

همسانه‌سازی و بیان ژن نو ترکیب CD40L انسانی در رده سلولی HEK293

بهاره شکوهیان^۱، زهره شریفی^۲، مهسید محمدی پور^۳، فاطمه یاری^۴

چکیده

سابقه و هدف

CD40L، پروتئینی غشایی و یکی از اعضای خانواده TNF است که نقش مهمی در انتقال پیام سلولی در ایمنی ذاتی و تطبیقی دارد. از آن جایی که این پروتئین نقش خود را از طریق تجمع گیرنده در سطح سلول هدف ایفا می‌کند، به نظر می‌رسد فرم مالتی مری آن بتواند اثر قوی تری نسبت به فرم طبیعی تراپمیری ایجاد کند. بر این اساس در این مطالعه کلونینگ و بیان فرم کایمیری و دودکامری CD40L محلول، از طریق پروتئین خود مالتی مر شونده سورفاکتانت پروتئین D (SP-D)، در رده سلولی HEK293 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پروتئین SPD-CD40L به صورت *in silico* طراحی و در پلاسمید (+)pcDNA3.1 همسانه‌سازی شد. سلول‌های HEK293 به عنوان میزبان بیانی مورد استفاده قرار گرفته و ترانسفکت شدند. بیان CD40L نو ترکیب در سطح RNA به وسیله RT-PCR بررسی شد. پس از تخلیص پروتئین نو ترکیب با روش کروماتوگرافی تمایلی، وزن مولکولی آن توسط SDS-PAGE تعیین گردید. به منظور بررسی اختصاصیت پروتئین نیز از روش‌های ELISA و Dot Blot استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده نشان‌دهنده ترانسفکشن سلول‌های HEK293 و بیان پروتئین نو ترکیب پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان ترانسفکشن بود. هم چنین نتایج حاصل از روش ELISA و Dot Blot بیانگر اختصاصیت پروتئین کایمیری SPD-CD40L بود.

نتیجه‌گیری

پروتئین کایمیری SPD-CD40L از طریق وکتور بیانی (+)pcDNA3.1 در رده سلولی یوکاریوتی HEK293 به‌طور موفقیت‌آمیز بیان شد و وزن مولکولی پروتئین ۴-تراپمیری (دودکامری) با مقدار مورد انتظار تطابق داشت.

کلمات کلیدی: CD40 لیگاند، رده سلولی HEK 293، ترانسفکشن

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۳

۱- کارشناس ارشد زیست فناوری پزشکی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- PhD ویروس‌شناسی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۳- PhD ژنتیک مولکولی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- مؤلف مسئول: PhD ایمنی‌شناسی پزشکی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی:

مقدمه

CD40 لیگاند (CD40L، gp39، CD145، HIGM1، IMD3 و TNFSF5) یک پروتئین غشایی تیپ II ۳۹ کیلو دالتونی است که به خانواده فاکتور نکروز توموری (TNFSF) تعلق داشته و سهم زیادی در انتقال پیام سلولی در ایمنی ذاتی و تطبیقی دارا می‌باشد (۱). این پروتئین توسط انواعی از سلول‌ها هم چون لنفوسیت B و T پلاکت‌های فعال شده، مونوسیت، سلول‌های دندریتیک، ماکروفاژها، بیان می‌شود (۳، ۲). ژن CD40L بر روی کروموزوم X واقع شده و یک گلیکوپروتئین ۲۶۱ اسیدآمینهای را کد می‌کند که در فرم غشایی شامل سه دومین می‌باشد. چنانچه CD40L غشایی از متیونین ۱۱۳ (Met113) دومین خارج سلولی شکسته شود، CD40L محلول یا sCD40L ایجاد می‌گردد. CD40L فعال، چه به فرم غشایی و چه به فرم محلول، ساختاری هوموترایمری دارد، این ساختار مالتی مری نقش مهمی در برهمکنش مؤثر با CD40 و پیام‌دهی سلولی متعاقب آن دارد (۴، ۲). برهمکنش CD40-CD40L برای پاسخ وابسته به T-cell لنفوسیت‌های B به آنتی‌ژن‌ها، ایجاد سلول‌های B خاطره و پلاسماسل و القای تولید آنتی‌بادی IgG، افزایش شکل‌گیری مراکز زایا در هماهنگی با سلول‌های T ضروری است. به علاوه ردپای سیستم دوتایی CD40-CD40L در بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های التهابی روده (IBD)، پیشرفت عفونت HIV و التهاب عصبی وابسته به HIV، انواع سرطان‌ها، آترواسکلروزیس، لوپوس، درماتومیوزیس و آلزایمر دیده می‌شود (۱۰-۵، ۱). در واقع برهمکنش CD40 و CD40L با فراهم کردن سیگنال ثانویه مورد نیاز، منجر به آغاز پاسخ ایمنی هومورال و پاسخ ایمنی با واسطه سلولی می‌گردد (۱۱، ۷). این حقیقت که CD40L قادر به القای تکثیر و تمایز لنفوسیت‌های B و T است، در مطالعه‌های بسیاری به اثبات رسیده است (۱۷-۱۲، ۷). اما اخیراً چندین بررسی آزمایشگاهی تأثیر چند برابری فرم مالتی مری CD40L نو ترکیب را بر القای ایمنی هومورال و سلولی نشان داده‌اند (۲۱-۱۸).

تولید فرم محلول پروتئین‌های TNFSF، بسیار حائز اهمیت است، زیرا بررسی این پروتئین‌ها و گیرنده‌های

اختصاصی آن‌ها در فرم غشایی پیچیدگی‌های بسیاری داشته و به دلیل وجود عوامل مداخله‌گر، تفسیر نتایج را غیر ممکن می‌سازد. به علاوه فرم‌های محلول چندین پروتئین از این خانواده کاربرد درمانی دارد (۲۴-۲۲).

به منظور تولید پروتئین‌های محلول از خانواده TNF دو راه وجود دارد: می‌توان فرم غشایی را تولید کرد و پس از آن با اثر دادن پروتئاز، بخش خارج سلولی پروتئین را در محیط آزاد ساخت، و یا تنها بخش خارج غشایی را به همراه یک توالی راهنما کلون و سنتز کرد. در هر دو حالت، فرم محلول پروتئین‌های TNFSF که هموترایمرهای تکی هستند، ناپایدار خواهند بود (۲۵).

روشی که به طور معمول برای حل مشکل ناپایداری پروتئین‌های مالتی مری در فرم محلول استفاده می‌شود، به کارگیری پروتئین مورد نظر در کنار یک قطعه از یک پروتئین دیگر که دارای توانایی دایمر و یا مالتی‌مر شدن به طور خودبه‌خودی می‌باشد، است (۲۴). از جمله این پروتئین‌های خود مالتی‌مر شونده سورفکتانت پروتئین D (SP-D) می‌باشد. SP-D یک لکتین تیپ C است که توسط سلول‌های اپیتلیال (عمدتاً سلول‌های اپیتلیال ریه) بیان می‌شود. این پروتئین به شکل دودکامری (Dodecameric) متشکل از چهار زیر واحد تراپیری می‌باشد (۲۶). با جایگزین کردن دومین خارج سلولی (ECD) پروتئین‌های خانواده TNF با ناحیه لکتینی می‌توان پروتئین‌های دودکامری ایجاد کرد.

با توجه به این که بیشتر اعضای خانواده TNS نقش درمانی داشته و تولید آن‌ها به شکل پروتئین‌های محلول و مالتی مری امکان‌پذیر و مؤثر می‌باشد، بررسی و مطالعه چگونگی طراحی و ساخت پروتئین‌های مالتی مری اهمیت پیدا می‌کند و این اهمیت با توجه به مطالعه‌های محدودی که در زمینه ساخت پروتئین‌های مالتی مری در ایران صورت گرفته، پررنگ‌تر می‌شود. در میان اعضای این خانواده، نقش کلیدی پروتئین CD40L در انواع زمینه‌های تشخیصی و درمانی از جمله کنترل التهاب، تولید واکسن، درمان سرطان و افزایش بازده تولید آنتی‌بادی و هم چنین عدم تولید این پروتئین در ایران، ما را برآن داشت تا شکل دودکامری CD40L محلول را از طریق پروتئین

پلاسمید (+)pcDNA3.1 با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت وایژن (Cat. NO. GF2001) و طبق روش مندرج کیت جداسازی شد. به منظور بررسی صحت همسانه‌سازی ژن هدف در حامل (+)pcDNA3.1، از روش توالی‌یابی (sequencing) و بررسی الگوی هضم آنزیمی (digestion pattern) استفاده شد. حامل پلاسمیدی نو ترکیب pcDNA-SPD-CD40L با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده HindIII و EcoRI و طبق دستورالعمل شرکت سازنده آنزیم‌ها (فرمتاز، انگلستان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت هضم شد. محصول واکنش هضم، با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ بررسی گردید.

کشت و نگهداری سلول‌های HEK293:

رده سلولی HEK293 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI-1460 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، محلول پنی‌سیلین (۱۰۰ U/mL)، استرپتومایسین (۱۰۰ µg/mL) و ۲ mM L-گلوتامین کشت داده شد. سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO₂ ۵٪ نگهداری و هر دو روز یک بار محیط کشت آن تعویض گردید.

ترانسفکشن سلول‌های HEK293 و جمع‌آوری محلول رویی:

سلول‌ها روز قبل از ترانسفکشن شمارش شده و تعداد 5×10^5 سلول به هر چاهک از پلیت ۶ خانه‌ای اضافه شد. ۲ µg پلاسمید استخراج شده حاوی قطعه ژن مورد نظر (معادل ۱۰ µL) به ۱۹۰ µL محیط کشت فاقد FBS و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین اضافه شد و محلول به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط گرماگذاری گردید.

۶ µL X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent (Cat. NO. 06366236001) محصول شرکت ژوش آلمان به محلول افزوده و محلول حاصل جهت تشکیل کمپلکس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط گرماگذاری شد. محلول حاوی کمپلکس معرف و پلاسمید نو ترکیب به محیط کشت سلول‌ها اضافه شده و پلیت به مدت ۶ ساعت در

مالتی‌مرکنده سورفکتانت پروتئین D تولید و در سلول‌های بیانی یوکاریوتی HEK293 بیان کنیم.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.

طراحی و ساخت ژن SPD-CD40L:

به منظور طراحی سازه کایمری توالی آمینواسیدی سورفکتانت پروتئین D انسانی با شماره دسترسی NP_003010.4 و پروتئین CD40L انسانی با شماره دسترسی NP_000065.1 از بانک اطلاعات پروتئین NCBI به دست آمد. با جایگزین کردن بخش خارج سلولی (ECD) پروتئین CD40L (اسید آمینه‌های ۴۷ تا ۲۶۱) با ناحیه لکتینی سورفکتانت پروتئین D (اسید آمینه‌های ۲۶۲ تا ۳۷۵)، توالی اولیه پروتئین به طول ۴۷۲ اسید آمینه طراحی شد. سپس ساختمان سوم پروتئین کایمری SPD-CD40L توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی تایید شده و توالی نوکلئوتیدی آن توسط شرکت ژن کاست (لوگزامبورگ) ساخت و در حامل پلاسمیدی (+)pcDNA3.1 قرار گرفت.

آماده‌سازی پلاسمید نو ترکیب و تراریختی سلول‌های بیانی یوکاریوتی:

کشت شبانه باکتری *E. coli* سویه Top10 در ۵ mL از محیط مایع LB (Lysogeny Broth) با گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه (rpm) انجام شد. سپس محیط کشت باکتری‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ گردید و پس از خارج کردن محیط کشت، رسوب باکتری با استفاده از تیمار شیمیایی توسط کلرید کلسیم (CaCl₂) ۰/۱ مولار و قرار دادن بر روی یخ به سلول مستعد تبدیل شد. پس از آماده‌سازی سلول‌های *E. coli* جهت پذیرش پلاسمید، تراریختی سلول‌های مستعد به روش شوک حرارتی انجام گرفت. سوپانسیون باکتریایی حاصل بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ µg/mL پخش شده و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس محیط کشت رویی خارج شده و محیط کشت جدید حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین به سلول‌ها اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

بررسی و تأیید بیان پروتئین نو ترکیب:

استخراج RNA

استخراج RNA از سلول‌های HEK293 تراریخت شده پس از جمع‌آوری مایع رویی سلول‌ها، با استفاده از محلول ترایزول TriPure Isolation Reagent (ژوش، آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ و هم چنین الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ سنجیده شد.

ساخت cDNA

ساخت cDNA به روش نسخه‌برداری معکوس (فرمنتاز، انگلستان) انجام شد. برای این منظور ۴/۵ µg RNA با آب مقطر حاوی DEPC به حجم نهایی ۲۰ µL رسید و آغازگرهای ۶ نوکلئوتیدی تصادفی (Random hexamers) به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس به آن بافر، آنزیم نسخه‌بردار معکوس، نوکلئوتیدهای آزاد سه فسفات (dNTPs) و مهارکننده RNase اضافه شد. مخلوط واکنش در ترمال سایکلر (بیوراد، آمریکا) تکثیر شد. بررسی کیفیت cDNA با واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن بتا اکتین به عنوان کنترل و بررسی وجود cDNA مربوط به SPD-CD40L با آغازگرهای اختصاصی نواحی داخلی ژن SPD-CD40L به طور جداگانه انجام شد و در نهایت محصول واکنش‌های PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ مشاهده و بررسی گردید (جدول ۱).

آزمایش SDS-PAGE

به منظور تأیید بیان و بررسی وزن مولکولی پروتئین

SPD-CD40L، پس از تخلیص پروتئین از محیط کشت سلول‌های HEK293 ۲۴ و ۴۸ ساعته به وسیله ستون کروماتوگرافی تمایلی که حاوی آنتی‌بادی اختصاصی Anti-CD40L (ابکم، کمبریج، Cat. NO. ab47204) تثبیت شده بود، آزمایش SDS-PAGE در سیستم بافری ناپوسته شامل ژل متراکم کننده و ژل جداکننده ۱۲٪ انجام شد. نمونه‌ها پس از سانتی‌فیوژ، به وسیله سرنگ همیلتون در کنار شاخص وزن مولکولی به چاهک‌های ژل منتقل شدند. بعد از اتمام الکتروفورز به مدت ۲:۲۰ ساعت در اختلاف پتانسیل ۱۲۰ ولت، کاست حاوی ژل باز شد. ژل پلی‌آکریل‌آمید با استفاده از رنگ کوماسی‌بلو به مدت ۲ ساعت روی شیکر رنگ شده و پس از ۲ ساعت رنگ‌زدایی با محلول رنگ‌بر مورد بررسی قرار گرفت.

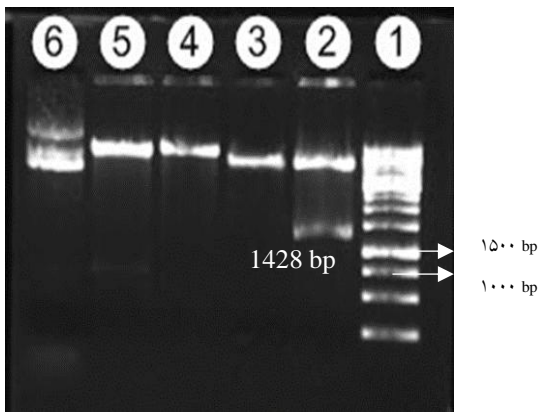
آزمایش الایزا:

پس از آن اختصاصیت پروتئین نو ترکیب SPD-CD40L با استفاده از روش الایزا بررسی شد. به این منظور ۵۰ µL SPD-CD40L تخلیص شده از مایع رویی سلولی (۲۴ و ۴۸ ساعته) به عنوان نمونه مورد بررسی، sCD40L تخلیص شده از کنسانتره پلاکتی به عنوان کنترل مثبت و بافر PBS و HCG (گنادوتروپین) به عنوان کنترل منفی، به چاهک‌های پلیت الایزا اضافه شد و پلیت به مدت یک شب در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس خانه‌های کوت شده، از پروتئین خالی گشته، ۱۰۰ µL محلول مسدودکننده (آلبومین + آزاید) به هر کدام افزوده و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. پس از خارج کردن محلول مسدودکننده از خانه‌ها، ۵۰ µL محلول آنتی‌بادی Anti-CD40L (ابکم، کمبریج، Cat. NO. ab47204) با رقت ۱:۲۰۰ در PBS به هر خانه اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. چاهک‌ها توسط محلول شستشو ۰.۵٪ PBS-T (PBS + Tween20) شستشو شدند و ۵۰ µL از کونزوگه آنزیمی Anti-mouse IgG با آنزیم HRP (سیگما، آمریکا، Cat. NO. A0170) با رقت ۱:۱۰۰۰ به هر خانه اضافه شد و پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت.

جدول ۱: توالی آغازگرهای طراحی شده برای ناحیه داخلی ژن SPD-CD40L و ژن بتاکتین

ژن	اندازه محصول	دمای اتصال	توالی آغازگر
ناحیه داخلی SPD-CD40L	۱۱۸ جفت باز	۵۴ درجه سانتی گراد	جلوبرنده: 5'-GGAATTTGCACGAGGACTTC-3'
			معکوس: 5'-TTGACAAACCCCTCGAACTG-3'
بتاکتین	۱۹۰ جفت باز	۵۷ درجه سانتی گراد	جلوبرنده: 5'-TCATGAAGATCCTCACCGAG-3'
			معکوس: 5'-TTGCCAATGGTGATGACCTG-3'

نواحی داخلی ژن‌های بتا اکتین و SPD-CD40L، الکتروفورز انجام شد. در نتیجه الکتروفورز محصول واکنش PCR در ژل آگارز ۲٪ در بافر TAE، مشاهده دو بانده ۱۹۰ جفت بازی حاصل تکثیر cDNA سلول‌های آزمایش و کنترل با آغازگرهای بتاکتین نشان‌دهنده کیفیت cDNA بود، به علاوه وجود بانده ۱۱۸ جفت بازی محصول تکثیر ناحیه داخلی ژن کدکننده SPD-CD40L در سلول‌های HEK293 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و عدم مشاهده این بانده در نمونه کنترل نشان دهنده بیان ژن مورد نظر در سطح RNA بود (شکل ۲).



شکل ۱: الکتروفورز محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور نوترکیب. ستون ۱ شاخص اندازه مولکولی یک کیلو بازی، ستون ۲ جدا شدن قطعه ژنی SPD-CD40L به طول ۱۴۲۸ جفت باز از پلاسمید pcDNA پس از هضم با آنزیم‌های HindIII و EcoRI، ستون ۳ پلاسمید pcDNA بدون قطعه ورودی هضم شده با آنزیم‌های HindIII و EcoRI، ستون ۴ وکتور نوترکیب برش خورده با آنزیم HindIII و EcoRI، ستون ۵ وکتور نوترکیب برش خورده با آنزیم EcoRI و ستون ۶ وکتور نوترکیب هضم نشده که به سه شکل حلقوی، خطی و سوپرکویل وجود دارد را نشان می‌دهد.

پس از شستشوی دوباره، ۵۰ μL از محلول TMB به هر چاهک اضافه شده و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق گرماگذاری شد. در نهایت با افزودن ۵۰ μL محلول اسید کلریدریک به هر چاهک، واکنش متوقف گردید و جذب نوری چاهک‌ها با استفاده از دستگاه خوانش الیزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

آزمایش دات بلات (Dot Blot):

برای بررسی وجود و اختصاصیت پروتئین نوترکیب، آزمایش دات بلات نیز انجام شد. در این روش محلول پروتئینی به طور مستقیم به شکل نقاط جدا از هم به غشاء PVDF (ژوش، آلمان) منتقل شد و آنتی‌بادی اختصاصی (آنتی‌بادی Anti-CD40L) اضافه گردید، سپس آنتی‌بادی کونژوگه با HRP افزوده شد که پس از مواجهه با سوبسترای ECL (Enhanced Chemi Luminescence) باعث ایجاد سیگنال قابل مشاهده از طریق دستگاه تصویربرداری مولکولی گردید.

یافته‌ها

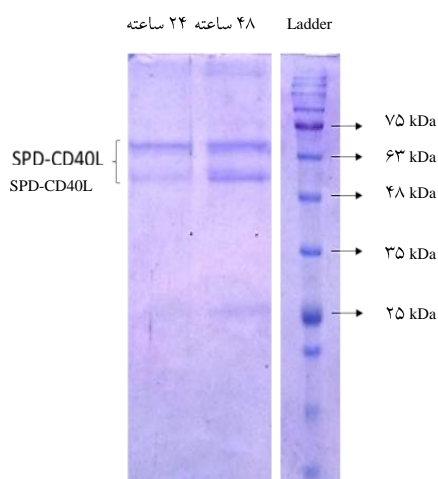
بررسی صحت همسانه‌سازی:

وکتور پلاسمیدی نوترکیب SPD-CD40L-pcDNA با استفاده از آنزیم‌های محدودالایتر HindIII و EcoRI در بافر مشترک هضم شد. محصول واکنش هضم، با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ بررسی گردید. خارج شدن قطعه ۱۴۲۸ جفت بازی حاصل از هضم آنزیمی با شاخص اندازه مولکولی، نشان دهنده صحت همسانه‌سازی بود (شکل ۱).

بررسی بیان در سطح RNA:

به منظور مشاهده قطعات مورد انتظار در نتیجه تکثیر

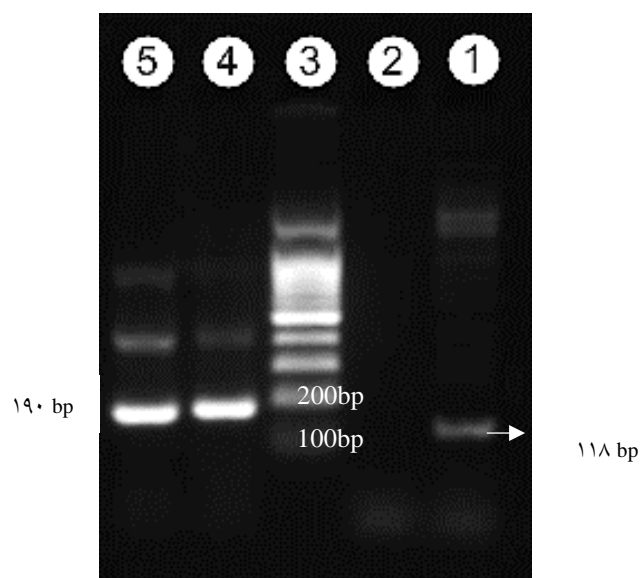
اختصاصی و ویژگی آنتی ژن نو ترکیب SPD-CD40L بود (جدول ۲). آزمایشات به منظور بررسی وجود و اختصاصیت پروتئین مورد نظر انجام شد. لکه‌های تیره مشخص شده در شکل ۴، نقاط واکنش مثبت سوبسترای ECL با آنتی‌بادی کونژوگه با HRP را نشان می‌دهند. مشاهده این نقاط، تأییدی بر وجود و ویژگی پروتئین SPD-CD40L تخلیص شده از محیط کشت سلول‌های HEK293 می‌باشد.



شکل ۳: SDS-PAGE پروتئین نو ترکیب SPD-CD40L در ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲٪. ستون سمت راست نشان‌دهنده مارکر وزن مولکولی است. ستون وسط نشان‌دهنده SPD-CD40L تخلیص شده از مایع رویی سلول‌های HEK293 پس از کشت ۴۸ ساعته و ستون سمت چپ نشان‌دهنده SPD-CD40L تخلیص شده از مایع رویی سلول‌های HEK293 پس از کشت ۲۴ ساعته می‌باشد.

جدول ۲: نتایج الیزا پروتئین نو ترکیب SPD-CD40L

نمونه	OD (۴۵۰ nm)
PBS	۰/۰۳۱ ± ۰/۰۹۸
HCG	۰/۰۱۱ ± ۰/۰۵۶
کنترل مثبت	۰/۰۸۴ ± ۰/۰۸۵
SPD-CD40L 48 hour	۰/۰۶۱ ± ۰/۰۳۸
SPD-CD40L 24 hour	۰/۰۳۸ ± ۰/۰۲۶



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR. ستون ۳ مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی می‌باشد. در ستون ۱ و ۲ به ترتیب محصول تکثیر ژن SPD-CD40L از سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده و ترانسفکت نشده (کنترل منفی) نشان داده شده است. وجود باند ۱۱۸ جفت‌بازی در ستون ۱ بیانگر بیان ژن SPD-CD40L در سطح RNA می‌باشد. در ستون‌های ۴ و ۵ نیز به ترتیب باند محصول تکثیر ژن بتا اکتین در سلول‌های HEK293 تست و کنترل نشان داده شده است.

بررسی بیان و اختصاصیت پروتئین SPD-CD40L:

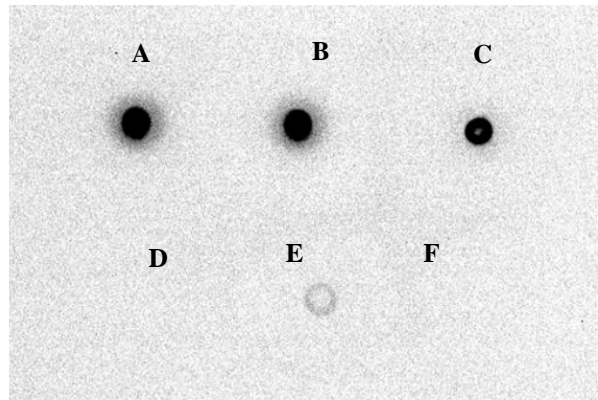
الکتروفورز پروتئین‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE انجام شد. باندهای حاصل از الکتروفورز عمودی SPD-CD40L تخلیص شده از محیط کشت سلول‌های HEK293 به دست آمده از کشت ۲۴ و ۴۸ ساعته، با مطالعه‌های مشابه قبلی هم‌خوانی داشت (شکل ۳). باندهای ۵۸ و ۶۴ کیلودالتونی نشان‌دهنده سطوح مختلف گلیکوزیلاسیون پروتئین نو ترکیب می‌باشند. اختصاصیت پروتئین نو ترکیب SPD-CD40L با استفاده از روش الیزا تأیید شد. در این روش پس از اتصال پروتئین به کف پلیت و افزودن آنتی‌بادی اختصاصی (آنتی‌بادی Anti-CD40L)، آنتی‌بادی کونژوگه با HRP اضافه گردید که پس از مواجهه با سوبسترای TMB سبب واکنش رنگزا شد. تشکیل محصول رنگی حاصل از واکنش آنزیمی، نشان‌دهنده واکنش

آزمایشگاه و به کارگیری این سلول‌ها در جهت فعال کردن و افزایش پاسخ T-cell ها و عده‌ای دیگر به منظور افزایش بازده سلول‌های هیبریدوما در تولید آنتی‌بادی، به این مهم پرداخته‌اند (۲۷). به همین علت مطالعه‌های بسیاری به منظور افزایش تحریک و فعال کردن لئوسیت‌های B صورت گرفته است. یکی از پروتئین‌هایی که در سال‌های اخیر به دلیل نقش کلیدی که در فعال کردن ایمنی ذاتی و تطبیقی دارد بسیار مورد توجه واقع شده، CD40L می‌باشد. اما بزرگترین مشکل در تحریک CD40 با واسطه منوهای CD40L یا آنتی‌بادی، اثر ضعیف این پروتئین‌ها بر تحریک و تکثیر B-cell است (۱۸). بررسی‌های بیشتر بر روی مکانیسم اثر CD40L نشان داد که این پروتئین از طریق کلاستر کردن گیرنده خود موجب انتقال پیام در سلول هدف شده و بنابراین با افزایش میزان تجمع گیرنده می‌توان اثر قوی‌تر و ماندگارتری را ایجاد کرد (۱۱).

در سال ۲۰۰۱ هزول و همکارانش با تولید دو فرم مختلف از CD40L زاویه‌ای متفاوت از تولید پروتئین‌های نو ترکیب مالتی مری را نشان دادند. اولین پروتئین تولیدی آن‌ها یک تراپمر تکی از بخش خارج سلولی CD40L و دیگری پروتئین ۴- تراپمری تشکیل شده از بدنه اصلی SP-D و بخش خارج سلولی CD40L موشی بود. نتایج آن‌ها نشان‌دهنده اثر بیشتر فرم دودکامری در مقایسه با فرم تراپمری در فعال کردن لئوسیت‌های B بود. هزول به منظور اتصال پروتئین SP-D به بخش خارج سلولی CD40L از توالی لینکر GGGNS استفاده کرد که با بررسی‌های بیوانفورماتیکی و پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین به نظر می‌رسد این توالی اثر مطلوبی در فولدینگ سازه نهایی نداشته باشد، بنابراین در این مطالعه، این توالی حذف شد (۱۹).

مطالعه بعدی توسط هالر و کورنبلات در سال ۲۰۰۳ حاکی از تولید پروتئین ادغامی ۲- تراپمری تشکیل شده از Acrp30 و بخش خارج سلولی CD40L بود. این پروتئین همگامی اثری کمتر از فرم دودکامری اما بیشتر از شکل تراپمری پروتئین CD40L داشت (۲۸).

در سال ۲۰۰۵ جیانگ و همکارانش با انتقال ژن



شکل ۴: آزمایش دات بلات پروتئین نو ترکیب SP-D-CD40L. نقطه نشان‌دهنده نمونه CD40L تخلیص شده از کنسانتره پلاکتی می‌باشد که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است. نقاط B و C نشان‌دهنده نو ترکیب بیان شده توسط سلول‌های HEK293، ۴۸ و ۲۴ ساعته می‌باشند. در نقطه D پروتئین BSA به عنوان کنترل منفی لکه‌گذاری شد و در این نقطه هیچ لکه‌ای مشاهده نگردید. نقطه E نشان‌دهنده Lysate سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده و نقطه F نشان‌دهنده Lysate سلول‌های HEK293 ترانسفکت نشده (به عنوان کنترل منفی نمونه Lysate) می‌باشد.

بحث

با توجه به اهمیت این پروتئین در انواع زمینه‌های تشخیصی و درمانی و عدم تولید آن در ایران، در مطالعه حاضر پروتئین SP-D-CD40L با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی طراحی شده و توالی نوکلئوتیدی آن ساخت و در پلاسמיד pcDNA3.1(+) همسانه‌سازی شد. سلول‌های HEK293 به عنوان میزبان بیانی مورد استفاده قرار گرفته و ترانسفکت شدند. بیان CD40L نو ترکیب در سطح RNA توسط RT-PCR بررسی شد. پس از تأیید بیان در سطح RNA، تخلیص پروتئین نو ترکیب با روش کروماتوگرافی تمایلی صورت گرفت و وزن مولکولی پروتئین نو ترکیب توسط SDS-PAGE تعیین گردید. به منظور بررسی اختصاصیت پروتئین نیز از آزمون‌های ELISA و Dot Blot استفاده شد.

ایجاد لئوسیت‌های B فعال همواره از جنبه‌های مختلف حائز اهمیت بوده است. عده‌ای از محققان با هدف تبدیل لئوسیت B به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن فعال در

مطالعه حاضر اولین مرحله در راستای رسیدن به سوی هدف مذکور است. بنابراین مقایسه اثر CD40L مالتی مری نوترکیب با فرم طبیعی CD40L در محیط *in vivo* بر تحریک تولید آنتی‌بادی از لنفوسیت‌های B در مطالعه‌های دیگر پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

حاصل این مطالعه طراحی و همسانه‌سازی موفقیت‌آمیز شکل ۴- تراپیری (دودکامری) پروتئین CD40L با استفاده از پروتئین خود مالتی‌مر شونده سورفکتانت پروتئین D بود که به دنبال آن پروتئین کایمری از طریق وکتور (+)pcDNA3.1 در میزبان بیانی یوکاریوتی HEK293 بیان شد. پروتئین نوترکیب تخلیص شده و اختصاصیت آن تایید گردید. نتایج حاصل از SDS-PAGE بیانگر تولید فرم دودکامری مورد نظر با وزن مولکولی مطلوب بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایانامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون با کد اخلاق IR.TMI.REC.1394.27 می‌باشد. بودجه این مطالعه توسط مؤسسه‌ی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین گردیده و همه مراحل عملی پروژه در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون انجام شده است.

CD40L موشی به لاین سلولی H22 توسط وکتور بیانی (+)pcDNA3.1، CD40L تراپیری را بیان کردند. در مطالعه حاضر از CD40L انسانی و سلول‌های HEK293 استفاده شده و علاوه بر ۴- تراپیری بودن سازه، پروتئین به صورت ترشحي طراحی گشته است که این مسئله برداشت و تخلیص پروتئین را تسهیل می‌کند (۲۹).

در سال ۲۰۰۶ استون و همکارانش هر دو شکل ۲- تراپیری و ۴- تراپیری CD40L را بیان کرده و به صورت *in vivo* مورد مطالعه قرار دادند، بررسی‌های وزن مولکولی پروتئین نوترکیب با روش SDS-PAGE، توسط وی بیانگر تولید پروتئینی با وزن تقریبی ۵۸ کیلودالتون بود که این نتیجه با مطالعه حاضر و بررسی‌های بیوانفورماتیکی در مورد پیش‌بینی وزن مولکولی پروتئین نوترکیب (۴۹ کیلودالتون به علاوه‌ی وزن دو زنجیره کربوهیدراتی) مطابقت دارد (۳۰).

در نهایت ریچارد کورنبلات در سال ۲۰۰۸ با ثبت انحصاری موفق به تولید این دو پروتئین با نام تجاری Multimeric Biotherapeutics شد (۳۱).

با توجه به این که ظرفیت محدود و بازده پایین سلول‌های هیبریدوما در تولید آنتی‌بادی مونوکلونال یکی از دلایل قیمت نسبتاً بالای این محصول محسوب می‌گردد، یافتن راهی جهت تحریک این سلول‌ها می‌تواند راهکاری کارآمد برای کاهش هزینه‌های تولید آنتی‌بادی باشد و

References:

- Kornbluth RS. The emerging role of CD40 ligand in HIV infection. *J Leukoc Biol* 2000; 68(3): 373-82.
- Kim HO, Kim HS, Youn JC, Shin EC, Park S. Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays. *J Transl Med* 2011; 9(1): 113.
- Galicia López A, Olgún Ortega L, Saavedra MA, Méndez Cruz R, Jimenez Flores R, García de la Peña M.. Increased concentrations of soluble CD40 ligand platelet in patients with primary antiphospholipidic syndrome. *Reumatol Clín* 2013; 9(4): 216-20. [Article in English, Spanish]
- Aloui C, Prigent A, Sut C, Tariket S, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, *et al*. The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion. *Int J Mol Sci* 2014; 15(12): 22342-64.
- Danese S, Sans M, Fiocchi C. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53(7): 1035-43.
- Davidson DC, Jackson JW, Maggirwar SB. Targeting platelet-derived soluble CD40 ligand :a new treatment strategy for HIV-associated neuroinflammation? *J Neuroinflammation* 2013; 10: 144.
- Elgueta R, Benson MJ, De Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 2009; 229(1): 152-72.
- Antoniades C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40

- ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(8): 669-77.
- 9- Daoussis D, Andonopoulos AP, Lioussis SN. Targeting CD40L: a promising therapeutic approach. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11(4): 635-41.
 - 10- Giunta B, Rezai-Zadeh K, Tan J. Impact of the CD40-CD40L dyad in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010; 9(2): 149-55.
 - 11- Liu A, Guardino A, Chinsangaram L, Goldstein MJ, Panicali D, Levy R. Therapeutic vaccination against murine lymphoma by intratumoral injection of recombinant fowlpox virus encoding CD40 ligand. *Cancer Res* 2007; 67(14): 7037-44.
 - 12- Aversa G, Punnonen J, Carballido JM, Cocks BG, de Vries JE. CD40 ligand-CD40 interaction in Ig isotype switching in mature and immature human B cells. *Semin Immunol* 1994; 6(5): 295-301.
 - 13- Blumberg N, Spinelli SL, Francis CW, Taubman MB, Phipps RP. The platelet as an immune cell-CD40 ligand and transfusion immunomodulation. *Immunol Res* 2009; 45(2-3): 251-60.
 - 14- Cognasse F, Boussoulade F, Chavarin P, Acquart S, Fabrigli P, Lamy B, *et al.* Release of potential immunomodulatory factors during platelet storage. *Transfusion* 2006; 46(7): 1184-9.
 - 15- Esmaili MA, Yari F, Sharifi Z, Nikougofar M, Fadaei R. Effects of platelet microparticles on the activation of B cells. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology* 2013; 15(4): 1-10. [Article in Farsi]
 - 16- Ma DY, Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol* 2009; 21(5): 265-72.
 - 17- Spriggs M, Armitage R, Strockbine L, Clifford K, Macduff B, Sato T, *et al.* Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J Exp Med* 1992; 176(6): 1543-50.
 - 18- Garcia-Marquez MA, Shimabukuro-Vornhagen A, Theurich S, Kochanek M, Weber T, Wennhold K, *et al.* A multimerized form of recombinant human CD40 ligand supports long-term activation and proliferation of B cells. *Cytotherapy* 2014; 16(11): 1537-44.
 - 19- Haswell LE, Glennie MJ, Al-Shamkhani A. Analysis of the oligomeric requirement for signaling by CD40 using soluble multimeric forms of its ligand, CD154. *Eur J Immunol* 2001; 31(10): 3094-100.
 - 20- Kilinc MO, Mukundan L, Yolcu ES, Singh NP, Suttles J, Shirwan H. Generation of a multimeric form of CD40L with potent immunostimulatory activity using streptavidin as a chaperon. *Exp Mol Pathol* 2006; 80(3): 252-61.
 - 21- Song W, Levy R. Therapeutic vaccination against murine lymphoma by intratumoral injection of naive dendritic cells. *Cancer Res* 2005; 65(13): 5958-64.
 - 22- Contin C, Pitard V, Itai T, Nagata S, Moreau JF, Déchanet-Merville J. Membrane-anchored CD40 Is Processed by the Tumor Necrosis Factor- α -converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem* 2003; 278(35): 32801-9.
 - 23- Croft M, Benedict CA, Ware CF. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12(2): 147-68.
 - 24- Kornbluth RS. Nucleic Acids Encoding Multimeric Fusion Proteins of TNF Superfamily Ligands [US20090263348 A1]. Google Patents; 2009.
 - 25- Schuchmann M, Hess S, Bufler P, Brakebusch C, Wallach D, Porter A, *et al.* Functional discrepancies between tumor necrosis factor and lymphotoxin α explained by trimer stability and distinct receptor interactions. *Eur J Immunol* 1995; 25(8): 2183-9.
 - 26- Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(1): 58-68.
 - 27- Chen C. Challenges and opportunities of monoclonal antibody manufacturing in China. *Trends in Bio/Pharmaceutical Industry* 2009; 5(3): 28-33.
 - 28- Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, *et al.* Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol* 2003; 23(4): 1428-40.
 - 29- Jiang YF, He Y, Gong GZ, Chen J, Yang CY, Xu Y. Construction of recombinant eukaryotic expression plasmid containing murine CD40 ligand gene and its expression in H22 cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11(2): 182-6.
 - 30- Stone GW, Barzee S, Snarsky V, Kee K, Spina CA, Yu X-F, *et al.* Multimeric soluble CD40 ligand and GITR ligand as adjuvants for human immunodeficiency virus DNA vaccines. *J Virol* 2006; 80(4): 1762-72.
 - 31- Kornbluth RS. Nucleic acids encoding multimeric proteins of TNF superfamily ligands [US7332298 B2]. Google Patents; 2008.

Original Article

Cloning and Expression of Recombinant Human CD40L in HEK293 Cell line

Shokoochian B.¹, Sharifi Z.¹, Mohammadi Pour M.¹, Yari F.¹

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

CD40L is a membrane protein and a member of the tumor necrosis factor super family (TNFSF) that plays an important role in transferring cell signaling in innate and adaptive immunity. Since this protein plays its role through clustering the receptors on the target cell surface, it seems that the multimeric form of this molecule can have a stronger effect than the natural trimeric form. So in this study we describe cloning and expression of dodecameric soluble CD40L through self multimerizing protein, surfactant protein D (SP-D), in the HEK293 cell line.

Materials and Methods

In this experimental study, the SPD-CD40L was designed in silico and cloned in pcDNA3.1(+) plasmid. HEK293 cells were transfected and used as the expression host cells. The expression of SPD-CD40L was determined at the RNA level by RT-PCR method. After the purification of the recombinant proteins by affinity chromatography, the molecular weight of the recombinant protein was determined by SDS-PAGE. To evaluate the specificity of protein, ELISA and Dot Blot were used.

Results

The results indicated that HEK293 cells were transfected and recombinant protein was expressed 24 and 48 hours after Transfection. Moreover, the results of ELISA and Dot Blot methods represented the specificity of recombinant SPD-CD40L chimeric protein.

Conclusions

Chimeric protein SPD-CD40L was expressed successfully by pcDNA3.1(+) in eukaryotic HEK293 cell line and the molecular weight of 4-trimeric (dodecameric) protein was shown to be consistent with the expected amount.

Key words: CD40 Ligand, HEK293 Cells, Transfection

Received: 15 Apr 2017

Accepted: 13 Jun 2017

Correspondence: Yari F., PhD of Immunology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.

P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052237; Fax: (+9821) 88601555

E-mail: f.yari@ibto.ir