

## Evaluating Gene Expression, Purification and Structural Characterization of the Calprotectin Subunits of S100 A8 and S100 A9

Asghari H<sup>1</sup>, Gheibi N<sup>2</sup>, Goodarzvand Chegini K<sup>2,\*</sup>, Sahmani M<sup>3</sup>, Ilghari D<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Paramedicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

<sup>2</sup> Cell and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

\* Corresponding Author: Tel: 0281-3336001 Fax: 0281-3324970 E-mail: kgchegini@qums.ac.ir

Received: 6 Dec 2013 Accepted: 15 May 2014

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Calprotectin, S100A8 and S100A9 are involved in important processes including cell signaling and regulation of inflammatory responses. In this study, recombinant expression, purification and structural characterization of S100A8 and S100A9 were accomplished.

**Methods:** In this experimental study, pET15b was used as vector of human S100A8 and S100A9 coding sequences, hosted by *E.coli* BL21 (DE3). Gene expression and purification attempts were evaluated using SDS-PAGE. Protein purification was accomplished using Ni-NTA resin based on its affinity for His-tag present on recombinant proteins. Tertiary structure of proteins were evaluated using spectrofluorimetry.

**Results:** The subunits were over expressed 3-4 hours following induction at 37 °C. S100A9 was expressed mainly as inclusion body while S100A8 was found to be expressed mainly as a soluble protein. Purification of S100A8 and S100A9 was achieved at 100 mM imidazole. Spectroscopic studies showed that the amino acid tryptophan is in the internal structures and is less exposed to the aqueous environment.

**Conclusion:** In this study, a recombinant S100A8 and S100A9 subunits were expressed and purified and also their structures were confirmed.

**Keywords:** S100A8, S100A9, *E.coli* BL21(DE3), pET15b, Ni-NTA, Spectrofluorimetry

## بررسی بیان ژن و خالص سازی زیر واحدهای S100 A8 , S100 A9

### کالپروتکتین و بررسی ساختار آنها

حمیده اصغری<sup>۱</sup>، نعمت الله غیبی<sup>۲</sup>، کوروش گودرزوند چگینی<sup>۳\*</sup>، مهدی سهمانی<sup>۳</sup>، داریوش ایلغاری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران <sup>۲</sup> مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران <sup>۳</sup> گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم قزوین، قزوین، ایران  
\*نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۸۱-۳۳۳۶۰۰۱ فاکس: ۰۲۸۱-۳۳۲۴۹۷۰ پست الکترونیک: kgchegini@qums.ac.ir

#### چکیده

**زمینه و هدف:** کالپروتکتین، S100 A8 و S100 A9 در فرآیندهای مهمی نظیر پیام رسانی و تنظیم پاسخ های التهابی نقش دارند. در این مطالعه، بیان S100 A8 و S100 A9 بصورت نوترکیب، خالص سازی و بررسی ساختار آنها انجام گردید. **روش کار:** در این مطالعه تجربی از pET15b به عنوان حامل توالی کد کننده ژنهای S100 A8, S100 A9 انسانی و از *E. coli* BL21(DE3) به عنوان میزبان استفاده گردید. بیان ژن و فرآیند خالص سازی از طریق SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. خالص سازی پروتئینها با استفاده از رزین Ni-NTA و بر اساس میل ترکیبی آن به His-Tag پروتئین های نوترکیب انجام گرفت. ساختار سوم پروتئین ها با طیف سنج فلورسانس بررسی شد. **یافته ها:** زیر واحدهای مذکور ۳-۴ ساعت بعد از القاء و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بیان بالایی را نشان دادند. درصد بالایی از پروتئین S100A9 در فاز اینکلوژن بادی نشان داده شد، در حالیکه زیر واحد S100A8 عمدتاً بصورت محلول بیان گردید. S100A8 و S100A9 در غلظت ۱۰۰ mM ایمیدازول خالص سازی گردید. در بررسی طیف سنجی نشان داده شد که اسید آمینه تریپتوفان در ساختار های داخلی قرار گرفته و کمتر در معرض محیط آبی است. **نتیجه گیری:** در این مطالعه زیر واحدهای S100A8 و S100A9 بصورت نوترکیب بیان شده و تخلیص گردید. همچنین، ساختار آنها مورد تایید قرار گرفت.

**کلمات کلیدی:** S100A8, S100A9, Ni-NTA, *E. coli* BL21(DE3), طیف سنجی فلورسانس، pET15b

دریافت: ۹۲/۹/۱۵ پذیرش: ۹۳/۲/۲۵

#### مقدمه

کالپروتکتین، MRP8/14، آنتی ژن فیبروز کیستیک، آنتی ژن 27E10 و Mac387 شناخته می شوند [۷-۳]. ژنهای مربوط به پروتئین های خانواده S100 در قالب یک مجموعه ژنی بر روی کروموزوم 1q21 قرار گرفته است. ساختمان ژنهای کد کننده پروتئین های MRP شناسایی شده و توالی آنها کلون گردیده است. MRP-14 دارای یک ناحیه کد کننده با ۳۵۲ نوکلئوتید بوده و پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۱۴ کیلودالتون و ۱۱۴ اسید آمینه را تشکیل می دهد. توالی MRP-8 انسانی دارای یک ناحیه کد کننده با ۲۷۹ نوکلئوتید می باشد که پروتئینی با ۹۳ اسید

کالپروتکتین به خانواده ای از پروتئینها به نام پروتئین های S100 تعلق دارد که به نوبه خود زیر مجموعه ای از پروتئین های خانواده EF-hand می باشند. این نوع پروتئین ها به صورت وابسته به کلسیم با انواع خاصی از پروتئین ها میان کنش داده و در تنظیم بسیاری از فرآیندهای سلولی نظیر انتقال پیام، تمایز و کنترل چرخه سلولی نقش دارند [۲،۱].

کالپروتکتین از دو زیر واحد مختلف به نام های MRP-8(S100A8) و MRP-14(S100A9) تشکیل شده است که در فرایند وابسته به کلسیم بطور غیر کووالان کمپلکس هترو دایمر تشکیل داده و به نامهای

نشر فلورسانس از دست می دهند. طیف نشری همواره دارای انرژی کمتری است زیرا بخشی از انرژی بصورت گرما و ارتعاش از بین می رود. خاصیت نشر فلورسانس مولکولها اغلب در محیطهای آبی فروکش می کند، برعکس در محیطهای غیرقطبی و یا محیط هایی با شرایط اتصال محکم این پدیده تشدید می شود. هم فرآیند فروکش و هم تشدید فلورسانس اطلاعات خوبی در خصوص ساختار و عمل پروتئین در اختیار می گذارند. بطور کلی ویژگی فلورسانس پروتئین ها بدلیل فلوروفورهای ذاتی نظیرریشه های تیروزین، تریپتوفان و فنیل آلانین یا فلوروفورهای خارجی که در نشان دار کردن پروتئین ها استفاده می شوند، ایجاد می شود. در واقع این ویژگی در بسیاری از پروتئین ها صرفا مربوط به اسید آمینه تریپتوفان می شود [۲۰، ۱۹، ۴].

با عنایت به اهمیت کالپروتکتین، که در بالا به برخی از آنها اشاره شد، در این مطالعه، بیان و خالص سازی زیرواحدهای کالپروتکتین، S100A8 و S100A9، بصورت نوترکیب در دستور کار قرار گرفت. از آنجا که پروتئین ها در ساختارهای طبیعی خود قادر به فعالیت بیولوژیک هستند ساختار و تاخوردگی این پروتئین ها به کمک اسپکتروسکوپی فلورسانس نیز مورد بررسی قرار گرفت.

### روش کار

**مواد:** در این مطالعه تجربی از پلاسمید pET15b (Liferiver) بعنوان وکتور توالی ناحیه کد کننده ژنهای S100 A8 و S100 A9 انسانی و از *E. coli* BL21(DE3)(Novagen) به عنوان میزبان جهت بیان S100 A8 و S100 A9 نوترکیب استفاده شد. از IPTG(Sigma)<sup>1</sup> به عنوان القاء کننده و از آمپی سیلین (Sigma) جهت انتخاب کلنی های ترانسفورم

آمینه و وزن مولکولی حدود ۱۰.۸ کیلو دالتون را می سازد. MRP-8 و MRP-14 دارای یک ریشه اسید آمینه سیستئین در ساختمان خود می باشند. این پروتئین ها فاقد توالی سیگنال یا توالی فرارگیری در غشاء هستند. همچنین این پروتئینها فاقد جایگاههای N-گلیکوزیلاسیون می باشند [۸، ۵-۳]. کالپروتکتین نقش عمده ای در تنظیم پاسخهای ایمنی و التهابی ایفا می کند [۹]. فعال شدن نوتروفیلها و چسبندگی مونوسیت ها به اندوتلیال با آزادسازی مقادیر قابل توجهی از کالپروتکتین همراه است. پژوهش ها نشان می دهد که غلظت پلاسمایی این پروتئین در برخی بیماریهای التهابی بطور چشمگیری افزایش می یابد، لذا این پروتئین بعنوان یک مارکر مناسب برای فرآیندهای التهابی معرفی شده است [۱۰]. امروزه افزایش غلظت مدفوعی کالپروتکتین بعنوان یک بیومارکر در تشخیص بیماریهای التهابی روده مورد استفاده قرار گرفته است [۱۱، ۸].

کالپروتکتین، بعنوان یک عامل موثر در ترمیم زخم پس از جراحتهای پوستی شناخته شده است. این پروتئین قابلیت اتصال به عنصر روی و برداشت آن از محیط را دارد و به همین دلیل مانع از فعالیت آنزیمهای وابسته به روی نظیر آنزیم متالوپروتئیناز ماتریکس شده و از رشد عوامل میکروبی جلوگیری می کند [۱۴-۱۲]. کالپروتکتین پروتئین نوینی در عرصه مطالعات سرطان است و پژوهشهای ساختاری و عملکردی آن نیز قدمت چندانی ندارد. این پروتئین رشد سلولهای پروکاریوتی و یوکاریوتی و بویژه سرطانی را بطور موثر و توانمند مهار می کند [۱۸-۱۵، ۸، ۱]. از این رو پیش بینی می شود که این پروتئین در آینده ای نه چندان دور یکی از داروهای موثر و مفید در جهت مقابله با سرطان باشد.

یکی از روش ها جهت مطالعه ساختار سوم پروتئین ها، روش طیف سنجی فلورسانس است. در مطالعه فلورسانس برخی مولکولها تهییج شده و ضمن برگشت به پایه انرژی اولیه انرژی خود را بصورت

<sup>1</sup>Isopropyl-D-thiogalactopyranoside

دقیقه در ۵۰۰۰ دور بر دقیقه، دمای ۴ درجه سانتیفریوژ شده و رسوب مربوطه جمع آوری و در دمای ۲۰- نگهداری شد.

**الکتروفورز پروتئین SDS-PAGE:** نمونه‌های جمع آوری شده از دو زیر واحد در شرایط native و denaturant لیز شده و روی ژل پلی آکرلامید ۱۲٪ با جریان ۲۰۰ ولت الکتروفورز شدند. بیان S100A8 و S100A9 نوترکیب به کمک اندازه (Size) آنها در مقایسه مارکر استاندارد و همچنین وجود باند متمایز در ستون مربوط به نمونه القاء شده، نشان داده می شود.

**بررسی حلالیت زیر واحدها:** پس از بیان دو زیر واحد S100A8, S100A9، برای انتخاب روش تخلیص به روش native و denaturing میزان حلالیت پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های جمع آوری شده از مرحله بیان با استفاده از دستگاه سونیکاتور و در بافر ۱۰۰ mM Tris، ۲۵ mM NaCl لیز شده، نمونه ای از آن به عنوان whole cell lysate و نمونه ای هم بعد از انجام سانتریفیوژ از مایع رویی توسط SDS-PAGE بررسی شد. مشخص شد که بیشترین میزان پروتئین بیان شده در هر دو زیر واحد در حالت محلول قرار دارند و میزان کمی در اینکلوژن بادی تجمع پیدا کرده اند.

**تخلیص:** به منظور خالص سازی پروتئین بیان شده، رسوب حاوی باکتری‌های جمع آوری شده در مرحله بیان، در بافر لیزکننده به مدت یک ساعت در ۱۳۵۰۰ دور بر دقیقه و ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. بافر لیزکننده حاوی ۲۵ mM HEPES، ۱۰۰ mM NaCl و گلیسرول ۱۰٪ با pH=۸ بود. سوپرناتانت نمونه هائیکه با روش native و denaturing لیز شده بود از ستون Ni-NTA عبور داده شد. سپس ستون با استفاده از غلظتهای مختلف ایمیدازول (۲۰۰-۵۰ میلی مولار) شستشو داده شد. نمونه هایی از لیزات خام و جمع آوری شده از مراحل شستشو بر روی SDS-PAGE

شده در محیط کشت استفاده گردید. از محیط LB<sup>۱</sup> (Sigma) برای کشت باکتری استفاده گردید. از رزین Ni-NTA (Sigma) و ایمیدازول (Appllichem) جهت خالص سازی پروتئین نوترکیب استفاده گردید. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت های Sigma و Merck خریداری شده و از درجه Molecular biology grade برخوردار بودند.

**ترانسفورماسیون:** پلاسمیدهای حاوی توالی کد کننده زیر واحدهای S100A8, S100A9 بطور جداگانه به میزبان پذیرا (Competent cell) انتقال داده شدند. ترانسفورمیشن با استفاده از شوک حرارتی و بر اساس پروتکل استاندارد انجام گرفت [۲۱]. بدین صورت که ۲ میکرولیتر پلاسمید (معادل ۱۶ نانوگرم) حاوی ژن کد کننده S100A8 به ۵۰ میکرولیتر میزبان پذیرا اضافه شده، مدت نیم ساعت روی یخ انکوبه شد. سپس در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد حمام آب گرم به مدت ۶۰ ثانیه قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محیط SOC افزوده و در ۳۷ درجه انکوباتور شیکر قرار داده شد. محتوی میکروتیوپ بر روی محیط LB Agar حاوی آمپی سیلین ۱٪ پخش شده به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. در مورد S100A9 نیز مراحل مذکور انجام گرفت.

**بیان ژن و تأیید آن:** از کلنی های بدست آمده در محیط LB Agar-آمپی سیلین، یک تک کلنی به ۵۰ میلی لیتر محیط LB Broth حاوی آمپی سیلین ۱٪ تلقیح شده در شیکرانکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۲۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. پس از اینکه OD<sub>۶۰۰nm</sub> محیط به ۰.۶ رسید، IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار به محیط افزوده شد و به مدت ۴ ساعت در شیکرانکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۲۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. به فاصله هر یک ساعت مقداری از محیط کشت برداشته شده و به مدت ۱۵

<sup>1</sup> Luria-Bertani

این بررسی ها با غلظت پروتئین ۰.۳ میلی گرم در میلی لیتر و در بافر حاوی ۱۰۰ mM NaCl، ۲۵ mM  $\text{PO}_4\text{NaH}_2$ ، pH=۶/۵ و در دمای اتاق انجام شد.

### یافته ها

#### بیان S100A8 و S100A9 نوترکیب

پس از ترانسفورم شدن باکتریها و القا با IPTG، برای بررسی بیان دو زیر واحد پروتئین کالپروتکتین نوترکیب، باکتریهای تراریخته در محیط مناسب کشت داده شدند و نمونهها قبل و بعد از القا در ساعت اول تا چهارم مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج SDS-PAGE نشان داد که بعد از القا با IPTG، پروتئین های نوترکیب مورد نظر بیان شده است. از آنجا که این پروتئین ها دارای دنباله پلی هیسیدین هستند وزن مولکولی بیشتری از نوع طبیعی خود دارند. لذا زیر واحد S100A8 در حدود ۱۹ و زیر واحد S100A9 در وزن ۱۷ کیلو دالتون مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که بهترین میزان بیان ۳ الی ۴ ساعت بعد از القا توسط IPTG می باشد (شکل ۲و۱).

#### خالص سازی S100A8 و S100A9 نوترکیب

بعد از بیان پروتئین ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

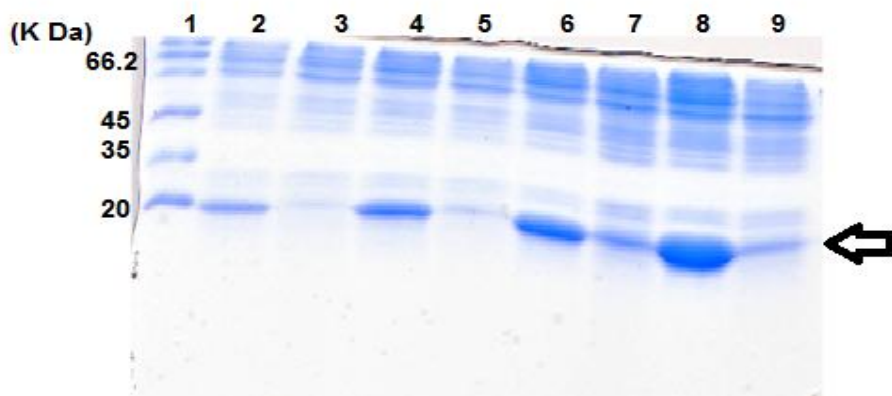
مورد بررسی قرارگرفت تا فرکشن حاوی پروتئین با خلوص بیشتر جدا شود. وجود یک باند متمایز در اندازه مورد نظر در نمونه های القاء شده که طی مراحل خالص سازی با افزایش غلظت ایمیدازول تقویت می شود و در عین حال حذف باند های دیگر طی این مراحل، خالص سازی پروتئین S100A8 و S100A9 نوترکیب را نشان می دهد.

#### دیالیز نمونه های تخلیص شده و تعیین غلظت:

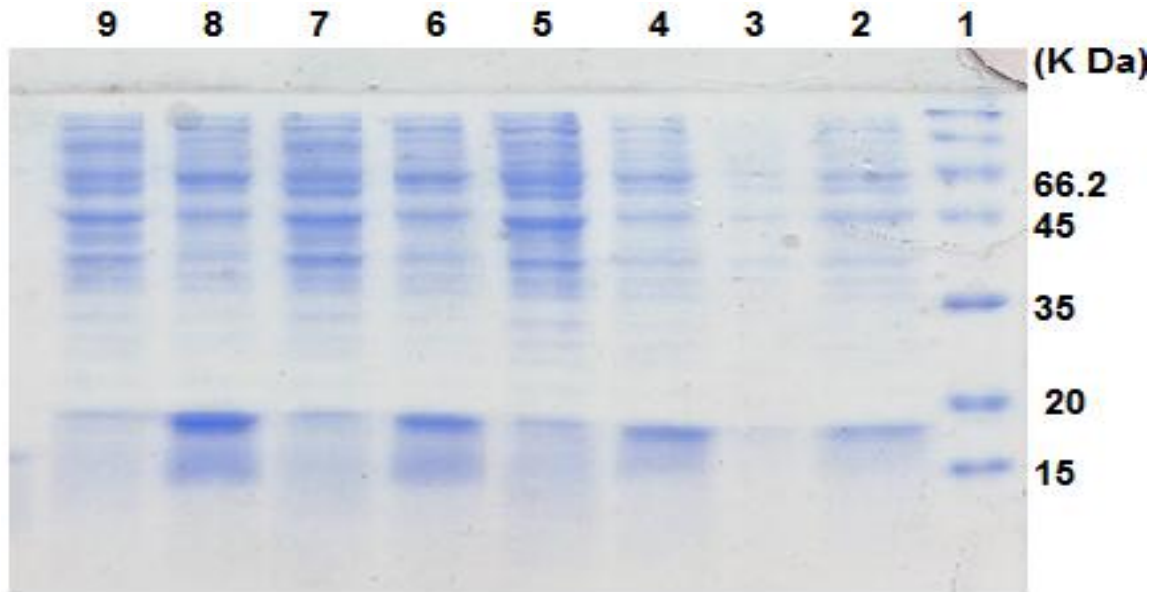
جهت خارج کردن ایمیدازول و اوره از نمونه های حاوی پروتئین تخلیص شده، نمونه ها در بافر حاوی ۱۰۰ mM NaCl و ۲۵ mM Tris، pH=۶ به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شدند. غلظت پروتئین نمونه ها با استفاده از نانودراپ و در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. از ضریب خاموشی ویژه  $1 \text{ mg}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  برای S100A8 و  $0.526 \text{ ml}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  برای S100A9 استفاده گردید. غلظت S100A8  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  و S100A9 حدود  $1/3 \text{ mg ml}^{-1}$  دست آمد.

#### بررسی ساختار پروتئین قبل و بعد از دیالیز

طیف سنجی فلورسانس پروتئین نوترکیب خالص شده با استفاده از دستگاه Varion انجام شد. از آنجا که هر دو زیر واحد دارای اسید آمینه تریپتوفان هستند در طول موج ۲۸۰ نانومتر تحریک و در طول موج ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر نشر آنها اندازه گیری شد.

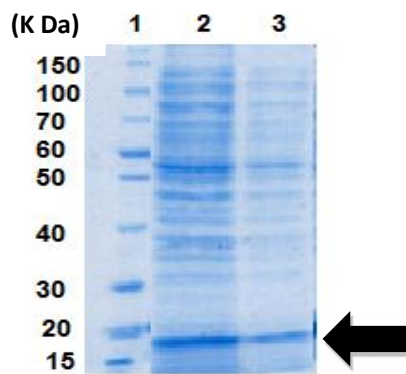


شکل ۱. بررسی بیان ژن S100A8 توسط SDS-PAGE: ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی، ستون ۲ نمونه لیز شده باکتری حامل پلاسمید نوترکیب ۱ ساعت بعد از القا با IPTG با غلظت یک میلی مولار، ستون ۳ نمونه لیز شده باکتری حامل پلاسمید نوترکیب قبل از القا، ستون های ۴، ۶ و ۸ بعد از القا با IPTG به ترتیب در فاصله زمانی دو، سه و چهار ساعت بعد از القا می باشد. بیان S100A8 بصورت باندهایی متمایز در امتداد پیکان نشان داده شده است. ستونهای ۵، ۷ و ۹ به ترتیب نمونه های القاء نشده در فاصله زمانی دو، سه، چهار ساعت بعد از القا می باشد.



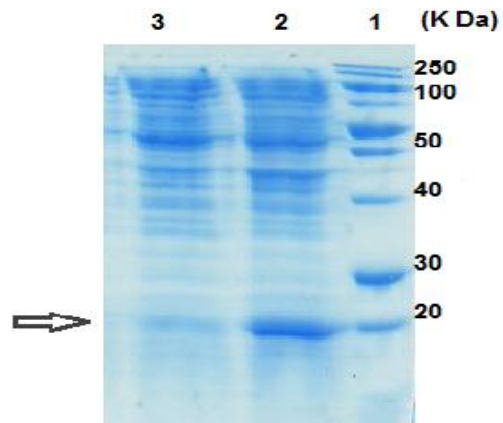
شکل ۲. بررسی بیان ژن S100A9 توسط SDS-PAGE: ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی، ستون ۲ نمونه لیز شده باکتری حامل پلاسمید نوترکیب ۱ ساعت بعد از القاء با IPTG با غلظت یک میلی‌مولار، ستون ۳ نمونه لیز شده باکتری حامل پلاسمید نوترکیب قبل از القاء، ستون‌های ۴، ۶ و ۸ بعد از القاء با IPTG به ترتیب در فاصله زمانی دو، سه و چهار ساعت بعد از القاء می‌باشد. بیان S100A9 بصورت باندهایی متمایز در امتداد پیکان نشان داده شده است. ستون‌های ۵، ۷ و ۹ به ترتیب نمونه‌های القاء نشده در فاصله زمانی دو، سه، چهار ساعت بعد از القاء می‌باشد.

و مقایسه‌ی نمونه‌های حاصل از لیز سلول و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ آن توسط SDS-PAGE مشاهده شد که زیر واحد S100A9 بیان شده تقریباً نامحلول و زیر واحد S100A8 محلول تر است (شکل ۳ و ۴).



شکل ۴. بررسی حلالیت زیر واحد S100A8. در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد. ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی، ستون ۲ و ۳ به ترتیب نمونه لیز شده باکتری و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد.

با توجه به وجود دنباله پلی‌هیستیدین در ابتدای پروتئین مورد نظر برای خالص‌سازی پروتئین بیان شده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA استفاده شد. شستشوی ستون با استفاده از شیب غلظت ایمیدازول از ۵۰ الی ۲۰۰ میلی‌مولار



شکل ۳. بررسی حلالیت زیر واحد S100A9: در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد. ستون ۱ نشانگر وزن مولکولی، ستون ۲ و ۳ به ترتیب نمونه لیز شده باکتری و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، باتوجه به شکل میزان پروتئین موجود در فاز محلول بسیار کم بوده و نشان دهنده این موضوع است که پروتئین بیشتر در فاز غیر محلول قرار دارد.

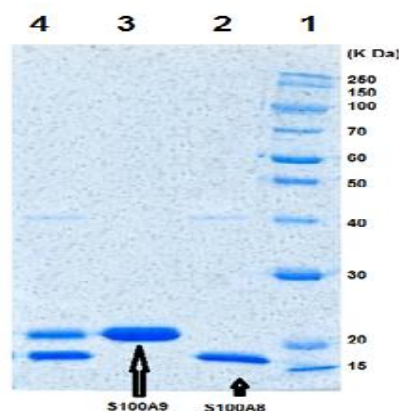
### طیف‌سنجی فلورسانس S100A8 و S100A9 نوترکیب

همانطور که ذکر شد پروتئین S100 A8 که نسبتاً محلولتر بود بصورت طبیعی و زیرواحد S100A9 بصورت دناتوره در بافر حاوی اوره ۶ مولار تخلیص شد و سپس دیالیز جهت خروج اوره و ایمیدازول انجام شد و به منظور اطمینان از اینکه پروتئین به شکل فعال و طبیعی بدست آمده است طیف سنجی فلورسانس انجام شد (شکل ۶و۷). طیف سنجی فلورسانس در پروتئین نوترکیب S100A9 قبل و بعد از دیالیز در شکل ۶ نشان داده شده است.

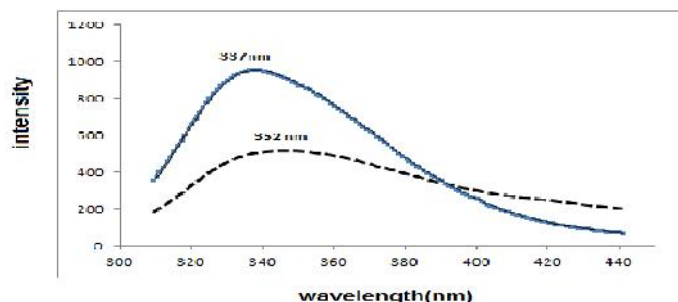
### بحث

بیان پروتئین بصورت نوترکیب روشی برای دسترسی به پروتئین مورد نظر و انجام مطالعات ساختاری و بررسی کاربرد دارویی آن است. سیستم های مختلفی برای تولید پروتئین بصورت نوترکیب

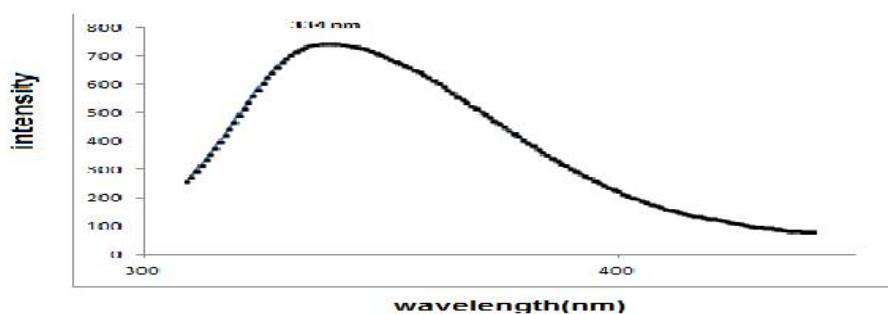
صورت پذیرفت. ارزیابی فرکشن‌های مختلف حاصل از شستشوی ستون بر روی SDS-PAGE نشان داد که S100A8 و S100A9 نوترکیب در غلظت mM ۱۰۰ ایمیدازول بصورت باندهای منفرد جداسازی می‌گردد که در شکل ۵ هر دو زیر واحد به صورت باند های متمایزی بر روی ژل نشان داده شده است.



شکل ۵. S100A8 , S100A9:نوترکیب پس از تخلیص. ستون ۱، نشانگر وزن مولکولی، ستون ۲، نشان دهنده زیر واحد S100A8 و ستون ۳ زیر واحد S100A9 و ستون ۴ هر دو زیر واحد.



شکل ۶. آنالیز طیف سنجی فلورسانس پروتئین نوترکیب S100 A9 : در حالت دناتوره و طبیعی. بیشترین طول موج نشر فلورسانس از اسید آمینه تریپتوفان در mM ۱۰۰ NaCl، mM ۲۵ PO<sub>4</sub>NaH<sub>2</sub> با pH=۶.۵ در دمای اتاق. منحنی (---) نشر فلورسانس در حالت دناتوره و قبل از دیالیز، منحنی (—): نشر فلورسانس بعد از دیالیز و خروج اوره از نمونه را نمایش می‌دهد.



شکل ۷. آنالیز طیف سنجی فلورسانس پروتئین نوترکیب S100 A8 : بعد از تخلیص و دیالیز. بیشترین طول موج نشر فلورسانس از اسید آمینه تریپتوفان در mM ۱۰۰ NaCl، mM ۲۵ PO<sub>4</sub>NaH<sub>2</sub> با pH=۶/۵ در دمای اتاق.

در بیوتکنولوژی وجود دارد. بیان پروتئین ها در سلولهای پستانداران اغلب منجر به تولید پروتئین های نوترکیب فعالی می شود که دچار تغییرات پس از ترجمه نیز شده اند، ولی این روش زمان گیر و گران است، در حالیکه باکتریها همچنان سیستم های تولیدی مناسبی هستند. یکی از مشکلاتی که حین تولید پروتئین نوترکیب در میزبان پروکاریوتی ممکن است با آن مواجه شویم نامحلول بودن پروتئین است. بسیاری از پروتئین هایی که در میزبان پروکاریوتی تولید می شوند تاخوردگی نادرست و یا ناکامل داشته که اغلب بصورت اجسام توده ای و غیرمحلول در سلول تجمع می یابند. اکثر مطالعات بیان پروتئین های نوترکیب در باکتری *E.coli* نشان داده است که تشکیل اجسام توده ای یک قاعده است تا یک استثناء. روشهای مختلفی برای به حداقل رساندن تشکیل اجسام توده ای و دستیابی به پروتئین محلول وجود دارد که شامل تغییر متغیرهایی نظیر درجه حرارت، میزان بیان، متابولیسم میزبان و غلظت ماده ای القا کننده یا تغییرات مهندسی روی پروتئین هدف مثل استفاده از اتصال دنباله مناسب و نیز بیان همزمان چاپرون ها با پروتئین می باشد. از بین روش های موجود، تغییر شرایط رشد باکتری مانند رشد دادن باکتری در درجه حرارت پایین تر و یا در محیط کشتی که از نظر مواد مورد نیاز باکتری غنی نباشد، اغلب به عنوان یک راهکار مناسب بکار گرفته می شود [۲۲-۲۴]. البته جهت صرفه جویی در هزینه ها و افزایش میزان محصول نهایی در بسیاری موارد از پروتئین هایی که بصورت اجسام توده ای در فاز نامحلول تجمع حاصل کرده اند استفاده می شود. برای این منظور بایستی ابتدا این رسوب به شکل محلول در آید. معمولاً عوامل دناتورده کننده قوی نظیر اوره و گوانیدیم هیدروکلرید جهت محلول کردن inclusion body استفاده می شوند. این عوامل ساختارهای فضایی سوم و چهارم پروتئین را از

بین برده و رسوب حاوی پروتئین غیر فعال را محلول می کنند [۲۵].

در یک مطالعه که توسط Hunter و همکارانش در سال ۱۹۹۸ انجام شد زیر واحدهای MRP8 و MRP9 بصورت نوترکیب در باکتری اشرشیاکلی گونه BL21 (DE3) بیان شد که بدلیل بیان بیش از حد، هر دو زیر واحد در فاز نامحلول بصورت اینکلوزن بادی قرار گرفتند که پس از لیز کردن نمونه و سانتریفیوژ، رسوب حاوی این زیرواحدها در بافر حاوی اوره ۸ مولار حل شد و پس از انجام دیالیز، توسط بررسی های اسپکتروفوتومتریک و بررسی دیمریزه شدن این دو زیر واحد فولدینگ طبیعی این پروتئین ها تایید شد [۲۶]. در مطالعه دیگری ژنهای کد کننده این دو زیر واحد در وکتور pET11/20 قرار گرفته و بیان شدند و برای تشکیل هترودیمر هر دو زیر واحد به نسبت یکسان مخلوط شده و برای اطمینان از دیمریزه شدن فرآیند دناتوراسیون و سپس برگرداندن به فرم طبیعی صورت گرفت [۵].

در این مطالعه در مرحله ای اول پلاسمید حاوی ژنهای ناحیه ای کد کننده پروتئین نوترکیب S100A8 و S100A9، تحت سیستم بیانی باکتری *E.coli* BL21 قرار گرفت و پروتئینهای مورد نظر به دست آمد. پس از بیان ژن های پروتئین S100A8 و S100A9 و بررسی حلالیت مشخص شد که زیر واحد S100A8 حلالیت بیشتری دارد که شاید بدلیل وزن مولکولی کمتر آن است. به همین علت زیر واحد کوچکتر به فرم طبیعی و در شرایط بدون اوره تخلیص شد. در خصوص زیر واحد بزرگتر برای بدست آوردن پروتئین بیشتر از رسوب حاصل از سلولهای لیز شده و در واقع از بخش نامحلول یا inclusion body استفاده شد. به همین جهت رسوب حاصل از سانتریفیوژ در بافر حاوی اوره ۶ مولار حل شد و در ستون کروماتوگرافی نیکل تخلیص شد. از آنجاییکه اوره موجب از بین رفتن ساختارهای فضایی پروتئین



۴۰۰-۳۰۰ اندازه گیری شد. حداکثر طول موج نشر تریپتوفان در حالت دناتورده در زیر واحد S100A9 (قبل از دیالیز و در بافر حاوی اوره ۶ مولار) ۳۵۲nm است و به نظر می رسد که تمام ریشه های تریپتوفان در سطح پروتئین و در ارتباط با محیط آبی قرار گرفته اند. در حالیکه حداکثر طول موج نشر در نمونه بعد از دیالیز ۳۳۶nm است که یک blue shift را در مقایسه با حالت دناتورده نشان می دهد و بیان کننده این است که ریشه های تریپتوفان بطور چشمگیری در داخل پروتئین قرار گرفته و تماس کمتری با محیط آبی دارد.

### نتیجه گیری

در این مطالعه دو زیر واحد S100A8 و S100A9 بصورت نوترکیب تولید و خالص گردید و نشان داده شد که پروتئین های تخلیص شده به صورت محلول و دارای ساختار طبیعی است. محصول این مطالعه در مطالعات بعدی جهت بررسی برهمکنش دو پروتئین با همدیگر و تاثیر آن در روند بهبود زخم و بررسی میزان القا آپوپتوز در سلولهای یوکاریوتی مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

می شود، برای برگشت به فرم طبیعی بایستی اوره از محیط حاوی پروتئین خارج می شد که این کار با دیالیز نمونه ها انجام شد. سپس برای اطمینان از ساختار پروتئین های حاصل، از روش طیف سنجی فلورسانس استفاده شد که به عنوان یکی از روشهای مطالعه ساختار سوم پروتئین ها و بررسی تاخوردگی پروتئین های نوترکیب استفاده می گردد [۲۰]. حضور تنها یک ریشه تریپتوفان در هر کدام از زیر واحد های کالپروتکتین شرایط را برای مطالعه با روش اسپکتروفوتومتری فلورسانس فراهم میکند.<sup>54</sup> Trp در MRP8 در میانه ماریپج آلفای سوم و<sup>88</sup> Trp در MRP14 در نزدیک به انتهای C ماریپج چهارم واقع است. زیر واحد کوچک دارای چهار تیروزین و زیر واحد بزرگ دارای یک تیروزین است. بنابراین اگر در مطالعه فلورسانس ذاتی از طول موج ۲۸۰nm برای تهیه استفاده شود هم تیروزین ها و هم تریپتوفان ها تهیه خواهند شد و اگر از طول موج ۲۹۰nm استفاده شود تنها تریپتوفان ها تهیه خواهند شد. طول موج نشری اطلاعاتی را در خصوص موقعیت تریپتوفان ها در اختیار می گذارد [۲۸،۲۷]. در این مطالعه نمونه ها در طول موج ۲۸۰nm تهیه شدند و طول موج نشر در دامنه nm

### Reference

- 1- Salama I, Malone PS, Mihaimed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. *EJSO* 2008 Apr;34(4):357-64.
- 2- Kostakis ID, Cholidou KG, Kallianidis K, Perrea D, Antsaklis A. The role of calprotectin in obstetrics and gynecology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010 Jul;151(1):3-9.
- 3- Hogg N, Allen C, Edgeworth J. Monoclonal antibody 5.5 reacts with p8,14, a myeloid molecule associated with some vascular endothelium. *Eur J Immunol.* 1989 Jun;19(6):1053-61.
- 4- Vogl T, Leukert N, Barczyk K, Strupat K, Roth J. Biophysical characterization of S100A8 and S100A9 in the absence and presence of bivalent cations. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Nov;1763(11):1298-306.
- 5- Wilkinson MM, Busuttill A, Hayward C, Brock DJ, Dorin JR, van HV. Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues. *J Cell Sci.* 1988 Oct;91 (2):221-30.
- 6- Leukert N, Vogl T, Strupat K, Reichelt R, Sorg C, Roth J. Calcium-dependent tetramer formation of S100A8 and S100A9 is essential for biological activity. *J Mol Biol.* 2006 Jun; 359(4):961-72.

- 7- Korndorfer IP, Brueckner F, Skerra A. The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)<sub>2</sub> heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting  $\alpha$ -helices can determine specific association of two EF-hand proteins. *JMB*. 2007 July;370(5):887-98.
- 8- Benet Bosco Dhas D, Vishnu Bhat B, Bahubali Gane D. Role of calprotectin in infection and inflammation. *Curr Pediatr Res*. 2012 May;16(2):83-94.
- 9- Averill MM, Barnhart S, Becker L, Li X, Heinecke JW, Leboeuf RC, et al. S100A9 differentially modifies phenotypic states of neutrophils, macrophages, and dendritic cells: implications for atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circulation*. 2011 Mar;123(11):1216-26.
- 10- Nacken W, Kerkhoff C. The hetero-oligomeric complex of the S100A8/S100A9 protein is extremely protease resistant. *FEBS Lett*. 2007 Oct;581(26):5127-30.
- 11- Burri E, Beglinger C. Faecal calprotectin in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *Biochem Med (Zagreb)*. 2011 Mar;21(3):245-53.
- 12- Hsu K, Champaiboon C, Guenther BD, Sorenson BS, Khammanivong A, Ross KF, et al. Anti-infective protective properties of S100 calgranulins. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2009 Dec;8(4):290-305.
- 13- Kehl-Fie TE, Chitayat S, Hood MI, Damo S, Restrepo N, Garcia C, et al. Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe*. 2011 Aug;10(2):158-64.
- 14- Thorey IS, Roth J, Regenbogen J, Halle JP, Bittner M, Vogl T, et al. The Ca<sup>2+</sup>-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes. *J Biol Chem*. 2001 Sep;276(38):35818-25.
- 15- Ghavami S, Kerkhoff C, Los M, Hashemi M, Sorg C, Karami-Tehrani F. Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *J Leukoc Biol*. 2004 Jul;76(1):169-75.
- 16- Ghavami S, Chitayat S, Hashemi M, Eshraghi M, Chazin WJ, Halayko AJ, et al. S100A8/A9: A Janus-faced molecule in cancer therapy and tumorigenesis. *Eur J Pharmacol*. 2009 Dec;625(1-3):73-83.
- 17- Zali H, Rezaei-Tavirani M, Kariminia A, Yousefi R, Shokrgozar MA. Evaluation of growth inhibitory and apoptosis inducing activity of human calprotectin on the human gastric cell line (AGS). *Iran Biomed J*. 2008 Jan;12(1):7-14.
- 18- Cheng P, Corzo CA, Luetetteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med*. 2008 Sep;205(10):2235-49.
- 19- Azimi O, Emami Z, Salari H, Chamani J. Probing the interaction of human serum albumin with norfloxacin in the presence of high-frequency electromagnetic fields: fluorescence spectroscopy and circular dichroism investigations. *Molecules*. 2011 Nov;16(12):9792-818.
- 20- Garland C, Nibler J, Shoemaker D. *Experiments in Physical Chemistry*. 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Education, 2008: 58-84.
- 21- Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4<sup>th</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012:1.105-1.111.
- 22- Alibolandi M, Mirzahoseini H. Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. *Biochem Res Int*. 2011 May; 1-6.
- 23- Alibolandi M, Mirzahoseini H. Purification and refolding of overexpressed human basic fibroblast growth factor in *Escherichia coli*. *Biotechnol Res Int*. 2011 Aug; 1-6.
- 24- Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2005 Jan;115(2):113-28.
- 25- Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr; 100(9):5142-5147.

- 26- Hunter MJ, Chazin WJ. High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14. *J Biol Chem.* 1998 May;273(20):12427-35.
- 27- Ababou A, Desjarlais JR. Solvation energetics and conformational change in EF-hand proteins. *Protein Sci.* 2001 Feb;10(2):301-12.
- 28- Erickson JR, Moerland TS. A competition assay of magnesium affinity for EF-hand proteins based on the fluorescent indicator magnesium green. *Anal Biochem.* 2005 Oct;345(2):343-5.