نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۸، بهار ۱۳۹۲

کاربردهای روش اتودیسپلی در بیان پروتئین های نوترکیب روی سطح سلولی باکتری ها

• **رضا پیله چیان لنگرودی** (نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۹۱
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۱۶۱۱۶۷۴
Email: r.pilehchian@rvsri.ac.ir

چکیده

سیستم های ترشح پروتئین در همه موجودات زنده ازجمله در باکتری های گرم منفی و اندامک های یوکاریوتیک منشعب از آنها وجود دارد. بر خلاف سایر موجودات زنده، باکتری های گرم منفی از تعدادی سیستم های ترشح پروتئین مستقل از یکدیگر برخوردارند. حداقل چهار تیپ سیستم ترشحی که انتقال پروتئین به خارج از غشاء سیتو پلاسمی یا قرار دادن پروتئین در غشاء سیتو پلاسمی را عهده دارند، در باکتری های گرم منفی وجود دارد. مقایسه سیستم های متفاوت باکتریائی با یکدیگر پیشنهاد میکند که علیرغم تشابهات بیوژنیک، مکانیستیک و تکاملی، هر یک مستقل از سایرین عمل میکند. از این میان مسیر های اتوترانسپورتری با توجه به سادگی آنها مورد توجه بیشتری قرار گرفته اند. به نمایش در آوردن(دیسپلی) پروتئین یا پپتیدی با عملکردی متفاوت از پروتئین های سطح سلولی سلول های زنده باکتریائی، چالشی است که دانشمندان و محققین علوم بیوشیمی و بیوتکنولوژی به صورت مداوم با آن روبرو هستند. سیستم اتودیسپلی براساس مکانیسم ترشحی خانواده اتو ترانسپورترها توسعه یافته است. مقالهٔ حاضر به معرفی روش های جدید بیان پروتئین ها به روش اتودیسپلی و بر مبنای روش ترشح اتوترنسپورتر، در سطح سلول های باکتریائی پرداخته و قابلیت های بالقوهٔ مختلف این روش و نیز کاربرد آن در تولید واکسن های نوترکیب جدید را شرح می دهد.

کلمات کلیدی: اتودیسپلی، ترشح پروتئین، سطح سلولی، اتو ترانسپورتر

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 98 pp: 55-63

Applications of autodisplay system for recombinant protein expression on the bacterial cell surface

By: R. Pilechian Langroudi, (Corresponding Author; Tel: +989121611674), Razi Serum and Vaccine Institute Karaj, Iran.

Received: June 2013 **Accepted: March 2013**

Protein secretory systems are found in all living organisms including gram negative bacteria, and eukaryotic cell's organelles that are derived from these bacteria. Unlike all other living organisms, gram negative bacteria have different protein secretory systems. At least there are four different independent secretory systems, which are responsible to transport the secreted proteins to the milieu or insert them into the bacterial cell surface. Comprising these systems in bacteria suggests that, beside the biogenic, mechanistic and evolutionary similarities, each acting independently. To display a protein or peptide with a distinct function at the surface of a living bacterial cell, is a challenging exercise with constantly increasing impact in many areas of biochemistry and biotechnology. Autodisplay system is developed based on autotransporters. This article introduces autodisplay protein expression based on autotransporters, on the bacterial cell surface, and their different potential applications and also in vaccine production.

Key words: Autodisplay, Protein secretion, Cell surface, Autotransporter

مقدمه

چهار تیپ سیستم ترشحی (secretory pathway(SP در باکتری ها شناخته شده است. تیپ های ۱، ۳ و ۴ که به ترتیب عبارتند از (IIISP; Fla/ Path) (ISP ABC) و (IVSP, Conj /Vir) می توانند پروتئین ها را با استفاده از یک مسیر یک مرحله ای وابسته به انرژی (single energy-coupled step) از هردو غشاء داخلی و خارجی به خارج از سلول انتقال دهند. چهارمین سیستم که با نام (type II secretory pathways IISP) شناخته می شود پروتئین ها را با استفاده از دو مسیر مجزا، از غشاءهای داخلی و خارجی به خارج از سلول انتقال می دهد. این سیستم از یکی از دو مسیر (general secretory pathway (Sec یا (Twinarginine targeting translocase (Tat برای انتقال پروتئین ها از غشا, داخلی و همچنین یکی از مسیرهای متعدد دیگر برای انتقال پروتئین از غشاء خارجی استفاده میکند. علاوه بر این پروتئین های فضای پیش پلاسمائی که مقصد نهایی آنها محیط خارج سلولی است از (Main Terminal Branch (MTB و یا از یکی دیگر از مسیرهای متعدد ویژهٔ انتقال پروتئین های اختصاصی، از غشاء خارجی انتقال میابند.

سیستم اتو دیسپلی در بیان پروتئین های نوترکیب در سطح سلولی غشاء باکتری *E. coli* و باکتری های وابسته به آن کاربرد بسیار ی داشته و در بسیاری از کاربردهای بیوتکنولوژیک، دیسپلی پروتئین ها یا پپتید های دارای عمل اختصاصی ویژه درسطح سلولی، کاربرد های متعدد و قانع کننده ای دارد که برخی از آنها عبارتند از:

۱- مولکول دیسپلی شده در سطح سلول، جهت هرنوع مطالعه و فعالیت های اتصالی، بدون نیاز به هرگونه سوبسترا یا شریک اتصالی برای عبور از سد غشاء، براحتی در دسترس است.

۲- این پروتئین ها در هنگام اتصال به یک ماتریکس، پایداری بیشتری نسبت به ملکول های آزاد نشان می دهند.

۳- نیازی به آماده سازی و یا تخلیص این پروتئین ها برای کاربردهای بعدی وجود ندارد زیرا سلول دیسپلی کننده ملکول مورد نظر را می توان به طور کامل برای اندرکنش یا سنجش های آنالیتیک استفاده نمود و پس از پایان کار نیز می توان آن را با یک سانتریفوگاسیون ساده خارج نمود.

۴- یکی دیگر از فوائد بسیار معنی دار و مهم دیسپلی سطح سلولی، ایجاد و پایش کتابخانه های پروتئینی یا پپتیدی در بررسی تکامل ملکولی جهت داده شده می باشد. با انتخاب ساختمان صحیح بیان شده در سطح سلول و انتخاب توام سلول حاوی ژن مسئول این بیان، که به عنوان یک نشانه درونی عمل میکند، می توان برای تعیین سریع توالی، مراحل اول پیشگوئی ساختمان پروتئین، و در سایر مطالعات یا کاربرد ها استفاده کرد (۱۶، ۳۸).

سیستم دیسپلی فاژی نیز به منظور مشابهی دراواسط دهه ۱۹۸۰ توسعه یافت که اجازه می دهد پپتیدها و پروتئین ها ی کوچک در پوشش باکتریو فاژهای رشته ای، از طریق ادغام با پروتئین پوششی pIII بیان گردند (۳۵). با توجه به اینکه سلول های باکتریائی بر خلاف باکتریوفاژها self-replicative (خود همانندساز) بوده و به اندازه کافی نیز بزرگ هستند که بتوان آنها را بوسیله روش های نوری از جمله میکروسکوپی فلورسانس یا روش های با بازدهی بالا، نظیر (FACS (fluorescence- activated cell sorting

تجزیــه و تحلیل و مطالعه نمود، بدین جهت سیســتم های دیســپلی سطح ســلولی در باکتری ها مفید تر هستند (۲، ۵،۳۶). تعداد زیادی سیســتم هــای دیســپلی در مخمــر، باکتــری هــای گــرم منفی و باکتری های گرم مثبت ایجاد شده است. این سیستم ها در گستره وسیعی از زمینه های صنعتی و بیوتکنو لوژیک استفاده شده و منجر به پیشرفت قابل توجهی در بیوکاتالیز سلول کامل (whole cell biocatalysts)، توســعه و تکوین واکسن های زنده (live-vaccine)، توسعه و تکوین بیوسوربنت ها (biosorbents) و بیوسنسور (biosensor)، ترسیم نقشه اپیتوپ ها (epitope mapping)، بیان پادگن در سطح سلول (antigen delivery)، طراحی مهارکننده (inhibitor design) و پایش کتابخانه های پروتئینی/پپتیدی شده است.

ناقلی که در دیســپلی سطح ســلولی پروتئین های نوترکیب درپ *E. coli* بیشــترین اســتفاده را دارد یک پروتئین کایمری متشکل از Lpp و OmpA اســت. این کایمر شــامل ناحیه (LPP) اسید آمینه ۱-۹(تــوام بــا ناحیه ترانــس ممبــران B۳-B۷ پروتئین OmpA اســت که پاسنجر نوترکیب (recombinant passenger) ازطریق پایانهٔ C به آن متصل اســت. این ناقل بطــور موفقیت آمیزی در بیان آنزیم ها، قطعات پادتن تک زنجیره ای و حوضه های اتصالی در سطح سلول *E. coli* اســتفاده شــده اســت. امــا بــه نظــر مــی رســد کــه بــه ســاختمان های دوم وســوم پروتئین پاســنجر حســاس است و قادر نیســت تــا در اینگونه مــوارد انتقال را بــه خوبی انجام دهــد (۶). در باکتری های گرم مثبت پروتئین های ســطح ســلولی معمولا از طریق پایانــه C خــود به صورت کووالانت به پپتید و گلیکان دیواره ســلولی متصل می گردند. بنابراین بیشــتر سیستم های دیسپلی سطح سلولی بــرای پروتئین های نوترکیب، که در باکتری های گرم مثبت بکار گرفته می شــوند حاوی این نوع پایانه C هستند که پاسنجر از طریق پایانه N خود به آن متصل است، همچنین در پایانه N دارای توالی علامتی هستند که عبور از غشاء را امکان پذیر می سازد. ناحیه لنگر اندازی پروتئین های طبیعی در دیواره سلولی سطح سلولی سلول های مختلف از جمله پروتئین A *Sta. aureus* (SpA)، پروتئیــن M۶ *Str. pyogenes* و پروتئین B اتصالــی به فیبرونکتین *Sta. aureus* به منظور دیســپلی موفقیت آمیــز آنزیم هــا، اپی توپ ها و حوضه های اتصالی در ســطح ســلول *L. lactis*، *Sta.xylosus* و *Sta. carnosus* اســتفاده شــده انــد (۳۸).

استراتژی دیسپلی با توجه با پوشش قوی باکتری های گرم مثبت، دیســپلی پلی پپتید های بزرگ را در ســطح سلول امکان پذیر ساخته اســت. وابسته به کاربرد مورد نظر، پیوند کووالانت با پپتید وگلیکان و همچنین کاهش معنی دار تعداد پروتئین های پاســنجر دیسپلی شده در ســطح ســلول باکتری های گرم مثبت در مقایســه با باکتری های گرم منفی، از محدودیت های استفاده از باکتری های گرم مثبت است (۵، ۳۶).

الزامات و ویژگی های ضروری یک سیســتم دیسپلی مناسب واجد کلیه الزامات فوق الذکر

۱- چنین سیســتمی بایــد کمترین محدودیت‌هــا را در خصوص اندازه و ســاختمان پروتئین دیسپلی شده که پاسنجر (passenger) نامیده می شود بروز دهد.

۲-پروتکل های استاندارد بیولوژی ملکولی و سویه های استاندارد همچنین ابزارها ی مورد نیاز باید به اندازه کافی موجود باشند تا تجزیه تحلیل و ارزیابی کارآیی پاسنجر دیسپلی شده امکان پذیر گردد.

۳- سیستم باید ساده بوده و کار با آن راحت باشد تا از بروز موانع غیر منتظره پیشگیری گردد.

جهت تامین هر چه بیشتر و بهتر این الزامات، یک سیستم اتو دیسپلی بر اســاس مکانیسم خانواده اتوترانســپورترها (autotransporter)، توســعه یافته اســت (۱۰ و۲۵) و برای حوضه های انتقالی از پروتئین اتوترانســپورتر AIDA-I باکتری *E. coli* استفاده شده است (۱). اتو ترانســپورترها به صورت پروتئین های پیش ســاز حاوی کلیه الزامات ساختمانی برای انتقال به غشاء سطح سلولی ساخته می شوند. پروتئاز IgA۱ باکتری نایسریا گونورآ اولین عضو این خانواده پروتئینی بود که در اواخر دهه ۱۹۸۰ توسط Meyer و همکارانش کشف و هویت یابی گردید و همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می گردد، همزمان با کشف آن ایده اصلی مکانیزم ترشحی آن نیز مطرح گردید (۲۹).

تحقیقــات بعدی مشــخص نمــود که این مکانیســم ترشــحی را می توان به منظور انتقال پروتئین های نوترکیب در *E. coli* از طریق جایگزینی ناحیه رمز کننده پاســنجر طبیعی (پروتئاز IgA۱) با ناحیه رمزکننده پروتئین نوترکیب مورد نظر و بیان آن و دیســپلی در سطح ســلول *E. coli* مورد اســتفاده قرار داد (۱۸). این پیشــنهاد با تعداد زیادی تجربیات و آزمایشــات پلی پپتیدهای نوترکیب محک زده شد، لیکــن کاربرد های بیوتکنولوژیک زیادی مشــاهده نگردید (۱۹، ۳۰). پس از کشــف پروتئاز IgA۱ باکتری *Nisseria gonorrhoeae* و مکانیســم ترشحی آن به سرعت نتیجه گیری شــد که برخی دیگر از پروتئین های ســطح ســلولی باکتری های گرم منفی نیز می توانند از طریق این مکانیزم ترشحی انتقال یابند (۲۰).

در ســال ۱۹۹۵ ده عــدد پروتئیــن ســطح ســلولی یا ترشــحی باکتــری های گرم منفی باویژگی های ســاختاری مشــابه انتخاب و با یک خانواده جدید از پروتئین هایی که اتو ترانســپورتر نامیده شــدند مقایســه گردیدنــد (۱۰). در این میان مشــخص گردیــد که پروتئین AIDA-I از باکتر ی *E. coli* به روشی مشابه پروتئاز IgA۱ باکتری *Nisseria gonorrhoeae* ترانســپورت می شــود. برخلاف پروتئاز IgA۱، AIDA-I بطور طبیعی در *E. coli* ساخته شده لذا به عنوان ابزاری ترجیحی جهت دیســپلی در سطح سلول میزبان هومولوگ آن در نظر گرفته شــد. AIDA-I ابتدا توســط Schmidt و همکارانش کشــف و ســاختمان و عمل آن مورد مطالعهٔ گســترده ای قرار گرفت (۳۳). برای ایجاد و توســعه سیستم اتودیســپلی β- barrel و ناحیه لینکــر AIDA-I همراه بــا پپتید علامتی زیر واحد بتا توکســین و با (CTB) و یک پروموتر قوی ســاختمانی (PTK) در یک پلاســمید متوســط کپی ادغام شــدند (۲۵). در ناحیه لینکر این پلاسمید، مکان برش پروتئاز ویژهٔ توالی رها ســازی پروتئین پاسنجر برای اتودیسپلی اســتفاده شد و اپی توپ های تشــخیص پادتن های مونوکلونال نیز در آن قرار داده شدند (۲۶).

یک روش غیروابسته به تشخیص پادتن، به نام Cystope tagging،

که فقط به افزودن یک ملکول سیستئین در ناحیه لینکر نیاز دارد، برای اتو دیسپلی طراحی گردیده است، ساختار پروتئین اتوترانسپورتر مصنوعی مورد استفاده در اتودیسپلی در شکل ۲ دیده می شود (۱۴، ۱۵). مرحله نهائی اتودیسپلی شامل انتقال پاسنجر از منفذی متشکل از β-barrel است که این منفذ از نظر اندازه برای پاسنجر محدودیت ایجاد می کند. این بدین مفهوم است که برای اینکه پاسنجر بتواند طی انتقال، حالت سازگار با انتقال (transport compatible state) خود را حفظ نماید، مجاز به کسب یک ساختارفضائی سه بعدی پایدار نیست، و در صورتی که پیچ خوردگی پایدار صورت گرفته باشد، انتقال در فضای پیش پلاسمائی سد می گردد (۱۱، ۱۶، ۱۸).

با توجه به اینکه انواع زیادی از پروتئین های پاسنجر که کاربردهای بیوتکنولوژیک زیادی دارند، حاوی اتصالات دی سولفید بوده و این اتصالات بطور طبیعی در فضای پیش پلاسمائی *E. coli* تشکیل می گردند، یک سویه جهش یافته DsbA-negative از *E. coli* سویهٔ JK۳۲۱ ساخته شده و نشان داده شده است که این گونه اتودیسپلی رامی توان به سهولت انجام داد. در سویه جهش یافته DsbA-negative ژن ompT به صورتی جهش یافته است که بتواند پروتئین پاسنجر نوترکیب را به صورت پایدار در سطح خود دیسپلی کند. پروتئین ompT یک اندو پپتید غشاء خارجی *E. coli* است که هومولوگ آن در گروه محدودی از باکتری های گرم منفی شناخته شده است(۱۱).

در یک جمع بندی می توان اینگونه بیان نمود که سیستم اتودیسپلی شامل وکتورهای کد کننده انواع ژن های مصنوعی اتو ترانسپورتراست که از β-barrel سیستم AIDA-I وبخش های مختلف ناحیه لینکرآن استفاده می کند. وابسته به کاربرد، امروزه انواع مختلف تغییرات شیمیائی ناحیه لینکر، انواع پپتید های علامتی تحت کنترل پروموتر های القائی یا ساختمانی سویه های جهش یافته *E. coli*، که انتقال و دیسپلی سطح سلولی را به وسیله مسیر های اتوترانسپورتری امکان پذیر می سازند، همچنین روش های آشکار سازی پروتئین هایی که به سطح سلول انتقال یافته اند، در دسترس هستند تا ردیابی مسیر انتقال به سطح سلول را ترجیحاً مستقل از حوضه پروتئینی استفاده شده بعنوان پاسنجر، امکان پذیر نمایند.

اتودیسپلی آنزیم ها وبیوکاتالیز سلول کامل

طیف آنزیم هائی که از طریق اتودیسپلی در سطح سلول دیسپلی شده اند، هیدرولاز ها، اکسیدو ردواکتازها و پروتئین های انتقال الکترون را شامل می شود.

هیدرولازها

بتا لاکتاماز اولین مثال از دیسپلی سطح سلولی یک آنزیم فعال به روش اتودیسپلی در *E. coli* است (۲۲). در یک میزبان جهش یافته OmpT/DsbA-negative درحالیکه سلول کاملاً سالم بوده و تخریبی در آن مشاهده نمی گردد مقادیر قابل توجهی بتا لاکتاماز در سطح سلول قابل آشکارسازی خواهد بود (۴).

استرازها گروهی از هیدرولازها هستند که به لحاظ تنوع طبیعی وسیع سوبستراهایشان، همچنین تنوع زیادی که از نظر تیپ واکنش ها دارند، توجه زیادی از نظر بیوتکنولوژیک و صنعتی به آنها معطوف شده است (۳). استرازها با توجه به استرئو سلکتیویتی (stereoselectivity) و تباین وابسته به ویژگی سوبسترائیشان، در تولید سوبستراهای خالص نوری با موفقیت به استفاده رسیده اند (۳۰، ۳۲). EstA باکتری *Burkholderia gladioli* اولین استرازی است که به فرم فعال و به روش اتودیسپلی در *E. coli* دیسپلی شده است (۳۴).

سوربیتول دهیدروژناز

تولید سوربیتول دهیدروژناز (SDH) به روش تولید استاندارد آلی به لحاظ تعداد زیاد گروه های فعال یکسان در موقعیت های مختلف این ملکول، کاری غیر حرفه ای و غیر استادانه ای است. لذا استفاده از آنزیم های استرئو سلکتیو در بیوکاتالیز آن راه حل خوبی برای ساختن آن است (۷). بدین منظور SDH *Rhodobacter sphaeroides* به روش اتودیسپلی و به صورت یک پروتئین دیمری متشکل از دو زیر واحد مونومری، در سطح سلول بیان می شود (۱۵، ۲۸).

در روش SDS-PAGE یک باند پروتئینی به اندازه دو برابر پروتئین اینتگرال اتوترانسپورتر SDH، مشاهده می شود که با استفاده از آنتی سرم اختصاصی SDH نیز تشخیص داده می شود، این مدرک به روشنی نشان می دهد که دیمریزاسیون پاسنجر، از زیرواحدهای مونومریک SDH، در سطح سلول صورت می گیرد. دیمریزاسیون پاسنجر که چگونگی آن در شکل۳ مشاهده می شود یک ویژگی منحصر بفرد اتودیسپلی بوده و در هیچ یک از دیگر سیستم های دیسپلی تا به امروز مشاهده نشده است. در غیاب مکانیسمی که بتواند ساختار پپتیدی بتا بارل را در غشاء تثبیت کند، این ساختار در غشاء متحرک خواهد بود و دیمیریزاسیون باعث تثبیت ساختار های پاسنجر در غشاء می گردد. بیوکاتالیست سلول کامل بدست آمده از اتودیسپلی SDH برای تولید کارآمد سوربیتول ($۲/۵ \times ۱۰^{۹}$ U /۰/۱۱)، فروکتوز (۰/۱۱ U)، D- تاگاتوز (۰/۰۷ U) و L- ریبولوز (۰/۱۵ U)، استفاده شده است (۱۵).

آدرنودوکسین گاوی (Bovine adrenodoxin)

فرودوکسین کورتکس فوق کلیه گاوی (bovine) آدرنودوکسین Adx نام دارد و با وزن ملکولی ۱۴/۴ kDa به گروه فرودوکسین ها (۲S–۲Fe) که خانواده کوچکی از پروتئین های اسیدی سولفور-آهن که در باکتری ها، گیاهان و جانوران یافت می شود، تعلق دارد (۸). فرودوکسین نقشی ضروری در انتقال الکترون از آدرنودوکسین ردوکتاز(AdR) به آنزیم های سیتوکروم میتوکندریائی که از جمله اجزاء مورد نیاز سنتز هورمون ها ی استروئیدی هستند را ایفاء میکند. اتودیسپلی Adx با استفاده از پپتید علامتی CTB و ناحیه لینکر AIDA- I و β-barrel با موفقیت صورت گرفته است (۱۲).

گزارش های مبنی بر اینکه Adx به صورت هومو دیمر فعالیت می کند نیز ارائه شده است (۲۶) و همانند آنچه که در مورد SDH مشاهده می شود، تشکیل خود بخودی ملکول های دیمری Adx

با کارآئی بالا، در سطح سلولی باکتری هامشاهده شده است (۱۳). ملکول های دیمری Adx در سطح سلولی خاموش بوده و تحقیقات نشان داده است که خالی از خوشه های سولفور-آهن هستند (۱۲). این مشاهدات با این نظریه که در مکانیسم ترشح اتو ترانسپورتری، پروتئین ها فقط در حالت پیچ نخورده می توانند انتقال یابند، تطبیق می کند که در مورد Adx به مفهوم عدم حضورگروه پروستتیک apo- Adx بوده و میتوان با الحاق یک خوشه [۲S-۲Fe] در شرائط بی هوازی به apo-Adx دیسپلی شده در سطح سلولی، آن را فعال و متعاقبِ آن، سلول را بدون کاهش فعالیت و با انتقال به شرائط هوازی، مجدداً فعال نمود (۱۲).

افزودن AdR خالص شده و پروتئین های CYP۱۱A۱ P۴۵۰ یا CYP۱۱B۱ P۴۵۰، که از فوق خانواده سیتوکروم ها هستند، بیوکاتالیست سلول کامل را به ترتیب برای سنتز کارآمد پروگننلون از کلسترول یا کورتیکوسترون از ۱۱-داکسی کورتیکوسترون امکان پذیر می کند (۱۳)، لذا دیسپلی مولکول های Adx درتمامی سطح سلول، محیط کافی و مناسبی برای آنزیم های P۴۵۰ که بطور طبیعی برای فعالیت خود به غشاء متصل می گردند ایجاد می کند. سیستم سلول کامل، زمینه کافی را برای دستیابی به توان بیوتکنولوژیک بالقوهٔ آنزیم P۴۵۰، فراهم آورده است (شکل ۴). اتودیسپلی Adx اولین گزارش در مورد دیسپلی سطح سلولی یک پروتئین نوترکیب فعال حاوی یک گروه پروستتیک غیر آلی که به آن الحاق شده است می باشد.

اتودیسپلی مهار کننده های آنزیمی و پایش کتابخانه

قابلیت کاربرد سیستم اتودیسپلی به عنوان ابزاری در کشف دارو ویژگی منحصر بفرد آن است که طی سه مرحله انجام می گردد (۱۶).

- دیسپلی کتابخانه پپتیدی در سطح سلول ها.
- نشان دار کردن تک تک سلولهای واجد ساختار مهاری، با اتصال آنزیم هدف.
- انتخاب و مرتب کردن سلول ها به وسیله FACS.

از میل ترکیبی آنزیم مهاری هدف، می توان برای نشان دار کردن سلول هایی که یک مهار کننده فعال را در سطح خود دیسپلی کرده اند، استفاده کرد. در مواردی که آنزیم با رنگ فلورسانت جفت شده است، از فلوسایتومتری می توان برای مرتب کردن سلول های نشان دارشده استفاده و در پی آن سلول های انتخاب شده را برای تولید کلونال مقادیر کافی سلولی جهت اهداف تحلیل گرایانه و سایر اهداف استفاده نمود. اولین مرحله در این استراتژی این است که نشان داده شود که یک آنزیم مهاری را میتوان در یک فرم فضائی فعال در سطح سلول *E. coli* به روش اتودیسپلی بیان کرد. بدین منظور آپروتینین که یک پروتئین ۶۶ اسید آمینه ای است که به سرعت پیچ خوردگی یافته و سه پیوند دی سولفیدی، این پروتئین مهار کننده پروتئازی را پایدار میکند، بعنوان پاسنجر در اتودیسپلی بکار رفته است (۱۶). آپروتینین یک مهار کننده قوی الاستاز لوکوسیت انسانی است (۲۴). تحت شرائط احیا که تشکیل پیوندهای دی سولفیدی پروتئین در فضای پیش پلاسمائی تقلیل می یابد، مقادیر قابل آشکار سازی ولی نه خیلی زیاد آپروتینین در سطح سلول مشاهده می گردد. سلول های دیسپلی کننده آپروتینین بطور اختصاصی به الاستاز لوکوسیت انسانی متصل شده و کمیت این اتصال را می توان بوسیله فلوسایتومتری تجزیه و تحلیل کرد. این نتایج نشان می دهد که سلول های *E. coli* که یک مهارکننده را در سطح خود بیان می کنند، می توان به کمک میل ترکیبی این مهار کننده با یک آنزیم هدف،نشان دار نمود (۱۶).

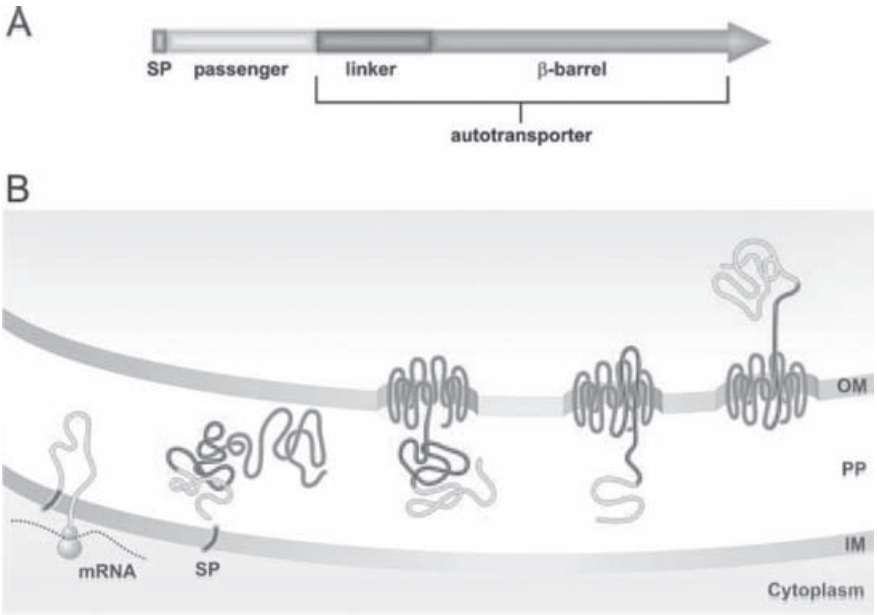
اتودیسپلی اپی توپ ها و توسعه واکسن

علاوه بر دیسپلی آنزیم هاو مهار کننده های آنزیمی، دیسپلی سطح سلولی اپی توپ ها و پادگن ها نیز از کاربرد های اتودیسپلی است. در مطالعات اولیه نشان داده شده است که در واکسن های حاوی سلول کامل (whole cell vaccines) که در آنها از پیکره کامل سلول برای تولید واکسن استفاده میگردد، ترشح پادگن های منجر به پاسخ ایمنیِ قابل مقایسه با پادگن های بیان شدهٔ درون سلولی می گردد (۹).

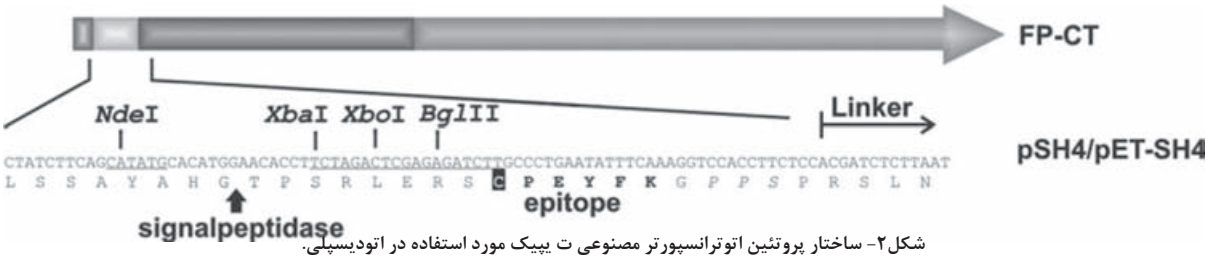
بنابراین فوائد اتودیسپلی با افزایش تحریک سیستم ایمنی برای تولید وکتورهای واکسن های خوراکی زنده(live oral vaccine vectors) بعنوان ناقلین واکسن (vaccine carriers) افزایش می یابد. با توجه به این دورنما، علاوه بر CTB که برای استقرار سیستم اتو دیسپلی استفاده شده است اپی توپ Nef ویروس نقص ایمنی انسانی یکی از دو پروتئین پاسنجری بود که اولین بار تولید شدند (۲۵). همچنین اپی توپ سلول T پروتئین شوک حرارتی ۶۰ (HSP۶۰)، باکتری *Yersinia entrocolitica* در سطح سلول سوش واکسینال تقلیل حدت یافتهٔ سالمونلا، و *E. coli* به روش اتودیسپلی بیان شده است. سلول هایT جدا شده از موش ایمن شده با سلول های سالمونلا که HSP۶۰ را دیسپلی می کنند، تکثیر اختصاصی پادگن توأم با سطوح بالای ترشح IFN-γ را نشان می دهند (۲۱، ۲۲).

این مسئله دال بر تحریک مؤثر سیستم ایمنی بوسیله سوش واکسینالی است که بطریق خوراکی به موش ها داده شده است، و کاربردی بودن اتودیسپلی شاخص های پادگنیک را برای توسعه و تکوین سوش واکسینال سالمونلا برای واکسن های زنده تقلیل حدت یافته نشان می دهد. اخیرا اتودیسپلی، برای بیان پادگنیکِ فراگمنت های اورآز *Heliobacter pylori* روی سطح سلولیِ سوش واکسینال *Salmonella enterica* سرووار تیفیموریوم و در پی آن ایمن کردن موش هایSPF ماده نژاد BALB/c به روش خوراکی استفاده شده است (۳۲). این فعالیت منجر به کاهش معنی دار گسترش *Heliobacter pylori* پس از چالش گردیده و بنابراین منجر به افزیش کارآئی پیشگیری از بیماری در مدل آلودگی های هلیکو باکتریائی در خانواده موش ها شده است. این نتایج در مجموع بیانگر آن است که: اتودیسپلی، ایمنی زائی پادگن های نوترکیب بیان شده از سوش های واکسن های خوراکی را، افزایش می دهد.

اتودیسپلی، قابلیت ایمن سازی برعلیه *Heliobacter pylori* را با سوش های واکسینال سالمونلای دیسپلی کننده اپی توپ های سلول T، امکان پذیر می سازد.

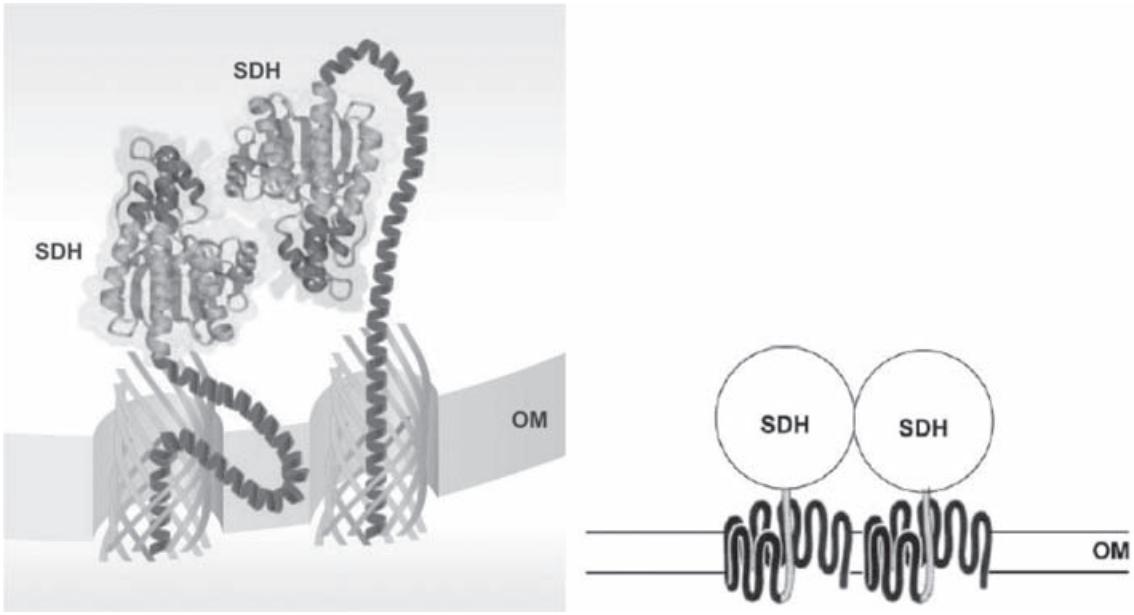


شکل ۱- مکانیزم ترشحی پروتئین های اتوترانسپورتر، Aساختار پیش ساز پلی پروتئین. B انتقال پاسنجر نوترکیب با استفاده از یک پپتید علامتی تیپیک پروتئین پیش ساز از ضخامت غشاء داخلی عبور داده می شود، با ورود به فضای پیش پلاسمائی پایانه C پروتئین پیش ساز، به صورت یک ساختمان شبه پورینی پیچ خوره و به نام β-barrel شناخته می شود و در غشاء خارجی قرار می گیرد و بدین ترتیب پاسنجر به سطح سلول انتقال می یابد. SP : پپتید علامتی، IM : غشاء داخلی، PP: فضای پیش پلاسمائی، OM: غشاء خارجی (۱۷).

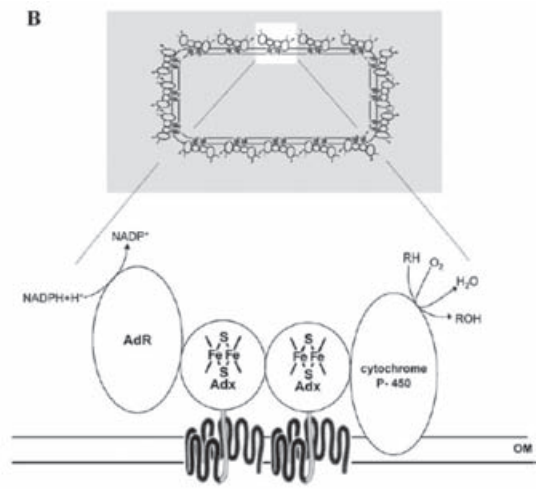


شکل۲- ساختار پروتئین اتوترانسپورتر مصنوعی ت یپیک مورد استفاده در اتودیسپلی.

FP-CTیک پروتئین ادغامی حاوی سیتئین است که یا بوسیله پلاسمیدpSH۴ تحت کنترل یک پروموتر قوی (PTK) و یا بوسیله پلاسمید pET-SH۴ تحت کنترل پروموتر القائی lac/T۷ رمز می شود. ناحیه جایگاه استقرار پاسنجر که برای انتقال به سطح سلول ضروری است بصورت توالی نشان داده شده است. زیر جایگاه های برش آنزیم های محدودگر(REs) مورد استفاده برای وارد کردن توالی DNA رمز کننده پاسنجر خط کشیده شده است. جایگاه های گوناگونی در پلاسمید های مشابه در دسترس اند. پپتید علامتی، از CTB گرفته شده است و جایگاه برش آنزیم پپتیداز علامتی با پیکان نشان داده شده است. پپتید های OmpA علامتی، PelB، β-lactamase و AIDA-I، نیز استفاده شده اند. جایگاه اختصاصی برش پروتئاز که برای رها سازی پروتئین پاسنجر به محیط خارج سلولی به کار گرفته می شود با حروف ایتالیک و اپی توپ خطی آنتی بادی مونوکلونال موش(Dü۱۴۲) که می تواند برای نشانه گذاری استفاده گردد با حروف ضخیم مشخص شده اند. سیستئین مورد استفاده در"Cystope tagging" در یک کادر سیاه نشان داده شده است. :Pپلاسمید، :FP پروتئین ادغامی،:SP پپتید علامتی،:P پاسنجر (۱۷).



شکل ۳- دیمریزاسیون پاسنجر ازSDH بیان شده به روش اتو دیسپلی در سطح سلول
با توجه به حرکت آزادانه β-barrel که در اتو دیسپلی به عنوان یک لنگر در غشاء خارجی عمل می کند، پروتئین پاسنجر حتی اگر به صورت مونومر و از ژن های مونومریک تولید شده باشد، می تواند بطور خود بخودی در سطح سلول یک دیمر ایجاد نماید (۱۲، ۱۷).



شکل ۴- بیوکاتالیست سلول کامل بدست آمده از اتودیسپلی Adx برای سنتز استروئیدها
پس از ترانسپورت apo-Adx به سطح سلول، دیمرها بطور خودبخودی ایجاد شده و فعالیت انتقال الکترونAdx طی همکاری شیمیائی خوشه[۲S-۲Fe] از سر گرفته می شود. پس از افزودن Adx ردوکتاز خالص(AdR) و CYP۱۱A۱ P۴۵۰ یا P۴۵۰ CYP۱۱B۱، یک بیوکاتالیست کارآمد سلول کامل، به ترتیب برای سنتز پرگننولون یا کورتیکوسترون بدست می آید. پوشش سلولی *E. coli* محیط غشائی کافی برای اینکه هر دو آنزیم P۴۵۰ فعال شوند را ایجاد می کند(۱۲، ۱۳).

منابع مورد استفاده

1- Benz, I., and M. A. Schmidt. (1989) Cloning and expression of an adhesion (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli, Infect. Immun*. 57, pp:1506–1511.

2- Bessette, P. H., J. J. Rice, and P. S. Daugherty. (2004) Rapid isolation of high-affinity protein binding peptides using bacterial display, *Protein Eng. Des. Sel*. 17,pp:731–739.

3- Bornscheuer, U. T. (2002) Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis, *FEMS Microbiol. Rev*, 26,pp:73–81.

4- Francisco, J. A., C. F. Earhart, and G. Georgiou. (1992) Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli, Proc. Natl. Acad. Sci*. 89,pp:2713–2717.

5- Francisco, J. A., R. Campbell, B. L. Iverson, and G. Georgiou. (1993) Production and fluorescence-activated cell sorting of Escherichia coli expressing a functional antibody fragment on the external surface, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90,pp:10444–10448.

6- Georgiou, G., C. Stathopoulos, P. S. Daugherty, A. R. Nayak, B. L. Iverson, and R. Curtiss III. (1997) Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: From the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines, *Nat. Biotechnol*. 15,pp:29–34.

7- Giffhorn, F., S. Kopper, A. Huwig, and S. Freimund. (2000) Rare sugars and sugar-based synthons by chemo-enzymatic synthesis, *Enzyme Microb. Technol.* 27,pp:734–742.

8- Grinberg, A. V., F. Hannemann, B. Schiffler, J. Muller, U. Heinemann, and R. Bernhardt. (2000) *Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties*, *Proteins* 40,pp:590–612.

9- Hess, J., A. Dreher, I. Gentschev, W. Goebel, C. Ladel, D. Miko, and S. H. Kaufmann. (1996) Protein p60 participates in intestinal host invasion by *Listeria monocytogenes*, *Zentbl. Bakteriol.* 284,pp:263–272.

10- Jose, J., F. Jahnig, and T. F. Meyer. (1995) Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters letter, *Mol. Microbiol*. 18,pp:378–380.

11- Jose, J., J. Kramer, T. Klauser, J. Pohlner, and T. F. Meyer. (1996) *Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the Escherichia coli cell surface via the Iga beta autotransporter pathway*, Gene, 178,pp:107–110.

12- Jose, J., F. Hannemann, and R. Bernhardt. (2001) Functional display of active bovine adrenodoxin on the surface of *E. coli* by chemical incorporation of the 2Fe-2S cluster, *Chembiochem*, 2,pp:695–701.

13- Jose, J., R. Bernhardt, and F. Hannemann. (2002) Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli, J. Biotechnol*. 95,pp:257–268.

14- Jose, J. and S. Handel. (2003) Monitoring the cellular surface display of recombinant proteins by cysteine labeling and flow cytometry, *Chembiochem*, 4,pp:396–405.

15- Jose, J., and S. von Schwichow. (2004) Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars, *Chembiochem*, 5,pp:100–108.

16- Jose, J., and D. Zangen. (2005) Autodisplay of the protease inhibitor aprotininin *Escherichia coli*, Biochem. Biophys. Res. Commun, 333,pp:1218–1226.

17- Jose J., Meyer, T.F. (2007) The Autodisplay Story, from Discovery to Biotechnical and Biomedical applications, microbiology and molecular biology reviews, Vol. 71, No. 4,pp:600–619

18- Klauser, T., J. Pohlner, and T. F. Meyer. (1990) Extracellular transport of cholera toxin B subunit using Neisseria IgA protease beta-domain: Conformation-dependent outer membrane translocation, *EMBO J*, 9,pp:1991–1999.

19- Klauser, T., J. Pohlner, and T. F. Meyer. (1992) Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: Dissection of Neisseria Iga beta-mediated outer membrane transport, *EMBO J*, 11,pp:2327–2335.

20- Klauser, T., J. Pohlner, and T. F. Meyer. (1993) The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram-negative bacteria, *Bioessays*, 15,pp:799–805.

21- Konieczny, M. P., M. Suhr, A. Noll, I. B. Autenrieth, and M. Alexander Schmidt. (2000) Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system, FEMS Immunol. Med. *Microbiol*, 27,pp:321–332.

22- Kramer, U., K. Rizos, H. Apfel, I. B. Autenrieth, and C. T. Lattemann. (2003) Autodisplay: Development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in Salmonella vaccine strains, *Infect. Immun*, 71,pp:1944–1952.

23- Lattemann, C. T., J. Maurer, E. Gerland, and T. F. Meyer. (2000) Autodisplay: Functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter, *J. Bacteriol*, 182,pp:3726–3733.

24- McBride, J. D., H. N. Freeman, and R. J. Leatherbarrow. (1999) Selection of human elastase inhibitors from a conformationally constrained combinatorial peptide library, Eur. *J. Biochem*, 266,pp:403–404 12.

25- Maurer, J., J. Jose, and T. F. Meyer. (1997) Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*, *J. Bacteriol*, 179,pp:794–804.

26- Maurer, J., J. Jose, and T. F. Meyer. (1999) Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions, *J. Bacteriol*, 181,pp:7014–7020.

27- Pikuleva, I. A., K. Tesh, M. R. Waterman, and Y. Kim. (2000) The tertiary structure of full-length bovine adrenodoxin suggests functional dimers, *Arch. Biochem. Biophys*, 373,pp:44–55.

28- Philippsen, A., T. Schirmer, M. A. Stein, F. Giffhorn, and J. Stetefeld. (2005) Structure of zinc-independent sorbitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.4 A resolution, *Acta Crystallogr*, 61,pp:374–379.

29- Pohlner, J., R. Halter, K. Beyreuther, and T. F. Meyer. (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease, *Nature*, 325,pp:458–462.

30- Pohlner, J., T. Klauser, E. Kuttler, and R. Halter. (1992) Sequence-specific cleavage of protein fusions using a recombinant Neisseria type 2 IgA protease, *Biotechnology*, 10,pp:799–804.

31- Reetz, M. T. (2000) Evolution in the test tube as a means to create enantioselective enzymes for use in organic synthesis, *Sci. Prog*, 83,pp:157–172.

32- Rizos, K., C. T. Lattemann, D. Bumann, T. F. Meyer, and T. Aebischer. (2003) Autodisplay: Efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in Salmonella vaccine strains, *Infect. Immun*,71,pp:6320–6328.

33- Schmidt, M., M. Baumann, E. Henke, M. Konarzycka-Bessler, and U. T. Bornscheuer. (2004) Directed evolution of lipases and esterases, *Methods Enzymol*, 388,pp:199–207.

34- Schultheiss, E., C. Paar, H. Schwab, and J. Jose. (2002) Functional esterase surface display by the autotransporter pathway in *Escherichia coli*, *J. Mol.Catal*, 18,pp:89–97.

35- Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: Novel expression vectors thatdisplay cloned antigens on the virion surface, *Science*, 228,pp:1315–1317.

36- Strauss, A., and F. Gotz. (1996) *invivo* immobilization of enzymatically active polypeptides on the cell surface of *Staphylococcus carnosus*, *Mol. Microbiol.* 21,pp:491–500.

37- Wentzel, A., A. Christmann, R. Kratzner, and H. Kolmar. (1999) Sequence requirements of the GPNG beta-turn of the *Ecballium elaterium* trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening, *J. Biol. Chem*,274,pp:21037–21043.

38- Wernerus, H., and S. Stahl. (2004) Biotechnological applications for surface engineered bacteria, *Biotechnol, Appl. Biochem*, 40,pp:209–228.