

## بررسی انواع سیستم‌های بیان پروتئین نو ترکیب، معرفی سلول‌های S2 به عنوان یک سیستم بیانی کارآمد

جعفر وطن‌دوست<sup>۱\*</sup>، شکوفه حسن آبادی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری

<sup>۲</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری

\*نشانی نویسنده مسئول: سبزواری، دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دکتر جعفر وطن دوست

E-mail: j.vatan@hsu.ac.ir

وصول: ۹۴/۶/۱۳، اصلاح: ۹۴/۸/۵، پذیرش: ۹۴/۹/۳۰

### چکیده

امروزه با استفاده از مهندسی ژنتیک، پروتئین‌های نو ترکیبی می‌توانند در حجم انبوه برای پاسخگویی به خواسته‌های فراوان صنعت تولید شوند. پروتئین‌های نو ترکیبی می‌توانند در سیستم‌های بیانی مختلفی بیان شوند و بر حسب نوع پروتئین نو ترکیب، این سیستم‌های بیانی می‌توانند عاری از سلول، بر پایه سلول پروکاریوتی یا یوکاریوتی باشند. برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب‌ارویی در اغلب موارد تغییرات پس از ترجمه لازم است و سامانه‌های بیانی پستانداران در این رابطه اولین انتخاب هستند؛ اما با توجه به مشکلات تولید انبوه پروتئین‌های نو ترکیب در آن‌ها، سامانه‌های بیانی حشرات می‌تواند جایگزین مناسب‌تری برای دستیابی به بیان بالای بسیاری از پروتئین‌های نو ترکیب و پیچیده مورد توجه قرار گیرند. در سال‌های اخیر رده سلولی S2 از حشره دروزوفیلا به عنوان میزبان برای بیان پروتئین‌های نو ترکیب انسانی و غیرانسان‌استفاده شده است. این سیستم با دارا بودن مزایای چون تراکم سلولی بالا و قابلیت تولید پروتئین نو ترکیب تاخوردده حامل تغییرات پس از ترجمه، این پتانسیل را جهت کاربرد در حوضه صنعتی و تجاری فراهم نموده است.

**واژه‌های کلیدی:** پروتئین نو ترکیب، سیستم‌های بیانی، سلول S2

### مقدمه

سیستم را در نظر بگیرد (۱). کیفیت پروتئین، عملکرد، سرعت تولید و بازده تولید مهم‌ترین عوامل در هنگام انتخاب سیستم بیان مناسب برای تولید پروتئین نو ترکیب هستند (۲). به طور قابل توجه ای میزبان‌های جدیدی مثل باکتری‌های گرم منفی، سویه‌های جدید مخمر، قارچ‌های رشته‌ای و سیستم‌هایی بر پایه گیاهان و حشرات در سال‌های اخیر پیشرفت‌های چشمگیری داشته‌اند. حتی سیستم‌های آزمایشگاهی ابداع شده‌اند که عاری از سلول

امروزه تولید تجاری پروتئین‌ها با تکیه بر مهندسی ژنتیک در سیستم‌های بیانی مختلف در حال گسترش است به طوری که محصولات تولید شده بخش مهمی از نیازهای جوامع را در برمی گیرند. یک سیستم بیانی مطلوب تنها در صورتی می‌تواند انتخاب شود که بهره‌وری، زیست فعالی و ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی پروتئین هدف، همراه با هزینه، راحتی و امنیت خود

است و در محیط عاری از سلول در حالت درون آزمایشگاهی قادر به ترجمه پروتئین هدف می باشد (۳). در مجموع دو نوع سیستم بیانی عاری از سلول و بر پایه سلول تعریف شده است که به توضیح این سیستم‌ها پرداخته می شود.

### سیستم‌های عاری از سلول

سیستم سنتز پروتئین عاری از سلول ( Cell-free protein synthesis/CFPS) زمان زیادی است که به عنوان یک ابزار پژوهش در بیولوژی بنیادی و کاربردی استفاده شده است. این سیستم مشتق شده از عصاره سلول خام در سال ۱۹۶۱ نقش اساسی در کشف کدهای ژنتیکی داشت (۴).

سیستم‌های CFPS برای تولید پروتئین‌های مورد نظر، نیازمند به اجزای کاتالیزوری لازم برای تولید انرژی و سنتز پروتئین از عصاره لیز شده خام سلول می باشند. عصاره لیز شده خام حاوی عناصر لازم برای رونویسی، ترجمه تا خوردن پروتئین و متابولیسم انرژی است. پس از شروع سنتز پروتئین در سیستم عاری از سلول، تولید به طور معمول تا تمام شدن یکی از سوبستراها (به عنوان مثال، ATP، سیستئینوگیره) و یا تجمع محصولات جانبی (به عنوان مثال، فسفات معدنی) ادامه می یابد (۵).

شایع ترین سیستم‌های ترجمه عاری از سلول شامل عصاره‌هایی از E.coli (Extracts from E.coli/ECE)، رتیکولوسیت خرگوش ( rabbit reticulocytes /RRL)، جوانه گندم (Wheat germ/WGE) و سلول‌های حشرات (insect cells /ICE) می باشند. از آنجا که این سلول‌ها بسیار متفاوت از هم رفتار می کنند، تصمیم اول برای تولید پروتئین‌های بیولوژیک فعال، انتخاب نوع منبع عصاره CFPS می باشد. سیستم CFPS بر پایه اشرشیا کلی از محبوب ترین سیستم‌ها است و از نظر تجاری در دسترس است. E. coli به راحتی در مقادیر زیاد با استفاده از محیط کشت کم هزینه قادر به تکثیر است و به آسانی با

استفاده از هم زن با فشار بالا از هم گسسته می شود. همچنین به طور کلی باعث دستیابی به بالاترین بازده پروتئین، از صدها میکروگرم تا میلی گرم در هر میلی لیتر بسته به پروتئین مورد نظر گزارش شده است (۶).

سیستم‌های WGE+RRL و ICE به طور گسترده در سیستم‌های عاری از سلول یوکاریوتی استفاده می شوند و از نظر تجاری در دسترس هستند. در مقایسه با سیستم E. coli، این روش‌ها برای تولید پروتئین‌های پیچیده کاربرد دارند، چرا که می توانند تغییرات پس از ترجمه که در باکتری انجام نمی شود را انجام دهند. با این حال آماده سازی عصاره آن‌ها پرهزینه تر و بازده پروتئین مورد نظر کمتر از باکتری می باشد. از لحاظ بازده پروتئین، WGE پیشگام است (۷). به طور معمول تولید بین چند صد میکروگرم تا میلی گرم پروتئین نو ترکیب در هر میلی لیتر واکنش می باشد (۸). بازده تولید پروتئین‌های متعدد در واکنش RRL تا ده‌ها میکروگرم پروتئین در میلی گرم واکنش گزارش شده است (۹). بازده پروتئینی گزارش شده از ICE که معمولاً از سلول‌های *Spodoptera frugiperda* تهیه می شود چند ده میکروگرم در هر میلی لیتر واکنش می باشد (۱۰). سیستم WGE کارآمدترین سیستم عاری از سلول در ساخت پروتئین است اما یک سیستم مناسب برای برخی از پردازش‌های پس از ترجمه مانند گلیکوزیلیاسیون نیست (۹). از طرفی ICE و RRL بیشترین تطبیق پذیری را نشان داده اند و در پردازش‌هایی مثل ایزوپرنیلاسیون (۱۱)، استیلاسیون (۱۲)، فسفوریلاسیون (۱۳)، اتصال به یوبیکوتین (۱۴)، پردازش سیگنال پپتید (۱۵) و ایجاد هسته گلیکوزیلیاسیون ( core glycosylation) (۹) استفاده شده اند. با توجه به گلیکوزیلیاسیون، ICE مزیت بیشتری بر RRL دارد زیرا ایجاد هسته گلیکوزیلیاسیون نیازمند افزودن غشاهای میکروزومال نیست اما در واکنش RRL این غشاها برای تغییرات پس از ترجمه مناسب مورد نیاز هستند. این غشاهای میکروزومال باید به طور جداگانه خالص سازی

شوند و به واکنش CFPS اضافه شوند که این مرحله پردازش اضافی مطلوب نیست. فراتر از سیستم‌های ذکر شده در بالا، سیستم‌های CFPS یوکاری و تی بر اساس مخمر (۱۶)، سلول‌های سرطانی (۱۷) و هیپریدوما (۱۸) نیز توسعه پیدا کرده‌اند.

با وجود بسیاری از جنبه‌های امیدوارکننده از سیستم عاری از سلول، محدودیت‌هایی برای استفاده از آن‌ها به عنوان یک تکنولوژی برای تولید پروتئین وجود دارد. این موانع شامل مدت زمان کوتاه واکنش سنتز فعال پروتئین، میزان کم تولید پروتئین، مشکل تهیه انرژی و سوسترهای مورد نیاز برای سنتز پروتئین، هزینه‌های معرف گران قیمت، ترجمه و رونویسی هم‌زمان و تخریب DNA توسط نوکلئازهای عصاره سلولی از معایب این سیستم است (۱۹). یکی از چالش‌های اصلی برای سیستم‌های CFPS، عدم تولید پروتئین انسانی فعال پیچیده به دلیل عدم وجود مسیری برای خوردن اکسیداتیو برای شکل‌گیری و ایزومریزاسی و نباندهای دیسولفید است. درحالی‌که موجودات تکامل یافته از قسمت‌های مختلفی برای جدایی مسیر تا خوردن از بیوسنتز پروتئین استفاده می‌کنند، سیستم‌های عاری از سلول هر دو وظیفه را در همان محفظه انجام می‌دهند. با این حال در دهه‌های گذشته به حل این محدودیت‌ها پرداخته شده است و پیشرفت‌های قابل توجهی برای سنتز پروتئین‌های پیچیده، مانند پروتئین‌های حاوی چندین باند دی سولفید تشدید شده است (۵).

### سیستم‌هایی بر پایه سلول

#### سیستمیانی پروکاریوتی

Itakura و همکاران در سال ۱۹۷۷ موفق به بیان سوماتوستاتین، یک هورمون پپتیدی پستانداران، در *E. coli* شدند و بیان در شرایط آزمایشگاهی از یک ژن خارجی در سلول‌های پروکاریوتی تحقق یافت (۱). *E. coli* یکی از اولین و گسترده‌ترین میزبان‌های استفاده شده برای تولید پروتئین‌های هترولوگ است (۲۰). این سیستم برای

بیان عملکردی پروتئین‌های غیر گلیکوزیله بسیار عالی است. از مزایای این سیستم می‌توان به رشد سریع، تراکم بالا در محیط‌های ساده و ارزان قیمت، اطلاعات ژنتیکی کاملاً شناخته شده، در دسترس بودن تعداد زیادی از ناقل‌های کلونینگ و سویه‌های جهش یافته میزبانی، انتقال ساده، کنترل آسان، امکان تولید انبوه پروتئین نوترکیب اشاره کرد. سیستم‌های باکتریایی مفید دیگر شامل *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Bacillus megaterium* و *B. brevis* می‌باشد (۲).

با این حال سیستم پروکاریوتی دارای برخی معایب است. یکی از این معایب، تراکم سلولی بالا به علت تشکیل استات است که منجر به مسمومیت می‌شود. همچنین پروتئین‌هایی که در اجسام انکلوژن تولید می‌شوند اغلب غیر فعال و غیرقابل حل هستند و نیاز به تا خوردن مجدد دارند. این سیستم در تولید پروتئین‌هایی با دی سولفید زیاد، عاجز است. محدودیت‌های دیگر سیستم‌های بیان پروکاریوتی شامل فقدان تغییرات پس از ترجمه به عنوان مثال گلیکوزیلاسیون پروتئین، تغییرات یا جایگزینی اسید آمینه‌ها به دلیل ترجیح کدونی، آلودگی با اندوتوکسین، تخریب پروتئین خارجی در میزبان، پردازش ناصحیح به دلیل فقدان چاپرون‌ها، عدم تولید پروتئین فعال، بی‌ثباتی پلاسمیدها، تولید مقادیر اندک پروتئین‌های عملکردی و تجمع محصول نوترکیب به عنوان انکلوژن بادی و دشوار شدن خالص‌سازی پروتئین است (۲۱).  
تشریح پروتئین‌های نوترکیب به وسیله *E. coli* به فضای پری پلاسمی یا درون محیط مزایای زیادی نسبت به تولید درون سلولی در انکلوژن بادی دارد. این روش به فرایندهای پایین‌دستی خوردن، پایداری، تولید پروتئین فعال و محلول کمک می‌کند. برای تولید پروتئین‌هایی که نیاز به باند دی سولفید دارند، بیان در فضای پری پلاسمیک بهتر از سیتوپلاسم است. پروتئین‌هایی با باند دی سولفید باید حتماً در پری پلاسم تجمع یابند زیرا سیتوپلاسم به شدت احیاء شده است. از طرفی پروتئین‌هایی که

در پری پلاسما قرار گرفته اند می توانند به راحتی به واسطه شوک اسمزی و نفوذ پذیری دیواره سلولی به درون محیط کشت ترشح شوند و نیاز به لیز سلولی نیست (۲۲).

### سیستم بیانی یوکاریوتی

#### مخمر

مخمرها قارچ های یوکاریوتی تک سلولی هستند و اغلب برای تولید پروتئین های نو ترکیبی استفاده می شوند که در سیستم پروکاریوتی به علت نیاز به تا خوردن و گلیکوزیلاسیون نشان تولید نمی شوند (۲). دوسویه معروف سیستم بیانی مخمر، ساکارومایسز سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) و پیشیا پاستوریس (*Pichia pastoris*) می باشند. این سویه ها به خوبی از نظر ژنتیکی شناخته شده اند و دست کاری ژنتیکی آن ها برای تولید انبوه آسان تر است (۱). علاوه بر مزایای سادگی محیط کشت، رشد سریع و هزینه کم مشابه با سلول های باکتریایی، همانند یوکاریوت های تک سلولی مخمر می تواند پروتئین های نو ترکیب محلول را به طور تاخوردیده صحیح تولید و ترشح کنند که دستخوش تغییرات پس از ترجمه مثل گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون، استیلاسیون، آسیلاسیون قرار گیرند (۲۳). همچنین ایمنی این سیستم مثل فقدان اندوتوکسین و انکوژنها تضمین شده است.

با این حال برخی از معایب استفاده از مخمرها به عنوان یک میزبان برای بیان هترولوگ وجود دارد. تعدادی از پروتئین ها در این سیستم به چاپرونی های خاصی برای تا خوردن مناسب پروتئین نیاز دارند (۲). یوکاریوت های پست متفاوت از هم تالی پستانداران از نظر O و N- گلیکوزیلاسیون هستند (۲۴). در پستانداران O- الیگوساکاریدها با فندهای متنوعی مثل N- استیل گالاکتوز آمین، گالاکتوز و اسید سیالیک ترکیب شده اند. در عوض در یوکاریوت های پست مثل پیشیا پاستوریس به O- الیگوساکاریدها تنها رزیدوی مانوز اضافه می شود. N- گلیکوزیلاسیون در پیشیا پاستوریس متفاوت از یوکاریوت های عالی تر است (۲۵). اضافه کردن بیش از حد

مانوزیک ویزگی معمول در مخمر است که مانع از تا خوردن صحیح و در نتیجه کاهش فعالیت پروتئین و مشکلات ایمنی می شود. همچنین مخمرها قادر به گاما کربوکسیلاسیون نیستند (۲۶).

#### قارچ های رشته ای

قارچ های رشته ای سیستم بیانی دیگری برای تولید پروتئین نو ترکیب می باشند (۲۷) که دارای ظرفیت بالایی برای تولید مقادیر زیادی از پروتئین ترشح شده هستند. قارچ های رشته ای مانند *Aspergillus oryzae* و *Trichoderma reesei* میزبان های جذابی برای تولید پروتئین های نو ترکیب به دلیل توانایی انجام برخی تغییرات پس از ترجمه هستند. مزایای استفاده از قارچ های رشته ای به عنوان میزبان شامل توانایی های طبیعی شان برای ترشح انواع پروتئین ها، بازده بالا، رشد سریع در محیط های کشت تعریف شده و ارزان، ایمن، مقیاس پذیر در سطح بیان بالا می باشد. همچنین ژن های خارجی می توانند از طریق پلاسمید به کروموزوم قارچ های رشته ای وارد شوند (۲۸). از طرفی تنوع ژنتیکی آن ها درهای جدیدی برای بهره برداری از آن ها به عنوان یک منبع جدید ژن به عنوان میزبان بیانی باز کرده است (۲۹).

با وجود مزایای زیاد و انجام تغییرات پس از ترجمه مثل فسفوریلاسیون، استیلاسیون، آسیلاسیون ... اما بازم قادر به اضافه کردن قندهای انسانی مثل اسید سیالیک نمی باشند و در نتیجه پروتئین فعال پیچیده انسانی را نمی توانند تولید کنند. ترجیح کدونی قارچ ها نیز با انسان ها ن متفاوت است (۳۰).

#### سیستم بیانی لیشمانیا

از سال ۱۹۸۶ نشان داده شد که لیشمانیا به عنوان یک تریپانوزوماتید فلاژل دار می تواند در بیان ژن های خارجی استفاده شود (۳۱). در میان خانواده تریپانوزوماتیدا، *Leishmania tarentolae* یک پارازیت غیر بیماری زا است که از نوعی مارمولک به دست آمده و

با وجود مزایای زیاد این سیستم، اما رده های سلولی پستانداران پایدار تنها بعد از یک دوره زمانی طولانی به دست می آیند و از طرفی بعد از ساخت رده سلولی نیاز است تا سلولها به طور مداوم تحت فشار انتخابی حفظ شوند و حتی ممکن است در کشت طولانی مدت ناپایدار شوند (۲۶). آلودگی احتمالی با ویروس های حیوانی سامانه بیانی پستانداران، یک محدودیت دیگر در استفاده آنها برای تولید انبوه است. از طرفی اغلب پرموتورهای القایی در این سامانه ها، یک سطح فعالیت پایه مداوم را نشان می دهند. پروتئین های نوترکیب انسانی اغلب در رده های سلولی موشی بیان می شوند لذا پروتئین نوترکیب الگوی گلیکوزیلاسیون موش را دارد. هرچند این رده های سلولی می توانند N-گلیکان هایی شبیه به نوع انسانی داشته باشند اما گروه کربوهیدراتی غیر شاخه دار-Gal $\alpha$ 1-3Gal به پروتئین نوترکیب تولید شده در این رده های سلولی اضافه می شود که این گروه کربوهیدراتی در پروتئین های انسانی یافت نشده است. از طرفی پروتئین های انسانی تولید شده در سلول های موشی ترکیب متفاوتی از اسید سیالیک را نشان می دهند (۴۰). از دیگر مشکلات سامانه های بیانی پستانداران می توان به سطح پایین تولید پروتئین نوترکیب، آهستگی رشد و ناپایداری آنها نیز اشاره کرد.

#### سیستم بیانی حشرات

سامانه های بیانی حشرات که به طور فزاینده ای برای پروتئین های مختلف استفاده می شود، یک روش سریع و ساده برای تولید پروتئین در سطح میلی گرم را فراهم نموده است (۴۱). یکی از مزایای اصلی این سامانه ها در مقایسه با سیستم های پروکاریوتی، توانایی آنها در تولید مقادیر انبوه پروتئین های یوکاریوتی است که نیاز به تغییرات پس از ترجمه دارند. مزیت دیگر این سامانه ها توانایی آنها در تولید پروتئین ها در مقیاس وسیع و در زمانی نسبتاً کوتاه (برخلاف سیستم های پستانداران) است (۴۲).

به عنوان یک سیستم بیان یوکاریوتی مستعد توسعه یافته است. از ویژگی های این سیستم رشد سریع باز ماند و برابر شدن ۴-۷ ساعت در ۲۶ درجه سانتی گراد، کشت در محیط های ارزان و عاری از سرم، تراکم سلولی بالا ( $10^8$ ) سلول در میلی لیتر) و غیر بیماری زا برای انسان است. زمان کوتاه تهیه کلون پایدار (۲ هفته)، استفاده از وکتور رفت و برگشتی با E.coli، پایداری وکتور اپیزومال و ترشح مناسب پروتئین های نوترکیب برخی دیگر از نقاط قوت این سیستم می باشد. یکی از مزایای اصلی سیستم بیان یلیشمانیا پتانسیل تغییرات پس از ترجمه پروتئین هدف از نوع پستانداران مانند گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون، پرنیلاسیون و ... است (۳۲).

L.tarentolae برای بیان موفقیت آمیز بسیاری از پروتئین های پیچیده یوکاریوتی مثل اریتروپویتین (۳۳)، ایتروفون گاما (۳۴، ۳۵)، پرو پروتئین کونورتاز ۴ (۳۶)، لامینین-۳۳۲ انسان (۳۷)، یک فعال کننده پلاسمینو ژن نوع بافتی (۳۸) و آنتی بادی (scFv) single chain antibody (fragments) خرگوش استفاده شده است. همچنین سلول های لیشمانیا میزبانی مناسب برای تولید پروتئین ایتروفون گاما (Recombinant lipophosphoglycan) rLPG3 می باشند که از آن به عنوان کاندیدی برای تهیه واکسن استفاده می شود (۳۹).

#### سلول های پستانداران

تولید پروتئین در کمیت و کیفیت مناسب یک نیاز ضروری در هر زمان است و از این نظر یک افزایش تدریجی در استفاده از سلول های پستانداران برای تولید پروتئین وجود دارد. سیستم های بیان سلول پستانداران مزایای زیادی نسبت به سیستم های قبلی دارند. این سیستم های بیانی قادر به تا زدن مناسب پروتئین نوترکیب، انجام تغییرات پس از ترجمه از جمله گلیکوزیلاسیون، پردازش سیگنال پپتید، ترشح پروتئین و عاری از اندوتوکسین می باشند. همچنین این سیستم را می توان برای بیان گذرای پایدار استفاده کرد.

نوترکیب در مقیاس بزرگ را می‌دهند. در بیشتر موارد پروتئین نوترکیب محلول و به آسانی قابل بازیافت از سلول عفونی است. با کلوویروسها می‌تواند در میزبان‌های حشرات تولید شوند و پپتید ایجاد شده از نظر تغییرات پس از ترجمه در نوعی شبیه به سلول‌های پستانداران است (۱).

اصلی‌ترین عیب این سامانه این است که بیان پروتئین مورد نظر معمولاً به وسیله پرموترهاژن‌های تأخیری از قبیل پلی هیدرین هدایت می‌شود، بنابراین حداکثر تولید پروتئین در نقطه‌ای است که سلول‌ها به خاطر عفونت ویروسی می‌میرند و در شرایط مرگ سلول میزبان، تغییرات بعد از ترجمه که می‌بایست بر روی پروتئین بیان شده اتفاق بیفتد دچار اختلال می‌گردد. از طرفی لیزسولی در این سامانه باعث آلودگی شدید پروتئین هدف با پروتئین‌های سلولی از قبیل پروتئین‌ها می‌شود لذا از این نظر زمان برداشت محصول در این سامانه خیلی حیاتی است. همچنین چون ژنوم باکلوویروس وارد ژنوم میزبان نمی‌شود، برای سنتز پروتئین نوترکیب در سلول جدید نیاز به عفونت مجدد است و از آنجایی که سلول‌های میزبان سرانجام می‌میرند، ژن هترولوگن می‌تواند به صورت مداوم بیان شود (۴۶). هر دو راز سنتز پروتئین مورد نظر نیاز به عفونت جدید سلول حشره دارد؛ بنابراین این سیستم از نظر ظرفیت آن برای تخمیر مستمر نسبت به سیستم‌های پروکاریوتیو مخمر پایین‌تر است. علاوه بر این، سلول‌های حشرات و سلول‌های پستانداران در الگوهای گلیکوزیلاسیون خود از جمله در طول الیگوساکاریدها و در محتوای مانوز تفاوت دارند. نکته قابل ذکر در مورد سامانه بیان یباکولوویروس، عدم توانایی آن در انجام گاما کربوکسیلاسیون است (۴۷).

### سلول‌های S۲ دروزوفیلیا

در حال حاضر سیستم‌های بیان پروتئین نوترکیب بر اساس استفاده از سلول‌های *Drosophila melanogaster* به‌طور فزاینده‌ای استفاده می‌شود. تا به

یکی از ویژگی‌های جذاب سیستم‌های بیانی حشرات، قابلیت پردازش پروتئینی و کاریوتی تا خوردن صحیح و ایجاد باند دی سولفید است. علاوه بر این قادر به انجام برخی تغییرات پس از ترجمه مثل N و O- گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون، آسیلاسیون، آمیداسیون، کر بوکسی متیلاسیون، ایزوپرنیلاسیون، انتقال هسته‌ای، برش سیگنال پپتید، برش پروتئولیتیک و پردازش آگزون و اینترون می‌باشد (۴۳). بر این اساس، این سیستم به‌طور گسترده‌ای برای تولید گلیکوپروتئین‌های نوترکیب در نظر گرفته می‌شود. در مجموع سیستم بیانی حشرات به دو نوع لایتیک و غیر لایتیک تقسیم می‌شود.

### سیستم بیانی بر پایه باکلوویروس

سیستم بیانی بر پایه باکلوویروس (BEVS/Baculovirus Expression Vector Systems) به‌عنوان یک سیستم لایتیک، یکی از قدرتمندترین و تطبیق‌پذیرترین سیستم‌های بیانی یوکاریوت است که در سال ۱۹۸۳ معرفی شد. BEVS یک سیستم ویروسی است که برای بیان ژن‌های هترولوگ از منابع مختلف مثل گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها در حشرات استفاده می‌شود. در این سیستم ژن‌های غیرضروری مثل پلی هیدرین با ژن‌های هترولوگ جایگزین می‌شوند (۴۴). از آنجایی که عفونت‌های باکلوویروس به حشرات محدود می‌شود، لذا طیف میزبانی بسیار خاصی دارد و برای انسان و گیاهان بیماری‌زا نمی‌باشند (۴۵). در این سیستم، دو یا چند ژن را می‌توان به‌طور هم‌زمان در طی یک عفونت سلول حشره منفرد بیان کرد. پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در سیستم باکلوویروس معمولاً در همان قسمت‌های سلولی که پروتئین اصلی قرار دارد قرار می‌گیرند. به‌عنوان مثال پروتئین هسته‌ای به هسته حشره منتقل می‌شود، پروتئین غشایی به غشای سلول متصل می‌شود و پروتئین ترشحی به‌وسیله سلول حشره آلوده به ویروس ترشح می‌شود. باکلوویروسها در محیط‌های کشت سوسپانسیون به‌خوبی رشد می‌کنند و اجازه تولید پروتئین

سامانه در وزوفیلا به طور بالایی قابل تنظیم است. یکی از پرموترهایی که در این سامانه ها کارایی بالایی از خود نشان داده، پرموتر متالوتیونین است که به شدت قابل تنظیم است و قادر به هدایت نسخه برداری در سطح بالا به وسیله القا با سولفات مسیاسولفاتکادمیوم است (۵۲). تحقیقاتی بر اساس داده های PubMed بر روی سلول های در وزوفیلا S2 نشان داد که استفاده از این سلول ها رو به افزایش است. از سال ۱۹۷۰ تا ۲۰۰۰، ۱۸۰ مقاله به این سیستم ارجاع داده شده در حالی که از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۱۴، به ۸۸۴ رسیده است. حتی در ۲ سال اخیر ۱۸۴ مقاله ارجاع داده شده است (۴۹). این سیستم بیانی یک سیستم غیر لیتیک و بر پایه وکتورهای پلاسמידی است که برای بیان و آنالیز پروتئین های درون سلولی، ترشح شده و غشایی استفاده شده است.

یکی از اولین گزارش ها در بکارگیری این سامانه، بیان دوپامین بتا هیدروکسیلاز (DBH) به میزان ۱۶ میلی گرم بر لیتر (۵۳) و ایتترلوکین ۵ انسانی به میزان ۲۲ میلی گرم بر لیتر در سلول های شنايدر S2 در وزوفیلا بود (۵۴). فعالیت آنزیم  $\beta$ -سکرتاز انسانی بیان شده در سلول های S2 که در شکل گیری غلاف میلیندر سلول های عصبی محیطی مهم است، به طور قابل توجه ای به بالای ۲۶٪ رسید (۵۵). یکی دیگر از کارهاخیر در بکارگیری این سامانه بیان ژن S از آنتی ژن های سطحی ویروس هپاتیت b (gA sbH) به میزان بیان ۷ میکروگرم برای هر لیتر از کشت بود که این مقدار بیش از ۱۰ برابر محصول سلول های fs9 است (۵۰). از دیگر کاربردهای سلول های S2، استفاده برای تولید پروتئین های تحقیقاتی، توسعه واکسن های نو ترکیب و ذرات شبه ویروس، تولید VIH-1PLV، بیان آنتی بادی، دوپامینتا هیدروکسیلاز انسانی (۵۳)، پلاسمینوژن انسانی (۵۶)، رسپتورها و کانال های یونی (۵۷)، پروتئین های غشایی (۵۸)، گلیکوپروتئین ویروس هاری (۵۹)، بیان ژن های هترو لوجوس و ... است (۴۹). حتی این سلول ها به دلیل

امروز حدود ۱۰۰ سلول مشتق شده از *D. melanogaster* به دست آمده است که از بین این ها ۱۲ مورد را می توان به راحتی کشت داد. با این حال، تنها رده های سلولی استفاده شده برای بیان ژن هترو لوج، شنايدر ۲ و ۳ (S2) و (Schneider's 2, 3/S3) می باشند که هر دو از مراحل انتهایی جنینی در وزوفیلا ملانوگاستر مشتق شده اند (۴۸). سیستم بیانی سلول های S2 در وزوفیلا در سال ۱۹۷۰ توسط شنايدر توسعه پیدا کرده است. اندازه سلول های S2، ۸-۱۰ میکرومتر است و در محیط عاری از سرم رشد می کنند. این سلول ها هم حالت مونولایر دارند، هم به صورت سوسپانسیون به صورت منفرد در محیط ساکن رشد می کنند. اعتقاد بر این است که منشأ ماکروفاژی رده سلولی S2 می تواند مزیت رشد به صورت سوسپانسیون را توضیح دهد. برخی مطالعات نشان داده اند که سلول های S2 می توانند به تراکم بالای ۷۰ میلیون سلول در هر میلی لیتر محیط کشت برسند (۴۹). بررسی ها نشان داده اند که وکتورهای بیانی این نوع سامانه به صورت چند کپی به داخل کروموزوم سلول های S2 در وزوفیلا وارد می شوند (۵۰).

و این سلول ها توانایی ورود بالغ بر ۱۰۰ کپی از یک کاست بیانی را به ژنوم خود در یک رخداد ترا ریخت سازی دارند. به این ترتیب برای تثبیت رده سلولی پایدار با سطح بیان بالا نیاز به دوره زمانی طولانی تکثیر پلاسמיד نیست (۵۱). از مزایای قابل توجه سامانه بیانی S2 می توان به قدرت بیان بیشتر نسبت به سلول های حشرات دیگر از قبیل fs9 (۱۰ تا ۲۰ برابر) (۴۱) تغییرات بعد از ترجمه یوکاریوتی از جمله گاما کربوکسیلاسیون (۴۷)، عدم لیز سلول ها، عدم تداخل و میان کنش بین پروتئین بیانی با پروتئین های رده سلولی، زمان کوتاه تهیه رده سلولی پایدار (حدود ۲-۳ هفته)، ورود چند کپی از ژن مورد نظر در جهت افزایش پایداری، رشد بادانسیته بالا، رشد در دمای اتاق و عدم نیاز به OC2 اشاره کرد (۴۱). از طرفی برخلاف سلول های پستانداران، بیان پروتئین نو ترکیب در



سلولی بالا تشکیل توده می‌دهند که هر دو فرایند توسعه و ساخت را پیچیده می‌کند. تجمع سلولی ممکن است منجر به تعدادی از مشکلات مرتبط از جمله عدم کنترل با محیط با توجه به تمایز در شرایط فیزیکی محیط، کاهش سلول‌های زنده و انتشار پروتئازها می‌شود. همچنین ممکن است به‌طور کلی باز یافتو همگنی (homogeneity) محصول تأثیر بگذارد. سلول‌های S2 به دلیل اینکه حتی در تراکم سلولی بسیار بالا (< ۲۵۰ میلیون سلول / میلی‌لیتر) تجمع نمی‌یابند بسیار مناسب برای پر فیوژن هستند. حالت پر فیوژن (Perfusion) فناوری مقرون به صرفه‌ای است که به سرعت در حال تبدیل شدن به یک روش ارجح برای تولید پروتئین است (۶۴).

در مقایسه با کشت سلولی پستانداران موضوع سمیت با آمونیاک در سلول‌های S2 وجود ندارد و سلول‌های S2 به اثرات سمی محصولات زائد تخمیر، مانند آمونیاک و لاکتات مقاوم هستند. آمونیاک، یک محصول فرعی کاتابولیکی گلوتامین در محیط کشت است که معمولاً در محیط کشت S2 تجمع نمی‌یابد اما مطالعات در بیوتکنولوژی نشان داده‌اند که سلول‌های S2 غلظت‌های بسیار بالا از آمونیاک را تحمل می‌کنند. علاوه بر این، سلول‌های S2 لاکتات را در طول دوره رشد به‌جز تحت شرایط استرس فقدان اکسیژن (anoxic) مانند سلول‌های CHO و دیگر پستانداران تولید نمی‌کنند. علاوه بر این، سلول‌های S2 نسبت به سایر رده‌های سلولی حشرات و سلول‌های پستانداران در برابر تغییرات pH، دما و اکسیژن، اسمولالیت و برش، کشت بلند مدت مقاوم می‌باشند لذا ممکن است سلول S2 برای بیش از یک ماه بدون تغییر محیط، کشت شوند. هیچ سیستم بافری مانند سیستم بافر بی‌کربنات / CO<sub>2</sub> که اغلب برای سلول‌های پستانداران استفاده می‌شود، نیاز ندارد. همچنین نیاز به CO<sub>2</sub> گران قیمت که مورد نیاز برای سلول‌های پستانداران است ندارد. سلول‌های حشرات در دمای بهینه ۲۶ تا ۲۸ همانند سایر سلول‌های حیوانات رشد می‌کنند. حتی سلول‌های S2 را می‌توان در

قابلیت کربوسیلایسیون برخلاف سایر حشرات، برای تولید پروتئین‌های دارویی انعقادی از جمله فاکتور ۹ استفاده شده است (۶۰، ۶۱).

یکی از مهم‌ترین کاندیدهای بیان پروتئین‌های ویروسی نو ترکیب DENV (Dengue virus)، JEV (Japanese Encephalitis virus) و WNV (West Nile virus) برای تهیه واکسن، سلول‌های دروزوفیلا S2 است. تولید DENV در سلول‌های S2 بازده بالای ۱۰-۵۰ میلی‌گرم بر لیتر داشته و کنفورماسیونی شبیه فرم اصلی داشته است. تولید JEV به‌عنوان معمول‌ترین عامل آنسفالیت ویروسی در سلول‌های S2 کارآمدتر و ارزان‌تر است و ذرات ویروسی تولید شده می‌تواند در موش سبب تولید آنتی‌بادی اختصاصی شود (۴۹). یکی از واکسن‌های ویروس WNV حاوی زیر واحدهای پروتئینی می‌باشد که در سلول‌های S2 تولید می‌شود و بازده تقریباً ۱۰-۲۵ میلی‌گرم بر لیتر دارد. این پروتئین از نظر ساختاری کاملاً تا خوردن صحیح دارد و در میمون سبب ایمنی ۱۰۰ درصد علیه ویروس می‌شود (۶۲). پروتئین اصلی ویروس هاری، گلیکوپروتئین RVGP (Rabies virus glycoprotein) است که تولید آن در سلول‌های دروزوفیلا S2 انجام گرفته است. تزریق این پروتئین‌های نو ترکیب به موش باعث مقاومت بدن موش در برابر ویروس هاری شد (۶۳).

سلول‌های S2 به‌طور معمول تراکم سلولی بیش از ۱۰ برابر بیشتر از دیگر رده‌های سلولی حشرات و یا پستانداران در فرآیندهای کشت بسته (batch) را دارند. افزایش غلظت سلول‌های زنده معمولاً به افزایش بازده تولید ترجمه در نتیجه بهبود فرآیندهای اقتصادی انجامد. این سلول‌ها حتی در تراکم سلولی بسیار بالا (< ۲۵۰ میلیون سلول / میلی‌لیتر) هم توده (aggregate) تشکیل نمی‌دهند. سلول‌های دیگر، مانند سلول‌های CHO (Chinese hamster ovary)، BHK (Baby Hamster Kidney) و HEK (Human Embryonic Kidney) اغلب در تراکم



تولید می‌کنند که ممکن است در غلظت‌های بالاتر از  $3/6\text{g/L}$  سمی باشد. در سیستم‌های سلولی حشرات، لاکتات یک محصول جانبی از متابولیسم بی‌هوازی گلوکز است و به‌طور مستقیم به محیط کشت بستگی دارد و رده‌های سلولی S2 الگوهای تخمیر لاکتات متفاوتی دارند. غلظت‌های خیلی کمی از لاکتات مشاهده می‌شود این غلظت‌ها ممکن است تحت شرایط مختلف از  $0/6\text{g/L}$  تا ۳ برسد. تولید لاکتات در سلول‌های حشرات تنها تحت شرایط محدودیت اکسیژن اتفاق می‌افتد (۵۵).

وکتورهای پلاسمیدی مورد استفاده برای ترا آلی سلول‌های S2 و تولید جمعیت‌های سلولی بیان‌کننده ژن هترولوگاساساً از پلاسمیدهای مورد استفاده برای ترآلی سلول‌های پستانداران متفاوت نیستند. وکتورهای توسعه یافته برای سیستم بیان دروزوفیلا (DES/ Drosophila Expression System) شامل عناصر ضروری برای تکثیر در باکتری‌ها و برای بیان ژن در سلول S2 می‌باشند. این وکتورها به منظور همانندسازی cDNA هترولوگو بیان توسط ماشین سلولی باید به ژنوم سلول وارد شوند. این سیستم ترکیبی از مزایای استفاده از هر دو سیستم‌های پستانداران و باکلوویروس است (۵۵). پلاس میدها اساساً شامل عناصری مثل ژن منشأ همانندسازی باکتری (pUCori)، پروموتور متالوتونین (pMt) یا اکتین (pAc) مورد استفاده برای بیان ژن هدف، یک ژنکد کننده برای یک پپتید که می‌تواند به عنوان یک نشانگر بیانی تولید شده (V5)، پروموتور ژن رونویسی کننده در وزوفیلا (pCopia) مورد استفاده برای انتخاب ژن (هایگرومایسین، پروماسین و ...)، ژن آمپی‌سیلین برای انتخاب در باکتری‌ها، سیگنال‌پلی آدنیل‌اسیون SV40 (SV40pA) و توالی سیگنال ترشح زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین متصل به پروتئین (BIP) در وزوفیلا هستند (۵۵).

اگر چه مسیرهای تغییرات پس از ترجمه پروتئین توسط سلول S2 ممکن است نسبت به سلول‌های

کابینت یا محیط آزمایشگاه رشد داد (۵۵). اکسیژن اغلب یک جز اولیه در محیط کشت است. باین‌حال، باوجود مهم بودن برای رشد سلول، می‌تواند در غلظت‌هایب الاسمی باشد لذا باید به‌دقت کنترل شود. هوادهی کشت سلول‌های S2 را می‌توان با موفقیت از طریق استفاده از غشاهای نفوذپذیر انجام داد که نفوذپذیری بالا به اکسیژن و دی‌اکسید کربن دارند در نتیجه میزان انتقال بالاییین غشا و محیط کشت سلول در راکتور انجام می‌گیرد. این روش مانع از تشکیل حباب در محیط کشت می‌شود لذا این کار باعث کاهش نیروهای برشی و در نتیجه کاهش آسیب سلولی می‌شود. سلول‌های حشرات به‌طور معمول دارای میزان تنفس مخصوص (QO2/ specific respiration rate) پایین‌تر از سلول‌های پستانداران هستند که به علت کوچک‌تر بودن آن‌ها می‌باشد به همین دلیل حجم زیست‌کوچک‌تر است. سلول S2 سلول‌های Sf9 و بسیار کمتر از سلول‌های پستانداران اکسیژن مصرف می‌کند (۵۵). سلول‌های S2 می‌توانند به‌طور گذرا پروتئین‌ها را بیان کنند و بازده کافی برای روش غربالگری در ۳-۴ روز تولید کنند. این کار اجازه غربالگری سریع را می‌دهد در نتیجه انتخاب کاندیدهای پروتئینی را تسریع می‌کند (۴۹).

کشت‌های آزمایشگاهی می‌توانند در فواصل ۷ روزه بین پاساژ نسبت به فاصله معمول ۳-۴ روز برای دیگر رده‌های سلولی حفظ شوند که باعث کاهش نیروی کاری می‌شود. آلودگی احتمالی با ویروس‌های حیوانی سامانه بیانی پستانداران، یک محدودیت دیگر در استفاده آن‌ها برای تولید انبوه است؛ اما ویروس‌های انسانی قادر به رشد در سلول‌های S2 نمی‌باشند. رده‌های سلولی S2، به‌مانند بسیاری از سلول‌های حیوانات، گلوکز (GLC) و گلوتامین (GLN) را به ترتیب به عنوان منابع اصلی برای کربن و نیتروژن مورد استفاده قرار می‌دهند. سلول‌های پستانداران در محیط کشت مقادیر بالایی لاکتات را در پاسخ به افزایش گلوکز، حتی در شرایط عدم محدودیت اکسیژن

### نتیجه‌گیری و بحث

در میان سیستم‌های بیان پروتئین نوترکیب اگرچه پروکاریوتها ممکن است به‌عنوان یک میزبان مناسب با سطح نسبی بالا مطرح شوند اما نداشتن تغییرات پس از ترجمه و نیاز به‌تاز خوردن مجدد، هنوز به‌عنوان یک مشکل حاد در این میزبان قابل بررسی است. به‌طورکلی در باکتری‌ها به دلیل اینکه قادر به ایجاد شاخه‌های گلیکان و باندهای دی سولفیدی نیستند، سیستم بیان پروتئین آن‌ها به‌خوبی و به طرز صحیح انجام نمی‌گیرد. همچنین تلاش‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در مخمر به دلیل ساختار غیرطبیعی پروتئین‌ها، ترشح ضعیف در محیط کشت و گلیکوزیلاسیون زیاد چندان رضایت‌بخش نیست؛ بنابراین وجود یک سیستم بیانی یوکاریوت جایگزین، به منظور حل مشکلات یادشده و تولید پروتئین‌های نوترکیب ضروری می‌نماید. از میان سیستم‌های مختلف تولیدکننده پروتئین‌های نوترکیب، سیستم یوکاریوتی به دلیل تولید پروتئین‌های بزرگ به‌ویژه پروتئین‌های غنی از باند دی سولفید و تغییرات پس از ترجمه بروی آن‌ها نسبت به سیستم پروکاریوتی ترجیح داده می‌شود. این در حالی است که سیستم‌های پروکاریوتی جهت سنتز پروتئین‌های کوچک کارتر است. برای تولید پروتئین‌های دارویی در اغلب موارد تغییرات پس از ترجمه لازم است و سامانه‌های بیانی پستانداران در این رابطه معمولاً اولین انتخاب هستند. هرچند سامانه‌های بیانی پستانداران جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی، استفاده می‌شوند اما توجه به مشکلات در تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب در آن‌ها، سامانه‌های بیانی حشرات می‌تواند جایگزین مناسبی برای دستیابی به بیان بالای بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب و پیچیده مورد توجه قرار گیرند. در سال‌های اخیر رده سلولی S2 از حشره دروزوفیلا به‌عنوان میزبان برای بیان پروتئین‌های هترولوگ معرفی شده و پروتئین‌های زیادی توسط این سیستم بیان شده است. گزارش‌های زیادی از استفاده از

پستانداران کمی متفاوت باشد، اما فعالیت پروتئین‌های نوترکیب نه‌تنها از بین نمی‌رود بلکه می‌تواند افزایش یابد. بیشتر N- گلیکانها در گلیکوپروتئین‌های نوترکیب بیان شده توسط سلول‌های S2 از ساختارهای مانوز کم (paucimannosidic) ساده تشکیل شده است. غالباً هسته ۳ مانوزی با یا بدون هسته فوکوزی  $\alpha(1,6)$  است که حاوی گالاکتوز یا اسید سیالیک در ساختارش نیست. باوجود این واقعیت که ساختار و ساختمان N-گلیکانها می‌تواند ترشح پروتئین، نیمه‌عمر و عملکرد بیولوژیکی آن را کنترل کند تا حدودی این مشکل را می‌توان با مهار آنزیم  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase در مسیر N- گلیکوزیلاسیون سلول S2 حل کرد (۶۵). در واقع محصولات گلیکوزیلاسیونی در حشرات حاوی مانوز کم یا زیاد انتهایی است. دلیل اصلی این ناتوانی پایین بودن سطح فعالیت تعدادی از آنزیم‌ها شامل  $\beta$ -N-(۱-۲) استیل گلوکز آمین ترانسفراز I و II،  $\beta$ -(۱-۴) گالاکتوزیل ترانسفراز،  $\alpha$ -(۲-۳) و  $\alpha$ -(۲-۶) سیالیل ترانسفراز است. از طرفی یک هگزوامیدیناز که سبب حذف N-استیل گلوکز آمین از انتهای محصول گلیکانی شده و مانع از اتصال گالاکتوز و اسید سیالیک به محصولات گلیکانی می‌شود، در حشرات کشف شده است لذا می‌توان حشرات را جهت تولید محصولات گلیکوزیلاسیونی مشابه پستانداران مهندسی کرد و عوامل مهارکننده سنتز محصولات سیالیل دار و گالاکتوزدار را از پیش رو برداشت (۶۶). مهندسی گلیکوزیلاسیون سلول‌های S2 به‌منظور تولید رده‌های سلولی S2 تغییر یافته و واجد گلیکوزیلاسیون، انجام گرفته است. مطالعات اولیه افزایش فعالیت بتا سکریتاز ( $\beta$ -secretas) و گلیکو اکسیژن از یک نوترکیب (Recombinant cyclooxygenase 1) را نشان داد که سلول‌های S2 با cDNA های کد کننده  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase و  $\alpha$ 2,6-GlcNAc 1,4-galactosyltransferase ترانسفکت شدند (۴۹).

پیشرفت‌هایی در درک گلیکوزیلاسیون و شرایط کشت کمک‌های بسیاری به استفاده از این سیستم در تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی کرده است. دیده شده است که هزینه خالص‌سازی، احتمال آلودگی و زمان تولید پروتئین در سیستم‌های S2 کمتر از پستانداران است. سازگاری بالای این سیستم برای استفاده در تولید واکسن‌ها، گلیکوزیلاسیون و گاما کربوکسیلاسیون پروتئین‌ها آن‌ها را به یک سیستم بیانی با ارزش تبدیل کرده است.

این سیستم جدید برای بیان پروتئین‌های نوترکیب انسانی و غیرانسانی وجود دارد. سلول‌های S2 ابزاری بسیار مفید در تحقیقات و تولیدات می‌باشند و به راحتی با تکنیک‌های جدید سازگار می‌شوند و یک مدل مفید برای انواع مطالعات را فراهم می‌کند. این سیستم سلولی در تعدادی از پروژه‌های واکسن استفاده شده است و نشان داده شده است که این سیستم بسیار انعطاف‌پذیر در تولید داروهای زیستی است لذا این سیستم شکاف‌هایی که در تولید داروهای زیستی وجود دارد را پر نموده است.

## References

1. Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol.* 2007;127(3):335-47.
2. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* 2009;27(3):297-306.
3. Sodoyer R. Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *BioDrugs.* 2004;18(1):51-62.
4. Nirenberg MW, Matthaei JH. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *P Natl A Sci India A.* 1961;47(10):1588-602.
5. Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, Jewett MC. Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnol Adv.* 2012;30(5):1185-94.
6. Zawada JF, Yin G, Steiner AR, Yang J, Naresh A, Roy SM, et al. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production—a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(7):1570-8.
7. Takai K, Sawasaki T, Endo Y. Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nat Protoc.* 2010;5(2):227-38.
8. Madin K, Sawasaki T, Ogasawara T, Endo Y. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *P Natl A Sci* 2000;97(2):559-64.
9. Tarui H, Murata M, Tani I, Imanishi S, Nishikawa S, Hara T. Establishment and characterization of cell-free translation/glycosylation in insect cell (*Spodoptera frugiperda* 21) extract prepared with high pressure treatment. *Appl Microbiol Biot.* 2001;55(4):446-53.
10. Ezure T, Suzuki T, Shikata M, Ito M, Ando E. A cell-free protein synthesis system from insect cells. *Cell-Free Protein Production: Springer*; 2010. p. 31-42.
11. Suzuki T, Ito M, Ezure T, Shikata M, Ando E, Utsumi T, et al. Protein prenylation in an insect cell-free protein synthesis system and identification of products by mass spectrometry. *Proteomics.* 2007;7(12):1942-50.
12. Suzuki T, Ito M, Ezure T, Shikata M, Ando E, Utsumi T, et al. N-Terminal protein modifications in an insect cell-free protein synthesis system and their identification by mass spectrometry. *Proteomics.* 2006;6(16):4486-95.
13. Safer B, Jagus R. Control of eIF-2 phosphatase activity in rabbit reticulocyte lysate. *P Natl Acad Sci USA.* 1979;76(3):1094-8.
14. Suzuki T, Ezure T, Ando E, Nishimura O, Utsumi T, Tsunasawa S. Preparation of ubiquitin-conjugated proteins using an insect cell-free protein synthesis system. *J Biotechnol.* 2010;145(1):73-8.
15. Shields D, Blobel G. Efficient cleavage and segregation of nascent presecretory proteins in a reticulocyte lysate supplemented with microsomal membranes. *J Biol Chem.* 1978;253(11):3753-6.
16. Iizuka N, Najita L, Franzusoff A, Sarnow P. Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Method Mol Cell Biol.* 1994;14(11):7322-30.
17. Weber L, Feman E, Baglioni C. Cell free system from HeLa cells active in initiation of protein synthesis. *Biochemistry.* 1975;14(24):5315-21.
18. Mikami S, Kobayashi T, Yokoyama S, Imataka H. A hybridoma-based in vitro translation system that

- efficiently synthesizes glycoproteins. *J Biotechnol.* 2006;127(1):65-78.
19. Swartz J. Developing cell-free biology for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 2006;33(7):476-85.
  20. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotech.* 1999;10(5):411-21.
  21. Wong MS, Wu S, Causey TB, Bennett GN, San K-Y. Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production. *Metab Eng.* 2008;10(2):97-108.
  22. Mergulhao F, Summers D, Monteiro G. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv.* 2005;23(3):177-202.
  23. Daly R, Hearn MT. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognt.* 2005;18(2):119-38.
  24. Jung E, Williams KL. The production of recombinant glycoproteins with special reference to simple eukaryotes including *Dictyostelium discoideum*. *Biotechnol Appl Bioc.* 1997;25(1):3-8.
  25. Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* 2000;16(1):23-52.
  26. Rai M, Padh H. Expression systems for production of heterologous proteins. *Current Science Bangalore.* 2001;80(9):1121-8.
  27. Van Hartingsveldt W, Mattern IE, van Zeijl CM, Pouwels PH, van den Hondel CA. Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *Mol Gen Gent.* 1987;206(1):71-5.
  28. Sharma R, Katoch M, Srivastava P, Qazi G. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. *World J Microb Biot.* 2009;25(12):2083-94.
  29. Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* 2002;20(5):200-6.
  30. Nevalainen KH, Te'o VS, Bergquist PL. Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends Biotechnol.* 2005;23(9):468-74.
  31. Davoudi N, Attarpour Yazdi MM, Hemmati A, Soltaninejad H. Development of expression constructs for production of human recombinant IFN $\gamma$  in *Leishmania tarentolae*. *Daneshvar.* 2012;19(100):21-8.
  32. Breitling R. The LEXSY platform for recombinant protein expression. *Farm animal proteomics: Springer;* 2013. p. 45-8.
  33. Clayton C, Häusler T, Blattner J. Protein trafficking in kinetoplastid protozoa. *Microbiol Rev.* 1995;59(3):325-44.
  34. Hughes AL, Piontkivska H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Mol Biol Evol.* 2003;20(4):644-52.
  35. Tobin JF, Reiner S, Hatam F, Zheng S, Leptak C, Wirth D, et al. Transfected *Leishmania* expressing biologically active IFN-gamma. *J Immunol.* 1993;150(11):5059-69.
  36. Basak A, Shervani NJ, Mbikay M, Kolajova M. Recombinant proprotein convertase 4 (PC4) from *Leishmania tarentolae* expression system: purification, biochemical study and inhibitor design. *Protein Expres Purif.* 2008;60(2):117-26.
  37. Phan H-P, Sugino M, Niimi T. The production of recombinant human laminin-332 in a *Leishmania tarentolae* expression system. *Protein Expres Purif.* 2009;68(1):79-84.
  38. Hemayatkar M, Mahboudi F, Majidzadeh-A K, Davami F, Vaziri B, Barkhordari F, et al. Increased expression of recombinant human tissue plasminogen activator in *Leishmania tarentolae*. *J Biotechnol.* 2010;5(11):1198-206.
  39. Pirdel L, Hosseini AZ, Kazemi B, Rasouli M, Bandehpour M, Soudi S. Cloning and Expression of *Leishmania infantum* LPG3 Gene by the Lizard *Leishmania* Expression System. *Avicenna journal of medical biotechnology.* 2012;4(4):186.
  40. Swiech K, Picanço-Castro V, Covas DT. Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expres Purif.* 2012;84(1):147-53.
  41. Bernard A, Kost T, Overton L, Cavegn C, Young J, Bertrand M, et al. Recombinant protein expression in a *Drosophila* cell line: comparison with the baculovirus system. *Cytotechnology.* 1994;15(1-3):139-44.
  42. Kim KR, Kim YK, Cha HJ. Recombinant baculovirus-based multiple protein expression platform for *Drosophila* S2 cell culture. *J Biotechnol.* 2008;133(1):116-22.
  43. King L. The baculovirus expression system: a laboratory guide: Springer Science & Business Media; 2012.
  44. Luckow VA, Summers MD. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Nat Biotechnol.* 1988;6(1):47-55.
  45. Summers M, Vail P. Baculoviruses for insect pest control, safety considerations. 1975.
  46. Kost TA, Condreay JP. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr Opin Biotech.* 1999;10(5):428-33.

47. Li T, Yang C-T, Jin D, Stafford DW. Identification of a *Drosophila* vitamin K-dependent  $\gamma$ -glutamyl carboxylase. *J Biol Chem*. 2000;275(24):18291-6.
48. Schneider I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morph*. 1972;27(2):353-65.
49. Adriaan de Jongh W, Salgueiro S, Dyring C. The use of *Drosophila* S2 cells in R&D and bioprocessing. *Pharmaceutical Bioprocessing*. 2013;1(2):197-213.
50. Jorge SA, Santos AS, Spina A, Pereira CA. Expression of the hepatitis B virus surface antigen in *Drosophila* S2 cells. *Cytotechnology*. 2008;57(1):51-9.
51. Vatandoost J, Zomorodipour A. Optimization of transfection and stable expression of human factor IX in *Drosophila* S2 cells. *Journal of cellular and molecular research*. 2015;27(4):598-610.
52. Olsen MK, Rockenbach SK, Fischer HD, Hoogerheide JG, Tomich C-SC. Stable production of an analog of human tissue plasminogen activator from cultured *Drosophila* cells. *Cytotechnology*. 1992;10(2):157-67.
53. Li B, Tsing S, Kosaka A, Nguyen B, Osen E, Bach C, et al. Expression of human dopamine beta-hydroxylase in *Drosophila* Schneider 2 cells. *Biochem J*. 1996;313:57-64.
54. Johanson K, Appelbaum E, Doyle M, Hensley P, Zhao B, Abdel-Meguid SS, et al. Binding Interactions of Human Interleukin 5 with Its Receptor  $\alpha$  Subunit large scale production, structural, and functional studies of *drosophila*-expressed recombinant proteins. *J Biol Chem*. 1995;270(16):9459-71.
55. Moraes AM, Jorge SA, Astray RM, Suazo CA, Riquelme CEC, Augusto EF, et al. *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: from gene cloning to bioprocess development. *Biotechnol Adv*. 2012;30(3):613-28.
56. Nilsen SL, Castellino FJ. Expression of Human Plasminogen in *Drosophila* Schneider S2 Cells. *Protein Expres Purif*. 1999;16(1):136-43.
57. Towers PR, Sattelle DB. A *Drosophila melanogaster* cell line (S2) facilitates post-genome functional analysis of receptors and ion channels. *Bioessays*. 2002;24(11):1066-73.
58. Brillet K, Pereira CA, Wagner R. Expression of membrane proteins in *Drosophila Melanogaster* S2 cells: Production and analysis of a EGFP-fused G protein-coupled receptor as a model. *Heterologous Expression of Membrane Proteins*: Springer; 2010. p. 119-33.
59. Lemos MAN, dos Santos AS, Astray RM, Pereira CA, Jorge SAC. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I: Design of expression/selection vectors, subpopulations selection and influence of sodium butyrate and culture medium on protein expression. *J Biotechnol*. 2009;143(2):103-10.
60. Vatandoost J, Zomorodipour A, Sadeghizadeh M, Aliyari R, Bos MH, Ataei F. Expression of biologically active human clotting factor IX in *Drosophila* S2 cells:  $\gamma$ -carboxylation of a human vitamin K-dependent protein by the insect enzyme. *Biotechnol Progr*. 2012;28(1):45-51.
61. Vatandoost J, Fasihfar M. An introduction of candidate substrates for *Drosophila* Gamma-carboxylase. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2015;21(6):977-85.
62. Lieberman MM, Nerurkar VR, Luo H, Cropp B, Carrion R, de la Garza M, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant subunit West Nile virus vaccine in rhesus monkeys. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(9):1332-7.
63. Swiech K, Rossi N, Astray RM, Suazo CA. Enhanced production of recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) by *Drosophila melanogaster* S2 cells through control of culture conditions. *Cytotechnology*. 2008;57(1):67-72.
64. Wang L, Hu H, Yang J, Wang F, Kaisermayer C, Zhou P. High yield of human monoclonal antibody produced by stably transfected *Drosophila* schneider 2 cells in perfusion culture using wave bioreactor. *Mol biotechnol*. 2012;52(2):170-9.
65. Kim YK, Kim KR, Kang DG, Jang SY, Kim YH, Cha HJ. Suppression of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase in the N-glycosylation pathway for complex glycoprotein formation in *Drosophila* S2 cells. *Glycobiology*. 2009;19(3):301-8.
66. Vatandoost J, Khalili L. Glycosylation Engineering of Human Recombinant Proteins in New S2 System. *Journal of Knowledge & Health*. 2015;10(3):45-52.

# Study o of recombinant protein expressionsystems, introduction of S2 cellsas anefficient expression system

\*Jafar Vatandoost

Assistant professor, Department of Biology, Hakim Sabzevari University, Sabzevar

Shokoofeh Hassanabadi

Msc student, Department of Biology, Hakim Sabzevari University, Sabzevar

Received:04/09/2015, Revised:27/10/2015, Accepted:21/12/2015

---

## Corresponding author:

Jafar Vatandoost,  
Hakim Sabzevari University,  
Sabzevar , Iran  
E-mail: j.vatan@hsu.ac.ir

## Abstract

Nowadays by genetic engineering, recombinant proteins can be produced massively in response to demands of industry. Proteins can be expressed in various expression systems and according to the protein type, the expression system can be cell free system, prokaryotic or eukaryotic-based system. For production of pharmaceutical proteins in most cases post-translational modifications are necessary and mammalian expression systems are the first choice in this regard. However, due to their problems in high production of recombinant proteins, insect expression systems can be an alternative suitable to achieve high expression of many recombinant and complex proteins. In recent year, S2 cell line from Drosophila was used as the host for the expression of human and non-human recombinant proteins. This system has the advantages such as high cell density and ability to produce folded recombinant proteins with accurate post-translational modifications, especially gamma carboxylation, provides the potential for application in industrial and commercial area.

**Keywords:** *Recombinant proteins, Expression systems, S2.*