

همسانه‌سازی و بیان آنزیم لیپواکسیژناز پوستی *Ambystoma mexicanum* (LOXe) در باکتری *Escherichia Coli*

مریم طحان^۱، دکتر احمد موحدیان عطار^۲، مهدی عباسیان^۳، دکتر محمدرضا مفید^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آنزیم‌های لیپواکسیژناز نقش مهمی در انواع مکانیسم‌های موجودات زنده ایفا می‌کنند. تا کنون مطالعات زیادی بر روی عملکرد لیپواکسیژناز در انسان و سایر موجودات انجام گرفته است. فعال شدن این آنزیم در یوکاریوت‌ها و اثرگذاری روی سوبسترای خود (اسید آراشیدونیک) باعث تولید واسطه‌های گوناگونی می‌شود. یکی از محصولات واکنش این آنزیم لکوترین است. این واسطه‌ی التهابی نقش مهمی در فرایند ترمیم زخم ایفا می‌کند. مطالعات اخیر نشان داده است که آنزیم لیپواکسیژناز LOXe استخراج شده از یک دوزیست (*Ambystoma mexicanum*) در مقایسه با لیپواکسیژناز انسانی تأثیری به مراتب بیشتر در فرایند بهبود زخم از خود نشان می‌دهد. تا به حال، همسانه‌سازی و بیان این ژن در باکتری انجام نشده است و از آن جا که اولین قدم برای شناسایی و تعیین ویژگی‌های هر پروتئین، در دست داشتن مقادیر زیادی از آن است، در تحقیق حاضر، همسانه‌سازی و بیان لیپواکسیژناز اکسولوتل (LOXe) مورد توجه قرار گرفت.

روش‌ها: ابتدا توالی کد کننده لیپواکسیژناز اکسولوتل بر اساس توالی آمینو اسیدی پروتئین مورد نظر، طراحی و پس از بهینه‌سازی کدون‌ها برای بیان حداکثری در باکتری *E. coli* (*Escherichia coli*)، در ناقل pUC57 قرار گرفت. قطعه‌ی کد کننده سنتز شده پس از هضم با آنزیم‌های برشی مورد نظر، در چهارچوب خواندن ناقل بیانی pET21-a قرار داده شد و در میزبان بیانی *E. coli*-BL21 برای بیان پروتئین ۷۱ کیلو دالتونی LOXe (۶۲۳ اسید آمینه) در حضور IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) القا گردید.

یافته‌ها: کلونینگ LOXe با صحت انجام گرفت و بیان این آنزیم در باکتری *E. coli* امکان پذیر است.

نتیجه‌گیری: آنالیز SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) نشان دهنده‌ی بیان فراوان پروتئین مورد نظر در مقایسه با نمونه‌ی شاهد بود.

واژگان کلیدی: لیپواکسیژناز، Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis، pET21-a

ارجاع: طحان مریم، موحدیان عطار احمد، عباسیان مهدی، مفید محمدرضا. همسانه‌سازی و بیان آنزیم لیپواکسیژناز پوستی *Ambystoma mexicanum* (LOXe) در باکتری *Escherichia Coli*. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۶۷): ۲۱۷۰-۲۱۶۲

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای داروسازی به شماره‌ی ۳۹۱۴۸۵ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی داروسازی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی و مرکز تحقیقات بیوانفورماتیک، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: mofid@pharm.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤؤل: دکتر محمدرضا مفید

مقدمه

لیپواکسیژنازها (LOXe, EC1.13.11.) یک خانواده‌ی گسترده از دی اکسیژنازهای آهن‌دار فاقد گروه هم و سولفور هستند و اکسیژناسیون اسیدهای چرب غیر اشباع را کاتالیز می‌کنند (۱-۲). این آنزیم‌ها در گیاهان، قارچ‌ها و حیوانات وجود دارند (۳). لیپواکسیژنازها به چهار گروه اصلی ۵-، ۸-، ۱۲- و ۱۵- لیپواکسیژناز تقسیم‌بندی می‌شوند. این تقسیم‌بندی بر اساس محل قرارگیری اکسیژن بر روی اسید آراشیدونیک می‌باشد (۱). به دنبال فعالیت آنزیم فسفولیپاز، فسفولیپیدهای غشای سلول به اسید آراشیدونیک تبدیل می‌گردند. آنزیم لیپواکسیژناز موجب تبدیل آراشیدونیک اسید به متابولیت‌هایی با فعالیت متفاوت شامل لکوترین‌ها، لیپوکسین‌ها (Lipoxins)، هیدروکسی ایکوزاترانوئیک اسیدها (HETEs یا Hydroxyeicosatetraenoic acid) و هپوکسیلین‌ها (Hepoxilins) می‌شود (۲).

لکوترین‌ها نقش مهمی در فرایند التهاب دارند و باعث ارسال اطلاعات به فیروبلاست جهت پخش شدن روی فیرونکتین می‌شوند (۳). در سلول‌های پوستی با مهار آنزیم LOX سرعت مهاجرت و تکثیر سلول‌ها کاهش می‌یابد (۴). بنابراین به نظر می‌رسد این گروه از آنزیم‌ها در ترمیم زخم نقش اساسی داشته باشند.

در مطالعه‌ای، اثر آنزیم لیپواکسیژناز حیوانی از رده‌ی دوزیستان که خویشاوندی نزدیکی با سمندر مکزیکی دارد، با نام علمی Ambystoma mexicanum در بازسازی بافت خود حیوان و نیز ترمیم زخم انسان در محیط In-vitro مورد بررسی قرار گرفته است (۵).

سمندرهای بالغ ظرفیت بالایی در بازسازی تمام عضوهای بدن، دم، سیستم عصبی مرکزی و بافت‌های چشم و قلب دارند (۶-۷). این حیوان به طور قابل توجهی بدون این که اثری از زخم باقی بماند، اعضای بدن خود را بازسازی می‌کند (۸). نتایج تحقیقات حاکی از آن است که در صورت بیان موقت لیپواکسیژناز Ambystoma mexicanum در سلول‌های کراتینوست یا استئو سارکومای انسانی و تیمار این سلول‌ها در محل زخم، سرعت مهاجرت سلول‌ها افزایش می‌یابد و در نتیجه‌ی آن، سرعت ترمیم زخم بیشتر می‌شود (۵).

در تحقیق حاضر، با استفاده از اطلاعات موجود در مورد توالی اسیدهای آمینه‌ی آنزیم لیپواکسیژناز LOXe در بانک‌های اطلاعاتی، توالی DNA کد کننده‌ی آن با هدف دستیابی به بیان فراوان، طراحی شد و در سیستم pET-21-a همسانه‌سازی گردید. ناقل همسانه‌سازی شده، پس از تأیید توالی، در میزبان بیانی BL21(DE3) برای بیان آنزیم LOXe القا گردید و آنالیز بیان با استفاده از تکنیک SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) انجام گرفت. هدف از انجام این مطالعه، همسانه‌سازی و بیان فراوان آنزیم LOXe در باکتری E. coli (Escherichia coli) بود تا مقدمه برای شناسایی ویژگی‌های آنزیمی و در نهایت کاربرد این آنزیم در کارهای بالینی فراهم شود.

روش‌ها

بهینه‌سازی و سنتز توالی کد کننده‌ی آنزیم

لیپواکسیژناز در ناقل pUC57

توالی DNA کد کننده‌ی آنزیم لیپواکسیژناز

مستعد XL1-Blue انتقال داده شد (۱۰). محصول واکنش انتقال روی محیط LB (Luria Bertani) آگار حاوی آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ µg/ml کشت داده شد و در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. غربالگری کلونی‌های به دست آمده با روش هضم آنزیمی و PCR (Polymerase chain reaction) صورت گرفت.

ناقل نوترکیب (pET21- LOXe) به روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد شده‌ی باکتری E. coli سویه‌ی BL21(DE3) منتقل شد و تعدادی از کلونی‌های رشد کرده روی محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین، برای مرحله‌ی بیان انتخاب گردیدند.

بیان فراوان آنزیم لیپواکسیژناز LOXe

ابتدا یک کشت ۵ cc اولیه از ۵ کلونی به طور تصادفی در محیط LB حاوی آمپی سیلین (غلظت یک میلی‌مولار) تهیه شد. پس از تیمار شبانه در دمای ۳۷ °C، کشت اولیه به نسبت ۱ به ۱۰۰ در محیط جدید LB حاوی آمپی سیلین (غلظت یک میلی‌مولار) رقیق گردید. بعد از تیمار در ۳۷ °C و رسیدن جذب نوری باکتری‌ها (OD_{۶۰۰} یا Optical density_{۶۰۰}) به ۰/۴-۰/۶، القا کننده‌ی IPTG با غلظت نهایی یک میلی‌مولار به محیط افزوده شد و تیمار در دمای ۳۷ °C به مدت ۳-۴ ساعت دیگر به همراه چرخش با دور ۱۵۰ rpm ادامه یافت. سپس یک میلی‌لیتر از کشت باکتریایی با سانتریفوژ در ۵۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شد و برای مراحل بعدی در دمای ۲۰ °C - نگهداری گردید.

آنالیز بیان پروتئین نوترکیب

آماده‌سازی نمونه‌ها

رسوب نگهداری شده از یک میلی‌لیتر محیط کشت در یک میلی‌لیتر بافر TE (Tris-EDTA) یا

Ambystoma mexicanum براساس توالی پلی پپتیدی آنزیم (ID: ACF33515.1) طراحی گردید. طراحی DNA بر اساس ترجیح کدونی (Codon preference) سویه‌ی میزبان BL21 توسط نرم‌افزار DNA2 نسخه‌ی ۲/۰ انجام گرفت. میزان بیان توالی‌های DNA طراحی شده توسط نرم‌افزار DNA2 با استفاده از مدل ارایه شده توسط زارعی و عباسیان (۹) پیش‌بینی گردید. جایگاه‌های برش NdeI و XhoI به ترتیب در ابتدا و انتهای چهارچوب خواندن (ORF) یا (Open reading frame) تعبیه شدند؛ به نحوی که کدون پایان TAA قبل از جایگاه برشی XhoI قرار گرفت.

همسازسازی قطعه‌ی کد کننده‌ی آنزیم

لیپواکسیژناز در ناقل بیانی pET-21a

پلاسمید pUC57 حاوی قطعه‌ی ORF خریداری شده و پلاسمید بیانی pET-21a با استفاده از روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد E. coli سویه‌ی XL1-Blue منتقل گردیدند (۱۰). استخراج پلاسمید از باکتری میزبان با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Fermentas (K0502) انجام شد. پلاسمیدهای استخراج شده، به طور جداگانه توسط دو آنزیم NdeI و XhoI به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C برش داده شدند (۱۰). قطعه‌ی ORF خارج شده از ناقل pUC57 و پلاسمید برش یافته‌ی pET21-a به طور جداگانه توسط کیت خالص‌سازی از ژل شرکت کیاژن (28704) از ژل آگاروز یک درصد استخراج گردیدند. واکنش اتصال قطعه‌ی ORF به پلاسمید خطی شده با نسبت ۱:۲ با کمک آنزیم T4DNA-Ligase شرکت Fermentas به مدت یک ساعت در دمای ۲۲ °C انجام گردید. محصول فرایند اتصال با روش شوک حرارتی به سلول‌های

۱/۲۵ میلی‌لیتر از Tris-HCl ۱/۵ مولار با pH ۶/۸، ۰/۲ میلی‌لیتر SDS ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر آمونیوم پرسولفات (APS) ۱۰ درصد و ۱۰ میکرولیتر TEMED تهیه گردید و در بالای ژل اولیه ریخته شد. تانک الکتروفورز با بافر تریس-گلیسین (۲۵ میلی‌مولار Tris، ۳ میلی‌مولار Glycin و ۳ میلی‌مولار SDS) پر شد و نمونه‌ها پس از تزریق در چاهک‌ها، بلافاصله با ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت به مدت ۳/۵ ساعت الکتروفورز گردیدند. رنگ آمیزی ژل با استفاده از روش کوماسی بلو R-۲۵۰ صورت گرفت (۱۰).

یافته‌ها

قطعه‌ی کد کننده‌ی آنزیم LOXe با استفاده از جایگاه‌های برشی Xho I و Nde I از پلاسمید pUC57 بیرون کشیده شد. جایگاه‌های برشی Nde I و Xho I به نحوی بر روی قطعه‌ی ORF تعبیه شده بودند که توالی کد کننده در چهارچوب خواندن صحیح ناقل pET-21a قرار گیرد. قطعه‌ی هضم شده بر روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز گردید و باند مورد نظر به طول حدود ۱۸۸۰ bp مشاهده گردید (شکل ۱).

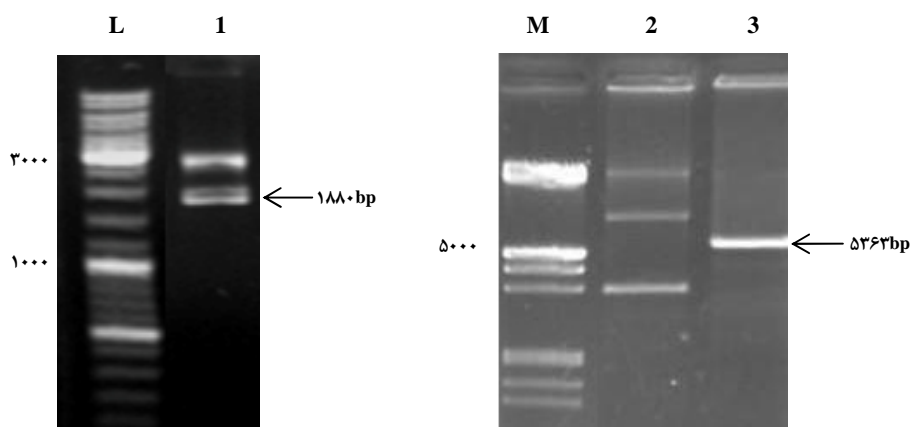
در مرحله‌ی بعد، پلاسمید pET-21a استخراج شد و با استفاده از دو آنزیم برشی Xho I و Nde I به طور کامل هضم گردید (شکل ۱). به منظور افزایش راندمان واکنش اتصال قطعه به پلاسمید برش یافته، پلاسمید برش یافته با دو آنزیم از ژل آگاروز یک درصد جداسازی و خالص گردید. از طرفی، قطعه‌ی کد کننده نیز پس از برش با همان دو آنزیم، خالص‌سازی گردید. پس از انجام واکنش اتصال و

(Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid (۱ mM EDTA pH۸، ۱۰ mM Tris-HCl pH۸) حل شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر بافر بارگذاری ۲X (۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH ۶/۸، ۴ درصد SDS، ۲۰ درصد گلیسرول و ۲ درصد برموفنول بلو) و یک میکرولیتر بتا-مرکاپتواتانول یا ۱۰ میلی‌مولار دی تیو تریتول (DTT یا Dithiothreitol) در لوله‌های اپندورف مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ °C قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند و ۲۵ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌ها تزریق شد.

الکتروفورز و ژل پلی اکریلامید- سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE)

اجزای ژل پایین پلی اکریلامید به غلظت ۱۲ درصد اکریلامید شامل ۶/۶ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر، ۸ میلی‌لیتر اکریلامید ۳۰ درصد، ۵ میلی‌لیتر از Tris-HCl ۱/۵ مولار با pH ۸/۸، ۰/۲ میلی‌لیتر SDS ۱۰ درصد، ۰/۲ میلی‌لیتر آمونیوم پرسولفات (APS یا Ammonium persulfate) ۱۰ درصد و ۴ میکرولیتر TEMED (Tetramethylethylenediamine) تهیه گردید.

برای پلیمریزه شدن ژل، از TEMED استفاده شد که در آخرین مرحله به سایر مواد تشکیل دهنده‌ی ژل اضافه گردید و بلافاصله این مواد به آرامی مخلوط و در فضای بین شیشه‌های دستگاه الکتروفورز و تا ارتفاع مناسب ریخته شدند. پس از آن که ژل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق پلیمریزه شد، ژل بالا با غلظت ۵ درصد اکریلامید شامل ۶/۸ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر، ۱/۷ میلی‌لیتر اکریلامید ۳۰ درصد،



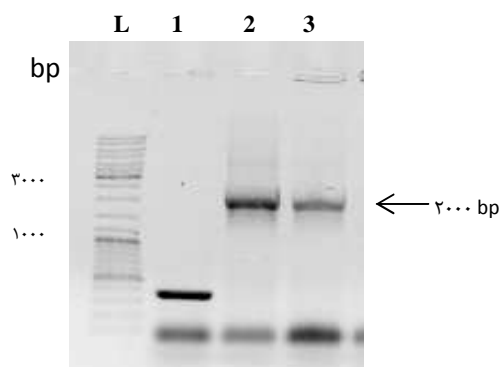
شکل ۱. ارزیابی پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از واکنش هضم آنزیمی چاهک ۱: هضم آنزیمی پلاسمید pUC57 با استفاده از دو آنزیم Nde I و Xho I، پیکان مشکی قطعه‌ی کد کننده‌ی LOXe را نشان می‌دهد. چاهک ۲: محصول استخراج پلاسمید pET21a.

چاهک ۳: هضم آنزیمی پلاسمید pET21a با استفاده از دو آنزیم Nde I و Xho I، پیکان مشکی پلاسمید خطی را نشان می‌دهد.

L: Fermentas molecular weight marker III M: Fermentas GeneRuler DNA Ladder

همسانه‌سازی شده در باکتری‌های تراریخته با استفاده از تکثیر قطعه‌ی ORF در واکنش PCR با آغازگرهای عمومی رفت و برگشت T7 مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل ۲ تکثیر موفق قطعه‌ی مورد نظر با اندازه‌ی حدود ۲۰۰۰ bp را نشان می‌دهد. جهت اطمینان از اتصال قطعه‌ی ORF در جایگاه خواندن و تشکیل صحیح جایگاه‌های برشی، پلاسمیدهای دارای قطعه‌ی مورد نظر با آنزیم‌های Nde I و Xho I هضم شدند. هضم آنزیمی موفق با دو آنزیم ذکر شده، دو قطعه در حدود ۱۸۸۰ bp و ۵۳۶۳ bp را نشان داد که به ترتیب مربوط به توالی کد کننده‌ی آنزیم LOXe و پلاسمید pET-21a بودند (شکل ۳).

در نهایت، یکی از همسانه‌های غربال شده توالی‌یابی گردید و صحت توالی آن تأیید شد. پلاسمید نو ترکیب تأیید شده pET21a- LOXe، به سویه‌ی بیانی BL21(DE3) منتقل گردید. پنج عدد از کلونی‌های رشد یافته بر روی محیط حاوی آنتی

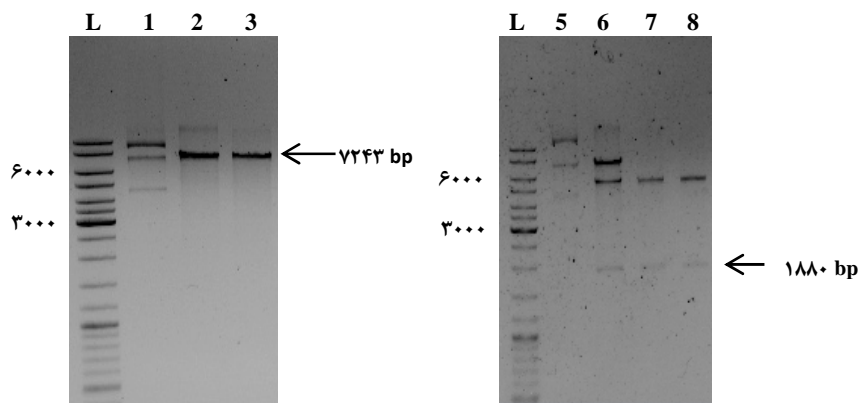


شکل ۲: ارزیابی اندازه قطعه ORF (Open reading frame) همسانه شده در پلاسمید بیانی با استفاده از PCR (Polymerase chain reaction)

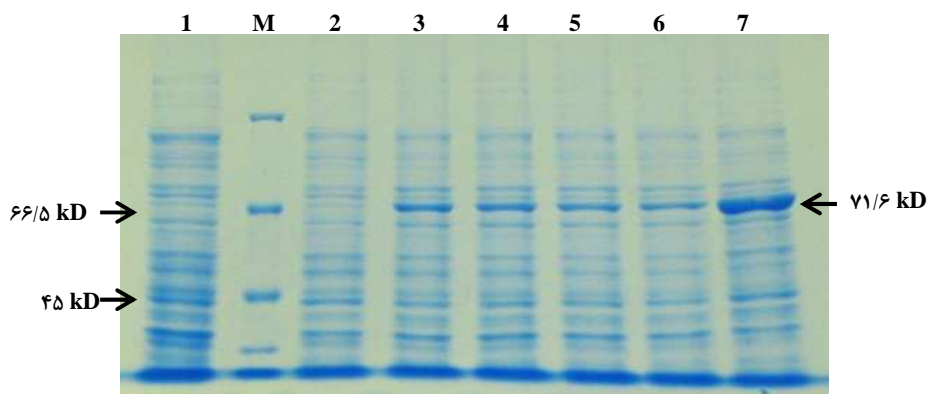
۱: محصول PCR حاصل از کلونی فاقد قطعه‌ی همسانه سازی شده با اندازه‌ی مورد نظر.
۲ و ۳: محصول PCR حاصل از کلونی‌های دارای قطعه ORF مورد نظر (اندازه حدود ۲۰۰۰ جفت باز)، پیکان‌ها نشان دهنده‌ی قطعه‌ی مورد نظر می‌باشند.

L: Fermentas GeneRuler DNA Ladder (#SM0332)

انتقال پلاسمیدهای نو ترکیب به باکتری E. coli سویه‌ی XL1-Blue، صحت اندازه‌ی قطعه‌ی



شکل ۳. تأیید اندازه‌ی قطعه‌ی ORF (Open reading frame) همساز شده در پلاسمید بیانی با استفاده از واکنش هضم آنزیمی ۱ و ۵: محصول استخراج پلاسمید هضم نشده pET21-LOXe. ۲ و ۳: هضم آنزیمی پلاسمید pET21-LOXe با استفاده از Xho I، پیکان‌ها قطعه‌ی پلاسمید خطی با اندازه‌ی ۷۲۴۳ جفت باز را نشان می‌دهند. ۴، ۶ و ۷: هضم آنزیمی پلاسمید pET21-LOXe با استفاده از دو آنزیم Xho I و Nde I، پیکان‌ها قطعه‌ی ORF خارج شده با اندازه‌ی ۱۸۸۰ جفت باز را نشان می‌دهند.



شکل ۴. آنالیز بیان آنزیم نوترکیب LOXe در میزبان بیانی BL21

۱ و ۲: به ترتیب میزبان بیانی فاقد پلاسمید نوترکیب و میزبان بیانی دارای پلاسمید نوترکیب القا نشده. ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷: میزبان‌های بیانی دارای پلاسمید نوترکیب صحیح که برای بیان فراوان پروتئین القا شده‌اند. پیکان، محل قرارگیری پروتئین نوترکیب مورد نظر با اندازه‌ی حدود ۷۲ کیلو دالتون را نشان می‌دهد. M: نشانگر پروتئینی شرکت Fermentas (#SM0431).

(۷۱/۶ کیلو دالتون) مطابقت داشت (شکل ۴).

بیوتیک برای بیان فراوان آنزیم القا شدند. نتایج حاصل از آنالیز بیان با تکنیک SDS-PAGE در مقایسه با نمونه‌های شاهد (باکتری فاقد ناقل نوترکیب و باکتری القا نشده)، وجود نوار پروتئینی در حدود ۷۲ کیلو دالتون را نشان داد که به درستی با اندازه‌ی پیش‌بینی شده‌ی پروتئین مورد نظر

بحث

لیپواکسیژناز (LOX) یکی از آنزیم‌هایی است که به طور گسترده در گیاهان و حیوانات مورد مطالعه قرار گرفته و نقش‌های مختلف آن بررسی شده است

(۱۷-۱۸)، اما همسانه‌سازی و بیان LOXe در سویه‌ی E. coli انجام نشده بود. از آن جایی که برای انجام مطالعات فیزیکی و شیمیایی بر روی آنزیم به مقدار زیادی از آنزیم نیاز است؛ در این پژوهش، همسانه‌سازی ژن لیپواکسیژناز دوزیست مورد نظر، در حامل بیانی مناسب، انتقال آن به میزبان بیانی و بیان آن در یک سویه مورد توجه قرار گرفت. به طور معمول، جهت همسانه‌سازی و بیان یک پروتئین، سیستم باکتریایی ترجیح داده می‌شود که دلیل آن، رشد سریع‌تر و هزینه‌ی کمتر این سیستم نسبت به سایر میزبان‌های بیانی است (۱۵). در این مطالعه، از سویه‌ی بیانی BL21(DE3) باکتری E. coli به دلیل ایجاد غلظت‌های بالای پروتئین، جهت بیان فراوان آنزیم LOXe استفاده شد (۱۹).

از آن جا که بیان مستقیم پروتئین‌های یوکاریوتی در سیستم‌های پروکاریوت به طور معمول به دلیل اختلاف در سیستم ترجیح کدونی با مشکل مواجه می‌شود، توالی کد کننده‌ی آنزیم LOXe با توجه به ترجیح کدونی باکتری میزبان، بازنویسی شد. بهینه‌سازی کدون‌ها به طور طبیعی می‌تواند منجر به تغییر در الگوهای طبیعی در ساختار ثانویه‌ی مولکول mRNA رونویسی شده‌ی آنزیم گردد. این مهم می‌تواند با تأثیر بر مرحله‌ی آغاز ترجمه و جلوگیری از اتصال زیر واحد کوچک ریبوزوم، بازدهی ترجمه را به میزان قابل توجهی کاهش دهد (۹). از این رو، ترجیح کدونی به نحوی بهینه شد که ساختارهای ثانویه‌ی تشکیل شده در بهترین حالت برای اتصال به زیر واحد کوچک ریبوزوم قرار گیرند. پس از سنتز و همسانه‌سازی توالی کد کننده‌ی بهینه‌سازی شده در pET-21a باکتری E. coli BL21(DE3) برای بیان

(۱۲-۱۱). آنزیم‌های LOX بر اساس محل اثرگذاری (باندهای دوگانه) روی سوبسترای خود (اسید آراشیدونیک و اسید لینولئیک) به انواع گوناگونی از قبیل ۵، ۸ و ۱۲ لیپواکسیژناز تقسیم‌بندی می‌شود (۱۱). به دنبال متابولیسم اسید آراشیدونیک و اسید لینولئیک، سیگنال‌هایی ارسال می‌شود که به طور بالقوه، اثرات متنوعی بر تنظیم فرایندهای بیولوژیکی از قبیل رشد سلول، بقای سلول، رگ‌زایی، مهاجم سلول و پتانسیل متاستاتیک دارد (۱۳). همچنین در مطالعه‌ای مشخص شد که مسیر متابولیسمی این آنزیم در مراحل پیشرفت و متاستاز سلول‌های سرطانی نقش مهمی را ایفا می‌کند (۱۴). در مطالعه‌ی دیگری مهار انواع مختلف این آنزیم در آپوپتوز سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که مهار این آنزیم‌ها به نحو چشمگیری در آپوپتوز سلول سرطانی نقش دارد (۱۳). این تحقیقات نشان دهنده‌ی نقش این آنزیم در بازسازی بافت و رشد سلول‌ها می‌باشد.

نوع دیگری از لیپواکسیژناز، LOXe نام دارد که در حیوانی از گونه‌ی سمندریان به نام *Ambystoma mexicanum* وجود دارد (۷). به دلیل توانایی این حیوان در بازسازی عضوهای از دست داده، مطالعات زیادی در مورد این حیوان انجام شده است (۱۶-۱۵). در مطالعه‌ای، قدرت ترمیم لیپواکسیژناز این دوزیست، نسبت به لیپواکسیژناز انسانی مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که LOXe دوزیست سرعت ترمیم زخم را بیشتر از لیپواکسیژناز انسانی افزایش می‌دهد (۷). تا زمان اجرای مطالعه، همسانه‌سازی و بیان انواع مختلف لیپواکسیژناز در سویه‌ی E. coli انجام گرفته بود

مراحل بهینه‌سازی بیان، خالص‌سازی و بررسی ویژگی‌های آنزیمی انتخاب گردید.

تشکر و قدردانی

از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در انجام این طرح پژوهشی قدردانی می‌شود.

فراوان همسانه‌ی نو ترکیب pET-21a- LOXe القاء شد. جهت رسیدن به حداکثر میزان تولید پروتئین در مرحله‌ی آخر، چندین کلونی باکتریایی با هم مقایسه گردید (شکل ۴) و سپس بهترین آن‌ها (کلونی شماره‌ی ۷) بر اساس اندازه‌ی باند گرفته شده روی ژل SDS-PAGE، برای بیان در مقیاس بالاتر و انجام

References

1. Furstenberger G, Epp N, Eckl KM, Hennies HC, Jorgensen C, Hallenborg P, et al. Role of epidermis-type lipoyxygenases for skin barrier function and adipocyte differentiation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007; 82(1-4): 128-34.
2. Schneider C, Pratt DA, Porter NA, Brash AR. Control of oxygenation in lipoyxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem Biol* 2007; 14(5): 473-88.
3. Yu Z. Discovery of a novel lipoyxygenase pathway in skin [PhD Thesis]. Nashville, TN: Vanderbilt University; 2005.
4. Krieg P, Marks F, Furstenberger G. A gene cluster encoding human epidermis-type lipoyxygenases at chromosome 17p13.1: cloning, physical mapping, and expression. *Genomics* 2001; 73(3): 323-30.
5. Green JA, Stockton RA, Johnson C, Jacobson BS. 5-lipoyxygenase and cyclooxygenase regulate wound closure in NIH/3T3 fibroblast monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287(2): C373-C383.
6. Yu Z, Schneider C, Boeglin WE, Brash AR. Mutations associated with a congenital form of ichthyosis (NCIE) inactivate the epidermal lipoyxygenases 12R-LOX and eLOX3. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1686(3): 238-47.
7. Menger B, Vogt PM, Allmeling C, Radtke C, Kuhbier JW, Reimers K. AmbLOXe--an epidermal lipoyxygenase of the Mexican axolotl in the context of amphibian regeneration and its impact on human wound closure in vitro. *Ann Surg* 2011; 253(2): 410-8.
8. Satoh A, Bryant SV, Gardiner DM. Regulation of dermal fibroblast dedifferentiation and redifferentiation during wound healing and limb regeneration in the Axolotl. *Dev Growth Differ* 2008; 50(9): 743-54.
9. Zareie R, Abbasian M. Method to produce recombinant MBP8298 and other polypeptides by nucleotide structure optimization, 2011. [Patent NO.: 20110008827].
10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
11. Brash AR. Lipoyxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 1999; 274(34): 23679-82.
12. Baysal T, Demirdoven Ah. Lipoyxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 2007; 40(4): 491-6.
13. Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, Reynolds JV, O'Byrne K, Nie D, et al. Lipoyxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26(3-4): 503-24.
14. Yoshimura R, Matsuyama M, Tsuchida K, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. Expression of lipoyxygenase in human bladder carcinoma and growth inhibition by its inhibitors. *J Urol* 2003; 170(5): 1994-9.
15. Maden M, Goodwin BC. Experiments on developing limb buds of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *J Embryol Exp Morphol* 1980; 57: 177-87.
16. Seifert AW, Monaghan JR, Voss SR, Maden M. Skin regeneration in adult axolotls: a blueprint for scar-free healing in vertebrates. *PLoS One* 2012; 7(4): e32875.
17. Matsumoto T, Funk CD, Radmark O, Hoog JO, Jornvall H, Samuelsson B. Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoyxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(1): 26-30.
18. Sigal E, Craik CS, Highland E, Grunberger D, Costello LL, Dixon RA, et al. Molecular cloning and primary structure of human 15-lipoyxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157(2): 457-64.
19. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10(5): 411-21.

Cloning and Expression of Epidermal Lipoxygenase from *Ambystoma Mexicanum* (LOXe) in *Escherichia Coli*

Maryam Tahan¹, Ahmad Movahedian-Attar PhD², Mahdi Abbasian MSc³,
Mohammad Reza Mofid PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: Lipoxygenase enzymes play an important role in various mechanisms of organisms. So far, many studies on human and other organisms lipoxygenase activity have been conducted. In eukaryotes, this enzyme converts arachidonic acid to a variety of inflammatory mediators. For example, leukotrienes are products of this enzyme reaction. This inflammatory mediator plays an important role in the healing process. Recent studies have shown that the lipoxygenase enzyme extracted from an amphibious (*Ambystoma mexicanum*) is more effective in the healing process in comparison with human lipoxygenase. Like in the case of other enzymes, the first step for enzyme identification and characterization is to produce a large amount of purified enzyme, but the recombinant production of these proteins in bacterial expression system has not yet been reported. Therefore, in the present study we have cloned and expressed lipoxygenase axolotls (LOXe) in *Escherichia coli* (E. coli) BL21.

Methods: The sequence encoding LOXe was designed based on the amino acid sequence of the protein and then, codon optimized in order to ensure the maximum expression in E. coli. At the next step, the synthetic DNA encoding LOXe inserted into the pUC57 vector using appropriate restriction sites and then, subcloned in the pET21-a, an expression vector in order to high production of the protein in bacteria. Recombinant vector transformed to E. coli BL21 as an expression host and expression of 71kDa protein LOXe (623 amino acids) was induced in the presence of IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside).

Findings: The cloning of LOXe was performed successfully and possibility of expression of this enzyme in E. coli was confirmed.

Conclusion: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis indicated that LOXe protein over-expressed successfully in E. coli cytoplasm.

Keywords: Lipoxygenase, Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), pET21-a

Citation: Tahan M, Movahedian-Attar A, Abbasian M, Mofid MR. Cloning and Expression of Epidermal Lipoxygenase from *Ambystoma Mexicanum* (LOXe) in *Escherichia Coli*. J Isfahan Med Sch 2014; 31(267): 2162-70

* This paper is derived from a Pharm D thesis No. 391485 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- PharmD Student, School of Pharmacy AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Department of Agricultural Biotechnology, School of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

4- Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry AND Bioinformatics Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Mohammad Reza Mofid, Email: mofid@pharm.mui.ac.ir