Downloaded from bloodjournal.ir at 21:28 +0430 on Wednesday June 20th 2018

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۴ شماره ۳ پاییز ۹۶ (۲۳۶-۲۲۷)

مقاله پژوهشی

همسانه‌سازی و بیان ژن نوترکیب CD40L انسانی در رده سلولی HEK293

بهاره شکوهیان[۱]، زهره شریفی[۲]، مهشید محمدی‌پور[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 جایی‌که این پروتئین نقش خود را از طریق تجمع گیرنده در سطح سلول هدف ایفا می‌کند، به نظر می‌رسد فرم مالتی‌مری آن بتواند اثر قوی‌تری نسبت به فرم طبیعی ترایمری ایجاد کند. بر این اساس در این مطالعه کلونینگ و بیان فرم کایمری و دودکامری CD40L محلول، از طریق پروتئین خود مالتی‌مر 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 نوترکیب در سطح RNA به وسیله RT-PCR بررسی شد. پس از تخلیص پروتئین نوترکیب 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 نوترکیب پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان ترانسفکشن بود. هم چنین نتایج حاصل از روش ELISA و Dot Blot بیانگر اختصاصیت پروتئین کایمری SPD-CD40L بود.

نتیجه گیری

پروتئین کایمری SPD-CD40L از طریق وکتور بیانی pcDNA3.1(+) در رده سلولی یوکاریوتی HEK293 به‌طور موفقیت‌آمیز بیان شد و وزن مولکولی پروتئین ۴-ترایمری(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 ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- PhD ویروس‌شناسی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- PhD ژنتیک مولکولی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- مؤلف مسئول:PhD ایمنی‌شناسی پزشکی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

Downloaded from bloodjournal.ir at 21:28 +0430 on Wednesday June 20th 2018

مقدمه

CD40 لیگانـــــد(CD40L ، CD145 ، gp39 ، HIGM1 ، IMD3 و TNFSF5) یک پروتئین غشـایی تیـپ II ۳۹ کیلـو دالتـونی اسـت کـه بـه خـانواده فـاکتور نکـروز تومـوری (TNFSF) تعلق داشته و سهم زیادی در انتقال پیـام سـلولی در ایمنی ذاتی و تطبیقـی دارا مـی‌باشـد(۱). ایـن پـروتئین توسـط انـواعی از سـلول‌هـا هـم چـون لنفوسـیت B و T پلاکت‌های فعال شده، مونوسـیت، سـلول‌هـای دنـدرتیک، ماکروفاژهـا، بیـان مـی‌شـود(۳، ۲). ژن *CD40L* بـر روی کرومـوزوم X واقـع شـده و یـک گلیکـوپروتئین ۲۶۱ اسیدآمینه‌ای را کد می‌کند کـه در فـرم غشـایی شـامل سـه دومین می‌باشد. چنانچـه CD40L غشـایی از متیـونین ۱۱۳ (Met113) دومـین خـارج سـلولی شکسـته شـود، CD40L محلول یا sCD40L ایجاد می‌گردد. CD40L فعـال، چـه بـه فرم غشایی و چه به فرم محلول، سـاختاری هومـوترایمری دارد، این ساختار مالتی‌مری نقش مهمی در برهمکنش مؤثر بـا CD40 و پیـام‌دهـی سـلولی متعاقـب آن دارد(۴، ۲). برهمکنش CD40-CD40L بـرای پاسـخ وابسـته بـه T-cell لنفوسیت‌های B به آنتی‌ژن‌ها، ایجاد سلول‌های B خـاطره و پلاسماسـل و القـای تولیـد آنتـی‌بـادی IgG ، افـزایش شکل‌گیری مراکز زایا در هماهنگی با سلول‌های T ضروری است. به علاوه ردپـای سیسـتم دوتـایی CD40-CD40L در بسـیاری از بیمـاری‌هـا از جملـه بیمـاری‌هـای التهـابی روده(IBD)، پیشرفت عفونت HIV و التهاب عصبی وابسـته بـه HIV ، انـواع سـرطان‌هـا، آترواسـکلروزیس، لوپـوس، درماتومیوزیس و آلزایمر دیده می‌شود(۱۰–۵، ۱). در واقـع برهمکنش CD40 و CD40L با فراهم کردن سیگنال ثانویـه مورد نیاز، منجر به آغـاز پاسـخ ایمنـی هومـورال و پاسـخ ایمنی با واسطه سلولی می‌گردد(۱۱، ۷). ایـن حقیقـت کـه CD40L قادر به القای تکثیر و تمایز لنفوسیت‌هـای B و T است، در مطالعه‌های بسیاری بـه اثبـات رسیـده است (۱۷–۱۲، ۷). اما اخیراً چندین بررسـی آزمایشـگاهی تـأثیر چند برابری فرم مالتی‌مری CD40L نوترکیـب را بـر القـای ایمنی هومورال و سلولی نشان داده‌اند(۲۱–۱۸).

تولید فرم محلول پـروتئین‌هـای TNFSF ، بسـیار حـائز اهمیـت اسـت، زیـرا بـررسی این پروتئین‌ها و گیرنده‌های اختصاصی آن‌ها در فـرم غشـایی پیچیـدگی‌هـای بسـیاری داشته و به دلیل وجود عوامل مداخله‌گـر، تفسـیر نتـایج را غیر ممکن می‌سازد. بـه عـلاوه فـرم‌هـای محلـول چنـدین پروتئین از این خانواده کاربرد درمانی دارد(۲۴–۲۲).

به منظور تولید پروتئین‌های محلول از خـانواده TNF دو راه وجود دارد: می‌توان فرم غشایی را تولید کرد و پـس از آن با اثر دادن پروتئاز، بخش خارج سـلولی پـروتئین را در محیط آزاد ساخت، و یا تنهـا بخـش خـارج غشـایی را بـه همراه یک توالی راهنما کلون و سنتز کرد. در هر دو حالت، فرم محلول پروتئین‌های TNFSF که هموترایمرهـای تکـی هستند، ناپایدار خواهند بود(۲۵).

روشی که به طور معمول برای حـل مشـکل ناپایـداری پروتئین‌های مالتی‌مری در فرم محلول استفاده می‌شـود، بـه کارگیری پروتئین مـورد نظـر در کنـار یـک قطعـه از یـک پروتئین دیگر که دارای توانایی دایمر و یا مالتی‌مر شدن بـه طور خودبـه‌خـودی مـی‌باشـد، اسـت(۲۴). از جملـه ایـن پروتئین‌های خود مالتی‌مر شـونده سـورفکتانت پـروتئین D (SP-D) می‌باشد. SP-D یک لکتین تیپ C است کـه توسـط سلول‌های اپیتلیال(عمـدتاً سـلول‌هـای اپیتلیـال ریـه) بیـان می‌شود. این پروتئین به شـکل دودکـامری(Dodecameric) متشکل از چهـار زیـر واحـد ترایمـری مـی‌باشـد(۲۶). بـا جایگزین کردن دومین خارج سلولی(ECD) پـروتئین‌هـای خـانواده TNF بـا ناحیـه لکتینـی مـی‌تـوان پـروتئین‌هـای دودکامری ایجاد کرد.

با توجه به این که بیشـتر اعضـای خـانواده TNS نقـش درمانی داشته و تولید آن‌ها به شکل پروتئین‌های محلـول و مالتی‌مری امکان‌پذیر و مـؤثر مـی‌باشـد، بررسـی و مطالعـه چگونگی طراحی و ساخت پروتئین‌های مالتی‌مری اهمیـت پیدا می‌کند و این اهمیت با توجه به مطالعه‌های محـدودی که در زمینـه سـاخت پـروتئین‌هـای مـالتی‌مـری در ایـران صورت گرفته، پررنگ‌تر مـی‌شـود. در میـان اعضـای ایـن خانواده، نقش کلیدی پروتئین CD40L در انواع زمینـه‌هـای تشخیصی و درمانی از جمله کنترل التهاب، تولیـد واکسـن، درمان سرطان و افزایش بازده تولید آنتی‌بادی و هـم چنـین عدم تولید این پروتئین در ایران، ما را برآن داشت تا شـکل دودکـــامری CD40L محلـــول را از طریـــق پـــروتئین

Downloaded from bloodjournal.ir at 21:28 +0430 on Wednesday June 20th 2018

مالتی‌مرکننده 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 آمینو اسیدی 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 (اسیدآمینه‌های ۴۷ تا ۲۶۱) با ناحیه لکتینی سورفکتانت پروتئین D (اسیدآمینه‌های ۲۶۲ تا ۳۷۵)، توالی اولیه پروتئین به طول ۴۷۲ اسیدآمینه طراحی شد. سپس ساختمان سوم پروتئین کایمری SPD-CD40L توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی تایید شده و توالی نوکلئوتیدی آن توسط شرکت ژن‌کاست (لوگزامبورگ) ساخت و در حامل پلاسمیدی pcDNA3.1(+) قرار گرفت.

آماده‌سازی پلاسمید نوترکیب 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. سوسپانسیون باکتریایی حاصل بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت µg/mL ۱۰۰ پخش شده و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

پلاسمید pcDNA3.1(+) با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت وایوژن (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 نوترکیب pcDNA–SPD-CD40L با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده HindIII و EcoRI و طبق دستورالعمل شرکت سازنده آنزیم‌ها(فرمنتاز، 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 CO_2 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 $۵×۱۰^۵$ 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. X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent ۶ µL (Cat. NO. 06366236001) محصول شرکت رُوش 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 نوترکیب به محیط کشت سلول‌ها اضافه شده و پلیت به مدت ۶ ساعت در

Downloaded from bloodjournal.ir at 21:28 +0430 on Wednesday June 20th 2018

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 نوترکیب:

استخراج RNA:

استخراج RNA از سلول‌های HEK293 تراریخت شده پس از جمع‌آوری مایع رویی سلول‌ها، با استفاده از محلول ترایزول TriPure Isolation Reagent (رُوش، 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 RNA ۴/۵ µg 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 فسفاته (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 برروی ژل آگارز ۲٪ مشاهده و بررسی گردید(جدول ۱).

آزمایش SDS-PAGE:

به منظور تایید بیان و بررسی وزن مولکولی پروتئین SPD-CD40L ، پس از تخلیص پروتئین از محیط کشت سلول‌های HEK293 ۲۴ و ۴۸ ساعته به‌وسیله ستون کروماتوگرافی تمایلی که حاوی آنتی‌بادی اختصاصی Anti-CD40L (ابکم، کمبریج، Cat. NO. ab47204) تثبیت شده بود، آزمایش SDS-PAGE در سیستم بافری ناپیوسته شامل ژل متراکم کننده و ژل جداکننده ۱۲٪ انجام شد. نمونه‌ها پس از سانتریفیوژ، 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 نوترکیب SPD-CD40L با استفاده از روش الایزا بررسی شد. به این منظور ۵۰ µL SPD-CD40L تخلیص شده از مایع‌رویی 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 هرکدام افزوده و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. پس‌از 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 ۰/۰۵٪ PBS-T (PBS + Tween20) شستشو شدند و ۵۰ µL از کونژوگه 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.

Downloaded from bloodjournal.ir at 21:28 +0430 on Wednesday June 20th 2018

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

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

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 الایزا 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 (رُوش، 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 Lumineseence) باعث ایجاد سیگنال قابل مشاهده از طریق دستگاه تصویربرداری مولکولی گردید.

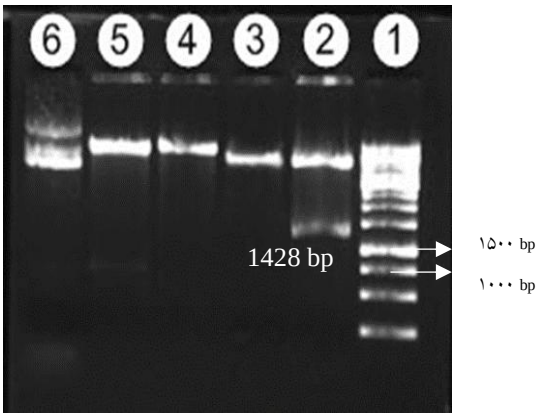
یافته‌ها

بررسی صحت همسانه‌سازی:

وکتور پلاسمیدی نوترکیب pcDNA–SPD-CD40L با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر 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).

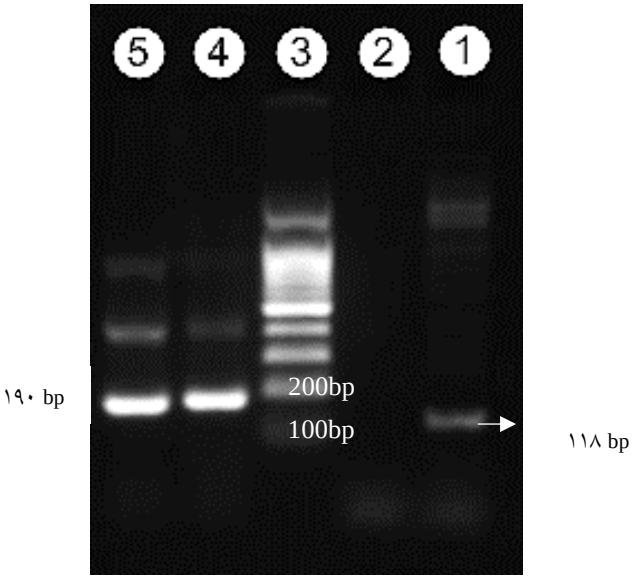
بررسی بیان در سطح RNA:

به منظور مشاهده قطعات مورد انتظار در نتیجه تکثیر 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 باند ۱۹۰ جفت بازی حاصل تکثیر cDNA سلول‌های آزمایش و کنترل با آغازگرهای بتااکتین نشان‌دهنده کیفیت cDNA بود، به علاوه وجود باند ۱۱۸ جفت بازی محصول تکثیر ناحیه داخلی ژن کدکننده SPD-CD40L در سلول‌های HEK293 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و عدم مشاهده این باند 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 ، 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.

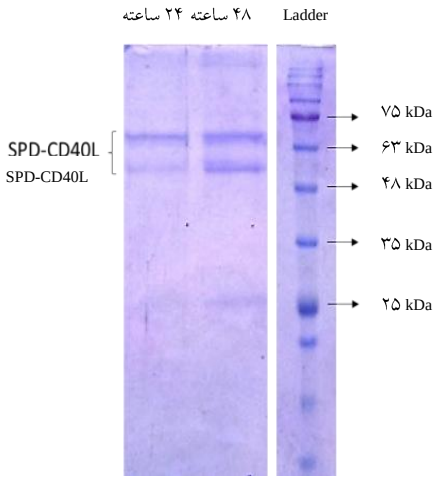
Downloaded from bloodjournal.ir at 21:28 +0430 on Wednesday June 20th 2018



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR. ستون ۳ مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی می‌باشد. در ستون ۱ و۲ 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(شکل۳). باندهای ۵۸ و ۶۴ کیلودالتونی نشان‌دهنده سطوح مختلف گلیکوزیلاسیون پروتئین نوترکیب می‌باشند. اختصاصیت پروتئین نوترکیب SPD-CD40L با استفاده از روش الایزا تایید 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 اختصاصی و ویژگی آنتی‌ژن نوترکیب SPD-CD40L بود(جدول ۲). آزمایش دات بلات به‌منظور بررسی وجود و اختصاصیت پروتئین موردنظر 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.

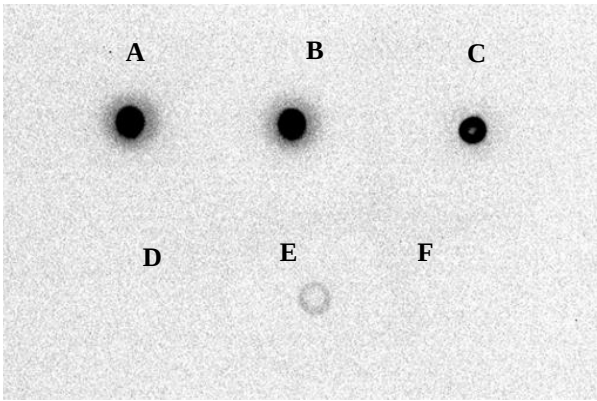


شکل ۳ : SDS-PAGE پروتئین نوترکیب SPD-CD40L در ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲٪. ستون سمت راست نشان‌دهنده مارکر وزن مولکولی است. ستون وسط نشان‌دهنده SPD-CD40L تخلیص شده از مایع رویی سلول‌های HEK293 پس از کشت ۴۸ ساعته و ستون سمت چپ نشان‌دهنده SPD-CD40L تخلیص شده از مایع رویی سلول‌های HEK293 پس از کشت ۲۴ ساعته می‌باشد.

جدول ۲: نتایج الایزا پروتئین نوترکیب SPD-CD40L

نمونه	OD (۴۵۰ nm)
PBS	۰/۰۹۸ ± ۰/۰۳۱
HCG	۰/۰۵۶ ± ۰/۰۱۱
کنترل مثبت	۰/۸۵۱ ± ۰/۰۸۴
SPD-CD40L 48 hour	۰/۶۳۸ ± ۰/۰۶۱
SPD-CD40L 24 hour	۰/۲۶۲ ± ۰/۰۳۸

Downloaded from bloodjournal.ir at 21:28 +0430 on Wednesday June 20th 2018



شکل ۴: آزمایش دات بلات پروتئین نوترکیب SPD-CD40L. نقطه A نشان‌دهنده نمونه CD40L تخلیص شده از کنسانتره پلاکتی می‌باشد که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است. نقاط B و C نشان‌دهنده SPD-CD40L نوترکیب 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 SPD-CD40L با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی طراحی شده و توالی نوکلئوتیدی آن ساخت و در پلاسمید pcDNA3.1(+) همسانه‌سازی شد. سلول‌های HEK293 به عنوان میزبان بیانی مورد استفاده قرارگرفته و ترانسفکت شدند. بیان CD40L نوترکیب در سطح RNA توسط RT-PCR بررسی شد. پس از تأیید بیان در سطح RNA ، تخلیص پروتئین نوترکیب با روش کروماتوگرافی تمایلی صورت گرفت و وزن مولکولی پروتئین نوترکیب توسط SDS-PAGE تعیین گردید. به منظور بررسی اختصاصیت پروتئین نیز از آزمون‌های ELISA و Dot Blot استفاده شد.

ایجاد لنفوسیت‌های B فعال همواره از جنبه‌های مختلف حائز اهمیت بوده است. عده‌ای از محققان با هدف تبدیل لنفوسیت B به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن فعال در 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 لنفوسیت‌های 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 منومرهای 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 نوترکیب مالتی‌مری را نشان دادند. اولین پروتئین تولیدی آن‌ها یک ترایمر تکی از بخش خارج سلولی CD40L و دیگری پروتئین ۴- ترایمری 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 ترایمری در فعال‌کردن لنفوسیت‌های 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 به‌نظر 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-ترایمری تشکیل شده از Acrp30 و بخش خارج سلولی CD40L بود. این پروتئین هگزامری اثری کمتر از فرم دودکامری اما بیشتر از شکل ترایمری پروتئین CD40L داشت(۲۸).

در سال ۲۰۰۵ جیانگ و همکارانش با انتقال ژن

Downloaded from bloodjournal.ir at 21:28 +0430 on Wednesday June 20th 2018

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

در سال ۲۰۰۶ استون و همکارانش هر دو شکل ۲- ترایمری و ۴- ترایمری 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 مطالعه حاضر اولین مرحله در راستای رسیدن به سوی هدف مذکور است. بنابراین مقایسه اثر CD40L مالتی‌مری 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- ترایمری(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.

References:

1- Kornbluth RS. The emerging role of CD40 ligand in HIV infection. J Leukoc Biol 2000; 68(3): 373-82.
2- 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.
3- Galicia López A, Olguín 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]
4- 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.
5- Danese S, Sans M, Fiocchi C. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. Gut 2004; 53(7): 1035-43.
6- 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.
7- 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.
8- Antoniades C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40

Downloaded from bloodjournal.ir at 21:28 +0430 on Wednesday June 20th 2018

ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. J Am Coll Cardiol 2009; 54(8): 669-77.
9- Daoussis D, Andonopoulos AP, Liossis 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, Nikougoftar 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-alpha-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.

Downloaded from bloodjournal.ir at 21:28 +0430 on Wednesday June 20th 2018

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2017; 14(3): 227-236

Original Article

Cloning and Expression of Recombinant Human CD40L in HEK293 Cell line

Shokoohian B.[1], Sharifi Z.[1], Mohammadi Pour M.[1], Yari F.[1]

[1]*Blood 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*