

بررسی عملکرد توالی نشانه در انتهای آمین دو پروتئین Ppic و Trmt1 انسان با سیستم ترشح مخمر (YST)

سید ابراهیم حسینی، بهرام محمد سلطانی* و مهرداد بهمنش

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۷

چکیده

پروتئین‌های ترش‌حی و خلال غشایی در بسیاری از فرآیندهای زیستی نقش کلیدی دارند. نرم افزارهای بیوانفورماتیکی متعددی جهت پیش‌بینی این پروتئین‌ها طراحی شده است. همچنین چندین روش تجربی نیز جهت به دام انداختن این پروتئین‌ها معرفی شده است. YST (yeast secretion trap)، یکی از روش‌های تجربی است که در این زمینه استفاده شده است. هدف از این تحقیق بکارگیری سامانه YST جهت ارزیابی پروتئین‌های ترش‌حی و تراغشایی بود که تا کنون در کشور ایران از این سامانه در شناسایی پروتئین‌های ترش‌حی و تراغشایی استفاده نشده است. به این منظور عملکرد دو توالی نشانه پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی، در انتهای آمین دو پروتئین انسانی Ppic و Trmt1 و توالی نشانه شناخته شده Pi16 (عملکرد این توالی انسانی به عنوان توالی نشانه با سامانه yst قبلاً شناخته شده است) به عنوان کنترل مثبت و توالی نشانه میتوکندری Tfam، به عنوان کنترل منفی با این روش مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از کنترل مثبت و منفی تحقیق، حاکی از کارکرد صحیح سیستم بود، با این وجود هیچ‌یک از دو توالی هدف پیش‌بینی شده به عنوان توالی نشانه در این سیستم عملکرد توالی نشانه را نداشتند و با توجه به گزارش‌های قبلی و نتایج حاصل از این تحقیق به نظر می‌رسد این سامانه توانمندی بالایی در شناسایی پروتئین‌های ترش‌حی و تراغشایی یوکاریوت‌های عالی از جمله توالی‌های نشانه انسانی را ندارد.

واژه‌های کلیدی: توالی نشانه، (YST) yeast secretion trap، ppic و trmt1

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۷۰۳، پست الکترونیکی: bmsoltani@yahoo.com

مقدمه

به صورت هدفمند با هدف قرار دادن این پروتئین‌ها به سمت سلول یا بافت مورد نظر هدایت کرد (۲).

مسیرهای صدور پروتئین‌های ترش‌حی و تراغشایی به فضای خارج سلولی به دو دسته مسیرهای کلاسیک و نامتداول قابل تقسیم هستند (۸).

مسیرهای نامتداول شامل مکانیسم‌های وابسته به حضور وزیکول‌های درون سلولی و مکانیسم‌های مستقل از وزیکول‌هاست. در مکانیسم وابسته به وزیکول‌های داخل سلولی، این وزیکول‌ها می‌توانند لیپوزوم‌های ترش‌حی و یا آگزوزوم‌هایی باشند که از اندامک‌های حفره‌ای درون سلولی نشأت گرفته‌اند. مکانیسم‌های مستقل، یکی شامل ترابری

پروتئین‌های ترش‌حی و تراغشایی در بسیاری از فرآیندهای زیستی نقش کلیدی ایفاء می‌کنند، فاکتورهای رشد و گیرنده‌های آنها، عوامل شرکت کننده در پیام‌رسانی سلول‌ها، بسیاری از پروتئین‌های درگیر در ایجاد اتصالات سلولی و نیز بسیاری از عوامل سیستم ایمنی مثالهایی از این پروتئین‌ها هستند. به دلیل اینکه این پروتئین‌ها در فضای خارج سلولی قرار دارند به آسانی در دسترس داروها قرار می‌گیرند و لذا نیاز تحویل دارو به سلول که همواره یک محدودیت در درمان بیماری‌ها به شمار می‌آید را برطرف می‌سازند. پروتئین‌های تراغشایی که ویژه سلول یا بافت ویژه‌ای هستند از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند چرا که می‌توان داروها را

cDNA حاوی توالی نشانه در قالب باز خواندنی پروتئین پوشش می‌باشد (۱۴). یک روش زیستی برپایه جداسازی RNA های کد کننده توالی نشانه طراحی شده است که در آن RNA های کد کننده توالی نشانه درگیر در فرآیند ترجمه به دلیل برهمکنش ریبوزوم‌های حاوی این RNA-ها با غشای شبکه آندوپلاسمی از سایر RNAها جدا و شناسایی می‌شوند (۴).

در به دام اندازی توالی نشانه توسط ژن گزارشگر، استخراج RNA، از سلول یا بافت مورد نظر صورت می‌گیرد. سپس رشته اول cDNA با استفاده از آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی ساخته می‌شود. ساخت رشته دوم و تکثیر آن در نسخه‌های متعدد با روش RACE، صورت می‌گیرد. این نسخه‌ها در بالا دست ژن گزار که فاقد توالی نشانه و متیونین آغازی است و روی یک حامل تعبیه شده است همسانه می‌گردد. کتابخانه حامل‌های نوترکیب به سلول میزبان انتقال می‌یابد. سلول میزبان فاقد ویژگی است که ژن گزارشگر بیان می‌کند. هر یک از cDNA هایی که حاوی توالی نشانه و متیونین آغازی باشد و این توالی را در قالب صحیح به ژن گزارشگر عرضه کند با بیان و ترشح محصول ژن گزارشگر ویژگی آن را بروز خواهد داد. سلول میزبان حامل ناقل نوترکیب با بیان ویژگی ژن گزارشگر از بقیه سلولها تمیز داده می‌شود. در نهایت حامل نوترکیب از سلول میزبان استخراج می‌شود و واکنش توالی‌یابی صورت می‌پذیرد و توالی cDNA در بانک اطلاعاتی جستجو می‌شود بدین ترتیب می‌توان فهمید که توالی نشانه به کدام ژن تعلق دارد (۱، ۹، ۱۱ و ۱۸).

تعدادی از ژنهای گزارشگر عبارتند از β -لاکتاماز، که آمپی‌سیلین را تجزیه می‌کند و ترشح آن به فضای پری پلاسمی باعث نجات باکتری روی محیط انتخابی حاوی آمپی‌سیلین می‌گردد (۱۸). CD4، پروتئین تراغشایی را کد می‌کند که در سطح سلول با آنتی بادی منوکلونال ردیابی می‌شود (۹). گیرنده اینترلوکین جهش یافته که یک گیرنده

مستقیم از خلال غشاء بواسطه ناقل‌های ABC (آدنوزین تری فسفات کاست) و دیگری، جوانه زنی غشاء و تولید وزیکولهای خارج سلولی می‌باشد (۱۵).

اغلب پروتئینهای ترشچی و تراغشایی با مسیرهای کلاسیک به فضای خارج سلول راه می‌یابند. این مسیرها شامل انتقال همزمان با ترجمه و انتقال پس ترجمه‌ای است که اولی در تمام یوکاریوتها وجود دارد و دومی در یوکاریوتهای عالی شناخته نشده است (۸).

مسیرهای کلاسیک ترشح وابسته به حضور توالی نشانه در انتهای آمینی پروتئینها می‌باشد. توالیهای نشانه از نظر طول و توالی بسیار متنوع هستند (۲۱).

روشهای مختلفی جهت شناسایی و پیش‌بینی پروتئینهای ترشچی و تراغشایی طراحی شده‌اند که عمدتاً بر مبنای تشخیص و پیش‌بینی توالی نشانه طرح ریزی شده‌اند و به دو دسته کلی قابل تقسیمند. روشهای نرم‌افزاری و روشهای تجربی (۱۰).

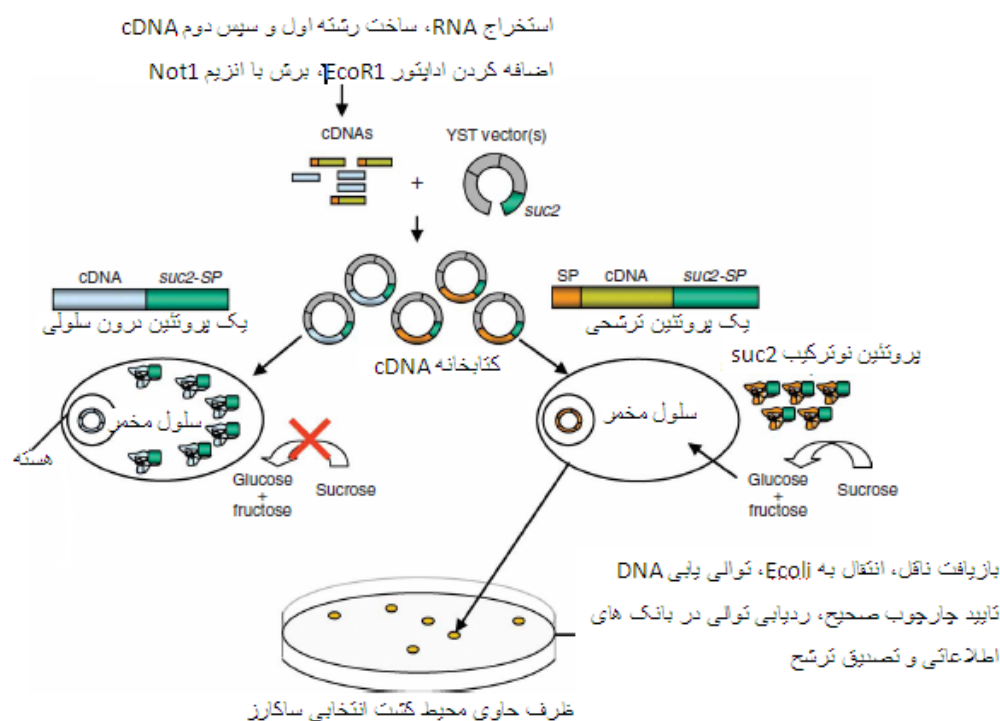
روشهای نرم‌افزاری توالی نشانه را ضمن تجزیه و تحلیل توالی انتهای آمین پروتئینهای ترشچی و تراغشایی پیش‌بینی می‌کنند و از برنامه شبکه عصبی (۱۰) و پنهان مارکوف جهت پیش‌بینی استفاده می‌کنند (۱۰).

روشهای زیستی (آزمایشگاهی) مختلف پروتئینهای ترشچی و تراغشایی را در مقیاس وسیع شناسایی می‌کنند. این روشها عبارتند از به دام اندازی توالی نشانه با ژن گزارشگر، مهندسی ویروسها جهت شناسایی پروتئینهای ترشچی و تراغشایی و جداسازی RNAهای متصل به غشاء و کدکننده این پروتئینهاست (۱، ۴، ۹، ۱۱، ۱۴ و ۱۸).

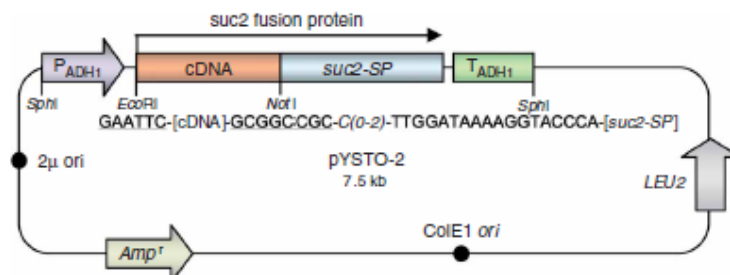
در مهندسی ویروسها جهت شناسایی پروتئینهای ترشچی و تراغشایی، ویروس Sindbis، به گونه‌ای دستکاری شده که پروتئین پوشش آن فاقد توالی نشانه و متیونین آغازی است و لذا تشکیل ذرات ویروسی مستلزم همسانه شدن

اینورتاز و مخمر جهش یافته جهت شناسایی پروتئینهای ترش‌چی و تراغشایی موسوم به YST، می‌باشد (شکل ۱). یک راه کار جهت بهینه‌سازی این سیستم استفاده از سه ناقل (pYST0، pYST1 و pYST2) هر یک حاوی ژن گزارشگر اینورتاز با قالبهای باز خواندنی متفاوت می‌باشند و انطباق صحیح cDNAها را از نظر قالب باز خواندنی با اینورتاز فراهم می‌نمایند (۱۲) (شکل ۲).

رشد مستقل از فاکتور رشد را در سطح سلول کد می‌کند و باعث نجات سلول در محیط کشت انتخابی می‌گردد (۱۱). آلکالین فسفاتاز یک آنزیم تراغشایی را کد می‌کند و یک واکنش تولید رنگ را در سطح سلول راه اندازی می‌کند (۱). اینورتاز که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، ساکارز را به فروکتوز و گلوکز تجزیه می‌کند (۱۲). و ترشح آن به خارج سلول باعث نجات مخمر جهش یافته روی محیط انتخابی ساکارز می‌شود. سامانه حاصل از ژن گزارشگر



شکل ۱- نمایشی شماتیک از مراحل اصلی YST. یک کتابخانه cDNA از بافت یوکاریوتی و یا سلول دلخواه با الحاق cDNA ها در حامل YST، که حاوی یک نسخه فاقد توالی پپتید نشانه ژن گزارشگر اینورتاز (SUC) می‌باشد، تهیه می‌شود. این کتابخانه سپس به یک سویه مخمر نا کارآمد از لحاظ عملکرد اینورتاز منتقل گردیده و روی محیط انتخابی کشت می‌شود. اینورتاز جهت هیدرولیز ساکارز الزامی است و رشد سلولها را در محیط ساکارز فراهم می‌آورد. اما هنگامی که پپتید نشانه حذف شده باشد، اینورتاز تولید و ترشح نمی‌شود و منجر به تولید سلولهای مخمری خواهد شد که قادر به رشد روی محیط انتخابی نمی‌باشند (سمت چپ) اگر cDNA های یوکاریوتی کد کننده یک پروتئین ترش‌چی همراه با پپتید نشانه باشند، مخمر جهش یافته قادر به رشد و نجات خواهد شد، چراکه پروتئین نوترکیب اینورتاز را ترشح می‌کند.



شکل ۲- نمایی شماتیک از وکتور YST به کار گرفته شده در تولید کتابخانه cDNA. سه وکتور مختلف تولید می‌شوند که در تعداد بازهای سیتوزین، بلافاصله پس از جایگاه برش NotI، متغیر می‌باشند. محل آنزیمهای (EcoRI، NotI) جهت همسانه‌سازی cDNA با خط زیرین مشخص شده است. P_{ADH2}: جایگاه راه انداز ژن الکل دهیدروژناز؛ EColi ori: مبدا همانندسازی EColi؛ T_{ADH2}: خاتمه گر ژن الکل دهیدروژناز؛ SphI: جایگاه برش آنزیم محدودگر SphI؛ Amp^r: ژن مقاوم به آمپی سیلین؛ 2μ ori: مبدا همانند سازی 2μ؛ suc2-SP: اینورتاز ناقص فاقد توالی نشانه و متیونین آغازی.

سامانه قبلاً گزارش شده است) و نیز از توالی نشانه میتوکندریایی پروتئین (mitochondrial transcription factor) Tfam به عنوان کنترل منفی آزمایش استفاده گردید.

مواد و روشها

روشهای به کار گرفته شده در این تحقیق شامل روشهای نرم‌افزاری و روشهای آزمایشگاهی بود.

جهت پیش‌بینی توالی نشانه در انتهای آمین پروتئینهای مورد نظر از سه نرم افزار ایچ در این زمینه شامل SignalP 3.0، TargetP و Predisi استفاده شد. همچنین جهت طراحی آغازگرها از نرم افزار Oligo 4.0 استفاده گردید.

ابتدا با استفاده از روش مرسوم اقدام به استخراج DNA ژنومی از خون انسان به عنوان Template شد (۱۶). سپس با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، قطعات کد کننده توالی انتخابی (مستعد به داشتن عملکرد توالی نشانه با پیش‌بینی نرم افزار) تکثیر گردید. توالی آغازگرها در جدول ۱ قابل مشاهده می‌باشد.

پس از تکثیر قطعات، با استفاده از کیت miniprep شرکت Bioneer اقدام به استخراج ناقله‌های pYST0 و pYST2 از باکتریهای حامل آنها شد. این حاملها توسط لی و همکاران طراحی و ساخته شده است (۱۲) و با انجام مکاتبات از ایشان تهیه شد (شکل ۲).

هدف از این تحقیق اجرایی نمودن روش تجربی (YST) - بر پایه ژن گزارشگر اینورتاز- جهت شناسایی پروتئینهای ترشچی و تراغشایی سلولهای انسانی بود چرا که این سامانه تاکنون در کشور ایران اجرا نشده است- و نیز ارزیابی عملکرد توالیهای نشانه پیش‌بینی شده با نرم افزار- های بیوانفورماتیکی در انتهای آمین دو پروتئین انسانی (peptidyl prolyl cis transe isomerase) Ppic و (tRNA methyl transferase 1) Trmt1 با این سامانه بود. Ppic انسان در مجموعه پروتئینهایی که با روش تجربی جهت شناسایی پروتئینهای ترشچی- بر مبنای جداسازی RNAهای متصل به غشا (RNA و ریبوزم متصل به غشای شبکه آندوپلاسمی) توسط Dihen M و همکاران- پی‌ریزی شده بود به عنوان یک پروتئین بالقوه ترشچی گزارش شده بود (۴). با تحقیق در مورد Ppic متوجه شده که تا کنون جایگاه عملکرد آن در انسان مکان‌یابی نشده است. Trmt1 نیز با نام FLJ20244 در مطالعاتی که با روش بیوانفورماتیکی توسط Welsh J و همکاران- تحت عنوان شناسایی پروتئینهای نشانگر زیستی ترشچی و موجود در سرم با افزایش بیان در سرطان در مقیاس وسیع- صورت گرفت به عنوان پروتئین بالقوه ترشچی با افزایش ۳٫۷ درصد بیان در سرطان سینه (از نوع گیرنده استروژن منفی) گزارش شده بود (۲۲). به منظور اطمینان از کارکرد صحیح سامانه YST، از یک کنترل مثبت (توالی نشانه پروتئین Pi16 (protease inhibitor 16) که عملکرد مثبت آن در این

جدول ۱- توالی آغازگرها و دمای ذوب آنها

| Name | Sequence | TM(°C) |
|---------|---|--------|
| pi16 F1 | 5- GAGGAATTCGTGACCTGGGTGCAACCA-3' | 58 |
| pi16 R1 | 5- GGGGGCGGCCGCGGTAGAGGTTGTGCAGCTC-3' | 56 |
| tfam F1 | 5'- TATAGAATTCGCCCTGGCTTGAAGTGAAGA-3' | 58 |
| tfam R1 | 5- ATATGCGGCCGCGAGCGCAGTCGACTTCCACA-3' | 58 |
| ppic F1 | 5'- ATATGAATTCGGGTCGCGAGTCTGAACTTGG-3' | 60 |
| ppic R1 | 5'- ATATGCGGCCGCTCACCTTGCCGTCACCGAGGGG-3' | 62 |
| trmt1 | 5-ATATGAATTCGTGGCTACGAGAGCAGGT-3' | 58 |
| trmt1 | 5'- ATATGCGGCCGCTCGGTGACTGTCGCTCTCCT-3' | 57 |

GAATTC: توالی شناسایی آنزیم محدودگر EcoRI؛ GCGGCCG: توالی شناسایی آنزیم محدودگر NotI

(۱۹). و سپس مخمرها را بر روی محیط انتخابی سوکروز کشت داده‌شد.

پس از یک هفته ناقل را از مخمرها (چه آنهایی که نجات یافته بودند و چه آنهایی که به صورت پس زمینه‌ای وجود داشتند) استخراج شدند و پس از ازدیاد در باکتری مستعد و استخراج مجدد از باکتری، مورد واکنش توالی‌یابی قرار گرفتند.

نتایج

به منظور پیش بینی حضور توالی نشانه در انتهای آمینی پروتئینهای مورد نظر (Trmt1 و Ppic)، ۷۰ اسید آمینه انتهای آمینی این پروتئینها با سه نرم افزار SignalP 3.0، TargetP و Predisi مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین جهت کنترل، توالی نشانه شبکه آندوپلاسمی (۷۰ اسید آمینه انتهای آمینی Pi16) و توالی نشانه میتوکندری (۷۰ اسید آمینه انتهای آمین Tfam) نیز با نرم افزارهای مذکور مورد سنجش قرار داده‌شد. نرم افزارهای SignalP 3.0 و Predisi فقط قادر به شناسایی توالی نشانه شبکه آندوپلاسمی (SP) می‌باشند، بنابر این پیش بینی خود از حضور یا عدم حضور توالی نشانه را به ترتیب با SP و

هریک از قطعات تکثیر یافته و ناقلها همزمان با دو آنزیم NotI و EcoRI طبق دستورالعمل شرکت Fermentase مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. پس از شستشوی محصولات هضم آنزیمی با کیت تخلیص PCR شرکت Roche، هر یک از قطعات با ناقل متناظر از نظر قالب صحیح، مطابق با دستورالعمل آنزیم T4DNAligase شرکت Fermentase الحاق داده شد (شکل‌های ۲ و ۳).

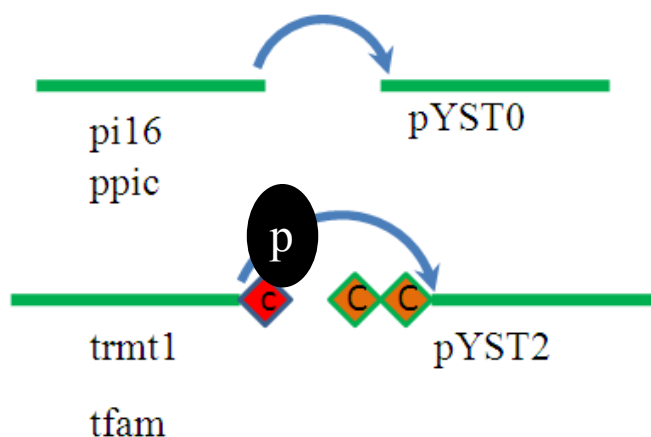
توالیهای مستعد عملکرد توالی نشانه (ppic و trmt1) در حاملهای منطبق (pYST0 و pYST2) و قطعات کد کننده توالیهای pi16 و ppic با حامل pYST0 منطبق بوده و توالیهای trmt1 و tfam، با داشتن یک نوکلئوتید اضافه در انتهای آغازگر برگشت و در ادامه توالی شناسایی آنزیم محدودگر NotI، با حامل pYST2، با دو نوکلئوتید سیتوزین اضافه در بالادست ژن گزارشگر منطبق می‌باشد، این سه نوکلئوتید با هم یک آمینو اسید اضافه پرولین کد می‌کنند و قالب صحیح بازیابی می‌شود.

ناقل های نو ترکیب حاصل با انتقال شیمیایی به باکتری مستعد DH5α انتقال داده‌شد(۱۷). پس از تکثیر ناقل‌های نو ترکیب در باکتری مستعد، ناقلها از باکتری استخراج و با الکتروپوریشن به مخمر جهش یافته مستعد منتقل گردید

نمره (Score) بیان می‌کند کار گرفته شده در این تحقیق در جدول ۲ قابل مشاهده است.

همه نرم افزارها توالی انتهای آمین Pi16 (کنترل مثبت) را با احتمال بالا به عنوان توالی نشانه پیش بینی کردند. نرم افزارهای SignalP 3.0 و Predisi قادر به تمیز دادن نشانه میتوکندری از شبکه اندوپلاسمی نمی باشند و توالی انتهای آمین Tfam (کنترل منفی) را به عنوان توالی نشانه پیش بینی کردند.

NO نشان می‌دهند که احتمال صحت این پیش بینی را با دادن نمره (Score) بیان می‌کنند. نرم افزار TargetP قادر به تمیز دادن توالی نشانه شبکه اندوپلاسمی از توالی نشانه میتوکندری می‌باشد و پیش بینی حاکی از حضور توالی نشانه شبکه اندوپلاسمی، توالی نشانه میتوکندری و یا عدم حضور توالیهای مذکور را به ترتیب با SP، MS و NO نشان می‌دهد و احتمال صحت این پیش بینی را با دادن

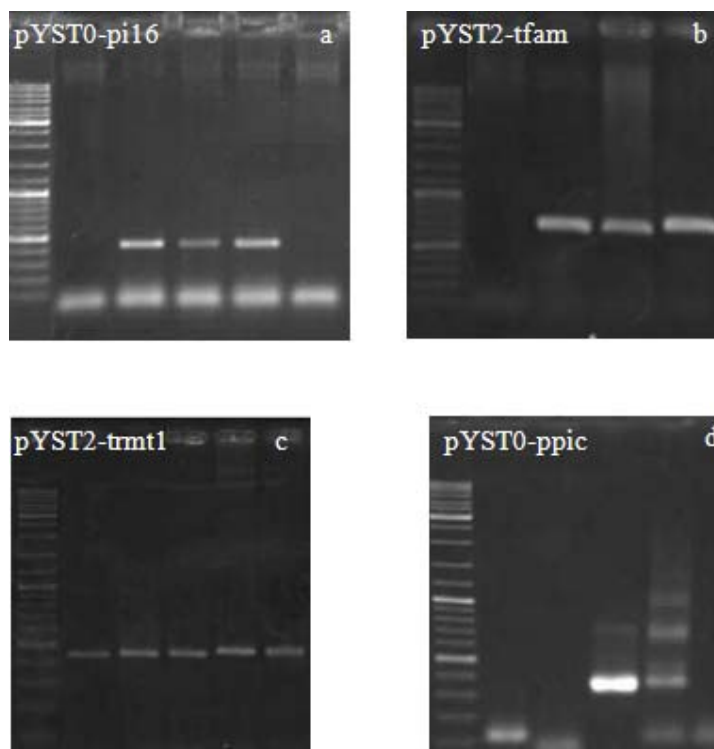


شکل ۳- نمایی شماتیک از الحاق قطعات کد کننده توالی نشانه (pi16)، توالی نشانه میتوکندری (tfam) و توالیهای مستعد عملکرد توالی نشانه (ppic) و trmt1 در حامل های منطبق (pYST0 و pYST2). قطعات کد کننده توالیهای pi16 و ppic با حامل pYST0 منطبق می‌باشد و توالیهای trmt1 و tfam با داشتن یک نوکلئوتید اضافه در انتهای آغازگر برگشت و در ادامه توالی شناسایی آنزیم محدودگر NotI، با حامل pYST2، با دو نوکلئوتید سیتوزین اضافه در بالادست ژن گزارشگر منطبق می‌باشد، این سه نوکلئوتید با هم یک آمینو اسید اضافه پرولین کد می‌کنند و قالب صحیح بازیابی می‌شود.

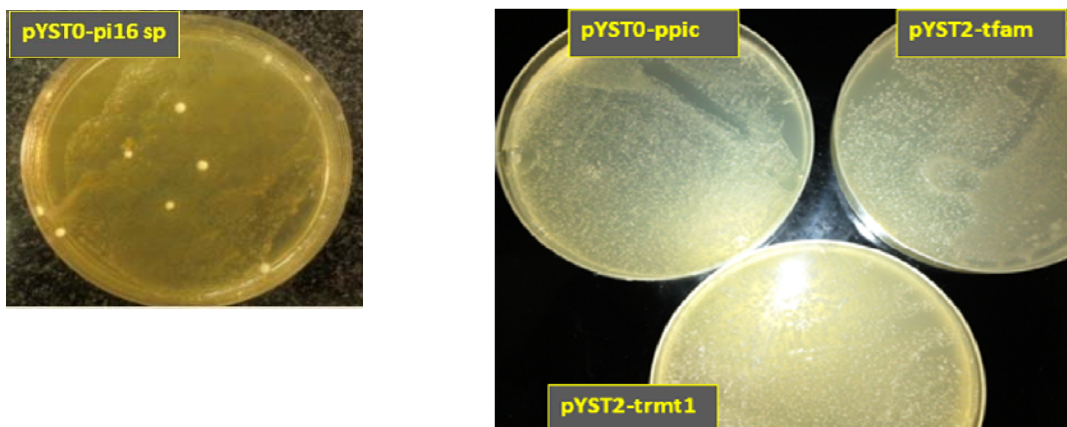
جدول ۲- نتایج حاصل از پیش بینی نرم افزارهای SignalP 3.0، TargetP و Predisi

| Software | SignalP(NN) | SignalP(HMM) | | Predisi | | TargetP | |
|----------|-------------|--------------|------------|---------|------------|---------|------------|
| | prediction | Score | prediction | Score | prediction | Score | prediction |
| Pi16 | SP | 0.99 | SP | 0.99 | SP | 0.97 | SP |
| Tfam | SP | 0.98 | SP | 0.58 | SP | 0.92 | MS |
| Ppic | SP | 0.98 | SP | 0.76 | SP | 0.89 | SP |
| Trmt1 | SP | 0.81 | SP | 0.35 | NO | 0.91 | MS |

SP: توالی نشانه شبکه اندوپلاسمی؛ MS: توالی نشانه میتوکندری؛ NO: فاقد توالی نشانه شبکه اندوپلاسمی، میتوکندری



شکل ۴- واکنش زنجیره ای پلیمرز کلنی های حاصل از انتقال حامل های نو ترکیب **a**: pYST0-pi16(486 bp) **b**: pYST2-tfam (653 bp) **c**: pYST2-trmt1(469 bp) **d**: pYST0-ppic (334 bp).



شکل ۵- نتیجه حاصل از انتقال حامل های نو ترکیب به مخمر جهش یافته و کشت روی محیط انتخابی ساکارز.

در انتهای آمینی Trmt1 پیش بینی کردند، این در حالی است که احتمال حضور توالی نشانه با پیش بینی نرم افزار Predisi، در این ناحیه بسیار پایین می‌باشد و نرم افزار TargetP آن را به عنوان توالی نشانه میتوکندری پیش بینی کرد.

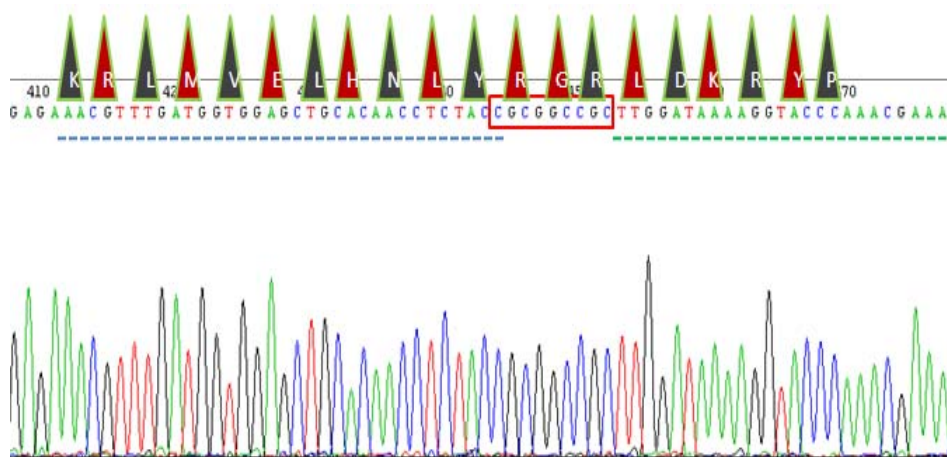
نرم افزار TargetP قادر به تمیز دادن نشانه میتوکندری از شبکه اندوپلاسمی می باشد و به درستی و با احتمال زیاد توالی نشانه میتوکندری را پیش بینی می کند. هر سه نرم افزار با احتمال نسبتاً بالایی توالی انتهای آمین Ppic را به عنوان توالی نشانه (شبکه اندوپلاسمی) پیش بینی کردند. نرم افزار SignalP 3.0 توالی نشانه را با احتمال نسبتاً بالایی

دریافت‌کننده حامل نوترکیب pYST2-tfam (کنترل منفی)، قادر به رشد بر روی محیط انتخابی سوکروز و تشکیل کلنی نبودند (شکل ۵). مخمرهای ترانسفورم شده با حاملهای pYST0-ppic و pYST2-trmt1 نیز قادر به تشکیل کلنی روی محیط انتخابی سوکروز نبودند.

نتیجه حاصل از تعیین توالی و تأیید انطباق صحیح قالب قطعه ورودی با قالب اینورتاز در حاملهای نوترکیب را می‌توان در شکل‌های ۶، ۷، ۸ و ۹ مشاهده کرد.

نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمرز کلنی‌های ترانسفورم شده با ناقل‌های نوترکیب حاصل از همسانه سازی قطعات تکثیر یافته در حامل‌های منطبق در شکل ۳، قابل مشاهده می‌باشد.

در نتایج حاصل از انتقال حامل‌های نوترکیب به مخمر و کشت روی محیط انتخابی همانگونه که انتظار می‌رفت مخمرهای حاوی حامل نوترکیب pYST0-pi16 (کنترل مثبت) و تشکیل کلنی روی محیط انتخابی سوکروز بود. همچنین با توجه به انتظاری که می‌رفت مخمرهای



شکل ۶- نتیجه توالی‌یابی و تأیید انطباق صحیح قالب قطعه pi16 با قالب اینورتاز در ناقل pYST0؛ خط چین سمت چپ: توالی قطعه pi16 کدکننده توالی نشانه؛ خط چین سمت راست: توالی حامل pYST0؛ کادر: توالی هشت نوکلئوتیدی شناسایی آنزیم محدودگر NotI و سیتوزین اضافه در انتهای آغازگر برگشت که سه اسید آمینه آرژنین، گلیسین و آرژنین را کد می‌کند و قالب صحیح حفظ می‌شود.

کنترل منفی آزمایش انتخاب شد. بررسی توالی انتخاب شده در انتهای آمین Tfam، با دو نرم افزار Signalp 3.0 و Predisi، توالی نشانه را در این ناحیه پیش بینی می‌کند در حالی که بررسی ناحیه مذکور با نرم افزار Targetp، این توالی را به عنوان نشانه میتوکندری پیش بینی می‌کند.

نتایج حاصل از پیش بینی توالی انتهای آمین trmt1، مشابه با نتایج حاصل از پیش بینی نرم افزارها در خصوص توالی انتهای آمین Tfam، می‌باشد و به نظر می‌رسد این توالی، توالی نشانه میتوکندری باشد.

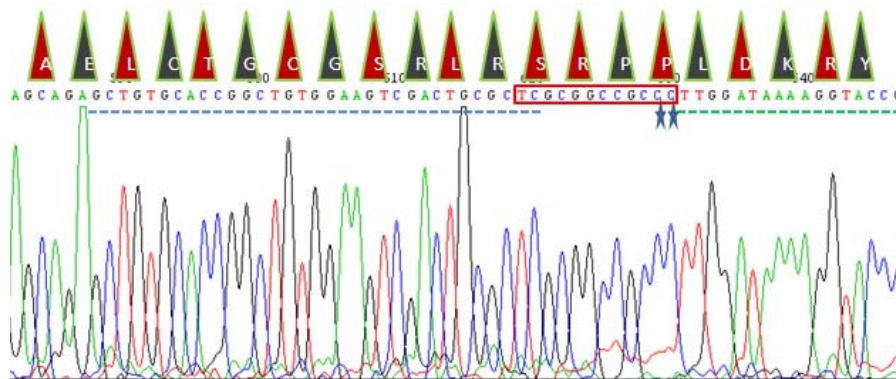
بحث

در این تحقیق جهت اطمینان از کارآمدی سیستم YST، در شناسایی عملکرد توالی نشانه از یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی نیز استفاده شد.

کنترل مثبت ۴۳ اسید آمینه انتهای آمین پروتئین Pi16 انتخاب شد که قبل از این، عملکرد آن به عنوان توالی نشانه شناسایی شده بود (۶). همچنین ۳۰ اسید آمینه انتهای آمین Tfam، که یک فاکتور رونویسی میتوکندریایی است و جایگاه عملکرد آن میتوکندری است به عنوان

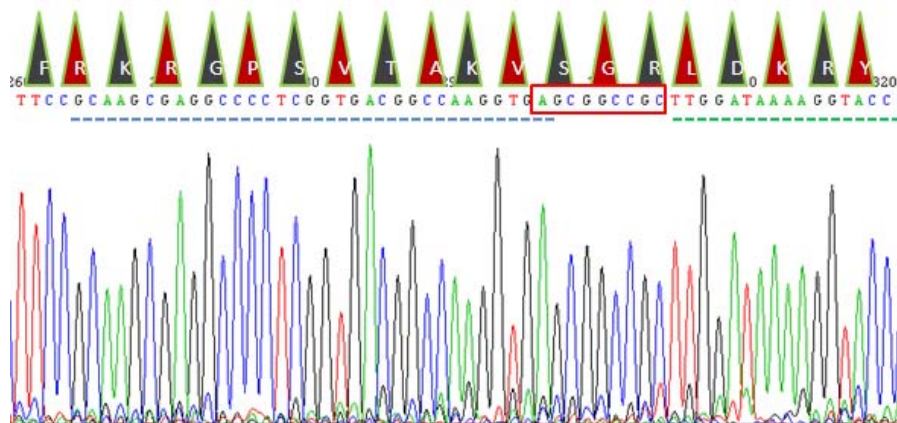
توجه به پیش‌بینی با احتمال بسیار زیاد این نرم‌افزارها به نظر می‌رسد این توالی، توالی نشانه شبکه آندوپلاسمی باشد.

هر سه نرم‌افزار Targetp، Signalp 3.0 و Predisi توالی انتهای آمین کد شده توسط رونوشت‌های ppic را همانند پیش‌بینی ارائه شده در خصوص توالی انتهای آمین pi16 (کنترل مثبت) به عنوان توالی نشانه پیش‌بینی می‌کنند و با

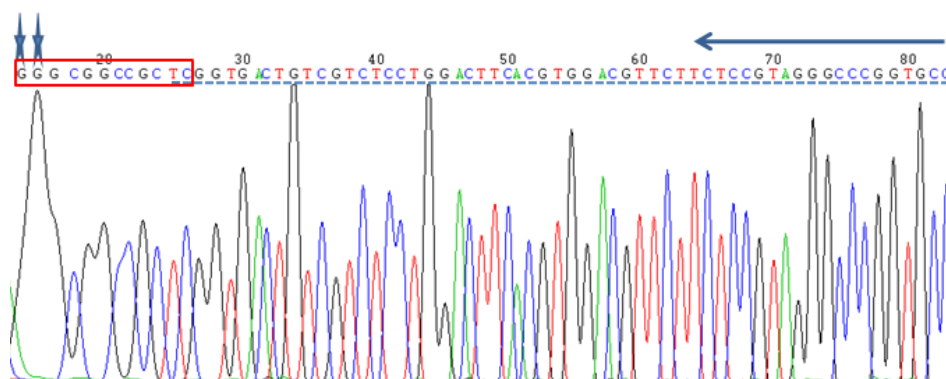


شکل ۷- نتیجه توالی‌یابی و تایید انطباق صحیح قالب قطعه tfam با قالب اینورتاز در ناقل pYST2؛ خط چین سمت چپ: توالی قطعه tfam کدکننده توالی نشانه میتوکندری؛ خط چین سمت راست: توالی حامل pYST2؛ کادر: توالی هشت نوکلئوتیدی شناسایی آنزیم محدودگر NotI و سیتوزین و تیمین اضافه در انتهای آغازگر برگشت و دو سیتوزین اضافه در بالادست ژن گزارشگر اینورتاز در ناقل pYST2 که در مجموع این ۱۲ نوکلئوتید ۴ اسید آمینه سرین، آرژنین، پرولین و پرولین را کد می‌کنند و قالب صحیح حفظ می‌شود.

** : دو سیتوزین اضافه در بالادست ژن گزارشگر اینورتاز در حامل pYST2



شکل ۸- نتیجه توالی‌یابی و تایید انطباق صحیح قالب قطعه ppic با قالب اینورتاز در ناقل pYST0؛ خط چین سمت چپ: توالی قطعه ppic کدکننده توالی نشانه پیش‌بینی شده با نرم‌افزار؛ خط چین سمت راست: توالی حامل pYST0؛ کادر: توالی هشت نوکلئوتیدی شناسایی آنزیم محدودگر NotI و آدنین اضافه در انتهای آغازگر برگشت که سه اسید آمینه سرین، گلیسین و آرژنین را کد می‌کنند و قالب صحیح حفظ می‌شود.



شکل ۹- نتیجه توالی‌یابی و تایید انطباق قالب قطعه *trmt1* با قالب اینورتاز در ناقل pYST2؛ این توالی با آغازگر برگشت (مکمل قسمتی از توالی اینورتاز حامل pYST2) توالی‌یابی شده است. خط چین سمت راست: توالی قطعه *trmt1* کدکننده توالی نشانه پیش‌بینی شده با نرم‌افزار ۴ کادر: توالی هشت نوکلئوتیدی شناسایی آنزیم محدودگر *NotI* و گوانین و آدنین (مکمل آنها سیتوزین و تیمین در شکل) اضافه در انتهای آغازگر برگشت و دو سیتوزین (مکمل آنها گوانین در شکل) اضافه در بالادست ژن گزارشگر اینورتاز در ناقل pYST2 که در مجموع این ۱۲ نوکلئوتید ۴ اسید آمینه کد می‌کنند و قالب صحیح حفظ می‌شود.

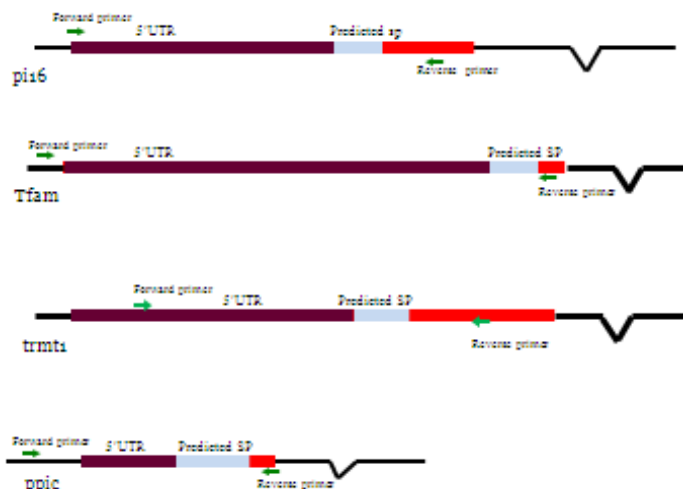
trm1 همولوگ *trmt1* در مخمر می‌باشد این آنزیم دارای دو ATG آغازی در آگزون شماره یک خود می‌باشد شروع فرآیند ترجمه از هریک از این ATG‌ها جایگاه آنزیم را درون سلول مشخص می‌کند به طوری که ترجمه از ATG بالا دستی توالی نشانه میتوکندی را کد می‌کند و آنزیم را به میتوکندی هدایت می‌کند اما ترجمه از ATG پایین دستی آنزیم را به سمت هسته هدایت می‌کند (۱۳). توالی آگزون یک *trmt1* که حاوی توالی پیش‌بینی شده به عنوان توالی نشانه توسط نرم‌افزار نیز بود به منظور شناسایی ATG‌های آغازی محتمل با نرم‌افزار *Dnafsmine* (dnafsmine.bic.nus.edu.sg) بررسی گردید که شامل سه ATG با قالب بازخواندنی صحیح می‌باشد (شکل ۱۱).

از سه ATG دو ATG (۳۵۱ و ۴۵۹)، در قالب بازخواندنی ژن *trmt1* قرار دارند که توالی ابتدایی کد شده با ATG شماره ۳۵۱، توالی مورد نظر این تحقیق بود با توجه به پیش‌بینی نرم‌افزار *TargetP* که قادر به پیش‌بینی توالی نشانه میتوکندی است و نیز مکان یابی آنزیم کد شده توسط همولوگ مربوط به مخمر در میتوکندی به نظر می‌رسد این توالی که با توالی همولوگ خود در مخمر شباهت زیادی ندارد توالی نشانه ورود به میتوکندی است.

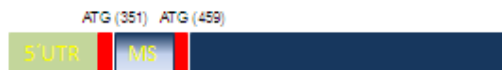
نرم‌افزارهای به کار گرفته شده در این تحقیق، *Signalp 3.0* و *Predisi* قادر به تمیز دادن نشانه‌های ترشحی از میتوکندیایی نمی‌باشند، همچنان‌که در مورد توالی نشانه میتوکندی *Tfam*، که در این نرم‌افزارها به عنوان توالی نشانه پیش‌بینی می‌شود می‌توان مشاهده کرد. در حالی‌که نرم‌افزار *Targetp*، توانایی پیش‌بینی هر دو نوع نشانه ترشح (شبکه اندوپلاسمی) و میتوکندیایی را دارد، بنابراین پیشنهاد می‌شود به منظور پیش‌بینی توالی نشانه حتماً نرم‌افزار *Targetp*، در کنار سایر نرم‌افزارها مورد استفاده قرار گیرد.

توالیهای پیش‌بینی شده به عنوان توالی نشانه را به همراه ناحیه ترجمه نشونده ۵' (5' UTR) بالا دست که در بر دارنده عناصر لازم جهت ترجمه است با واکنش زنجیره ای پلیمراز از ژنوم انسان جدا نموده و در سیستم YST، مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۹).

از چهار توالی بررسی شده تنها توالی بررسی شده *Pi16* که کنترل مثبت آزمایش بود در این سامانه به عنوان توالی نشانه دارای عملکرد تشخیص داده شد.



شکل ۱۰- نمایی شماتیک از اگزون اول ژن های pi16، Tfam، ppic و trmt1. محل اتصال آغازگرها و ناحیه کد کننده توالی نشانه.



شکل ۱۱- نمایی شماتیک از اگزون اول trmt1 انسان و موقعیت ATG‌های آغازی آن؛ MS: توالی نشانه میتوکندری پیش بینی شده با نرم افزار TargetP؛ 5'UTR: ناحیه ترجمه نشونده 5'.

تعدادی از توالیهای نشانه شناخته شده پروتئینهای موش شامل FLK1 و H-cadherin، C10 نیز قبلاً با سامانه YST، مورد سنجش قرار گرفتند که در این سیستم عملکرد توالی نشانه را نشان ندادند (۷).

یک توضیح احتمالی جهت فقدان عملکرد پپتیدهای نشانه جانوری در سیستم YST، را می‌توان به تفاوت تمایل ماشین ترش‌چی ارگانیزمهای مختلف به توالیهای نشانه گوناگون نسبت داد به طوری که فرآیند انتقال همراه با ترجمه، از باکتری تا انسان به طور بسیار محافظت شده کشف شده است. این در حالی است که در میکرو ارگانیزمها دو مسیر موازی یعنی انتقال پس ترجمه‌ای و انتقال همزمان با ترجمه شناخته شده است.

انتخاب هریک از این مکانیزمها به وسیله میکروارگانیزم به خصوصیات توالی نشانه و شناسایی آن توسط SRP، مربوط می‌شود.

برخلاف SRP‌های پستانداران که تمامی توالیهای نشانه را شناسایی می‌کند. SRP های باکتری و مخمر عمدتاً به

احتمال حضور توالی نشانه در انتهای آمین پروتئین Ppic: سیکلوفیلین C موش دارای توالی نشانه شناخته شده است و به عنوان پروتئین ترش‌چی از رده سلولی استرومای مشتق از مغز استخوان جدا شد. توالی نشانه پیش بینی شده در سیکلوفیلین C انسان همانندی زیادی با توالی نشانه سیکلوفیلین C موش دارد (۵).

هرچند توالی پیش بینی شده به عنوان توالی نشانه در سیکلوفیلین C انسان، در سیستم YST، عملکرد نداشت اما با توجه به شباهت زیاد (۸۵ درصد) این توالی با توالی نشانه همولوگ خود در موش و پیش بینی قوی همه نرم‌افزارهای به کار برده شده، با احتمال زیاد این توالی نیز توالی نشانه باشد. توالی هدف در مخمر برای یافتن توالیهای مشابه جستجو گردید، چرا که ممکن است مخمر دارای توالی نشانه مشابه با توالی نشانه مورد نظر باشد و در این صورت می‌توان عدم عملکرد آن را به اجرای سیستم نسبت داد. اما جستجوی همانندی نتیجه‌ای در بر نداشت.

تفاوت در عناصر لازم برای ترجمه و تفاوت در ناحیه ترجمه نشونده در بالادست توالی نشانه یوکاریوت‌های عالی و ابتدایی ممکن است توجیهی جهت عدم عملکرد توالی‌های نشانه یوکاریوت‌های عالی در سامانه YST باشد (۷).

توالی‌های نشانه بسیار آبگریز متصل می‌شوند. پروتئین‌هایی که آبگریز بودن توالی نشانه آنها، پایین‌تر از یک حد آستانه است به وسیله SRP مخمر شناسایی نشده و لذا مسیر انتقال پس ترجمه‌ای را طی می‌کنند (۳ و ۲۰). از طرفی

منابع

- Chen, J. and J.R. Patton. 1999. Cloning and characterization of a mammalian pseudouridine synthase. *RNA*, 5: 409-19.
- Clark, H.F. 2003. The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment. *Genome Res*, 13: 2265-70.
- de Gier, J.W. 1998. Differential use of the signal recognition particle translocase targeting pathway for inner membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 14646-51.
- Diehn, M. 2006. Genome-scale identification of membrane-associated human mRNAs. *PLoS Genet*, 2(1):e11. Epub 2006 Jan 13.
- Friedman, J. and I. Weissman. 1991. Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA. *Cell*, 66: 799-806
- Frost, R.J. and S. Engelhardt. 2007. A secretion trap screen in yeast identifies protease inhibitor 16 as a novel antihypertrophic protein secreted from the heart. *Circulation*, 116(16):1768-75.
- Galliciotti, G. 2001. Signal-sequence trap in mammalian and yeast cells: a comparison. *J Membr Biol*, 183: 175-82
- Hansen, W. and P. Walter. 1988. Preprocarboxypeptidase Y and a truncated form of pre-invertase, but not full-length pre-invertase, can be posttranslationally translocated across microsomal vesicle membranes from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 106: 1075-81
- Imai, T. 1996. Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J Biol Chem*, 271: 21514-21
- Klee, E.W. and L.B. Ellis. 2005. Evaluating eukaryotic secreted protein prediction. *BMC Bioinformatics*, 6: 256
- Kojima, T. and T. Kitamura. 1999. A signal sequence trap based on a constitutively active cytokine receptor. *Nat Biotechnol*, 17: 487-90.
- Lee, S.J., B.D. Kim., J.K. Rose. 2006. Identification of eukaryotic secreted and cell surface proteins using the yeast secretion trap screen. *Nat Protoc*, 1: 2439-47.
- Martin, N.C. and A.K. Hopper. 1994. How single genes provide tRNA processing enzymes to mitochondria, nuclei and the cytosol. *Biochimie*, 76: 1161-7.
- Moffatt, P. 2002. Engineered viruses to select genes encoding secreted and membrane-bound proteins in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 30: 4285-94.
- Nickel, W., et al., 2005. Unconventional secretory routes: p. direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic*, 6: 607-14.
- Pietro, F., et al., 2011. Genomic DNA extraction from whole blood by rapid phenol-chloroform protocol: a useful tool for genetic epidemiology studies. *Mol Cell Probes*, 25: 44-8.
- Swords, E.W., et al., 2003. Chemical Transformation of *E. coli*. *Methods in Molecular Biology*, 235: 49-53.
- Tan, R., X. Jiang, A. Jackson. 2003. *E. coli* selection of human genes encoding secreted and membrane proteins based on cDNA fusions to a leaderless beta-lactamase reporter. *Genome Res*, 13(8): p. 1938-43.
- Thompson, J.R. 1998. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. *Yeast*, 14: 565-71.
- Ulbrandt, N.D., J.A. Newitt, H.D. Bernstein. 1997. The *E. coli* signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins. *Cell*, 88: 187-96.
- von Heijne, G., 1990. The signal peptide. *J Membr Biol*, 115: 195-201.
- Welsh, J., et al., 2003. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in

Test functionality of the human Trmt1 and Ppic predicted signal peptides by yeast secretion trap (YST)

Hosseini S.E., Mohammad Soltani B. and Behmanesh M.

Genetics Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Secreted and transmembrane proteins are key players in various biological processes. they are accessible to various drug delivery mechanisms and they have a critical role as diagnostic and prognosis factors in clinical states . There are several bioinformatic softwares applied in the prediction of signal peptides and there are several experimental methods to trap signal peptides and identify secreted and transmembrane proteins. YST abbreviated form of yeast secretion trap is one of experimental methods based on pYST vectors and a host *Saccharomyces cerevisiae* strain 066-2. The host yeast is mutant and lacks invertase. The three pYST expression vectors encoding a mutant invertase in one of three frames and lacking the start codon and signal sequence. In this work we intended to set up YST system and for this purpose we examined two electronically predicted signal sequences in the amino terminal of cyclophilin c (ppic) and tRNA methyl transferase (Trmt1) human proteins. In addition we used putative signal sequence of pil6 as positive control and putative mitochondrial signal sequence of Tfam as the negative control to confirm functionality of the system. these sequences were amplified by PCR and then cloned to in frame in pYST expression vectors. Subsequently, The host yeast strain 066-2 recombinant were transformed with recombinant vectors and cultured on the selective agar media. The results of experiments confirmed the functionality of the system. Neither trmt1 nor ppic amino terminal predicted signal sequence did not function as signal sequence in this system.

Key words: signal peptide, yeast secretion trap (YST), Ppic, Trmt1