مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJMAPR.2021.356257.3071
جلد ۳۷، شماره ۶، صفحه ۹۹۹-۹۸۸ (۱۴۰۰) | شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1400.37.6.7.8

شناسایی ژن مربوط به آنزیم P450 مسئول تولید آلکالوئید کیلانتیفولین در گیاه *Chelidonium majus* L. با استفاده از مخمّر مهندسی ژنتیک شده *Pichia pastoris*

مهدی یحیی‌زاده[1*]، نجمه هادی[2]، زهرا شیرازی[3]، کامکار جایمند[4]، خلیل کریم‌زاده اصل[2]، مریم مکی‌زاده تفتی[2]، سمیه فکری قمی[5]، مهشید رحیمی‌فرد[2]، مینا کوه‌جانی گرجی[2]، فاطمه عسکری[2]، زهرا بهراد[5] و دیرک زلمار[6]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، پست الکترونیک: yahyazadeh@rifr-ac.ir

۲- استادیار، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- استادیار، بخش تحقیقات زیست‌فناوری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۴- دانشیار، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۵- کارشناس ارشد، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۶- استاد، مؤسسه زیست گیاهی، دانشگاه برانشوایگ، برانشوایگ، آلمان

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۰ | تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۴۰۰ | تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۰

چکیده

گیاهان منشأ اصلی تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی بالا می‌باشند. مهمترین عضو این ترکیب‌های با ارزش، آلکالوئیدها با مصارف مختلف دارویی هستند. با توجه به تولید محدود برخی از این مواد در گیاهان، به‌عنوان روش جایگزین، با شناسایی و انتقال ژن‌های مسئول سنتز آنزیم‌های سازنده آلکالوئیدها از گیاهان به میکروارگانیسم‌ها می‌توان به‌صورت تجاری این گونه از مواد دارویی را به‌صورت طبیعی تولید کرد. در این راه، شناسایی ژن‌های مسئول آنزیم‌های سنتزکننده قدم نخست چنین اقدامی است. در بین آنزیم‌های سنتزکننده ترکیب‌های آلکالوئیدی، آنزیم‌های سیتوکروم P450 نقش مهمی دارند. با توجه به وابستگی این آنزیم‌ها به وجود شبکه اندوپلاسمی و خصوصیات گلیکوپروتئینی این آنزیم‌ها، نمی‌توان آنها را در سیستم‌های باکتریایی استاندارد بیان کرد. بنابراین می‌توان از میزبان‌های یوکاریوتی مانند مخمّر یا سلول حشرات برای بیان آنها استفاده کرد. در این تحقیق، با استفاده از توالی آمینو اسیدی شناخته شده کیلانتیفولین سنتاز گیاه شقایق کالیفرنیایی و مقایسه فیلوژنی این توالی با توالی‌های آمینو اسیدی هومولوگ گیاه مامیران بدست‌آمده از پایگاه داده بیوانفورماتیک، به‌صورت نظری شش آنزیم سیتوکروم P450 با درصد هومولوژی بالا مسئول سنتز آنزیم کیلانتیفولین سنتاز در گیاه مامیران (*Chelidonium majaus* L.) شناسایی شد. برای اثبات عملی کارآیی این آنزیم‌ها، ژن‌های آنها در وکتور *p*PIC3.5 کلون شده و بعد با انتقال این وکتورهای نوترکیب به سلول مخمّر *Pichia pastoris* و در اختیار قرار دادن آلکالوئید اسکولرئین، تولید آلکالوئید کیلانتیفولین توسط میکروب‌های انتقال ژن داده شده توسط دستگاه LC-MS بررسی گردید. نتایج نشان داد که از بین ژن‌های کلون و معرفی شده آن آنزیم‌ها به میزبان مخمّر، تنها آنزیم Contig8931 فعالیت کیلانتیفولین سنتازی دارد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های P450، ایزوکینولین آلکالوئید، تولید میکروبی، مخمّر.

مقدمه

گیاهان طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه (۲۵۰۰۰ ترکیب ترپنوئیدی، ۱۲۰۰۰ ترکیب آلکالوئیدی و ۸۰۰۰ ترکیب فنولی) را با اثرهای فیزیولوژیکی قوی تولید می‌کنند (Sato & Kumagai, 2013). گیاهان با تولید این ترکیب‌ها سازوکار دفاعی خود را در مقابل آفات و بیماری‌ها تقویت و همچنین باعث بهبود توان رقابتی آنها با سایر گیاهان می‌شوند. این ترکیب‌ها همچنین با جذب موجودات گرده‌افشان به زادآوری گیاهان کمک می‌کنند. علاوه‌بر موارد مذکور، آنها می‌توانند مقاومت گیاهان را در برابر تنش‌های غیرزنده محیطی بهبود ببخشند. تعدادی از این ترکیب‌ها از دیرباز به‌وسیله انسان‌ها در مصارف مختلف استفاده شده‌اند. ازجمله این مصارف می‌توان به طعم‌دهندگی غذا، رنگ‌آمیزی البسه و مصارف دارویی اشاره کرد (Briskin, 2000).

تاریخچه استفاده دارویی از متابولیت‌های گیاهی به حدود ۳۵۰۰ سال قبل برمی‌گردد (Raskin *et al*., 2002). ازجمله متابولیت‌های ثانویه که مدت‌ها قبل از کشف مولکول‌های آنها در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گرفتند، آلکالوئیدها بودند. به‌عنوان دارو، تجربه علمی استفاده از مواد آلکالوئیدی موجود در گیاه گنه‌گنه (*Cinchona pubesceas*) برای درمان بیماری ویروسی مالاریا به سال ۱۶۳۸ برمی‌گردد (Oliveira & Szczerbowski, 2009). در سال ۱۸۰۵ فردریش زرترانر توانست یکی از مهمترین آلکالوئیدها به نام مورفین را جداسازی کند (Bynum & Porter, 2013). بعدها روش مورد استفاده در جداسازی و خالص‌سازی مورفین توسط جوزف پلتیر و جوزف بنایمه اصلاح و برای خالص‌سازی تعداد دیگری از آلکالوئیدها مورد استفاده قرار گرفت (Simmons, 2002).

واژه آلکالوئید به علت بروز حالت شبه قلیایی اولین بار در سال ۱۸۱۹ توسط وی مایزنر بیان شد (Clayden *et al*., 2001). در حال حاضر ۵۰ داروی آلکالوئیدی فرموله شده در بازار موجود است (Amirkia & Heinrich, 2014). برخی از این ترکیب‌های دارویی به‌طور طبیعی به مقدار فراوان در گیاهان موجود هستند و استخراج آنها از این منابع گیاهان مقرون به صرفه است. برای برخی دیگر از این داروها که میزان سنتز بسیار پایین در گیاهان دارند (Song *et al*., 2014)، می‌طلبد روش جایگزین مناسبی به‌جای روش تولید معمول یعنی استخراج از گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. سنتز شیمیایی ترکیب‌های طبیعی می‌تواند یکی از این روش‌ها باشد، اما در بسیاری از موارد پیچیدگی این مولکول‌ها و دست‌سانی (Chirality) آنها امکان سنتز و توسعه روش‌های مقرون به‌صرفه را غیرممکن می‌سازد (Newman & Cragg, 2012). پیشرفت‌ها در بیوتکنولوژی و بیولوژی سنتتیک اجازه تولید این مواد با مقادیر کم را با استفاده از میکروارگانیسم‌های مهندسی ژنتیک شده به مقدار فراوان داده است (Pham *et al*., 2019). مواد تولید شده با این روش به‌عنوان تولیدات طبیعی شناخته می‌شوند، چون ساختار مواد تولید شده میکروبی برخلاف ترکیب‌های سنتز شده شیمیایی کاملاً مشابه با منابع اصلی آنها در گیاهان هستند. با توجه به مزایای استفاده از این روش، مهندسی این میکروب‌ها اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد (Lee *et al*., 2009؛ Matsumura *et al*., 2018). ازاین‌رو علاقه‌مندی در مورد تولید میکروبی متابولیت‌های ثانویه گیاهان به‌صورت روزافزون در حال افزایش است (Chemler & Koffas, 2008؛ Zhou *et al*., 2008؛ Marner, 2009؛ Schäfer & Wink, 2009). به‌عنوان نمونه داروی ضد مالاریای آرتیمیزین که از گیاه تاج‌خروس استخراج می‌شود با استفاده از سیستم‌های میکروبی تولید انبوه می‌شود. تولید میکروبی این فرآورده باعث کاهش قیمت تمام شده این فرآورده دارویی شده است (Peplow, 2016). داروی با ارزش Paclitaxel که در درمان سرطان از آن استفاده می‌شود، با استفاده از میکروب مهندسی شده (*Escherichia coli* و *Saccharomyces cerevisiae*) تولید می‌شود (Zhou *et al*., 2015). فرایند تولید میکروبی سایر ترکیب‌های آلکالوئیدی مانند رتیکولین، تبائین، هیدروکودون، ناسکاپین و استریکتوزیدین با استفاده از میکروارگانیسم‌های دستکاری شده ژنتیک در حال انجام است (Brown *et al*., 2015؛ DeLoache *et al*., 2015؛ Galanie *et al*., 2015؛

(Li *et al*., 2018).

ایزوکینولین آلکالوئیدها ازجمله آلکالوئیدهای حقیقی بوده که دارای ارزش دارویی فراوانی هستند. از ۵۰ ترکیب تجاری دارویی آلکالوئیدی، هفت ترکیب دارویی در این دسته قرار دارند. از مرحله اول تولید این آلکالوئیدها یعنی سنتز تیروزین تا مراحل نهایی، آنزیم‌های مختلفی در فرایند تولیدشان شرکت دارند. ازجمله مراحل آنزیمی دخیل در سنتز ایزوکینولین آلکالوئیدها می‌توان به هیدروکسیلاسیون، دکربوکسیلاسیون، ترانس آمیناسیون، متیلاسیون و اکسیداسیون اشاره کرد. ازجمله مهمترین آلکالوئیدها برای تولید میکروبی که تولید آنها سختی‌های فراوانی دارد ایزوکینولین آلکالوئیدهای وابسته به آنزیم متیلن دی‌اکسی بریج می‌باشند (Townsend & Ebizuka, 2010) که نوعی از آنزیم‌های سیتوکروم P450 هستند. در مورد آنزیم‌های سیتوکروم P450 با توجه به قرار گرفتن آنها در شبکه آندوپلاسمی و ویژگی‌های گلیکوپروتئینی آنها عملاً نمی‌توان در سیستم باکتریایی استاندارد آنها را بیان کرد (Ikezawa *et al*., 2003؛ Hamann & Møller, 2007). در نتیجه، بیان heterologous آنها باید توسط سیستم‌های یوکاریوتی مانند مخمّر و یا سلول حشرات که دارای شبکه اندوپلاسمی هستند، انجام شود (Ikezawa *et al*., 2003؛ Gesell *et al*., 2011). هدف این مقاله بیان روش شناسایی ژن مسئول سنتز آنزیم کیلانتیفولین سنتاز که تولیدکننده آلکالوئید کیلانتیفولین در گیاه مامیران (*Chelidonium majus* L.) است، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شناسایی توالی آمینو اسیدی **P450** مسئول سنتز آلکالوئید کیلانتیفولین

توالی آمینو اسیدی و ترانسکریپتوم گیاه مامیران از پایگاه داده بیوانفورماتیک (https://bioinformatics.tugraz.at/phytometasyn) بدست آمد. با در دسترس بودن توالی آمینو اسیدی مسئول سنتز آلکالوئید کیلانتیفولین در گونه شقایق کالیفرنیایی (با شماره دسترسی EcCYP719A5) از پایگاه داده NCBI، با انجام بلاست توالی پروتئین‌های ژن‌های هومولوگ زیادی از آمینو اسیدهای گیاه مامیران با درصد هومولوژی بالا بدست آمد. با استفاده از نرم‌افزار Mega.7 و با استفاده از روش Maximum likelihood، درختواره فیلوژنی توالی‌های پروتئین شناخته شده به‌همراه توالی‌های یافت شده ترسیم گردید. توالی پروتئین‌های شناسایی شده با توالی‌های ناشناخته‌ای که در یک خوشه قرار گرفتند به‌عنوان بیشترین احتمال در سنتز ترکیب آلکالوئیدی هدف در نظر گرفته شد (شکل ۱). با در دست داشتن توالی نوکلئوتیدی مربوط به آن آنزیم‌ها، ORF (Open Reading Frame) آنها توسط وب سایت NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder) مشخص گردید.

جداسازی **RNA** کل و تبدیل آنها به **cDNA**

RNA کل توسط کیت جداسازی RNA کل (Macherey-nagel) جداسازی گردید. حدود یک میکروگرم از RNA کل جدا شده با استفاده از آنزیم avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega) و پرایمر oligo-d(T) (5'-TTT TTT TTT TTT TTTTTT GGA TCC ATA TAT-3') در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۲۰ دقیقه به cDNA تبدیل شد.

طراحی پرایمر

برای طراحی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق، از وب سایت Bioinfo (https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0) استفاده شد. یادآوری می‌شود با توجه به اینکه پلاسمید مورد استفاده از نوع *p*PIC3.5 بود و اتصال نقاط ابتدا و انتهای ژن‌ها به نقاط طراحی شده درون پلاسمید (restriction sites) باید انجام می‌شد، توالی CCTAGG به ابتدای هر یک از بخش ATG پرایمرهای پیشرو و بخش کدون پایانی پرایمر معکوس اضافه شد (جدول ۱).

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده بر اساس ORF توالی ژن‌ها

اسم پرایمرها	زنجیره پرایمرها به‌علاوه **'5'-CCTAGG-3'**	طول **cDNA** هدف
c1128_for	CCTAGGATGGAGGAACTCATGAGTGATCC	۱۴۷۰
c1128_rev	CCTAGGCTAGCAACGAGAAGTGATTCGTGC	۱۴۷۰
c4873_for	CCTAGGATGGAGGAGATCAATGTGGAATGG	۱۵۰۹
c4873_rev	CCTAGGTCAACGGACTCGAGGAACTATGCG	۱۵۰۹
Contig8931_for	CCTAGGATGGAGGAGAGTTTTTGGTTGG	۱۴۷۳
Contig8931_rev	CCTAGGTTAATGGGTGCGAGGAGTAATTTTTGC	۱۴۷۳
Singlet80014_for	CCTAGGATGATCATGAGTAACTTATGG	۱۴۸۲
Singlet80014_rev	CCTAGGCTACAAACGAGGAACTATACGTGC	۱۴۸۲
C4983_for	CCTAGGATGATCATCATAAGCGATATCG	۱۴۷۵
C4983_rev	CCTAGGTTATCTACTGTCGAAAGGTTTTGTACG	۱۴۷۵
Singlet28804_for	CCTAGGATGGAATGGCCAGCAGGTCC	۱۴۹۵
Singlet28804_rev	CCTAGGTTAAATTTCTATATGCTTGGTC	۱۴۹۵

PCR و جداسازی DNA از ژل

با استفاده از کیت Phusion High Fidelity (Thermo Fisher) به‌همراه cDNA و پرایمرهای طراحی شده، PCR انجام شد. برنامه دستگاه PCR شامل یک چرخه ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته‌سازی اولیه (Primary denaturing) و ۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی به‌مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد، اتصال (Annealing) به‌مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد و بسط (Extention) برای ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در نهایت یک چرخه ۶ دقیقه‌ای برای توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. بعد از انجام PCR، محصول این فرایند توسط الکتروفورز در ژل آگارز و با توجه به اندازه‌های مدنظر رشته‌های تکثیر شده DNA براساس طول نوکلئوتیدها در زیر نور UV بریده شدند (شکل ۱). رشته‌های DNA توسط کیت NucleoTrap Gel extraction kit (MachereyNagel) از ژل استخراج شدند.

کلون ژن‌ها در پلاسمید *p*Jet1.2 و انتقال آنها به باکتری *E. coli* (DH5*α*)

قطعات DNA جدا شده و پلاسمید طبق دستورالعمل کیت Thermo Fisher) Scientific Clone Jet PCR cloning) به هم متصل شدند. وکتور نوترکیب توسط شوک حرارتی به سویه باکتری DH5*α* منتقل شد. با انتخاب کلون‌های مثبت رشد کرده در ظروف پتری محیط کشت LB جامد حاوی آمپی‌سیلین، آنها در محیط کشت مایع LB حاوی آمپی‌سیلین تحت تکان دادن (Shaking) مداوم در دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. بعد از گذشت یک شب، برای جداسازی *p*DNA از کیت NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) استفاده شد. همچنین برای اثبات صحت توالی کلون شده، *p*DNA برای توالی‌یابی به شرکت Eurofins Genomics ارسال شد.

کلون cDNA مسئول سنتز آلکالوئید کیلانتیفولین در وکتورهای بیان‌کننده *p*PIC3.5

برای کلون cDNA در وکتورهای بیان‌کننده، cDNA

کلون شده در *p*Jet1.2 توسط آنزیم برش‌دهنده *Avr*II طبق دستورالعمل کیت (Promega) برش داده شد. به‌صورت موازی نیز پلاسمیدهای (New England BioLabs) *p*PIC3.5 علاوه بر آنزیم برش‌دهنده *Avr*II با آنزیم آلکالین فسفاتاز (Promega) برای ممانعت از اتصال دوباره دو سمت برش‌خورده پلاسمید به یکدیگر تیمار شدند. برای غیر فعال‌سازی هر دو آنزیم بکار برده شده، مخلوط ذکرشده به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه قرار داده شد. برای خالص‌سازی قطعات cDNA و پلاسمید از الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ استفاده شد و باندهای مدنظر توسط NucleoTrap extraction (MachereyNagel) استخراج شد. قطعات DNA جدا شده و وکتور *p*Pic3.5 ابتدا در یک شیب دمایی ۵۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه گذاشته شدند. مخلوط یادشده بعد از زمان ذکرشده به مدت کوتاه در یخ قرار داده شده و بعد ۵ میکرولیتر از Mixed DNA Ligation kite (Takara Company) به آن اضافه شد. مخلوط مذکور به مدت یک ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مراحل انتقال وکتور نوترکیب به باکتری و استخراج آن قبلاً توضیح داده شد. برای بررسی مسیر صحیح ژن‌های کلون شده (سنس یا آنتی‌سنس)، ژن‌ها و وکتورهای نوترکیب برای توالی‌یابی به شرکت Eurofins Genomics ارسال شدند.

انتقال ژن کلون شده به وکتور *p*PIC3.5 به مخمّر *Pichia pastoris* (GS115)

دو میلی‌لیتر از محیط کشت YPD مایع در لوله‌های آزمایش استریل با یکی از کلونی‌های مخمّر *P. pastoris* (GS115) آغشته شدند. لوله‌های آزمایش بر روی شیکر و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب تکان داده شده و بعد کشت اولیه به فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت YPD منتقل شد. بعد از دو ساعت از گذاشتن فلاسک در داخل یخ، سلول‌های مخمّر با استفاده از سانتریفوژ برداشت شدند. سپس ابتدا این سلول‌ها با آب سرد و بعد با محلول یک مولار سوربیتول سرد، شستشو شدند. آنگاه سلول‌ها توسط ۵۰۰ میکرولیتر از محلول یک مولار سوربیتول غوطه‌ور شدند. برای افزایش ضریب انتقال پلاسمید حامل ژن به سلول مخمّر، خطی کردن این پلاسمید ضروری بود، ازاین‌رو این پلاسمیدها توسط آنزیم برش‌دهنده *Bsp*EI (BioLabs New England) بریده شدند. برای خالص‌سازی پلاسمیدهای برش‌خورده، این پلاسمیدها توسط الکتروفورز خالص‌سازی شدند. محصول این فرایند در زیر نور UV بریده و رشته‌های DNA توسط کیت NucleoTrap Gel extraction (MachereyNagel) از ژل استخراج شدند. ۱۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول با ۴۰ نانوگرم پلاسمید خطی شده با هم مخلوط شدند. به‌عنوان کنترل، یک میکروگرم از پلاسمید تنها بدون هیچ ژنی با سلول‌های مخمّر مخلوط شده و برای معرفی پلاسمیدهای خطی شده، سلول‌ها به‌وسیله یک پالس الکتریکی کوتاه (1500 V) تیمار شدند. بعد از شوک الکتریکی این سلول‌ها بر سطح محیط کشت MD agar پخش شدند. بعد از سه روز، کلون‌های مثبت انتخاب و با استفاده از کیت KOD neo FX (Toyobo) و با استفاده از پرایمر رو به جلو طراحی شده (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') برای وکتور *p*PIC3.5 و پرایمر معکوس هر ژن کلون شده، وجود و درست بودن مسیر ژن‌ها در وکتور با PCR بررسی گردید. سپس برای اثبات درستی توالی، *p*DNA برای توالی‌یابی به شرکت Eurofins Genomics ارسال شد.

بررسی فعالیت کیلانتیفولین در سلول

کلون‌های مثبت در ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع YPD در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و تکان دادن مداوم با دور ۲۵۰ rpm در طول شب به‌عنوان کشت اولیه رشد داده شدند. کشت اولیه به فلاسک ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۶۰ میلی‌لیتر از کشت BMMY انتقال داده شد و بعد در ۲۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه تکان داده شدند. بعد از

دو ساعت محیط کشت از نظر تعداد سلول‌ها بررسی شد (OD_{600} = 0.6 to 0.9) و به نسبت ۰/۵٪ متانول به محیط کشت اضافه شد. همچنین، بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، حجم مشابه از متانول به محیط کشت اضافه شد. ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ذکرشده سانتریفوژ شده و توسط هفت میلی‌لیتر از بافر Hepes غوطه‌ور شد. به نسبت ۵٪ ماده پیش‌ساز آلکالوئیدی اسکولرئین به هر یک از سوسپانسیون‌های سلولی با غلظت نهایی ۱۰۰ میکرومولار اضافه شد. مخلوط ذکرشده برای شیک شدن به‌مدت یک شب در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از سانتریفوژ، بافر Hepes و مواد باقی‌مانده در سلول که با متانول اسیدی شده استخراج شده بودند، برای بررسی محصول آلکالوئیدی مورد نظر توسط دستگاه LC-MS تجزیه شد.

تجزیه واکنش با LC-MS

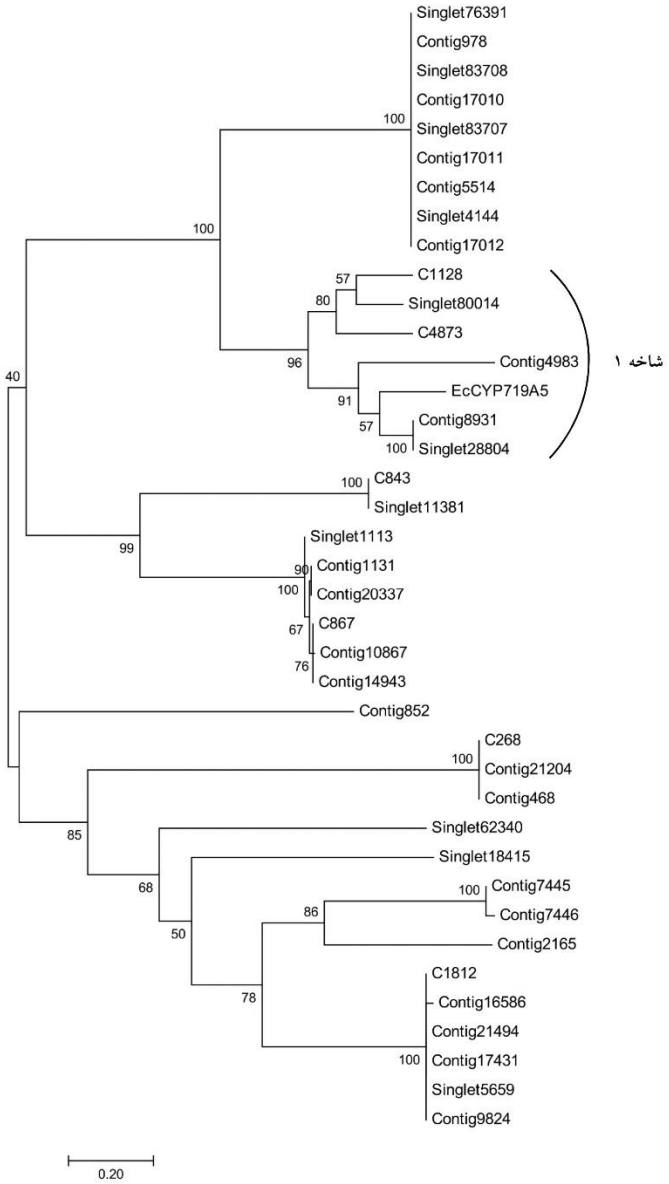
اندازه‌گیری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه LC/MS-2020T شرکت شیمادزو (electrospray ionization=ESI) در ۱/۵ kV در حالت یون مثبت انجام شد. اندازه‌گیری طیف UV در ۲۸۰ نانومتر و با ردیاب SPD-20A شرکت شیمادزو انجام شد. دستگاه مجهز به ستون TSKgel 80-TM (4.6 × 250 mm; Tosoh) بود. دمای ستون در ۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود. فاز متحرک، استونیتریل و آب (نسبت ۶۵:۳۵) محتوای ۱٪ اسید استیک بود. مقدار جریان فاز متحرک، ۰/۶ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم شد.

نتایج

بر پایه توالی آمینواسیدهای سیتوکروم P450 که در گیاه شقایق کالیفرنیایی تولید کیلانتیفولین می‌کند، ۳۹ پروتئین هومولوگ توسط جستجوی بلاست وب سایت دانشگاه کالگری در گیاه مامیران شناسایی شد. سپس مقایسه فیلوژنی توالی همه آمینو اسیدهای آنزیم‌های سیتوکروم از گیاه مامیران با درصد هومولوژی بالا با کیلانتیفولین سنتاز شقایق کالیفرنیایی انجام شد. درختواره فیلوژنی توالی ۳۹ آمینو اسید هومولوگ گیاه مامیران به‌همراه کیلانتیفولین سنتاز (EcCYP719A5) با استفاده از هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها (CLUSTALW) و روش خوشه‌بندی neighbour joining method ایجاد شد. نتایج نشان‌دهنده هومولوژی بالای توالی شش آمینواسید موجود در شاخه نام‌گذاری شده با شماره یک با توالی آمینو اسیدی کیلانتیفولین سنتاز گیاه شقایق کالیفرنیایی بود (شکل ۱) و نشان‌دهنده این مطلب بود که احتمالاً یک یا تعدادی از این پروتئین‌ها توانایی تولید آلکالوئید کیلانتیفولین را دارند.

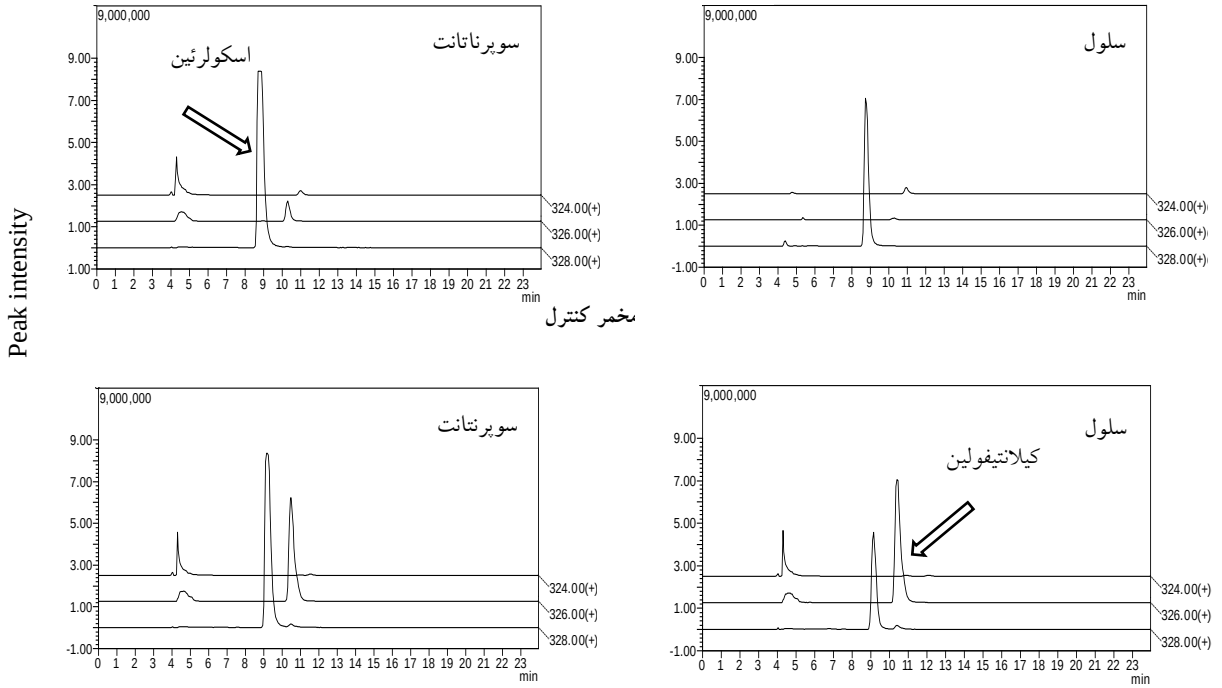
برای اثبات نتایج تئوری بدست آمده، سعی شد cDNA ژن‌های شاخه یک گیاه مامیران در داخل پلاسمید *p*PIC3.5 کلون شود تا قادر به بیان هترولوژیک در مخمّر *P. pastoris* شده و امکان سنتز کیلانتیفولین توسط پلاسمیدهای انتقال ژن داده شده بررسی شود. به علت عدم جدا شدن شش ژنی که آمینو اسیدهای آنها در شاخه یک قرار داشت از وکتور *p*Jet1.2 توسط آنزیم برش‌دهنده *Avr*II، تنها سه عدد از آنها (C1128، C4873 و Contig8931) در داخل پلاسمید کلون شد و در نهایت در مخمّر *P. pastoris* معرفی و بیان شدند. اما بقیه آنها با استفاده از آنزیم برش‌دهنده از وکتور *p*Jet1.2 جدا نشدند. تغییر در آنزیم برش‌دهنده (*Bgl*II)، تغییر در سویه باکتری مورد استفاده (*E. coli*, ATCC 47013) و حتی استفاده از وکتور متفاوت (*p*Bluescript SK) هم تغییری در رهاسازی ژن‌ها از پلاسمید ایجاد نکرد.

در مورد ژن‌هایی که کلون شدنشان موفقیت‌آمیز بود، از روش سلولی برای سنجش بیان هترولوژیک در جهت اثبات فعالیت کیلانتیفولین سنتازی استفاده شد. در این روش، ماده پیش‌ساز که همان آلکالوئید اسکولرئین بود به‌طور مستقیم به محیط مایع بافر Hepes حاوی سلول انتقال ژن داده شده، اضافه شد. به‌عنوان کنترل، ماده پیش‌ساز به محیط بافر حاوی سلول‌های مخمّر دارای پلاسمید انتقال یافت. با توجه به نفوذپذیری بالای مواد پیش‌ساز، این مواد می‌توانند به سهولت وارد غشاء سلولی شده و در مجاورت آنزیم سنتزکننده تبدیل به محصول شوند.



شکل ۱- مقایسه فیلوژنی توالی آمینو اسیدهای P450 گیاه مامیران با کیلانتیفولین سنتاز (EcCYP719A5) گیاه شقایق کالیفرنیایی (*Eschscholzia californica*)

از سویی، مواد تولید شده توانایی عبور از غشاء سلولی به داخل محیط کشت را دارند. بنابراین می‌طلبد که فعالیت آنزیمی آنها به‌وسیله LC-MS بر پایه تشخیص محصول مورد نظر در محیط کشت و استخراج مواد تولید شده و باقی‌مانده در درون سلول مورد ارزیابی قرار گیرد. ازاین‌رو با سانتریفوژ محیط کشت، مقادیر آلکالوئید در محیط بافر Hepes و بقایای سلولی به‌صورت جداگانه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که کیلانتیفولین سنتز شده از پیش‌ساز اسکولرئین به سهولت بعد از تولید وارد محیط کشت شد و همچنین با کاهش غلظت اسکولرئین در محیط سلول، غلظت کیلانتیفولین افزایش یافت. مقادیر کیلانتیفولین هم در سوپرناتانت یا با استخراج از سلول یا بقایای سلولی موجود بود (شکل ۲). این نشان‌دهنده این موضوع بود که ژن Contig8931 (شکل ۳) فعالیت کیلانتیفولین سنتاز دارد.



شکل ۲- فعالیت کیلانتیفولین سنتاز در مخمّر انتقال ژن داده شده

Contig8931

ATGGAGGAGAGTTTTTGGTTGGTAGCTGCTACTGTTCTAGTAGTCTTTGTAGTAGCAAAACTACTGTTCAGG
AAATCATCTTCTATCTCTACAATGGAATGGCCAGCAGGTCCAAAAACACTACCCATCATTGGAAACCTTCAT
CAATTAGGAGGAGCAGCTTTACATGTTGTTTTAGCAAATCTTGCTAAAGTTTATGGAAGTGTTATGACGATT
TGGGTAGGTGCTTGGCGCCCGATGATCGTCATAAGCGACATCGACAAAGCGTGGGAAGTTCTTGTTAATAA
ATCATCTGATTACTCTGCTAGAAGTTTGCCTGAAATTACTAGAATCATCTCTGCAAATTGGAAGAACATTAT
GACTTCTGATTCTGGTCCTTTTTGGCAAAACCTAAGAAAAGGTCTTCAAGGTGGTGCCTTATCTCCTCATAA
TGTCATGTCTCAATATCAATTGCAAGAGAGAGATATGCAAAATTTGATCAAGACCATGCGCGTCGAAGCTT
CTAAAAACAATGGGAGAATAAAACCTCTTGATCATTTGAAGCAAGAGACGGTTCGATTATTGAGTCGACTT
ATCTTCGGCCAAGATTTTAATGATGAGAAATTGGTTGTTGGCATGCACCATGCGCTCGACGATTTAGTACGT
ATAAGTGGGTACGCTAGTCTTGCTGATGCTTTCAAAGTCGCTGAAAATTTACCAAGTCACAAGAAATCGAT
CCGCGAAGTTCACGAATTGAAGAGACGCGTCGAAAACCTGGTACGCCCACATATCGTTTCTAACCCTCCTA
CCAACACTTACCTAAATTTTCTTCTATCTCAAAATTTTAGTGAAGATCTTATAATCTCTGCAATTTTAGAAGT
TTATGATTTGGGTGTTGATAGTACTGCATCAACAACTGTTTGGGCACTTACATTTTTGGTAAGAGAACAAAA
AGTTCAAGAGAAGCTTTATCAAGAAATCAAGAACTTAACTGGTGGAAGATCAACAGTTAAGGTTGAAGAA
GTAAGTAAGATGCCCTATTTACAAGCTGTGATGAAAGAAACAATGAGGATGAAACCCATTGCTCCAATGGC
TATCCCTCATACAGCTGCAAGAGAGACTTCATTAATGGGGAAGAAAATTGATAAGGGTACAGTGGTGATGG
TGAATCTTTATGCTATTCATCATAACCCTAATATTTTCCCTGAGCCCTATAAGTTCATGCCAGAGAGATTCTT
GCATGGTGAAGAACAAAATGGTGGTAATATTAAAGAAATGGAGCAATCACTTTTGCCATTTAGTGCTGGAA
TGAGAATTTGTGCAGGGATGGAATTAGGGAAACTTCAATTGGGTTTTGCACTTGCAAGTTTAGTGAATGCA
TTTAAATGGGAATGTGCTGCTGATGGGAAATTGCCTGATTTGAGTGAAGATCATTGTTTTATTCTCTTGATG
AAGAATCCACTTGAAGCAAAAATTACTCCTCGCACCCATTAA

شکل ۳- توالی نوکلئوتیدی ژن کیلانتیفولین سنتاز شناسایی شده در گیاه مامیران

شکل ۴- مقایسه توالی آمینو اسیدهای کیلانتیفولین سنتازهای شقایق کالیفرنیایی با کیلانتیفولین سنتاز شناسایی شده از گیاه مامیران

(توالی پروتئین‌ها به‌وسیله نرم‌افزارهای clustalW و Bioedit sequence Alignment Editor مقایسه شد)

برخلاف نتایج مربوط به مقایسه فیلوژنی آمینو اسیدها که نشان‌دهنده هومولوژی بالای توالی‌های آمینو اسیدی کیلانتیفولین سنتاز شقایق کالیفرنیایی با موارد شناسایی شده گیاه مامیران در شاخه ۱ بود، تمامی ژن‌های کلون و معرفی شده به مخمّر فعالیت کیلانتیفولین سنتازی از خود نشان ندادند. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که دو ژن C1128 و C4873 هیچ‌گونه فعالیت مبنی بر تولید آنزیم کیلانتیفولین سنتاز و متعاقب آن تولید آلکالوئید مربوطه را از خود نشان ندادند. کیلانتیفولین سنتاز، به‌صورت اکسیداسیونی یک گروه متوکسی را به گروه هیدروکسیل منتقل و تولید پل متیلن دی‌اکسی بریج می‌کند و این واکنش را تنها در حلقه D انجام می‌دهد. یادآوری می‌شود که این آنزیم با وجود دارا بودن موقعیت مشابه در حلقه A ماده پیش‌ساز اسکولرئین، توانایی انجام واکنش مشابه را در این حلقه ندارد. نتایج نشان‌دهنده مشابهت ۷۵ درصدی پروتئین شناسایی شده با پروتئین کیلانتیفولین با مسئول آن در گیاه شقایق ایرانی بود (شکل ۴).

بحث

تحقیقات زیادی ترکیب‌های آلکالوئیدی بنزیل ایزوکینولین را در گونه‌های مختلف گیاهی شناسایی کرده‌اند. در این میان مسیر بیوسنتزی این قبیل از ترکیب‌ها مانند مورفین در خشخاش (Ziegler *et al.*, 2009)، بربرین در *Coptis japonica* (Ikezawa *et al.*, 2003) و آلکالوئیدهای مختلف این خانواده در شقایق کالیفرنیایی (Ikezawa *et al.*, 2009) شناسایی شده‌اند. از مسیر بیوسنتزی و نحوه سنتز آلکالوئیدهای گیاه مامیران که عمده ترکیب آلکالوئید بنزیل ایزوکینولین آن کوپتیسین می‌باشد، اطلاعات کمی در دست است. مهمترین آلکالوئید موجود در این گیاه یعنی ترکیب کوپتیسین بعد از چندین مرحله بیوسنتزی از اسیدآمینه تیروزین به این ترکیب آلکالوئیدی تبدیل می‌شود. ازجمله آلکالوئیدهای حدوسط این چرخه بیوسنتزی کیلانتیفولین بود که از اسکولرئین ساخته و بلافاصله بعد از تولید، توسط استیلوپین سنتاز به استیلوپین و بعد به‌صورت واکنش خودبه‌خودی اکسیداسیونی و بدون نیاز به فرایند آنزیمی به کوپتیسین تبدیل می‌شود. در این تحقیق، با در دسترس بودن توالی آمینو اسیدی و نوکلئوتیدی کیلانتیفولین سنتاز گیاه شقایق کالیفرنیایی، مطالعات فیلوژنی و هم‌ردیفی توالی آمینو اسیدی، مبین وجود ژن و آمینو اسید مشابه کیلانتیفولین سنتاز این گیاه در مامیران بود. در نتیجه، مسیر بیوسنتزی این دو گیاه باید با یکدیگر شباهت داشته باشد. البته، بعد از طی مراحل مختلف جداسازی و کلون ژن در وکتور اختصاصی و معرفی ژن کلون شده در وکتور به سلول مخمّر، با در اختیار قرار دادن ماده پیش‌ساز به سلول مخمّر انتقال ژن داده شده غوطه‌ور در بافر، سلول حاوی ژن Contig8931 کلون شده در وکتور از آلکالوئید اسکولرئین به‌عنوان پیش‌ساز استفاده کرده و آن را تبدیل به آلکالوئید کیلانتیفولین کرد که این مهم مؤید نتایج

بدست آمده تئوری بود. بنابراین، نتایج مربوط به همترازی بین توالی آمینو اسیدهای کیلانتیفولین سنتاز شناسایی شده در گیاهان مامیران و شقایق کالیفرنیایی نشان‌دهنده این موضوع بود که این دو آنزیم شباهت زیادی با یکدیگر دارند. مفروض است که در بیوسنتز ایزوکینولین آلکالوئیدها در گیاه مامیران و شقایق کالیفرنیایی که توسط گروه ساتو شنایی شد (Sato & Kumagai, 2013) شباهت زیادی وجود دارد.

مراحل شناسایی ذکرشده قابل تعمیم به همه ترکیب‌های دارویی وابسته به آنزیم سیتوکروم P450 است. بعد از بررسی آزمایشگاهی، وجود محصول مورد نظر در تولیدات مخمّر انتقال ژن داده شده، برای تولید در سطح زیاد این ترکیب دارویی می‌توان سلول‌های مخمّر دستکاری شده ژنتیک را به بیوراکتورهای صنعتی انتقال داد. هم‌اکنون برخی از کشورها در زمینه تولید میکروبی داروهای ضد آلزایمر و ضد سرطان که ارزش افزوده فراوانی هم دارند به پیشرفت‌های چشمگیری دست یافته‌اند. انجام چنین طرح‌هایی اگرچه هزینه‌بر بوده، امکان بازگشت مبالغ سرمایه‌گذاری شده را در صورت دستیابی به محصول به سرعت جبران می‌کند. با توجه به ویژگی‌های مثبتی که تولید میکروبی داروها دارند، استفاده از آنها در سیستم‌های دارویی می‌تواند تأمین‌کننده نیاز دارویی کشور به این ترکیب‌های با ارزش باشد و از سویی فعال شدن بخش صادراتی این ترکیب‌ها، ارزش افزوده فراوانی را نصیب کشور خواهد کرد.

منابع مورد استفاده

- Amirkia, V. and Heinrich, M., 2014. Alkaloids as drug leads-A predictive structural and biodiversity-based analysis. Phytochemistry Letters, 10: xlviii-liii.
- Briskin, D.P., 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. Plant physiology, 124: 507-514.
- Brown, S., Clastre, M., Courdavault, V. and O'Connor, S.E., 2015. De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112: 3205-3210.
- Bynum, W.F. and Porter, R., 2013. Companion Encyclopedia of the History of Medicine. Taylor and Francis, Hoboken, 1856p.
- Chemler, J.A. and Koffas, M.A.G., 2008. Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. Current Opinion in Biotechnology, 19: 597-605.
- Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. and Wothers, P., 2001. Organic Chemistry. Oxford University Press, New York, NY, 1264p.
- DeLoache, W.C., Russ, Z.N., Narcross, L., Gonzales, A.M., Martin, V.J.J. and Dueber, J.E., 2015. An enzyme-coupled biosensor enables (S)-reticuline production in yeast from glucose. Nature Chemical Biology, 11: 465-471.
- Galanie, S., Thodey, K., Trenchard, I.J., Interrante, M.F. and Smolke, C.D., 2015. Complete biosynthesis of opioids in yeast. Science, 349(6252): 1095-1100.
- Gesell, A., Chávez, M.L.D., Kramell, R., Piotrowski, M., Macheroux, P. and Kutchan, T.M., 2011. Heterologous expression of two FAD-dependent oxidases with (S)-tetrahydroprotoberberine oxidase activity from Argemone mexicana and Berberis wilsoniae in insect cells. Planta, 233: 1185-1197.
- Hamann, T. and Møller, B.L., 2007. Improved cloning and expression of cytochrome P450s and cytochrome P450 reductase in yeast. Protein Expression and Purification, 56: 121-127.
- Ikezawa, N., Tanaka, M., Nagayoshi, M., Shinkyo, R., Sakaki, T., Inouye, K. and Sato, F., 2003. Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured Coptis japonica cells. The Journal of Biological Chemistry, 278: 38557-38565.
- Ikezawa, N., Iwasa, K. and Sato, F., 2009. CYP719A subfamily of cytochrome P450 oxygenases and isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Eschscholzia californica*. Plant Cell Reports, 28: 123-133.
- Lee, S.Y., Kim, H.U., Park, J.H., Park, J.M. and Kim, T.Y., 2009. Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. Drug Discovery Today, 14: 78-88.
- Li, Y., Li, S., Thodey, K., Trenchard, I., Cravens, A. and Smolke, C.D., 2018. Complete biosynthesis of noscapine and halogenated alkaloids in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 115: E3922-E3931.
- Marner, W.D., 2009. Practical application of synthetic biology principles. Biotechnology Journal, 4: 1406-1419.
- Matsumura, E., Nakagawa, A., Tomabechi, Y., Ikushiro, S., Sakaki, T., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H., Sato, F. and Minami, H., 2018.

microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. Biotechnology Journal, 4: 1684-1703.
- Simmons, J.G., 2002. Doctors and discoveries: Lives that created today's medicine. Houghton Mifflin, Boston, 448p.
- Song, M.C., Kim, E.J., Kim, E., Rathwell, K., Nam, S.J. and Yoon, Y.J., 2014. Microbial biosynthesis of medicinally important plant secondary metabolites. Natural product reports, 31: 1497-1509.
- Townsend, C.A. and Ebizuka, Y., 2010. Natural Products Structural Diversity-I, Secondary Metabolites. Organization and biosynthesis. Elsevier, Boston, 997p.
- Zhou, H., Xie, X. and Tang, Y., 2008. Engineering natural products using combinatorial biosynthesis and biocatalysis. Current Opinion in Biotechnology, 19: 590-596.
- Zhou, K., Qiao, K., Edgar, S. and Stephanopoulos, G., 2015. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. Nature biotechnology, 33: 377-383.
- Ziegler, J., Facchini, P.J., Geissler, R., Schmidt, J., Ammer, C. and Kramell, R., 2009. Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. Phytochemistry, 70: 1696-1707.

Microbial production of novel sulphated alkaloids for drug discovery. Scientific Reports, 8: 7980.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of Natural Products, 75: 311-335.
- Oliveira, A.R.M. and Szczerbowski, D., 2009. Quinine: 470 years of history, controversy and science development. Química Nova, 32: 1971-1974.
- Peplow, M., 2016. Synthetic biology's first malaria drug meets market resistance. Nature, 530: 389-390.
- Pham, J.V., Yilma, M.A., Feliz, A., Majid, M.T. and Maffetone, N., 2019. A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. Frontiers in Microbiology, 10: 1404.
- Raskin, I., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Ilic, N. and Poulev, A., 2002. Plants and human health in the twenty-first century. Trends in Biotechnology, 20: 522-531.
- Sato, F. and Kumagai, H., 2013. Microbial production of isoquinoline alkaloids as plant secondary metabolites based on metabolic engineering research. Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences, 89: 165-182.
- Schäfer, H. and Wink, M., 2009. Medicinally important secondary metabolites in recombinant

Characterization of P450 enzyme gene responsible for Cheilanthifoline alkaloid in greater celandine (*Chelidonium majus* L.) by transgenic yeast *Pichia pastoris*

M. Yahyazadeh[1*], N. Hadi[2], Z. Shirazi[2], K. Jaimand[2], Kh. Karimzadeh Asl[2], M. Makizadeh Tafti[2], S. Fekri Qomi[2], M. Rahimifard[2], M. Gorji[2], F. Askari[2], Z. Behrad[2] and D. Selmar[3]

1*- Corresponding author, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, E-mail: yahyazadeh@rifr-ac.ir

2- Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

3- Institute of Plant Biology, TU Braunschweig, Mendelssohnstr, Braunschweig, Germany

Received: October 2021 Revised: November 2021 Accepted: December 2021

Abstract

Plants are the main sources of secondary metabolites with high medical value. The most important member of these valuable compounds are alkaloids with the different drug purposes. Concerning the limited production of some of these metabolites in the plants, these medicinal compounds can be produced naturally and commercially with the identification and transfer of alkaloids-producing enzymes corresponding plant genes to the microorganisms as an alternative method. In this way, the characterization of the corresponding genes is the first step. Among the different enzymes involved in the alkaloid biosynthesis, the cytochrome P450 enzymes play an important role. Due to the endoplasmic reticulum (ER) localization of these enzymes and their glycoprotein characters, they cannot be expressed functionally in the standard bacterial systems. Consequently, the heterologous expression aimed to verify the enzymatic activity can favorably be performed using the eukaryotic systems, like yeast or insect cells. Herein, in this study, with employing a phylogenic comparison of cheilanthifoline synthase sequence of *Eschscholzia californica* Cham. and comparing the sequence with the homolog amino acid sequences of *Chelidonium majus* L. achieved from bioinformatics databases, six cytochrome P450 enzymes responsible for cheilanthifoline synthase in *Ch. majus* were identified. To prove the efficacy of these enzymes practically, their genes were cloned into the *p*PIC3.5 vector. Then, these recombinant vectors were transferred to the yeast cell (*Pichia pastoris*) and the scoulerine alkaloid was given to its media. Finally, the cheilanthifoline alkaloid microbial production by *P. pastoris* containing the recombinant plasmids was evaluated by LC-MS. The results of the present study indicated that among the enzymes genes cloned and introduced to the yeast host, only the Contig8931 enzyme had the cheilanthifoline synthase activity.

Keywords: P450 enzymes, isoquinoline alkaloids, microbial production, yeast.