

بهینه‌سازی تولید فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی نو ترکیب در انگل لیشمانیای غیر بیماری‌زا با طراحی دو سازه ژنی

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

چکیده

زمینه و هدف: پروتیین فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی نو ترکیب (ft-PA) یکی از مهم‌ترین ترکیبات ضد لخته می‌باشد که در درمان سکتته‌های قلبی و مغزی از اهمیت بالایی برخوردار است. تاکنون روش‌های مختلفی برای تولید پروتیین‌های نو ترکیب هترولوگ با استفاده از میزبان‌های پروکاریوتیک و یوکاریوتیک مورد بررسی قرار گرفته است. اخیراً انگل لیشمانیا تارنتولا (*Leishmania tarentolae* (L. tarentolae)) به دلایل متعددی از جمله عدم بیماری‌زایی و شرایط ویژه آن در تولید پروتیین‌های پیچیده اهمیت زیادی یافته است. **روش بررسی:** در تحقیق حاضر به منظور بهینه‌سازی میزان بیان t-PA نو ترکیب انسانی با استفاده از سلول *L. tarentolae* 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. tarentolae* 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 ۶۴kD در غشاء نیتروسولوز حضور t-PA در محیط کشت سلول‌های *L. tarentolae* ترانسفکت شده را تایید کرد. نتایج آزمون علاوه بر تایید حضور پروتیین t-PA فعال در سوپ سلولی نشان داد که میزان فعالیت پروتیین ترشح شده در سلول‌های ترانسفکت شده با یک سازه، ۳۷۵ IU/ml و در سلول‌های ترانسفکت شده با هر دو سازه برابر با ۴۸۰ IU/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 میزبان و نیز بیشتر از عدد گزارش شده در بسیاری از میزبان‌های یوکاریوتیک دیگر می‌باشد.

کلمات کلیدی: پروتیین نو ترکیب، فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی، لیشمانیا تارنتولا.

مهدی حمایتکار، نوشین داوودی
فاطمه دوامی، کیوان مجید زاده اردبیلی
فرزانه برخوردار، فریدون مهبودی*
گروه بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران،
تهران، ایران

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور
ایران، شماره ۶۹، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، کدپستی:
۱۳۱۶۹۴۳۵۱
تلفن: ۰۲۱-۶۶۴۸۰۷۸۰
email: mahboudi.f@gmail.com

مقدمه

سکتته مغزی، آمبولی ریه و یا نارسایی کلیه گردد. یک دیدگاه مهم درمانی ترومبوز، تزریق وریدی فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن به‌عنوان داروهای حل‌کننده لخته‌های فیبرینی می‌باشد. فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن آنزیم‌های پروتئولیتیکی 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 فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن، استرپتوکیناز قدیمی‌ترین و ارزان‌ترین عامل ترومبولیتیک است که توسط گونه‌های مختلفی از استرپتوکوک‌ها تولید و هنوز در تعدادی از کشورهای جهان از جمله کشور ما به‌عنوان یک داروی موثر کاربرد کلینیکی دارد. اما استفاده از این پروتیین به دلیل منشا 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 اصلی‌ترین 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 بالاخره وریدهای عمقی اندام‌ها به‌ویژه اندام تحتانی را درگیر می‌نماید.^{۱-۳} این اختلال اگر با انسداد عروق حیاتی بدن مانند عروق کرونر قلب، عروق مغزی، ریوی و یا کلیوی همراه باشد می‌تواند باعث بروز صدمات جبران‌ناپذیری مانند انفارکتوس قلبی،

Retepase 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 آلودگی 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 تریپانوزومیده (Trypanosomatidae) در مطالعات بیوتکنولوژی به دلیل خصوصیات ژنتیکی 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 میزبانی بالقوه جهت بیان گلیکوپروتئین‌های هترولوگ تبدیل کرده و پیش‌بینی می‌شود که به‌عنوان جایگزینی برای سلول‌های پستانداران مطرح شود.^{۱۵-۱۸} مطالعات نشان داده است که در اکثر میزبان‌های یوکاریوتیک، رونویسی مرحله‌ای تعیین‌کننده در بیان پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد. در میان روش‌های مختلف افزایش رونویسی از ژن‌ها مانند استفاده از پروموتورهای 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 به‌منظور بهینه‌سازی بیان گلیکوپروتئین t-PA در *L. tarentolae* دو سازه بیانی که هر کدام حاوی دو کپی از ژن t-PA بود طراحی و به‌منظور ورود در ناحیه 18s ribosomal RNA (ssu) از ژنوم میزبان به درون این انگل ادغام شد. ناحیه‌ای از ژنوم این میزبان 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 میزبان تک یاخته بوده است، اما سازه‌های طراحی شده این قابلیت را

همراه است. اوروکیناز (Urokinase) که دیگر ترکیب فعال‌کننده پلاسمینوژن می‌باشد اگرچه به‌دلیل منشا انسانی، ایمنی‌زا و تب‌زا نمی‌باشد، اما تهیه آن از ادرار، گران بوده و این منبع برای استفاده وسیع درمانی محدود می‌باشد. اما فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی Tissue Plasminogen Activator (t-PA) علاوه بر این که ایمونوژن و پیروژن نمی‌باشد، بر خلاف دو عامل فوق، خاصیت فیبرینولیتیک خود را به‌طور اختصاصی اعمال کرده، با قدرت بیشتری به لخته‌های فیبرینی متصل می‌شود و ترجیحاً پلاسمینوژن به دام افتاده در داخل لخته‌ها را فعال می‌کند. به‌همین علت خطر خونریزی‌های داخلی در استفاده از آن به‌میزان زیادی کاهش می‌یابد. بنابراین t-PA نوترکیب بی‌شک یکی از موثرترین عوامل فیبرینولیتیک می‌باشد.^۵ t-PA انسانی سرین پروتئاز با وزن مولکولی حدود ۶۸kd بوده و دارای ۵۲۷ اسید آمینه می‌باشد. این گلیکوپروتئین مالتی دامین شامل پنج دامین اصلی به‌نام‌های Serine protease, Kringle2, Kringle1, Epidermal growth factor, Finger می‌باشد. همچنین دارای ۳۵ آمینواسید سیستمین و ۱۷ باند دی سولفیدی بوده و سه زنجیره اولیگوساکاریدی از نوع N-linked و یک زنجیره از نوع O-linked به بدنه پروتئینی آن متصل می‌باشد. t-PA نوترکیب به‌عنوان یک داروی فیبرینولیتیک در درمان بیماری‌هایی نظیر 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 مخمرها، حشرات، سلول‌های پستانداران، گیاهان و حیوانات ترانسژن به‌عنوان سیستم‌های بیانی در تولید t-PA نوترکیب استفاده شده است.^۵ به‌دلیل ویژگی‌هایی نظیر 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 ساکارومیسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) و سلول حشرات نیز به‌دلیل ترشح پایین پروتئین به‌محیط کشت، گلیکوزیلاسیون بیش از حد و فولدینگ نادرست برای این منظور مناسب نمی‌باشند.^{۱۱،۱۲} 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 Chinese Hamster Ovary (CHO) تولید می‌شود. t-PA نوترکیب تجارتي با نام‌های Activase (Genentech)، Reteplase (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- α -t2 توسط آنزیم‌های *BamHI/SalI* بریده و قطعه t1- α -t2 پس از خالص‌سازی 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 آنزیم‌های *BglIII/XhoI* که سازگار (Biocompatible) با آنزیم‌های *BamHI/SalI* می‌باشند، تحت هضم آنزیمی قرار گرفتند و قطعه Stuffer از آن‌ها خارج شد. پس از خالص‌سازی بدنه این وکتورها از روی ژل آگارز، واکنش Ligation مابین قطعه t1- α -t2 و وکتورهای مذکور انجام شده و حضور قطعه t1- α -t2 در هر یک از آن‌ها توسط واکنش‌های هضم آنزیمی تایید گردید. بدین ترتیب وکتورهای pFX1.4hyg-2tPA و pFX1.4sat-2tPA حاصل شدند. در کلیه مراحل فوق جهت خالص‌سازی پلاسمیدها از کیت استخراج پلاسمید (Core Bio, Korea) استفاده شد.

ترانسفکشن سلول‌های *L. tarentolae*: پروماستیگوت‌های *L. tarentolae* در محیط کشت (Merck, Brain Heart Infusion (BHI) Germany) حاوی $15 \mu\text{g/ml}$ Hemin، 50 IU/ml پنی‌سیلین (Sigma, USA) و $50 \mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین (Sigma, USA) در دمای 26°C کشت شدند. به منظور واردسازی سازه‌های بیانی در ناحیه ssu از ژنوم سلول میزبان، ابتدا وکتور pFX1.4hyg-2tPA توسط آنزیم *SwaI* تحت هضم آنزیمی قرار گرفت و سازه hyg-2tPA از ژل آگارز استخراج شد. مقدار $10 \mu\text{g}$ از این DNA خالص‌شده جهت ترانسفکشن سلول‌های لیثمانیا توسط الکتروپوریشن (Electroporation) استفاده شد.^{۲۲} کلون‌های ترانسفکت‌شده در محیط BHI agar حاوی 15% سرم و $40 \mu\text{g/ml}$ آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین (Hygromycin) غربال شدند. این سلول‌ها در محیط BHI broth حاوی $30 \mu\text{g/ml}$ هیگرومایسین کشت و برای مرحله دوم ترانسفکشن آماده شدند. مرحله دوم نیز به روشی مشابه قبل بر روی سلول‌های ترانسفکت شده مقاوم به هیگرومایسین، توسط سازه sat-2tPA که حاصل هضم آنزیمی وکتور pFX1.4sat-2tPA با آنزیم *SwaI* بود، انجام شد. کلون‌های ترانسفکت شده به دست آمده در این مرحله بر روی محیط BHI agar حاوی $40 \mu\text{g/ml}$ هیگرومایسین و $80 \mu\text{g/ml}$ آنتی‌بیوتیک نوزوتریسن (Nourseothricin) غربال شدند. کلون‌های به دست آمده در محیط BHI broth حاوی $30 \mu\text{g/ml}$ هیگرومایسین و $60 \mu\text{g/ml}$ نوزوتریسن

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

روش بررسی

طراحی پرایمرها و تکثیر ژن t-PA: DNA ژنومیک مورد استفاده جهت تکثیر ژن t-PA از سلول‌های CHO (CRL-9606, A.T.C.C) توسط کیت استخراج DNA (BILLATEC, Germany) خالص‌سازی گردید. در مرحله بعد دو کپی از ژن t-PA توسط دو جفت پرایمر FH-tPA/RH-tPA و FM-t2/RM-t2 تکثیر گردید (جدول ۱). این پرایمرها به گونه‌ای طراحی شدند که سایت‌های آنزیمی *SpeI*, *BamHI* در ابتدای پرایمر جلوزن و سایت آنزیمی *HindIII* در ابتدای پرایمر عقب زن مربوط به کپی اول قرار گیرد. سایت برش آنزیم‌های *XbaI* و *SalI* نیز به ترتیب در ابتدای پرایمرهای جلوزن و عقب ژن مربوط به کپی دوم قرار داده شد. همچنین توالی شش‌تایی هیستیدین (Histidin tag) نیز به منظور تسهیل در امر خالص‌سازی در مراحل انتهایی در ابتدای هر دو پرایمر عقب زن پس از توالی‌های آنزیمی تعبیه شد. در جدول ۱ توالی برش آنزیم‌ها 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 به‌طور جداگانه در وکتور pJET1.2/blunt (Fermentas, Lithuania) کلون گردیدند. پلاسمیدهای به دست آمده از جهت حضور ژن t-PA، توسط واکنش‌های 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 آنزیم‌های *SpeI/HindIII* جدا شده و به وکتور واسط pGEM-9Zf(-) (Promega, USA) در ناحیه بالادست 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 آنزیم‌های *XbaI/SalI* از پلاسمید حاوی آن خارج و در وکتور pGEM-9Zf(-)، پایین‌دست قطعه α -tubulin کلون شد. بدین ترتیب وکتور واسط pGEM-t1- α -t2 ساخته شد. تایید پلاسمید ساخته‌شده توسط آزمون‌های PCR و هضم آنزیمی انجام شد.

به دست آمد. توالی نوکلئوتیدی ژن های t-PA توسط واکنش Sequencing تایید شد. در مرحله بعد دو وکتور بیانی نهایی که حاوی ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک های هیگرومایسین و نوزوتریسین و دو کپی از ژن t-PA بودند، از طریق کلونینگ قطعه t1- α -t2 به ترتیب در هریک از وکتورهای pFX1.4hyg و pFX1.4sat به دست آمد. بدین ترتیب وکتورهای pFX1.4hyg-2tPA و pFX1.4sat-2tPA حاصل شدند. به دلیل آنکه سازه های نهایی به واسطه واکنش Homologous recombination در نواحی 'ssu' و 'ssu' در ژنوم میزبان ادغام می گردند، نواحی باکتریایی وکتورها که غیر ضروری و احتمالاً مانع انجام صحیح ادغام ژنی بودند، پیش از ترانسفکشن، سازه های hyg-2tPA و sat-2tPA از طریق هضم آنزیمی با آنزیم محدودکننده SwaI جداسازی شدند. شکل ۱ نمای شماتیک سازه های به دست آمده جهت واردسازی به ژنوم سلول های *L. tarentolae* را نشان می دهد. ترانسفکشن سلول های لیشمانیا: پس از تایید سکانس ژنی و جداسازی سازه hyg-2tPA، این سازه از طریق الکتروپوریشن به درون سلول های *L. tarentolae* ترانسفورم شد. سلول های ترانسفکت شده مقاوم به hyg در محیط BHI agar حاوی $40 \mu\text{g/ml}$ آنتی بیوتیک هیگرومایسین انتخاب شدند. این سلول ها مجدداً توسط سازه sat-2tPA ترانسفورم شده و در این مورد نیز محیط BHI agar حاوی $40 \mu\text{g/ml}$ هیگرومایسین و $80 \mu\text{g/ml}$ نوزوتریسین جهت غربالگری کلون های مقاوم به hyg و sat استفاده شد. ادغام سازه های حاوی ژن t-PA در سلول میزبان با انجام PCR بر روی ژنوم سلول های ترانسفکت شده بررسی و تایید گردید. در این مورد جهت بررسی حضور ژن های کدکننده هیگرومایسین و نوزوتریسین از پرایمرهای اختصاصی آن ها و به منظور تایید حضور ژن t-PA از پرایمرهای موجود (جدول ۱) استفاده شد. ظهور قطعات 1050 bp برای ژن hyg، 500 bp برای ژن sat و 1700 bp برای ژن t-PA نشان دهنده ورود سازه های ژنی در کلون هایی بود که با هر دو سازه hyg-2tPA و sat-2tPA ترانسفکت شده بودند (شکل ۲). جهت تایید نهایی و به منظور حصول اطمینان از ورود سازه های 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 ناحیه ای از ژن ssu در ژنوم انگل متصل می شود، ظهور به ترتیب قطعات 2800 bp و 2300 bp در ژل آگارز (شکل ۲، ستون های چهارم و هشتم) نشان-

کشت شدند. وارد شدن هر یک از سازه های بیانی در ژنوم سلول های ترانسفکت شده توسط چندین واکنش PCR بر روی ژن های t-PA، sat، hyg و نیز PCR تایید واردسازی در ناحیه ssu تایید گردید. آزمون وسترن بلات (Western blotting): محتوای پروتئینی 3 ml محیط کشت شش روزه سلول های ترانسفکت شده (10^6 cell/ml) توسط 3 ml از محلول آبی Tri Chloro Acetic acid (TCA) 50% پس از یک ساعت انکوباسیون در یخ و پنج دقیقه سانتریفوژ در 12000 rpm رسوب داده شد. پس از خارج کردن مایع رویی و شستشو با 1 ml استون و سپس 1 ml الکل 96% درجه، رسوب حاصل در $100 \mu\text{l}$ آب دیونیزه حل شد. مقدار $30 \mu\text{l}$ از محلول به دست آمده ($50 \mu\text{g}$ پروتئین) در ژل پلی آکریل آمید 12% الکتروفورز گردید. ادامه مراحل وسترن بلات مطابق روش استاندارد انجام گردید^{۲۳} و از آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی ضد t-PA (Abcam, USA) به عنوان آنتی بادی اولیه و از آنتی بادی گاوی ضد ایمونوگلوبولین G خرگوشی (Dako, UK) به عنوان آنتی بادی ثانویه استفاده شد. از دی آمینوبنزیدین (DAB) در حضور پراکسید هیدروژن برای ظهور باندهای حاصله استفاده گردید. آزمون فعالیت آمیدولیتیک: میزان بیان t-PAی نوترکیب در سلول های ترانسفکت شده با یک سازه و سلول های ترانسفکت شده با هر دو سازه بیانی، به طور کمی توسط کیت Biopool Chromolize t-PA (Biopool, Ireland) ارزیابی شد. از نمونه های سوپ رقیق شده از کشت سلولی پنج و شش روز پس از تلقیح اولیه در حجم 50 ml و چرخش 130 rpm جهت بررسی میزان t-PA فعال ترشح شده در محیط کشت استفاده شد. t-PA فعال موجود در سوپ سلولی توسط آنتی بادی مونوکلونال sp-322 در $\text{pH} = 5/9$ مهار شده و پس از سه مرحله شستشو و اضافه کردن پلاسمینوژن و سوبسترای رنگی طبق روش ذکر شده توسط شرکت سازنده (Biopool, Ireland) میزان جذب نوری در طول موج 405 nm اندازه گیری شد. میزان فعالیت آمیدولیتیک t-PA ترشح شده بر اساس منحنی استاندارد به دست آمده از نمونه های استاندارد موجود در کیت محاسبه شد.

یافته ها

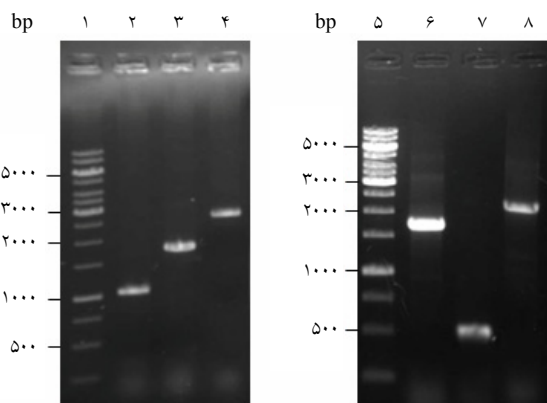
ساخت سازه های واسط و نهایی: وکتور واسط pGEMt1- α -t2 کلون کردن کپی های اول و دوم از ژن t-PA در بالادست و پایین دست قطعه ژنی غیر ترجمه شونده α -tubulin (Non-translated region)

Chromolize استفاده شدند. پس از اتصال t-PA موجود در محیط کشت به آنتی‌بادی متصل شده به انتهای چاهک‌ها و افزودن پلاسمینوژن و سویسترا، پلاسمین حاصل از تجزیه پلاسمینوژن بر سویسترا اثر کرده و ماده کروموزنیکی تولید می‌شود که در ۴۰۵nm جذب نوری دارد. پس از رسم منحنی استاندارد میزان فعالیت آمیدولیتیک پروتیین 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 sat-2tPA و hyg-2tPA دست‌کم برابر با ۳۷۵IU/ml و ۴۸۰IU/ml به دست آمد. لازم به ذکر است که در نمونه مربوط به سلول‌های ترانسفکت نشده در این آزمون هیچ میزانی فعالیت آمیدولیتیک مشاهده نشد.

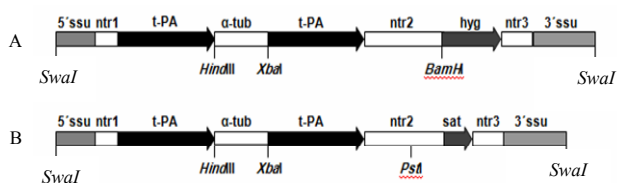
دهنده ادغام صحیح سازه‌های طراحی شده در ناحیه مورد نظر بود. آنالیز وسترن بلات: با انجام آزمون وسترن بلات باند مربوط به واکنش t-PA تجاری (Actylase) با آنتی‌بادی خرگوشی ضد t-PA به وزن مولکولی تقریباً ۶۶kD در غشاء نیتروسولوزی مشاهده شد (شکل ۳، ستون دو). به‌طور مشابه باندی با وزن مولکولی حدود ۶۴kD با استفاده از نمونه‌های مربوط به سوپ محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده به دست آمد (شکل ۳، ستون‌های چهار و پنج). این در حالی بود که در نمونه مربوط به سوپ 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 پروتیین ترشح شده در محیط کشت توسط کیت

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده به منظور تکثیر ژن t-PA از ژنوم سلول CHO

پرایمر	توالی	دمای ذوب (°C)	طول توالی تکثیر شونده (bp)
FH-tPA	5'CAACTAGTGGATCCATGGATGCAATGAAGAGAGG3'	۸۲/۶	۱۷۳۰
RH-tPA	5'TGTAAGCTTTTCACACCACCACCACCACCACCGGTCGCATGTTGTCAC3'	۹۳/۴	
FM-t2	5'CCATCTAGAATGGATGCAATGAAGAGAGG3'	۷۳/۴	۱۷۲۵
RM-t2	5'TGTGTCGACTCACCACCACCACCACCACCGGTCGCATGTTGTCAC3'	۹۴/۹	

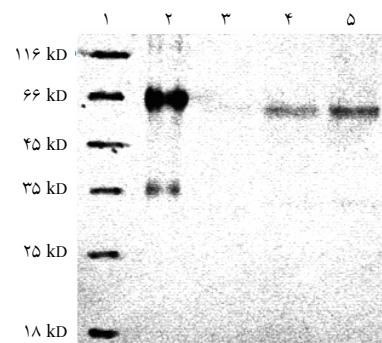


شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR بر روی ژنوم سلول *L. tarentolae* دوبار ترانسفکت شده. ستون‌های یک و پنج، مارکر ۱kb؛ ستون دو، ژن hyg (۱۰۵۰bp)؛ ستون‌های سه و شش، ژن t-PA (۱۷۰۰bp)؛ ستون چهار، باند ۲/۸kb مربوط به ادغام سازه hyg-2tPA در ناحیه ssu؛ ستون هفت، ژن sat (۵۰۰bp)؛ ستون هشت، باند ۲/۳kb مربوط به ادغام سازه sat-2tPA در ناحیه ssu.



شکل ۱- نمای شماتیک سازه‌های خطی شده hyg-2tPA (۹۴۸۸bp) و sat-2tPA (۹۰۰۲bp) پس از هضم آنزیمی توسط آنزیم SwaI بر روی وکتورهای pFX1.4sat-2tPA و pFX1.4hyg-2tPA. اختصارات: 5' ssu، ناحیه 5' از زیر واحد کوچک ژن RNA ریوزومی *L. tarentolae*؛ Ntr1 (0.4 k-IR cam BA)، Ntr2 (1.4 k-IR cam) و ntr3 (1.7 k-IR) CB، نواحی غیر ترجمه شونده بین ژنی جهت فراهم کردن سیگنال‌های اسپلایسینگ به منظور انجام صحیح تغییرات پس از رونویسی در *L. tarentolae*؛ alpha-tubulin، ناحیه غیر ترجمه شونده بین ژنی از *L. donovani*؛ t-PA، cDNA مربوط به ژن t-PA، hyg، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین؛ sat، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک نوروزوتربسین؛ 3' ssu، ناحیه 3' از زیر واحد کوچک ژن RNA ریوزومی *L. tarentolae*.

Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) را در لوکوس 18S rRNA، ایتگره نموده‌اند. آن‌ها بعد از آنالیز کلون‌های حاصل، یک رابطه مستقیم بین تعداد کپی‌های ایتگره شده و فلورسانس پروتیین EGFP گزارش کرده‌اند. کلون دارای بیشترین بیان، پروتیین EGFP نوترکیب را به مقدار ۳۰mg/lit تولید کرده است.^{۲۱} از آنجا که فرایند رونویسی در خانواده تریپانوزومیده به صورت پلی سیسترونیک انجام می‌شود، روند نهایی شدن رونویسی از mRNA اولیه که شامل *trans-splicing* و *poly-adenylation* می‌باشد جهت تهیه mRNA مونوسیسترونیک ضروری می‌باشد و در این مسیر نقش حضور نواحی غیر ترجمه شونده بین ژنی (*Intergenic NTRs*) به اثبات رسیده است.^{۲۴ و ۲۵} به همین دلیل در وکتورهای بیانی pFX1.4sat و pFX1.4hyg این نواحی در طرفین ژن‌های بیان شونده (مانند ژن *sat* و *hyg*) و نیز طرفین قطعه Stuffer تعبیه شده است (۳-۱). به دلیل مشابه، در این مطالعه، در طراحی دو سازه نهایی قطعه بین ژنی α -tubulin از انگل *L. donovani* مابین دو کپی از ژن t-PA قرار داده شد. سازه‌های طراحی شده فوق که هر یک حاوی دو کپی از ژن t-PA بودند به ترتیب به سلول‌های *L. tarentolae* ترانسفورم شدند و بدین ترتیب سلول‌های یک‌بار ترانسفکت شده و دو بار ترانسفکت شده به دست آمدند. هر یک از این سازه‌ها حاوی دو برابر تعدادی از کپی ژن t-PA بود که در مطالعه قبلی در این انگل به کار رفته بود.^{۲۶} به دلیل اهمیت درمانی t-PA به عنوان یک داروی فیبرینولیتیک، برای کاربردهای کلینیکی نیاز به روشی موثر جهت تولید این داروی ارزشمند با بازده بالا و صرف حداقل هزینه می‌باشد. در یک مقایسه کلی، t-PA نوترکیب تولید شده در سلول *E. coli* به صورت تک‌زنجیره و غیر گلیکوزیله بوده و به شکل ذرات نامحلول (*Inclusion bodies*) در سلول باقی می‌ماند. اگرچه پس از انجام مراحل محلول‌سازی و Refolding، پروتیین تولید شده دارای فعالیت کمی می‌باشد و همچنین گلیکوزیلاسیون نیز تاثیر مستقیمی در فعالیت t-PA ندارد، اما *E. coli* میزبان مناسبی برای تولید t-PA کامل (Full length) به نظر نمی‌رسد مگر آن‌که روش‌های کارامدی جهت Refolding پروتیین در این سلول به دست آید.^{۲۷ و ۲۸} Reteplase که شکل کوتاه شده t-PA با تعداد کمتری باندهای دی سولفید می‌باشد در این میزبان با موفقیت تولید شده است، اما درمان با این دارو به دلیل عدم عملکرد اختصاصی بر پلاسمینوژن موجود در محل لخته فیبرینی و تاثیر مستقیم بر



شکل-۳: آزمون وسترن بلات بر روی محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده و نشده (wild). ستون اول، مارکر پروتیین؛ ستون دوم، ۳μg از t-PA تجاری (Actylase)؛ ستون سوم، ۵۰μg از محتوای پروتیینی سوپ سلولی کلون ترانسفکت نشده؛ ستون چهارم، ۵۰μg از محتوای پروتیینی سوپ سلولی کلون یک‌بار ترانسفکت شده؛ ستون پنجم، ۵۰μg از محتوای پروتیینی سوپ سلولی کلون دو بار ترانسفکت شده.

جدول-۲: فعالیت آمیدولیتیک نمونه‌های استاندارد و نمونه‌های محیط کشت مربوط به سلول‌های *L. tarentolae* ترانسفکت شده

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

t-PA: Tissue Plasminogen Activator

بحث

در این مطالعه تلاش بر آن بود تا با طراحی دو سازه جدید بیان قابل توجهی از t-PA نوترکیب در انگل *L. tarentolae* به عنوان یک سیستم بیانی جدید و قابل در بیان پروتیین‌های هترولوگ، به دست آید. تاکنون مطالعات زیادی تاثیر مستقیم تعداد کپی ژن و بیان پروتیین‌های نوترکیب را در برخی دیگر از میزبان‌های یوکاریوتیک نشان داده‌اند. بدین دلیل و به منظور به دست آوردن میزان بالایی از بیان پروتیین نوترکیب t-PA، دو سازه ژنی که هر کدام حاوی دو کپی از ژن t-PA بودند طراحی و ساخته شدند. دیگر محققین با استفاده از وکتورهای بیانی اختصاصی این میزبان، یک یا دو کپی اضافی از ژن

همان‌طور 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 دوزنجیره t-PA (Two chain) 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 پروتیین 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 ۳۵۰ IU/ml و در سلول‌های ترانسفکت شده با هر دو سازه ۴۸۰ IU/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* (۳-۷ IU/ml)^{۱۹} و سلول CHO تغییر نیافته (۵۰ IU/ml)^۵ گزارش شده است. با نظر به نتایج به دست آمده امید است که با به‌کارگیری سایر روش‌های بهینه‌سازی‌ها و نیز انجام آزمایشات تکمیلی، تولید بالاتری از t-PA نوترکیب در این میزبان 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 کپی‌های 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 پروتیین در رده‌های سلولی میلوما رت، فیبروبلاست C۱۲۷ و CHO با موفقیت انجام شده است.^۵ در حال حاضر tPA در صنعت به وسیله سلول‌های CHO نوترکیب تولید می‌شود اما کوشش‌ها برای کاهش قیمت و کاهش خطر آلودگی با ویروس‌ها، پرایون‌ها و مایکوپلازما 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 کشت سلول‌های ترانسفکت شده، آزمون وسترن بلات حضور t-PA 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, Tangelder 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, Hyeong-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. *Plan 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, Peticca 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.
- Fritsche 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 (NY)* 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

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

Abstract

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.

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 protozoon 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 resistancy. 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