

A Study of the Effect of Human Prothrombin's Signal Peptide on the Secretion Efficiency of Recombinant Human FIX in the HEK293T Cell Line

Shohreh Khorshidi¹, Alireza Zomorodipour^{2*}, Mehrdad Behmanesh³

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Molecular Medicine, Institute of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Box: 14065/161, Department of Molecular Medicine, Institute of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
Email: zomorodi@nigeb.ac.ir

Received: 05/May/2015, Accepted: 06/Jul/2015

Abstract

Objective: Eukaryotic proteins generally have signal peptides which are not only crucial for their secretion efficiencies but are important for their expression levels. Coagulation factor IX (FIX) is a glycoprotein that plays a fundamental role in the blood coagulation pathway. Reduced levels or dysfunctional FIX are associated with hemophilia B. This study investigates the function of the human prothrombin signal peptide in an attempt to improve the human FIX (hFIX) secretion efficiency in a heterologous expression system. With this aim, we have used the SignalP and PrediSi programs for in silico evaluation of the signal peptide efficiency prior to conducting this experiment.

Methods: We used molecular techniques to amplify and join the coding region of the human prothrombin signal peptide to the cDNA of mature hFIX. The chimeric fragment was examined for transient expression in a mammalian cell line (HEK293T) in comparison with the native hFIX, under a CMVp regulation. Using the neural network-based prediction programs, we evaluated the scores for cleavage position and secretion efficiency of the human prothrombin and hFIX signal peptides. The expression efficiencies of hFIX expressed by the recombinant cells were analyzed by RT-PCR and ELISA.

Results: In silico analysis more efficiently predicted the human prothrombin signal peptide with a high score compared to the native hFIX signal peptide. This data was confirmed by the RT-PCR and ELISA results obtained from expression analyses at the RNA and protein levels, respectively.

Conclusion: The present study showed that the signal peptide derived from the human prothrombin has the potential for efficient secretion of hFIX as evidenced by the results taken from a transient expression system. The results were consistent with in silico analysis. This replacement could be evaluated in a stable state condition.

Keywords: Human factor IX, Prothrombin, Secretion efficiency, Signal peptide

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No. 2, Pages: 27-39

بررسی تأثیر استفاده از پپتید نشانه پروترومبین انسانی بر کارایی ترشح فاکتور ۹ انسانی در رده سلولی HEK293T

شهره خورشیدی^۱، علیرضا زمردی پور^{۲*}، مهرداد بهمنش^۳

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه پزشکی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۱۴۹۶۵/۱۶۱، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، گروه پزشکی مولکولی

Email: zomorodi@nigeb.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۴/۰۴/۱۵

دریافت مقاله: ۹۴/۰۲/۱۵

چکیده

هدف: به طور عمده پروتئین‌های یوکاریوتی دارای پپتید نشانه هستند که نه تنها نقش محوری در کارایی ترشح دارند بلکه در بیان پروتئین نیز اهمیت دارند. فاکتور ۹ انعقادی، گلیکوپروتئینی است که نقش محوری در مسیر انعقاد خون ایفا می‌کند. نقص یا کاهش تولید فاکتور ۹ منجر به بیماری هموفیلی B می‌شود. در این پژوهش، با هدف افزایش و کارایی ترشح پروتئین فاکتور ۹، عملکرد پپتید نشانه پروترومبین انسانی در سامانه بیانی هترولوگ بررسی شد. به این منظور، کارایی ترشح پپتیدهای نشانه ابتدا با برنامه‌های رایانه‌ای SignalP و PrediSi و سپس به صورت عملی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: با استفاده از روش‌های مولکولی، تکثیر پپتید نشانه پروترومبین انسانی و الحاق آن به بخش بالغ cDNA فاکتور ۹ انسانی انجام شد. سپس قطعه کایمریک حاصل در مقایسه با فاکتور ۹ انسانی با پپتید نشانه بومی در رده سلولی HEK293T تحت تنظیم پروموتور سیتومگالوویروس (CMV) در شرایط گذرا به طور عملی آزمایش شد. با استفاده از نرم‌افزارهای پیشگویی کننده مبتنی بر الگوریتم شبکه‌های عصبی، امتیازی برای جایگاه برش و کارایی ترشح پپتید نشانه پروترومبین انسانی و بومی فاکتور ۹ ارزیابی شد. میزان فاکتور ۹ بیان شده در محیط کشت سلول‌های نوترکیب با RT-PCR و الایزا بررسی شد.

نتایج: بررسی‌های رایانه‌ای پیشگویی نمود که پپتید نشانه پروترومبین انسانی در مقایسه با پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ کارآمدتر است. این پیشگویی با استفاده از روش‌های RT-PCR و الایزا علیه RNA کایمری و نیز پروتئین نوترکیب FIX به ترتیب تأیید شد.

نتیجه‌گیری: تحقیق حاضر نشان داد که پپتید نشانه پروترومبین انسانی نسبت به پپتید نشانه بومی پروتئین فاکتور ۹ از کارایی بالاتری برخوردار است. این موضوع با پیش‌بینی‌های حاصل از برنامه‌های رایانه‌ای مطابقت دارد. نتیجه این جایگزینی می‌تواند در فاز بیان پایدار بررسی شود.

کلیدواژگان: فاکتور ۹ انسانی، پروترومبین، کارایی ترشح، پپتید نشانه

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، صفحات: ۲۷-۳۹

مقدمه

بیش از زنان است. فراوانی بیماری هموفیلی نوع B [بیماری کریسمس (Christmas disease)] یک در هر ۲۵۰۰۰-۳۰۰۰۰

بیماری هموفیلی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های انعقادی ژنتیکی و وابسته به جنس است که احتمال وقوع آن در مردان

تأثیر پپتید نشانه پروترومبین انسانی بر کارایی ترشح فاکتور ۹ انسانی

آب‌گریز پپتید نشانه و پروپیتید (پری-پرو) هستند. پپتید نشانه‌ها در این میان نقشی کلیدی در هدایت و جایابی پروتئین‌های ترشحاتی و غشایی ایفا می‌کند [۵]. یکی از راه‌کارهای جایگزین برای دستیابی به بیان انبوه فاکتور ۹ بهینه‌سازی فرآیند ترشح این پروتئین با انتخاب پپتید نشانه مناسب است. در سلول‌های یوکاریوتی پپتید نشانه پروتئین‌های ترشحاتی بین ۱۵ تا ۳۰ اسید آمینه طول دارد. اغلب این چنین توالی در انتهای آمینی توالی پپتید بالغ، باعث شناخته شدن آن پروتئین به عنوان یک پروتئین ترشحاتی می‌شود. اکثر پپتید نشانه‌ها دارای یک ناحیه قطبی بازی (N) در انتهای آمینی، هسته آب‌گریز (H) و انتهای قطبی (C) در انتهای کربوکسیل هستند [۶]. ناحیه H بیشترین نقش را در انتقال پروتئین به شبکه اندوپلاسمی دارد و افزایش در بار قلبایی ناحیه N و افزایش آب‌گریزی در ناحیه H می‌تواند ترشح پروتئین را تا ۳/۵ برابر افزایش دهد [۷]. چندین برنامه برای پیشگویی پپتیدهای نشانه به کار گرفته شده است از جمله برنامه‌های PSORT, PHYLSEAN, SignalP, و PrediSi [۸]. داده‌های حاصل از دو برنامه SignalP و PrediSi کیفیت ساختاری و جایگاه برش در پپتید نشانه را پیشگویی می‌کند [۸]. اگر چه توالی پپتید نشانه در میان پروتئین‌های وابسته به ویتامین K متفاوت است، ولی شباهت قابل توجهی در ناحیه پروپیتید دارند. ناحیه پروپیتید در میان پروتئین‌های وابسته به ویتامین K شدیداً حفاظت شده است و یک جایگاه شناسایی برای اتصال آنزیم گاما کربوکسیلاز برای انجام گاما کربوکسیلاسیون را در این پروتئین‌ها فراهم می‌کند [۹]. پروترومبین انسانی، گلیکوپروتئینی تک زنجیره‌ای است که در کبد تولید و ذخیره می‌شود و در پلاسمای خون نیز وجود دارد و در حضور ترومبوپلاستین و یون‌های کلسیم طی فرایند انعقاد به ترومبین تبدیل می‌شود. تولید این پروتئین نیز نیازمند ویتامین K است. رونوشت پروترومبین یک پروتئین چند ناحیه‌ای را کد می‌کند [۱۰]. هدف از این بررسی، بهبود بیان و ترشح فاکتور ۹ انسانی در رده سلولی پستانداران با تأکید بر جایگزینی پپتید نشانه

تولد نوزاد مذکر در سطح جهان است [۱]. یکی از چالش‌های عمده در درمان بیماران هموفیلی B نیاز به فاکتور ۹ انعقادی پلاسمایی یا نو ترکیب با دُز بالا است. تهیه فاکتور ۹ از پلاسمای در مقیاس بالا با توجه به میزان اندک آن در خون، هزینه تولید آن را سنگین و خطر سرایت بیماری‌های خونی به دلیل مشکلات موجود در ویروس‌زدایی از آن را افزایش می‌دهد. بنابراین تولید فاکتور ۹ به روش نو ترکیب می‌تواند با توجه به اهمیت و نقش این عامل روش مناسب و ایمن برای حل مشکلات موجود در درمان هموفیلی نوع B باشد [۲]. فاکتور ۹ انعقادی که به عنوان یک پیش‌ساز غیر فعال در جریان خون در حال گردش است، در جریان انعقاد پس از فعال‌سازی به وسیله فاکتور ۱۱ فعال (XIIa) یا فاکتور بافتی ۷ فعال (VIIa) در مرحله میانی مسیر درونی انعقاد خون شرکت می‌کند [۳]. محصول ترجمه آن پروتئین پیش‌ساز فاکتور ۹ با ۶۱ اسید آمینه است. با توجه به تغییرات بعد از ترجمه فاکتور ۹، میزان مناسب برای تولید آن با استفاده از فناوری DNA نو ترکیب، سلول‌های پستانداران هستند. اما نشان داده شده است که تنها کمتر از ۱۰ درصد از پروتئین‌های وابسته به ویتامین K ترشحاتی نو ترکیب در سامانه پستانداران به طور کامل گاما کربوکسیله و فعال است. از آنجایی که فعالیت زیستی پروتئین فاکتور ۹ به تغییرات صحیح بعد از ترجمه متکی است، بنابراین به کارگیری میزان مناسب برای این منظور دارای اهمیت است. مراحل پردازش بعد از ترجمه شامل: حذف پری-پرو پپتید، گاما کربوکسیلاسیون ۱۲ گلوتامیک اسید انتهای آمینی، بتا هیدروکسیلاسیون آسپارتیک اسید و گلیکوزیلاسیون است. گاما کربوکسیلاسیون فاکتور ۹ که تأثیر اساسی در عملکرد این پروتئین دارد توسط آنزیم گاما گلوتامیل کربوکسیلاز انجام می‌شود که یک پروتئین داخل غشایی با حداقل ۵ ناحیه است و منطقه انتهای کربوکسیل آن در فضای شبکه اندوپلاسمی قرار می‌گیرد [۴]. بررسی محصول ترجمه پروتئین‌های وابسته به ویتامین K نشان می‌دهد که همگی مانند فاکتور ۹ ابتدا به عنوان مولکول‌های پیش‌ساز تولید می‌شوند و شامل هر دو توالی

بومی فاکتور ۹ با پپتید نشانه پروترومبین انسانی است.

Mapper و (<http://www.malundberg.gu.se/cutter2>)

Restriction (<http://www.restrictionmapper.org>) استفاده

شد.

مواد و روش‌ها

نرم افزارها و روش‌های نرم‌افزاری

از بانک اطلاعاتی NCBI و EBI برای دستیابی به توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن‌های فاکتور ۹ انعقادی (NC_000023.11) و پروترومبین انسانی (NC_000011.10) استفاده شد. برای پیش‌بینی برش و ارزش پپتید نشانه‌های مختلف همراه با فاکتور ۹ از برنامه آنالیز SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) [۱۱] و PrediSi (<http://www.predisi.de>) [۱۲] استفاده شد. برای رسم نمودار آب‌گریزی پپتیدهای نشانه از الگوریتم Eisenberg [۱۳] استفاده شد. برای مطالعه فایل‌های کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی از نرم‌افزار Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) و Chromas 2.01 (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Chromas-Lite.shtml>) استفاده شد. برای طراحی آغازگرها از نرم‌افزار Gene Runner 3.4 (<http://www.generunner.net>) و Oligo Analyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) و برای بررسی نقشه هضم آنزیمی توالی‌ها از برنامه آنالیز Webcutter2

طراحی و ساخت پلاسمیدهای نو ترکیب

باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) (Stratagene, آمریکا) به‌عنوان میزبان در مراحل همسانه‌سازی و برای تکثیر DNA پلاسمیدی استفاده شد. از پلاسمید pcDNA3 (Fermentas, آمریکا) به‌منظور بیان موقتی در میزبان‌های پستانداران استفاده شد. آغازگرهای طراحی شده برای انجام این پژوهش که ترادف آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده توسط شرکت تکاپوزیست (ایران) ساخته شد. جفت آغازگرهای hFIX-KpnI و hFIX-XhoI به‌صورت اختصاصی برای تکثیر cDNA فاکتور ۹ انسانی طراحی و ساخته شدند که به‌ترتیب پس از تکثیر منجر به ایجاد جایگاه‌های برشی KpnI و XhoI در ابتدا و انتهای cDNA می‌شدند. آغازگر hFIX-KpnI شامل توالی کوزاک (Kozak sequence) نیز است. همچنین آغازگرهای Hprot-KpnI و hFIX-XhoI به‌صورت اختصاصی باعث تکثیر cDNA ژن پروترومبین انسانی شده و به‌ترتیب در انتهاهای خود دارای جایگاه‌های برش برای آنزیم‌های KpnI و XhoI هستند.

جدول ۱ توالی و کاربرد آغازگرها و اندازه محصول تکثیری آن‌ها

طول قطعه (جفت باز)	کاربرد آغازگر	توالی آغازگرها	نام آغازگرها
۱۴۱۰	تکثیر فاکتور ۹ دارای توالی کوزاک انسانی	3' 5' GGGGT AC/C GCCACC ATGCAGCGCTGAAC F : 3' CCGC/T CGAGATCCATCTTTCATTAAGT GAGC 5' R :	hFIX-KpnI// hFIX-XhoI
۱۴۱۰	تکثیر فاکتور ۹ دارای توالی پری پرو پروترومبین انسانی	F : 5' GGGGT ACGCCACCATGGCGCACGT CCGAG 3' 3' CCGC/T CGAGATCCATCTTTCATTAAGT GAGC R : 5'	Hprot-KpnI // hFIX-XhoI
۱۱۷	تکثیر ناحیه‌ای از ژن فاکتور ۹ انسانی	CGGGT GAGCT T AGAAGT T TGTG 3' F : 5' 3' R : 5' GGT GGT T T GCT CCTGT ACTGA	hF9-RT R1//hF9-RT F1
۱۱۳	تکثیر ناحیه‌ای از ژن GAPDH	F : 5' AAGGT GAAGGT CGGAGT CAAC 3' R : 5' GGGT CATT GAT GGCAACAATA 3'	Hu-gapdhF/Hu-gapdHR

کشت سلول

میکرولیتتر از X-TREME GENE9 (Roche آلمان) به DNA رقیق شده اضافه شد و چندین مرتبه پیتاژ شد. سپس به منظور تشکیل مخلوط ترانسفکشن نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۱۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد و پس از آن، مخلوط حاصل به صورت قطره قطره اضافه شد و پلیت‌ها به آرامی تکان داده شد. بعد از ۴ ساعت از زمان ترانسفکشن بدون تعویض محیط، مقدار ۵ میکروگرم/میلی‌لیتر ویتامین k به همراه ۵۰۰ میکرولیتر FBS به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌های حاوی سلول‌ها تحت شرایط طبیعی رشد قرار گرفت.

بررسی بیان گذرا در سلول‌های HEK293T

برای بررسی بیان گذرا، دو ترانسفکشن جداگانه برای هر دو سازه انجام شد. ۴ ساعت بعد از ترانسفکشن محیط سلول‌ها با ۲ میلی‌لیتر محیط جدید دارای ویتامین k تعویض شد. سپس در فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن مایع رویی جمع‌آوری، سلول‌ها نیز شمارش و از آن لیز سلولی تهیه شد.

استخراج RNA

RNA تام از سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های نوترکیب با استفاده از کیزول (Qiagen، آلمان) استخراج شد. به صورت خلاصه در این روش، ابتدا به هر فلاسک ۱ میلی‌لیتر محلول کیزول اضافه شد، سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و پس از تکان‌های شدید به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰g سانتریفوژ شد. لایه رویی تشکیل شده شامل RNA به ویال جدید منتقل و نصف حجم کیزول، ایزوپروپانل به آن اضافه شد. پس از تکان‌های شدید ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰g سانتریفوژ شد. رسوب حاصل، دو بار با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد تا نمک‌های اضافی حذف شود و رسوب در معرض هوا خشک شود. به رسوب خشک

از سلول‌های HEK293T (کلیه جنینی) برای کشت در مرحله سلولی استفاده شد. تهیه و کشت دودمان‌های سلولی HEK293T بر طبق شرایط عمومی کشت سلول‌های یوکاریوتی انجام پذیرفت. محیط کشت سلول‌های مورد استفاده در این پژوهش (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium -Hams-F12 (Gibco, BRL Life Technology) (آلمان) با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: Invitrogen) و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (آمریکا) تکمیل شد و سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند.

دست‌ورزی DNA

پس از ساخت سازه‌های نوترکیب با روش‌های مولکولی همسانه‌سازی، تعیین توالی سازه‌های مولکولی بیان‌کننده فاکتور ۹ مبتنی بر pcDNA3 یکی مجهز به توالی پپتید نشانه پروترومبین انسانی که به cDNA فاکتور انسانی ۹ الحاق شده بود و دیگری پلاسمید مجهز به توالی‌های بومی فاکتور ۹، برای تأیید درستی cDNA بر اساس روش سنگر (Sanger یا di-deoxy) به صورت خودکار با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) و با استفاده از دستگاه Automated sequencer AB1 373A توسط شرکت MWG آلمان انجام شد.

ترانسفکشن با استفاده از X-TREME GENE 9

یک روز قبل از انجام واکنش ترانسفکشن (Transfection) سلول‌های HEK293T تریپسینه شدند. سپس سلول‌ها با تراکم ۲۵۰۰۰۰ سلول به ازای هر چاهک از ظروف کشت ۶ خانه‌ای در محیط کشت حاوی سرم و آنتی‌بیوتیک شناور شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر از سلول‌ها به هر چاهک منتقل شد و تحت شرایط طبیعی رشد انکوبه شدند. قبل از ترانسفکشن ۲ میکروگرم DNA در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم و آنتی‌بیوتیک حل شد و سپس ۶

اندازه گیری آنتی ژنیستی فاکتور ۹ انسانی بیان شده با روش الایزا (ELISA)

آنتی ژنیستی فاکتور ۹ نو ترکیب انسانی بیان شده در محیط کشت سلول های ترانسفکت شده با روش ساندویچ الایزا روی میکروپلیت هایی که با آنتی بادی های پلی کلونال ضد فاکتور ۹ پوشش داده شده بود (کیت Diagnostica Stago، فرانسه) انجام گرفت. فاکتور ۹ متصل شده به اولین آنتی بادی با استفاده از آنتی بادی ثانویه پلی کلونال خرگوشی ضد فاکتور ۹ که با پراکسیداز نشاندار شده بود و به شاخص آنتی ژنی دیگری از فاکتور ۹ متصل می شود آشکار شد. آشکارسازی ترکیب آنتی ژن - آنتی بادی بر اساس فعالیت تترا متیل بنزیدین (Tetramethylbenzidine: TMB) آنزیم پراکسیداز بر سوبسترا انجام شد. بعد از این که واکنش ها با اضافه کردن سولفوریک اسید متوقف شد رنگ به دست آمده در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد.

اندازه گیری فاکتور ۹ انباشته شده درون سلول

به منظور به دست آوردن مقدار پروتئین باقی مانده در سلول، سلول ها در ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده سرد (تریون x-100 ۵۰/۵ درصد، کلرید پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار، کلرید منیزیم ۲ میلی مولار و pH (HEPES: ۷/۵) و آنتی پروتئاز (Roche، آمریکا) مخلوط شدند، سپس به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و در نهایت لیز سلولی به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ (۱۲۰۰۰g، ۴ درجه سانتی گراد) شد. فاکتور ۹ موجود در محلول رویی (مایع رویی) با روش الایزا اندازه گیری شد.

نتایج

در این تحقیق پس از بررسی های رایانه ای، عملکرد دو پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ و پروترومبین انسانی در ترشح فاکتور ۹ در رده سلولی HEK293T در شرایط بیان گذرا مقایسه شد.

شده ۳۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز اضافه شد. کیفیت RNA تام با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و مشاهده باندهای ۱۸S و ۲۸S مربوط به RNA ریوزومی بررسی شد. تعیین کمیت RNA استخراج شده با استفاده از میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروسکوپی و با استفاده از دستگاه NanoDrop (مدل ۲۰۰۰ شرکت Thermo، آمریکا) انجام پذیرفت و نمونه ها در برودت ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

واکنش رونوشت برداری معکوس و واکنش زنجیره ای پلیمرز

به منظور حذف هرگونه آلودگی احتمالی با DNA میزان ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده با ۰/۱ میکرولیتر از آنزیم DNase I (Roche، آمریکا) در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر مجاور شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس با اضافه کردن یک میکرولیتر EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۵۰ میلی مولار و انکوباسیون در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه با آنزیم DNase I غیرفعال شد. cDNA توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MuLV (Fermentas، آمریکا) با استفاده از RNA تیمار شده با DNAase عاری از RNAase به عنوان الگو و آغازگرهای هگزامرهای تصادفی طبق روش استاندارد مربوط به استفاده از کیت ساخت cDNA (Roche، آمریکا) در دو مرحله متوالی ساخته شد. سپس قطعات تولید شده به عنوان الگو برای واکنش PCR استفاده شد. در این پژوهش از آغازگرهای اختصاصی RTF، RTR به منظور تکثیر اختصاصی ناحیه ای از ژن فاکتور ۹ انسانی و آغازگرهای اختصاصی Hu-gapdhF و Hu-gapdhR به عنوان کنترل داخلی برای تکثیر بخشی از توالی رمز کننده ژن گلیسرآلدئید - ۳ فسفات دهیدروژناز انسان (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۱).

تاثیر پپتید نشانه پروترومبین انسانی بر کارایی ترشح فاکتور ۹ انسانی

PrediSi بین ۰ و ۱ است. امتیاز بزرگتر از ۰/۵ به این مفهوم است که توالی مورد بررسی به احتمال خیلی زیاد شامل یک پپتید نشانه است [۱۲]. در برنامه SignalP مهم‌ترین امتیاز میانگینی از امتیاز تک تک آمینواسیدهای موجود در توالی پپتید نشانه است که تعیین کننده ترشحي و غير ترشحي بودن پروتئين است و با S-mean نشان داده می‌شود. امتیاز بالاتر از ۰/۵ پروتئين ترشحي و کمتر از آن غير ترشحي محسوب می‌شود [۱۱]. نتایج حاصل از پیش‌بینی پردازش پپتید نشانه با استفاده از برنامه PrediSi برای توالی پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ (شکل ۱ الف) و توالی پپتید نشانه پروترومبین انسانی (شکل ۱ ب) نشان داده شده است. نتایج حاصل از بررسی با برنامه SignalP نیز در (شکل ۲ الف) و (شکل ۲ ب) به ترتیب برای پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ انسانی و پروترومبین انسانی نشان داده شده است. نتایج بررسی با هر دو برنامه، مشخص کرد که پپتید نشانه پروترومبین انسانی نسبت به پپتید نشانه فاکتور ۹ از امتیاز بالاتری برخوردار است.

بررسی‌های رایانه‌ای

نتایج به دست آمده از بررسی پپتیدهای نشانه با نرم افزار

SignalP و PrediSi

از آنجایی که ساختار عمومی توالی‌های پپتید نشانه و عملکرد دستگاه ترشحي به خوبی حفاظت شده هستند، امکان استفاده از پپتید نشانه‌های غير خودی (هترولوگ) برای افزایش کارایی ترشح وجود دارد. در این رابطه، عملکرد ترشحي پپتید نشانه پروترومبین انسانی در کنار فاکتور ۹ انسانی آزمایش و بررسی شد. برای تکثیر قطعات رمز کننده توالی پپتید نشانه احتمالی، ۷۰ آمینواسید انتهایی آمینی رمز شده توسط رونوشت‌های مختلف ژن‌های مورد نظر توسط دو برنامه آنالین پیش‌بینی کننده پپتید نشانه PrediSi و SignalP ارزیابی شد. پارامترهای خروجی در این دو برنامه عبارتند از تخمین کلی حضور یا عدم حضور پپتید نشانه در توالی آمینواسید مورد بررسی، امتیازدهی برای پپتید نشانه و جایگاه برش تعیین شده برای سیگنال پپتیداز و ارزش پپتید نشانه. امتیاز داده شده در

الف



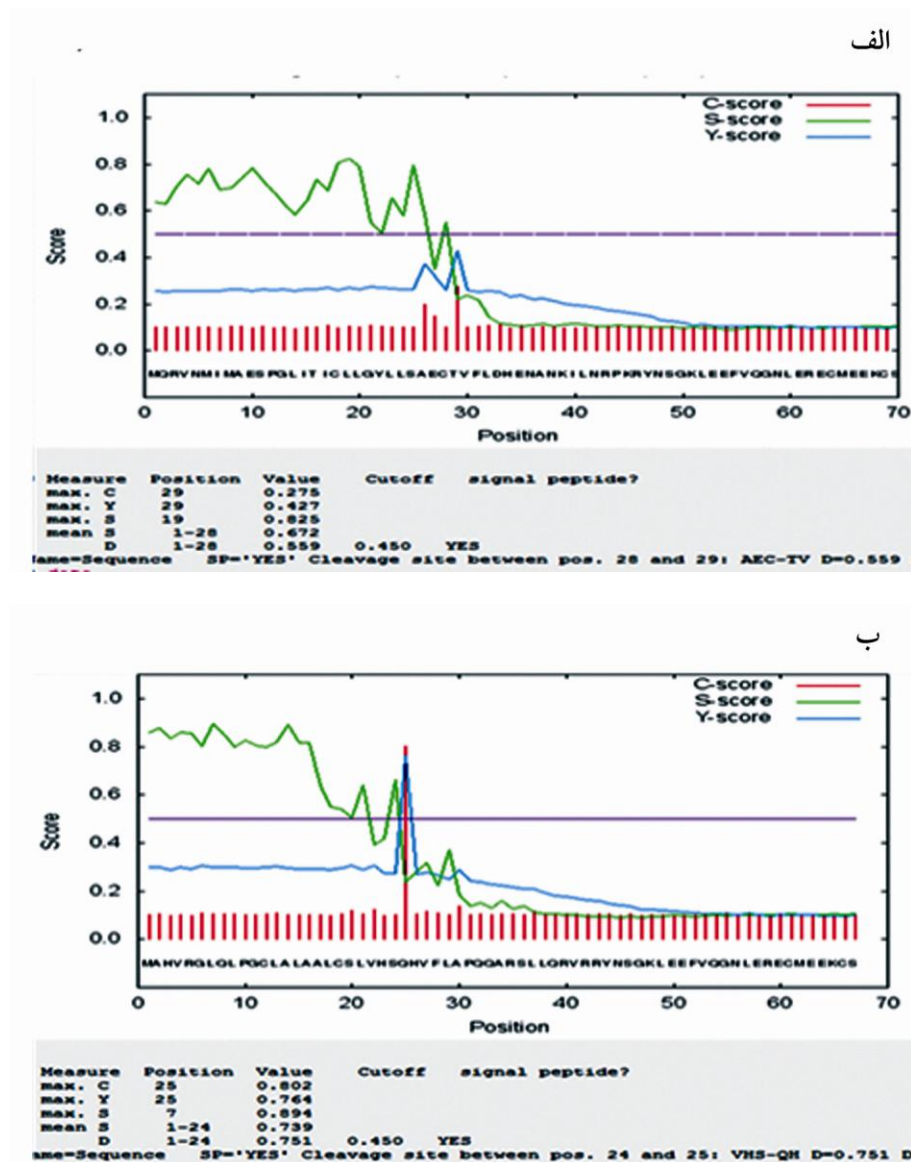
یوکاریوت	ماتریکس
۷۰ اسید آمینه	کوتاه سازی
۲۸	جایگاه برش
۰/۵۳۲۴	نمره
پیش بینی شده برای ترشح	وضعیت پیش بینی

ب



یوکاریوت	ماتریکس
۷۰ اسید آمینه	کوتاه سازی
۲۴	جایگاه برش
۰/۷۰۳۳	نمره
پیش بینی شده برای ترشح	وضعیت پیش بینی

شکل ۱ بررسی توالی پپتید نشانه با برنامه آنالین PrediSi. (الف) پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ (نمره: ۰/۵۳۲۴)، (ب) پپتید نشانه پروترومبین انسانی به همراه فاکتور ۹ (نمره: ۰/۷۰۳۳)



شکل ۲ بررسی توالی پپتید نشانه با برنامه آنالین SignalP. (الف) پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ (s-mean: ۰/۶۷۲)، (ب) توالی پپتید نشانه پروتومبین انسانی به همراه فاکتور ۹ (s-mean= ۰/۸۳۹)

بررسی آب‌گریزی پپتیدهای نشانه با استفاده از

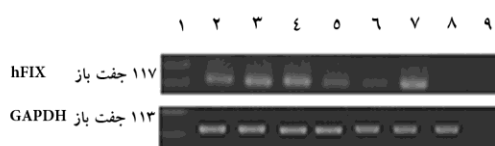
سیستم امتیازدهی Eisenberg و برنامه TopPred

ناحیه آب‌گریز نقش تعیین کننده در کارآیی پپتیدهای نشانه و انتقال پروتئین به سمت مسیر ترشحی دارد [۱۴]. برای طراحی و یافتن یک پپتید نشانه مناسب، بررسی میزان

آب‌گریزی پپتیدهای نشانه و مقایسه آن‌ها، دقت طراحی را بالا می‌برد و در تفسیر نتایج قابل استفاده خواهد بود. با مقایسه نتایج مربوط به میزان آب‌گریزی آمینواسیدهای دو پپتید نشانه یاد شده، می‌توان نتیجه گرفت که میزان آب‌گریزی پپتید نشانه پروتومبین انسانی نسبت به پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ بالاتر بوده است. ناحیه آب‌گریز پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ شامل

تأثیر پپتید نشانه پروترومبین انسانی بر کارایی ترشح فاکتور ۹ انسانی

شده حاصل از نمونه‌های ترانسفکت شده، منتج به تولید قطعه مورد انتظار به طول ۱۱۷ جفت باز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی RTR و RTF در واکنش PCR شد. از سلول‌هایی که ترانسفکت نشده بودند، به عنوان کنترل منفی استفاده شد (شکل ۴). همچنین به منظور اطمینان از عدم آلودگی RNA به DNA از RNA ساخته شده به عنوان الگوی PCR به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

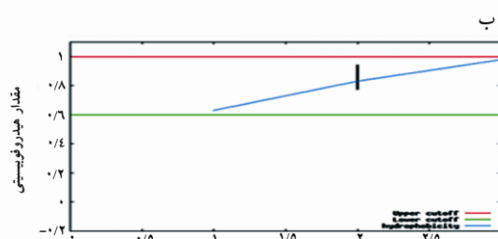
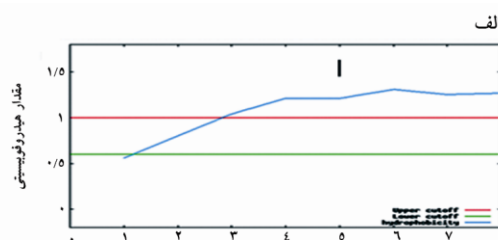


شکل ۴ الگوی الکتروفورزی محصولات RT-PCR؛ (ردیف بالا) آغازگرهای اختصاصی فاکتور ۹ و (ردیف پایین) GAPDH به عنوان کنترل داخلی، ستون (۱) نشانگر ۱۰۰ جفت باز DNA، ستون ۲-۴) سازه مجهز به توالی پپتید نشانه پروترومبین انسانی ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، ستون ۵-۷) سازه مجهز به توالی پپتید نشانه بومی فاکتور ۹، ستون ۸) سلول‌های لیز شده و ترانسفکت نشده، ستون ۹) کنترل منفی

ارزیابی کارایی ترشح

کارایی ترشح یک پروتئین به نسبت بخش ترشح شده (پروتئین موجود در محیط کشت) و مقدار کلی بیان شده آن (محیط کشت و لیز سلولی) پروتئین تعریف می‌شود [۱۵]. براساس این تعریف، مقدار پروتئین فاکتور ۹ موجود در محیط کشت با روش الایزا اندازه‌گیری شد. ارزیابی کارایی ترشح در سه روز متوالی بعد از ترانسفکشن نشان داد که سازه مجهز به پپتید نشانه پروترومبین انسانی حداکثر میزان ترشح را در ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن داشت. این بدان معناست که فاکتور ۹ به دام افتاده در داخل سلول در طول دوره کشت سلولی آزاد می‌شود. در حالی که افزایش زمان تأثیری در میزان ترشح فاکتور ۹ در سازه مجهز به پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ نداشته است. نتایج ارایه شده حاصل از سه بار تکرار آزمایش و میانگینی از نتایج به دست آمده است (شکل ۵).

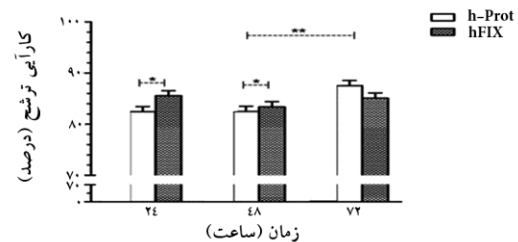
آمینواسیدهای لوسین و ایزولوسین با میزان آب‌گریزی بالا و چند آمینواسید با میزان آب‌گریزی پایین و ۳ آمینواسید آب‌دوست است. این در حالی است که ناحیه آب‌گریز پپتید نشانه پروترومبین انسانی شامل آمینواسیدهای لوسین، آلانین و والین با میزان آب‌گریزی بالا و ۲ آمینواسید آب‌دوست است. بررسی آب‌گریزی دو نوع پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ (شکل ۳ الف) و پپتید نشانه پروترومبین انسانی (شکل ۳ ب) با استفاده از سیستم امتیازدهی Eisenberg و برنامه TopPred نشان داده شده است. نتایج حاصل از هر دو برنامه میزان کلی آب‌گریزی (Total Hydrophobicity) بالاتری را برای توالی پپتید نشانه پروترومبین انسانی در مقایسه با توالی پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ نشان داد.



شکل ۳ بررسی میزان آب‌گریزی پپتیدهای نشانه با استفاده از سیستم امتیازدهی Eisenberg و برنامه آنالیز TopPred؛ (الف) نمودار آب‌گریزی آمینواسیدهای موجود در توالی پپتید نشانه بومی فاکتور ۹، (ب) نمودار آب‌گریزی آمینواسیدهای موجود در توالی پپتید نشانه پروترومبین انسانی

تأیید بیان فاکتور ۹ در مرحله نسخه‌برداری

بررسی کیفی بیان در سطح رونویسی با انجام فرآیند RT-PCR مقدور است. آزمایش RT-PCR روی سلول‌های لیز



شکل ۵ ارزیابی کارایی ترشح فاکتور ۹ در سلول‌های HEK293T؛ کارایی ترشح در سازه مجهز به توالی پپتید نشانه پروترومبین انسانی (h-Prot) طی سه روز پس از ترانسفکشن در مقایسه با سازه بومی فاکتور ۹ (hFIX) روند افزایشی معنی‌داری ($P < 0.05$) را نشان می‌دهد.

بحث

نقص یا کاهش در تولید محصولات ژنی باعث بروز بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی می‌شود، بنابراین با تولید محصول پروتئینی این ژن‌ها به عنوان دارو یا با پیش گرفتن راهبرد ژن درمانی می‌توان برای درمان این بیماری‌ها گام برداشت. موفقیت در انجام این راه کارهای درمانی، نیازمند به استفاده از سازه‌های ژنتیکی کارآمد و توانمند است که در آن‌ها از عناصر ژنتیکی مناسب بهره گرفته شده باشد. در تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی، برای آسان تر شدن مراحل تخلیص، پروتئین‌ها به صورت ترشحي تولید می‌شوند. برای تولید بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب دارویی از میزبان‌های یوکاریوتی به خصوص سلول‌های پستانداران استفاده می‌شود. استفاده از پپتیدهای نشانه مناسب برای تولید صنعتی پروتئین‌های نوترکیب در حال گسترش است و می‌توان از این راه کار در ژن درمانی نیز بهره برد [۶]. برای ژن درمانی بسیاری از بیماری‌ها مانند هموفیلی، نیاز است پروتئین به جریان خون وارد شود و این امر با ترشح پروتئین مورد نظر به خارج از سلول امکان پذیر خواهد بود. به عنوان یک راه کار جدید و متفاوت می‌توان از طریق بهینه کردن فرآیند ترشح، کارایی تولید پروتئین در سامانه‌های نوترکیب و یا در ژن درمانی برای چنین بیماری‌هایی افزایش داد [۱]. در این پژوهش با توجه به اهمیت فرآیند ترشح در تولید پروتئین‌های نوترکیب و نیز ژن درمانی، با هدف بهینه سازی ترشح فاکتور ۹، پپتید نشانه پروتئین

پروترومبین انسانی جایگزین پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ شد و اثر آن بر ترشح فاکتور ۹ انسانی در دره سلولی HEK293T بررسی شد. پیشتر در مطالعاتی که توسط سام (Sam) و همکاران انجام گرفت نشان داده شد زمانی که از پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ استفاده می‌شود، بخش زیادی از فاکتور ۹ بیان شده درون سلول‌های نوترکیب انباشته می‌شود [۱۶]. بنابراین دستیابی به پروتئینی با ترشح کارآمد در میزبان پستانداران دغدغه اصلی محققان بوده است و انتخاب پپتید نشانه مناسب ممکن است مفید باشد [۱۷]. در میان پارامترهایی که در ترشح یک پروتئین دخیل هستند، پپتید نشانه نقش کلیدی بازی می‌کند و می‌تواند به خوبی در تنظیم بیان ژن تأثیرگذار باشد [۱۸-۲۰]. ارزیابی آب‌گریزی و کارایی برش پپتیدهای نشانه به کار گرفته شده در این پژوهش، با استفاده از برنامه‌هایی که بر اساس الگوریتم شبکه‌های عصبی پیش‌بینی می‌کنند انجام گرفت و پیش‌بینی شد که پپتید نشانه پروترومبین انسانی کارایی ترشح بالاتری نسبت به پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ دارد. بررسی‌های بیانی در فاز گذرا شواهدی مبنی بر بهبود کارایی ترشح فاکتور ۹ نشان داد، زمانی که از پپتید نشانه پروترومبین انسانی استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل از کلون hProt-hFIX کارایی ترشح فاکتور ۹ تولید شده پس از ۷۲ ساعت به ۸۹ درصد افزایش یافت و بدین معناست که فاکتور ۹ به دام افتاده در داخل سلول با گذشت زمان کاهش پیدا کرده است و همه فاکتور ۹ تولید شده به بیرون از سلول ترشح می‌شود. این در حالی است که کارایی ترشح فاکتور ۹ تولید شده توسط پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ سه روز پس از ترانسفکشن تقریباً ثابت و حدود ۸۶ درصد بود و نتایج حاصل با نتایج پیش‌بینی شده توسط برنامه‌های رایانه‌ای Predisi و SignalP مطابقت داشت. بررسی‌های رایانه‌ای محققان حاضر نشان داد که میزان آب‌گریزی پپتید نشانه پروترومبین انسانی در مقایسه با پپتید نشانه فاکتور ۹ بیشتر است و با نتایجی که قبلاً توسط هاتسوزاوا (Hatsuzawa) و همکاران در سال ۱۹۹۷ گزارش شد مطابقت دارد [۲۰]. این گروه نشان دادند که میزان کلی آب‌گریزی در منطقه پپتید نشانه نسبت به طول منطقه

تأثیر پپتید نشانه پروترومبین انسانی بر کارایی ترشح فاکتور ۹ انسانی

پپتید نشانه آلبومین، تریپسینوژن (Trypsinogen) وایترولوکین انسانی به ترتیب ۱۹۰۰، ۴۰ و ۱۷۰ درصد است [۲۲]. به طور کلی نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان می دهد پپتید نشانه پروترومبین انسانی نسبت به پپتید نشانه بومی فاکتور ۹ از کارایی ترشح بالاتری برخوردار است و با نتایج حاصل از بررسی های رایانه ای با برنامه های SignalP و PrediSi و ارزیابی میزان کلی آب گریزی پپتید نشانه با برنامه TopPred که نشان دهنده پتانسیل بیشتر ترشح پروترومبین انسانی نسبت به فاکتور ۹ است، مطابقت دارد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از رساله دکتری ژنتیک مولکولی است. پشتیبانی مالی لازم برای انجام این مطالعه توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری صورت گرفته است.

آب گریز (H-region) برای شناسایی توسط SRP (Signal Recognition Particle) و قرار گرفتن در عرض غشای شبکه آندوپلاسمی مهم تر است. برد (Bird) و همکاران در سال ۱۹۹۰ پیشنهاد کردند که میزان آب گریزی هر پپتید نشانه به طور مستقیم با کارایی آن مرتبط است؛ بدین معنی که هر چه میزان آب گریزی پپتید نشانه بیشتر باشد کارایی ترشح آن نیز بیشتر است [۲۱]. ژانگ (Zhang) و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز نشان دادند که جایگزینی پپتید نشانه ایترولوکین ۲ با پپتید نشانه ای که افزایش در بار قلیایی ناحیه N و افزایش آب گریزی در ناحیه H دارد قادر است ترشح پروتئین را تا ۳/۵ برابر افزایش دهد [۷]. در مطالعات مرتبط با پژوهش حاضر، جایگزینی پپتید نشانه گوسیا لوسیفراز (Gussia princep luciferase) با پپتیدهای نشانه مختلف گزارش شده است که تأثیر مهمی روی تولید و ترشح پروتئین دارد. نتایج به دست آمده از پروتئین لوسیفراز، نشان دهنده افزایش قابل توجه در کارایی ترشح پروتئین های گزارشگر نسبت به دیگر پپتیدهای نشانه است؛ به طوری که این افزایش نسبت به

منابع

- [1] Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias--from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med* 2001; 344(23): 1773-9.
- [2] Vatandoost J, Zomorodipour A, Sadeghizadeh M, Aliyari R, Bos MH, Ataei F. Expression of biologically active human clotting factor IX in *Drosophila* S2 cells: γ -carboxylation of a human vitamin K-dependent protein by the insect enzyme. *Biotechnol Prog* 2012; 28(1): 45-51.
- [3] Jackson CM, Nemerson Y. Blood coagulation. *Annu Rev Biochem* 1980; 49: 765-811.
- [4] Bandyopadhyay PK. Vitamin K-dependent gamma-glutamylcarboxylation: an ancient posttranslational modification. *Vitam Horm* 2008; 78: 157-84.
- [5] Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 1997; 10(1): 1-6.
- [6] Martoglio B, Dobberstein B. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 1998; 8(10): 410-5.
- [7] Zhang L, Leng Q, Mixson AJ. Alteration in the IL-2 signal peptide affects secretion of proteins in vitro and in vivo. *J Gene Med* 2005; 7(3): 354-65.
- [8] Menne KM, Hermjakob H, Apweiler R. A comparison of signal sequence prediction

- methods using a test set of signal peptides. *Bioinformatics* 2000; 16(8): 741-2.
- [9] Jorgensen MJ, Cantor AB, Furie BC, Brown CL, Shoemaker CB, Furie B. Recognition site directing vitamin K-dependent gamma-carboxylation resides on the propeptide of factor IX. *Cell* 1987; 48(2): 185-91.
- [10] Bristol JA, Ratcliffe JV, Roth DA, Jacobs MA, Furie BC, Furie B. Biosynthesis of prothrombin: intracellular localization of the vitamin K-dependent carboxylase and the sites of gamma-carboxylation. *Blood* 1996; 88(7): 2585-93.
- [11] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 2004; 340(4): 783-95.
- [12] Hiller K, Grote A, Scheer M, Münch R, Jahn D. PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(Web Server issue): W375-9.
- [13] Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC, Wilcox W. Hydrophobic moments and protein structure. *Faraday Symp Chem Soc* 1982; 17: 109-20.
- [14] Zanen G, Houben EN, Meima R, Tjalsma H, Jongbloed JD, Westers H, Oudega B, Luirink J, van Dijl JM, Quax WJ. Signal peptide hydrophobicity is critical for early stages in protein export by *Bacillus subtilis*. *FEBS J* 2005; 272(18): 4617-30.
- [15] Kim YK, Shin HS, Tomiya N, Lee YC, Betenbaugh MJ, Cha HJ. Production and N-glycan analysis of secreted human erythropoietin glycoprotein in stably transfected *Drosophila* S2 cells. *Biotechnol Bioeng* 2005; 92(4): 452-61.
- [16] Sam MR, Zomorodipour A, Shokrgozar MA, Ataei F, Haddad-Mashadrizheh A, Amanzadeh A. Enhancement of the human factor IX expression, mediated by an intron derived fragment from the rat aldolase B gene in cultured hepatoma cells. *Biotechnol Lett* 2010; 32(10): 1385-92.
- [17] Soejima Y, Lee JM, Nagata Y, Mon H, Iiyama K, Kitano H, Matsuyama M, Kusakabe T. Comparison of signal peptides for efficient protein secretion in the baculovirus-silkworm system. *Cent Eur J Biol* 2013; 8(1): 1-7.
- [18] Stern B, Olsen LC, Tröbe C, Ravneberg H, Pryme IF. Improving mammalian cell factories: The selection of signal peptide has a major impact on recombinant protein synthesis and secretion in mammalian cells. *Trends Cell Mol Biol* 2007; 2: 1-17.
- [19] Serruto D, Galeotti CL. The signal peptide sequence of a lytic transglycosylase of *Neisseria meningitidis* is involved in regulation of gene expression. *Microbiology* 2004; 150(Pt 5): 1427-37.
- [20] Hatsuzawa K, Tagaya M, Mizushima S. The hydrophobic region of signal peptides is a determinant for SRP recognition and protein translocation across the ER membrane. *J Biochem* 1997; 121(2): 270-7.
- [21] Bird P, Gething MJ, Sambrook J. The functional efficiency of a mammalian signal peptide is directly related to its hydrophobicity. *J Biol Chem* 1990; 265(15): 8420-5.
- [22] Knappskog S, Ravneberg H, Gjerdrum C, Trösse C, Stern B, Pryme IF. The level of

تأثیر پپتید نشانه پروترومبین انسانی بر کارایی ترشح فاکتور ۹ انسانی

synthesis and secretion of Gaussia princeps
luciferase in transfected CHO cells is heavily

dependent on the choice of signal peptide. J
Biotechnol 2007; 128(4): 705-15.