تنظیم: علی اکباتانی

ویرایش ژنوم باکتری باسیلوس پامیلوس با استفاده از تکنیک کریسپر با هدف افزایش تولید پروتئاز

زمینه های استفاده و کاربرد محصول

آنزیم های پروتئولیتیک به صورت گسترده در تمام موجودات یافت می شوند و در رشد و نمو سلول دارای نقش مهمی هستند. پروتئازهای برون سلولی به دلیل کاربرد در صنایع گوناگون از قبیل شوینده، نساجی، چرم و غیره داری ارزش تجاری بالایی می باشند. هرچند منابع میکروبی بی شماری توانایی تولید این آنزیمها را دارند،اما فقط تعداد معدودی از آنها پتانسیل بالقوه ای برای به کارگیری در مقیاس صنعتی به عنوان تولیدکنندگان تجاری دارند.(Salihu et al. 2012)

ضرورت انجام این پروژه

آنزیم پروتئاز یکی از مهمترین آنزیم های صنعتی بوده و دارای کاربردهای مختلف در صنایع گوناگون می باشد.از آنجا که واحد تولیدی مشخصی جهت تولید آنزیم در داخل کشور وجود ندارد و با توجه به آمار اتاق بازرگانی، صنایع،معادن و کشاورزی کشور تقریبا تمام حجم آنزیم مورد نیاز کشور نزدیک به ۲۵میلیون دلار در سال ۱۳۹۶از طریق واردات تامین میشود که از این میزان بین ۴۰ تا ۶۰ درصد مربوط به آنزیم پروتئاز می باشد.با توجه به اینکه سالانه میزان زیادی آنزیم وارد کشور میشود، تولید آنزیم پروتئاز با فعالیت بالا و کاربرد آن در صنایع مختلف حائز اهمیت می باشد(Ariyaei et al. 2019; Dadshahi et al. 2016).

هم اکنون شرکت نووانزایم در صدر شرکت های تولیدکننده آنزیم های تجاری است، و در رتبه های بعدی شرکت دوپونت و DSM قرار دارند.

از جمله نیازمندی های یک پروتئاز برای استفاده در شوینده ها، فعالیت و پایداری بالا در pH و دمای بالای محیط و همچنین مقاومت و سازگاری در برابر عوامل تخریب کننده ی موجود در شوینده هستند.

در ارزیابی های فعالیت آنزیمی در شوینده های تجاری شرکتهای بین المللی، بیشترین فعالیت آنزیمی پروتئاز در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و pH۱۰,۵ تا ۱۱ مشاهده شده است.(Silva and Yang 1998)

با توجه به نیاز روز افزون به این آنزیم در کشور و اهمیتی که آنزیم های پروتئاز از جمله پروتئازهای قلیایی دارند، شناسایی باکتریهای بومی مولد آنزیم، شناسایی و جداسازی ژن و آنزیم مورد نظر ضروری به نظر میرسد، زیرا بیشتر صنایع از آنزیمهای تجاری که توسط شرکتهای خارجی تولید میشوند استفاده می کنند که به لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیست. همچنین، بیشتر آزمایشها و پژوهشهایی که در زمینه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی انجام گرفته با استفاده از سویه های استاندارد و آماده بوده است.

چالش اصلی تولید پروتئاز قلیایی با استفاده از سلولهای وحشی این است که علاوه بر عدم تولید کافی و مقرون به صرفه نبودن، گاها شرایط کشت آنها نیز بسیار سخت است. اما اصلاح کروموزوم سلول، مسیر جدیدی را در این حوزه معرفی کرد که به وسیله آن میتوان تولید پروتئین موردنظر را

افزایش داد و در عین حال شرایط کشت را برای آن آسانتر کرد. در این مسیر میتوان از رویکردهای دست ورزی ژن پروتئینهای تنظیمی، استفاده از یک پیشران قوی، مهندسی متابولیک و ... استفاده کرد.(Barbieri et al. 2017)

ضرورت بهینه سازی سویه

میکروارگانیسم های مورد استفاده در بیوتکنولوژی معمولاً از طبیعت جدا می شوند. این میکرواگانیسم هاعمدتاً محصولات موردنظر و تجاری را در مقادیر بسیار کم تولید می کنند. بنابراین لازم است که قدرت تولید سویه انتخابی بهبود و افزایش پیدا کند. ازآنجا که توانایی تولید میکروب ها توسط ژنوم آنها کنترل می شود، برای افزایش و بهبود عملکرد، با دستکای های مناسب در ژنوم،بازده تولید را افزایش داد.

پروتئازها شامل گروه خیلی بزرگ و پیچیدهای از آنزیمها هستند که در خواصی مانند ویژگی سوبسترا، جایگاه فعال و عمل کاتالیزوری، pHدما و پایداری متفاوت هستند .به طورکلی طبقه بندی پروتئازها بر اساس مکانیسم کاتالیتکی زیر می باشد:

۱- Glutamic Protease

۲- Serin Protease

۳- Cycteine Protease

۴- Aspartic Protease

۵- Matallo Protease

۶- Threonine Protease

پروتئازهای گروه سرین، سیستئین، آسپارتیک و متالوپروتئازها، یکی از مهمترین گروههای آنزیمهای صنعتی می باشند.(Akere et al. 2020)

میکروارگانیسم های مورد استفاده در فرآیندهای صنعتی باید دارای ویژگی های مشخصی باشد تا تولید صنعتی به صرفه باشد. شاخصه های زیر باید هنگام انتخاب سویه برای استفاده در فرآیندهای صنعتی مدنظر قرار گیرند:

- میکروارگانیسم باید قادر به رشد در یک محیط کشت ساده و ارزان باشد و نیاز به فاکتور رشد نداشته باشد. زیرا هرچقدر محیط کشت پیچیده تر و گرانتر باشد، محصول نهایی مقرون به صرفه نخواهد بود.
- ارگانیسم باید بتواند به سرعت در محیط کشت مورد استفاده، رشد کند. مسئله ی زمان در رقابت با سایر تولیدکنندگان فاکتور بسیار مهمی به شمار میرود. نه تنها ارگانیسم باید به سرعت رشد کند، بلکه باید ماده ی موردنظر را در کمترین زمان ممکن تولید کند.
- محصول نهایی نباید شامل مواد سمی و سایر مواد نامطلوب باشد.
- ارگانیسم باید دارای ژنوم پایدار یا پایداری فیزیولوژیکی باشد. درصورتیکه ارگانیسم پایداری لازم را نداشته باشد، با تغییر شرایط و ایجاد موتاسیون در ژنوم سلول، میتواند محصولی تولید شود که تفاوت قابل توجهی با مطلوب ما داشته باشد. یا حتی موجب تولید مواد جانبی سمی در طی فرآیند گردد.
- محصول تولید شده توسط ارگانیسم باید قابلیت برداشت با هزینه کمتر در مراحل پایین دستی خالص سازی را داشته باشد.
- مقاومت ارگانیسم باید در برابر شرایط خاص تخمیر، مانند دمای بالا یا pHپایین، خوب باشد.
- مقاومت ارگانیسم باید در برابر گونه های تخریب کننده مانند باکتریوفاژها، خوب باشد.
- ارگانیسم مورداستفاده نباید به مقدار بسیار زیادی هوا نیاز داشته باشد؛ زیرا باعث افزایش هزینه های هوادهی به محیط کشت و کاهش صرفه ی اقتصادی محصول نهایی میشود.
- در نهایت ارگانیسم باید به راحتی قابلیت دستکاری ژنتیکی را داشته باشد تا بتوان سویه های تولید کرد که ویژگی های قابل قبول تری برای استفاده در صنعت داشته باشد.(Niyonzima and More 2015)

در مقایسه با سایر میکروارگانیسم ها، گونه های باسیلوس ، به ظرفیت بالای ترشح پروتئین مشهور هستند. همچنین توانایی رشد در منابع کربن ارزان و مقاومت بالا در فرآیندهای تخمیرصنعتی،باسیلوس را به یک میکروارگانیسم ممتاز برای تولید صنعتی انواع محصولات مانند مواد شیمیایی،بیوپلیمرها و پروتئینها تبدیل کرده است.(Esakkiraj et al. 2009)

روش انجام طرح

کلونیگ ژن پروتئاز در E.coli

بدین منظور از باکتری E.coli DH5α (یا سویه Roset) به عنوان میزبان و پلاسمید (؟) به عنوان حامل استفاده خواهد شد.

هدف اصلی در این پروژه، افزایش تولید پروتئاز قلیایی خارج سلولی، با ویرایش ژنوم سویه باسیلوس پامیلوس است. این امر با استفاده از سامانه کریسپر صورت می پذیرد و رویکرد اصلی ، جایگزینی پروموتری قوی تر از پروموتر طبیعی ژن است.

با توجه این که هدف پروژه، اصلاح ژنوم باکتری باسیلوس پامیلوس است، قابلیت دست ورزی ژنتیکی و میزان پاسخ مثبت سویه به این دست ورزی، بسیار حائز اهمیت است.و ارزیابی نهایی موثر بودن فرآیند اصلاح ژنوم، با سنجش میزان فعالیت آنزیم پروتئاز صورت می پذیرد. (Yang et al. 2000)

سازوکار عملکرد سامانه کریسپر

روش های متعددی برای اصلاح ژنوم سلول وجود دارند. شناخته شده ترین روش ها برای اصلاح کروموزوم انواع سلول ها ، کریسپر(CRISPR/Cas9) است.اساس روش بر پایه ایجاد یک شکست در DNA دو رشته ای در یک مکان مشخص از کروموزوم سلول با استفاده از یک آنزیم اندونوکلئازاست. پس از ایجاد شکاف در کروموزوم سلول یا به سیستم تعمیر طبیعی سلول اجازه داده میشود تا شکاف ایجادشده را بازسازی کند (NHEJ) یا با یک الگوی مشخص در اختیار آن قرار می دهند تا تعمیر را بر اساس الگوی حدید انجام دهد(HDR).

آرایه ی کریسپر، قسمتی از سیستم ایمنی اکتسابی باکتری ها است که برای هدف قرار دادن توالی خاصی از ژن ویروس مهاجم، به وسیله crRNA به کار می رود. حمله به وسیله ی پروتئینی به نام نوکلئاز Cas صورت می گیرد.انواع مختلفی از پروتئینهای Cas وجود دارند اما مهمترین و پرکاربردترین آنها Cas9 است.

از سامانه کریسپر میتوان برای انتقال ژن جدید به ژنوم باکتری ،حذف یک ژن و کاهش رونوشت ژن استفاده کرد. از مزایای دیگر این روش، اصلاح ژنتیک به صورت پیوسته و تغییر همزمان در توالی چند ژن است.

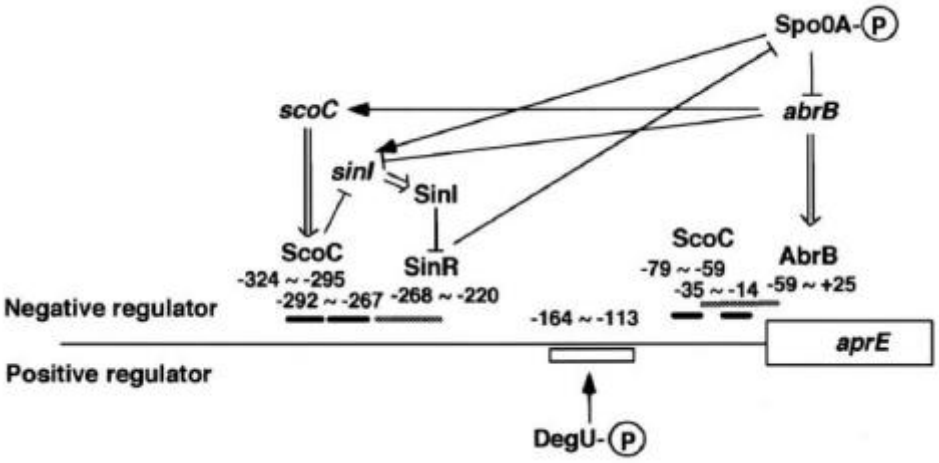
امروزه تحقیقات بسیار گسترده ای برای بهینه سازی سلول های تولید کننده آنزیم های صنعتی در حال انجام است. به علت تاثیرگذاری عوامل متعدد در مسیر تولید آنزیم، رویکردهای مختلفی میتواند برای کاهش موانع و گلوگاه های تولید و افزایش عوامل تحریک کننده، اتخاذ شود. این رویکردها با حذف کردن یک ژن، اضافه کردن ژن جدید یا کاهش بیان یک پروتئین، به صورت هدفمند، تولید یک پروتئین خاص را افزایش میدهند. این تغییرات چون در کروموزوم سلول صورت میپذیرد، پایدار باقی میماند و با رشد و تکثیر سلول، تغییرات ایجادشده در نسل های بعدی نیز باقی خواهد ماند.(Sami et al. 2021; Tarek et al. 2022)

دست ورزی ژن پروتئین های تنظیم کننده

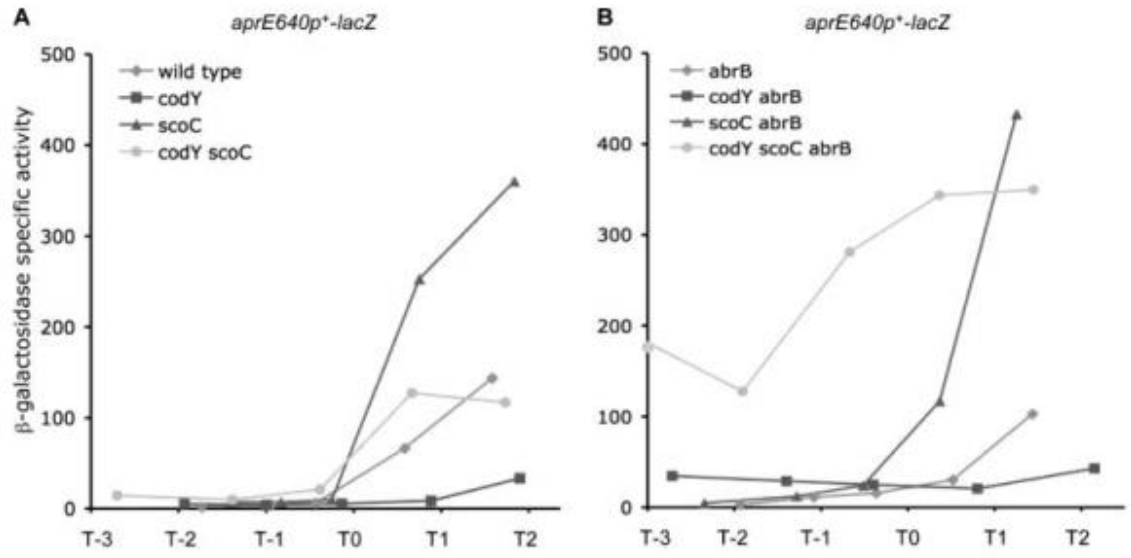
در بالادست ژن کدکننده ی پروتئاز قلیایی خارج سلولی(aprE) جایگاه هایی برای اتصال پروتئین های مختلف وجود دارد، که نقش فعال کننده یا سرکوب کننده رونوشت ژن را برعهده دارند. به عنوان مثال باعث سهولت در اتصال RNAP یا مانع از اتصال آن میشوند و به این ترتیب میزان تولید آنزیم را در فازهای مختلف رشد و شرایط مختلف، تنظیم میکنند. این پروتئین ها به وسیله ژنهایی که در سایر قسمت های ژنوم سلول قرار دارند، بیان میشوند. علاوه بر آن، تولید و بیان خود این پروتئین ها توسط پروتئین های دیگری، تحریک یا سرکوب میشود. بنابراین، به طور کلی، تولید یک پروتئین توسط شبکه ی پیچیده و بزرگی از ژن ها و پروتئین های تنظیم کننده، کنترل میشود و به سلول این امکان را می دهد که بتواند در شرایط مختلف، پروتئینهای ضروری موردنیاز خود را تولید کند. تعداد زیادی پروتئین، نقش کنترل بیان پروتئاز قلیایی را برعهده دارند.

بنابراین میتوان با جلوگیری از فعالیت پروتئینهای سرکوب کننده و افزایش فعالیت پروتئین های تحریک کننده، باعث افزایش رونوشت ژن و بیان آنزیم شد.

باربیری و همکارانش افزایش تولید پروتئاز را تا ۳۲برابر، با ایجاد جهش در ژن کدکننده دو پروتئین ScoC، CodYنشان دادند. این دو پروتئین، اثر تنظیمی منفی بر رونوشت ژن پروتئاز قلیایی دارند و با حذف آنها این کنترل منفی از بین میرود و تولید آنزیم افزایش مییابد. اما این افزایش تولید تنها پس از فاز رشد نمایی مشاهده میشود ودرصورتیکه در ژن abrBجهش ایجاد شود، نتایج نشان میدهد که تولید پروتئاز در فاز رشد نمایی نیز به شکل قابل توجهی افزایش مییابد.



ژن ها و پروتئین های تاثیرگذار بر بیان آنزیم پروتئاز قلیایی خارج سلولی



تاثیر حذف codY.scoC و abrB بر میزان تولید پروتئاز قلیایی خارج سلولی.محور عمودی فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز، که در اتصال با ژن پروتئاز قلیایی است نشان می دهد

پروتئین های تنظیم کننده ی موثر بر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی

پروتئین یا ژن	اثر تحریکی یا مهاری
ScoC	مهار رونوشت ژن aprE
AbrB	مهار رونوشت ژن aprE در فاز رشد نمایی سلول
DegU	اثر تنظیمی مثبت بر تولید AprE در حالت فسفرلیه
CodY	مهار رونوشت ژن aprE و همچنین مهار تولید پروتئین ScoC
SinR	مهار رونوشت aprE
SinI	افزایش تولید پروتئین AprE با جلوگیری از اتصال SinR به پیشران ژن
Spo0A	ژن مسئول شروع فرایند تشکیل اسپور توسط باکتری و حذف آن از سلول کاهش تولید پروتئین AprE
Sa1A	تاثیر غیرمستقیم بر تولید AprE با مهار تولید پروتئین ScoC

DegR	اثر مثبت بر تولید AprE با افزایش پایداری پروتئین DegUفسفریله
g1nA	اثر مثبت بر تولید AprE با کاهش دادن فعالیت ژن ScoC و اثر منفی بر تولید AprE با ایجاد محدودیت در تولید پروتئین DegR
proB	ژن کد کننده گاما-گلوتامیل کیناز ، افزایش رونوشت آن در سلولی که ژن degR بسیار رونوشت می شود، باعث افزایش فسفرلیه شدن DegUو در نتیجه افزایش تولید AprE می شود
Sens	افزایش تولید پروتئین AprE با مهار رونوشت ژن ScoC
RapG	کاهش رونوشت ژن aprE با جلوگیری از اتصال DegU به پیشران آن
PhrG	افزایش رونوشت ژن aprE با کاهش دادن فعالیت پروتئین RapG
sinR	کاهش تولید پروتئین AprE با حذف ژن SinR

با بررسی رویکردهای مختلف و مقایسه ی میزان تأثیر هرکدام برافزایش پروتئاز قلیایی، دست ورزی ژن یک پروتئین تنظیمی را به عنوان رویکرد مورداستفاده در این پژوهش قرار خواهیم داد. نتایج مطالعات گذشته نشان میدهند که جلوگیری از تولید پروتئین ،scoCبیشترین تأثیر را برافزایش تولید پروتئاز قلیایی داشته است. بنابراین ایجاد اختلال در ژن scoC برای توقف در بیان پروتئین ،ScoCبه عنوان هدف اصلی پژوهش انتخاب شد. این کار با سامانه کریسپر و از مسیر NHEJ انجام می شود(Barbieri et al. 2017).

Akere, Aishat, Serena H Chen, Xiaohan Liu, Yanger Chen, Sarath Chandra Dantu, Alessandro Pandini, Debsindhu Bhowmik, and Shozeb Haider. 2020. “Structure-Based Enzyme Engineering Improves Donor-Substrate Recognition of Arabidopsis Thaliana Glycosyltransferases.” *The Biochemical Journal* 477 (15): 2791–2805. https://doi.org/10.1042/BCJ20200477.

Ariyaei, Ahmadreza, Ayoub Farhadi, Fatemeh Moradian, and Ghodrat Rahimi Mianji. 2019. “Cloning, Expression and Characterization of a Novel Alkaline Serine Protease Gene from Native Iranian Bacillus Sp.; a Producer of Protease for Use in Livestock.” *Gene* 693 (April): 10–15. https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.01.020.

Barbieri, Ramona, Erika Coppo, Anna Marchese, Maria Daglia, Eduardo Sobarzo-Sánchez, Seyed Fazel Nabavi, and Seyed Mohammad Nabavi. 2017. “Phytochemicals for Human Disease: An Update on Plant-Derived Compounds Antibacterial Activity.” *Microbiological Research* 196 (March): 44–68. https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.003.

Dadshahi, Zahra, Ahmad Homaei, Farrokhzad Zeinali, Reza H. Sajedi, and Khosro Khajeh. 2016. “Extraction and Purification of a Highly Thermostable Alkaline Caseinolytic Protease from Wastes Litopenaeus Vannamei Suitable for Food and Detergent Industries.” *Food Chemistry* 202 (98): 110–15. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.104.

Esakkiraj, P, G Immanuel, S M Sowmya, P Iyapparaj, and A Palavesam. 2009. “Evaluation of Protease-Producing Ability of Fish Gut Isolate Bacillus Cereus for Aqua Feed.” *Food and Bioprocess Technology* 2 (4): 383–90. https://doi.org/10.1007/s11947-007-0046-6.

Niyonzima, Francois Niyongabo, and Sunil S More. 2015. “Detergent-Compatible Proteases: Microbial Production, Properties, and Stain Removal Analysis.” *Preparative Biochemistry \& Biotechnology* 45: 233–58.

Salihu, Aliyu, Md. Zahangir Alam, M Ismail AbdulKarim, and Hamzah M Salleh. 2012. “Lipase Production: An Insight in the Utilization of Renewable Agricultural Residues.” *Resources, Conservation and Recycling* 58: 36–44. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2011.10.007.

Sami, Abdul, Zhao Xue, Saheera Tazein, Ayesha Arshad, Zong He Zhu, Ya Ping Chen, Yue Hong, Xiao Tian Zhu, and Ke Jin Zhou. 2021. “CRISPR-Cas9-Based Genetic Engineering for Crop Improvement under Drought Stress.” *Bioengineered* 12 (1): 5814–29. https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1969831.

Silva, E M, and S T Yang. 1998. “Production of Amylases from Rice by Solid-State Fermentation in a Gas-Solid Spouted-Bed Bioreactor.” *Biotechnology Progress* 14 (4): 580–87. https://doi.org/10.1021/bp9800440.

Tarek, Nashwa, Ahmed O El-Gendy, Ahmed S Khairalla, Medhat Abdel-Fattah, Eman Tawfik, and Ahmed F Azmy. 2022. “Genomic Analysis of Enterococcus Durans NT21, a Putative Bacteriocin-Producing Isolate.” *Molecular Biology Research Communications* 11 (3): 143–53. https://doi.org/10.22099/mbrc.2022.44088.1760.

Yang, Jen-Kuo, Ing-Lung Shih, Yew-Min Tzeng, and San-Lang Wang. 2000. “Production and Purification of Protease from a Bacillus Subtilis That Can Deproteinize Crustacean Wastes☆.” *Enzyme and Microbial Technology* 26 (5): 406–13. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00164-7.