

مهندسی آنزیم درمانی اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس با استفاده از روش جهش‌زایی هدف‌دار

لیلا رضائیان مرجانی^۱، مهدی ایمانی^{۲،*}، حسین زارعی جلیانی^۳

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۰۸/۱۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۱۰/۲۹

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس (EC 1.7.3.3) به‌عنوان یک آنزیم دارویی دارای کاربردهای درمانی از جمله کاهش اورات سمی بوده و در درمان بالینی اختلالات نقرس، نفروپاتی و هایپراوریسمی ناشی از سندروم لیز توموری (TLS) استفاده می‌شود. علی‌رغم داشتن تمایل و ویژگی بالا در تبدیل سوبسترا به محصول، پایداری کم آن در برابر حرارت، کاربرد آن را با محدودیت مواجه ساخته است. برای حل این چالش راهکارهای متعددی وجود دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به مهندسی پروتئین و دستکاری ژنتیکی اشاره کرد. هدف از این تحقیق طراحی و ایجاد پل‌های دی‌سولفیدی برای اولین بار در آنزیم اوریکاز می‌باشد. **مواد و روش کار:** در این تحقیق با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیکی و سرورهای موجود و با در نظر گرفتن کد Lxxj pdb، موقعیت‌های صحیح برای ایجاد پیوند دی‌سولفیدی در آنزیم اوریکاز انتخاب شد. سپس با روش جهش‌زایی هدف‌دار و روش SOE-PCR جهش‌های انتخابی ایجاد شدند. **یافته‌ها:** شش جایگاه احتمالی تشکیل پیوند دی‌سولفیدی گزینش شد که شامل سه پیوند دی‌سولفیدی داخل زنجیره‌ای و سه پیوند دی‌سولفیدی بین زنجیره‌ای شامل Ser 145-Thr 185، Ala 235-Val 248، His 256-Gln 281، Ala 6-Cys290، Ser282-Ser282، Asn12-Asp283 می‌باشند که با جهش دادن آن‌ها به سیستمین پیوند دی‌سولفیدی تشکیل می‌شود. در این پروژه نتایج حاصل از SOE-PCR و کلونینگ برای جهش نقطه‌ای Ala6 و Ser282 با موفقیت توسط روش‌های کلونی PCR و هضم آنزیمی و در نهایت تعیین توالی، تأیید شدند. **بحث و نتیجه‌گیری:** در این تحقیق با موفقیت مکان‌هایی برای جهش به اسیدآمینه سیستمین تعیین شد و توسط روش SOE-PCR با موفقیت جهش‌زایی انجام شد.

کلیدواژه‌ها: اوریکاز، پیوند دی‌سولفیدی، جهش‌زایی هدف‌دار، SOE-PCR، نقرس

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و نهم، شماره اول، ص ۶۲-۵۰، فروردین ۱۳۹۷

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، بخش بیوشیمی، ۳۱۹۴۲۶۱۸-۰۴۴

Email: m.imani@urmia.ac.ir

مقدمه

این آنزیم به‌صورت هموترامر و با جرم مولکولی ۱۳۵ کیلو دالتون فعالیت دارد (۱-۳). اوریکاز یک آنزیم کلیدی در مسیر تخریب نوکلئوتیدهای پورینی است. در این مسیر اوریکاز بعد از عمل گزانتین اکسیداز فعالیت می‌کند (۴). علی‌رغم توزیع گسترده این آنزیم در میکروارگانیسم‌ها و پستانداران ژن اوریکاز در ژنوم پریما‌ت‌های بالاتر و انسان به دلیل وقوع جهش‌هایی بیان نمی‌شود بنابراین این جانداران فاقد اوریکاز عملکردی بوده و در آن‌ها اسید اوریک به‌عنوان محصول نهایی کاتابولیسم پورین‌ها تولید می‌شود. این امر منجر به افزایش غلظت اسید اوریک در خون شده خطر ابتلا به بیماری هیپراوریسمی (افزایش شدید اسید اوریک خون) در انسان

آنزیم اوریکاز یا اورات اکسیداز متعلق به کلاس اکسیدازهای بدون کوفاکتور بوده و یک آنزیم تترامر است. اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس (EC1.7.3.3; UOX)، اکسیداسیون اسید اوریک را در حضور اکسیژن مولکولی به ۵-هیدروکسی ایزواورات (5-hydroxyisourate) و H₂O₂ کاتالیز می‌کند. سپس این ترکیب حد واسط طی یک واکنش غیر آنزیمی به یک ترکیب محلول قابل دفع یعنی آلانتوئین و همچنین دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌شود (۱). از دیدگاه بیوشیمیایی، آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس با جرم مولکولی ۳۴/۵ کیلو دالتون و دارای ۳۰۲ اسیدآمینه می‌باشد

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، دپارتمان بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۲ استادیار، دکتری تخصصی بیوشیمی، بخش بیوشیمی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استادیار، دکتری تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

را بالا می‌برد (۵). ثابت شده است که محدوده طبیعی غلظت اسید اوریک در سرم انسان، بین $1/5 - 6$ میلی‌گرم بر دسی لیتر در زنان و $2/5 - 7$ میلی‌گرم بر دسی لیتر در مردان است (۶). فقدان آنزیم اوریکاز همچنین به عنوان یک مزیت تکاملی از نظر طول عمر و حفاظت در مقابل سرطان در نظر گرفته شده است (۴). اسید اوریک، یک محصول جانبی متابولیسم نوکلئوتیدی بوده که باید از جریان خون پاک شود. تجمع اسید اوریک در خون می‌تواند باعث بیماری‌های قلبی عروقی شده و یک عامل مستعد ابتلا به بیماری نقرس و نقرپاتی حاد یا مزمن است. علاوه بر این رسوب کریستال‌های اورات منجر به تشکیل سنگ کلیه، نقرس روده و کلسیفیکاسیون پوست می‌شود (۷-۸). اورات اکسیداز یک آنزیم با کاربردهای درمانی و تشخیصی است که با کاهش تجمع اورات سمی برای درمان بالینی اختلالات نقرس و نقرپاتی‌ها و همچنین هیپراوریسمی استفاده می‌شود. علاوه بر این در کاهش اسید اوریک ناشی از سندروم لیز توموری (TLS) نیز مؤثر می‌باشد. TLS شامل مجموعه اختلالات متابولیکی است که معمولاً پس از درمان مؤثر بعضی از تومورهای بدخیم و لوسمی‌ها بروز می‌کند. هیپراوریسمی یکی از عوارض این سندروم می‌باشد (۹).

اوریکاز به‌طور طبیعی در بسیاری از پستانداران یافت می‌شود و اسید اوریک را به آلانتوئین که ۱۰ برابر محلول‌تر از اسید اوریک است تبدیل کرده و این ماده به راحتی توسط کلیه‌ها دفع می‌شود (۱۰). راسبوریکاز آنزیم اورات اکسیداز نو ترکیب اسپرژیلوس فلاووس می‌باشد که در ساکارومایسز سرویزیه بیان شده است و امروزه به صورت کلینیکی استفاده می‌شود. این آنزیم توسط موسسه غذا و داروی آمریکا (FAD) تأیید شده است. Elitek و Fasturtec نام تجاری این آنزیم می‌باشد (۱۱).

آنزیم‌ها به عنوان دارو با داشتن تمایل بالا و توانایی تبدیل تعداد زیادی مولکول هدف به محصول از سایر انواع داروها متمایز می‌شوند. این دو ویژگی آنزیم‌ها را به داروهای اختصاصی و قدرتمندی تبدیل کرده است که توانایی انجام واکنش‌های بیوشیمیایی را دارند (۱۲). یکی از مشکلات پیش روی آنزیم‌های دارویی پایداری کم آن‌ها در برابر حرارت می‌باشد که برای مقابله با این چالش راهکارهای مختلفی استفاده شده است که می‌توان به مهندسی پروتئین و دستکاری ژنتیکی اشاره کرد. بنابراین بهبود مقاومت حرارتی آنزیم کاملاً ضروری می‌باشد. یک آنزیم پایدار از لحاظ حرارتی و دارای خواص بهبود یافته با استفاده از فناوری‌های مختلف نظیر جهش‌زایی هدف‌دار، شبیه‌سازی و جهش‌زایی تصادفی ایجاد می‌شود. از آنجاکه افزایش ثبات آنزیم‌ها یک هدف عمده مهندسی پروتئین می‌باشد برای بهبود پایداری آنزیم چندین استراتژی از جمله ایجاد میانکنش ضعیف مانند پیوندهای هیدروژنی، میانکنش‌های هیدروفوب و ایجاد

پیوند کووالانسی نظیر پیوندهای دی‌سولفیدی پیشنهاد شده است از میان این استراتژی‌ها، ایجاد پل‌های دی‌سولفیدی یکی از مهم‌ترین راهکارهای بهبود پایداری حرارتی پروتئین است (۱۳). از نظر بیوشیمیایی پیوند دی‌سولفیدی یک پیوند کووالان محسوب می‌شود که از واکنش بین دو گروه تیول تشکیل می‌گردد. این پیوند نسبتاً قوی که دارای انرژی تجزیه پیوندی حدود 60 kcal/mol می‌باشد، به پیوند S-S یا پل دی‌سولفیدی نیز معروف است. مشخص شده است که پروتئین‌های دارای پیوند دی‌سولفیدی پایدار به ندرت در بخش سیتوپلاسمی یافت می‌شود و اغلب در پروتئین‌های خارج سلولی و غشا سلول‌ها موجود هستند. این امر مربوط به طبیعت احیایی سیتوپلاسم و طبیعت اکسیدکننده محیط خارج سلولی می‌باشد. این پیوندها در باکتری‌ها معمولاً در بخش‌های خارج سلولی یا محیط ترشحی یافت می‌شوند زیرا محیط موجود در داخل سلول‌ها، شدیداً احیاکننده بوده و از ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی ممانعت می‌کند. در یوکاریوت‌ها پیوندهای دی‌سولفیدی اساساً در پروتئین‌های ترشحی خارج سلولی (هورمون انسولین، آلبومین، آنتی‌بادی و...) یافت می‌شود، زیرا پروتئین خارج سلولی در معرض انواع استرس‌ها قرار دارد لذا باید مستحکم باشد. پرواضح است که اتصالات دی‌سولفیدی باعث استحکام ساختار پروتئین می‌شوند این پیوندها در سلول‌های یوکاریوتی تنها در لومن شبکه آندوپلاسمی خشن تشکیل می‌شوند و این به دلیل وجود آنزیم پروتئین دی‌سولفید ایزومراز (PDI) است که تشکیل مؤثر پیوندهای دی‌سولفیدی وابسته به این آنزیم می‌باشد (۱۴).

آزمایش‌های مختلف بر روی ریبونوکلاز پانکراس نشان می‌دهد که تشکیل پل دی‌سولفید به صورت خودبه‌خود و فرآیند غیرآنزیمی می‌باشد که در حضور اکسیژن و محیط‌های غیراحیایی رخ می‌دهد. علاوه بر این گزارش شده است که پروتئین‌هایی مانند یک نسخه از یوروکیناز موشی با شش پیوند دی‌سولفیدی، آلکانل فسفاتاز با دو پیوند دی‌سولفیدی و فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی انسانی (tPA) با هدفه پیوند دی‌سولفیدی می‌توانند به درستی فولد شده و قابلیت بیان در سیتوزول اکسیداتیو *E. coli* را داشته و پل دی‌سولفیدی به‌طور طبیعی در این پروتئین‌ها یافت می‌شود (۱۵).

آنزیم اوریکاز اسپرژیلوس فلاووس در حالت طبیعی دارای سه سیستمین می‌باشد ولی هیچ‌کدام توانایی تشکیل پیوند دی‌سولفیدی ندارند. هدف از این تحقیق طراحی و پیدا کردن جایگاه مناسب برای ایجاد پل دی‌سولفیدی در آنزیم درمانی اوریکاز اسپرژیلوس فلاووس می‌باشد.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی و آنزیم‌ها:

فاصله بین دو کربن β و فاصله بین دو گروه سولفور موجود در دو اسیدآمینه سیستمین اشاره کرد همچنین میزان دسترس پذیری و فاکتور B (آزادی حرکت) اسیدآمینه موردنظر، طول لوپ که توسط دو سیستمین هنگام تشکیل پیوند دیسولفیدی بسته می شود و تغییرات حجمی ناشی از ایجاد پیوند دیسولفیدی در تعیین جایگاه مناسب مدنظر قرار می گیرند (۱۶).

از بین جهش های پیشنهادی توسط سرور MODIP، با در نظر گرفتن اسیدآمینه های مهم و حیاتی در جایگاه فعال و کاتالیز آنزیمی، شش جایگاه انتخاب شدند که جهش آنها به سیستمین باعث تشکیل پیوند دیسولفیدی داخل زنجیره ای و بین زنجیره ای می شود (جدول ۱).

جدول (۱): موقعیت های انتخاب شده در توالی اسیدآمینه ای

اوریکاز برای جهش به سیستمین	
موقعیت های انتخابی داخل زنجیره -	موقعیت های انتخابی بین زنجیره ای
Ala6 – Cys290	Ser145-Thr185
Ser282 – Ser282	Ala235-Val248
Asn12- Asp283	His256-Gln281

جهش زایی هدف دار:

از ژن سنتتیک اوریکاز موجود در ناقل pET28a(+) به عنوان الگو برای جهش زایی استفاده شد (۱۷). روش مورد استفاده برای جهش Ser282-Ser282، -SOE-PCR بود. با استفاده از نرم افزار Gene Runner پرایمرهای زیر برای تبدیل Ser282 به Cys282 طراحی شدند (جدول ۲).

آنزیم DNA Pfu پلیمراز از شرکت ویوانتیس، آنزیم Taq پلیمراز و مخلوط dNTP از شرکت سیناژن، نردبان 1kb DNA از شرکت ویوجین، آنزیم های NcoI، XhoI و T4 DNA لیگاز از شرکت ترموساینترفیک، کیت های استخراج پلاسمید و تخلیص از ژل از شرکت Gene all، تربیتون از شرکت کیولب، عصاره مخمر از شرکت شارلو، آنتی بیوتیک کانامایسین از شرکت سیگما و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک تهیه شدند.

میکروارگانیسیم ها و پلاسمیدها:

سویه های Top10، Shuffle، و Bl21(DE3) اشریشیاکلی از مرکز تحقیقات پاستور تهران تهیه شدند تا به عنوان میزبان های کلونینگ و بیانی مورد استفاده قرار گیرند. پلاسمید مورد استفاده در این تحقیق یعنی pET-28a(+) نیز از مرکز تحقیقات پاستور تهیه شد.

مطالعات بیوانفورماتیکی:

به منظور طراحی و ایجاد پل دیسولفیدی، ساختار بلوری اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس تترامر با کد بانک اطلاعاتی پروتئین (PDB:1XXJ) به عنوان یک مدل برای انتخاب مکان مناسب اسیدآمینه سیستمین و تشکیل پل های دیسولفیدی استفاده شد. پیش بینی موقعیت جهش ها به صورت in silico به کمک تجزیه و تحلیل ارائه شده توسط سرور MODIP انجام گرفت. برای بررسی ساختار سه بعدی آنزیم های طبیعی و مهندسی شده و مدل سازی جهش ها از نرم افزار Swiss_PDB Viewer استفاده گردید.

سرور MODIP با در نظر گرفتن پارامترهای کنفورماسیونی خاصی که در پیوند دیسولفیدی به حالت طبیعی یافت می شود، جایگاه های احتمالی مناسب تشکیل پیوندهای دیسولفیدی را ارائه می کند. از جمله این پارامترها می توان به فاصله بین دو کربن α .

جدول (۲): پرایمرهای طراحی شده برای ایجاد جهش های سرین ۲۸۲ و آلانین ۶ به سیستمین

توالی	
Ser282Cys پرایمر	
AGT to TGC	
pET28a forward	F: 5'-TGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAAC -3'
Reverse (mutant)	R: 5'-CCGTTCGATCgcaTTGGGGCGCAAAGACCTC -3'
Forward (mutant)	F: 5'-CCCCAAATgcGATCCGAACGGTCTG-3'
pET28a reverse	R: 5'-AAAGGGAGCCCCGATTTAGAGC-3'
Ala6Cys پرایمر	
GCG to TGC	
Forward (mutant)	F: 5'-AAGGAGCCATGGCAGCCGTGAAGGCAtgcCGCTATGGTAAAGAC-3'
Reverse (mutant)	R: 5'-AAAGGGAGCCCCGATTTAGAGC-3'

استفاده از نرم افزار A plasmid Editor به شرح زیر محاسبه شد: طول قطعه تکثیر یافته در PCR مرحله اول: ۱۱۶۱ bp، طول قطعه

لازم به ذکر می باشد که پرایمرهای pET28F و pET28R برای خود پلاسمید طراحی شد. طول قطعات تکثیر یافته در هر مرحله با

تکثیر یافته در PCR مرحله دوم: ۴۲۷ bp، و طول قطعه تکثیر یافته در PCR مرحله سوم: ۱۵۶۸ bp.

به این ترتیب با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده و طی سه مرحله PCR جداگانه، جهش نقطه‌ای موردنظر حاصل شد.

آنزیم DNA Pfu پلیمرز یک آنزیم مقاوم به حرارت بوده که علاوه بر فعالیت پلیمرازی در جهت ۵' به ۳' دارای فعالیت اگزونوکلازی در جهت ۳' به ۵' یعنی تصحیح خطا (proofreading) نیز است. DNA Pfu پلیمرز کم‌ترین میزان خطا را نسبت به هر DNA پلیمرز مقاوم به حرارت نشان می‌دهد. در نتیجه این آنزیم برای واکنش‌های پلیمریزاسیون موردنیاز برای سنتز با صحت و دقت (Fidelity) بالا مفید است. برای PCR معمولی و برای شناسایی ساده محصول، DNA Taq پلیمرز مناسب است، در حالی که برای PCR با دقت بالا مانند کلونینگ ژن، بیان ژن یا بررسی جهش، DNA Pfu پلیمرز توصیه می‌شود (۱۸). بنابراین برای وجود صحت کامل در رونوشت‌های DNA و جلوگیری از بروز جهش‌های ناخواسته در توالی موردنظر از آنزیم DNA Pfu پلیمرز استفاده شد.

از پلاسمید حاوی ژن UOX طبیعی به عنوان الگو برای PCR های ۱ و ۲ تحت شرایط زیراستفاده شد. واسرشت شدن اولیه ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه (۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه برای ۳ دقیقه) و مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه صورت گرفت.

برای بررسی صحت PCR از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. بافر بکار رفته برای الکتروفورز اسیدهای نوکلئیک، بافر TBE (5X) می‌باشد. محتویات این بافر شامل تریس بازی Tris (base) ۱/۱ مولار، اسید بوریک (Boric Acid) ۹۰۰ میلی مولار و EDTA ۲۵ میلی مولار در pH برابر با ۸/۲ و حجم نهایی یک لیتر است. که سپس با نسبت ۱ به ۱۰ رقیق گشته و بافر 0.5X را برای ژل گذاری استفاده می‌شود. ژل آگارز ۱ درصد (یک گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی لیتر از بافر TBE (0.5X) تهیه شد رنگ آمیزی ژل توسط محلول اتیدیوم بروماید انجام گرفت در حضور این ماده مولکول‌های DNA در برابر تابش نور UV خاصیت فلورسانسی پیدا می‌کنند. نمونه‌های PCR در حضور نردبان ۱kb در روی ژل بارگذاری شدند، باندهای مربوط به قطعات تکثیر یافته در PCR های ۱ و ۲، به کمک اسکالپل تمیز، سریع از ژل برش داده شد این مرحله باید با سرعت انجام شود و محصول PCR کم‌تر در معرض اشعه UV ساطع شده از دستگاه قرار گیرد. در نهایت تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص از ژل انجام شد.

رشته الگو برای PCR سوم شامل همین قطعات تکثیر یافته و تخلیص شده PCR های ۱ و ۲ می‌باشد. با استفاده از این قطعات الگو و پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده مربوط به خود پلاسمید pET28a(+) چرخه حرارتی بشرح زیر برای PCR سوم برنامه‌ریزی شد. لازم به ذکر است که در این مرحله میکروتیوب حاوی تمام اجزای PCR به غیر از پرایمرهای رفت و برگشت اختصاصی برای پلاسمید می‌باشد. دمای واسرشت شدن اولیه ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه، ۱۵ چرخه (۹۴ درجه برای ۱ دقیقه، ۵۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه به مدت ۴ دقیقه). بعد از اتمام ۱۵ چرخه فوق و اتصال دو قطعه در محل جهش نقطه‌ای، پرایمرهای رفت و برگشت مربوط به پلاسمید (ابتدا و انتهای ژن) به محتویات میکروتیوب افزوده شد و به منظور تکثیر قطعه موردنظر برنامه PCR زیر اجرا شد. واسرشت شدن اولیه ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۳۰ چرخه (۹۴ درجه برای یک دقیقه، ۵۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه به مدت ۴:۳۰) و طویل شدن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه صورت گرفت.

با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد قطعه ۱۵۶۸ bp تکثیر یافته در PCR سوم که حاوی جهش نقطه‌ای Ser282 به Cys282 می‌باشد رویت و سریع از روی ژل برش داده شد. در مورد جهش Ala6-Cys290 جهش نقطه‌ای موردنظر با استفاده از پرایمرهای جدول ۲ و طی انجام یک PCR معمولی در قالب برنامه ارائه شده برای PCR های ۱ و ۲ جهش Ser282، رخ داد.

بعد از اتمام پلیمریزاسیون باند ۱۲۷۵ bp مربوط به قطعه تکثیر یافته که حاوی جهش Ala6 به Cys6 می‌باشد از ژل برش یافت و توسط کیت تخلیص از ژل خالص‌سازی شد.

واکنش هضم آنزیمی:

توالی کد کننده آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس (AFUOX) که بهینه‌سازی شده و به صورت سنتتیک تهیه گردیده است در سمت ۵' ژن دارای محل برش برای آنزیم NcoI و در سمت ۳' دارای محل برش برای آنزیم XhoI می‌باشد همچنین قبل از محل برش آنزیم XhoI، توالی کد کننده برای برچسب هیستیدین (6xHis) و کدون پایان نیز قرار دارد. ناقل کلونینگ مورد استفاده pET28a(+) می‌باشد و ژن AFUOX در این ناقل بین محل برش آنزیم‌های NcoI و XhoI کلون شده است (۱۷).

ژن اوریکاز دارای ۹۲۹ نوکلئوتید است محصولات تکثیر یافته در طی واکنش PCR دارای قطعاتی از ناقل pET28a(+) نیز می‌باشند که همراه با ژن موردنظر و توسط پرایمرهای اختصاصی مربوط به ناقل تکثیر یافته‌اند به این منظور محصولات با آنزیم‌های محدودکننده فوق، هضم شدند. برای برش ۳۵ میکرولیتر از محصول PCR نهایی مربوط به هر یک از جهش‌ها با ۱ میکرولیتر از هر یک

رسوبات باکتری طی دو مرحله در کلسیم کلراید و گلیسرول ۱۵ درصد شناور شد و در نهایت در ویال‌های جداگانه و در حجم موردنظر تقسیم شد. برای اطمینان از زنده‌مانی و رشد باکتری‌ها، یک ویال را به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته و در محیط LB جامد فاقد آنتی بیوتیک کشت داده شد (۱۹).

انتقال پلاسمید (ناقل):

انتقال پلاسمید به روش شیمیایی صورت گرفت. ۱۰ میکرولیتر از محصولات لیگاسیون به میکروتیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر باکتری اشریشیاکلی مستعد اضافه شد به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. به‌منظور ایجاد شوک حرارتی، انکوبه کردن میکروتیوب‌های حاوی باکتری مستعد و ناقل به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سلسیوس انجام شد. جهت رشد بهتر باکتری‌های پذیرنده ناقل، ۹۰۰ میکرولیتر محیط مغذی SOC به میکروتیوب‌ها اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با ۱۵۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند. سپس محتویات میکروتیوب‌ها به مدت ۳ دقیقه در ۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و رسوب باقیمانده در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط SOC شناور شد. در نهایت روی پلیت‌های LB جامد حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر کشت داده شدند و پلیت‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ انکوبه شد. همچنین باکتری مستعد در محیط دارای آنتی بیوتیک به‌عنوان کنترل منفی کشت داده شد (۱۹).

تأیید ایجاد جهش موردنظر:

پس از به‌دست آمدن تک کلونی‌های از هر یک از جهش‌ها با استفاده از کلونی PCR، وارد شدن ژن‌های UOX جهش یافته به داخل پلاسمید با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به خود ناقل تأیید شدند. از آنزیم DNA Taq پلیمرز استفاده شد یک تکه از هر کلونی نیز نقش الگو را داشت. شرایط واکنش PCR به‌صورت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه، ۳۰ چرخه با شرایط (۱ دقیقه در ۹۴ درجه، ۱ دقیقه در ۵۵ درجه و ۸۰ ثانیه در ۷۲ درجه) و در نهایت یک چرخه ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه تنظیم شد.

تهیه پلاسمید در مقیاس کم (Miniprep): از هر یک از کلونی‌های به‌دست آمده از جهش‌های موردنظر که وجود ژن UOX در آن‌ها طی واکنش کلونی PCR تأیید شد دو یا سه عدد به‌طور تصادفی انتخاب شد و هر یک در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شد و عمل استخراج پلاسمید در مقیاس کم با استفاده از روش لیز قلیایی توسط کیت استخراج پلاسمید باهدف لیز کردن باکتری‌ها و استخراج پلاسمید

از آنزیم‌های NcoI و XhoI مخلوط شد و میکروتیوب‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. ژن حاوی آنزیم‌های جهش یافته در مرحله بعد به ناقل pET28a(+) الحاق خواهد شد بنابراین ۳۵ میکرولیتر از پلاسمید نیز تحت واکنش هضم دوگانه با آنزیم‌های محدودکننده مذکور قرار گرفت تا از فرم حلقوی به فرم خطی تبدیل شده و قابلیت دریافت ژن را داشته باشد. جهت بررسی صحت واکنش هضم، هر سه قطعه برش یافته روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند و باندهای مربوطه توسط اسکالپل تمیز، سریعاً بریده شد و قطعات نازک ژل توسط کیت استخراج از ژل، تخلیص شدند (۱۹).

واکنش لیگاسیون (الحاق):

جهش یافته‌های Ser282/Cys و Ala6/Cys با نسبت ۳ به ۱ با ناقل pET28a(+) در حضور آنزیم T4 لیگاز، به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۶ درجه تحت واکنش لیگاسیون قرار گرفت. همچنین به‌عنوان کنترل (Self-ligation) یک میکروتیوب حاوی ناقل و بدون هیچ ژنی تحت شرایط فوق قرار گرفت.

کلونینگ و انتقال ناقل حاوی ژن‌های جهش یافته به باکتری

E.coli سویه TOP10

کشت باکتری:

یک خراش از باکتری اشریشیاکلی سویه TOP10 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۵ سی سی محیط کشت اولیه LB مایع در انکوباتور شیکردار به مدت یک شب تلقیح شد. سپس ۱ سی سی از محیط کشت اولیه به ۱۰۰ سی سی محیط کشت LB جدید (با نسبت ۱ به ۱۰۰) افزوده گردید. رشد باکتری‌ها با همان شرایط مذکور تا رسیدن به جذب نوری ۰/۴-۰/۳۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ادامه یافت. در این بازه جذبی باکتری‌ها در اوایل مرحله رشد لگاریتمی هستند و این مرحله بهترین زمان برای مستعد کردن باکتری‌ها است.

تهیه سلول مستعد (Competent cell):

فلاسک حاوی محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب باکتریایی پس از حل شدن در منیزیم کلراید سرد ۱۰۰ میلی مولار در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از حذف مایع رویی، رسوب در کلسیم کلراید ۱۰۰ میلی مولار مخلوط و سوسپانسیون به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. محلول با شرایط مرحله قبل سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و

هضم آنزیمی:

بعد از انجام واکنش های PCR، محصولات حاوی جهش های موردنظر و ناقل pET28a(+) توسط دو آنزیم XhoI و NcoI برش یافته و ژن اوریکازهای جهش یافته و ناقل در حالت خطی، روی ژل آگارز ۱ درصد جداسازی شدند. مطابق با شکل ۵ ب، باندهای مربوط به ژن اوریکاز ۹۲۹ نوکلئوتیدی، نزدیک ۱۰۰۰ و پلاسمید بریده شده بین باندهای ۵۰۰ و ۶۰۰ قرار دارد.

ساخت سازواره های جهش یافته و تأیید آن توسط واکنش

کلونی PCR:

به منظور ساخت دو سازواره نوترکیب pET28a(+)-UOX حاوی جهش های موردنظر، دو ژن اوریکاز جهش یافته و ناقل pET28a(+) تخلیص شده از ژل، تحت واکنش الحاق توسط آنزیم T4 DNA لیگاز قرار گرفتند و محصول این واکنش به باکتری اشریشیا کلی سویه TOP10 منتقل شد.

پس از به دست آمدن تک کلونی های هر یک از جهش ها، جهت تأیید انتقال ژن های اوریکاز جهش یافته به پلاسمید، واکنش کلونی PCR توسط پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای خود پلاسمید که در بخش مواد و روش ها توضیح داده شد، انجام گرفت. همان گونه که در شکل ۶ مشاهده می شود در چاهک های شماره ۲، ۳، ۹، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴ که دارای باند نزدیک ۱۵۰۰ می باشند قطعه موردنظر تکثیر شده است این امر تأیید می کند که ژن های اوریکاز نوترکیب در پلاسمید حضور دارند. سایر چاهک ها فاقد ژن موردنظر می باشند.

تأیید سازواره های جهش یافته توسط هضم آنزیمی:

علاوه بر واکنش کلونی PCR برای حصول اطمینان بیشتر قبل از ارسال نمونه ها برای تعیین توالی از کلونی هایی که وجود ژن نوترکیب UOX در آن ها طی واکنش کلونی PCR تأیید شد به طور تصادفی انتخاب و پلاسمید در مقیاس کم (Miniprep) استخراج شد سپس این پلاسمیدها توسط آنزیم های محدود کننده NcoI و XhoI برش داده شدند در شکل ۷ چاهک شماره ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ باند نزدیک ۱۰۰۰ (۹۲۹bp) مربوط به ژن UOX و باند بین ۵۰۰ و ۶۰۰ مربوط به پلاسمید pET28a(+) و حاکی از حضور ژن کدکننده آنزیم اوریکاز در داخل ناقل pET28a(+) می باشد. سرانجام برای تأیید نهایی جهش ها پلاسمید حاوی ژن های جهش یافته تعیین توالی شدند (نتایج نشان داده نشده است).

صورت گرفت. سپس این پلاسمیدها توسط آنزیم های محدود کننده NcoI و XhoI برش داده شدند و با رویت باند ۹۲۹bp مربوط به ژن UOX، از حضور ژن کدکننده آنزیم اوریکاز در داخل ناقل pET28a(+) اطمینان کامل حاصل شد.

در نهایت بعد از حصول اطمینان از کیفیت استخراج پلاسمید توسط الکتروفورز ژل آگاروز و تعیین غلظت آن ها توسط دستگاه نانودراپ، نمونه ها جهت تعیین ترادف DNA به شرکت بیونیر کره جنوبی جهت تعیین توالی ارسال شدند.

یافته ها

جهت طراحی پل های دی سولفیدی و ایجاد آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس پایدار از لحاظ حرارتی، ساختار بلوری آنزیم مورد بررسی قرار گرفت و در شرایط *in silico* تشکیل پل های دی سولفیدی اثبات گردید.

بررسی بیوانفورماتیکی تشکیل پیوند دی سولفیدی:

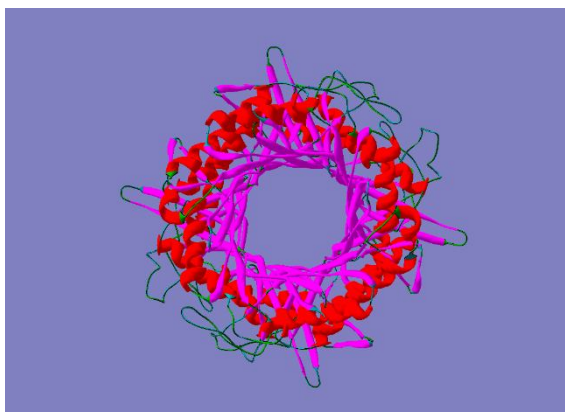
بعد از استخراج فایل تترامر آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس با کد بانک اطلاعاتی پروتئین 1XXJ و با در نظر گرفتن پارامترهای ارائه شده توسط سرور MODIP، با استفاده از نرم افزار Swiss_PDB تشکیل پل دی سولفیدی مدل سازی و اثبات شد (اشکال ۱ تا ۳).

جهش زایی هدف دار:

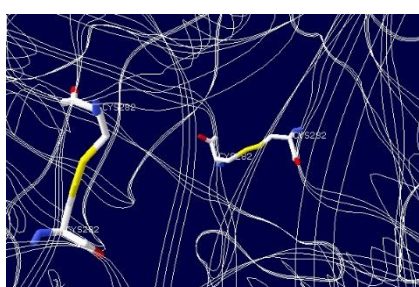
بعد از انجام واکنش PCR1,2، محصولات روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند تا صحت واکنش بررسی گردد. همان گونه که در شکل ۴ مشخص شده است چاهک های شماره ۳ و ۲ بین باند ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ مربوط به PCR1 از جهش Ser282Cys و چاهک های شماره ۴، ۵ و ۶ بین باند ۲۵۰ و ۵۰۰ مربوط به PCR2 از همین جهش می باشد (شکل ۴ الف).

بعد از خالص سازی باندهای مربوطه، به منظور الحاق دو قطعه جهش یافته ژن اوریکاز و ساخت و تکثیر قطعه کامل PCR3 جهش Ser282 انجام شد. در شکل ۵ باند نزدیک ۱۵۰۰ نشانگر انجام درست این PCR می باشد (شکل ۴ ب).

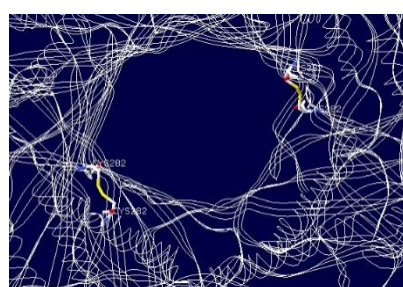
جهش Ala هم طی یک PCR معمولی انجام و بعد از اتمام باند ۱۲۷۵ bp مربوط به قطعه تکثیر یافته روی ژل بارگذاری و رویت شد (شکل ۵ الف).



شکل (۱): ساختار سه بعدی آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس طبیعی (PDB:1XXJ)

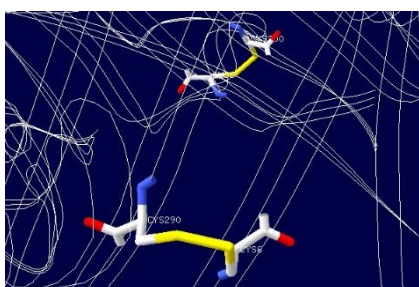


ب



الف

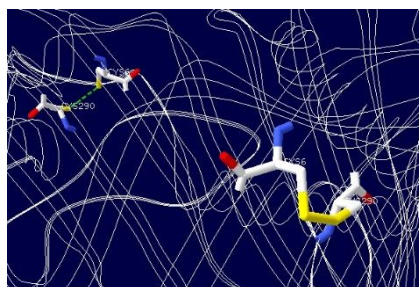
شکل (۲): توانایی تشکیل پیوند دیسولفیدی بین اسیدآمینه‌های Ser282 موجود در زیر واحدهای A-D و B-C بعد از جهش آن‌ها به سیستئین (الف) در نمای کلی، (ب) بزرگ نمایی موقعیت پیوند دیسولفیدی



ب

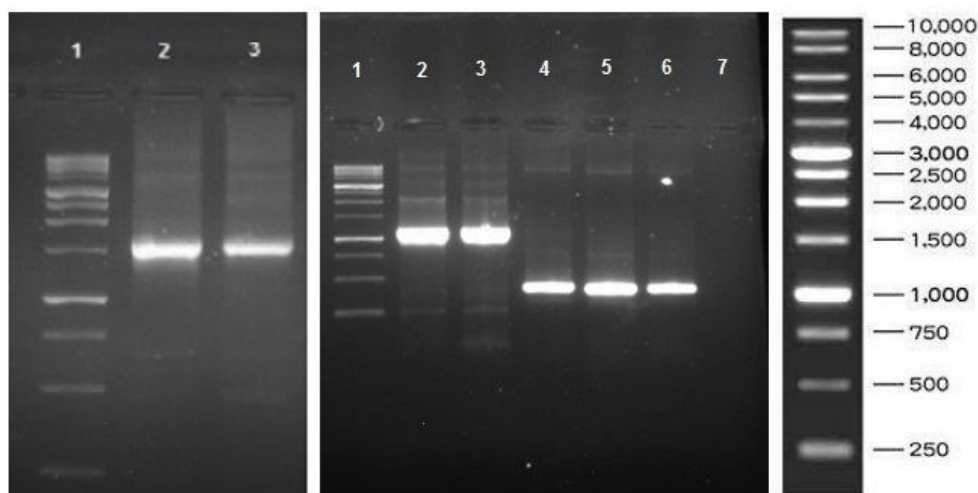


الف



ج

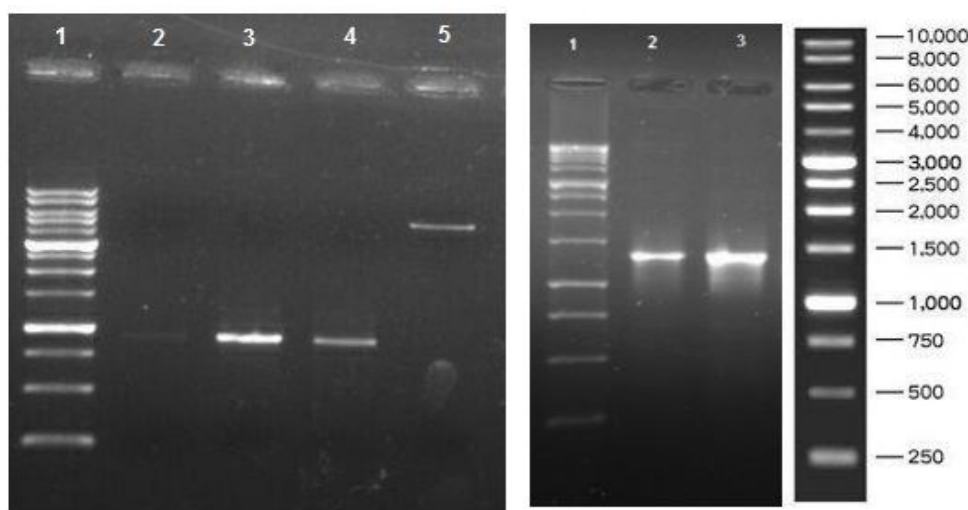
شکل (۳): توانایی تشکیل پیوند دیسولفیدی بین اسیدآمینه‌های Cys290 و Ala6 موجود در زیر واحدهای A-B و C-D بعد از جهش Ala6 به سیستئین (الف) در نمای کلی، (ب) بزرگ نمایی موقعیت پیوند دیسولفیدی، (ج) تشکیل پیوند هیدروژنی بین Cys290 زیر واحد C با Cys6 جهش یافته زیر واحد D.



ب

الف

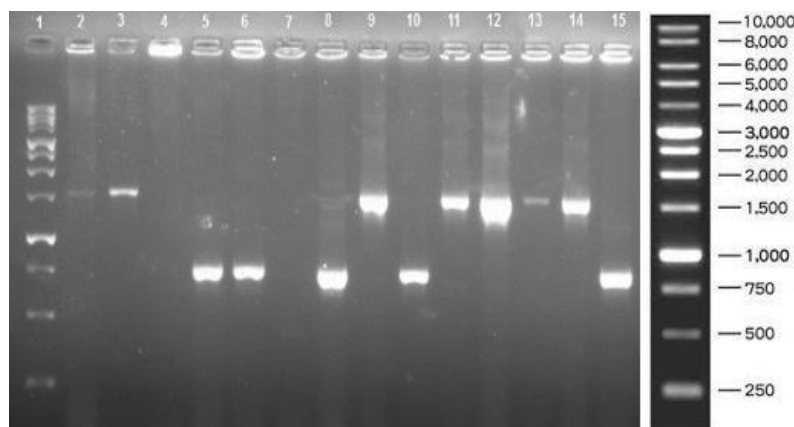
شکل (۴): الف) بررسی صحت PCR1,2 مربوط به جهش Ser282Cys، چاهک ۱ اندازه نمای DNA ۱ kb، چاهک‌های ۲ و ۳ با اندازه bp ۱۱۶۱ برای PCR مرحله ۱، چاهک‌های ۴، ۵ و ۶ با اندازه ۴۲۷ bp مربوط به PCR مرحله ۲ می‌باشند. ب) مشاهده صحت PCR مرحله ۳ برای جهش Ser282Cys، چاهک ۱ اندازه نمای DNA 1kb، چاهک ۲ و ۳ با اندازه ۱۵۶۸ bp مربوط به این واکنش می‌باشد.



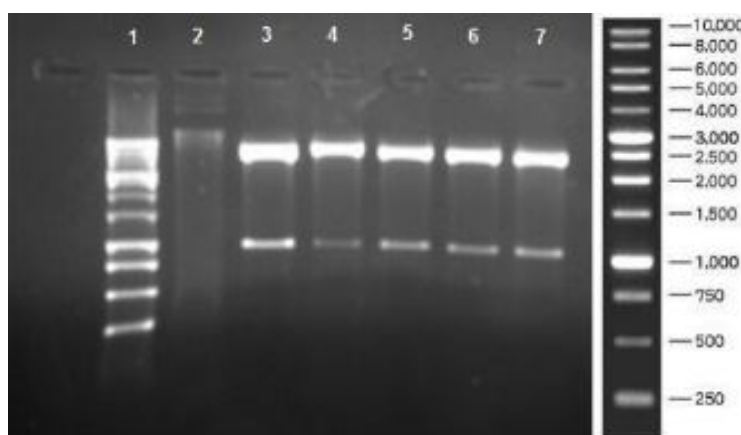
ب

الف

شکل (۵): الف) بررسی صحت PCR برای جهش Ala6Cys، چاهک ۱ اندازه نمای DNA 1kb، چاهک‌های ۲ و ۳ با اندازه bp ۱۲۷۵ مربوط به این PCR می‌باشد. ب) واکنش هضم آنزیمی دو گانه با آنزیم‌های XhoI و NcoI مربوط به ژن‌های UOX و پلاسمید pET28a(+). چاهک ۱ اندازه نمای DNA 1kb، چاهک‌های ۲، ۳ و ۴ با اندازه ۹۲۹، به ترتیب مربوط به ژن‌های UOX طبیعی، جهش یافته Ser282Cys و جهش یافته Ala6Cys، چاهک ۵ با اندازه ۵۲۳۱ مربوط به پلاسمید pET28a(+) می‌باشد.



شکل (۶): بررسی صحت کلونی PCR چاهک ۱ اندازه نمای DNA 1kb، چاهک ۲ به عنوان کنترل و حاوی UOX طبیعی، چاهک های ۳، ۹، ۱۱ و ۱۲ الی ۱۴ با اندازه ۱۵۶۸ به ترتیب حاوی ژن UOX جهش یافته Ser282Cys و Ala6Cys می باشند.



شکل (۷): بررسی وجود ژن UOX در پلاسمید pET28a(+) چاهک ۱ اندازه نمای DNA 1kb، چاهک ۲ پلاسمید حاوی ژن UOX طبیعی (هضم نشده)، چاهک های ۳ الی ۷ پلاسمیدهای استخراج شده که با دو آنزیم XhoI و NcoI هضم شده اند را نشان می دهد. باندهای مشخص شده در بالا و پایین به ترتیب مربوط به پلاسمید و ژن های جهش یافته می باشند.

این سیستم بیانی تغییرات پس از ترجمه از جمله گلیکوزیلاسیون صورت نمی گیرد. از آنجایی که آنزیم اوریکاز هم غیرگلیکوزیله می باشد این سیستم، یک سیستم کلون سازی و بیان مناسب برای اوریکاز می باشد (۲۱).

برای درمان هیپراوریسمی از داروهای آلپورینول و فبوسوستات استفاده می شود این دو دارو مهارکننده های رقابتی آنزیم گزانتین اکسیداز می باشند. رویکرد درمانی آن ها جلوگیری از تبدیل هیپوگزانتین و گزانتین به اسید اوریک در نتیجه کاهش اسید اوریک خون می باشد. درواقع این داروها اسید اوریک انباشته شده را نمی کاهند ولی تولید آن را کاهش می دهند. با این وجود آن ها قادر به جلوگیری از نقرس مقاوم که در بیماران مبتلا به حساسیت به آلپورینول، عدم تحمل سمیت آلپورینول و یا در اثر تعاملات

بحث و نتیجه گیری

کلونینگ ژن کد کننده اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس در سال ۱۹۹۲ انجام شد (۲۰) تا به امروز، چندین گروه تحقیقاتی UOX را در میزبان های مخمری از جمله ساکارومایسز سرویزیه و پیشیا پاستوریس و میزبان های باکتریایی باسیلوس سابتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا کلون سازی کرده اند (۱۱). از این میان آنزیم آسپرژیلوس فلاووس دارای فعالیت و پایداری بهینه در درمان پیشنهاد شده است. آنزیم اورت اکسیداز آسپرژیلوس فلاووس دارای ۳۰۲ اسید آمینه و جرم مولکولی ۳۴/۵ کیلو دالتون می باشد که در پراکسیزوم سلول بیان می شود (۱۱، ۲۱).

سیستم کلونینگ و بیان pET یک سیستم قدرتمند برای کلون سازی و بیان پروتئین نو ترکیب در اشریشیا کلی می باشد. در

دارویی با آلپورینول و فبوسکوستات رخ می‌دهد، نمی‌باشند (۲۲)– (۲۳). هدف اصلی رویکردهای درمانی مختلف کاهش سطح اسید اوریک خون به میزان کم‌تر از ۶ میلی‌گرم بر دسی لیتر می‌باشد. که در این صورت تعداد حملات نقرس و همچنین اندازه توفی‌ها (Tophi) یعنی رسوبات کریستال‌های اسید اوریک در بافت‌های نرم کاهش می‌یابد (۲۴).

امروزه آنزیم‌های درمانی که یکی از روش‌های نوین درمان بسیاری از بیماری‌های متابولیک می‌باشند، در مورد درمان بیماری نقرس نیز کاربرد پیدا کرده است. اخیراً درمان اوریکولیتیک توسط اوریکاز برای درمان بیماری‌های نقرس و هیپراوریسمی ناشی از سندروم لیز توموری نسبت به داروهای شیمیایی برتری یافته است زیرا کریستال‌های اسید اوریک از طریق تجزیه به آلانتوئین به راحتی از کلیه دفع می‌شوند (۲۵، ۲۶).

یکی از چالش‌های آنزیم‌های دارویی پایداری کم آن‌ها در برابر حرارت می‌باشد. از رویکردهای مهم در افزایش پایداری پروتئین‌ها و آنزیم‌ها ایجاد پیوند دی‌سولفیدی در ساختار آن‌ها می‌باشد. تا به امروز پیوندهای دی‌سولفیدی متعددی در پروتئین‌های گوناگون توسط روش جهش‌زایی هدف‌دار ایجاد شده است. از جمله این پروتئین‌ها می‌توان به آنزیم لوسیفراز، T4 لیزوزیم، هیدروفولات ردوکتاز، مهارکننده تریپسین پانکراس گاوی، کوریوگنادوتروپین انسانی و سوبیتیلیزین اشاره کرد. لازم به ذکر است که بسیاری از انواع جهش یافته این پروتئین‌ها بعد از ایجاد پیوند دی‌سولفیدی پایدار شده‌اند در حالی که برخی از آن‌ها نیز در اثر پیوند دی‌سولفیدی شکل ناپایدار به خود گرفته‌اند. علت این امر به فاکتورهای مختلفی از جمله فشار فضایی روی پروتئین فولد شده که در اثر انتخاب جایگاه‌های نامناسب به وجود می‌آید، بستگی دارد (۱۳، ۲۷).

تاکنون به جز TB-90 اورات اکسیداز متعلق به باسیلوس سابتیلیس که توسط گروه Hibi در سال ۲۰۱۶ اجرا شده (۲۸)، هیچ پل دی‌سولفیدی دیگری در آنزیم اوریکاز ایجاد نشده است. همچنین در ساختار طبیعی این آنزیم هیچ پل دی‌سولفیدی در دسترس نیست. بنابراین در این تحقیق به منظور افزایش پایداری

آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس و ایجاد یک آنزیم جهش یافته با ویژگی‌های بهبود یافته و ایجاد پل‌های دی‌سولفیدی، دو جایگاه به کمک سرور MODIP مدل‌سازی شد که با در نظر گرفتن پارامترهای شیمی فضایی در افزایش پایداری حرارتی نقش مهمی داشتند سپس توسط روش جهش‌زایی هدف‌دار ژن کد کننده اوریکاز تغییر داده شد و با موفقیت در ناقل pET28a(+) کلون شد و توالی و قرارگیری ژن‌های تغییر یافته اوریکاز در موقعیت قالب خوانش صحیح، توسط تعیین توالی تأیید شد.

نتایج این تحقیق نشان داد که مکان‌های مناسبی برای تبدیل به اسیدآمینه سیستمین انتخاب شده است (اشکال ۱ تا ۳). با استفاده از جهش‌زایی هدف‌دار به منظور تولید پروتئین‌های مقاوم‌تر به حرارت ژن کدکننده دو نوع آنزیم جهش یافته اوریکاز شامل Ser282Cys و Ala6Cys با موفقیت در پلاسمید pET28a(+) کلون شده است و با استفاده از باکتری اشریشیاکلی کلون‌سازی انجام شد. بررسی توسط واکنش‌های کلونی PCR و هضم آنزیمی نشان داد که ژن‌های دو نوع اوریکاز جهش یافته در ناقل pET28a(+) موجود هستند (اشکال ۶ و ۷). در نهایت نتایج تعیین توالی، حضور ژن اوریکاز و ایجاد جهش‌های نقطه‌ای موردنظر را تأیید کرد. گام بعدی بیان بهینه و تخلیص و تولید این دو آنزیم جهش یافته و بررسی چهار جهش ذکر شده دیگر خواهد بود. از آنجایی که در ایران تاکنون هیچ اقدامی مبنی بر استفاده از آنزیم نو ترکیب به جای داروهای شیمیایی رایج برای درمان نقرس و هیپراوریسمی ناشی از سندروم لیز توموری صورت نگرفته است کلون‌سازی، بیان و تخلیص شکل‌های بهبود یافته و مهندسی شده این آنزیم دارویی سودمند و مفید می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری کارشناسان محترم پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه، خانم راضیه پاک ترمی و آقای اشکان بصیرنیا کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References:

1. Gabison L, Chiadmi M, El Hajji M, Castro B, Colloc'h N, Prangé T. Near-atomic resolution structures of urate oxidase complexed with its substrate and analogues: the protonation state of the ligand. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010; 66(Pt 6):714-24.

2. Bui S, von Stetten D, Jambrina PG, Prangé T, Colloc'h N, de Sanctis D, et al. Direct evidence for a peroxide intermediate and a reactive enzyme-substrate-dioxygen configuration in a cofactor-free oxidase. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014;53(50):13710-4.

3. Retaillieu P, Colloc'h N, Vivarès D, Bonneté F, Castro B, El Hajji M, et al. Urate oxidase from *Aspergillus flavus*: new crystal-packing contacts in relation to the content of the active site. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2005;61(Pt 3):218–29.
4. Gabison L, Colloc'h N, Prangé T. Azide inhibition of urate oxidase. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 2014;70(Pt 7):896–902.
5. Xie G, Yang W, Chen J, Li M, Jiang N, Zhao B, et al. Development of Therapeutic Chimeric Uricase by Exon Replacement/Restoration and Site-Directed Mutagenesis. *Int J Mol Sci* 2016;17(5). Maiuolo, J., et al., Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*, 2016. 213: p. 8-14.
6. Alishah K, Asad S, Khajeh K, Akbari N. Utilizing intein-mediated protein cleaving for purification of uricase, a multimeric enzyme. *Enzyme Microb Technol* 2016 Nov;93-94:92-8.
7. George RL, Jr Sundry JS. Pegloticase for treating refractory chronic gout. *Drugs Today (Barc)* 2012, 48: 441-449.
8. Hummel M, Buchheidt D, Reiter S, Bergmann J, Adam K, Hehlmann R. Recurrent chemotherapy-induced tumor lysis syndrome (TLS) with renal failure in a patient with chronic lymphocytic leukemia - successful treatment and prevention of TLS with low-dose rasburicase. *Eur J Haematol* 2005;75(6):518–21.
9. Mahmoud HH, Leverger G, Patte C, Harvey E, Lascombes F. Advances in the management of malignancy-associated hyperuricaemia. *Br J Cancer* 1998; 77 (Suppl 4): 18–20.
10. Fazel R, Zarei N, Ghaemi N, Namvaran MM, Enayati S, Mirabzadeh Ardakani E, et al. Cloning and expression of *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Pichia pastoris*. *Springerplus* 2014;3:395.
11. Vellard M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14(4):444–50.
12. Imani M, Hosseinkhani S, Ahmadian S, Nazari M. Design and introduction of a disulfide bridge in firefly luciferase: increase of thermostability and decrease of pH sensitivity. *Photochem Photobiol Sci* 2010;9(8):1167–77.
13. Kadokura H, Katzen F, Beckwith J. Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* 2003; 72:111-35.
14. Bessette PH, Aslund F, Beckwith J, Georgiou G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(24):13703–8.
15. Dani VS, Ramakrishnan C, Varadarajan R. MODIP revisited: re-evaluation and refinement of an automated procedure for modeling of disulfide bonds in proteins. *Protein Eng* 2003;16(3):187–93.
16. Why select Pfu DNA Polymerase over Taq DNA Polymerase? How should an amplification reaction containing Pfu polymerase be prepared? [Internet]. [cited 2018 Apr 23]. Available from: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/why-select-pfu-dna-polymerase-over-taq-dna-polymerase/>
17. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press; 1989.
18. Legoux R, Delpech B, Dumont X, Guillemot JC, Ramond P, Shire D, et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding *Aspergillus flavus* urate oxidase. *J Biol Chem* 1992;267(12):8565–70.

19. Li J, Chen Z, Hou L, Fan H, Weng S, Xu C, et al. High-level expression, purification, and characterization of non-tagged Aspergillusflavusurate oxidase in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* 2006; 49(1):55-9.
20. Pession A, Melchionda F, Castellini C. Pitfalls, prevention, and treatment of hyperuricemia during tumor lysis syndrome in the era of rasburicase (recombinant urate oxidase). *Biologics* 2008;2(1):129-41.
21. Yang X, Yuan Y, Zhan C-G, Liao F. Uricases as therapeutic agents to treat refractory gout: Current states and future directions. *Drug Dev Res* 2012;73(2):66-72.
22. Perez-Ruiz F, Calabozo M, Pijoan JI, Herrero-Beites AM, Ruibal A. Effect of urate-lowering therapy on the velocity of size reduction of tophi in chronic gout. *Arthritis Care Res* 2002; 47: 356-60.
23. Terkeltaub R. Gout & Other Crystal Arthropathies E-Book. Elsevier Health Sciences; 2011.
24. Alakel N, Middeke JM, Schetelig J, Bornhäuser M. Prevention and treatment of tumor lysis syndrome, and the efficacy and role of rasburicase. *OncoTargets and therapy* 2017;10:597.
25. Karagüler NG, Sessions RB, Clarke AR. Effects of disulphide bridges on the activity and stability of the formate dehydrogenase from *Candida methylca*. *Biotechnol Lett* 2007;29(9):1375-80.
26. Hibi T, Kume A, Kawamura A, Itoh T, Fukada H, Nishiya Y. Hyperstabilization of Tetrameric *Bacillus* sp. TB-90 Urate Oxidase by Introducing Disulfide Bonds through Structural Plasticity. *Biochemistry* 2016;55(4):724-32.

ENGINEERING OF THERAPEUTIC ASPERGILLUS FLAVUS URICASE USING SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

Leila Rezaeian Marjani¹, Mehdi Imani^{1,2}, Hossein Zarei Jalian³

Received: 12 Nov, 2016; Accepted: 19 Jan, 2017

Abstract

Background & Aims: As a therapeutic enzyme, *Aspergillus flavus* (uricase or; EC 1.7.3.3), is used for treatment of urate deposits, gout and nephropathy, hyperuricemia and tumor lysis syndrom (TLS). Despite desirable kinetic features, fragile stability of uricase limits its wide range applications. Therefore, several approaches have developed such as protein engineering and genetic manipulations to overcome these problems. The main aim of the current research was the design and creation of disulfide bridge in therapeutic enzyme uricase for the first time.

Materials & Methods: By the help of bioinformatics studies and based on protein data bank (PDB) code: 1xxj, the potential points for disulfide bridge formation were selected. To create mutations, site-directed mutagenesis using SOE-PCR was employed.

Results: According to computational tools, six potential pairs including three intra and three inter-chains were predicted to form disulfide when mutated to cysteins as followings: Ser145-Thr185, Ala235-Val248, His256-Gln281 and Ala6-Cys290, Ser282-Ser282, Asn12-Asp283. By means of SOE-PCR, mutation and cloning of Ala6 and Ser282 was implemented and verified by colony PCR, digestion check and eventually by sequencing.

Conclusion: In the current research, we successfully determined the location for mutating to cystein and fortunately implemented mutagenesis by SOE-PCR.

Keywords: Uricase, Disulfide bond, Site-directed mutagenesis, SOE-PCR, Gout

Address: Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Tel: +989143804138

Email: m.imani@urmia.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2018; 29(1): 62 ISSN: 1027-3727

¹MSc., Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran

²Assistant Professor, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

³Assistant Professor, Department of Genetics, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran