بررسی کارایی ژن‌های تنظیم‌کننده مسیرهای ترجمه و پس از ترجمه در بهینه‌سازی بیان فاکتور فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی

اعظم رحیم‌پور [۱](Ph.D)، آزیتا نجایی [۲](M.Sc)، فریدون مهبودی [*۳](Ph.D)

۱- *دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران*

۲- *دانشگاه پیام نور، تهران، ایران*

۳- *مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران*

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) پرکاربردترین سیستم میزبانی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب می‌باشند. روش‌های متنوعی هم‌چون ایجاد وکتورهای بیانی بهینه و نیز میزبان‌های مهندسی شده برای افزایش میزان بیان پروتئین در این میزبان به‌کار گرفته شده‌اند. در این مطالعه روش مهندسی سلول بر پایه ژن‌های موتان غیر قابل فسفریله شونده زیرواحد آلفای فاکتور آغازی یوکاریوتی ۲ (eIF2α S51A) و پروتئین انتقال‌دهنده سرامید (CERT S132A)، که به ترتیب مسیرهای ترجمه و ترشح پروتئین را در سلول کنترل می‌کنند، به منظور ایجاد رده سلولی CHO بهینه به‌کار گرفته شده است.

مواد و روش‌ها: هر یک از ژن‌های CERT S132A، eIF2α S51A و فاکتور فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (t-PA) در وکتور بیانی مناسب کلون شدند. جمعیت‌های سلولی پایدار بیان‌کننده هر یک از ژن‌های CERT S132A و eIF2α S51A ایجاد شده و کارایی این سلول‌ها در بیان موقتی ژن t-PA در مقایسه با سلول‌های دستورزی نشده مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: وارد شدن هر یک از ژن‌های CERT S132A و eIF2α S51A در ژنوم سلول میزبان از طریق انجام PCR بر DNA ژنومی سلول‌های پایدار تائید شد. هم‌چنین در وسترن‌بلات باند اختصاصی مطابق با هر یک از پروتئین‌های CERT S132A و eIF2αS51A مشاهده شد. بیان ژن CERT S132A افزایش بیان ۵۰٪ را در بیان t-PA به‌دنبال داشت. در مقابل در سلول‌های پایدار شده با ژن eIF2α S51A تاثیر مثبتی بر میزان بیان مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق کارایی روش مهندسی سلول بر پایه ژن CERT S132A را در ایجاد سلول CHO بهینه‌شده نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های تخمدان هامستر چینی، سرامید، فاکتور آغازی یوکاریوتی ۲، فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی

مقدمه

پروتئین‌های نوترکیب امروزه روش‌های درمانی جدیدی را برای طیف وسیعی از بیماری‌ها از سرطان تا بیماری‌های عفونی فراهم کرده‌اند [۱]. میزبان‌های متنوعی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب دارویی معرفی شده‌اند اما بسیاری از این فراورده‌ها دارای ساختارهای پیچیده‌ای هستند و ایجاد تغییرات پس از ترجمه نقش بسیار مهمی را در فعالیت و نیمه

* نویسنده مسئول، تلفن: ۶۶۴۸۰۷۸۰-۰۲۱ Email: mahboudi_f@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۱۶

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-17]

عمر آن‌ها دارا می‌باشد. بنابراین اغلب این پروتئین‌ها در سلول‌های پستانداران تولید می‌شوند. در میان انواع رده‌های سلولی موجود، سلول‌های CHO بیش‌ترین استفاده را در این زمینه داشته‌اند [۲]. با این وجود، کشت سلول‌های پستانداران بسیار وقت‌گیر و پرهزینه بوده و میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب در این میزبان‌ها در مقایسه با باکتری‌ها و قارچ‌ها بسیار پائین می‌باشد. از طرفی بسیاری از فراورده‌های دارویی نوترکیب می‌بایست در دوزهای بالا مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین هزینه درمان با این داروها بسیار بالا می‌باشد [۴،۳]. در این راستا روش‌های متنوعی در جهت افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های پستانداران مورد بررسی قرار گرفته‌اند که از آن جمله می‌توان به بهینه‌سازی محیط کشت و فرایند تولید، بهینه‌سازی اجزاء وکتور بیانی و مهندسی سلول بیانی اشاره کرد [۶،۵]. دو عامل تعیین‌کننده در میزان تیتر پروتئین شامل تولید ویژه، که میزان تولید پروتئین را به ازاء هر سلول در واحد زمان نشان می‌دهد، و دانسیته سلولی زنده می‌باشد. در این میان بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت و فرایند تولید بیش‌ترین سهم را در افزایش دانسیته سلولی، زمان کشت و تیتر پروتئین تولید شده داشته است. روش‌های مبتنی بر مهندسی اجزاء وکتور بیانی نیز نقش مهمی در افزایش میزان رونویسی از ژن خارجی و افزایش میزان پایداری بیان آن داشته‌اند [۵]. در سال‌های اخیر مهندسی سلول بیانی به‌عنوان یک روش نوین در جهت افزایش تولید ویژه و دانسیته سلولی گسترش یافته است. در این رویکرد از روش‌های مهندسی ژنتیک در جهت افزایش یا سرکوب بیان هدفمند ژن‌ها با هدف بهبود ویژگی‌های سلول استفاده می‌شود [۷]. با این وجود، مطالعات انجام شده نشان می‌دهند موفقیت این روش به عوامل متنوعی از جمله سلول میزبان، میزان بیان پروتئین خارجی و ماهیت پروتئین بستگی دارد. از جمله رویکردهایی که با هدف افزایش تیتر پروتئین‌های نوترکیب مورد بررسی قرار گرفته‌اند می‌توان به جلوگیری از مرگ سلولی، افزایش تکثیر سلولی و بهبود متابولسیم اشاره نمود. در مقابل، روش‌های استفاده شده در جهت افزایش تولید ویژه شامل افزایش رونویسی و ترجمه، بهبود تاخوردگی، انتقال و ترشح پروتئین و القاء ایست در سیکل سلولی می‌باشند [۸].

تا کنون مطالعات متنوعی در زمینه مهندسی سلو CHO از طریق افزایش بیان ژن‌های درگیر در مراحل مختلف تاخوردگی و ترشح پروتئین انجام شده است. از این دسته می‌توان به افزایش بیان چپرون‌ها و فولدازها و واسطه‌های ایجاد وزیکول‌های ترشحی اشاره نمود [۹-۱۱].

پروتئین انتقال‌دهنده سرامید (CERT) به‌عنوان یک مدیاتور اصلی در انتقال سرامید از شبکه اندوپلاسمیک به دستگاه گلژی شناخته شده است [۱۲]. سرامید به‌عنوان پیش‌ساز ساخت دی‌اسیل‌گلیسرول و اسفنگومیلین مورد استفاده قرار می‌گیرد. تجمع دی‌اسیل‌گلیسرول در شبکه پس‌گلژی منجر به فراخوانی پروتئین کیناز D (PKD) می‌شود. پروتئین کیناز D پس از فعال شدن، با فراخوانی پروتئین‌های تنظیمی درگیر در ایجاد وزیکول‌های ترشحی نقش مهمی را در فرایند ترشح پروتئین ایفا می‌کند. به‌علاوه پروتئین انتقال‌دهنده سرامید، خود یک سوبسترای پروتئین کیناز D می‌باشد و فسفریلاسیون CERT در محل اسید امینه سرین ۱۳۲ توسط پروتئین کیناز D، فعالیت این پروتئین و تمایل آن به گلژی را کاهش می‌دهد [۱۳]. Florin و همکاران [۱۴] نشان داده‌اند انتقال ژن CERT به سلول‌های CHO بیان‌کننده آنتی‌بادی منوکلونال و آلبومین انسانی می‌تواند میزان بیان این دو ژن را به‌ترتیب به میزان ۲۶ و ۶۰٪ افزایش دهد. در مطالعه Fugmann و همکاران [۱۳] نشان داده شده است ترانسفکشن هم‌زمان ژن‌های CERT با ژن گزارشگر پراکسیداز بیان موقتی این ژن را در سلول‌های HEK293 به میزان ۲/۵ برابر افزایش می‌دهد. در هر دو مطالعه فوق محققان نشان داده‌اند ژن موتان غیر قابل فسفریلاسیون (CERT S132A) CERT نسبت به نوع طبیعی آن نقش موثرتری در افزایش بیان ژن هترولوگ داشته است.

فاکتور آغازی یوکاریوتی ۲ (eIF2) یکی از فاکتورهای کلیدی در کنترل ترجمه سلولی می‌باشد. در شرایط مختلف استرس سلولی مانند شوک حرارتی، کاهش سرم و آلودگی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-17]

ویروسی، فسفریلاسیون زیرواحد آلفای این فاکتور در محل سرین ۵۱ توسط کینازهای مختلف منجر به کاهش میزان ترجمه وابسته به کلاهک می‌شود [۱۵]. برخی گزارش‌ها نشان داده‌اند تجمع پروتئین در شبکه اندوپلاسمیک نیز می‌تواند فسفریلاسیون این فاکتور را القاء کند [۱۶]. در این زمینه برخی محققان نقش ژن موتان غیر قابل فسفریلاسیون این فاکتور (eIF2α S51A)، که در آن اسید آمینه سرین ۵۱ به آلانین تغییر یافته است، را در افزایش میزان بیان ژن‌های خارجی مورد بررسی قرار داده‌اند Underhill و همکاران [۱۷] نشان داده‌اند ترانسفکشن هم‌زمان ژن eIF2α S51A به همراه ژن گزارشگر لوسیفراز در بیان موقتی، افزایش میزان بیان این ژن را به‌دنبال داشته است.

هدف از انجام این تحقیق بررسی کارایی انواع موتان غیر قابل فسفریلاسیون ژن‌های CERT S132A و eIF2α S51A در ایجاد رده سلولی جدید CHO با قابلیت افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد. در این راستا، از ژن کدکننده فاکتور فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (t-PA) به‌عنوان پروتئین مدل استفاده شده است. فاکتور فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی انسانی، گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۶۸ کیلو دالتون می‌باشد که با تبدیل پلاسمینوژن غیرفعال به نوع فعال آن یعنی پلاسمین باعث حل شدن لخته فیبرینی می‌شود. t-PA انسانی نوترکیب به‌دلیل این‌که از کارایی و ایمنی بالاتری نسبت به سایر سرین پروتئازها مانند استرپتوکیناز و اوروکیناز برخوردار می‌باشد، به‌صورت گسترده در درمان بیماری‌های ترومبوتیک مورد استفاده قرار گرفته است. امروزه t-PA نوترکیب به‌صورت تجاری در سلول‌هایCHO تولید می‌شود [۱۸].

مواد و روش‌ها

کشت سلولی. رده سلولی CHO-K1 (انستیتوپاستور، ایران) در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی غیر فعال شده با حرارت (Invitrogen، آمریکا)، ۱۰۰واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین ، ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۲ میلی‌مولار گلوتامین (Biosera، انگلستان)، در انکوباتور حاوی ۵٪ دی‌اکسیدکربن، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۸۵٪ رطوبت کشت داده شدند. سلول‌ها در فاصله ۳-۲ روز با تراکم سلولی ۱۰۶× ۰/۲ سلول در میلی‌لیتر پاساژ داده شدند. شمارش سلولی با روش تریپان بلو و با استفاده از لام نئوبار انجام شد.

طراحی و ساخت پلاسمیدهای بیانی. توالی کدکننده نوع موتان غیر فسفریله‌شونده پروتئین متصل‌شونده به سرامید (CERT S132A) از وکتور حاوی این ژن (اهداشده توسط دکتر Monilola Olayiaye، آلمان) تکثیر شده و پس از کلونینگ در وکتور حدواسط(pGEM-T EASY Promega، لیتوانی) و تعیین توالی با استفاده از آنزیم‌های HindIII و XbaI در وکتور pcDNA3.1/hygro(+) کلون شد. توالی کدکننده دنباله FLAG در پرایمر برگشت این ژن قرار داده شد. ژن نوع موتان غیر فسفریله‌شونده فاکتور آغازی یوکاریوتی ۲ (eIF2α S51A) نیز پس از تکثیر از وکتور حاوی این ژن (اهدا شده توسط دکتر David Schubert، آمریکا) در وکتور حد واسط pGEM-T EASY کلون شده و پس از تعیین توالی با استفاده از آنزیم‌های HindIII و XbaI (Fermentas، لیتوانی) در وکتور pVP22/myc-His2(+) کلون شد. در مورد این ژن توالی شامل دنباله پلی‌هیستیدین موجود در وکتور در انتهای ژن قرار می‌گیرد. این دو سازه به ترتیب pcDNA-CERT S132A و peIF2α S51A نامیده شدند. توالی کدکننده فاکتور فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی با استفاده از آنزیم‌های NotI و XhoI (Fermentas، لیتوانی) از ناقل pTZ57R t-PA (که در مطالعات قبلی ایجاد شده بود)، خارج شده و در ناقل pCMV-puro که توسط همین دو آنزیم بریده شده بود کلون شد تاسازه pTPA ایجاد شود.

ترانسفکشن و ایجاد رده سلولی پایدار. برای انجام ترانسفکشن از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen، آمریکا) استفاده شد. برای ایجاد رده سلولی پایدار، وکتورهای pcDNA-CERT S132A و peIF2α S51A با استفاده از آنزیم محدودکننده BglII (Fermentas، لیتوانی) خطی شده و به سلول ترانسفکت شدند. در مورد هر وکتور دو ترانسفکشن

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-17]

مستقل انجام شد. پس از ۴۸ ساعت سلول‌ها به نسبت ۱:۱۰ رقیق شده و در محیط حاوی ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین (در مورد سلول‌های ترانسفکت‌شده با pcDNA-CERT S132A) یا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک نئومایسین (در مورد سلول‌های ترانسفکت‌شده با peIF2α S51A) کشت داده شدند. سلول‌های CHO ترانسفکت‌نشده نیز به‌عنوان کنترل در معرض آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند. کشت سلول‌ها در این محیط انتخابی تا زمانی که درصد زنده بودن سلول‌های ترانسفکت‌نشده به صفر رسید، ادامه یافت. در مرحله بعد سلول‌ها به مدت ۴ هفته در محیط کشت حاوی غلظت دو برابر از آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند و پس از آن آنتی‌بیوتیک از محیط کشت حذف شد. به‌منظور بررسی الحاق ناقل‌های بیانی به ژنوم سلول‌های پایدار شده، DNA ژنومی سلول‌های ترانسفکت شده با هر یک از وکتورها با استفاده از کیت استخراج DNA تخلیص شده و PCR انجام شد.

وسترن بلات . برای انجام وسترن‌بلات، تعداد ۱۰۶× ۵ سلول از هر یک از جمعیت‌های پایدار ایجاد شده و نیز سلول‌های ترانسفکت نشده لیز شدند. ۵۰ میکروگرم از هر عصاره بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ الکتروفورز شد. پس از آن انتقال پروتئین‌ها از ژل پلی‌آکریل‌آمید به یک غشا نیتروسلولزی انجام شده و بلاکینگ در محلول شیر خشک ۵٪ به مدت یک‌ساعت صورت گرفت. پس از انجام شستشو، غشاء نیتروسلولز به‌مدت ۲ ساعت در بافر حاوی آنتی‌بادی اولیه مناسب قرار گرفت. در مورد ژن CERT S132A از آنتی‌بادی علیه دنباله FLAG Cell Signalling (Technologies، آمریکا) و در مورد ژن eIF2α S51A از آنتی‌بادی اولیه علیه دنباله پلی‌هیستیدین (Roche، آمریکا) استفاده شد. شستشوی غشاء نیتروسلولزی مجدداً انجام شده و به‌مدت ۱ ساعت در بافر حاوی آنتی‌بادی ثانویه متصل به پراکسیداز (Santa Cruz Biotechnology، آمریکا) قرار داده شد. پس از انجام شستشو نهایتاً از کیت Amersham ECL (Biosciences، آمریکا) برای آشکارسازی باندهای پروتئینی استفاده شد.

بیان موقتی و بررسی میزان بیان t-PA. وکتور بیانی t-PA به سلول‌های پایدارشده با هر یک از وکتورهای pcDNA-CERT S132A و peIF2α S51A و نیز سلول‌های کنترل به‌صورت دوتایی ترانسفکت شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت، محیط کشت سلولی جمع‌آوری و شمارش سلولی انجام شد. میزان فعالیت آنزیمی t-PA نوترکیب در محیط کشت هر رده سلولی با استفاده از کیت تعیین فعالیت (Trinity Biotech، ایراند) تعیین شد. برای محاسبه میزان تولید ویژه (specific productivity) فرمول زیر مورد استفاده قرار گرفت. در این فرمول P میزان تولید حجمی t-PA، X1 تعداد سلول اولیه، X2 تعداد سلول نهایی و t زمان کشت را بر حسب روز نشان می‌دهد [۱۹]. تولید ویژه بر حسب میزان بیان/سلول/روز گزارش می‌شود.

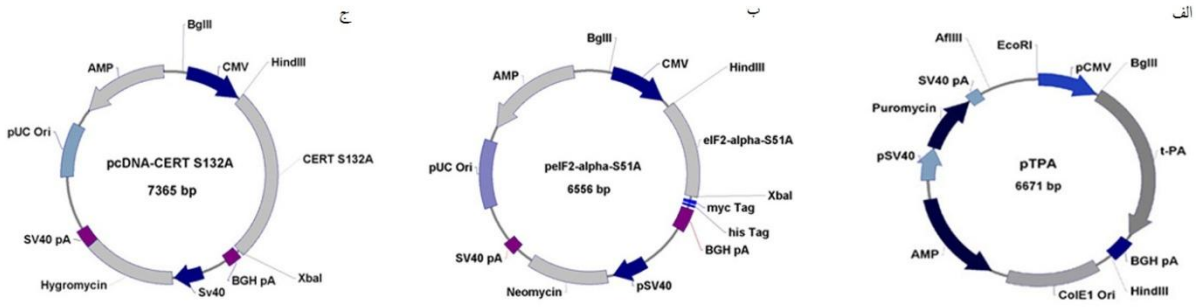
نتایج

ساخت سازه‌های بیانی. تائید کلونینگ ژن‌های CERT S132A، eIF2α S51A و t-PA در وکتور بیانی مربوطه از طریق هضم آنزیمی و تعیین توالی انجام شد. نقشه وکتورهای مورد استفاده در این تحقیق در شکل ۱ نشان داده شده است.

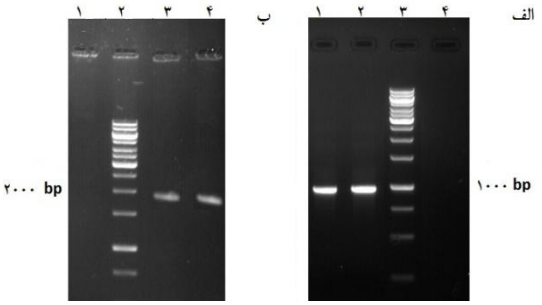
ایجاد رده سلولی پایدار. پس از ترانسفکشن سلول‌های CHO با هر یک از ناقل‌های pcDNA-CERT S132A و peIF2α S51A، سلول‌های در بردارنده هر یک از پلاسمیدها به ترتیب در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین یا نئومایسین انتخاب شدند. سلول‌های انتخاب شده در این مرحله به‌مدت ۳ الی ۴ هفته در محیط حاوی غلظت افزایش‌یافته آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. هدف از انجام مرحله دوم انتخاب، غنی‌سازی هر چه بیش‌تر جمعیت سلولی از سلول‌های دارای بیان بالاتر و حذف کامل سلول‌های ترانسفکت نشده می‌باشد. در مرحله بعد ادغام سازه‌های بیانی در ژنوم سلول‌های انتخاب شده از طریق انجام PCR بررسی شد. نتایج این مرحله در شکل ۲ نشان داده شده است. در این

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-17]

شکل، قطعه ۱۸۰۰ جفت‌بازی مطابق با ژن CERT در PCR مربوط به سلول‌های حاوی پلاسمید pcDNA-CERT S132A، و قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی مطابق با توالی کدکننده eIF2α در PCR مربوط به سلول‌های پایدار شده با پلاسمید peIF2α S51A قابل مشاهده است. در هر مورد از سلول‌های ترانسفکت‌نشده به‌عنوان کنترل استفاده شده است.

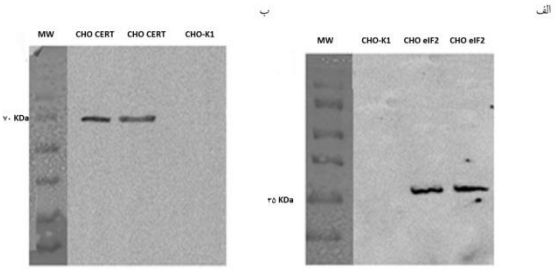


شکل ۱. نقشه وکتورهای تهیه شده در این تحقیق در شکل نشان داده شده است. الف. وکتور بیانی ژن t-PA. ب. وکتور بیانی ژن peIF2α S51A. ج. وکتور بیانی ژن CERT S132A



شکل ۲. الکتروفورز ژل آگارز برای محصولات PCR بر روی DNA ژنومی سلول‌های پایدار. الف. سلول‌های پایدار شده با وکتور peIF2α S51A. ستون‌های ۱و ۲: نتیجه انجام PCR بر روی سلول‌های بر روی سلول‌های پایدار، ستون ۳: مارکر DNA، ستون ۴: نتیجه انجام PCR بر روی سلول‌های کنترل. ب. سلول‌های پایدار شده با وکتور pcDNA-CERT S132A. ستون ۱: نتیجه انجام PCR بر روی سلول‌های کنترل، ستون ۲ مارکر DNA، ستون‌های ۳ و ۴: نتیجه انجام PCR بر روی سلول‌های پایدار.

وسترن بلات. ژن‌های CERT S132A و eIF2α S51A به‌صورت درون سلولی بیان می‌شوند، بنابراین وسترن‌بلات بر روی عصاره سلولی انجام شد. با توجه به این‌که نوع غیر موتان هر یک از ژن‌های CERT و eIF2α نیز در سلول بیان می‌شوند، به‌منظور شناسایی پروتئین‌های هترولوگ CERT S132A و eIF2α S51A از آنتی‌بادی علیه دنباله‌های FLAG و پلی‌هیستیدین در وسترن‌بلات استفاده شد. شکل ۳ نتایج مربوط به وسترن‌بلات را نشان می‌دهد. در این شکل باند با وزن مولکولی ۶۹ کیلودالتون پروتئین CERT S132A و باند با وزن ۳۶ کیلودالتون پروتئین eIF2α S51A را نشان می‌دهد. در هر مورد عصاره سلول‌های ترانسفکت‌نشده به‌عنوان کنترل استفاده شده است.

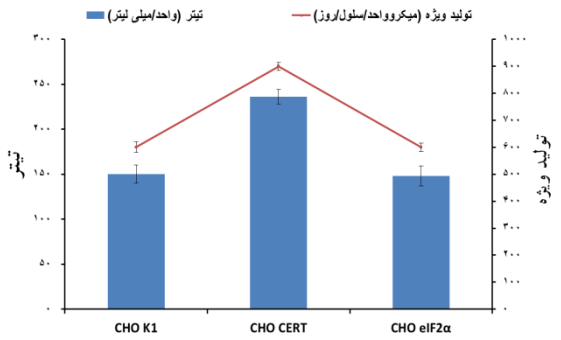


شکل۳. انجام وسترن بلات به منظور تائید بیان ژن‌های CERT S132A و eIF2α S51A. الف. نتیجه وسترن بلات انجام شده بر روی سلول‌های پایدار شده با ژن eIF2αS51A (CHO eIF2). ب. نتیجه وسترن بلات انجام شده بر روی سلول‌های پایدار شده با ژن CERT S132A (CHO CERT). در هر مورد از لیزت سلول‌های ترانسفکت نشده به‌عنوان کنترل استفاده شده است.

بررسی بیان موقتی ژن t-PA در سلول‌های CHO مهندسی شده. به‌منظور بررسی کارایی هر یک از جمعیت‌های سلولی ایجاد شده در بیان پروتئین‌های نوترکیب از روش بیان موقتی استفاده شد. به این ترتیب سلول‌های پایدار شده با هر

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-17]

یک از وکتورهای CERT S132A و eIF2α S51A و نیز سلول‌های کنترل با وکتور بیان‌کننده t-PA ترانسفکت‌شده و میزان فعالیت t-PA در محیط کشت سلولی بعد از گذشت ۷۲ ساعت بررسی شد. همان‌گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود میزان تولید حجمی و تولید ویژه در سلول‌های پایدار شده با ناقل pcDNA-CERTS132A به‌ترتیب ۲۳۶ واحد فعالیت آنزیمی در هر میلی‌لیتر (U/ml) و ۹۰۰ میکروواحد به ازای سلول در هر روز μ (U/cell/day) محاسبه شده است که در مقایسه با سلول‌های کنترل ۵۰٪ افزایش نشان می‌دهد. در مقابل در سلول‌های ایجاد شده با ناقل peIF2α S51A هیچ‌گونه تغییری در میزان بیان مشاهده نشد.



شکل ۴. بررسی میزان بیان t-PA در بیان موقتی در سلول های پایدار شده با ژن CERT S132A (CHO CERT) و سلول‌های پایدار شده با ژن eIF2α S51A (CHO eIF2α) در مقایسه با سلول‌های کنترل. نوار خطا انحراف معیار را نشان می‌دهد. نتایج با استفاده از آزمون one way-ANOVA بررسی شده و تفاوت بین میانگین‌ها در $p<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته‌شد.

بحث و نتیجه‌گیری

ایجاد رده سلولی پایدار یکی از چالش‌های اصلی در روند تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی می‌باشد. در سال‌های اخیر روش‌های متنوعی مانند مهندسی سلول‌های بیانی، ایجاد وکتورهای جدید و استفاده از سیستم‌های اتومات برای تسهیل فرایند ایجاد سلول‌های پایدار صنعتی معرفی شده‌اند [۲۰،۲۱]. در این راستا مطالعه حاضر با هدف ایجاد رده سلولی CHO با قابلیت بیان بهینه پروتئین‌های نوترکیب طراحی و انجام شد. دستورزی ژنتیکی سلول میزبان به‌عنوان یک استراتژی موثر در جهت کاهش موانع سلولی موجود در بیان موثر پروتئین‌های نوترکیب شناخته شده است. با این وجود شناسایی ژن هدف مناسب در به‌کارگیری موفقیت‌آمیز این روش نقش اساسی دارد [۷]. مشخص شده است در سلول‌های پستانداران میزان بیان پروتئین نوترکیب ترشح شده همواره با تعداد کپی ژن یا میزان mRNA متناسب نمی‌باشد. بنابراین می‌توان تصور کرد که فرایندهای ترجمه یا پس از ترجمه می‌توانند مراحل محدودکننده سرعت در تولید پروتئین باشند [۲۲]. به این ترتیب در این مطالعه، ما مسیرهای ترجمه و ترشح پروتئین را به‌عنوان اهداف مهندسی سلول مورد بررسی قرار داده‌ایم. با توجه به این‌که بیان پروتئین در سلول‌های پستانداران فرایندی پیچیده و چندمرحله‌ای می‌باشد، هدف‌گیری ژن‌های کلیدی که فعالیت کلی یک فرایند سلولی را کنترل می‌کنند می‌تواند نتایج موثرتری را به‌دنبال داشته باشد. بنابراین نوع موتان غیر قابل فسفریله‌شونده ژن‌های زیرواحد آلفای فاکتور آغازی یوکاریوتی ۲ (eIF2α S51A) و پروتئین انتقال‌دهنده سرامید (CERT S132A) برای ایجاد رده سلولی با قابلیت بیان بهبود یافته پروتئین‌های نوترکیب مورد بررسی قرار گرفتند.

وکتورهای بیانی در بردارنده هر یک از ژن‌های فوق ساخته شده و جمعیت سلولی پایدار بیان‌کننده هر ژن ساخته شد. وارد شدن هر ژن در ژنوم سلول میزبان از طریق انجام بر روی ژنومی تائید شد. همچنین صحت بیان پروتئین‌های مربوطه از طریق انجام وسترن‌بلات تائید شد. به‌منظور بررسی بیان فاکتور فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی در هر یک از رده‌های سلولی ایجاد شده از روش بیان موقتی استفاده شد. بیان موقتی یک روش موثر برای بیان موثر ژن‌های هترولوگ در یک بازه زمانی کوتاه می‌باشد. از طرفی با توجه به این‌که در طی این بازه زمانی بیش‌ترین درصد پلاسمیدهای ترانسفکت‌شده همچنان به‌صورت خارج کروموزومی باقی می‌مانند، بنابراین بیان ژن خارجی تحت تاثیر اثر مکانی ژنوم میزبان قرار نمی‌گیرد [۲۳].

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-17]

در این مطالعه تیتر و میزان تولید ویژه t-PA در سلول‌های پایدار شده با ژن CERT S132A به میزان ۵۰٪ در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش یافت. اما افزایش میزان بیان در سلول‌های eIF2α S51A دیده نشد. نتایج ما در این مطالعه در تضاد با نتایج Underhill و همکاران [۱۷] می‌باشد که اثر مثبت ترانسفکشن هم‌زمان ژن eIF2α S51A را در بیان موقتی ژن لوسیفراز در سلول‌های CHO نشان داده‌اند. این تضاد می‌تواند به‌دلیل تفاوت‌های موجود در ماهیت پروتئین خارجی، نحوه بیان ژن و نوع روش ترانسفکشن باشد. به نظر می‌رسد بیان نوع موتان غیر قابل فسفریله‌شونده زمانی می‌تواند موثر باشد که تجمع پروتئین نوترکیب در شبکه اندوپلاسمیک منجر به قرار گرفتن سلول در شرایط استرس شود. بنابراین لازم است پس از انجام بهینه‌سازی‌های بیش‌تر بر روی روش ترانسفکشن موقتی و افزایش بازده این روش، مجدداً کارایی سلول بیان‌کننده ژن eIF2α S51A را در بیان ژن‌های هترولوگ مورد بررسی قرار داد.

نتایج حاصل از این تحقیق کارایی ژن CERT S132A را در افزایش بیان موقتی t-PA در جمعیت سلولی پایدار نشان می‌دهد. اما به منظور تائید کارایی این سلول لازم است در مطالعات آتی پس از جداسازی تک کلون‌های سلولی دارای بیش‌ترین میزان بیان از ژن CERT S132A از جمعیت سلولی فوق، طیفی از پروتئین‌های مختلف با ویژگی‌های ساختاری متفاوت در این میزبان بیان شده و کارایی رده حاصل در بیان این پروتئین‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد. در صورت کسب نتایج مناسب، رده سلولی فوق می‌تواند به‌عنوان یک میزبان بهبودیافته در بیان پروتئین‌های نوترکیب دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران انجام شده است. از دکتر Monilola Olayioye و دکتر David Schubert برای هدیه وکتورهای حاوی ژن‌های CERT S132A و eIF2α S51A قدردانی می‌شود.

منابع

[1] Jayapal KP, Wlaschin FK, Hu SW, Yap MG. Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. Chem Eng Prog 2007; 103: 40-47.

[2] Almo SC, Love JD. Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. Curr Opin Struct Biol 2014; 26: 39-43.

[3] Bandaranayake AD, Almo SC. Recent advances in mammalian protein production. FEBS Lett 2014; 588: 253-260.

[4] Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. Appl Microbiol Biotechnol 2012; 93: 917-930.

[5] Hacker DL, De Jesus M, Wurm FM. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - where do we go from here? Biotechnol Adv 2009; 27: 1023-1027.

[6] Cacciatore JJ, Chasin LA, Leonard EF. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. Biotechnol Adv 2010; 28: 673-681.

[7] Kuystermans D, Krampe B, Swiderek H, Al-Rubeai M. Using cell engineering and omic tools for the improvement of cell culture processes. Cytotechnology 2007; 53: 3-22.

[8] Mohan C, Kim YG, Koo J, Lee GM. Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells. Biotechnol J 2008; 3: 624-630.

[9] Peng RW, Fussenegger M. Molecular engineering of exocytic vesicle traffic enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. Biotechnol Bioeng 2009; 102: 1170-1181.

[10] Ku SC, Ng DT, Yap MG, Chao SH. Effects of overexpression of X-box binding protein 1 on recombinant protein production in Chinese hamster ovary and NS0 myeloma cells. Biotechnol Bioeng 2008; 99: 155-164.

[11] Jin F, Kretschmer PJ, Harkins RN, Hermiston TW. Enhanced protein production using HBV X protein (HBx), and synergy when used in combination with XBP1s in BHK21 cells. Biotechnol Bioeng 2010; 105: 341-349.

[12] Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, et al. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. Nature 2003; 426: 803-809.

[13] Fugmann T, Hausser A, Schoffler P, Schmid S, Pfizenmaier K, Olayioye MA. Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. J Cell Biol 2007; 178: 15-22.

[14] Florin L, Pegel A, Becker E, Hausser A, Olayioye MA, Kaufmann H. Heterologous expression of the lipid transfer protein CERT increases therapeutic protein productivity of mammalian cells. J Biotechnol 2009; 14: 84-90.

[15] Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6: 318-327.

[16] Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. Nature 1999; 397: 271-274.

[17] Underhill MF, Coley C, Birch JR, Findlay A, Kallmeier R, Proud CG, et al. Engineering mRNA translation initiation to enhance transient gene expression in chinese hamster ovary cells. Biotechnol Prog 2003; 19: 121-129.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-17]

[18] Rouf SA, Moo-Young M, Chisti Y. Tissue-type plasminogen activator: characteristics, applications and production technology. Biotechnol Adv 1996; 14: 239-266.

[19] Brezinsky SC, Chiang GG, Szilvasi A, Mohan S, Shapiro RI, MacLean A, et al. A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. J Immunol Methods 2003; 277: 141-155.

[20] Balasubramanian S, Matasci M, Kadlecova Z, Baldi L, Hacker DL, Wurm FM. Rapid recombinant protein production from piggyBac transposon-mediated stable CHO cell pools. J Biotechnol 2015; 200: 61-69.

[21] Hou JJ, Hughes BS, Smede M, Leung KM, Levine K, Rigby S, et al. High-throughput ClonePix FL analysis of mAb-expressing clones using the UCOE expression system. N Biotechnol 2014; 31: 214-220.

[22] Becker E, Florin L, Pfizenmaier K, Kaufmann H. An XBP-1 dependent bottle-neck in production of IgG subtype antibodies in chemically defined serum-free Chinese hamster ovary (CHO) fed-batch processes. J Biotechnol 2008; 135: 217-223.

[23] Rajendra Y, Hougland MD, Alam R, Morehead TA, Barnard GC. A high cell density transient transfection system for therapeutic protein expression based on a CHO GS-knockout cell line: Process development and product quality assessment. Biotechnol Bioeng 2015; 112: 977-986.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-17]

Efficiency of translation and post-translation regulatory genes in optimization of tissue plasminogen activator gene expression

S Azam Rahimpour (Ph.D)[1], Azita Najaei (BS.c)[2], Fereidoun Mahboudi (Ph.D) [*3]
1 - School of Advanced Technologies in Medicine, ShahidBeheshti University of Medical Sciences, Tehran. Iran
2 - Payame Noor University, Tehran, Iran
3 - Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

(Received: 16 Aug 2015; Accepted: 7 Sep 2015)

Introduction: Chinese hamster ovary (CHO) cells are the most commonly used host system for the expression of high quality recombinant proteins. Different strategies such as generation of more efficient expression vectors and establishment of genetically engineered host cells have been employed to improve recombinant protein expression in this system. Here the cell line engineering strategy based on the phosphorylation resistant variants of eukaryotic initiation factor 2 alpha(eIF2α) and ceramide transfer protein(CERT), key mediators of protein translation and secretion, have been used to develop improved CHO host cells.

Materials and Methods: The CERT S132A, peIF2α S51A and tissue plasminogen activator (t-PA) were cloned in suitable expression vectors. CERT S132A and peIF2α S51A stable cell pools were generated and the efficacy of the cells for transient expression of t-PA was evaluated in comparison to un-modified CHO cells.

***Results*:** Integration of CERT S132A and peIF2α S51A expression vectors in CHO cell genome confirmed by PCR analysis of genomic DNA from stable cells. Moreover, the specific bands for CERT S132A and peIF2α S51A proteins were observed in Western blot analysis. Expression of CERT S132A gene increased expression of t-PA by 50%. However no positive effect on t-PA expression was observed in the peIF2α S51A stable cell pools.

Conclusion: This study showed the efficiency of CERT S132Abased cell line engineering approach for the development of optimized CHO host cells.

Keywords: CHO, Eukaryotic initiation factor 2, Ceramides, Tissue plasminogen activator

* Corresponding author. Tel: +98 21 66480780
mahboudi_f@pasteur.ac.ir

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-17]