتایج نشان داده نشده است).

بحث

مسیرهای مختلفی که مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را تنظیم می‌کنند به عنوان اهداف درمانی در انکولوژی به منظور

القاگر این بود که چون پروتئین HtrA2 در حضور القاگر لاکتوز بیان ضعیفی را از خود نشان داد، لذا برای بهتر شدن بیان از القاگر IPTG نیز استفاده شد. بنابراین کسب نتایج بهتر نیاز به بهینه سازی کدون برای سیستم پروکاریوتی می‌باشد.

در ادامه کار پروتئین‌های بیان شده، توسط ستون نیکل آگارز خالص سازی شدند و سپس توسط SDS-PAGE آنالیز شدند. شکل ۹ نتایج مربوط به خالص سازی پروتئین HtrA2 با وزن مولکولی ۳۶ کیلوالتون توسط ستون نیکل آگارز را نشان می‌دهد.



شکل ۹- نتیجه ژل SDS-PAGE مربوط به پروتئین HtrA2

تخلیص شده (چاهک اول پروتئین القا شده با لاکتوز بعد از ۶ ساعت (باند ۳۶ کیلوالتونی با پیکان مشخص شده است)، چاهک دوم اندازه نمای پروتئین، چاهک سوم پروتئین القا شده با IPTG بعد از ۶ ساعت و چاهک چهارم نمونه تخلیص شده توسط ستون).

تعیین فعالیت آنزیم HtrA2: برای تعیین فعالیت پروتئین HtrA2 از سوبسترای کازئین استفاده گردید. جذب نمونه‌ی موردنظر در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت تبدیل مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر به مولاریته، منحنی استاندارد تیروزین رسم گردید (شکل ۱۰).

در این مرحله در ابتدا اختلاف جذب نمونه اصلی القا شده با لاکتوز و نمونه کنترل در واحد زمان (به ازای دقیقه) به دست آمد که برابر با ۰/۵ بوده و سپس با استفاده از معادله

بیشتر می‌باشد (۸). در لوکمای لنفوسیتی مزمن (chronic lymphocytic leukemia) در مقایسه با سلول‌های B طبیعی بیان HtrA2/omi کمتر می‌باشد (۹). همچنین بیان HtrA2/omi در تومور wilm's در مقایسه با کلیه طبیعی بیشتر می‌باشد (۵). در سرطان تخمدان این پروتئین بیان پایینی دارد (۱۱). در سرطان پستان نیز با افزایش پیشرفت تومور، بیان HtrA2/omi کاهش می‌یابد (۲۵ و ۲۶). در سرطان پروستات متاستاتیک نیز در مقایسه با سرطان ابتدایی پروستات، پروستات طبیعی یا هیپرتروفی خوش خیم پروستات، بیان HtrA2/omi کمتر می‌باشد (۶). در تومور سلول‌های جنسی مردانه (germ cell tumor) در مقایسه با بیضه‌های سالم HtrA2/omi بیان پایین‌تری دارد (۱۴). در یک آزمایش صورت گرفته بر روی کارسینومای معده پیشرفته، با استفاده از رویکرد ریز آرایه بافتی (tissue microarray)، میزان بیان پروتئین HtrA2/omi بر روی ۶۰ بیمار بررسی شد و مشخص شد که در ۴۳ بیمار از ۶۰ بیمار مبتلا به کارسینومای معده (Gastric carcinoma)، بیان HtrA2/omi به خوبی صورت می‌گیرد در حالی که در موکوس طبیعی معده بیان پروتئین HtrA2/omi وجود ندارد و یا بیان خیلی ضعیفی دارد (۱۵). در رده سلولی کارسینومای هپاتوسلولار (Hepatocellular carcinoma) نیز، پروتئین HtrA2/omi بیان خیلی بالایی دارد و آپوپتوز سلول‌های کارسینومای هپاتوسلولار را القا می‌کند (۳۲).

در این تحقیق برای بررسی بیان ژن HtrA2/omi در سلول‌های طبیعی و سرطانی، cDNA مربوط به HtrA2/omi از منابع مختلف سلولی تهیه شده و بعد از انجام عمل PCR مشخص شد تعدادی از این سلول‌ها دارای بیان ژن HtrA2/omi بوده ولی در بعضی دیگر یا بیانی وجود ندارد و یا بیان قابل تشخیص نیست. در cDNA تهیه شده از بافت سرطانی معده برخلاف مطالعات قبلی ژن HtrA2/omi بیان نشده بود و هیچ بانندی به دنبال انجام PCR مشاهده نشد در حالی که در cDNA تهیه شده از بافت سرطانی ریه بعد از انجام PCR باند مربوط به

افزایش حساسیت به عوامل شیمی‌درمانی و یا غلبه بر مساله مقاومت، کانون توجه تحقیقات بوده‌اند. دو مسیر اصلی تنظیم‌کننده مرگ‌سلولی برنامه‌ریزی شده شامل گیرنده‌های مرگ (مسیر خارجی) و مسیر سیگنال آپوپتوزی میتوکندریایی (مسیر داخلی) می‌باشد. این مسیرها با تعدادی از پروتئین‌های پروآپوپتوزی و آنتی‌آپوپتوزی تنظیم می‌شوند. تنظیم‌کننده‌های آپوپتوز به عنوان هدف درمانی جدید مطرح هستند (۴). هدف قرار دادن آپوپتوز یک روش جدید برای کشف داروی سرطان است (۷). HtrA2 پروتئینی هست که در هموستازی میتوکندری و در نتیجه حفظ بقای سلول نقش دارد (۳۱). HtrA2 در سلول‌های انسانی از طریق فعالیت پروتئازی خود قادر به القای آپوپتوز در مسیر غیر وابسته به کاسپاز و در مسیر وابسته به کاسپاز از طریق توانایی مهار میان‌کنش کاسپاز-IAP می‌باشد (۳۳، ۳۴ و ۳۵). بنابراین HtrA2 می‌تواند به عنوان کاندید دارویی آپوپتوز مطرح باشد (۱۶). همچنین آنالیز و بررسی وضعیت بیان پروتئین HtrA2/omi به عنوان تنظیم‌کننده آپوپتوز، برای درک میزان پیشرفت سرطان در بافت‌های سرطانی نیاز است (۴). بنابراین با توجه به اهمیت HtrA2/omi به عنوان یک آنزیم تنظیم‌کننده و القاگر آپوپتوز و فعالیت ضد توموری آن، در ابتدا بیان این پروتئین در سلول‌های مختلف انسانی بررسی شد و سپس cDNA مربوط به HtrA2/omi در حامل بیانی مناسب کلون و بیان گردید و پس از بهینه کردن بیان پروتئین، خالص‌سازی آنزیم انجام گرفت و در نهایت فعالیت پروتئازی آن با استفاده از سوبسترای کازئین بررسی شد.

بر حسب مطالعات انجام گرفته مشخص شده است بیان HtrA2/omi در تومورها بر حسب نوع تومور متغیر است. برای مثال در آدنوکارسینومای ریه (adenocarcinoma lung) بیان بالایی از HtrA2/omi دیده شده است (۲). در کارسینومای سلول‌های سر و گردن (squamous cell carcinoma of the head and neck) مقایسه با سلول‌های طبیعی همان بافت بیان HtrA2/omi

و دماهای مختلف و الفاکنده‌های IPTG و لاکتوز برای بررسی بیان استفاده گردید. برای بیان پروتئین HtrA2، دمای 30°C و ۶ ساعت انکوباسیون پس از القا با لاکتوز ۴ میلی مولار و IPTG ۱ میلی مولار به عنوان شرایط بهینه برای بیان پروتئین انتخاب شد. پروتئین HtrA2/omi به همراه توالی مربوط به His-Tag وزن مولکولی معادل ۳۶ کیلودالتون داشت که بر روی ژل SDS-PAGE در محدوده بین ۳۰-۴۱ کیلودالتون قرار گرفت. فعالیت آنزیم HtrA2/omi توسط سوبسترای کازئین نیز در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. در اثر فعالیت آنزیم HtrA2/omi بر روی سوبسترا، کازئین شکسته شده و تیروزین به همراه قطعات پپتیدی دیگر تولید می‌شوند. با تهیه رقت‌های مختلف از تیروزین و رسم نمودار استاندارد تیروزین، می‌توان جذب نوری نمونه‌های حاصل از پروتئولیز را به مولاریته تبدیل کرد. فرایند پروتئولیز در pH ۷ تا ۱۰ پایدار بوده و کازئین سوبسترای زود هضم و قابل دسترس می‌باشد. به همین دلیل از کازئین به عنوان سوبسترای آنزیم HtrA2/omi استفاده شد. فعالیت آنزیم در دمای 25°C کاهش قابل توجهی نسبت به دمای 40°C از خود نشان داد. قرارگیری موقتی HtrA2 در معرض دماهای بالا نیز مشابه چاپرون باکتریایی خود (deg P) که پروتئاز تجزیه کننده پروتئین‌ها در فضای پری پلاسمیک باکتری می‌باشد، فعالیت پروتئازی HtrA2/omi را افزایش می‌دهد (۱۳). با توجه به این که پروتئاز HtrA2/omi احتمالاً دارای فعالیت چاپرونی بوده و نیز آنزیمی است که تحت شرایط استرسی فعالیت بیشتری دارد، بنابراین فعالیت بیشتر در دمای 40°C درجه نسبت به دمای 25°C درجه پیش بینی می‌شد. آزمایش‌های دقیق‌تر بر روی فعالیت آنزیمی و فعالیت چاپرونی پروتئین در حال انجام است تا بتوان این پروتئین را به عنوان تارگتی مفید و سودمند در درمان برخی بیماری‌ها از جمله سرطان معرفی نمود.

تکنیک HtrA2/omi قابل مشاهده بود. پس از اینکه بیان پروتئین HtrA2 در چندین بافت و رده مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. برای درک عملکرد و خصوصیات احتمالی این پروتئین که بیان‌های متفاوتی از آن در چندین بافت مورد مطالعه مشاهده گردید به منظور مطالعات بیشتر و لزوم تولید پروتئین، cDNA این پروتئین در ناقل مناسب کلون شد و پروتئین نوترکیب بیان گردید. در این تحقیق طی کلون سازی به دلیل بیان ژن مورد نظر در میزبان پروکاریوتی، نیاز به وجود توالی سیگنال پپتید جهت قرارگیری در میتوکندری نبود در نتیجه در استراتژی کلونینگ از آغازگرهای مختص کلونینگ که فقط قطعه مربوط به فرم بالغ پروتئین HtrA2/omi را همانندسازی می‌کردند استفاده گردید. در نتیجه استفاده از این آغازگرها قطعات ژنی با ۹۷۵ جفت باز تولید شدند. بعد از مشاهده باند مورد نظر، کلونینگ قطعه ژنی در حامل pET21a(+) صورت گرفت، نتایج حاصل از ژل کراکینگ و کلونی PCR، موید کلون شدن قطعه ژنی درون حامل بودند، همچنین برای اطمینان بیشتر حامل حاوی قطعه کلون شده برای تعیین توالی به شرکت bioneer فرستاده شد. در انتهای کربوکسیل آغازگرهای مختص کلونینگ توالی His-Tag طراحی شد. موتیف His-Tag قادر به تسهیل در جداسازی و تخلیص پروتئین مورد نظر از طریق ستون کروماتوگرافی نیکل-آگارز می‌شود و در واقع پروتئین از طریق این موتیف با گروه‌های نیکل ستون کروماتوگرافی میان‌کنش برقرار می‌کند. دلیل قرار نگرفتن توالی His-Tag در N-ترمینال آغازگرها این بود که در ناحیه آمین، دمین‌های عملکردی جای گرفته‌اند و به هنگام تولید پروتئین بالغ برش دقیقاً از کنار دمین درون غشایی صورت می‌گیرد در حالی که در انتهای کربوکسیل بعد از دمین PDZ، دمین‌های عملکردی مهمی وجود ندارند. در مرحله بیان ژن HtrA2/omi درون حامل بیانی BL21(DE3) از زمان‌ها

منابع

- 1- Agostini M, Tucci P, Melino G, 2011: Cell death pathology: perspective for human diseases. *Biochemical and biophysical research communications*, 414(3):451-455.
- 2- Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, Ladd C, Beheshti J, Bueno R, Gillette M, 2001: Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24):13790-13795.
- 3- Bhuiyan M, Fukunaga K, 2008: Activation of HtrA2, a mitochondrial serine protease mediates apoptosis: current knowledge on HtrA2 mediated myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular therapeutics*, 26(3):224-232.
- 4- Chien J, Campioni M, Shridhar V, Baldi A, 2009: HtrAserine proteases as potential therapeutic targets in cancer. *Current cancer drug targets*, 9(4):451-468.
- 5- Cutcliffe C, Kersey D, Huang C-C, Zeng Y, Walterhouse D, Perlman EJ, 2005: Clear cell sarcoma of the kidney: up-regulation of neural markers with activation of the sonic hedgehog and Akt pathways. *Clinical cancer research*, 11(22):7986-7994.
- 6- Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM, 2001: Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*, 412(6849):822.
- 7- Fesik SW, 2005: Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer*, 5(11):876.
- 8- Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS, Patel KJ, Volker SE, Pambuccian SE, Ondrey FG, Adams GL, Gaffney PM, 2004: Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer research*, 64(1):55-63.
- 9- Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P, Kraut N, Stratowa C, Abseher R, 2004: Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *Journal of Clinical Oncology*, 22(19):3937-3949.
- 10- Healthcare G, 2007: Affinity chromatography principles and methods.
- 11- Hendrix ND, Wu R, Kuick R, Schwartz DR, Fearon ER, Cho KR, 2006: Fibroblast growth factor 9 has oncogenic activity and is a downstream target of Wnt signaling in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer research*, 66(3):1354-1362.
- 12- Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F, 2013: Apoptosis: programmed cell death. *JQUMS*, 17(3):48-57.
- 13- Jin S, Kalkum M, Overholtzer M, Stoffel A, Chait BT, Levine AJ, 2003: CIAP1 and the serine protease HTRA2 are involved in a novel p53-dependent apoptosis pathway in mammals. *Genes & development*, 17(3):359-367.
- 14- Korkola JE, Houldsworth J, Chadalavada RS, Olshen AB, Dobrzynski D, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti R, 2006: Down-regulation of stem cell genes, including those in a 200-kb gene cluster at 12p13.31, is associated with in vivo differentiation of human male germ cell tumors. *Cancer research*, 66(2):820-827.
- 15- Lee SH, Lee JW, Kim HS, Kim SY, Park WS, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, 2003: Immunohistochemical analysis of Omi/HtrA2 expression in stomach cancer. *Apmis*, 111(5):586-590.
- 16- Los M, Burek CJ, Stroh C, Benedyk K, Hug H, Mackiewicz A, 2003: Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. *Drug discovery today*, 8(2):67-77.
- 17- Maniatis T, Frisch E.F and Sambrook j, 1982: Molecular Cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- 18- Mao G, Lv L, Liu Y, Chen B, Li M, Ni T, Yang D, Zhu H, Xue Q, Ni R, 2014: The expression levels and prognostic value of high temperature required A2 (HtrA2) in NSCLC. *Pathology-Research and Practice*, 210(12):939-943.
- 19- Martins LM, 2013: HtrA2 Peptidase. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*. Elsevier: 2571-2577.
- 20- Narkiewicz J, Klasa-Mazurkiewicz D, Zurawa-Janicka D, Skorko-Glonek J, Emerich J, Lipinska B, 2008: Changes in mRNA and

- protein levels of human HtrA1, HtrA2 and HtrA3 in ovarian cancer. *Clinical biochemistry*, 41(7-8):561-569.
- 21- Novo MTM, Soares-Costa A, de Souza AQ, Figueira ACM, Molina GC, Palacios CA, et al. A complete approach for recombinant protein expression training, 2005: From gene cloning to assessment of protein functionality. *Biochemistry and Molecular Biology Education*.;33(1):34-40.
- 22- Patel S, 2017: A critical review on serine protease: key immune manipulator and pathology mediator. *Allergologia et immunopathologia*, 45(6):579-591.
- 23- Seong Y-M, Park H-J, Seong G-H, Choi J-Y, Yoon S-JK, Min B-R, Kang S, Rhim H, 2004: N-terminal truncation circumvents proteolytic degradation of the human HtrA2/Omi serine protease in Escherichia coli: rapid purification of a proteolytically active HtrA2/Omi. *Protein expression and purification*, 33(2):200-208.
- 24- Skorko-Glonek J, Zurawa-Janicka D, Koper T, Jarzab M, Figaj D, Glaza P, Lipinska B, 2013: HtrA protease family as therapeutic targets. *Current pharmaceutical design*, 19(6):977-1009.
- 25- Sørliie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, 2001: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19):10869-10874.
- 26- Sørliie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, 2003: Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14):8418-8423.
- 27- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R, 2001: A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Molecular cell*, 8(3):613-621.
- 28- Tower J, 2015 : Programmed cell death in aging. *Ageing research reviews*, 23:90-100.
- 29- Vinatier D, Dufour P, Subtil D, 1996: Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 67(2):85-102.
- 30- Wagh AR, Bose K, 2017: Emerging Roles of Mitochondrial Serine Protease HtrA2 in Neurodegeneration. In *Proteases in Physiology and Pathology*. Springer; 325-353.
- 31- Walle LV, Lamkanfi M, Vandenberghe P, 2008: The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell death and differentiation*, 15(3):453.
- 32- Xu Z, Chen Y, Xu G, Peng C, Liu E, Li Y, Niu J, Li C, 2015: Omi/HtrA2 pro-apoptotic marker differs in various hepatocellular carcinoma cell lines owing to p53/pea-15 expression level. *Oncology reports*, 33(2):905-912.
- 33- Zumbrohn J, Trüb B, 1996: Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS letters*, 398(2-3):187-192.
- 34- Sadeghi E, behmanesh M, Sharifi M, mohammad soltani B, ahmadian N, 2014: Induced apoptosis of bladder carcinoma cell line 5637 by podophyllotoxin treatment. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 27(3): 399-405.
- 35- Motamedi M, 2018: Programmed cell death regulatory genes in primitive Eumetazoa. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 31(4): 673-684.
- 36- Zurawa-Janicka D, Wenta T, Jarzab M, Skorko-Glonek J, Glaza P, Gieldon A, Ciarkowski J, Lipinska B, 2017: Structural insights into the activation mechanisms of human HtrA serine proteases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 621:6-23.

Investigation of expression patterns of High temperature requirement A2 (HtrA2) in some tissues and cell lines and its production in prokaryotic host

shaterian S.¹, Najavand S.¹, Mota A.² and Pazhang M.¹

¹Dept. of Biology, Faculty of Sciences, AzarbaijanShahidMadani University, Tabriz, I.R. of Iran

²Dept. of Biochemistry and Clinical Laboratories, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences and Health Services, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

HtrA2 is the mitochondrial serine protease, expressed in almost all tissues. At stressful conditions, this protease is converted into a pro-apoptic factor and induces apoptosis. It has been showed that beside protease function, HtrA2 acts as a chaperone and is involved in the proper protein folding. Considering the importance of the HtrA2 enzyme in inducing apoptosis and its association with some diseases, the expression pattern of HtrA2 protein was evaluated in natural cell lines and some disease categories. PCR results obtained in the present study showed that the normal human gastric tissue express HtrA2 gene, but the HtrA2 gene was not expressed in gastric cancer form. Also, HtrA2 gene was expressed in human lung cancer tissue, SW480 cell lines and MS cell lines. According to different expression of HtrA2 gene in natural and diseases tissues and cell lines, there was no specific pattern indicating the association of expression of this protease with a disease. In the next step, due to the importance of HtrA2, the cloning of HtrA2 gene in pET21a (+) (expression vector) has been done and the recombinant vector was transformed to the E. coli TOP10 strain cells. Finally, protein expression was analyzed with SDS-PAGE electrophoresis. Then, the produced protein was purified with Ni-NTA Agarose and protease activity of HtrA2 was assayed by casein substate with spectrophotometer. The results showed the produced protein is active, so the produced HtrA2 has natural structure and can be used for further research.

Key words: HtrA2, apoptosis, casein, SDS-PAGE, expression