Original Article

A Comparison of Bone Morphogenetic Protein-7 Mutant Expression in Prokaryotic and Eukaryotic Hosts

Leila Nematollahi[1], Fereidoun Mahboudi[2], Mohammad Azizi[3], Farzaneh Barkhordari[4], Ahmad Adeli[4], Vahid Khalaj[5*]

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- B.Sc., Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
5- Assistant Professor, 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: khalajs@pasteur.ac.ir

Received: 02/Sep/2012, Accepted: 28/Nov/2012

Abstract

Objective: Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) is a multifunctional growth factor predominantly recognized for its osteoinductive properties. Due to the high cost of this protein, the availability of BMP-7 for treatment is limited. The heterologous production of recombinant hBMP-7 has been performed in a number of expression systems. In this study a novel form of BMP-7 was expressed in eukaryotic and prokaryotic hosts.

Methods: For expression in the prokaryotic system, the novel protein was secreted to the periplasmic space of *Escherichia coli* using a pelB signal sequence followed by single-step purification by Ni^{2+}-charged column chromatography. In the mammalian cell expression system, we transferred a full-length cDNA encoding precursor of the novel protein to CHO cells then selected stable clones by using the appropriate antibiotic concentration. Expressions in both systems were confirmed by Western blot analysis.

Results: The novel recombinant protein was produced as a 36-38 kDa dimer in the CHO cell line and a 16 kDa monomer in the *Escherichia coli* system. Quantitative analysis according to ELISA showed that the expression levels of the mutant protein in the eukaryotic and prokaryotic expression systems were 40 ng/ml and 135 ng/ml of the culture media, respectively.

Conclusion: In this study, the expression level in *Escherichia coli* was at least three times more than observed in the CHO cells. However, further optimization is required to obtain a dimer protein in *Escherichia coli*. The results show that periplasmic expression may be suitable for the production of complex proteins such as BMPs.

Keywords: Recombinant protein, Human bone morphogenetic protein 7, CHO cells, *Escherichia coli*

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 3, Autumn 2012, Pages: 93-102

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

مقاله اصیل

مقایسه بیان شکل تغییر یافته BMP-7 در میزبان‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی

لیلا نعمت‌الهی[1]، فریدون مهبودی[2]، محمد عزیزی[3]، فرزانه برخورداری[4]، احمد عادلی[4]، وحید خلج[5*]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- دکتری تخصصی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- کارشناس، بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۵- استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی
Email: khalajs@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۱/۰۶/۱۲ پذیرش مقاله: ۹۱/۰۹/۰۸

چکیده

هدف: BMP-7 عامل رشد چند منظوره‌ای است که اغلب به دلیل خواص استخوان‌زایی خود شناخته شده است. به دلیل قیمت بالا، دسترسی به این پروتئین برای مصارف درمانی محدود است. تاکنون تولید هترولوگ پروتئین نوترکیب BMP-7 در تعدادی از سیستم‌های بیانی انجام یافته است. در مطالعه حاضر شکل جدیدی از پروتئین در میزبان‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی بیان شده است.

مواد و روش‌ها: برای بیان در سیستم بیانی پروکاریوتی، پروتئین جدید به فضای پری‌پلاسمی باکتری اشریشیا کلی ترشح شد و تخلیص توسط ستون تمایلی انجام گرفت. برای بیان در سیستم بیانی یوکاریوتی، قطعه cDNA با طول کامل به سلول یوکاریوتی CHO منتقل شد و کلون‌های پایدار انتخاب شد. بیان پروتئین نوترکیب در هر دو سیستم بیانی توسط آزمون وسترن بلات تأیید شد.

نتایج: پروتئین نوترکیب جدید به صورت دایمر با وزن مولکولی ۳۶-۳۸ کیلودالتون در سلول یوکاریوتی و به صورت مونومر با وزن مولکولی ۱۶ کیلودالتون در سیستم بیانی اشریشیا کلی تولید شد. تجزیه و تحلیل کمّی با استفاده از الایزا نشان داد که سطح بیان جهش یافته در سیستم بیانی یوکاریوتی و پروکاریوتی به ترتیب ۴۰ و ۱۳۵ نانوگرم در هر میلی‌لیتر از محیط کشت است.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه سطح بیان پروتئین در اشریشیا کلی حداقل ۳ برابر میزان بیان در سلول یوکاریوتی بود. با این وجود بهینه‌سازی‌های بیشتر برای به‌دست آوردن مولکول دایمر در اشریشیا کلی مورد نیاز است. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که بیان پری‌پلاسمی ممکن است برای تولید پروتئین‌های پیچیده مانند BMPs مناسب باشد.

کلیدواژگان: پروتئین نوترکیب، پروتئین استخوان‌زای انسانی رده ۷، رده سلولی CHO، اشریشیا کلی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحات: ۹۳-۱۰۲

مقدمه

BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)، عامل رشد چند منظوره‌ای است که نقش آنان در بسیاری از جنبه‌های رشد جنینی، شامل شکل‌گیری غضروف و استخوان و رشد

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

استخوان‌ها به اثبات رسیده است. این پروتئین‌ها پس از تولد نیز نقش اساسی در نگهداری توده استخوانی ایفا کرده و در ترمیم شکستگی‌ها در بالغین نقش دارد [۱-۳]. تاکنون فقط BMP-2 و BMP-7 (Bone Morphogenetic Protein-7) برای استفاده بالینی مورد تأیید قرار گرفته‌اند و در بازار دارویی دنیا موجود هستند [٤-۷]. BMP-7 برای مصرف در درمان هم‌جوشی نخاعی (Spinal Fusion) و شکستگی‌های غیر یکپارچه در استخوان‌های بلند (Long Bone Nonunions) مورد تأیید سازمان غذا و داروی آمریکا قرار گرفته است [۸، ۹]. با وجود آثار بالینی مفید، نیمه عمر کوتاه آن نیاز به تجویز دوز قابل توجهی از این دارو را ایجاب می‌نماید که به علت گران بودن BMP-7، دسترسی به آن برای مصارف درمانی محدود می‌شود. بنابراین تولید این پروتئین دارویی در سیستم‌های بیانی مختلف برای به‌دست آوردن مقادیر کافی از آن ضروری است.

امروزه تعداد زیادی از پروتئین‌های نوترکیب دارویی در سیستم‌های یوکاریوتی تولید می‌شود که دلیل آن توانایی آن‌ها در اعمال اصلاحات پس از ترجمه (Post-translational Modifications) است. در این میان سلول CHO (Chinese Hamster Ovary) از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا قادر به ایجاد ساختار مناسب و الگوی گلیکوزیلاسیون صحیح در پروتئین‌های دارویی بوده و پروتئین‌های تولید شده در این رده سلولی فعالیت زیست‌شناختی مطلوبی دارد [۱۰]. با وجود تولید BMPs در فرم فعال خود در محیط کشت سلول‌های پستانداران (Mammalian Expression System) بازده تولید کم بوده و هزینه‌های آن افزایش می‌یابد. بنابراین سیستم‌های بیانی پروکاریوتی مانند اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) نیز به عنوان جایگزین سیستم‌های یوکاریوتی برای بیان BMP به‌کار رفته است ولی تولید پروتئین به صورت اجسام تجمعی (Inclusion body) در سیتوپلاسم اشریشیا کلی نیازمند به‌کارگیری فرآیندهای تا خوردگی مجدد (Refolding) و تخلیص برای به‌دست آوردن پروتئین فعال دارویی است. ترشح پروتئین به فضای پری‌پلاسمی باکتری اشریشیا کلی می‌تواند معایب ذکر شده را برطرف سازد [۱۱-۱۳]. ترشح پروتئین‌ها به فضای اکسید کننده پری‌پلاسم، علاوه بر تحریک شکل‌گیری باندهای دی سولفیدی و ایجاد تاخوردگی صحیح پروتئین، باعث تسهیل در امر خالص‌سازی آن نیز می‌شود [۱۲-۱۵].

در پژوهش حاضر از دو سیستم بیانی یوکاریوتی (سلول‌های CHO) و پروکاریوتی (بیان در فضای پری‌پلاسم باکتری اشریشیا کلی) برای بیان فرم جدیدی از BMP-7 استفاده شد. در فرم جدید جایگزینی پایانه آمینی BMP-7 با ناحیه متصل شونده به هپارین (Heparin Binding Site) از BMP-2 به منظور افزایش نیمه عمر این پروتئین و بهینه‌سازی خواص آن انجام شد که در مطالعات آینده بررسی خواهد شد. در این پژوهش کارآمدی سیستم‌های بیانی یوکاریوتی و پروکاریوتی مورد استفاده در بیان این پروتئین بحث و بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

طراحی سازه ژنی

توالی ژن سنتز شده به طول تقریبی ۱۳۰۰ جفت‌باز برای انتقال به سلول یوکاریوتی (CHO DG44) شامل ۳ بخش توالی راهنما (۲۹ اسید آمینه)، پروپروتئین (۲۶۳ اسید آمینه) و ناحیه بالغ تغییر یافته (۱۳۹ اسید آمینه) است. سازه ژنی که برای بیان در میزبان پروکاریوتی سنتز شد تنها شامل ناحیه بالغ مهندسی شده از BMP-7 با تعداد نوکلئوتید ۵۲۰ جفت‌باز (شامل جایگاه‌های برش آنزیمی به انضمام بخشی از توالی ناقل) بود. طراحی ناحیه بالغ از BMP-7 براساس تغییر پایانه آمینی این پروتئین انجام شد؛ به این ترتیب که در این ناحیه ۱٦ اسید آمینه ابتدایی پایانه آمینی BMP-7 با ۱٦ اسید آمینه ابتدایی BMP-2 (یا ناحیه متصل شونده به هپارین) تعویض شد. این توالی‌ها توسط شرکت Gen Ray Biotech (کشور چین) ساخته شد.

تهیه سازه بیانی

پس از ساخت توالی‌های اشاره شده بالا، سازه بیانی نهایی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

برای انتقال به سلول CHO به شرح زیر تهیه شد. ابتدا توالی سنتز شده توسط آنزیم‌های محدودالاثر *Kpn*I و *Not*I از پلاسمید حد واسط بریده شد و در جایگاه کلون‌سازی چندگانه (Multiple Cloning Site) ناقل بیانی pTracer-SV40 کلون شد. پلاسمید نوترکیب حاصل با هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شد. برای هضم آنزیمی از آنزیم‌های *Pst*I/*Not*I استفاده شد. در مورد سازه بیانی نهایی برای انتقال به باکتری اشریشیا کلی نیز ژن سنتز شده توسط آنزیم‌های محدودالاثر *Nde*I و *Eco*RI از پلاسمید حد واسط جدا شد و در ناقل بیانی PET22b کلون شد. پلاسمید نوترکیب حاصل نیز از طریق هضم آنزیمی که در آن از آنزیم‌های محدودالاثر NdeI/EcoRV استفاده شد تأیید شد.

بیان پری‌پلاسمی و خالص‌سازی پروتئین در باکتری اشریشیا کلی

پلاسمید بیانی حاصل به میزبان سویه BL21(DE3) (Novagen، آمریکا) منتقل شد. باکتری‌هایی ترانسفورم (Transform) شده در محیط LB (Luria Bertani) که شامل آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (Ampicillin) بود در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا زمانی‌که کدورت محیط در طول موج ٦٠٠ نانومتر به حدود ۰/۵ رسید. در این مرحله القا با اضافه کردن ایزوپروپیل بتا-دی- تیوگالاکتوپیرانوزید (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside: IPTG) ۱ میلی‌مولار صورت گرفت. سه نمونه از سلول‌ها در زمان‌های ۰ و ۲ و ٤ ساعت پس از القا توسط سانتریفوژ جمع‌آوری شدند. یک قسمت از کشت نیز بدون اضافه کردن IPTG به عنوان نمونه قبل از القا و کنترل منفی به‌کار رفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده در ژل پلی آکریل آمید ۱۵ درصد الکتروفورز شد و پس از تأیید اولیه بیان، شوک اسموتیک، طبق برنامه مرسوم انجام گرفت [١٦]. پس از انجام شوک اسموتیک عصاره حاوی پروتئین‌های پری‌پلاسمی به منظور آماده‌سازی برای انجام فرایند تخلیص در مقابل بافر لیز کننده دیالیز شد. تخلیص پروتئین با ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA و روش بومی (Native) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (QIAGEN، آمریکا) انجام گرفت. به طور خلاصه پس از متعادل‌سازی ستون با بافر لیز کننده، عصاره پری‌پلاسم دیالیز شده به ستون وارد و پس از شستشوی ستون، پروتئین نوترکیب با استفاده از بافر جداسازی از ستون جدا شد.

بیان پایدار و تخلیص پروتئین در سلول CHO DG44

پس از تعیین حساسیت سلول یوکاریوتی به آنتی‌بیوتیک زئوسین (Zeocin) (Invitrogen، آمریکا) (٤٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر)، ناقل بیانی حاوی سازه ژنی نهایی با استفاده از آنزیم محدودالاثر *Bgl*II خطی شده و با کمک روش لیپوفکشن (Lipofection) و با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipofectamine 2000) (GIBCO Invitrogen، آمریکا) و طبق برنامه شرکت سازنده به سلول CHO منتقل شد. پس از گذشت ٢٤ ساعت از انجام ترانسفکشن (Transfection)، سلول‌ها به محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک زئوسین منتقل شد و طی انتخاب‌های مکرر و اضافه کردن آنتی‌بیوتیک با فاصله زمانی ۳ تا ٤ روز، کلون‌ها با ویژگی بیان مناسب و پایدار ژن انتخاب شد. پس از این مرحله، سلول‌های ترانسفکت شده در محیط کشت اختصاصی که فاقد سرم بود کشت داده شد. وجود پروتئین ترشحی در محیط کشت ٦ روزه جمع‌آوری شده از سلول‌های ترانسفکت شده در ابتدا با روش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) تأیید شد. سوپ‌های ترشحی توسط ستون تمایلی Hi-Trap Heparin Hp (GE Healthcare، آمریکا) و طبق برنامه شرکت سازنده تخلیص شد.

تجزیه و تحلیل کمّی پروتئین (آزمون ELISA)

در ابتدا بیان پروتئین در هر دو سیستم یوکاریوتی و پروکاریوتی با روش ELISA کنترل شد. همچنین میزان

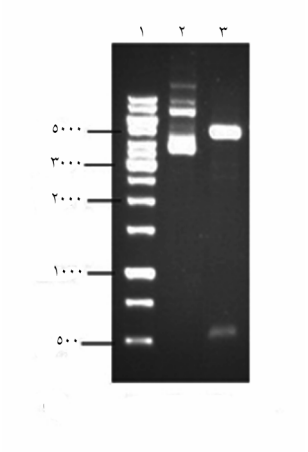
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

دقیق پروتئین ترشحی در سوپ سلول‌های ترانسفکت شده CHO و همچنین در بخش تخلیص شده پری‌پلاسمی حاصل از باکتری اشریشیا کلی با روش ELISA و با استفاده از کیت تجاری Human BMP-7 ELISA Kit (Ray Biotech، آمریکا) به‌دست آمد.

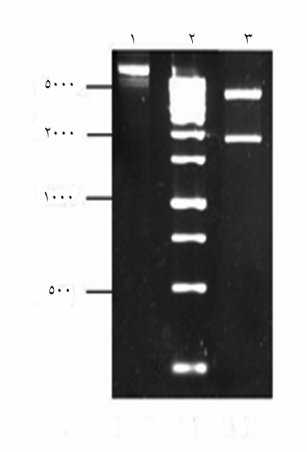
وسترن بلات (Western Blot)

پروتئین‌های تخلیص شده به‌دست آمده از هر دو سیستم بیانی یوکاریوتی و پروکاریوتی پس از تغلیظ، در ژل پلی آکریل آمید ۱۵ درصد الکتروفورز شد. ادامه مراحل وسترن بلات طبق برنامه‌های معمول انجام شد [۱۷].

برای انجام آزمون وسترن بلات روی پروتئین به‌دست آمده از سلول یو کاریوتی از آنتی‌بادی اولیه پلی‌کلونال (Polyclonal) خرگوشی ضد BMP-7 شرکت Abcam (آمریکا) و آنتی‌بادی ثانویه اتصال یافته به آنزیم پراکسیداز (Peroxidase) ضد خرگوشی شرکت رازی (ایران) استفاده شد. نمونه به‌دست آمده از بیان پری‌پلاسمی با استفاده از آنتی‌بادی ضد توالی هیستیدین متصل شده به آنزیم پراکسیداز شرکت Roche (آلمان) تأیید شد. در هر دو مورد از سیستم شناسایی کمّی لومینسانس (Luminescence) برای ظهور باندهای حاصل استفاده شد.



شکل ۱ نتایج حاصل از هضم آنزیمی روی پلاسمید نوترکیب نهایی برای انتقال به سلول CHO؛ **ردیف ۱)** نشانگر DNA (۱ کیلوبازی)، **ردیف ۲)** پلاسمید هضم نشده، **ردیف ۳)** محصول هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Pst*I/*Not*I که شامل قطعات ۵۶۱ جفت‌باز و ۴۹۰۰ جفت‌باز است.



شکل ۲ نتایج حاصل از هضم آنزیمی روی پلاسمید نوترکیب نهایی برای انتقال به باکتری اشریشیا کلی؛ **ردیف ۱)** پلاسمید هضم نشده، **ردیف ۲)** نشانگر DNA (۱ کیلوبازی)، **ردیف ۳)** محصول هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Not*I/*Eco*RV که شامل قطعات ۴۰۹۵ جفت‌باز و ۱۸۲۰ جفت‌باز است.

نتایج

ساخت ناقل بیانی

پس از انجام فرایند کلونینگ و ساخت ناقل بیانی برای انتقال به سلول CHO DG44، هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودالاثر PstI/NotI باعث ایجاد قطعات با اندازه ۵۶۱ جفت‌باز و ۴۹۰۰ جفت‌باز شد (شکل ۱).

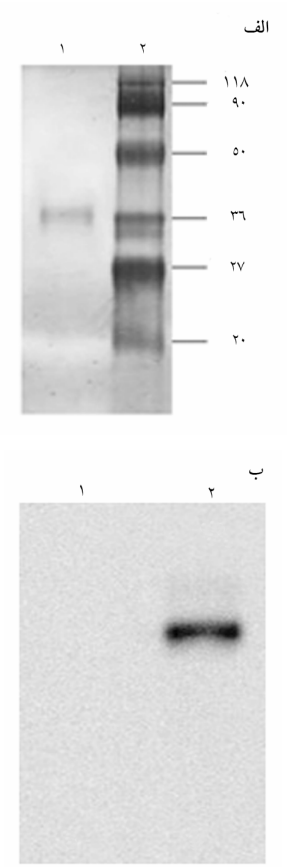
در مورد پلاسمید نوترکیب تولیدی برای انتقال به اشریشیا کلی نیز پس از کلونینگ قطعه ژنی سنتز شده داخل ناقل PET22b، هضم آنزیمی با آنزیم‌های NotI/EcoRV باعث ایجاد قطعات با اندازه ۴۰۹۵ جفت‌باز و ۱۸۲۰ جفت‌باز شد (شکل ۲). نتایج مذکور اندازه‌های محاسبه شده به صورت تئوری و به‌دست آمده از نرم‌افزارها را تأیید کرد.

تجزیه و تحلیل بیان

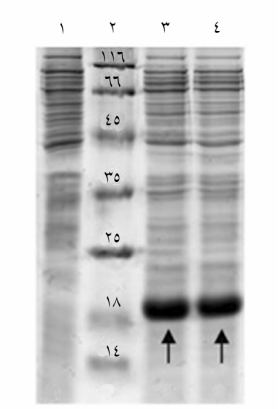
پروتئین تخلیص شده حاصل از سلول‌های ترانسفکت شده یوکاریوتی پس از انجام الکتروفورز در ژل ۱۵ درصد باند

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

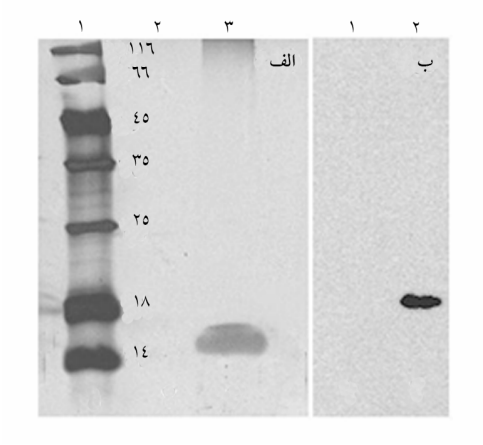
مربوط بـه پـروتئین دایمـر، بـا وزن مولکـولی تقریبـی ۳۶-۳۸ کیلودالتون را نشان داد. نتایج حاصل از SDS- PAGE با انجام وسترن بلات تأیید شـد (شـکل ۳ الـف و ب). شـکل ٤ نتـایج حاصل از الکتروفورز نمونه‌هـای ۲ سـاعته و ٤ سـاعته پـس از القای بیان در اشریشیا کلی را در ژل پلی آکریل آمید ۱۵ درصد نشان می‌دهد. همچنین پروتئین بالغ (پردازش شـده) نهـایی در بیـان پـری‌پلاسـمی بـا وزن مولکـولی ۱٦کیلودالتـون، پـس از خالص‌سازی و انجـام الکتروفـورز در ژل ۱۵ درصـد از طریـق وسترن بلات تأیید شد (شکل ۵ الف و ب).



شکل ۳ تجزیه و تحلیل بیان پروتئین تولیدی در سیـستم بیـانی CHO cells؛ **(الف)** تجزیه و تحلیل SDS-PAGE پروتئین با رنـگ‌آمیـزی نیتـرات نقـره؛ **ردیف ۱)** پروتئین تخلیص شده در حالت دایمـر، بـا وزن مولکـولی تقریبـی ۳٦-۳۸ کیلودالتون، **ردیف ۲)** نـشانگر انـدازه پـروتئین؛ **(ب)** وسـترن بـلات پروتئین تلخیص شده از سیستم یوکاریوتی؛ **ردیـف ۱)** کنتـرل منفـی شـامل سوپ ترشحی سلول‌های ترانسفکت نشده، **ردیف ۲)** پروتئین تخلیص شـده دایمر با وزن مولکولی تقریبی ۳٦-۳۸ کیلودالتون



شکل ٤ بررسی بیان پروتئین در زمان‌هـای مختلـف پـس از القـا در بـاکتری اشریشیا کلی؛ **ردیف ۱)** نمونه قبل از القا، **ردیف ۲)** نشانگر اندازه پـروتئین، **ردیف‌های ۳ و ٤)** به ترتیب نمونه‌های ۲ و ٤ ساعت بعد از القا (باند مربوط به پروتئین پردازش نشده با وزن مولکولی تقریبـی ۱۸ کیلودالتـون بـا پیکـان مشخص شده است).



شکل ۵ تجزیه و تحلیل بیان پروتئین تولیدی در باکتری اشریشیا کلی؛ **(الف)** تجزیه و تحلیل SDS-PAGE پروتئین با رنگ‌آمیزی نیترات نقره؛ **ردیـف ۱)** نشانگر اندازه پروتئین، **ردیف ۲)** نمونه القا نشده (کنترل منفـی)، **ردیـف ۳)** پـروتئین تخلـیص شـده در حالـت مونـومر بـا وزن مولکـولی تقریبـی ۱٦ کیلودالتون؛ **(ب)** وسترن بلات پروتئین تلخیص شده از سیستم پروکـاریوتی؛ **ردیف ۱)** نمونه القا نشده (کنترل منفی)، **ردیف ۲)** پروتئین تخلیص شده بـا وزن مولکولی تقریبی ۱٦ کیلودالتون

اندازه‌گیری میزان بیان به کمک آزمون ELISA

میزان بیان در سوپ ٦ روزه جمع‌آوری شده از سلول‌هـای ترانسفکت شده CHO DG44، ٤۰ نانوگرم در میلی‌لیتر اسـت.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

میزان بیان پروتئین در سیستم اشریشیا کلی به صورت پری‌پلاسمی ۱۳۵ نانوگرم در میلی‌لیتر تعیین شد.

بحث

BMPs پروتئین‌هایی با خاصیت تحریک استخوان‌زایی است که برای درمان شکستگی‌های شدید به‌کار می‌رود [۱۸]. استراتژی‌های مختلفی برای تولید این پروتئین‌ها به میزان زیاد و کارآیی بیشتر در میزبان‌های مختلف یوکاریوتی و پروکاریوتی به‌کار برده شده است. در این پژوهش شکل تغییر یافتهٔ جدیدی از BMP-7 در دو میزبان یوکاریوتی و پروکاریوتی بیان شد. خصوصیات پروتئین تولیدی در این سیستم‌ها و همچنین بازده بیان بررسی و مقایسه شد. در این پروژه از میزبان یوکاریوتی CHO DG44 cells، به علت توانایی آن در تولید پروتئین با فعالیت مناسب و تاخوردگی صحیح و ایجاد الگوی گلیکوزیلاسیون مطلوب استفاده شد [۱۰]. اثبات شده است که BMPs قبل از ترشح شامل ۳ بخش توالی راهنما، پروپروتئین و ناحیه بالغ است که پس از برش پروتئولیتیکی، ناحیه بالغ که گلیکوزیله و شامل ۲ مونومر است رها می‌شود [۸، ۱۹، ۲۰]. به نظر می‌رسد که پروپروتئین در ایجاد تاخوردگی مناسب و ترشح BMPs به حالت دایمر و فعال نقش دارد [۲۱، ۲۲]. با انتقال قطعه cDNA با طول کامل به سلول‌های یوکاریوتی (CHO) به علت حضور پروپروتئین در بالا دست ژن مهندسی شده، فرم دایمر ایجاد شد که باند مربوط ۳۶-۳۸ کیلودالتون توسط SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید شد. شایان ذکر است پروتئین دایمر مذکور فعالیت زیست‌شناختی قابل مقایسه با نمونه استاندارد را از خود نشان داد (اطلاعات مربوط نشان داده نشده است). میزان پروتئین ترشحی در سوپ سلول‌های ترانسفکت شده ٤٠ نانوگرم در میلی‌لیتر است که نشان دهنده بازده پایین بیان با وجود تولید فرم فعال و دایمر پروتئین نوترکیب در سلول CHO است. نتایج حاصل منطبق با مطالعاتی است که نشان می‌داد به‌دست آوردن مقادیر بالای بیان با استفاده از روش‌های استاندارد در سیستم‌های بیانی یوکاریوتی نظیر CHO و COS مشکل است [۲۳-۲۵].

به دلیل مزایای سیستم‌های بیانی پروکاریوتی که در مقدمه به آن اشاره شد، این پروژه با هدف طراحی یک سیستم جدید برای اولین بار برای بیان پروتئین مهندسی شده در فضای پری‌پلاسمی اشریشیا کلی انجام شد. به این منظور از ناقل بیانی PET22b که دارای توالی پپتید نشانه pelB برای ترشح پروتئین به فضای پری‌پلاسم و توالی شش‌تایی هیستیدین (Histidin tag) برای تسهیل در امر خالص‌سازی است، استفاده شد. اشاره شده است که فضای پری‌پلاسمی باعث جدایی پروتئین‌های سیتوزولی از پروتئین ترشحی نوترکیب می‌شود و به دلیل ترشح مقادیر کم از پروتئین نوترکیب محلول، این سیستم می‌تواند باعث تسهیل در امر خالص‌سازی شود [۱۱-۱٤]. در مطالعه حاضر پس از آزاد شدن پروتئین‌های فضای پری‌پلاسمی با کمک شوک اسموتیک، پروتئین نوترکیب حاصل با کمک ستون تمایلی Ni-NTA و در یک مرحله تخلیص شد. نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات وجود پروتئین بالغ (پردازش شده) با وزن مولکولی ١٦ کیلودالتون را در بخش پری‌پلاسمی نشان داد. میزان پروتئین بیان شده در ۲ و ٤ ساعت بعد از القا، تفاوت قابل ملاحظه‌ای را نشان نمی‌دهد. همچنین بررسی و مقایسه الگوی پروتئین سیتوپلاسمی و پری‌پلاسمی، نشانگر انتقال کامل پروتئین بالغ (پردازش شده) به فضای پری‌پلاسمی است.

اندازه‌گیری میزان پروتئین بیان شده، نشان می‌دهد که این میزان ۱۳۵ نانوگرم در هر میلی‌لیتر از محیط کشت است که حداقل ۳ برابر بیشتر از میزان بیان پروتئین مذکور در سلول CHO (٤٠ نانوگرم در میلی‌لیتر) است. نتایج مذکور منطبق با مطالعاتی است که نشان می‌داد بیان در سیستم‌های پروکاریوتی از بازده بیشتری نسبت به سیستم بیانی یوکاریوتی برخوردار است [٢٦]. البته تولید پروتئین مونومر در فضای پری‌پلاسمی تأیید کنندهٔ فرضیه دخالت پروپروتئین در ایجاد فرم دایمر است زیرا فقط سازه ژنی محتوی ناحیه بالغ در اشریشیا کلی بیان شد. انتقال پیش‌ساز BMPs به سیستم‌های یوکاریوتی به علت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

برش پروتئولیتیکی توسط آنزیم فورین (Furin) در جایگاه‌های آنزیمی چندگانه داخل پروپروتئین، باعث ایجاد مخلوط ناهمگنی از پروتئین‌های مذکور می‌شود [۲۰]. یافته‌های پژوهش یاد شده نیز ناهمگنی (Heterogenicity) بیان که منطبق با مطالعات قبلی است را تأیید می‌کند، در حالی که در سیستم پروکاریوتی مورد استفاده در پژوهش حاضر، ناهمگنی در پایانه آمینی پروتئین به دلیل بیان ناحیه بالغ محدود شده و مخلوط یکنواختی از پروتئین بالغ پردازش شده تولید شده است. با این‌که آزمون فعالیت زیست‌شناختی در مورد مونومر تولیدی در اشریشیاکلی انجام نشد، اما با توجه به مطالعات قبلی که نشان می‌داد hBMP-7 فقط در حالت هومودایمر یا هترودایمر دارای فعالیت زیست‌شناختی است [۲٤]، می‌توان پیش‌بینی نمود که فعالیت زیست‌شناختی پروتئین مذکور منوط به انجام مراحل بعدی برای شکل‌گیری فرم دایمر پروتئین است.

از آن‌جایی که در بازده پردازش در پری‌پلاسم و تولید پروتئین کامل پردازش شده عوامل مختلف مانند شرایط القا، رشد، میزان بیان، سویه میزبان و نوع پپتید نشانه نقش دارند [۲۷]، انتظار می‌رود که با وجود تولید پروتئین به فرم مونومر در این سیستم، با بهینه‌سازی هر یک از عوامل فوق بتوان به تولید پروتئین بالغ و پردازش شده در حالت دایمر دست یافت. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این دو سیستم بیانی، امید است در آینده علاوه بر بهینه‌سازی بیان در این سیستم‌ها، با انجام آزمون‌های تکمیلی، جهش یافتهٔ پیشنهادی با نمونه دارویی مقایسه شود و فرضیه تولید داروی جدید از نسل دوم BMPs با کارآیی بهتر و عوارض جانبی کمتر اثبات شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران انجام شده است.

منابع

[1] Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ. Bone morphogenetic protein. Biochem Biophys Res Commun 2007; 362(3): 550-3.

[2] Dimitriou R, Giannoudis PV. Discovery and development of BMPs. Injury 2005; 36(Suppl 3): S28-33.

[3] Gazzerro E, Minetti C. Potential drug targets within bone morphogenetic protein signaling pathways. Curr Opin Pharmacol 2007; 7(3): 325-33.

[4] Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. ANZ J Surg 2007; 77(8): 626-31.

[5] De Biase P, Capanna R. Clinical applications of BMPs. Injury 2005; 36(Suppl 3): S43-6.

[6] Dinopoulos H, Giannoudis PV. (iv) The use of bone morphogenetic proteins (BMPs) in long-bone non-unions. Curr Orthopaed 2007; 21(4): 268-79.

[7] Jeong GK, Sandhu HS, Farmer J. Bone morphogenic proteins: applications in spinal surgery. HSS J 2005; 1(1): 110-7.

[8] Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. Braz J Med Biol Res 2005; 38(10): 1463-73.

[9] Carlisle E, Fischgrund JS. Bone morphogenetic proteins for spinal fusion. Spine J 2005; 5(Suppl 6): S240-9.

[10] Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu W, Yap MGS. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. Chem Eng Prog. 2007; 103(10): 40.

[11] Robbens J, De Coen W, Fiers W, Remaut E.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

Improved periplasmic production of biologically active murine interleukin-2 in Escherichia coli through a single amino acid change at the cleavage site. Process Biochem 2006; 41(6): 1343-6.

[12] Soares CRJ, Gomide FIC, Ueda EKM, Bartolini P. Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the λP_L promoter: use of HPLC for product. Protein Eng 2003; 16(12): 1131-8.

[13] Balderas Hernández VE, Paz Maldonado LM, Medina Rivero E, Barba de la Rosa AP, Jiménez-Bremont JF, Ordoñez Acevedo LG, De León Rodríguez A. Periplasmic expression and recovery of human interferon gamma in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif 2008; 59(1): 169-74.

[14] Ambrus A, Torocsik B, Adam-Vizi V. Periplasmic cold expression and one-step purification of human dihydrolipoamide dehydrogenase. Protein Expr Purif 2009; 63(1): 50-7.

[15] Rastgar Jazii F, Karkhane AA, Yakhchali B, Fatemi SS, Deezagi A. A simplified purification procedure for recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor from periplasmic space of *Escherichia coli*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2007; 856(1-2): 214-21.

[16] Nossal NG, Heppel LA. The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. J Biol Chem 1966; 241(13): 3055-62.

[17] Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, Wingfield PT. Short protocol in protein science: a compendium of methods from current protocols in protein science. New York: John Wiley and Sons, 2003; p: 43-7.

[18] Calori GM, Donati D, Di Bella C, Tagliabue L. Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions. Injury 2009; 40(Suppl 3): S67-76.

[19] Di Liddo R, Grandi C, Venturini M, Dalzoppo D, Negro A, Conconi MT, Parnigotto PP. Recombinant human TAT-OP1 to enhance NGF neurogenic potential: preliminary studies on PC12 cells. Protein Eng Des Sel 2010; 23(11): 889-97.

[20] Swencki-Underwood B, Mills JK, Vennarini J, Boakye K, Luo J, Pomerantz S, Cunningham MR, Farrell FX, Naso MF, Amegadzie B. Expression and characterization of a human BMP-7 variant with improved biochemical properties. Protein Expr Purif 2008; 57(2): 312-9.

[21] Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. Growth Factors 1992; 7(2): 139-50.

[22] Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RH. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. J Biol Chem 1992; 267(28): 20352-62.

[23] Kim CK, Oh SD, Rhee JI, Lee EM, Yoon TR Expression and purification of recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7) in *Bacillus subtilis*. Biotechnol Bioprocess Eng 2010; 15(5): 830-6.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

[24] Chen L, Huang YD, Zhang YD. Expression and secretion of human bone morphogenetic protein-7 in *Pichia pastoris*. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 2006; 22(6): 907-13.

[25] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science 1988; 242(4885): 1528-34.

[26] Swartz JR. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. Curr Opin Biotechnol 2001; 12(2): 195-201.

[27] Kiany J, Zomorodipour A, Ahmadzadeh Raji M, Sanati MH. Construction of recombinant plasmids for periplasmic expression of human growth hormone in *Escherichia coli* under T7 and lac promoters. J Sci I R Iran 2003; 14(4): 311-6.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]