Archive of SID

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۳ شماره ۳ پاییز ۹۵ (۲۴۲-۲۳۳)

مقاله پژوهشی

کارآیی ترشح و گاماکربوکسیلاسیون فاکتور IX نوترکیب انسانی در سلول‌های پایدار دروزوفیلا

سمیرا خلیل‌زاده[۱]، جعفر وطن‌دوست[۲]

چکیده

سابقه و هدف

فاکتور IX طی بلوغ خود در کبد، نیازمند کربوکسیلاسیون اسیدآمینه‌های گلوتامیک در ناحیه گلا می‌باشد که در ترشح و فعالیت آن نقش دارد. با توجه به ناکارآمدی سیستم بیانی پستانداران در ترشح و گاماکربوکسیلاسیون کامل فاکتورهای انعقادی نوترکیب و فعالیت بالاتر آنزیم گاماکربوکسیلاز در سامانه دروزوفیلا (S2)، مطالعه حاضر با هدف بررسی قابلیت این سامانه در گاماکربوکسیلاسیون و لذا ترشح و فعالیت فاکتور IX انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی، به دنبال تراآلایی سلول‌های S2 با وکتور pMT-hFIX، برای ارزیابی کمی بیان و فعالیت فاکتور IX از روش الایزا و aPTT و برای بررسی گاماکربوکسیلاسیون فاکتور IX از روش رسوب‌دهی پروتئین‌های محیط کشت به وسیله باریوم سیترات استفاده شد. نمونه‌ها در سه روز متوالی و با سه تکرار و توسط آزمون‌های واریانت آنوا و دانکن در سطح ۵٪ بررسی شدند.

یافته‌ها

نتایج آزمون انعقاد، ترشح فاکتور IX فعال توسط سلول‌های S2 پایدار را نشان داد. هم چنین ارزیابی کمی فاکتور IX در محیط کشت و لیز سلولی با الایزا، کارآیی ۹۴ درصدی ترشح را نشان داد. نتایج الایزا نیز در ارزیابی کمی فاکتور IX رسوب داده شده با باریوم سیترات نشان داد که حدود ۴۵٪ از فاکتور IX مترشحه از سلول‌های S2 ، کاملاً کربوکسیله‌اند.

نتیجه گیری

فعالیت فاکتور IX و رسوب آن توسط باریوم سیترات موید قابلیت سلول‌های S2 برخلاف سایر سلول‌های حشرات در گاماکربوکسیلاسیون فاکتور IX است. نتایج تحقیق، شواهد متقاعد کننده‌ای را فراهم می‌کند که گاماکربوکسیلاز دروزوفیلا، گاماکربوکسیلاسیون لازم که برای ترشح و فعالیت انعقادی فاکتور IX لازم است را انجام می‌دهد.

کلمات کلیدی: فاکتور IX انعقادی، هموفیلی B ، گاما گلوتامیل کربوکسیلار، پپتیدگلا

تاریخ دریافت : ۹۴/۹/ ۴
تاریخ پذیرش : ۹۵/۱/۱۷

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی ـ گروه زیست‌شناسی ـ دانشگاه حکیم سبزواری ـ سبزوار ـ ایران
۲- مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک مولکولی ـ استادیار دانشکده علوم پایه دانشگاه حکیم سبزواری ـ سبزوار ـ ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یکی از مشخص‌ترین تغییرات پس از ترجمه در پروتئین‌های وابسته به ویتامین K (Vitamin K-dependent, VKD)، گاماکربوکسیلاسیون ناحیه غنی از اسیدآمینه‌های گلوتامات (Glu) و تبدیل آن‌ها به گاما کربوکسی گلوتامات یا گلا (Gla) می‌باشد(۱). ایجاد این رزیدوهای گاماکربوکسی گلوتامیک اسید، برعهده آنزیم گاما کربوکسیلاز است. تا پیش از این اعتقاد بر این بود که این آنزیم تنها در سیستم‌های بیانی پستاندارن وجود دارد و سلول‌های حشرات از جمله سلول‌های S2 دروزوفیلایی، فاقد فعالیت گاما کربوکسیلازی هستند و یا آنزیم گاما کربوکسیلاز قابلیت شناسایی پروپپتید پروتئین‌های VKD را ندارد. بررسی‌های بعدی نشان داد که آنزیم گاما کربوکسیلاز علاوه بر مهره داران، در دو بی‌مهره دروزوفیلا ملانوگاستر و نوعی حلزون Molluscs متعلق به جنس Conus نیز وجود دارد(۴-۲).

یک تفاوت اصلی بین آنزیم دروزوفیلایی و انسانی این است که از انتهای کربوکسی، ۸۶ اسید آمینه کمتر از آنزیم انسانی دارد اما حذف آن اثری بر فعالیت آنزیم انسانی ندارد. هر چند سوبستراهای طبیعی آنزیم گاما کربوکسیلاز دروزوفیلایی تاکنون مشخص نشده است اما این آنزیم می‌تواند پروپپتید فاکتور IX و پروترومبین انسانی را به عنوان سوبسترا شناسایی و ناحیه گلای آن‌ها را کربوکسیله کند. حتی آنزیم گاماکربوکسیلاز دروزوفیلایی در شرایط *in vitro* دارای تمایل بالاتری برای شناسایی سوبستراهای واجد پروپپتید فاکتور IX و پروترومبین نسبت به حالت بدون پروپپتید است(۵). از طرفی نشان داده شده است که در شرایط و مقادیر یکسان، محصول کربوکسیله به دست آمده از آنزیم گاما کربوکسیلاز دروزوفیلا (dγC) حدود ۵ برابر آنزیم گاما کربوکسیلاز انسانی(hγC) است(۵). لذا به نظر می‌رسد گاما کربوکسیلاز از نظر خواص و مکانیسم کربوکسیلازی در مهره‌داران و بی‌مهره‌ها مشابه است و هر دو قادرند که سوبستراهای همدیگر را کربوکسیله کنند. هم چنین موتاسیون F16A باعث حذف کربوکسیلاسیون (کاهش ۹۰٪) به وسیله هر دو آنزیم کربوکسیلاز دروزوفیلا و انسانی می‌شود(۵). انتظار می‌رود سامانه بیانی S2 از کارآیی بالایی برای کربوکسیلاسیون، ترشح و بازیافت فاکتورهای خونی وابسته به ویتامین K برخوردار باشد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی توانایی و کارآیی گاما کربوکسیلاسیون فاکتور IX انعقادی در سلول‌های S2 نسبت به سیستم‌های بیانی پستانداران بود.

مواد و روش‌ها

سوش باکتری، پلاسمیدها، سلول‌های S2:

در یک مطالعه تجربی، سوش DH5α باکتری *E.coli* (استراتژن – آمریکا) برای مراحل کلونینگ استفاده شد. کتابخانه cDNA کبدی برای جداسازی cDNA انسانی از شرکت MRC (انگلستان) خریداری گردید. پلاسمیدهای pMT-V5-HisA ، pCoHygro و سلول‌های دروزوفیلایی اشنایدر ۲ (S2) از شرکت اینویتروژن(آمریکا) تهیه گردید.

محیط کشت، آنزیم‌ها، مواد شیمیایی و کیت‌ها:

محیط کشت LB (Luria-Bertani) به عنوان محیط کشت باکتری استفاده شد و آمپی‌سیلین(۱۰۰ µg/mL محیط کشت) در صورت نیاز به وجود محیط کشت انتخابی استفاده شد. محیط کشت دروزوفیلایی (Schneider's Drosophila Medium)، پنی‌سیلین G ، استرپتومایسین، هایگرومایسین و میتومایسین از شرکت سیگما (آلمان) خریداری گردید. اولیگونوکلئوتیدها به وسیله شرکت بیونر (کره) ساخته شدند. همه آنزیم‌های مورد استفاده در هضم برشی و PCR و هم چنین کیت‌های تخلیص PCR ، تخلیص پلاسمید و تهیه RNA از شرکت رُوش(آلمان) خریداری شد. کیت InsT/Aclone از شرکت فرمنتاز، کیت الایزای مخصوص فاکتور IX و مواد مربوط به آزمون انعقاد یک مرحله‌ای از شرکت دیاگنوستیک(فرانسه) فراهم گردید. ویتامین K برای القا نیز از شرکت رُوش(آلمان) تهیه شد. هم چنین مارکر DNA و مارکر پروتئین از فرمنتاز خریداری گردید.

ساخت سازه‌های بیانی:

به منظور ساخت پلاسمید بیان‌کننده فاکتور IX انسانی که به صورت اختصاصی در سلول‌های دروزوفیلا بیان

www.SID.ir

Archive of SID

گردد، از پلاسمید pMT-V5-His A با طول ۳۵۳۸ جفت باز استفاده شد. برای انتقال cDNA فاکتور IX به داخل این وکتور بیانی لازم بود که جایگاه‌های برشی مناسب در دو انتهای cDNA قرار داده شود. لذا با استفاده از دو آغازگر hFIX-KpnI (5'GGG GTAC/ CGC CAC CAT GCA 3') و hFIX-XhoI (5'CCGC/ TCG GCG CGT GAAC 3')، cDNA فاکتور IX با انتهاهای دلخواه از کتابخانه cDNA کبد، pfu-PCR گردید. محصول cDNA به دست آمده بعد از استخراج از ژل و آدنیله کردن، در T- وکتور کلون شد. به دنبال واکنش الحاق محصول PCR به T- وکتور، سلول‌های پذیرای DH5α با پلاسمید نوترکیب ترانسفورم شدند. بعد از استخراج و برش پلاسمید حاصله(T.V-hFIX) با آنزیم‌های XhoI و KpnI ، خروج cDNA فاکتور IX ، تخلیص از ژل و هم چنین برش پلاسمیدpMT-V5-His A با آنزیم‌های XhoI و KpnI ، عمل اتصال بین cDNA و پلاسمید pMT-V5-His A صورت گرفت که منجر به ساخت پلاسمید pMT-hFIX گردید.

کشت سلول و تراآلایی:

کشت سلول‌های S2 در محیط کشت اختصاصی آن با تراکم ۱ تا ۲ میلیون سلول به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت انجام شد. سلول‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و بدون CO_2 قرار داده شدند و هر چهار الی پنج روز، پاساژ داده می‌شد. تراآلایی سلول‌های S2 با روش کلسیم فسفات انجام شد. ۲۴ ساعت قبل از تراآلایی، ۳ میلی‌لیتر از سلول‌ها با تراکم سلولی 10^6 سلول برای هر میلی‌لیتر به ظرف کشت ۶ خانه‌ای منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. قبل از تراآلایی، ۳۰۰ میکرولیتر از مخلوط تراآلایی شامل ۳۶ میکرولیتر از $CaCl_2$ دو مولار، ۱۰-۵ میکروگرم از DNA و آب تزریقی در یک لوله استریل فراهم شد. سپس یک حجم از این مخلوط با یک حجم از HEPES 2x قطره قطره خوب مخلوط و تا ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. به ازای هر ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت، ۰/۲ میلی‌لیتر از مخلوط تراآلایی به محیط کشت سلولی اضافه شد و به آرامی حرکت داده تا خوب مخلوط شود. پس از انجام تراآلایی سلول ها به مدت ۱۶-۶ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پس از آن محیط سلول‌ها با محیط تازه و گرم تعویض شد.

تهیه کلون‌های پایدار:

برای دستیابی به رده سلولی پایدار از سلول‌های S2 ، پلاسمید مورد نظر همراه با پلاسمید انتخابی pCoHygro که ژن مقاومت به هایگرومایسین را دارد تراآلایی شد. به منظور انتخاب سلول های نوترکیب، ۴۸ ساعت پس از تراآلایی، هایگرومایسین با غلظت ۳۰۰ µg/mL به محیط کشت سلول‌ها افزوده شد. ۱۰-۷ روز پس از تیمار با هایگرومایسین در سلول‌های تراآلوده شده، کلنی‌های مقاوم از طریق استفاده از میتومایسین جدا شدند. در این روش حدود ۱۵۰ میلیون سلول عادی تراآلوده نشده به مدت ۴ ساعت در مجاورت با میتومایسین قرار داده شدند. میتومایسین به طور کوالانتی به DNA متصل شده و از تکثیر آن جلوگیری می‌کند هر چند که سلول‌ها زنده می‌مانند(۷، ۶). پس از سانتریفوژ و شستشو با PBS (Phosphate buffered Saline)، این سلول‌ها با تراکم 3×10^6 cell/mL در پلیت‌های ۲۴ خانه منتقل شدند. از طرفی سلول‌های تراآلوده شده مخلوط سلولی پایدار به گونه‌ای رقیق‌سازی شدند که در هر ۱۰۰ میکرولیتر، به طور میانگین تنها یک سلول وجود داشته باشد. این مقدار به سلول‌های عادی تراآلوده نشده و تیمار شده با میتومایسین در پلیت ۲۴ خانه اضافه می‌شوند. بعد از ۲ هفته از کشت سلول‌ها در محیط واجد هایگرومایسین، سلول‌های پایدار که از یک کلون رشد کرده‌اند از نظر بیان و فعالیت فاکتور IX بررسی و به پلیت ۱۲ و ۶ خانه منتقل شدند.

ارزیابی بیان و فعالیت فاکتور IX نوترکیب:

به منظور بررسی وجود فاکتور IX در محیط کشت سلول‌های تراآلوده شده، محیط کشت سلول‌ها در روزهای اول، دوم و سوم پس از افزودن ویتامین K1 (۵۰۰ µg/mL) و القا با سولفات مس(۵۰۰ µg/mL)، جمع‌آوری شد و پس از سانتریفوژ، محلول رویی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز

www.SID.ir

Archive of SID

گردید. آنتی‌ژن فاکتور IX نوترکیب انسانی بیان شده در محیط کشت سلول‌های تراآلوده شده با روش ساندویچی الایزا بر روی میکروپلیت ها که با آنتی‌بادی های پلی‌کلونال ضد فاکتور IX که در کیت الایزا مهیا شده بود، آشکار شد. برای بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور IX در محیط کشت، از آزمایش aPTT استفاده گردید. برای تعیین فعالیت بیولوژیک فاکتور IX بیان شده توسط سلول های تراآلوده شده، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت جمع آوری شده از هر نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر از پلاسمای فاقد فاکتور IX و ۱۰۰ میکرولیتر از PTT فعال شده مخلوط و دقیقاً ۳ دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر کلسیم کلرید ۲۵ mM از قبل گرم شده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آن اضافه و زمان انعقاد اندازه‌گیری گردید. فعالیت انعقادی هر نمونه بر اساس نمودار استاندارد تعیین شد. منحنی استاندارد انعقاد با استفاده از رسم زمان انعقاد علیه فعالیت انعقادی رقت‌های مختلف از پلاسمای طبیعی سیتراته روی نمودار log-log ترسیم شد.

رسوب‌دهی پروتئین‌های محیط کشت به وسیله باریوم سیترات:

برای بررسی کربوکسیلاسیون فاکتور IX در سلول‌های S2 ، از روش جذب پروتئین‌های وابسته به ویتامین K کربوکسیله به نمک باریوم سیترات استفاده شد. در این روش به محیط کشت سلولی ۰/۴٪ سدیم سیترات و ۵٪ باریوم کلراید اضافه شد و به مدت یک ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار داده شد. بعد از سانتریفوژ، رسوب و محلول رویی به ترتیب برای بررسی فاکتور IX جذب شده و جذب نشده نگهداری شد. رسوب حاصل با ۵ mM کلرید باریوم سرد شستشو داده شد و سانتریفوژ گردید. نهایتاً رسوب در ۰/۱ M سدیم سیترات و ۱۰٪ آمونیوم سولفات حل گردید. بعد از سانتریفوژ، محلول نهایی برای بررسی فاکتور IX کربوکسیله در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای بررسی درصد بازیافت فاکتور IX نسبت به مقدار اولیه، مقدار فاکتور IX قبل و بعد از رسوب به وسیله الایزا اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری:

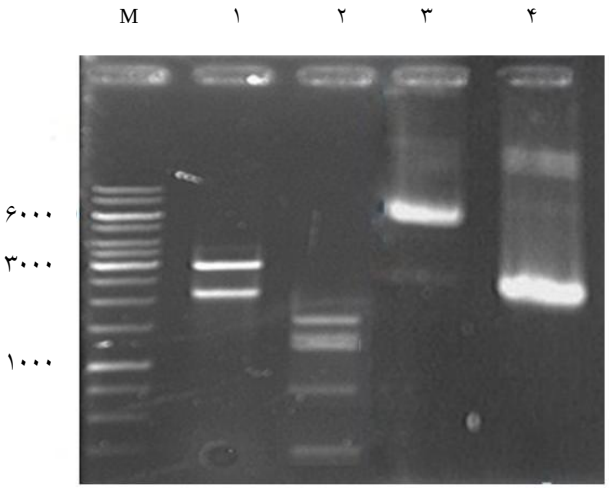
همه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس(ANOVA) و آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام شد.

یافته‌ها

ساخت سازه‌های بیانی:

بعد از کلونینگ cDNA فاکتور IX در T- وکتور و ساب کلونینگ آن در وکتور pMT-V5-His A ، پلاسمید نوترکیب pMT-hFIX ایجاد شد. پلاسمید نوترکیب حاصل به شکل سوپرکویل سنگین‌تر از pMT-V5-His A حرکت می‌کند که مؤید کلون شدن قطعه مذکور در pMT-V5-His A است.

صحت کلون شدن قطعه مذکور با استفاده از برش پلاسمید pMT-hFIX با آنزیم‌های DraI و Hind III نیز تایید شد(نمودار ۱). برای بررسی عدم وجود جهش در فاکتور IX کلون شده در pMT-V5-His A ، این پلاسمید با استفاده از یک جفت آغازگر عمومی T7 promoter و BGH-r از داخل وکتور تعیین توالی گردید. بررسی توالی نشان‌دهنده صحت کلونینگ و عدم وجود جهش در فاکتور IX بود.



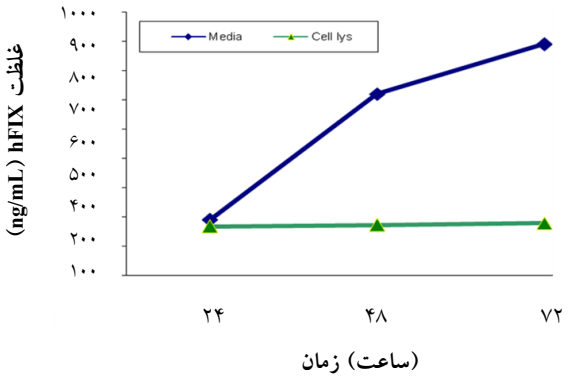
نمودار ۱: تایید کلون شدن قطعه cDNA فاکتور IX با استفاده از برش پلاسمید pMT-hFIX با آنزیم‌های DraI (ردیف ۱) و Hind III (ردیف ۲). الگوی حرکتی پلاسمید pMT-V5-His A (ردیف ۳) و پلاسمید نوترکیب pMT-hFIX (ردیف ۴). M : مارکر Kb ۱.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی بیان فاکتور IX در سلول‌های S2-hFIX :

برای ارزیابی بیان دایم فاکتور IX در سلول‌های S2-hFIX ، محیط کشت و هم‌چنین لیز سلولی سلول‌های پایدار و القا شده و نمونه‌های کنترل برای آزمون الایزا مورد استفاده قرار گرفتند. مقدار فاکتور IX ترشح شده در محیط کشت در روز اول، دوم و سوم بعد از القا با سولفات مس و اضافه کردن ویتامین K1 به ترتیب ۲۹۰ ng/mL ، ۷۲۰ ng/mL و ۸۹۰ ng/mL بود. این در حالی است که مقدار فاکتور IX درون سلول‌های S2-hFIX در تمام دوره بعد از القا در سطح حداقل و حدود ۲۵۰ ng/mL بود (نمودار ۲).



نمودار ۲: بررسی بیان فاکتور IX پایدار در سلول‌های نوترکیب S2-hFIX ، در زمان‌های مختلف بعد از القا، بر اساس آزمایش الایزا بر روی نمونه‌های گرفته شده از محیط کشت(Media) و لیز سلولی(lys Cell).

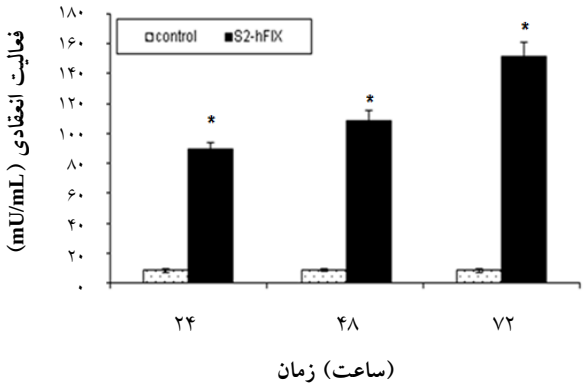
بررسی فعالیت فاکتور IX نوترکیب در سلول‌های S2-hFIX:

فعالیت انعقادی فاکتور IX در محیط سلول‌های پایدار S2-hFIX در مقایسه با کنترل در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از القا با سولفات مس و افزودن ویتامین K1 ، بررسی گردید.

میانگین فعالیت انعقادی فاکتور IX ترشح شده از سلول‌های S2-hFIX در روز اول، دوم و سوم به ترتیب ۹۰ mU/mL ، ۱۰۹ mU/mL و ۱۵۳ mU/mL بود (جدول ۱). همان طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، بیشترین فعالیت بیولوژیک در ۷۲ ساعت بعد از القای سلول‌های پایدار مشاهده گردید. فعالیت در هر دو حالت کنترل در سلول‌های ترانسفکت نشده صفر و در سلول‌های پایدار القا نشده حدود ۵ mU/mL می‌باشد.

جدول ۱: مقادیر میانگین فعالیت انعقادی فاکتور IX در دو گروه کنترل و مترشحه از سلول‌های نوترکیب پایدار S2-hFIX

زمان	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳	میانگین فعالیت	انحراف معیار
۲۴	۹۳	۹۱	۸۸	۹۰/۶	۲/۵
۴۸	۱۰۸	۱۰۶	۱۱۳	۱۰۹	۳/۶
۷۲	۱۵۸	۱۵۰	۱۵۱	۱۵۳	۴/۳
کنترل	۶	۸	۹	۷/۶	۱/۵



نمودار ۳: مقایسه فعالیت انعقادی فاکتور مترشحه از سلول‌های نوترکیب پایدار S2-hFIX با سلول‌های S2 پایدار القا نشده به عنوان نمونه کنترل(کنترل)، در زمان‌های مختلف بعد از القا. ستاره‌ها نشان‌دهنده معناداری نمونه‌ها در مقایسه با کنترل با استفاده از آنالیز واریانس است(p< ۰/۰۵).

رسوب فاکتور IX :

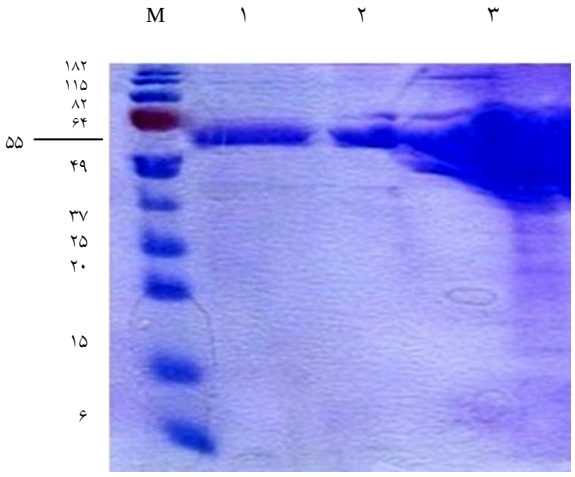
قبل و بعد از تیمار محیط کشت سلول‌های پایدار S2 تولیدکننده فاکتور IX با نمک باریوم سیترات، الگوی حرکتی فاکتور IX ترشح شده در مقایسه با فاکتور IX استاندارد تخلیص شده از پلاسمای نرمال(۱ µg در چاهک) در SDS-PAGE بررسی شد. همان طور که از نمودار ۴ مشخص است، این روش برای جذب

www.SID.ir

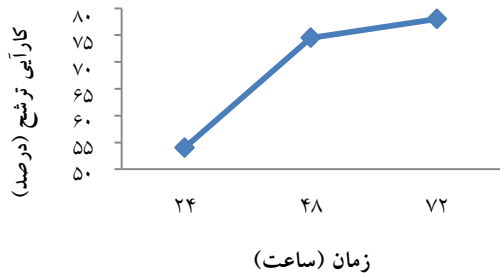
Archive of SID

پروتئین‌های کربوکسیله کارا بود. هم چنین نتایج نشان داد فاکتور IX مترشحه از سلول‌های نوترکیب به عنوان یک پروتئین کربوکسیله توسط سیترات باریوم جذب و از سایر پروتئین‌های محیط کشت جدا شد.

مقدار فاکتور IX بازیابی شده از رسوب سیترات باریوم که با الایزا تایید شد، نشان داد که در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲، درصد بازیافت فاکتور IX به ترتیب ۲۹، ۳۱ و ۴۵ درصد است. بر اساس این نتایج حدود نیمی از فاکتور IX بیان شده به وسیله سلول‌های S2-hFIX رسوب نگردید.



نمودار ۴: الگوی حرکتی فاکتور IX ترشح شده از سلول‌های نوترکیب S2-hFIX در SDS-PAGE قبل(۳) و بعد از رسوب(۲). ردیف ۱ فاکتور IX استاندارد. M : مارکر.



نمودار ۵ : کارآیی ترشح فاکتور IX در سلول‌های S2

کارآیی ترشح:

کارآیی ترشح یک پروتئین با نسبت بخش ترشح شده و مقدار کلی بیان شده آن پروتئین تعریف می‌شود(۸). بر اساس این تعریف، کارآیی ترشح فاکتور IX در سلول‌های S2 در روزهای اول، دوم و سوم بعد از القا به ترتیب ۵۳ ، ۷۴ و ۷۸ درصد بود(نمودار ۵). این بدان معناست که فاکتور IX به دام افتاده در داخل سلول در طول دوره کشت سلولی آزاد می‌شود.

بحث

با توجه به مشکلات سلول‌های پستانداران از جمله آهستگی رشد، پایین بودن بقای سلولی و ناپایداری آن‌ها، سامانه‌های بیانی حشرات و به ویژه سلول‌های دروزوفیلایی S2 می‌توانند جایگزین مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در سطح بالا باشند. یکی از مزایای اصلی این سامانه در مقایسه با سیستم‌های پروکاریوتی، توانایی آن‌ها در تولید انبوه پروتئین‌های یوکاریوتی است که نیاز به تغییرات پس از ترجمه دارند. مزیت دیگر این سامانه، توانایی آن‌ها در تولید پروتئین‌ها در مقیاس وسیع و در زمانی نسبتاً کوتاه(برخلاف سیستم‌های پستانداران) است (۹). هم چنین از آن جایی که تراکم رده‌های سلولی حشرات نسبت به سلول‌های پستانداران بیشتر است، به همین منظور حجم کوچکی از محیط کشت هم برای رشد آن‌ها کافی به نظر می‌رسد(۱۰).

از مزایای قابل توجه سامانه بیانی S2 می‌توان به قدرت بیان بیشتر نسبت به سلول‌های حشرات دیگر از قبیل Sf9 (۱۰ تا ۲۰ برابر)، تغییرات بعد از ترجمه یوکاریوتی از جمله گاما کربوکسیلاسیون، عدم لیز سلول‌ها، عدم تداخل و میانکنش بین پروتئین بیانی با پروتئین‌های رده سلولی، زمان کوتاه تهیه رده سلولی پایدار(حدود ۲-۳ هفته)، رشد با دانسیته بالا، رشد در دمای اتاق و عدم نیاز به CO_2 اشاره کرد(۱۴-۱۱، ۹، ۵، ۲).

سلول‌های S2 نسبت به سایر رده‌های سلولی حشرات و سلول‌های پستانداران در برابر تغییرات pH ، دما، اکسیژن و اسمولالیته مقاوم می‌باشند لذا ممکن است سلول S2 برای بیش از یک ماه بدون تغییر محیط، کشت شوند(۱۵). هم چنین این سامانه بیانی یک سامانه غیرلیتیک و برپایه وکتورهای پلاسمیدی است(۱۳). بررسی‌ها نشان داده‌اند که

www.SID.ir

Archive of SID

وکتورهای بیانی این نوع سامانه به صورت چند نسخه به داخل کروموزوم سلول‌های S2 دروزوفیلا وارد می‌شوند و این سلول‌ها توانایی ورود بالغ بر ۱۰۰ نسخه از یک کاست بیانی را به ژنوم خود در یک رخداد تراآلایی دارند(۱۷، ۱۶). به این ترتیب برای تثبیت رده سلولی پایدار با سطح بیان بالا، نیاز به دوره زمانی طولانی تکثیر پلاسمید نیست (۹). با توجه به مزایای زیاد این سیستم، برخلاف محصولات موجود در پستانداران و سیستم‌های بیانی آن‌ها که به طور معمول در انتها دارای گالاکتوز و اسید سیالیک می‌باشند، محصولات گلیکوزیلاسیونی در حشرات و سیستم‌های بیانی آن‌ها به صورت انتهایی با واحد مانوزی کم یا انتهایی با واحد مانوزی زیاد و هیبرید با انتهای N-استیل گلوکز آمین دار می‌باشد(۱۸، ۸).

یکی از اولین گزارش‌ها در به کارگیری این سامانه، بیان دوپامین بتا هیدروکسیلاز (DBH) به میزان ۱۶ mg/L در مقیاس زیاد و اینترلوکین ۵ انسانی به میزان ۲۲ mg/L در سلول‌های S2 در فلاسک‌های ۱ لیتری بوده است(۲۰، ۱۹). میزان بازدهی و تولید اریتروپویتین نوترکیب انسانی نیز در سیستم بیانی S2 پس از کشت در فلاسک‌های ۵۰۰ mL به مقدار ۱۸ mg/L گزارش شده است(۸). هم چنین پلاسمینوژن انسانی در سلول‌های S2 در فلاسک‌های ۱ لیتری به میزان ۱۰ mg/L تولید شد(۲۱). تاکنون بیان پروتئین‌های نوترکیب وابسته به ویتامین K که برای فعالیت خود نیازمند کربوکسیلاسیون اسید آمینه‌های گلوتامیک در انتهای آمینوی خود هستند، در این سامانه صورت نگرفته است. زیرا تصور می‌شد سلول‌های حشرات از جمله سلول‌های S2 دروزوفیلایی فاقد فعالیت گاما کربوکسیلازی هستند و یا آنزیم گاما کربوکسیلاز قابلیت شناسایی پروپپتید این نوع پروتئین‌ها را ندارد(۲). به دنبال آزمایش‌های باندیوپادیای در شرایط *in vitro* و مطالعه‌های قبلی ما، مشخص گردید که نه تنها سلول‌های S2 برخلاف سایر حشرات واجد فعالیت گاما کربوکسیلازی‌اند بلکه آنزیم گاماکربوکسیلاز دروزوفیلایی ۵ برابر، محصول گاماکربوکسیله بیشتری تولید می‌کند(۱۲، ۵). نتایج این تحقیق نیز این مطلب را تایید می‌کند. بررسی غلظت فاکتور IX نوترکیب ترشح شده از سلول‌های S2 ، حاکی از بیان حدود ۰/۹ mg/L است که در مقایسه با گزارش‌های بیان در سلول‌های CHO و سلول‌های MSCs_hAM بسیار بیشتر است(۲۳، ۲۲). هم چنین فعالیت بالای فاکتور IX (۱۵۳ mU/mL) نشان‌دهنده فعالیت بالای آنزیم گاما کربوکسیلاز در دروزوفیلا نسبت به این آنزیم در پستانداران است.

چندین روش مختلف برای بررسی و تشخیص فاکتور IX نوترکیب فعال از فاکتور IX غیرفعال استفاده می‌شود که همه آن‌ها برپایه تغییرات کونفورماسیونی دومین گلا می‌باشد(۲۴). رسوب باریوم سیترات یکی از اولین روش‌های استفاده شده است که به عنوان روش تقریباً کارآمد در جداسازی پروتئین‌های کربوکسیله و فعال از جمعیت غیرفعال مورد توجه است(۲۴). در این روش، از خاصیت پروتئین‌های وابسته به ویتامین K در جذب نمک باریوم سیترات از طریق اسیدآمینه های گاما کربوکسی گلوتامیک استفاده می‌شود و مولکول‌هایی که به طور ضعیف یا اصلاً کربوکسیله نشده‌اند، نمی‌توانند به وسیله یون‌های باریوم جذب و رسوب گردند، بنابراین به صورت محلول در سوپرناتانت باقی می‌مانند.

ارزیابی کمی فاکتور IX رسوب داده شده نشان داد که حدود ۴۵-۳۰ درصد از فاکتور IX مترشحه از سلول‌های S2 جذب و رسوب شده‌اند و بنابراین به احتمال زیاد به طور کامل کربوکسیله هستند. براین اساس حدود ۷۰-۵۵ درصد از فاکتور IX بیان شده جذب و رسوب نگردیده که ممکن است این قسمت از فاکتور IX ساخته شده به طور جزیی یا اصلاً کربوکسیله نشده باشد. هر چند که هم فعالیت انعقادی و هم رسوب با باریوم سیترات نشان می‌دهد که قسمتی از فاکتور IX انسانی مترشحه از سلول‌های S2 به طور صحیح گاماکربوکسیله شده‌اند اما تاکنون تعریف دقیقی از کربوکسیلاسیون صحیح پروتئین‌های وابسته به ویتامین K ارایه نشده است. نتایج تحقیقات و پژوهش‌ها نشان داده است که تمام واحدهای اسیدگلوتامیک در ناحیه گلا نقش کلیدی و اساسی ندارند. فاکتور ۹ دارای ۱۲ واحد اسیدآمینه گلوتامیک در دومین گلای خود است و اسیدهای آمینه شماره ۷، ۸، ۱۵، ۱۷، ۲۰، ۲۱، ۲۶، ۲۷، ۳۰، ۳۳، ۳۶ و ۴۰ ، واحدهای اسیدآمینه

www.SID.ir

Archive of SID

گلوتامیک هستند. جهش در اسیدهای آمینه گلوتامیک در موقعیت‌های ۷، ۱۵، ۲۰، ۲۷، ۳۳ باعث کاهش شدید در فعالیت بیولوژیک فاکتور ۹ می‌شود، اما جهش در سایر موقعیت‌ها تاثیر چندانی روی فعالیت بیولوژیک این فاکتور ندارد(۲۵).

بنابراین از آن جایی که تنها ۵ اسیدآمینه گلوتامیک از ۱۲ اسیدآمینه گلوتامیک موجود در دومین گلا برای فعالیت بیولوژیک فاکتور IX کافی است، لذا به نظر می‌رسد که فاکتور IX که به طور ناقص کربوکسیله شده ولی واجد فعالیت‌اند، در سوپرناتانت وجود داشته باشد. این فرض با نتایج کارآیی ترشح نیز تایید می‌شود. کارآیی حدود ۸۰ درصدی ترشح فاکتور IX به وسیله سلول‌های S2 نشان می‌دهد که حدود ۲۰٪ فاکتور IX بیان شده در داخل سلول نگه داشته می‌شود. لذا بسیاری از پروتئین‌های فاکتور IX در محیط کشت ممکن است به طور کامل کربوکسیله نشده‌اند اما بدلیل کربوکسیلاسیون حداقل ۵ اسید آمینه در ناحیه گلا، قادر به ترشح شده‌اند.

نتیجه‌گیری

داده‌های این مطالعه نشان می‌دهد که سلول‌های S2 ، فاکتور IX فعال بیولوژیکی را بیان می‌کنند و لذا پیشنهاد می‌کند که سلول‌های S2 قادر به کربوکسیلاسیون فاکتور IX انسانی می‌باشند. در واقع فعالیت انعقادی فاکتور IX مترشحه از سلول‌های S2 ، شواهد متقاعد کننده‌ای را فراهم می‌کند که سلول‌های S2 دروزوفیلایی، گاما کربوکسیلاسیون لازم را که برای فعالیت انعقادی لازم است انجام می‌دهند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه حکیم سبزواری به خاطر حمایت مالی پروژه، هم چنین آقای دکتر زمردی‌پور(پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) و خانم دکتر Mettine Bos (مرکز پزشکی دانشگاه لیدن هلند) به دلیل در اختیار قرار دادن برخی سلول‌ها و مواد، کمال تشکر را داریم.

References :

1- Khorshidi S, Zomorodipour A, Behmanesh M, Vatandoost J, Bos MH. Functional expression of the human coagulation factor IX using heterologous signal peptide and propeptide sequences in mammalian cell line. Biotechno Lett 2015; 37(9): 1773-81.

2- Li T, Yang CT, Jin D, Stafford DW. Identification of a Drosophila vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase. J Biol Chem 2000; 275(24): 18291-6.

3- Walker CS, Shetty RP, Clark K, Kazuko SG, Letsou A, Olivera BM, *et al*. On a Potential Global Role for Vitamin K-dependent gamma-carboxylation in animal systems. Evidence for a gamma-glutamyl carboxylase in Drosophila. J Biol Chem 2001; 276(11): 7769-74.

4- Czerwiec E, Begley GS, Bronstein M, Stenflo J, Taylor K, Furie BC, *et al*. Expression and characterization of recombinant vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase from an invertebrate, Conus textile. Eur J Biochem 2002; 269(24): 6162-72.

5- Bandyopadhyay P, Clark K, Stevenson B, Rivier J, Olivera B, Golic K, *et al*. Biochemical characterization of Drosophila gamma-glutamyl carboxylase and its role in fly development. Insect Mol Biol 2006; 15(2): 147-56.

6- Zhou D, Lin G, Zeng SC, Xiong B, Xie PY, Cheng DH, *et al*. Trace levels of mitomycin C disrupt genomic integrity and lead to DNA damage response defect in long-term-cultured human embryonic stem cells. Arch Toxicol 2015; 89(1): 33-45.

7- Daker M, Bhuvanendran S, Ahmad M, Takada K, Khoo AS. Deregulation of lipid metabolism pathway genes in nasopharyngeal carcinoma cells. Mol Med Rep 2013; 7(3): 731-41.

8- 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.

9- 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.

10- Kollewe C, Vilcinskas A. Production of recombinant proteins in insect cells. Am J Biochem Biotechnol 2013; 9: 255-71.

11- Bernard A, Kost T, Overton L, Cavegn C, Young J, Bertrand M, *et al*. Recombinant protein expression in aDrosophila cell line: comparison with the baculovirus system. Cytotechnology 1994; 15(1-3): 139-44.

12- 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.

13- 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.

www.SID.ir

Archive of SID

Biotechnol Adv 2012; 30(3): 613-28.
14- Vatandoost J, Zomorodipour A. Optimization of transfection and stable expression of human factor IX in Drosophila S2 cells. Journal of Cell and Molecular Research 2015; 27(4): 598-610.
15- Benting J, Lecat S, Zacchetti D, Simons K. Protein expression in Drosophila Schneider cells. Anal Biochem 2000; 278(1): 59-68.
16- Cherbas L, Cherbas P. "Parahomologous" gene targeting in Drosophila cells: an efficient, homology-dependent pathway of illegitimate recombination near a target site. Genetics 1997; 145(2): 349-58.
17- Jorge SA ,Santos AS, Spina Â, Pereira CA. Expression of the hepatitis B virus surface antigen in Drosophila S2 cells. Cytotechnology 2008; 57(1): 51-9.
18- Vatandoost J, Khalili L. Glycosylation Engineering of Human Recombinant Proteins in New S2 System. Journal of Knowledge & Health 2016; 10(3): 44-51. [Article in Farsi]
19- 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(Pt 1): 57-64.
20- Johanson K, Appelbaum E, Doyle M, Hensley P, Zhao B, Abdel-Meguid SS, *et al*. Binding Interactions of Human Interleukin 5 with Its Receptor α Subunit Large Scale Production, Structural, And Functional Studies Of Drosophila-Expressed Recombinant Proteins. J Biol Chem 1995; 270(16): 9459-71.
21- Nilsen SL, Castellino FJ. Expression of Human Plasminogen inDrosophilaSchneider S2 Cells. Protein Expres Purif 1999; 16(1): 136-43.
22- Kaufman R, Wasley L, Furie B, Furie B, Shoemaker C. Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem 1986; 261(21): 9622-8.
23- Paridar M, Amirizadeh N, Habibi Roudkenar M, Amiri F, Abolghasemi H, Jalili MA. Expression of Recombinant Coagulation Factor IX in Human Amniotic Membrane-derived Mesenchymal Stem Cells: A New Strategy to Gene Therapy of Hemophilia B. Iranian Journal of Blood and Cancer 2014; 6(3): 133-41.
24- Lindsay M, Gil GC, Cadiz A, Velander WH, Zhang C, Van Cott KE. Purification of recombinant DNA-derived factor IX produced in transgenic pig milk and fractionation of active and inactive subpopulations. J Chromatogr A 2004; 1026(1): 149-57.
25- Stenflo J, Dahlback B. Vitamin K-dependent proteins in blood coagulation. In: The Molecular Basis of Blood Diseases. 2nd ed. New York: W.B.Saunders company; 2001. p. 147-56.

www.SID.ir

Archive of SID

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2016; 13(3): 233-242

Original Article

The efficiency of secretion and γ-carboxylation of recombinant human factor IX in stable drosophila cells

Khalilzadeh S.[1],Vatandoost J.[1]

[1]Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

Abstract

Background and Objectives

Human factor IX (hFIX) during maturation in the liver requires carboxylation of glutamic amino acids in the Gla domain, which is involved in its secretion and activity. Due to the deficiency of mammalian expression systems in the secretion and fully γ_carboxylation of recombinant coagulation factors and higher activity of γ_carboxylase enzyme in Drosophila S2system, the present study was performed to evaluate ability of this system in γ_carboxylation, secretion and activity of recombinant hFIX.

Materials and Methods

In this study, following transfection of S2 cells with pMT-hFIX vector, the ELISA and aPTT tests were used to evaluate the expression and activity of recombinant hFIX. In addition, γ_carboxylation of factor IX was approved by barium citrate precipitation. The samples were analyzed on three consecutive days and being repeated three times.

Results

The coagulation results showed the secretion of active recombinant hFIX by stable S2 cells. Quantitative assessment of recombinant hFIX in medium and cell lysis with ELISA showed 94% secretion efficiency. The results of ELISA on precipitated FIX with barium citrate also indicated that about 45% of secreted recombinant hFIX from S2 cells are fully carboxylated.

Conclusions

Activity and barium citrate precipitation of recombinant hFIX confirmed the ability of S2 cells, unlike other insect cells, in the γ_carboxylation of factor IX. So, our results provide convincing evidence that Drosophila γ_carboxylase perform necessary γ_carboxylation required for secretion and coagulation activity of recombinant hFIX.

Key words: Coagulation factor IX, Hemophilia B, gamma-glutamyl carboxylase, GALA peptide

Received: 25 Nov 2015
Accepted: 5 Apr 2016

Correspondence: Vatandoost J., PhD of Molecular Genetics. Assistant Professor of Hakim Sabzevari University. P.O.Box: 397, Sabzevar, Iran. Tel: (+9851) 44013329; Fax: (+9851) 44013329
E-mail: *j.vatan@hsu.ac.ir*

www.SID.ir