

بهینه‌سازی تولید فعال کننده پلاسمینوژن بافتی نوترکیب در انگل لیشمانیای غیر بیماری‌زا با طراحی دو سازه ژنی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۸/۳۰ ۱۳۸۹/۰۹/۲۳ تاریخ پذیرش:

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن بافتی نوترکیب (rt-PA) یکی از مهم‌ترین ترکیبات خد لخته می‌باشد که در درمان سکته‌های قلبی و مغزی از اهمیت بالایی برخوردار است. تاکنون روش‌های مختلفی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب هتلرولوگ با استفاده از میزان‌های پروکاربیوتیک و یوکاربیوتیک مورد بررسی قرار گرفته است. اخیراً انگل لیشمانیا تارنتولا (*L. tarantolae*) به دلایل متعددی از جمله عدم بیماری‌زا بی و شرایط ویژه آن در تولید پروتئین‌های پیچیده اهمیت زیادی یافته است. روش بررسی در تحقیق حاضر بهمنظر بهینه‌سازی میزان بیان t-PA نوترکیب انسانی با استفاده از سلول *L. tarantolae* دو سازه بیانی که هر یک حاوی دو کپی از t-PA cDNA بود طراحی و ساخته شد. این سازه‌ها از طریق الکتروپوریشن به سلول‌های *L. tarantolae* وارد و در ژنوم انگل ادغام گردیدند. پس از انتخاب کلون‌های ترانسفورم شده، بیان t-PA ترشح شده به محیط کشت سلولی و میزان فعالیت بیولوژیکی آن توسط آزمون‌های وسترن بلات و کرومولیز (Chromolize) بررسی گردید. **یافته‌ها:** ظهور باند ۶۴kDa در غشاء نیتروسلولز حضور rt-PA در محیط کشت سلول‌های *L. tarantolae* ترانسفکت شده را تایید کرد. نتایج آزمون علاوه بر تایید حضور پروتئین t-PA فعال در سوب سلولی نشان داد که میزان فعالیت پروتئین ترشح شده در سلول‌های ترانسفکت شده با یک ساز، ۳۷۵IU/ml و در سلول‌های ترانسفکت شده با هر دو سازه برابر با ۴۸۰IU/ml می‌باشد. **نتیجه‌گیری:** در این مطالعه میزان فعالیت t-PA بیان شده در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده، دست‌کم هفت برابر بیشتر از مقدار گزارش شده در مطالعات پیشین در این میزان و نیز بیشتر از عدد گزارش شده در بسیاری از میزان‌های یوکاربیوتیک دیگر می‌باشد.

کلمات کلیدی: پروتئین نوترکیب، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی، لیشمانیا تارنتولا.

مهدي حمایتكار، نوشين داودي

فاطمه دوامي، كيوان مجيد زاده اردبيلي

*فرزانه برخورداري، فريدون مهبدي

گروه بيوتكنولوجى پزشکى، انتسيتو پاستور ايران،

تهران، ايران

*نويسنده مسئول: تهران، خيابان پاستور، انتسيتو پاستور

ايران، شماره ۶۹، مرکز تحقیقات بيوتكنولوجى، کدپستي:

تلفن: ۰۲۱-۶۶۴۸۰۷۸۰

email: mahboudi.f@gmail.com

مقدمه

سکته مغزی، آمبولی ریه و یا نارسایی کلیه گردد. یک دیدگاه مهم درمانی ترومبووز، تزریق وریدی فعال کننده‌های پلاسمینوژن به عنوان داروهای حل کننده لخته‌های فیبرینی می‌باشد. فعال کننده‌های پلاسمینوژن آنزیم‌های پروتولیتیکی هستند که با تبدیل پلاسمینوژن غیرفعال به شکل فعال آن یعنی پلاسمین، باعث حل شدن لخته فیبرینی و بازگشت مجدد جریان خون می‌گردند.^۱ از میان فعال کننده‌های پلاسمینوژن، استرپتوکیناز قدیمی‌ترین و ارزان‌ترین عامل ترومبوولیتیک است که توسط گونه‌های مختلفی از استرپتوکوک‌ها تولید و هنوز در تعدادی از کشورهای جهان از جمله کشور ما به عنوان یک داروی موثر کاربرد کلینیکی دارد. اما استفاده از این پروتئین به دلیل منشأ غیر انسانی آن با واکنش‌های نامطلوب از جمله واکنش‌های تب‌زا

بیماری‌های قلبی عروقی مانند انفارکتوس حاد میوکارد Acute Myocardial Infarction (AMI)، حمله مغزی (Stroke) و ترومبوآمبولی وریدی (Venous thromboembolism) احتمالاً اصلی ترین عامل مرگ و ناتوانی در یک جمعیت بالغ می‌باشند. ترومبوآمبولی یکی از اختلالات شایع جریان خون در انسان می‌باشد که عروق ارگان‌های مختلف از جمله عروق کرونر قلب، عروق مغزی، عروق ریه، شریان کلیوی و بالآخره وریدهای عمقی اندام‌ها به ویژه اندام تحتانی را درگیر می‌نماید.^{۲-۳} این اختلال اگر با انسداد عروق حیاتی بدن مانند عروق کرونر قلب، عروق مغزی، ریوی و یا کلیوی همراه باشد می‌تواند باعث بروز صدمات جبران ناپذیری مانند انفارکتوس قلبی،

Reteplase فقط دارای دامین‌های Kringle2 و سرین پروتئاز است. با این وجود، تحقیق و تلاش برای بهبود و کاهش هزینه تولید t-PA نوترکیب ادامه دارد. یکی از مشکلات تولید t-PA نوترکیب در سیستم CHO استفاده از محیط کشت حاوی سرم می‌باشد که از طرفی موجب پیچیده شدن مراحل خالص‌سازی پروتئین نوترکیب می‌گردد و هزینه‌ها را افزایش می‌دهد و از طرف دیگر خطر آسودگی با ویروس‌ها و پرایون‌ها را ممکن می‌سازد. همچنین گلیکوزیلاسیون t-PA نوترکیب در سیستم CHO رضایت‌بخش نیست.^{۱۳}^{۱۴} در سال‌های اخیر استفاده از ارگانیسم‌های انگلی متعلق به خانواده Trypanosomatidae (Trypanosomatidae) در مطالعات بیوتکنولوژی به دلیل خصوصیات زنگی ویژه آن‌ها اهمیت فراوانی یافته است. در این میان انگل غیر بیماری‌زای Leishmania tarentolae (L. tarentolae) که انگل نوعی مارمولک به نام Tarentolae anularis است برای کلونینگ و بیان ژن‌های انسانی مورد توجه فراوانی قرار گرفته است. خصوصیات ویژه این ارگانیسم از قبیل سرعت رشد بالا، شرایط رشد ارزان، غیربیماری‌زا بودن آن، گلیکوزیلاسیون مناسب گلیکوپروتئین‌ها در آن و در نهایت بیان موفق چندین پروتئین مختلف، این انگل را به میزانی بالقوه جهت بیان گلیکوپروتئین‌های هترو لوگ تبدیل کرده و پیش‌بینی می‌شود که به عنوان جایگزینی برای سلول‌های پستانداران مطرح شود.^{۱۵-۱۸} مطالعات نشان داده است که در اکثر میزان‌های یوکاریوتیک، رونویسی مرحله‌ای تعیین‌کننده در بیان پروتئین‌ها نوترکیب می‌باشد. در میان روش‌های مختلف افزایش رونویسی از ژن‌ها مانند استفاده از پرموترهای قوی و وارد سازی نواحی متصل شونده به ماتریکس (Matrix attachment regions)، مشاهده شده است که تعداد کپی ژن کدکننده پروتئین نوترکیب (Gene copy number) نیز عاملی تاثیرگذار در تنظیم رونویسی می‌باشد.^{۱۹-۲۰} بدین‌منظور در این مطالعه به منظور بهینه‌سازی بیان گلیکوپروتئین t-PA در L. tarentolae دو سازه بیانی که هر کدام حاوی دو کپی از ژن 18s ribosomal RNA (ssu) از ژنوم میزان به درون این انگل ادغام شد. ssu ناحیه‌ای از ژنوم این میزان می‌باشد که شدت توسط RNA پلیمراز I رونویسی می‌شود که این مطلب خود در میزان بیان تاثیرگذار می‌باشد.^{۲۱} اگرچه هدف از این تحقیق بهینه‌سازی میزان بیان t-PA نوترکیب در این میزان تک یاخته بوده است، اما سازه‌های طراحی شده این قابلیت را

همراه است. اوروکیناز (Urokinase) که دیگر ترکیب فعال‌کننده پلاسمینوژن می‌باشد اگرچه به دلیل منشا انسانی، اینمنی‌زا و تبزنا نمی‌باشد، اما تهیه آن از ادرار، گران بوده و این منبع برای استفاده وسیع درمانی محدود می‌باشد. اما فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی پیرونوژن نمی‌باشد، برخلاف دو عامل فوق، خاصیت فیرینولیتیک خود را به طور اختصاصی اعمال کرده، با قدرت بیشتری به لخته‌های فیرینینی متصل می‌شود و ترجیحاً پلاسمینوژن به دام افتاده در داخل لخته‌ها را فعال می‌کند. به همین علت خطر خونریزی‌های داخلی در استفاده از آن به میزان زیادی کاهش می‌باید. بنابراین t-PA نوترکیب بی‌شک یکی از موثرترین عوامل فیرینولیتیک می‌باشد.^۵ سرین پروتئازی با وزن مولکولی حدود ۶۸kDa بوده و دارای ۵۲۷ اسید آمینه می‌باشد. این گلیکوپروتئین مالتی دامین شامل پنج دامین اصلی Serine protease, Kringle2, Kringle1, Epidermal growth factor, Finger factor, Finger band دی سولفیدی بوده و سه زنجیره اولیگوساکاریدی از نوع N-linked و یک زنجیره از نوع O-linked به بدن پروتئینی آن متصل می‌باشد. t-PA نوترکیب به عنوان یک داروی فیرینولیتیک در درمان بیماری‌هایی نظری انفارکتوس حاد میوکارد، آمبولی ریه و حمله حاد ایسکمیک استفاده می‌گردد.^{۶-۷} تاکنون انواع مختلفی از سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمراها، حشرات، سلول‌های پستانداران، گیاهان و حیوانات ترانسژن به عنوان سیستم‌های بیانی در تولید t-PA نوترکیب استفاده شده است.^۸ به دلیل ویژگی‌هایی نظری ساختار پیچیده، باندهای دی سولفیدی زیاد، میزان و ساختار اولیگوساکاریدها، باکتری‌ها غالباً در بیان این گلیکوپروتئین ناموفق بوده‌اند.^{۸-۹} همچنین نشان داده شده است که ساکارومیسیس سروزیزیه (Saccharomyces cerevisiae) و سلول حشرات نیز به دلیل ترشح پایین پروتئین به محیط کشت، گلیکوزیلاسیون بیش از حد و فولیدینگ نادرست برای این منظور مناسب نمی‌باشند.^{۱۰-۱۱} از طرف دیگر بیان این پروتئین در گیاهان ترانسژن نیز با بازده بسیار پایینی همراه بوده است.^{۱۲} امروزه t-PA نوترکیب با استفاده از سلول‌های تخم‌دان هامستر چینی (CHO) Chinese Hamster Ovary تولید می‌شود. t-PA نوترکیب تجاری با نام‌های Activase (Genentech)، Relese (Centosor & Roche) در دسترس است.^۷ البته داروی

ساخت سازه‌های نهایی: به منظور ساخت سازه‌های نهایی جهت بیان t-PA نوترکیب در *L. tarentolae* وکتور pGEMt1-*a*-t2 با آنزیم های *BamHI/SalI* بریده و قطعه t1-*a*-t2 پس از خالص سازی از روی ژل آگارز توسط کیت مربوطه (Qiagen, USA)، جهت ورود به وکتورهای نهایی استفاده شد. وکتورهای بیانی pFX1.4hyg و pFX1.4sat نیز به روش مشابه توسط آنزیم های *BglII/XhoI* که سازگار (Biocompatible) با آنزیم های *BamHI/SalI* می باشند، تحت هضم آنزیمی قرار گرفتند و قطعه Stuffer از آنها خارج شد. پس از Ligation مابین قطعه t1-*a*-t2 و وکتورهای مذکور انجام شده و حضور قطعه t1-*a*-t2 در هر یک از آنها توسط واکنش های هضم آنزیمی تایید گردید. بدین ترتیب وکتورهای pFX1.4hyg-2tPA و pFX1.4sat-2tPA حاصل شدند. در کلیه مراحل فوق جهت خالص سازی پلاسمیدها از کیت استخراج پلاسمید (Core Bio, Korea) استفاده شد.

L. tarentolae: پرماستیگوت های (Merck, Brain Heart Infusion (BHI) در محیط کشت (*tarentolae*) (Sigma, Germany) حاوی ۵۰IU/ml Hemin ۱۵µg/ml ۵۰µg/ml پنی سیلین (Sigma, USA) در دمای ۲۶ °C و ۵۰µg/ml استرپتومایسین (Sigma, USA) در دمای ۳۷ °C کشت شدند. به منظور وارد سازی سازه های بیانی در ناحیه ssu از ژنوم سلول میزان، ابتدا وکتور pFX1.4hyg-2tPA توسط آنزیم *Swal* تحت هضم آنزیمی قرار گرفت و سازه ۲tPA-hyg از ژل آگارز استخراج شد. مقدار ۱۰µg از این DNA خالص شده جهت ترانسفکشن سلول های لیشمانیا توسط الکتروپوریشن (Electroporation) استفاده شد.^{۲۲} کلون های ترانسفکت شده در محیط BHI agar حاوی ۱۵٪ سرم و ۴۰µg/ml آنتی بیوتیک هیگرومایسین (Hygromycin) (Gribal شدند. این سلول ها در محیط BHI broth حاوی ۳۰µg/ml هیگرومایسین کشت و برای مرحله دوم ترانسفکشن آماده شدند. مرحله دوم نیز به روش مشابه قبل بر روی سلول های ترانسفکت شده مقاوم به هیگرومایسین، توسط سازه sat-2tPA که حاصل هضم آنزیمی وکتور pFX1.4sat-2tPA با آنزیم *Swal* بود، انجام شد. کلون های ترانسفکت شده به دست آمده در این مرحله بر روی محیط agar BHI حاوی ۴۰µg/ml هیگرومایسین و ۸۰µg/ml آنتی بیوتیک نورزو تریسین (Nourseothricin) غربال شدند. کلون های به دست آمده در محیط BHI broth حاوی ۳۰µg/ml هیگرومایسین و ۶۰µg/ml نورزو تریسین

دارند که با جایگزین کردن ژن t-PA با ژن مربوط به سایر پروتئین های نوترکیب بتوان از آنها جهت بیان گروه وسیعی از پروتئین ها در این میزبان استفاده کرد.

روش بررسی

طراحی پرایم راه و تکثیر ژن t-PA DNA ژنومیک مورد استفاده CHO (CRL-9606. A.T.C.C) از سلول های (BILLATEC, Germany) DNA خالص سازی توسط کیت استخراج گردید. در مرحله بعد دو کپی از ژن t-PA توسط دو جفت پرایم FH-tPA/RM-t2 و FM-t2/RM-tPA تکثیر گردید (جدول ۱). این پرایم راه به گونه ای طراحی شدند که سایت های آنزیمی *SpeI*, *BamHI* در ابتدای پرایم جلوزن و سایت آنزیمی *HindIII* در ابتدای پرایم عقب زن مربوط به کپی اول قرار گیرد. سایت برش آنزیم های *XbaI* و *SalI* نیز به ترتیب در ابتدای پرایم راه جلوزن و عقب ژن مربوط به کپی دوم قرار داده شد. همچنین توالی شش تایی هیستیدین (Histidin tag) نیز به منظور تسهیل در امر خالص سازی در مراحل انتهایی در ابتدای هر دو پرایم عقب زن پس از توالی های آنزیمی تعییه شد. در جدول ۱ توالی برش آنزیم ها توسط خط و توالی ۱۸ بازی هیستیدین با حروف سیاه مشخص شده است. به منظور اطمینان از صحت توالی حاصله، در فرایند PCR از آنزیم PWO DNA Polymerase (Roche, Germany) استفاده شد.

ساخت سازه واسط: هر یک از محصولات PCR به طور جداگانه در وکتور pJET1.2/blunt متعلق به کیت (Fermentas, clonJET PCR) کلون گردیدند. پلاسمید های به دست آمده از جهت حضور ژن t-PA، توسط واکنش های PCR و هضم آنزیمی و به لحاظ صحت توالی ژن t-PA با انجام Sequencing تایید شدند. در مرحله بعد کپی اول ژن t-PA از پلاسمید حاوی آن توسط هضم آنزیمی با آنزیم های *SpeI/HindIII* (Promega, USA) در ناحیه بالادرست قطعه ژنی *α-tubulin* که از قبل در این وکتور کلون شده بود، وارد گردید. به روش مشابه کپی دوم از ژن t-PA توسط برش با آنزیم های *XbaI/SalI* از پلاسمید حاوی آن خارج و در وکتور (pGEM-9Zf(-)، پایین درست قطعه *α-tubulin* کلون شد. بدین ترتیب وکتور واسط pGEM-t1-*a*-t2 ساخته شد. تایید پلاسمید ساخته شده توسط آزمون های PCR و هضم آنزیمی انجام شد.

به دست آمد. توالی نوکلتوتیدی ژن‌های t-PA توسط واکنش Sequencing تایید شد. در مرحله بعد دو وکتور بیانی نهایی که حاوی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های هیگرومایسین و نورزوتتریسین و دو کپی از ژن t-PA-بودند، از طریق کلونینگ قطعه t1-a-t2 به ترتیب در هریک از وکتورهای *hyg* و *pFX1.4sat* و *pFX1.4sat-2tPA* حاصل بدین ترتیب وکتورهای *pFX1.4hyg-2tPA* و *pFX1.4sat-2tPA* حاصل شدند. به دلیل آن‌که سازه‌های نهایی به واسطه واکنش Homologous recombination در نواحی' ۵ssu و ۳ssu در ژنوم میزبان ادغام می‌گردند، نواحی باکتریایی وکتورها که غیر ضروری و احتمالاً مانع انجام صحیح ادغام ژنی بودند، پیش از ترانسفکشن، سازه‌های *SwalI* جداسازی شدند. شکل ۱ نمای شماتیک سازه‌های به دست آمده جهت واردسازی به ژنوم سلول‌های *L. tarantolae* را نشان می‌دهد.

ترانسفکشن سلول‌های لیشمانیا: پس از تایید سکانس ژنی و جداسازی سازه *hyg-2tPA*. این سازه از طریق الکتروپوریشن به درون سلول‌های *L. tarantolae* ترانسفورم شد. سلول‌های ترانسفکت شده مقاوم به *hyg* در محیط agar BHI حاوی $40\mu\text{g}/\text{ml}$ آنتی‌بیوتیک *sat*-*hyg*-*2tPA* ترانسفورم شده و در این مورد نیز محیط agar BHI حاوی *2tPA* ۴۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ هیگرومایسین و ۸۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ نورزوتتریسین جهت غربال‌گری کلون‌های مقاوم به *hyg* و *sat* استفاده شد. ادغام سازه‌های حاوی ژن t-PA در سلول میزبان با انجام PCR بر روی ژنوم سلول‌های t-PA ترانسفکت شده برسی و تایید گردید. در این مورد جهت برسی حضور ژن‌های کدکننده هیگرومایسین و نورزوتتریسین از پرایمرهای اختصاصی آن‌ها و بهمنظور تایید حضور ژن t-PA از پرایمرهای موجود (جدول ۱) استفاده شد. ظهور قطعات *hyg* ۱۰۵۰bp و *sat*-*hyg-2tPA* ۵۰۰bp برای ژن *sat* و ۱۷۰۰bp برای ژن t-PA نشان‌دهنده ورود سازه‌های ژنی در کلون‌هایی بود که با هر دو سازه *hyg-2tPA* و *2tPA* ترانسفکت شده بودند (شکل ۲). جهت تایید نهایی و بهمنظور حصول اطمینان از ورود سازه‌های ژنی به ناحیه ssu، واکنش PCR دیگری با استفاده از پرایمرهای جلوزن *hyg* و *sat* و پرایمر عقب ژن ssu انجام شد. با توجه به آن‌که پرایمر عقب ژن ssu به ناحیه‌ای از ژن ssu در ژنوم انگل متصل می‌شود، ظهور به ترتیب قطعات ۲۸۰۰bp و ۲۳۰۰bp در ژل آگارز (شکل ۲، ستون های چهار و هشت) نشان-

کشت شدند. وارد شدن هر یک از سازه‌های بیانی در ژنوم سلول‌های ترانسفکت شده توسط چندین واکنش PCR بر روی ژن‌های t-PA و *hyg sat* و نیز PCR تایید واردسازی در ناحیه ssu تایید گردید.

آزمون وسترن بلات (Western blotting): محتوای پروتئینی ۳ml محیط کشت شش روزه سلول‌های ترانسفکت شده ($10^8\text{cell}/\text{ml}$) توسط ۳ml از محلول آبی (TCA) (TCA) 50% پس از یک ساعت انکوباسیون در یخ و پنج دقیقه سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰rpm رسوب داده شد. پس از خارج کردن مایع رویی و شستشو با ۱ml استون و سپس ۱ml الکل ۹۶ درجه، رسوب حاصل در $100\mu\text{l}$ آب دیونیزه حل شد. مقدار $1\mu\text{l}$ از محلول به دست آمده ($50\mu\text{g}$ پروتئین) در ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ الکتروفورز گردید. ادامه مراحل وسترن بلات مطابق روش استاندارد انجام گردید^{۳۳} و از آنتی‌بادی پلی کلونال خرگوشی ضد t-PA (Abcam, USA) به عنوان آنتی‌بادی اولیه و از آنتی‌بادی گاوی ضد ایمونوگلوبولین G خرگوشی (Dako, UK) به عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شد. از دی آمینوبنزیدین (DAB) در حضور پراکسید هیدروژن برای ظهور باندهای حاصله استفاده گردید.

آزمون فعالیت آمیدولیتیک: میزان بیان t-PA-۱ ای نوترکیب در سلول‌های سازه بیانی، به طور کمی توسط کیت Biopool Chromolize t-PA (Biopool, Ireland) ارزیابی شد. از نمونه‌های سوب رقیق شده از کشت سلولی پنج و شش روز پس از تلقيق اولیه در حجم ۵۰ml و چرخش ۱۳۰rpm جهت بررسی میزان t-PA فعال ترشح شده در محیط کشت استفاده شد. t-PA فعال موجود در سوب سلولی توسط آنتی‌بادی مونوکلونال sp-322 در pH=۵/۹ مهار شده و پس از سه مرحله شستشو و اضافه کردن پلاسمینوژن و سوبسترات رنگی طبق روش ذکر شده توسط شرکت سازنده (Biopool, Ireland) میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵nm ۴ اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آمیدولیتیک t-PA ترشح شده بر اساس منحنی استاندارد به دست آمده از نمونه‌های استاندارد موجود در کیت محاسبه شد.

یافته‌ها

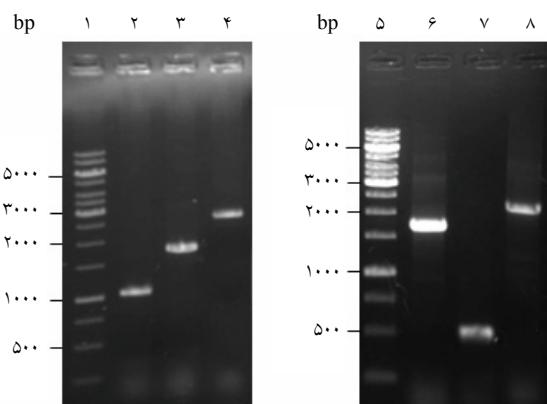
ساخت سازه‌های واسط و نهایی: وکتور واسط pGEMt1-a-t2 با کلون کردن کپی‌های اول و دوم از ژن t-PA در بالادست و پایین دست قطعه ژنی غیر ترجمه شونده *α-tubulin* (Non-translated region)

استفاده شدند. پس از اتصال t-PA موجود در محیط کشت به آنتی بادی متصل شده به انتهای چاهکها و افزودن پل‌اسمینوژن و سوبسترا، پل‌اسمین حاصل از تجزیه پل‌اسمینوژن بر سوبسترا اثر کرده و ماده کروموزنیکی تولید می‌شود که در ۴۰۵nm جذب نوری دارد. پس از رسم منحنی استاندارد میزان فعالیت آمیدولیتیک پروتئین موجود در محیط کشت سلول‌های ترانسفورم شده بررسی گردید. همان‌طور که در جدول ۲ آمده است با ضرب عدد مربوط به میزان فعالیت در ضریب رقت، فعالیت آمیدولیتیک برای کلون ترانسفکت شده با سازه hyg-2tPA و کلون ترانسفکت شده با هر دو سازه hyg-2tPA و sat-2tPA به دست کم برابر با ۳۷۵IU/ml و ۴۸۰IU/ml بودست آمد. لازم به ذکر است که در نمونه مربوط به سلول‌های ترانسفکت نشده در این آزمون هیچ میزانی فعالیت آمیدولیتیک مشاهده نشد.

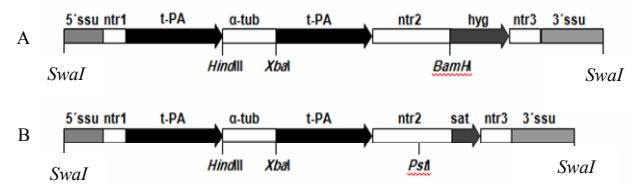
دهنده ادغام صحیح سازه‌های طراحی شده در ناحیه مورد نظر بود. آنالیز وسترن بلاط: با انجام آزمون وسترن بلاط باند مربوط به واکنش t-PA تجاری (Actylase) با آنتی‌بادی خرگوشی ضد t-PA به وزن مولکولی تقریباً ۶۶kD در غشاء نیتروسلولوزی مشاهده شد (شکل ۳، ستون دو). به طور مشابه باندی با وزن مولکولی حدود ۴۴kD با استفاده از نمونه‌های مربوط به سوب محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده به دست آمد (شکل ۳، ستون‌های چهار و پنج). این در حالی بود که در نمونه مربوط به سوب محیط کشت سلول‌های ترانسفکت نشده هیچ باندی مشاهده نشد (شکل ۳، ستون سه). تعیین میزان فعالیت آمیدولیتیک: از آنجا که مولکول t-PA فعال، پلاسمینوژن را به پلاسمین تبدیل می‌کند، محیط کشت کلون‌های ترانسفکت شده با یک و با هر دو سازه، برای بررسی فعالیت آمیدولیتیک بروتین: ترشح شده در محیط کشت توسط کیت

جدول-۱: توالی پر اینمایی طراحی شده به منظور تکثیر زن t-PA از زنوم سلول CHO

پرایمر	توالی	دماهی ذوب (°C)	طول توالی تکثیر شونده (bp)
FH-tPA	5'CAACTAGTGGAT <u>CC</u> ATGGATGCAATGAAGAGAGG3'	82/6	1730
	5'TGT <u>AAGCT</u> TCACACCACCACCCACCACCGGTGCGATGTTGTCAC3'	93/4	
RH-tPA	5'CCAT <u>CTAGA</u> ATGGATGCAATGAAGAGAGG3'	73/4	1725
	5'TGT <u>GTCGACT</u> CACACCACCACCCACCACCGGTGCGATGTTGTCAC3'	94/9	
FM-t2			
RM-t2			

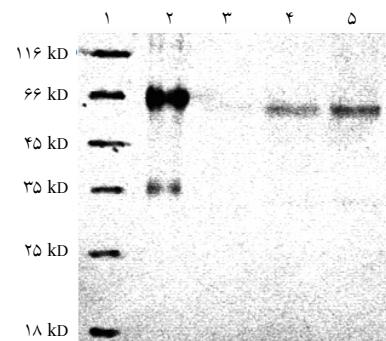


شکل-۲: الکتروفوروز ژل آگارز محصولات PCR بر روی ژنوم سلول L. *tarentolae* دوبار ترانسفکت شده. سنتون های یک و پنج، مارکر kb ۱؛ سنتون دو، ژن hyg (۱۰۵,000 bp)؛ سنتون های سه و شش، ژن t-PA (۱۷۰,000 bp)؛ سنتون چهار، باند ۲/۸kb مربوط به ادغام سازه 2tPA-hyg در ناحیه sat (۵۰,000 bp)؛ سنتون هشت، باند ۲/۴kb مربوط به ادغام سازه sat-2tPA در ناحیه ssu.



شکل-۱: نمای شماتیک سازه‌های خطی شده (۹۴۸bp) hyg-2tPA و (۹۰۳bp) sat-2tPA پس از هضم آنزیمی توسعه آنزیم Swal بر روی وکتورهای اختصارات: ssu ک' ناحیه ۵ از زیر واحد pFX1.4sat-2tPA و pFX1.4hyg-2tPA کوچک ژن RNA ریبوزومی k-IR cam (ntr2, 0.4 k-IR cam BA) Ntr1 L. *tarentolae* و (ntr3, 1.7 k-IR) (CB) و (ntr3, 1.7 k-IR) نواحی غیر ترجمه شونده بین ژنی جهت فراهم کردن سینگالهای اسپلایسینین به منظور انجام صحیح تغییرات پس از رونویسی در L. *tarentolae* a-tubulin ناحیه غیر ترجمه شونده بین ژنی از cDNA ۴-PA L. *donovani* مربوط به ژن ۴-PA hyg ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک هیگروماکسین؛ sat ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک نوروزتریسین؛ ssu ۳' از ز' واحد کوچک ژن RNA دیبزومی L. *tarentolae*

Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) را در لوكوس ۱۸s rRNA، اينستگره نموده‌اند. آن‌ها بعد از آناليز کلون‌های حاصل، يك رابطه مستقيم بين تعداد کپی‌های اينستگره شده و فلورسانس پروتئين EGFP گزارش کرده‌اند. کلون دارای بيشترین بيان، پروتئين EGFP نوترکيب را به مقدار 30 mg/lit توليد کرده است.^{۲۱} از آنجا که فرایند رونویسي در خانواده تریپانوزومیده به صورت پلی سیسترونیک انجام می‌شود، روند نهايی‌شدن رونویسي از mRNA می‌شود، mRNA می‌باشد جهت تهيي poly-adenylation و trans-splicing مونوسیسترونیک ضروري می‌باشد و در اين مسیر نقش حضور نواحي غير ترجمه شونده بين ژني (Intergenic NTRs) به اثبات رسیده است.^{۲۴،۲۵} به همين دليل در وكتورهای بيانی pFX1.4sat و pFX1.4hyg اين نواحي در طرفين ژن‌های بيان شونده (مانند ژن hyg و sat) و نيز طرفين قطعه Stuffer تعبيه شده است (۱-۳ntr). به دليل مشابه، در اين مطالعه، در طراحی دو سازه نهايی قطعه بين ژنی α -tubulin از انگل L. donovani مابين دو کپي از ژن t-PA قرار داده شد. سازه‌های طراحی شده فوق که هر يك حاوي دو کپي از ژن t-PA بودند به ترتيب به سلول‌های L. tarantolae ترانسفورم شدند و بدین ترتيب سلول‌های يکبار ترانسفكت شده و دو بار ترانسفكت شده به دست آمدند. هريک از اين سازه‌ها حاوي دو برابر تعدادي از کپي ژن t-PA بود که در مطالعه قبلی در اين انگل به کار رفته بود.^{۲۶} به دليل اهميت درمانی t-PA به عنوان يك داروي فييرينوليتیک، برای کاربردهای کلینیکی نياز به روشي موثر جهت توليد اين داروي ارزشمند با بازده t-PA بالا و صرف حداقل هزينه می‌باشد. در يك مقایسه کلي، t-PA نوترکيب توليد شده در سلول E. coli به صورت تک زنجیره و غير گلیکوزيله بوده و به شكل ذرات نامحلول (Inclusion bodies) در سلول باقی می‌ماند. اگرچه پس از انجام مراحل محلول‌سازی و Refolding، پروتئين توليد شده دارای فعالیت کمي می‌باشد و همچنین گلیکوزيلاسون نيز تاثير مستقيمي در فعالیت t-PA ندارد، اما E. coli ميزبان مناسبی برای توليد t-PA کامل (Full length) به نظر نمی‌رسد مگر آن‌كه روشهای کارامدی جهت Refolding پروتئين در اين سلول به دست آيد.^{۷۷،۷۸} Reteplase که شكل کوتاه‌شده t-PA با تعداد كمتری باندهای دی سولفید می‌باشد در اين ميزبان با موفقیت تولید شده است، اما درمان با اين دارو به دليل عدم عملکرد اختصاصی بر پلاسمینogen موجود در محل لخته فييرينی و تاثير مستقيمي بر



شکل-۳: آزمون وسترن بلاط بر روی محیط کشت سلول‌های ترانسفكت شده و نشده (wild). ستون اول، مارکر پروتئین: ستون دوم، $3\mu\text{g}$ از t-PA (Acetylase): ستون سوم، $50\mu\text{g}$ از محتوای پروتئینی سوب سلولی کلون ترانسفكت نشده؛ ستون چهارم، $50\mu\text{g}$ از محتوای پروتئینی سوب سلولی کلون يکبار ترانسفكت شده؛ ستون پنجم، $50\mu\text{g}$ از محتوای پروتئینی سوب سلولی کلون دوبار ترانسفكت شده.

جدول-۲: فعالیت آميدولیتیک نمونه‌های استاندارد و نمونه‌های محیط کشت مربوط به سلول‌های L. tarantolae ترانسفكت شده

نمونه (مرتبه رقيق‌سازی)	جذب در ۴۰۵nm (IU/ml)	فعالیت t-PA
استاندارد (۰)	۰/۰۲	۰
استاندارد (۱:۴)	۰/۲۳	۰/۵
استاندارد (۲:۴)	۰/۴۴	۱
استاندارد (۳:۴)	۰/۶۲	۱/۵
استاندارد (۴:۴)	۰/۸۴	۲
سوب سلول يک بار ترانسفكت شده (۱:۵۰۰)	۰/۳۵	۰/۷
سوب سلول دو بار ترانسفكت شده (۱:۶۰۰)	۰/۳۸	۰/۸

t-PA: Tissue Plasminogen Activator

بحث

در اين مطالعه تلاش بر آن بود تا با طراحی دو سازه جديده بيان قابل توجهی از t-PA نوترکيب در انگل L. tarantolae به عنوان يك سیستم بيانی جديده و قابل در بيان پروتئین‌های هترولوگ، به دست آيد. تاکنون مطالعات زيادي تاثير مستقيمي تعداد کپي ژن و بيان پروتئین‌های نوترکيب را در برخري ديجر از ميزبان‌های يوکاريوتیک نشان داده‌اند. بدین دليل و به منظور به دست آوردن ميزبان بالايی از بيان پروتئین نوترکيب t-PA، دو سازه ژنی که هر کدام حاوي دو کپي از ژن t-PA بودند طراحی و ساخته شدند. ديجر محققین با استفاده از وكتورهای بيانی اختصاصی اين ميزبان، يك يا دو کپي اضافي از ژن

همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در ستون مربوط به t-PA تجاری (Actylase) دو باند مختلف در وزن‌های مولکولی ۶۶ و ۳۵ کیلو دالتون حضور دارد که به ترتیب مربوط به اشکال تکزنجیره و دوزنچیره (Two chain t-PA) می‌باشد. در ستون‌های چهار و پنج این شکل که به ترتیب مربوط به کلونی‌های یکبار ترانسفکت شده و دوبار ترانسفکت شده می‌باشد، عمدتاً ساختار تکزنجیره مشاهده می‌شود. با انجام تست کرومولیز میزان فعالیت پروتئین ترشح شده در محیط کشت سلول‌های ترانسفورم شده به دست آمد. بدین ترتیب مشخص گردید که میزان بیان t-PA در سلول‌های ترانسفکت شده با یک سازه حداقل ۳۵۰IU/ml و در سلول‌های ترانسفکت شده با هر دو سازه ۴۸۰IU/ml می‌باشد. این میزان از فعالیت، هفت برابر مقداری است که در مطالعه قبلی اعلام شده و همچنین قابل رقابت با مقادیری است که در مورد سلول E. coli (۳–۷IU/ml)^۹ و سلول CHO تغییر نیافته است که با به کارگیری سایر روش‌های بهینه‌سازی‌ها و نیز انجام آزمایشات تکمیلی، تولید بالاتری از t-PA نوترکیب در این میزان یوکاریوتیک به دست آید.

پلاسمینوژن موجود در گردش خون، می‌تواند همراه با عوارض جانبی همچون خونریزی‌های داخلی باشد.^۷ تاکنون نشان داده شده است که رده‌های سلولی پستانداران که با تعداد کمی‌های متفاوت از ژن t-PA انسانی ترانسفورم شده‌اند، میزان‌های مناسب‌تری نسبت به سایرین از جمله سلول حشرات، قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌باشند. اگرچه بیان t-PA نوترکیب در این دسته از سیستم‌های بیانی خالی از اشکال نیست، کلونینگ و بیان این پروتئین در رده‌های سلولی میلومای رت، فیبروبلاست C127 و CHO با موفقیت انجام شده است.^۵ در حال حاضر rPA در صنعت به وسیله سلول‌های CHO نوترکیب تولید می‌شود اما کوشش‌ها برای کاهش قیمت و کاهش خطر آلودگی با ویروس‌ها، پرایون‌ها و مایکوپلاسمای ادامه دارد، هرچند علاقه به ساده کردن پردازش پایین دست در تولید t-PA از طریق حذف سرم، کشت سلول‌های CHO در محیط ساده‌تر و از همه مهم‌تر تولید t-PA با وضعیت گلیکوزیلاسیون بهینه نیز وجود دارد. در این مطالعه پس از واردسازی سازه‌های ساخته شده در ژنوم انگل L. tarentolae و t-PA کشت سلول‌های ترانسفکت شده، آزمون وسترن بلاک حضور نوترکیب را در محیط کشت این سلول به اثبات رساند. در این تست

References

- Goldhaber SZ. Pulmonary thromboembolism. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, et al, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. New York: McGraw-Hill; 2005; p. 1561-5.
- Clagett GP, Sobel M, Jackson MR, Lip GY, Tangelander M, Verhaeghe R. Antithrombotic therapy in peripheral arterial occlusive disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126(3 Suppl):609S-26S.
- Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349(9061):1269-76.
- Ghazali M, Hayward GL. Simplex optimization of acoustic assay for plasminogen activators. *Anal Bioanal Chem* 2009;393(2):635-42.
- Rouf SA, Moo-Young M, Chisti Y. Tissue-type plasminogen activator: characteristics, applications and production technology. *Biotechnol Adv* 1996;14(3):239-66.
- Borisov OV, Field M, Ling VT, Harris RJ. Characterization of oligosaccharides in recombinant tissue plasminogen activator produced in Chinese hamster ovary cells: two decades of analytical technology development. *Anal Chem* 2009;81(23):9744-54.
- Baruah DB, Dash RN, Chaudhari MR, Kadam SS. Plasminogen activators: a comparison. *Vascul Pharmacol* 2006;44(1):1-9.
- Hockney RC. Recent developments in heterologous protein production in Escherichia coli. *Trends Biotechnol* 1994;12(11):456-63.
- Georgiou G, Valax P. Expression of correctly folded proteins in Escherichia coli. *Curr Opin Biotechnol* 1996;7(2):190-7.
- Furlong AM, Thomsen DR, Marotti KR, Post LE, Sharma SK. Active human tissue plasminogen activator secreted from insect cells using a baculovirus vector. *Biotechnol Appl Biochem* 1988;10(5):454-64.
- Ogrydziak DM. Yeast extracellular proteases. *Crit Rev Biotechnol* 1993;13(1):1-55.
- Bum-Soo H, Joon-Soo S, Hyoeng-Mi K, Mi-Young A, Hyo-Kyung P, Nan-A K, et al. Expression and characterization of human tissue-plasminogen Activator in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Mol Biol Rep* 2009; 27: 209-216.
- Griffiths JB, Electricwala A. Production of tissue plasminogen activators from animal cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 1987;34:147-66.
- Cartwright T. Production of t-PA from animal cell culture. In: Spier RE, Griffiths JB, editors. Animal Cell Biotechnology. New York, NY: Academic Press; 1992. p. 217-45.
- Kushnir S, Gase K, Breitling R, Alexandrov K. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host Leishmania tarentolae. *Protein Expr Purif* 2005;42(1):37-46.
- Basile G, Petieca M. Recombinant protein expression in Leishmania tarentolae. *Mol Biotechnol* 2009;43(3):273-8.
- Phan HP, Sugino M, Niimi T. The production of recombinant human laminin-332 in a Leishmania tarentolae expression system. *Protein Expr Purif* 2009;68(1):79-84.
- Fritzsche C, Sitz M, Weiland N, Breitling R, Pohl HD. Characterization of the growth behavior of Leishmania tarentolae: a new expression system for recombinant proteins. *J Basic Microbiol* 2007;47(5):384-93.

19. Mansur M, Cabello C, Hernández L, País J, Varas L, Valdés J, et al. Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 2005;27(5):339-45.
20. Jiang Z, Huang Y, Sharfstein ST. Regulation of recombinant monoclonal antibody production in chinese hamster ovary cells: a comparative study of gene copy number, mRNA level, and protein expression. *Biotechnol Prog* 2006;22(1):313-8.
21. Breitling R, Klingner S, Callewaert N, Pietrucha R, Geyer A, Ehrlich G, et al. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expr Purif* 2002;25(2):209-18.
22. Beverley SM, Clayton CE. Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. *Methods Mol Biol* 1993;21:333-48.
23. Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, Wingfield PT. Short protocol in protein science: a compendium of methods from current protocols in protein science. New York: John Wiley and Sons; 2003. p. 43-7.
24. Teixeira SM. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz J Med Biol Res* 1998;31(12):1503-16.
25. LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* 1993;7(6):996-1007.
26. Soleimani M, Mahboudi F, Davoudi N, Amanzadeh A, Azizi M, Adeli A, et al. Expression of human tissue plasminogen activator in the trypanosomatid protozoan *Leishmania tarentolae*. *Biotechnol Appl Biochem* 2007;48(Pt 1):55-61.
27. Klausner A. Researchers probe second-generation t-PA. *Biotechnology* 1986;4:706-11.
28. Datar RV, Cartwright T, Rosen CG. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Biotechnology (N Y)* 1993;11(3):349-57.
29. Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, et al. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 1983;301(5897):214-21.

Optimizing production of recombinant tissue plasminogen activator in non-pathogenic *Leishmania* by two genetic constructs

Mahdi Hemayatkar PharmD.
Noushin Davoudi PhD.
Fatemeh Davami PhD.
Keivan Majidzadeh-A PhD.
Farzaneh Barkhordari BSc.*
Fereidoun Mahboudi PhD.

Department of Biotechnology,
Pasteur Institute of Iran, Tehran,
Iran.

Abstract

Received: November 21, 2010 Accepted: December 14, 2010

Background: Recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) is one of the most important thrombolytic agents used in patients with vascular occlusions such as acute ischemic stroke or myocardial infarction. A variety of recombinant protein expression systems have been developed for heterologous gene expression in prokaryotic and eukaryotic hosts. In recent years, *Leishmania tarentolae* (*L. tarentolae*), a non-pathogenic trypanosomatid protozoa, has come under consideration because of its safety and immunogenicity as a vaccine vector and special attributes in the expression of complex proteins. This study was done to improve rt-PA expression in this protozoan and create the opportunity for the replacement of rt-PA gene with other genes for the production of other complex proteins.

Methods: Two expression cassettes were used for the integration of two copies of t-PA cDNA, one copy in each cassette, into the parasite genome by electroporation. The transformed clones were selected by antibiotic resistance. The expression of active secreted rt-PA was confirmed by Western blot analysis and Chromolize assay.

Results: Appearance of a 64 kD band in nitrocellulose membrane in the Western blot analysis confirmed the presence of full-length rt-PA in the culture media. Chromolize assay showed the expression levels of active recombinant t-PA in single and double transfected *L. tarentolae* clones- 375 IU/ml and 480 IU/ml of the culture media, respectively.

Conclusion: The produced rt-PA in the culture media containing the transfected cells was at least seven times higher than what has been reported in previous studies on *L. tarentolae* or on some other eukaryotic systems.

Keywords: Expression, *leishmania tarentolae*, tissue plasminogen activator, t-PA.

* Corresponding author: Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, No. 69, Pasteur Ave., Tehran, Iran, Post Box: 1316943551
Tel: +98-21-66480780
email: mahboudi.f@gmail.com