Original Article

The Effects of Recombinant IgG4 Expression on the Growth of Sp2.0 Cell Lines

Hoda Jahandar[1], Vahid Khalaj[2], Leila Nematollahi[3], Fatemeh Zandi[4], Somayeh Enayati[4], Behrouz Vaziri[2*]

1- Ph.D. Candidate, Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2- Associated Professor, Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3- Ph.D., Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4- M.Sc., Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1316943551, Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
Email: behrouz-vaziri@pasteur.ac.ir

Received: 05/Jan/2014, Accepted: 02/Feb/2014

Abstract

Objective: The study of physiological changes in recombinant cell lines provides useful information to improve production performance. In this study, we investigate the effects of an anti-CD33 chimeric IgG_4 expression on Sp2.0 cell growth.

Methods: Variable region genes of light and heavy chains of monoclonal antibody produced by M195 were cloned in pFUSE-CLIg-hk and pFUSE-CHIg-hG4 expression vectors, respectively. Transfection of recombinant plasmids into Sp2.0 cell lines was performed using lipofectamine in two steps. Positive transformant cells were isolated and subjected to PCR, RT-PCR and Western blot analysis to confirm the integration of gene cassettes and the expression of recombinant IgG_4.

To assess the growth parameters, recombinant and parent Sp2.0 cell lines were seeded at a density of 1×10^5 cells/ml in duplicate into 12-well plates. For nine days, culture plates were sampled daily and viable cell count and viability determined.

Results: The results of PCR, RT-PCR and Western blot analyses confirmed the generation of stable producer cell lines. In recombinant cells, the maximum cell density decreased by 46%. However, it was observed that IgG_4 expression had no effect on cell viability of these transfectants.

Conclusion: Our results showed that the expression of recombinant IgG_4 can change growth parameters in Sp2.0 cell lines that express the pFUSE-CHIg-hG4-pFUSE-CLIg-hk construct.

Keywords: Monoclonal antibody, IgG_4, Sp2.0 cell line, Maximum cell density

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 4, Winter 2014, Pages: 27-37

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

مقاله اصیل

تأثیر بیان پایدار IgG_4 نوترکیب بر رشد سلول‌های Sp2.0

هدی جهاندار[1]، وحید خلج[2]، لیلا نعمت‌الهی[3]، فاطمه زندی[4]، سمیه عنایتی[4]، بهروز وزیری[2*]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی
Email: behrouz-vaziri@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۲/۱۰/۱۵ پذیرش مقاله: ۹۲/۱۱/۱۳

چکیده

هدف: مطالعه تغییرات فیزیولوژیک سلول‌های نوترکیب در مقایسه با سلول‌های والد، اطلاعات مفیدی برای بهبود کارآیی فرایند تولید فراهم می‌نماید. در این مطالعه تأثیر بیان IgG_4 کایمریک علیه نشانگر CD33 بر رشد سلول Sp2.0 بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: ژن‌های نواحی متغیر زنجیره‌های سبک و سنگین آنتی‌بادی تولید شده توسط سلول M195 به ترتیب در ناقل‌های pFUSE-CLIg-hk و pFUSE-CHIg-hG4 همسانه‌سازی شد. پلاسمیدهای نوترکیب در دو مرحله با استفاده از لیپوفکتامین به سلول‌های Sp2.0 منتقل شد. سلول‌های پایدار در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک‌های بلاستیسیدین و زئوسین انتخاب شدند. الحاق سازه نوترکیب به ژنوم سلول‌های تراریخت مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین بیان IgG_4 با استفاده از روش‌های PCR، RT-PCR و وسترن بلات بررسی شد. برای مطالعه پارامترهای کینتیکی، سلول‌های والد و نوترکیب با چگالی 1×10^5 سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت در پلیت ۱۲ خانه به مدت ۹ روز انکوبه شدند و هر ۲٤ ساعت از سلول‌ها نمونه‌برداری شد و شمارش تعداد سلول زنده و محاسبه درصد زنده بودن انجام گرفت.

نتایج: بر اساس نتایج PCR، RT-PCR و وسترن بلات، ایجاد سلول تولید کننده پایدار IgG_4 تأیید شد. این مطالعه نشان داد که حداکثر چگالی سلولی برای سلول‌های نوترکیب در مقایسه با سلول‌های والد ٤٦ درصد کاهش یافته است در حالی که در این نمونه‌ها درصد سلول‌های زنده تغییری نکرده است.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این تحقیق بیان IgG_4 کایمریک در سیستم Sp2.0/pFUSE-CHIg-hG4-pFUSE-CLIg-hk باعث تغییر برخی از پارامترهای رشدی سلول میزبان می‌شود.

کلیدواژگان: آنتی‌بادی تک دودمانی، IgG_4، سلول Sp2.0، حداکثر چگالی سلولی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، صفحات: ۲۷-۳۷

مقدمه

طی سال‌های اخیر تعداد پروتئین‌های نوترکیب دارویی تولید شده توسط سلول‌های جانوری و همچنین تقاضای بازار برای آن‌ها روز به روز در حال افزایش است. از سوی دیگر؛ پیشرفت‌های چشمگیری در این زمینه به‌وجود آمده است. از

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

جمله این موارد می‌توان به توسعه ناقل‌های مناسب، سلول‌های میزبان و فناوری کشت سلولی اشاره نمود. این در حالیست که جنبه‌های دیگری نظیر شناخت کامل فیزیولوژی سلول‌های مولد، به مطالعات بیشتری نیاز دارد [۱، ۲]. تولید پروتئین نوترکیب می‌تواند تأثیرات متفاوتی بر سرعت رشد و تکثیر سلول داشته باشد [۳]. شناخت ویژگی‌های کینتیکی سلول و تأمین شرایط مورد نیاز برای بهینه‌سازی تعداد سلول‌های زنده، به عنوان رویکردی مؤثر در راستای حداکثر نمودن بازده تولید پروتئین‌های نوترکیب در نظر گرفته می‌شود [٤، ٥]. مطابق نتایج مطالعات گذشته پارامترهای کینتیکی سلول‌ها بعد از دریافت و بیان ژن پروتئین نوترکیب دستخوش تغییر می‌شود. چند سال پس از تولید نخستین پروتئین دارویی نوترکیب در اشریشیا کولی (*Escherichia coli*) مشخص شد که باکتری‌ها و مخمرهای نوترکیب برای حفظ نسخه‌های متعدد ژن و بیان مقادیر انبوه پروتئین خارجی، مجبور به صرف اشکال ذخیره‌ای انرژی مانند ATP و GTP و همچنین تولید اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدها مورد نیاز در سنتز انواع RNA و پروتئین‌ها و در نتیجه متحمل بار متابولیک هستند [٦]؛ بنابراین در مقایسه با سلول‌های والد زمان دو برابر شدن طولانی‌تر، سرعت رشد و حداکثر چگالی سلولی کمتری دارند. در مورد میزبان‌های یوکاریوتی و به خصوص سلول‌های جانوری نتایج مشابه در تعداد محدودتری مطالعه حاصل شده است. در چند بررسی، افزایش تعداد نسخه‌های سازه ژنی نوترکیب (Amplification) منجر به کاهش سرعت رشد سلول‌های CHO (Chinese Hamster Ovary) شد. در حالی که سلول‌های نوترکیب که تعداد نسخه‌های ژن خارجی در آن‌ها افزایش نیافته بود سرعت رشدی مشابه با سلول‌های فاقد ژن داشتند [٦-٨]. به نظر می‌رسد برخی سلول‌ها و حتی کلون‌های مختلف یک سلول، در تحمل این بار متابولیک تواناتر هستند؛ بنابراین به میزان کمتری دچار تغییر خصوصیات کینتیکی خواهند شد. با وجود اهمیت موضوع، داده کافی و جامع در مورد سلول‌های جانوری در دسترس نیست [۸].

آنتی‌بادی‌های تک دودمانی در درمان بیماری‌هایی چون سرطان، اختلالات خودایمنی، آلرژی و بیماری‌های عفونی کاربرد دارد [۹]. افزایش تعداد آنتی‌بادی‌هایی که در مراحل مطالعه بالینی است یا برای مصرف دارویی مورد تأیید قرار گرفته‌است، منجر به شکل‌گیری تلاش گسترده برای بهبود میزان تولید آن‌ها شده است [٥]. در بسیاری از موارد پیشرفت فناوری کشت سلول‌های جانوری تأثیر به‌سزایی در بهینه‌سازی بیان پروتئین‌های نوترکیب از جمله آنتی‌بادی‌ها داشته است [۹، ۱۰]. پرکاربردترین رده‌های سلولی جانوری که برای تولید آنتی‌بادی‌های تک دودمانی در مقیاس صنعتی استفاده می‌شوند شامل سلول‌های هامستر چینی (CHO)، سلول‌های میلومای موشی (Sp2.0، NSO) و سلول‌های هیبریدوما (Hybridoma) هستند [۱۱]. از آن‌جایی که سلول‌های میلومایی متخصص بیان آنتی‌بادی هستند، رده‌های سلولی Sp2.0 و NSO، میزبان‌های مناسب برای تولید آنتی‌بادی‌های تک دودمانی به شمار می‌روند [۱۲]. در این میان ۲۵ درصد آنتی‌بادی‌های تک دودمانی موجود در بازار ایالات متحده آمریکا و اتحادیه اروپا در سلول Sp2.0 تولید شده است [۱۳].

هدف این مطالعه ایجاد سلول‌های Sp2.0 نوترکیب تولید کننده IgG_4 کایمریک بر علیه نشانگر CD33، بررسی پارامترهای کینتیکی سلول‌های مذکور و مقایسه آن با سلول‌های والد است. نتایج این تحقیق می‌تواند در ایجاد سلول‌های جانوری نوترکیب برای بیان انواع پروتئین‌های دارویی به‌کار گرفته شود.

مواد و روش‌ها

کشت رده سلولی

رده سلولی Sp2.0-Ag14 (ATCC-CRL-1581) در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی غیر فعال شده با حرارت (Invitrogen، آمریکا)، در انکوباتور حاوی ٥ درصد دی اکسید کربن، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۸۵ درصد رطوبت کشت داده شد. سلول‌ها با فواصل ۲-۳ روز با چگالی $۲/۵\times۱۰^{٥}$ سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت پاساژ

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

داده شدند. شمارش سلولی با روش تریپان بلو (Trypan Blue) با استفاده از لام نئوبار انجام شد.

تهیه سازه‌های ژنی

توالی ژن کد کننده ناحیه متغیر زنجیره سبک [GenBank: M83099.1] و سنگین [GenBank: M83098.1] آنتی‌بادی علیه نشانگر CD33 که توسط کلون M195 ساخته می‌شود، در پایگاه‌های اطلاعاتی موجود است. بر این اساس توالی ژنی، شامل ناحیه متغیر زنجیره سبک (VL) و سنگین (VH) و جایگاه‌های برش آنزیم‌های مورد نظر، طراحی و ساخته شد (Gene Ray، چین). در این تحقیق از ناقل بیانی pFUSE-CLIg-hk و pFUSE-CHIg-hG4 (Invivogen، آمریکا) استفاده شد. این ناقل‌ها به ترتیب حاوی ژن رمز کننده ناحیه ثابت زنجیره سبک کاپا و زنجیره سنگین IgG_4 انسانی و به ترتیب دارای نشانگرهای بلاستیسیدین (Blasticidin) و زئوسین (Zeocin) است. هر دو ناقل شامل پروموتورهای زنجیره سبک فریتین انسانی (human Ferritin Light Chain: hFerL) برای نشانگر انتخابی و فاکتور طویل کننده انسانی ۱- ویروس HTLV. (human Elongation Factor 1α-Human T-Cell Leukemia Virus: hEF1-HTLV) برای آنتی‌بادی است. به منظور کلون کردن ژن‌ها در ناقل‌های بیانی متناظر، پلاسمید pFUSE-CHIg-hG4 و ژن VH توسط آنزیم‌های NheI/EcoRI (Fermentas، آمریکا) و ژن VL و ناقل pFUSE-CLIg-hk با آنزیم‌های *Bsi*WI/*Nco*I (Fermentas، آمریکا) بریده شد. تشکیل پلاسمیدهای نوترکیب pFUSE-CHIg-hG4-VH و pFUSE-CLIg-hk-VL با روش هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شد.

دامنه حساسیت سلول‌های Sp2.0 به نشانگرهای انتخابی

از آن‌جایی که نشانگرهای انتخابی طراحی شده در ناقل‌های بیانی مورد استفاده در این مطالعه ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های زئوسین و بلاستیسیدین است، ضروری است دامنه حساسیت سلول‌های Sp2.0 به این آنتی‌بیوتیک‌ها تعیین شود. بدین منظور تعداد $۲/۵\times۱۰^{۵}$ سلول در هر میلی‌لیتر در چاهک‌های پلیت ۱۲ خانه ریخته شد. به هر یک از چاهک‌ها به ترتیب میزان ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰، ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک زئوسین (Invitrogen، آمریکا) اضافه شد. کشت در حضور آنتی‌بیوتیک به مدت ۱۴ روز ادامه داشت. در مورد بلاستیسیدین هم به همین ترتیب، تأثیر غلظت‌های ۳، ۲، ۱، ۰/۷۵، ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۱۴ روز بررسی شد. سپس برای تعیین دامنه حساسیت سلول‌ها در حضور دو آنتی‌بیوتیک، غلظت‌های ۱۰۰/ ۰/۵، ۵۰/ ۰/۷۵، ۵۰/ ۰/۵، ۵۰/ ۰/۲۵، ۰ از زئوسین/ بلاستیسیدین به مدت ۱۴ روز مطالعه شد. در هر سه مطالعه، نمونه‌برداری با فواصل ۲-۳ روز انجام شد. شمارش تعداد سلول‌های زنده با روش تریپان بلو با استفاده از لام نئوبار انجام شد. برای هر غلظت آنتی‌بیوتیک دو نمونه در نظر گرفته شد.

ترانسفکشن و ایجاد سلول‌های Sp2.0 نوترکیب

برای افزایش احتمال ایجاد رده سلولی پایدار، پلاسمید نوترکیب pFUSE-CLIg-hk-VL حاوی ژن زنجیره سبک توسط آنزیم NotI (Fermentas، آمریکا) خطی شد. ترانسفکشن با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen، آمریکا) و مطابق روش پیشنهادی توسط شرکت سازنده انجام شد. پس از ۴۸ ساعت سلول‌ها رقیق شده و با چگالی $۲/۵\times۱۰^{۵}$ سلول در میلی‌لیتر در محیط انتخابی حاوی بلاستیسیدین قرار گرفتند. پس از ۴ هفته سلول‌های پایدار به‌دست آمده با پلاسمید خطی شده pFUSE-CHIg-hG4-VH ترانسفکت شدند. سلول‌های حاوی هر دو ژن زنجیره سبک و سنگین در حضور آنتی‌بیوتیک‌های زئوسین و بلاستیسیدین انتخاب شدند. در هر دو مرحله سلول‌های ترانسفکت نشده نیز به عنوان کنترل منفی در معرض آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

به منظور تأیید ورود ناقل‌های نوترکیب به ژنوم سلول‌های پایدار شده، با استفاده از کیت استخراج DNA (High Pure PCR Template Preparation Kit) (Roche Diagnostics GmbH، آلمان) DNA ژنومی تخلیص شد و PCR برای تکثیر ژن‌های ناحیه متغیر زنجیره سبک و سنگین انجام شد. توالی آغازگرهای (Primers) مورد استفاده برای ناحیه متغیر زنجیره سنگین:

5'-TTGAGAGTAGATGGTTTGAGCCTGAG-3' (رفت)

و 5'-GTGCTAGCTGAGGAGACGGTG-3' (برگشت)

و برای ناحیه متغیر زنجیره سبک:

5'-TTGAGAGTAGATGGTTTGAGCCTGAG-3' (رفت)

و 5'-CCACCGTACGTTTGATTTCCAG-3' (برگشت) بود.

برای محصولات زنجیره سبک و سنگین به ترتیب اندازه‌های ٤٢٠ و ٤٢٥ جفت باز پیش‌بینی شده بود. مشابه همین مراحل روی سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی انجام شد. برای بررسی بیان، mRNA سلول‌های پایدار با استفاده از RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen، آمریکا) استخراج و با cDNA synthesis with RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas، آمریکا) به cDNA تبدیل شد. سپس با استفاده از آغازگرهای بیان شده، PCR انجام شد. مشابه همین مراحل روی سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی انجام شد. برای بررسی بیان پروتئین، وسترن بلات در شرایط احیا و غیر احیا انجام شد. در شرایط غیر احیا، محیط کشت سلول‌های پایدار ۲/۵ برابر غلیظ شد. پروتئین‌های موجود در محیط کشت روی ژل پلی آکریلامید ۸ درصد الکتروفورز شد. تجزیه و تحلیل وسترن بلاتی با انتقال پروتئین‌ها از ژل روی غشای نیتروسلولزی به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ۱۸ ولت صورت گرفت. به منظور ردیابی IgG_4، غشا به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق با ۲/۵ درصد شیر خشک بدون چربی- بافر نمکی تریس- ۰/۰۵درصد توین۲۰ بلوکه شد. سپس غشا با رقت ۱:۱۵۰۰ از آنتی‌بادی مرغی متصل به HRP (Horseradish Peroxidase) ضد آنتی‌بادی انسانی (HRP Gallus) (Conjugated Chicken Anti-Human IgG Immunotech، آمریکا) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس بلات‌ها شستشو و با استفاده از معرف‌های آشکارسازی ECL (Enhanced Chemiluminescence) (GE Healthcare، آمریکا) و دستگاه ردیاب ECL بر طبق دستور شرکت سازنده بررسی شد. مشابه همین مراحل روی سوپ سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی انجام شد. در شرایط احیا باندهای مورد انتظار ۲۵ و ۵۰ کیلودالتون است که باند ۵۰ کیلودالتون به دلیل همپوشانی با آلبومین در ژل رنگ‌آمیزی شده پلی آکریلامید مشخص نبود؛ بنابراین ابتدا آنتی‌بادی تخلیص و سپس تجزیه و تحلیل شد. برای تخلیص آنتی‌بادی تولید شده، محیط کشت سلول‌های Sp2.0 نوترکیب از ستون Goat anti human IgG-Agarose (Sigma، آمریکا) و بر اساس روش پیشنهادی سازنده استفاه شد. آنتی‌بادی خالص به‌دست آمده با استفاده از روش وسترن بلات در شرایط احیا شناسایی شد. بدین منظور نمونه روی ژل ۱۲ درصد پلی آکریلامید الکتروفورز و سپس با ولتاژ ۱۲ ولت به مدت ٤٥ دقیقه به غشای نیتروسلولزی منتقل شد. مراحل بعدی مشابه شرایط غیراحیا بود.

مطالعه پارامترهای رشد در سلول‌های پایدار

به منظور مقایسه پارامترهای کینتیکی، سلول‌های پایدار شده و والد با چگالی 1×10^5 در هر میلی‌لیتر در پلیت‌های ۱۲ خانه کشت داده شدند. به مدت ۹ روز از سلول‌ها نمونه‌برداری و تعداد سلول‌های زنده با روش تریپان بلو و با استفاده از لام نئوبار شمارش و همچنین درصد سلول‌های زنده محاسبه شد. بر اساس این داده‌ها حداکثر چگالی سلول‌های زنده مشخص شد. آزمایش‌ها دو بار تکرار شد.

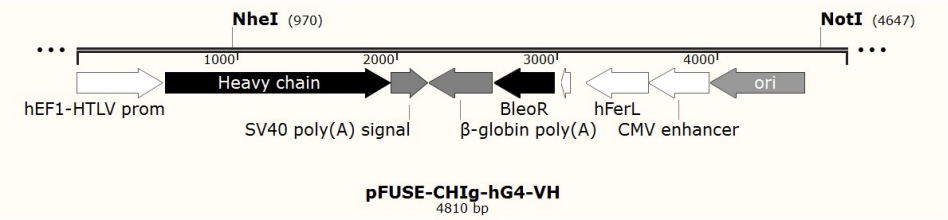
نتایج

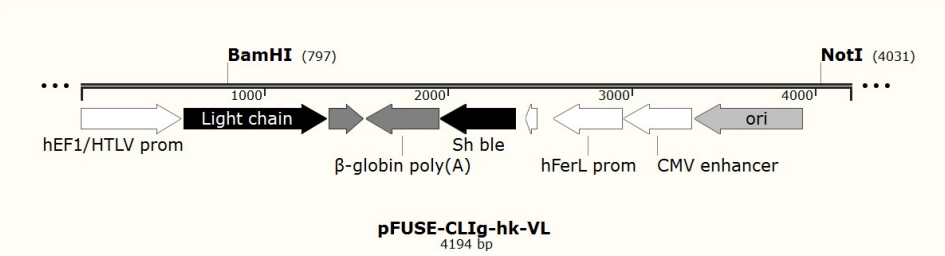
ساخت پلاسمیدهای نوترکیب

قطعات ژنی VL و VH به درستی به ترتیب در ناقل‌های pFUSE-CLIg-hk و pFUSE-CHIg-hG4 متصل به نواحی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

ثابت آنتی‌بادی قرار گرفت. هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pFUSE-CLIg-hk-VL و pFUSE-CHIg-hG4-VH و تعیین توالی آن‌ها، تأیید کننده درستی ساختار این سازه‌ها بود. در شکل ۱ نقشه پلاسمیدهای نوترکیب حاصل نشان داده شده است.





شکل ۱ نمای شماتیک ناقل‌های بیانی مورد استفاده برای تولید IgG_4 کایمریک علیه نشانگر CD33؛ پلاسمیدهای نوترکیب pFUSE-CHIg-hG4-VH و pFUSE-CLIg-hk-VL به ترتیب ژن‌های زنجیره سنگین و سبک آنتی‌بادی را کد می‌کنند.

تعیین غلظت مناسب آنتی‌بیوتیک‌های زئوسین و بلاستیسیدین برای انتخاب سلول‌های Sp2.0 نوترکیب

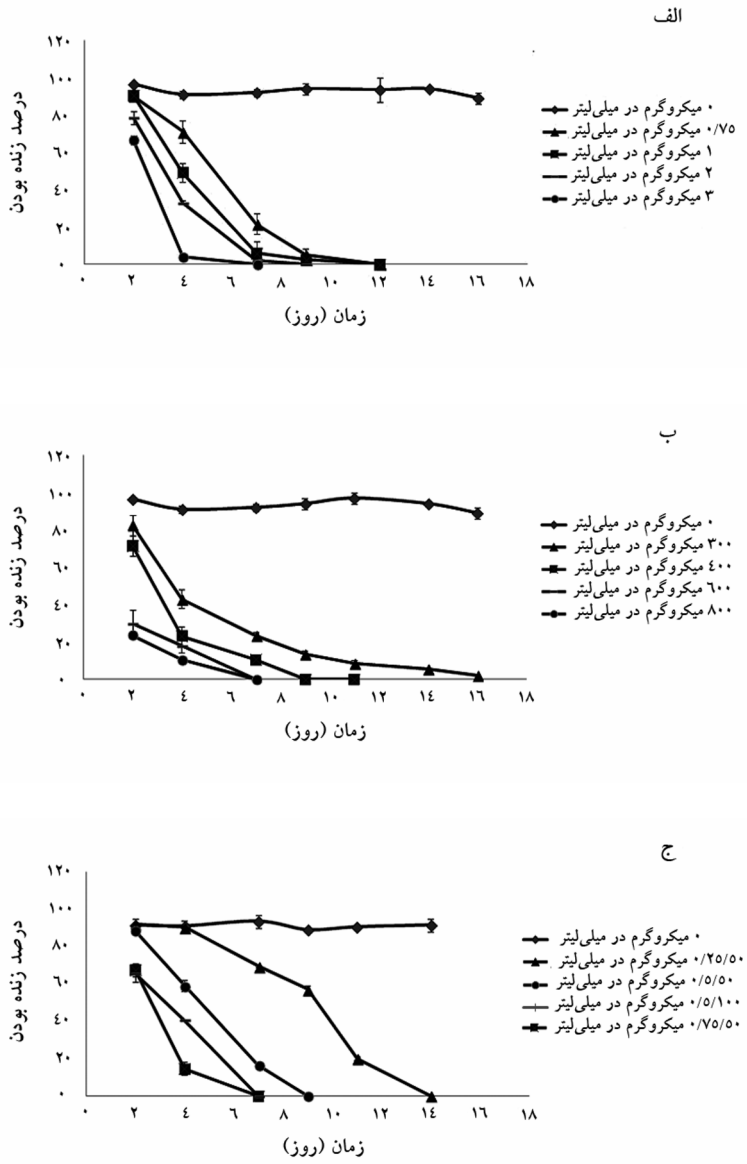
به‌کارگیری غلظت مناسب از نشانگر انتخابی اهمیت به سزایی در بهبود کارآیی فرآیند انتخاب سلول‌های حاوی پلاسمید نوترکیب دارد. با توجه به دو مرحله‌ای بودن ترانسفکشن و انتخاب سلول‌ها، دامنه حساسیت سلول‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های زئوسین و بلاستیسیدین به تنهایی و با هم تعیین شد. شکل ۲ نشان دهنده نمودار کشندگی سلول‌ها در حضور بلاستیسیدین (الف)، زئوسین (ب) و زئوسین-بلاستیسیدین است. غلظت‌های ۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر برای بلاستیسیدین و ۵۰/۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر برای بلاستیسیدین/زئوسین در محیط‌های انتخابی استفاده شد.

ایجاد سلول‌های پایدار تولید کننده آنتی‌بادی

همان‌گونه که در بخش مواد و روش‌ها گفته شد، سلول‌های Sp2.0 پس از دو مرحله ترانسفکشن و انتخاب برای تأیید ورود ناقل نوترکیب در ژنوم بررسی شدند. نتیجه تکثیر ژن ناحیه متغیر زنجیره سبک و سنگین آنتی‌بادی از ژنوم سلول‌های پایدار با روش PCR، در شکل ۳ (الف) نشان داده شده است. قطعات تکثیر شده دارای اندازه پیش‌بینی شده ۴۲۰ و ۴۲۵ جفت باز به ترتیب برای زنجیره سبک و سنگین است که حضور سازه نوترکیب را در ژنوم سلول‌های پایدار تأیید می‌نماید. در مرحله بعد بیان در سطح mRNA و پروتئین تأیید شد. از mRNA سلول‌های پایدار با روش RT-PCR، قطعات ۴۲۰ جفت باز مربوط به ناحیه متغیر زنجیره سبک و ۴۲۵ جفت باز برای ناحیه متغیر زنجیره سنگین تکثیر شد در حالی‌که از نمونه mRNA سلول‌های ترانسفکت نشده با آغازگرهای ذکر

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

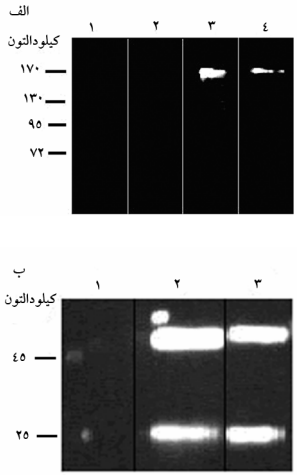
شده قطعه ژنی تکثیر نشد (شکل ۳ ب). شکل ٤ نشان دهنده نتایج تجزیه و تحلیل وسترن بلات است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود با ظهور باند ۱۵۰ کیلودالتون در شرایط غیر احیا (الف) و باندهای ۲۵ و ۵۰ کیلودالتون در شرایط احیا، بیان و ترشح آنتی‌بادی به شکل چهار زنجیره‌ای در محیط کشت سلول‌های Sp2.0 نوترکیب اثبات می‌شود.



شکل ۲ تعیین غلظت مؤثر شاخص‌های انتخابی؛ سلول‌های Sp2.0 در معرض غلظت‌های متفاوت بلاستیسیدین (الف)، زئوسین (ب) و بلاستیسیدین/ زئوسین (ج) قرار گرفتند. هر ۲ تا ۳ روز سلول‌ها شمارش و محیط انتخابی تعویض شد. کمترین غلظت زئوسین، بلاستیسیدین و بلاستیسیدین/ زئوسین که طی ۱ تا ۲ هفته اکثر سلول‌ها را از بین برد به ترتیب ۳۰۰، ۰/۷۵، ۰/۲۵/ ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر انتخاب شد. نتایج نشان داده شده میانگین دو اندازه‌گیری مستقل است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

شکل ۳ الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR روی DNA ژنومی (الف) و RT-PCR روی mRNA (ب) استخراج شده از سلول‌های Sp2.0 پایدار و ترانسفکت نشده؛ اندازه پیش‌بینی شده قطعات حاصل ٤۲۰ و ٤۲۵ جفت باز به ترتیب برای ناحیه متغیر زنجیره سبک و سنگین است. (الف) ستون ۱ نشانگرDNA، ستون ۲ تکثیر ناحیه متغیر زنجیره سنگین از پلاسمید نوترکیب pFUSE-CHIg-hG4-VH (کنترل مثبت)، ستون ۳ تکثیر ناحیه متغیر زنجیره سبک از DNA ژنومی سلول پایدار، ستون ٤ تکثیر ناحیه متغیر زنجیره سنگین از DNA ژنومی سلول پایدار، ستون ٥ DNA ژنومی سلول ترانسفکت نشده با آغازگر ناحیه متغیر زنجیره سنگین، ستون ٦ DNA ژنومی سلول ترانسفکت نشده با آغازگر ناحیه متغیر زنجیره سبک، (ب) ستون ۱ نشانگرDNA، ستون ۲ تکثیر ناحیه متغیر زنجیره سنگین از پلاسمید نوترکیب pFUSE-CHIg-hG4-VH (کنترل مثبت)، ستون ۳ تکثیر ناحیه متغیر زنجیره سبک از mRNA سلول پایدار، ستون ٤ تکثیر ناحیه متغیر زنجیره سنگین از mRNA سلول پایدار، ستون ٥ mRNA سلول ترانسفکت نشده با آغازگر ناحیه متغیر زنجیره سنگین و ستون ٦ mRNA سلول ترانسفکت نشده با آغازگر ناحیه متغیر زنجیره سبک



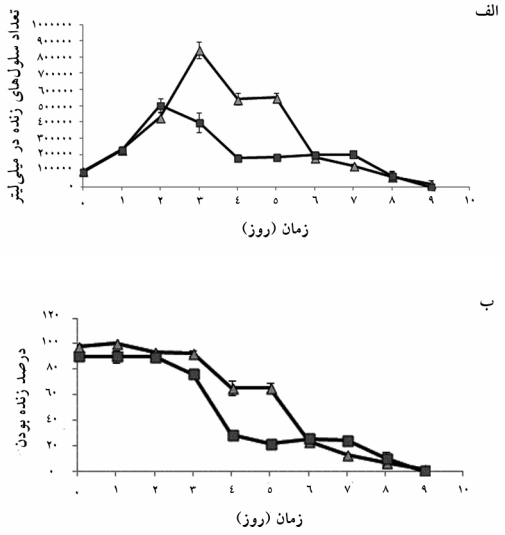
شکل ٤ وسترن بلاتینگ آنتی‌بادی بیان شده؛ در شرایط غیر احیا (الف)، جداسازی اجزای محیط کشت تغلیظ شده سلول‌های Sp2.0 پایدار و ترانسفکت نشده روی ژل ۸ درصد انجام شد و در شرایط احیا (ب) IgG_4 تخلیص شده روی ژل ۱۲ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. باندها با استفاده از HRP-conjugated chicken Anti-Human IgG و کیت ECL مشخص شد. (الف) ستون ۱ شناساگر پروتئین، ستون ۲ محیط کشت سلول‌های ترانسفکت نشده، ستون ۳ محیط کشت سلول‌های پایدار، ستون ٤ آنتی‌بادی تخلیص شده انسانی (کنترل مثبت). (ب) ستون۱ شناساگر پروتئین، ستون ۲ IgG_4 نوترکیب تخلیص شده، ستون ۳ آنتی‌بادی تخلیص شده انسانی (کنترل مثبت)

بررسی تأثیر بیان آنتی‌بادی کایمریک بر رشد سلول‌های نوترکیب

از آن‌جایی که بیان آنتی‌بادی و نشانگر انتخابی برای سلول‌های نوترکیب بار متابولیکی محسوب می‌شود، می‌توان انتظار داشت که برخی از پارامترهای کینتیکی سلول‌های نوترکیب در مقایسه با سلول‌های والد دستخوش تغییراتی شود. برای بررسی تأثیر بیان پروتئین‌های خارجی بر رشد سلول‌های Sp2.0 نوترکیب در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت نشده، تعداد ۱×۱۰^{۵} سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت، به مدت ۹ روز انکوبه شدند. شکل ٥ الگوی رشد سلول و درصد سلول‌های زنده را طی مدت کشت نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود رشد سلول‌های نوترکیب کاهش یافته است. حداکثر چگالی سلول‌های زنده در سلول‌های والد $۸/٤ \pm ۷۱ \times ۱۰^{۵}$ سلول در میلی‌لیتر محیط کشت است که در سلول‌های نوترکیب تا $٤/٥\pm۰/۰۸\times۱۰^{۵}$ کاهش یافته است (شکل ٥ الف). بر اساس داده‌های شکل ٥ (ب) از آن‌جایی که درصد زنده بودن سلول‌های نوترکیب در روز ۲ حدود ۹۰ است، می‌توان

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

نتیجه گرفت که این کاهش چگالی احتمالاً به دلیل افزایش مرگ یا لیز سلولی نیست. به علاوه روند مرگ سلول‌های دو گروه تفاوت قابل توجهی را نشان نمی‌دهد؛ بنابراین این گونه به نظر می‌رسد که بیان پروتئین نوترکیب موجب تسریع مرگ سلول‌ها نشده است.



شکل ۵ بررسی تأثیر بیان IgG_4 کایمریک بر رشد (الف) و درصد سلول‌های زنده (ب) Sp2.0 نوترکیب؛ رده سلولی ترانسفکت نشده به عنوان کنترل استفاده شد (▲ سلول Sp2.0 ترانسفکت نشده، ■ سلول Sp2.0 نوترکیب). سلول‌ها با چگالی 1×10^5 سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت در پلیت ۱۲ خانه کشت شدند و به مدت ۹ روز، شمارش سلول‌های زنده با روش تریپان بلو و با استفاده از لام نئوبار انجام شد. نتایج نشان داده شده میانگین دو اندازه‌گیری مستقل است.

بحث

با توجه به اهمیت آنتی‌بادی‌های تک دودمانی در درمان و تشخیص بیماری‌ها و در نتیجه افزایش تقاضای بازار، بهبود بازده تولید این پروتئین‌ها هدف بسیاری از مطالعات قرار گرفته است [۱٤]. در بسیاری از موارد این مهم از طریق روش‌های کشت سلولی ممکن شده است. شناخت تأثیر بیان ژن نوترکیب بر رشد و فیزیولوژی سلول از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و با دسترسی به خصوصیات کینتیکی سلول‌های تولید کننده آنتی‌بادی‌ها طراحی و کنترل فرآیند تولید تسهیل خواهد شد [۱۵]. در مطالعات گذشته نشان داده شده است که در سلول‌های میزبان پروکاریوتی با افزایش سطح بیان پروتئین خارجی یا اندازه ناقل‌های ژنی و در نتیجه تحمیل بار متابولیکی، پارامترهای کینتیکی دچار تغییر می‌شود [٦–۸، ۱٦]. به عنوان مثال در یک مطالعه تأثیر چهار پلاسمید از خانواده pUC8 با اندازه‌های متفاوت، بر پارامترهای رشدی سلول اشریشیا کلی بررسی شد. نتایج نشان دادد که اگرچه سرعت رشد همه میزبان‌ها مشابه است ولی با افزایش اندازه ناقل، حداکثر چگالی سلولی کاهش می‌یابد. همچنین مرگ سلول‌ها پس از رسیدن سلول‌ها به فاز سکون تسریع می‌شود [٦]. همچنین در مطالعه دیگری افزایش بیان پروتئین نوترکیب منجر به کاهش درصد سلول‌های زنده و سرعت رشد شد [۱۷]. مشابه همین وضعیت در سلول‌های جانوری هم گزارش شده است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای نشان داده شد که سرعت رشد سلول CHO تولید کننده همزمان آنتی‌بادی کایمریک و ژن دی هیدروفولات ردوکتاز (Dihydrofolate Reductase: DHFR)، در حضور غلظت‌های بالای متوتروکسات (Methotrexate) و در نتیجه تکثیر ژن خارجی (Amplification) ٤۰–٤٥ درصد کاهش یافت [۱۸]. در سلول‌های CHO تولید کننده آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HbsAg) و همچنین ژن lacZ، در شرایط مشابه به ترتیب تا ٦۳/٥ و ٦۲ درصد کاهش سرعت رشد گزارش شده است [۱۹، ۲۰]. در حال حاضر مطالعات کافی برای مشخص شدن ارتباط بین فیزیولوژی سلول و تعداد نسخه‌های ژن، پایداری ژن و میزان بیان برای سیستم‌های مختلف ناقل/ میزبان در دست نیست اما به نظر می‌رسد نتایج هر سیستم کاملاً اختصاصی باشد [۲۱]. از سوی دیگر؛ برخلاف باکتری‌ها در برخی از سلول‌های جانوری می‌توان واکنش سلول به بار متابولیک را با بهینه‌سازی محیط کشت تعدیل یا برطرف نمود. به عنوان مثال در سویه‌ای از سلول CHO، مشکل کاهش حداکثر چگالی سلولی با افزایش غلظت گلوتامین در محیط کشت مرتفع شد در حالی که افزودن انسولین برای بهبود

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

سرعت رشد سلول‌ها مؤثر بود. البته چنین به نظر می‌رسد که چنین پاسخ‌هایی بسته به نوع سلول متفاوت باشد که این امر اهمیت انتخاب رده سلولی مناسب برای تولید پروتئین نوترکیب را نشان می‌دهد [۸].

با وجود اهمیت سلول Sp2.0 در تولید آنتی‌بادی، تاکنون در مورد این سلول مطالعه مشابهی انجام نشده است. در این تحقیق سلول‌های Sp2.0 با ناقل‌های حاوی پروموتور زنجیره سبک فریتین انسانی (hFerL) برای نشانگر انتخابی و عامل طویل کننده انسانی ۱- ویروس HTLV (hEF1-HTLV) برای ژن آنتی‌بادی کایمریک، ترانسفکت شدند. ورود ژن به داخل کروموزوم سلول و بیان IgG_4 کایمریک تأیید شد. سپس تعدادی از عوامل رشدی از قبیل تعداد سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده تعیین و سپس حداکثر چگالی سلولی برای سلول‌های پایدار محاسبه و با سلول‌های والد مقایسه شد. نتایج نشان دهنده کاهش حداکثر چگالی سلول‌های نوترکیب بود، در حالی که افزایش تعداد نسخه‌های ژنی و بیان بالای پروتئین خارجی در مورد این سلول‌ها صادق نیست. از سوی دیگر؛ اگرچه بار تحمیل شده باعث کاهش رشد شده است اما در روند مرگ سلول‌ها تغییری ایجاد نشده است؛ بنابراین بیان IgG4 نوترکیب در سیستم Sp2.0/pFUSE-CHIg-hG4-pFUSE-CLIg-hk باعث تغییر برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی سلول میزبان می‌شود.

به‌طور خلاصه در این مطالعه نشان داده شد که تکثیر سلول‌های Sp2.0 نوترکیب تحت تأثیر بیان پروتئین خارجی قرار گرفته و حداکثر چگالی اشباع سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت نشده کاهش یافته است. تأیید ارتباط اثر مشاهده شده با متابولیسم سلولی منوط به انجام مطالعات مسیرهای اصلی متابولیک است. همچنین بهینه‌سازی محیط کشت برای برطرف نمودن کاهش چگالی سلولی پیشنهاد می‌شود. در صورت انجام بررسی‌های تکمیلی، نتایج این تحقیق می‌تواند در بهبود کارآیی فرآیند تولید پروتئین‌های نوترکیب مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران انجام شد.

منابع

[1] Butler M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 68(3): 283-91.

[2] Barnes LM, Dickson AJ. Mammalian cell factories for efficient and stable protein expression. Curr Opin Biotechnol 2006; 17(4): 381-6.

[3] Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. Methods Mol Biol 2004; 267: 15-52.

[4] Kaufmann H, Mazur X, Fussenegger M, Bailey JE. Influence of Low Temperature on Productivity, Proteome and Protein Phosphorylation of CHO Cells. Biotechnol Bioeng 1999, 63: 573-82.

[5] Dinnis DM, James DC. Engineering mammalian cell factories for improved recombinant monoclonal antibody production: lessons from nature? Biotechnol Bioeng 2005; 91(2): 180-9.

[6] Glick BR. Metabolic load and heterologous gene expression. Biotechnol Adv 1995; 13(2): 247-61.

[7] Yallop CA, Nørby PL, Jensen R, Reinbach H, Svendsen I. Characterisation of G418-induced metabolic load in recombinant CHO and BHK cells: effect on the activity and expression of

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]

central metabolic enzymes. Cytotechnology 2003; 42(2): 87-99.

[8] Yallop CA, Svendsen I. The effects of G418 on the growth and metabolism of recombinant mammalian cell lines. Cytotechnology 2001; 35(2): 101-14.

[9] Rita Costa A, Elisa Rodrigues M, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. Eur J Pharm Biopharm 2010; 74(2): 127-38.

[10] Birch JR, Racher AJ. Antibody production. Adv Drug Deliv Rev 2006; 58(5-6): 671-85.

[11] Chu L, Blumentals I, Maheshwari G. Production of recombinant therapeutic proteins by mammalian cells in suspension culture. In: Smales CM, James DC (Editors). Therapeutic Proteins Methods in Molecular Biology™. Totowa: Humana Press Inc, 2005; p: 107-21.

[12] Deyev SM, Lieber A, Radko BV, Polanovsky OL. Production of recombinant antibodies in lymphoid and non-lymphoid cells. FEBS Lett 1993; 330(2): 111-3.

[13] Beck A, Reichert JM. Marketing approval of mogamulizumab: a triumph for glyco-engineering. MAbs 2012; 4(4): 419-25.

[14] Reichert JM. Antibodies to watch in 2010. MAbs 2010; 2(1): 84-100.

[15] Suzuki E, Ollis DF. Enhanced antibody production at slowed growth rates: experimental demonstration and a simple structured model. Biotechnol Prog 1990; 6(3): 231-6.

[16] Bentley WE, Mirjalili N, Andersen DC, Davis RH, Kompala DS. Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. Biotechnol Bioeng 1990; 35(7): 668-81.

[17] Betenbaugh MJ, Beaty C, Dhurjati P. Effects of plasmid amplification and recombinant gene expression on the growth kinetics of recombinant *E. coli*. Biotechnol Bioeng 1989; 33(11): 1425-36.

[18] Kim SJ, Kim NS, Ryu CJ, Hong HJ, Lee GM. Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. Biotechnol Bioeng 1998; 58(1): 73-84.

[19] Pendse GJ, Karkare S, Bailey JE. Effect of cloned gene dosage on cell growth and hepatitis B surface antigen synthesis and secretion in recombinant CHO cells. Biotechnol Bioeng 1992; 40(1): 119-29.

[20] Gu MB, Todd P, Kompala DS. Metabolic burden in recombinant CHO cells: effect ofdhfr gene amplification and *lac*Z expression. Cytotechnology 1995; 18(3): 159-66.

[21] Zabriskie DW, Arcuri EJ. Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. Enzyme Microb Tech 1986, 8(12): 706-17.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-09-19]