Original Article

Enhancement of Recombinant Human Tissue Plasminogen Activator Expression in CHO Cells using Matrix Attachment Region Containing Vectors in Combination with Promoter Activation Strategy

Azam Rahimpour[1], Behrouz Vaziri[2], Farzaneh Barkhordari[3], Leila Nematollahi[4], Ahmad Adeli[3], Fereidoun Mahboudi[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- B.Sc., Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4- Ph.D., 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: mahboudi@pasteur.ac.ir

Received: 10/Mar/2013, Accepted: 19/May/2013

Abstract

Objective: Development of high producing mammalian cell lines is a major bottleneck in manufacturing of recombinant therapeutic proteins. This study examines the effect of using the matrix attachment region from the human interferon beta gene in combination with promoter activation strategy with E1A 13S protein on human tissue plasminogen activator (t-PA) expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells.

Methods: The matrix attachment region was cloned in 3´ and 5´ flanking sides of the t-PA expression cassette in pTPA vector to generate pMTPA. After transfection of the cells with pTPA and pMTPA vectors, stable cell pools were developed and the t-PA expression level determined for each stable cell line. In the next step, E1A 13S expression plasmid was transfected to stable cell pools and t-PA titers were measured after 72 hours.

Results: Integration of pTPA and pMTPA vectors in the CHO genome was confirmed by PCR analysis on genomic DNA of stable cell pools. Analysis of the t-PA expression level showed a three-fold enhancement in pMTPA transfected cells compared to pTPA-containing cells. t-PA expression was further enhanced up to 1771 U/ml by transient expression of E1A 13S in pMTPA stable cell pools.

Conclusion: These results have shown that incorporation of matrix attachment region in an expression vector in combination with promoter activation can effectively enhance recombinant protein expression levels in CHO cells.

Keywords: Matrix attachment region, Promoter activation, Tissue plasminogen activator, Chinese hamster ovary cell

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 1, Spring 2013, Pages: 11-21

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

مقاله اصیل

افزایش بیان عامل فعال کننده پلاسمینوژن بافتی نوترکیب در سلول‌های CHO با استفاده از ناقل بیانی حاوی نواحی متصل شونده به ماتریکس و روش فعال‌سازی راه‌انداز

اعظم رحیم‌پور[۱]، بهروز وزیری[۲]، فرزانه برخورداری[۳]، لیلا نعمت‌الهی[۴]، احمد عادلی[۳]، فریدون مهبودی[۲*]

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

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

دریافت مقاله: ۹۱/۱۲/۱۹ پذیرش مقاله: ۹۲/۰۲/۲۹

چکیده

هدف: ایجاد رده‌های سلولی دارای بیان بالا یک مرحله محدود کننده اصلی در روند تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی است. در این مطالعه اثر به‌کارگیری ناحیه متصل شونده به ماتریکس ژن اینترفرون بتای انسانی به‌همراه روش فعال‌سازی راه‌انداز از طریق پروتئین E1A 13S بر بیان فاکتور فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (t-PA) در سلول‌های تخمدان هامستر چینی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: ناحیه متصل شونده به ماتریکس در سمت ´۵ و ´۳ واحد بیان کننده t-PA در ناقل pTPA کلون شد تا ناقل pMTPA به‌دست آید. پس از ترانسفکشن سلول‌ها با ناقل‌های pTPA و pMTPA، رده‌های سلولی پایدار ایجاد شده و میزان بیان t-PA برای هر رده تعیین شد. در مرحله بعد، پلاسمید بیان کننده E1A 13S به سلول‌های پایدار ترانسفکت شده و میزان بیان t-PA پس از ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد.

نتایج: الحاق ناقلین pTPA و pMTPA به ژنوم سلول CHO از طریق انجام PCR روی DNA ژنومی سلول‌های پایدار تأیید شد. بررسی میزان بیان t-PA افزایش بیان به‌میزان سه برابر را در سلول‌های ترانسفکت شده با ناقل pMTPA در مقایسه با رده ایجاد شده با pTPA نشان داد. بیان موقتی E1A 13S در رده‌های پایدار منجر به افزایش تیتر t-PA به ۱۷۷۱ واحد در هر میلی‌لیتر در سلول‌های ایجاد شده با ناقل pMTPA شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان‌دهنده آنست که به‌کارگیری ناحیه متصل شونده به ماتریکس در ناقل بیانی به‌همراه روش فعال‌سازی راه‌انداز می‌تواند به‌صورت مؤثر میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های CHO را افزایش دهد.

کلیدواژگان: ناحیه متصل شونده به ماتریکس، فعال‌سازی راه‌انداز، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی، سلول‌های تخمدان هامستر چینی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، صفحات: ۱۱-۲۱

مقدمه

سلول‌های کشت شده جانوری به‌دلیل دارا بودن قابلیت ایجاد تغییرات پس از رونویسی مناسب و قابلیت بیان پروتئین‌های پیچیده و چند واحدی امروزه به‌عنوان سیستم بیانی غالب در تولید پروتئین‌های دارویی تبدیل شده‌اند [۱]. با این وجود ایجاد رده سلولی پایدار بیان کننده مقادیر کافی از

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

پروتئین‌های نوترکیب غالباً فرآیندی طولانی و دشوار است؛ زیرا احتمال وارد شدن ژن به یک محل بسیار رونویسی شونده در ژنوم با استفاده از ناقل‌های بیانی معمول بسیار کم است [۲]. از طرفی وضعیت کروماتینی ژنوم در محل وارد شدن پلاسمید نیز می‌تواند میزان بیان ژن خارجی را تحت تأثیر قرار دهد. به‌عنوان مثال گسترش نواحی هتروکروماتینی به درون پلاسمید بیانی می‌تواند منجر به کاهش بیان و یا خاموش شدن ژن در طول زمان شود. بنابراین دست‌یابی به سلول‌های دارای بیان بالا غالباً مستلزم غربالگری تعداد بسیاری از کلون‌های نوترکیب است [۳، ٤].

راه‌کارهای مختلفی برای غلبه بر این مشکل ارایه شده‌اند که از آن‌جمله می‌توان به استفاده از عواملی که در افزایش بیان ژن مؤثر بوده یا ژن مورد نظر را از قرار گرفتن در معرض محیط کروماتینی اطراف خود حفاظت می‌کنند نام برد. دسته اخیر تحت عنوان عوامل سد کننده (Barrier Elements) شناخته می‌شود [٤]. از این دسته عوامل می‌توان به نواحی متصل شونده به ماتریکس (Matrix Attachment Regions: MARs) اشاره نمود. MARها توالی‌های DNA با طول ۳۰۰-۳۰۰۰ جفت‌باز است که کروماتین را به پروتئین‌های ماتریکس هسته‌ای متصل و از این طریق حلقه‌های کروماتینی مستقل از هم را در ژنوم ایجاد می‌کند. این حلقه‌های کروماتینی بدون این‌که در معرض عوامل تنظیمی سایر بخش‌های ژنوم قرار گیرد به‌صورت واحدهای بیانی مستقل عمل می‌کند. از طرفی این توالی‌ها می‌تواند بیان ژن را از طریق تسهیل برهم‌کنش بین کمپلکس‌های فعال کننده و نیز از طریق تنظیم در دسترس بودن کروماتین کنترل کند. بنابراین MARها علاوه بر دارا بودن نقش سدکنندگی در افزایش میزان رونویسی هم مؤثر است [۳، ٥]. این ویژگی MARها منجر به استفاده گسترده آن‌ها در مطالعات بیان ژن، ژن درمانی و تراریخت (Transgenic) شده است [٦، ۷].

انواع متفاوتی از نواحی متصل شونده به ماتریکس در مطالعات بیان ژن در سلول‌های هامستر چینی (Chinese Hamster Ovary: CHO) استفاده شده‌است که از آن جمله می‌توان به نواحی متصل شونده به ماتریکس از ژن‌های اینترفرون بتای انسانی (Human Interferon-beta: IFN-β) [۸، ۹]، لیزویم جوجه (Chicken Lysozyme) [۱۰، ۱۱] و بتا گلوبین انسانی (Human Beta-Globin) [۹، ۱۲] اشاره نمود. این مطالعات قابلیت MARها در افزایش میزان بیان پایه پروتئین‌های نوترکیب را نشان داده‌است. با این وجود به نظر می‌رسد در صورتی‌که این عوامل به‌همراه سایر روش‌های بهینه‌سازی بیان به‌کار گرفته شود، دست‌یابی به کلون‌های دارای بیان بالا در مدت زمان کمتری امکان‌پذیر است.

فرآیند فعال‌سازی راه‌انداز (Promoter Activation) از جمله روش‌های دیگری است که برای افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های CHO استفاده شده است. در این روش عوامل رونویسی سلولی یا ویروسی که قابلیت اتصال به راه‌انداز به‌کار رفته در ناقل بیانی و افزایش میزان رونویسی از آن‌را دارد در سلول بیان می‌شود [۱۳، ١٤]. پروتئین آدنوویروسی E1A 13S از دسته فعال کننده‌هایی است که قابلیت افزایش رونویسی از راه‌انداز سایتومگالوویروس (Cytomegalovirus: CMV) را دارد. مشخص شده است که E1A 13S پس از اتصال به راه‌انداز CMV از طریق فراخوانی کمپلکس‌های فعال کننده رونویسی افزایش میزان بیان ژن‌های تحت کنترل این راه‌انداز را موجب می‌شود [۱۵، ١٦]؛ اما تاکنون مطالعه‌ای برای بررسی این‌که آیا بیان E1A 13S در سلول‌های پایدار شده با ناقل حاوی ناحیه متصل شونده به ماتریکس می‌تواند اثر افزایشی بیشتری در میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب داشته باشد انجام نشده است.

عامل فعال کننده پلاسمینوژن بافتی انسانی (Human Tissue Plasminogen Activator: t-PA) گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ٦٨ کیلو دالتون و از خانواده سرین پروتئازها است. t-PA با تبدیل پلاسمنیوژن غیر فعال 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

سرین پروتئازها مانند استرپتوکیناز (Streptokinase) و اوروکیناز (Urokinase) برخوردار است، به‌صورت گسترده در درمان بیماری‌های ترومبوتیک (Thrombotic Disease) استفاده می‌شود. امروزه t-PA انسانی نوترکیب به‌صورت تجاری در سلول‌های CHO تولید می‌شود [۱۷، ۱۸].

هدف از انجام این تحقیق بررسی کارآیی دو روش مهندسی ناقل بیانی از طریق استفاده از نواحی متصل شونده به ماتریکس ژن اینترفرون بتا و فعال‌سازی راه‌انداز از طریق بیان ژن E1A 13S آدنوویروس در افزایش بیان t-PA نوترکیب انسانی در سلول‌های CHO است. بدیهی است نتایج حاصل از مطالعه می‌تواند برای بهینه‌سازی بیان سایر پروتئین‌های نوترکیب نیز به‌کار گرفته شود.

مواد و روش‌ها

کشت رده سلولی

رده سلولی CHO (NCBI، ایران) در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی غیر فعال شده با حرارت (Invitrogen، آمریکا)، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Penicillin)، ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (Streptomycin) و ۲ میلی‌مولار گلوتامین (Biosera، انگلستان)، در انکوباتور حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۸۵ درصد رطوبت کشت داده شد. سلول‌ها در فاصله ۲–۳ روز با تراکم سلولی $۰/۲ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر پاساژ داده شدند. شمارش سلولی با روش تریپان بلو (Trypan Blue) و با استفاده از لام نئوبار انجام شد.

ساخت پلاسمیدهای نوترکیب

ناحیه متصل شونده به ماتریکس ژن اینترفرون بتا با استفاده از آنزیم پلی‌مراز Expand High Fidelity (Roche، آلمان) از پلاسمید pTZE20 [ناقل حد واسط حاوی IFN-β MAR، اهداء شده توسط دکتر جرگن باد (Jurgen Bode)، آلمان] تکثیر و در ناقل حد واسط pGEM-T easy (Fermentas، لیتوانی) کلون شد که منجر به ایجاد سازه pGEM-MAR شد. توالی آغازگرهای (Primers) رفت و برگشت مورد استفاده در این مرحله به‌ترتیب به‌صورت:

5′-TCTAAGCTTAGCAAGGTCGCCACG-3′

و

5′-CATCGAAGCTTGCACTATAGGGAATCC-3′

بود. توالی کد کننده t-PA با استفاده از آنزیم‌های *Not*I و *Xho*I (Fermentas، لیتوانی) از ناقل pTZ57R t-PA (که در مطالعات قبلی از طریق کلون کردن ژن t-PA در ناقل حد واسط pTZ57R ایجاد شده بود)، خارج شد و در ناقل pCMV-puro که توسط همین دو آنزیم بریده شده بود کلون شد. سازه حاصل pTPA نامیده شد و به‌عنوان ناقل بیانی پایه به‌کار برده شد. این پلاسمید در سمت ′۳ و ′۵ واحد بیانی t-PA به‌ترتیب دارای محل‌های برش آنزیمی *Hind*III و *Eco*RI است. بنابراین در مرحله بعد، قطعه حاوی IFN-β MAR توسط هر یک از آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III از ناقل pGEM-MAR خارج شده و در فرادست و فرودست واحد بیانی t-PA کلون شد تا ناقل بیانی pMTPA ایجاد شود. در همه موارد از آنزیم T4 DNA ligase (Fermentas، لیتوانی) برای لیگاسیون (Ligation) استفاده شده و درستی کلونینگ (Cloning) در هر مرحله از طریق هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شد. برای تعیین جهت قرارگیری توالی‌های MAR در دو سوی واحد بیانی t-PA، از آنزیم *Bgl*II استفاده شد. این آنزیم دارای یک محل برش روی هر یک از توالی‌های IFN-β MAR و یک محل برش روی جایگاه کلون‌سازی چندگانه (Multiple Cloning Site: MCS) ناقل pMTPA است. همچنین پلاسمید pcDNA3 E1A که حاوی ژن آدنوویروسی E1A 13S است، به‌صورت هدیه از دکتر میشل نولز (Michael Nevels) (دانشگاه Regensburg، آلمان) دریافت شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

تعیین دامنه حساسیت سلول‌های CHO به آنتی‌بیوتیک پوررومایسین

برای تعیین غلظت مؤثر آنتی‌بیوتیک پوررومایسین، تعداد $۰/۱×۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر در چاهک‌های پلیت ۱۲ خانه ریخته شد. به هر یک از چاهک‌ها به ترتیب میزان ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم در میکرولیتر آنتی‌بیوتیک پوررومایسین (Puromycin) (Sigma، آمریکا) اضافه شد. کشت در حضور آنتی‌بیوتیک به‌مدت ده روز ادامه داشت و درصد زنده بودن سلول‌ها در روزهای ۰، ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ تعیین شد. برای هر غلظت آنتی‌بیوتیک دو اندازه‌گیری انجام شد.

ترانسفکشن و ایجاد رده سلولی پایدار

ترانسفکشن (Transfection) با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipofectamine 2000) (Invitrogen، آمریکا) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای ایجاد رده سلولی پایدار، ناقل‌های pTPA و pMTPA با استفاده از آنزیم محدودکننده *Afl*III (New England Biolabs، انگلستان) خطی شده و به سلول ترانسفکت شد. برای هر ناقل دو ترانسفکشن مستقل انجام شد. پس از ٤۸ ساعت سلول‌ها به نسبت ۱:٦ رقیق شده و در محیط حاوی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر پوررومایسین کشت داده شدند. سلول‌های CHO ترانسفکت نشده نیز به‌عنوان کنترل در معرض آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند. پس از گذشت ۸ روز کلون‌های سلولی در سلول‌های ترانسفکت شده با ناقل‌های بیانی مشاهده شدند در حالی‌که درصد زنده بودن سلول‌های ترانسفکت نشده طی این مدت به صفر رسید. پس از این‌که تراکم سلول‌های نوترکیب در پلیت به ۹۰ درصد رسید سلول‌ها به فلاسک منتقل شدند و به‌مدت ۳-٤ هفته در محیط کشت حاوی۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پوررومایسین کشت داده شدند و پس از آن آنتی‌بیوتیک از محیط کشت حذف شد. در مرحله بعد به‌منظور بررسی الحاق ناقل‌های بیانی به ژنوم سلول‌های پایدار شده، DNA ژنومی سلول‌های ترانسفکت شده با ناقلین pTPA و pMTPA با استفاده از کیت استخراج DNA تخلیص شد و PCR انجام شد. در مورد سلول‌های پایدار حاوی ناقل pTPA از آغازگرهای رفت و برگشت اختصاصی برای ابتدا و انتهای ژن t-PA با توالی 5´-ATGGATGCAATGAAGAGAGG-3′ (رفت) و 5′-TCACGGTCGCATGTTGTCAC-3′ (برگشت) استفاده شد. در مورد سلول‌های پایدار ایجاد شده با ناقل pMTPA، آغازگرها به‌صورتی انتخاب شد که محل اتصال آغازگر رفت روی ناحیه متصل شونده به ماتریکس و محل اتصال آغازگر برگشت روی ژن t-PA قرار داشت. توالی آغازگرهای رفت و برگشت مورد استفاده در این مرحله به‌ترتیب به‌صورت 5´-TCTAAGCTTAGCAAGGTCGCCACG-3´ و 5′-GCTGTTCCAGTTGGTGCACTC-3′ بود.

بررسی میزان بیان t-PA

به‌منظور بررسی میزان بیان t-PA، رده‌های سلولی پایدار شده با هر یک از ناقلین pTPA و pMTPA با تعداداولیه $۰/۲×۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر کشت داده شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت محیط کشت سلولی جمع‌آوری و شمارش سلولی انجام شد. میزان بیان t-PA نوترکیب در محیط کشت سلول‌های پایدار با استفاده از کیت تعیین فعالیت (Trinity Biotech، ایرلند) تعیین شد. این کیت میزان فعالیت t-PA در واحد حجم را اندازه‌گیری می‌کند. برای محاسبه میزان تولید ویژه (Specific Productivity) فرمول زیر استفاده شد؛ 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].

$$Qp = \frac{P}{\frac{(X2 - X1)t}{\ln\frac{X2}{X1}}}$$

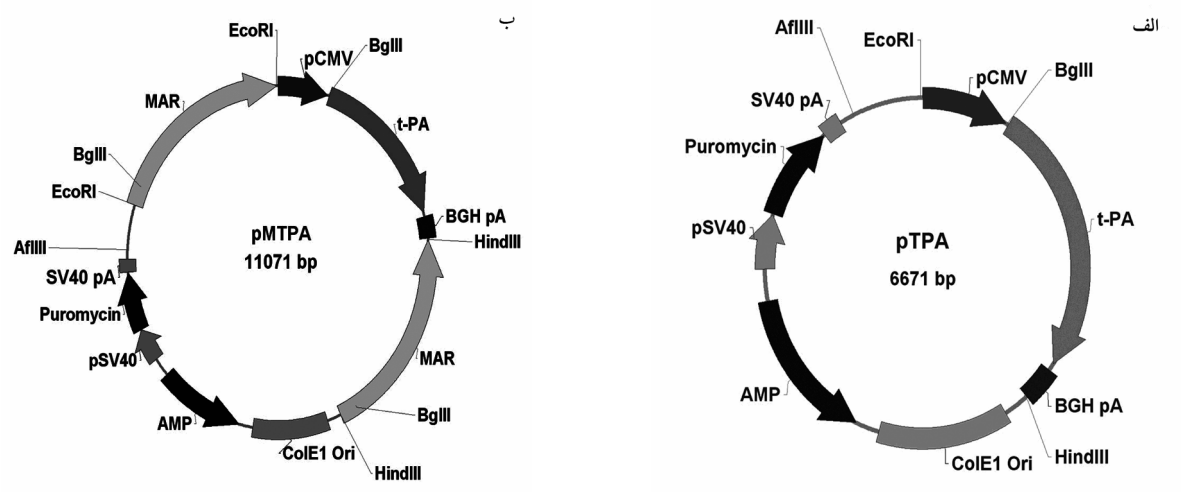
نتایج

طراحی و ساخت سازه‌های بیانی

در این تحقیق از ناقل pTPA که بیان‌کننده ژن t-PA و ژن

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

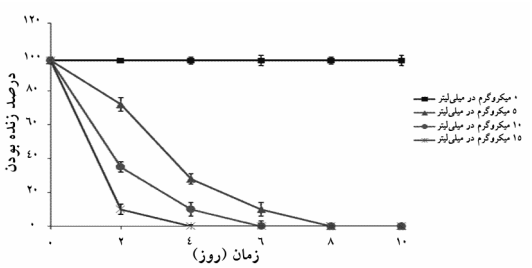
مقاومتی پوروماییسین است به‌عنوان سازه پایه استفاده شد. مطالعات نشان داده‌است زمانی‌که ناحیه متصل شونده به ماتریکس ژن IFN-β در دو سوی واحد بیان کننده ژن خارجی قرار گرفته باشد بیشترین کارایی را داراست؛ بنابراین یک کپی از این توالی در فرادست و کپی دیگر در فرودست بخش بیان کننده t-PA در ناقل بیانی پایه کلون شد که منجر به ایجاد سازه بیانی pMTPA شد. هضم آنزیمی این سازه با آنزیم *Bgl*II نشان‌دهنده آن بود که دو توالی MAR در جهت برعکس نسبت به یکدیگر قرار گرفته‌است. نقشه ناقل‌های به‌دست آمده در این تحقیق در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱ نمای شماتیک ناقل‌های بیانی طراحی شده برای بررسی اثر ناحیه متصل شونده به ماتریکس ژن اینترفرون بتا بر میزان بیان عامل فعال کننده پلاسمینوژن بافتی؛ (الف) ناقل pTPA فاقد توالی مربوط به ناحیه متصل شونده به ماتریکس بوده و به‌عنوان ناقل کنترل استفاده شده است. (ب) در ناقل pMTPA یک کپی از توالی در بردارنده ناحیه متصل شونده به ماتریکس در فرادست و کپی دیگر در فرودست واحد بیان کننده t-PA کلون شده است.

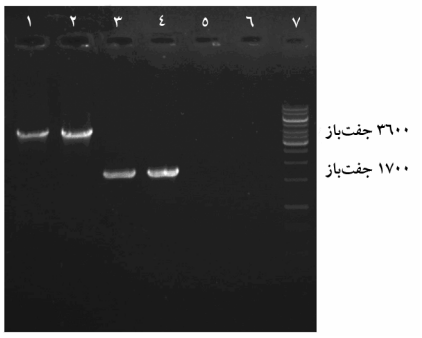
تعیین غلظت مؤثر آنتی‌بیوتیک پوروماییسین برای سلول‌های CHO

ناقل‌های بیانی مورد استفاده در این تحقیق دارای ژن مقاومتی پوروماییسین است، بنابراین غلظت مؤثر این آنتی‌بیوتیک برای سلول‌های CHO تعیین شد. به این منظور غلظت‌های ۱۵ و ۱۰، ۵، ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پوروماییسین در یک دوره ۱۰ روزه بررسی شد. به‌صورت معمول کمترین غلظت آنتی‌بیوتیک که در کوتاه‌ترین زمان سلول‌ها را از بین ببرد به‌عنوان غلظت مؤثر آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته می‌شود. همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر پوروماییسین درصد زنده بودن سلول‌ها طی چهار روز به ۲۸ درصد کاهش یافته و در روز هشتم به صفر رسیده است. به این ترتیب غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان مناسب‌ترین دوز آنتی‌بیوتیک برای سلول‌های CHO در نظر گرفته شد.



شکل ۲ سلول‌های CHO به‌مدت ۱۰ روز در معرض غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک پوروماییسین قرار گرفتند. درصد زنده بودن در روزهای ۰، ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ محاسبه شد. غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر که طی ۸ روز تمام سلول‌ها را از بین برد به‌عنوان غلظت مؤثر شناسایی شد. نتایج نشان داده شده میانگین دو اندازه‌گیری مستقل است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]



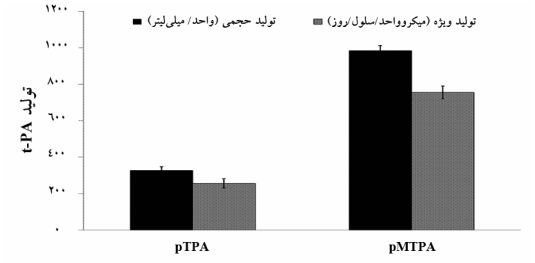
شکل ۳ الکتروفورز ژل آگارز برای محصولات PCR روی DNA ژنومی سلول‌های پایدار شده با ناقل‌های pTPA، pMTPA و سلول‌های CHO ترانسفکت نشده (کنترل)؛ ستون‌های ۱ و ۲ سلول‌های پایدار شده با ناقل pMTPA، ستون‌های ۳ و ٤ سلول‌های پایدار شده با ناقل pTPA، ستون‌های ٥ و ٦ سلول‌های CHO کنترل و ستون ۷ نشانگر DNA

ایجاد رده‌های سلولی پایدار بیان کننده عامل فعال کننده پلاسمینوژن بافتی

با توجه به این‌که نقش اصلی نواحی متصل شونده به ماتریکس حفاظت از ژن‌ها در مقابل محیط کروماتینی اطراف است، بررسی اثر این عوامل بر ژن خارجی تنها در بیان پایدار امکان‌پذیر است. پس از ترانسفکشن سلول‌های CHO با هر یک از ناقل‌های pTPA و pMTPA، سلول‌های دربردارنده پلاسمید بیانی در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک پوروماییسین انتخاب شدند. پس از انجام پاساژهای متوالی در محیط کشت حاوی پوروماییسین به‌مدت سه تا چهار هفته، در نهایت آنتی‌بیوتیک از محیط کشت حذف شد. در مرحله بعد ادغام سازه‌های بیانی pTPA و pMTPA در ژنوم سلول‌های پایدار شده از طریق انجام PCR بررسی شد. نتایج این مرحله در شکل ۳ نشان داده شده است. در این شکل قطعه ۳٦۰۰ جفت‌بازی مطابق با توالی در بر دارنده ناحیه متصل شونده به ماتریکس، راه‌انداز CMV و بخشی از ژن t-PA در PCR مربوط به سلول‌های حاوی pMTPA (ستون‌های ۱ و ۲)، و قطعه ۱۷۰۰ جفت‌بازی مطابق با توالی کد کننده t-PA در PCR مربوط به سلول‌های پایدار شده با ناقل pTPA (ستون‌های ۳ و ٤) قابل مشاهده است. در حالی‌که در مورد سلول‌های ترانسفکت نشده (ستون‌های ٥ و ٦) تکثیری مشاهده نمی‌شود. ستون ۷ نشانگر DNA را نشان می‌دهد.

بررسی میزان بیان فاکتور فعال کننده پلاسمینوژن بافتی در رده‌های سلولی پایدار

برای بررسی بیان t-PA، هر یک از رده‌های سلولی پایدار شده به‌مدت ۷۲ ساعت در پلیت‌های شش خانه کشت داده شد. میزان بیان t-PA در هر رده بر حسب واحد فعالیت آنزیمی در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد و میزان تولید ویژه (Specific Productivity) محاسبه شد. همان‌گونه که در شکل ٤ نشان داده شده است میزان تولید حجمی و تولید ویژه در سلول‌های پایدار شده با ناقل pMTPA به‌ترتیب ۹۸٤ واحد در هر میلی‌لیتر و ۷٥٥ میکرو واحد/سلول/روز (μU/cell/day) محاسبه شده است که در مقایسه با سلول‌های ایجاد شده با ناقل pTPA با میزان بیان ۳۲۷ واحد در هر میلی‌لیتر و ۲٥٦ میکرو واحد/سلول/روز سه برابر افزایش نشان می‌دهد.



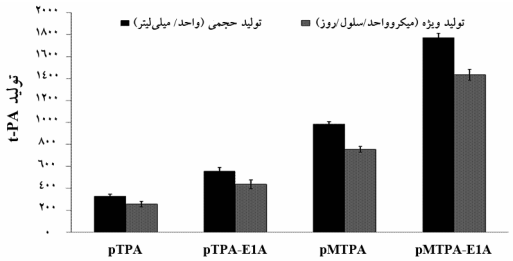
شکل ٤ مقایسه میزان بیان t-PA در رده‌های سلولی پایدار شده با ناقل‌های pTPA و Pmtpa؛ سلول‌ها با تعداد اولیه $۰/۲×۱۰^{٦}$ سلول در میلی‌لیتر در پلیت‌های شش خانه کشت داده شدند. بیشترین میزان بیان در سلول‌های ترانسفکت شده با ناقل pMTPA مشاهده شد. نتایج نشان داده شده میانگین حاصل از سه اندازه‌گیری مستقل است.

فعال‌سازی راه‌انداز CMV از طریق بیان موقتی ژن E1A 13S

به‌منظور بررسی این‌که آیا بیان E1A 13S در سلول‌های پایدار شده با ناقل حاوی ناحیه متصل شونده به ماتریکس

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

می‌تواند اثر افزایشی بیشتری در میزان بیان t-PA داشته باشد، در مرحله بعد سلول‌های پایدار شده با ناقل‌های pTPA و pMTPA با ناقل بیان کننده E1A 13S ترانسفکت شدند و میزان بیان t-PA در محیط کشت سلولی بعد از گذشت ۷۲ ساعت بررسی شد. نتایج این بررسی در شکل ۵ نشان داده شده است. در این شکل سلول‌های پایدار ترانسفکت شده با پلاسمید بیان کننده E1A 13S به‌صورت pTPA-E1A و pMTPA-E1A نام‌گذاری شده‌اند. همان‌گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود بیان موقتی E1A 13S میزان بیان t-PA از هر دو ناقل pTPA و pMTPA را به‌میزان ۱/۷– ۱/۹ برابر افزایش داده است. به این ترتیب بیشترین میزان تولید حجمی و تولید ویژه که به‌ترتیب ۱۷۷۱ واحد در هر میلی‌لیتر و ۱٤۳٤ میکرو واحد/سلول/روز محاسبه شده است مربوط به سلول‌های pMTPA-E1A است. این نتیجه اثر هم‌افزایی افزایش رونویسی از طریق دو مکانیسم فعال‌سازی راه‌انداز و به‌کارگیری ناحیه متصل شونده به ماتریکس را نشان می‌دهد.



شکل ۵ بررسی اثر بیان موقت ژن E1A 13S بر میزان بیان t-PA در رده‌های سلولی پایدار ایجاد شده با ناقل حاوی ناحیه متصل شونده به ماتریکس (pMTPA) و ناقل کنترل (pTPA). در هر مورد رده‌های سلولی ترانسفکت نشده با پلاسمید بیان کننده E1A 13S به‌عنوان کنترل استفاده شدند. میزان بیان t-PA پس از ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داده شده میانگین سه اندازه‌گیری مختلف در هر مورد است.

بحث

در سال‌های اخیر به استفاده از عوامل ساختاری ژنوم در مطالعات بیان ژن به‌صورت گسترده توجه شده است. از جمله این عوامل می‌توان به نواحی متصل شونده به ماتریکس (MARs) اشاره نمود [۳]. اگرچه مکانیسم دقیق عملکرد MARها به‌خوبی مشخص نشده است ولی مطالعات متعددی نقش کلیدی این نواحی در سازمان‌دهی ساختار کروماتین و کنترل بیان ژن را نشان داده‌است. در واقع مشخص شده است که MARها از یک سو با ایجاد دومن‌های کروماتینی (Chromatin Domain) مجزا ژن‌های موجود در هر دومن را از قرار گرفتن در معرض تغییرات کروماتینی مجاور حفظ می‌کند و از سوی دیگر از طریق فراخوانی پروتئین‌های تغییر دهنده ساختار کروماتین، ایجاد ساختار کروماتینی باز را در محل القا می‌کند [۲۰، ۲۱].

با توجه به خصوصیات گفته شده توالی‌های متصل شونده به ماتریکس اهداف مناسبی برای مهندسی پلاسمیدهای بیانی به‌شمار می‌رود. بنابراین در این مطالعه ناقل بیانی حاوی ناحیه متصل شونده به ماتریکس از ژن اینترفرون بتای انسانی برای ایجاد رده سلولی پایدار بیان کننده عامل فعال کننده پلاسمینوژن بافتی استفاده شده‌است.

ناحیه متصل شونده به ماتریکس از ژن اینترفرون بتای انسانی یک توالی غنی از نوکلئوتیدهای A و T به طول ۲۲۰۰جفت‌باز است. مشخص شده است زمانی‌که این توالی در هر دو سوی واحد بیانی ژن مورد نظر قرار گیرد بهترین عملکرد را نشان خواهد داد. از طرفی جهت قرارگیری این توالی در پلاسمید بیانی در عملکرد آن مؤثر نیست [۸]. بنابراین در این تحقیق ناقل بیانی به‌صورتی طراحی شد که یک ناحیه MAR در فرادست و ناحیه دیگر در فرودست واحد بیان کننده t-PA قرار گیرد. سلول‌های ترانسفکت شده با ناقل بیانی کنترل و ناقل حاوی MAR در محیط کشت حاوی غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک پوروماپسین قرار داده شدند. پس از این‌که کلون‌های ایجاد شده در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک رشد کردند غلظت پوروماپسین در محیط به ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر افزایش داده شد و سلول‌ها به‌مدت سه تا چهار هفته در این شرایط کشت داده شدند. انتظار می‌رود

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

کشت متوالی سلول‌ها در محیط حاوی غلظت‌های بالاتر آنتی‌بیوتیک در طول زمان منجر به غنی شدن مجموعه سلولی پایدار از سلول‌های دارای بیان بالاتر شود. پس از آن وجود توالی کد کننده t-PA در ژنوم سلول‌های پایدار از طریق انجام PCR به‌اثبات رسید.

بررسی میزان بیان t-PA در محیط کشت سلول‌های پایدار شده افزایش بیان به‌میزان سه برابر را در سلول‌های ایجاد شده با ناقل حاوی ناحیه متصل‌شونده با ماتریکس (pMTPA) نسبت به سلول‌های در بردارنده ناقل کنترل (pTPA) نشان داد. به‌صورتی که تولید اختصاصی در سلول‌های پایدار شده با pMTPA و pTPA به‌ترتیب ۷٤٦ و ۲٥٦ میکروواحد/ سلول/ روز محاسبه شد. این نتیجه با داده‌های به‌دست آمده توسط سایر محققین هم‌خوانی دارد. به‌عنوان مثال کیم (Kim) و همکاران با به‌کارگیری ناقل بیانی حاوی IFN-β MAR افزایش بیان شش برابری را در میزان تولید بتا گالاکتوزیداز گزارش کرده‌اند [۸]. هم‌چنین گزارش‌هایی مبنی بر افزایش بیان به‌میزان پنج تا شش برابر در تولید ژن گزارشگر کلرامفنیکل استیل ترانسفراز (CAT) با استفاده از ناحیه متصل شونده به ماتریکس ژن بتاگلوبین به ثبت رسیده است [۲۲]. بدیهی است میزان افزایش بیان در هر مورد تا حد زیادی به خصوصیات ساختاری پروتئین هدف و طراحی ناقل بیانی بستگی دارد.

اگرچه استفاده از نواحی متصل شونده به ماتریکس میزان پایه بیان ژن مورد نظر را افزایش می‌دهد اما به‌منظور دست‌یابی به کلون‌های سلولی که قابلیت استفاده در تولید صنعتی پروتئین‌های نوترکیب را داشته باشند، گاهی لازم است روش‌های دیگری به‌صورت هم‌زمان با این رویکرد استفاده شود. برای مثال در مطالعه کیم و همکاران نشان داده شده است که با قرار دادن ژن دی هیدروفولات ردوکتاز (DHFR) روی ناقل حاوی MAR و انجام فرآیند تکثیر ژنی در حضور ممانعت کننده آنزیمی DHFR می‌توان با انجام تنها دو دور فرآیند تکثیر ژنی کلون‌هایی با ۳-٤ برابر افزایش بیان را از سلول‌های بیان‌کننده اریتروپوئتین (Erythropoietin) و عامل رشد هپاتوسیت (Hepatocyte Growth Factor) جداسازی نمود. همچنین افزایش پایداری بیان این کلون‌ها در مقایسه با کلون‌هایی که در آن‌ها فرآیند تکثیر ژنی با ناقل‌های فاقد MAR انجام شده نشان داده شده است [۸].

فعال‌سازی راه‌انداز از طریق بیان عوامل رونویسی نیز یکی از روش‌هایی است که برای افزایش میزان رونویسی از ژن خارجی استفاده می‌شود. مشخص شده است که پروتئین E1A 13S از آدنوویروس (Adenovirus) قابلیت فعال‌سازی راه‌انداز CMV و افزایش میزان رونویسی از آن را دارد [١٦]. با توجه به این‌که ناقلین مورد استفاده در این تحقیق دارای راه‌انداز CMV هستند، در مرحله روش فعال‌سازی راه‌انداز از طریق بیان پروتئین E1A 13S بررسی شد که افزایش بیان به‌میزان ۱/۷-۱/۹ برابر را به‌دنبال داشت. به این ترتیب میزان بیان t-PA در محیط کشت سلول‌های پایدار شده با ناقل pMTPA به ۱۷۷۱ واحد در هر میلی‌لیتر رسید. لازم به ذکر است که بررسی بیان پروتئین E1A 13S در سلول‌های CHO و نیز مقایسه میزان mRNAی ژن t-PA در سلول‌های ترانسفکت شده با ژن E1A 13S و سلول‌های کنترل ترانسفکت نشده در برنامه کاری مطالعات بعدی قرار دارد.

این میزان از فعالیت قابل رقابت با مقادیری است که در سلول اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) (۳-۷ واحد در هر میلی‌لیتر) [۲۳] سلول CHO تغییر نیافته (۵۰ واحد در هر میلی‌لیتر) [۱۷] و انگل غیر بیماری‌زای لیشمانیا (*Leishmania*) (٤۸۰ واحد در هر میلی‌لیتر) [٢٤] گزارش شده است. با توجه به این‌که ژن E1A 13S در این تحقیق به‌صورت گذرا بیان شده بود به‌نظر می‌رسد بررسی کارایی این ژن در بیان پایدار نیز می‌تواند به‌عنوان یک راه‌کار در افزایش بیان t-PA از ناقل حاوی ناحیه متصل شونده به ماتریکس از ژن اینترفرون بتا در آینده مورد بررسی قرار گیرد.

به‌صورت خلاصه نتایج این تحقیق نشان می‌دهد استفاده از ناحیه متصل شونده به ماتریکس ژن اینترفرون بتا در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

طراحی پلاسمید بیانی به‌همراه به‌کارگیری روش فعال‌سازی راه‌انداز می‌تواند به‌عنوان یک روش مؤثر در افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب به‌کار گرفته شود. بدیهی است استفاده از روش‌های تکثیر ژنی یا بیان پایدار ژن‌های فعال کننده راه‌انداز می‌تواندامکان دست‌یابی به میزان بیان بالاتری را فراهم کند.

تشکر و قدردانی

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

منابع

[1] Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat Biotechnol 2004; 22(11): 1393-8.

[2] Matasci M, Baldi L, Hacker DL, Wurm FM. The PiggyBac transposon enhances the frequency of CHO stable cell line generation and yields recombinant lines with superior productivity and stability. Biotechnol Bioeng 2011; 108(9): 2141-50.

[3] Harraghy N, Buceta M, Regamey A, Girod PA, Mermod N. Using matrix attachment regions to improve recombinant protein production. Methods Mol Biol 2012; 801: 93-110.

[4] Kwaks TH, Otte AP. Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells. Trends Biotechnol 2006; 24(3): 137-42.

[5] Bode J, Benham C, Knopp A, Mielke C. Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2000; 10(1): 73-90.

[6] Sjeklocha L, Chen Y, Daly MC, Steer CJ, Kren BT. β-globin matrix attachment region improves stable genomic expression of the Sleeping Beauty transposon. J Cell Biochem 2011; 112(9): 2361-75.

[7] Recillas-Targa F, Valadez-Graham V, Farrell CM. Prospects and implications of using chromatin insulators in gene therapy and transgenesis. Bioessays 2004; 26(7): 796-807.

[8] Kim JD, Yoon Y, Hwang HY, Park JS, Yu S, Lee J, Baek K, Yoon J. Efficient selection of stable chinese hamster ovary (CHO) cell lines for expression of recombinant proteins by using human interferon beta SAR element. Biotechnol Prog 2005; 21(3): 933-7.

[9] Wang F, Wang TY, Tang YY, Zhang JH, Yang XJ. Different matrix attachment regions flanking a transgene effectively enhance gene expression in stably transfected Chinese hamster ovary cells. Gene 2012; 500(1): 59-62.

[10] Zahn-Zabal M, Kobr M, Girod PA, Imhof M, Chatellard P, de Jesus M, Wurm F, Mermod N. Development of stable cell lines for production or regulated expression using matrix attachment regions. J Biotechnol 2001; 87(1): 29-42.

[11] Girod PA, Zahn-Zabal M, Mermod N. Use of the chicken lysozyme 5' matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines. Biotechnol Bioeng 2005; 91(1): 1-11.

[12] Kim JM, Kim JS, Park DH, Kang HS, Yoon J, Baek K, Yoon Y. Improved recombinant gene

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

expression in CHO cells using matrix attachment regions. J Biotechnol 2004; 107(2): 95-105.

[13] Kwon RJ, Kim SK, Lee SI, Hwang SJ, Lee GM, Kim JS, Seol W. Artificial transcription factors increase production of recombinant antibodies in Chinese hamster ovary cells. Biotechnol Lett 2006; 28(1): 9-15.

[14] Katakura Y, Seto P, Miura T, Ohashi H, Teruya K, Shirahata S. Productivity enhancement of recombinant protein in CHO cells via specific promoter activation by oncogenes. Cytotechnology 1999; 31(1-2): 103-9.

[15] Pei R, Berk AJ. Multiple transcription factor binding sites mediate adenovirus E1A transactivation. J Virol 1989; 63(8): 3499-506.

[16] Sanchez TA, Habib I, Leland Booth J, Evetts SM, Metcalf JP. Zinc finger and carboxyl regions of adenovirus E1A 13S CR3 are important for transactivation of the cytomegalovirus major immediate early promoter by adenovirus. Am J Respir Cell Mol Biol 2000; 23(5): 670-7.

[17] Rouf SA, Moo-Young M, Chisti Y. Tissue-type plasminogen activator: characteristics, applications and production technology. Biotechnol Adv 1996; 14(3): 239-66.

[18] Baruah DB, Dash RN, Chaudhari MR, Kadam SS. Plasminogen activators: a comparison. Vascul Pharmacol 2006; 44(1): 1-9.

[19] Brezinsky SC, Chiang GG, Szilvasi A, Mohan S, Shapiro RI, MacLean A, Sisk W, Thill G. A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. J Immunol Methods 2003; 277(1-2): 141-55.

[20] Bode J, Goetze S, Heng H, Krawetz SA, Benham C. From DNA structure to gene expression: mediators of nuclear compartmentalization and dynamics. Chromosome Res 2003; 11(5): 435-45.

[21] Boulikas T. Nature of DNA sequences at the attachment regions of genes to the nuclear matrix. J Cell Biochem 1993; 52(1): 14-22.

[22] Wang TY, Yang R, Qin C, Wang L, Yang XJ. Enhanced expression of transgene in CHO cells using matrix attachment region. Cell Biol Int 2008; 32(10): 1279-83.

[23] Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Goeddel DV, Collen D. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. Nature 1983; 301(5897): 214-21.

[24] Hemayatkar M, Mahboudi F, Majidzadeh-A K, Davami F, Vaziri B, Barkhordari F, Adeli A, Mahdian R, Davoudi N. Increased expression of recombinant human tissue plasminogen activator in Leishmania tarentolae. Biotechnol J 2010; 5(11): 1198-206.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]