

همسانه سازی و بیان ژن نو ترکیب CD40L انسانی در رده سلولی HEK293

بهاره شکوهیان^۱، زهره شریفی^۲، مهشید 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 می کند، به نظر می رسد فرم مالتی مری آن بتواند اثر قوی تری نسبت به فرم طبیعی تراپیری ایجاد کند. بر این اساس در این مطالعه کلونینگ و بیان فرم کایمری 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 روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پروتئین SPD-CD40L به صورت *in silico* طراحی و در پلاسمید (+)pcDNA3.1 همسانه سازی شد. سلول های 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 روش های ELISA و Dot Blot استفاده شد.

یافته ها

نتایج به دست آمده نشان دهنده ترانسفکشن سلول های 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 کایمری SPD-CD40L بود.

نتیجه گیری

پروتئین کایمری SPD-CD40L از طریق وکتور بیانی (+)pcDNA3.1 در رده سلولی یوکاریوتی HEK293 به طور موفقیت آمیز بیان شد و وزن مولکولی پروتئین ۴-تراپیری (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 ویروس شناسی - 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 ایمنی شناسی پزشکی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی:

۱۱۵۷-۱۴۶۵

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 می باشد (۱). این پروتئین توسط انواعی از سلول ها هم چون لنفوسیت B و T پلاکت های فعال شده، مونوسیت، سلول های دندریتیک، ماکروفاژها، بیان می شود (۳، ۲). ژن CD40L بر روی کروموزوم X واقع شده و یک گلیکوپروتئین ۲۶۱ اسید آمینه ای را کد می کند که در فرم غشایی شامل سه دومین می باشد. چنانچه CD40L غشایی از متیونین ۱۱۳ (Met113) دومین خارج سلولی شکسته شود، CD40L محلول یا sCD40L ایجاد می گردد. 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 پیام دهی سلولی متعاقب آن دارد (۴، ۲). برهمکنش CD40-CD40L برای پاسخ وابسته به T-cell لنفوسیت های B به آنتی ژن ها، ایجاد سلول های B خاطره و پلاسماسل و القای تولید آنتی بادی IgG، افزایش شکل گیری مراکز زایا در هماهنگی با سلول های T ضروری است. به علاوه رد پای سیستم دوتایی CD40-CD40L در بسیاری از بیماری ها از جمله بیماری های التهابی روده (IBD)، پیشرفت عفونت HIV و التهاب عصبی وابسته به HIV، انواع سرطان ها، آترواسکلروزیس، لوپوس، درماتومبوزیس و آلزایم دیده می شود (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 می گردد (۱۱، ۷). این حقیقت که CD40L قادر به القای تکثیر و تمایز لنفوسیت های B و T است، در مطالعه های 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 داده اند (۲۱-۱۸).

تولید فرم محلول پروتئین های TNFSF، بسیار حائز اهمیت است، زیرا بررسی این پروتئین ها و گیرنده های

اختصاصی آن ها در فرم غشایی پیچیدگی های بسیاری داشته و به دلیل وجود عوامل مداخله گر، تفسیر نتایج را غیر ممکن می سازد. به علاوه فرم های محلول چندین پروتئین از این خانواده کاربرد درمانی دارد (۲۴-۲۲).

به منظور تولید پروتئین های محلول از خانواده TNF دو راه وجود دارد: می توان 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 پروتئین های TNFSF که هموترایمرهای تکی هستند، ناپایدار خواهند بود (۲۵).

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

با توجه به این که بیشتر اعضای خانواده TNS نقش درمانی داشته و تولید آن ها به شکل پروتئین های محلول و مالتی مری امکان پذیر و مؤثر می باشد، بررسی و مطالعه چگونگی طراحی و ساخت پروتئین های مالتی مری اهمیت پیدا می کند و این اهمیت با توجه به مطالعه های محدودی که در زمینه ساخت پروتئین های مالتی مری در ایران صورت گرفته، پررنگ تر می شود. در میان اعضای این خانواده، نقش کلیدی پروتئین CD40L در انواع زمینه های تشخیصی و درمانی از جمله کنترل التهاب، تولید واکسن، درمان سرطان و افزایش بازده تولید آنتی بادی و هم چنین عدم تولید این پروتئین در ایران، ما را بر آن داشت تا شکل دودکامری CD40L محلول را از طریق پروتئین

مالتی مرکب سورهفکانت پروتئین D تولید و در سلول های بیانی یوکاریوتی HEK293 بیان کنیم.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.

طراحی و ساخت ژن SPD-CD40L:

به منظور طراحی سازه کایمری توالی آمینو اسیدی سورفکانت 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 آمینه های ۴۷ تا ۲۶۱) با ناحیه لکتینی سورفکانت پروتئین D (اسید آمینه های ۲۶۲ تا ۳۷۵)، توالی اولیه پروتئین به طول ۴۷۲ اسید آمینه طراحی شد. سپس ساختمان سوم پروتئین کایمری SPD-CD40L توسط نرم افزارهای بیوانفورماتیکی تایید شده و توالی نوکلئوتیدی آن توسط شرکت ژن کاست (لوگزامبورگ) ساخت و در حامل پلاسمیدی pcDNA3.1(+) قرار گرفت.

آماده سازی پلاسمید نو ترکیب و تراریختی سلول های بیانی یوکاریوتی:

کشت شبانه باکتری *E.coli* سویه Top10 در ۵ mL از محیط مایع LB (Lysogeny Broth) با گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه (rpm) انجام شد. سپس محیط کشت باکتری ها 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 آماده سازی سلول های *E.coli* جهت پذیرش پلاسمید، تراریختی سلول های مستعد به روش شوک حرارتی انجام گرفت. سوپانسیون باکتریایی حاصل بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ µg/mL پخش شده و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

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 همسانه سازی ژن هدف در حامل pcDNA3.1(+)، از روش توالی یابی (sequencing) و بررسی الگوی هضم آنزیمی (digestion pattern) استفاده شد. حامل پلاسمیدی نو ترکیب pcDNA-SPD-CD40L با استفاده از آنزیم های محدود کننده HindIII و EcoRI و طبق دستورالعمل شرکت سازنده آنزیم ها (فرمتاز، انگلستان) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت هضم شد. محصول واکنش هضم، با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ بررسی گردید.

کشت و نگهداری سلول های HEK293:

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

ترانسفکشن سلول های HEK293 و جمع آوری محلول رویی:

سلول ها روز قبل از ترانسفکشن شمارش شده و تعداد ۵×۱۰^۵ سلول به هر چاهک از پلیت ۶ خانه ای اضافه شد. ۲ µg پلاسمید استخراج شده حاوی قطعه ژن مورد نظر (معادل ۱۰ µL) به ۱۹۰ µL محیط کشت فاقد FBS و آنتی بیوتیک پنی سیلین - 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 سلول ها اضافه شده و پلیت به مدت ۶ ساعت در

انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. سپس محیط کشت رویی خارج شده و محیط کشت جدید حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین - استرپتومایسین به سلول ها اضافه شد. سلول ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند.

بررسی و تأیید بیان پروتئین نو ترکیب:

استخراج RNA:

استخراج RNA از سلول های HEK293 تراریخت شده پس از جمع آوری مایع رویی سلول ها، 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 نسخه برداری 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 سانتی گراد قرار گرفت و سپس به آن بافر، آنزیم نسخه بردار 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 واکنش های 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 سلول های HEK293 ۲۴ و ۴۸ ساعته به وسیله ستون کروماتوگرافی تمایلی که حاوی آنتی بادی 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. نمونه ها پس از سانتیفیوژ، به وسیله سرنگ همپلتون در کنار شاخص وزن مولکولی به چاهک های ژل منتقل شدند. بعد از اتمام الکتروفورز به مدت ۲:۲۰ ساعت در اختلاف پتانسیل ۱۲۰ ولت، کاست حاوی ژل باز شد. ژل پلی آکریل آمید با استفاده از رنگ کوماسی بلو به مدت ۲ ساعت روی شیکر رنگ شده و پس از ۲ ساعت رنگ زدایی با محلول رنگ بر مورد بررسی قرار گرفت.

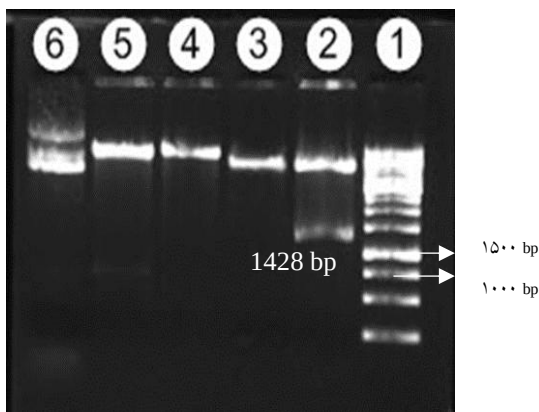
آزمایش الایزا:

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 چاهک های پلیت الایزا اضافه شد و پلیت به مدت یک شب در یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس خانه های 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 خانه ها، ۵۰ µL محلول آنتی بادی 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 سانتی گراد گرماگذاری شد. چاهک ها توسط محلول شستشو ۰/۰۵٪ 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 <i>SPD-CD40L</i>	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 باند ۱۹۰ جفت بازی حاصل تکثیر cDNA سلول‌های آزمایش و کنترل با آغازگرهای بتاکتین 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.

پس از شستشوی دوباره، ۵۰ μ L 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 μ L 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 (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 Luminescence) باعث ایجاد سیگنال قابل مشاهده از طریق دستگاه تصویربرداری مولکولی گردید.

یافته‌ها

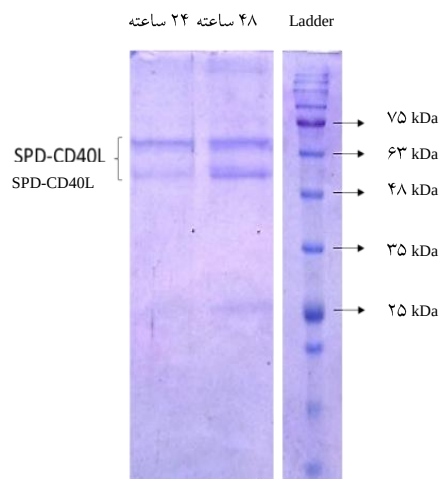
بررسی صحت همسانه‌سازی:

وکتور پلاسمیدی نوترکیب pcDNA-SPD-CD40L با استفاده از آنزیم‌های محدودالایر *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

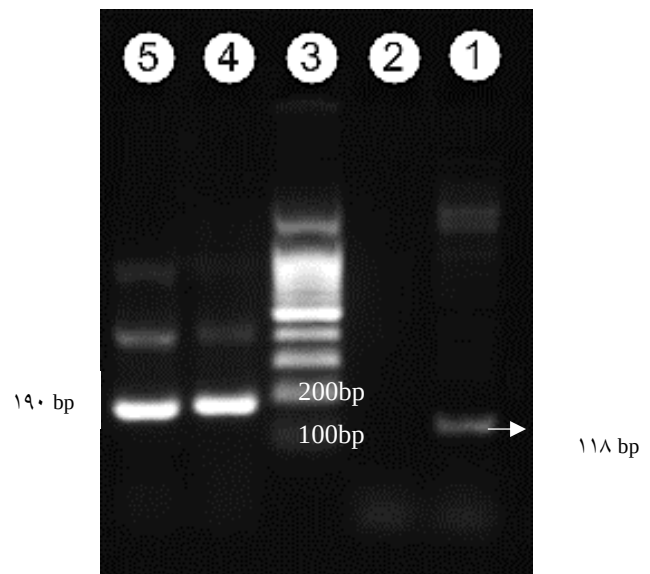
اختصاصی و ویژگی آنتی ژن نو ترکیب SPD-CD40L بود (جدول ۲). آزمایش دات بلات به منظور بررسی وجود و اختصاصیت پروتئین مورد نظر انجام شد. لکه های تیره مشخص شده در شکل ۴، نقاط واکنش مثبت سوسترای ECL با آنتی بادی کونژوگه با HRP را نشان می دهند. مشاهده این نقاط، تأییدی بر وجود و ویژگی پروتئین SPD-CD40L تخلیص شده از محیط کشت سلول های HEK293 می باشد.



شکل ۳: SDS-PAGE پروتئین نو ترکیب SPD-CD40L در ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪. ستون سمت راست نشان دهنده مارکر وزن مولکولی است. ستون وسط نشان دهنده SPD-CD40L تخلیص شده از مایع رویی سلول های HEK293 پس از کشت ۴۸ ساعته و ستون سمت چپ نشان دهنده SPD-CD40L تخلیص شده از مایع رویی سلول های HEK293 پس از کشت ۲۴ ساعته می باشد.

جدول ۲: نتایج الایزا پروتئین نو ترکیب SPD-CD40L

نمونه	OD (۴۵۰ nm)
PBS	0.098 ± 0.031
HCG	0.056 ± 0.011
کنترل مثبت	0.851 ± 0.084
SPD-CD40L 48 hour	0.638 ± 0.061
SPD-CD40L 24 hour	0.262 ± 0.038



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

بررسی بیان و اختصاصیت پروتئین SPD-CD40L:

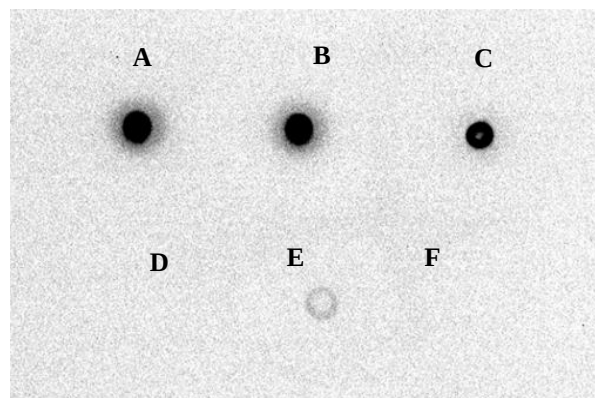
الکتروفورز پروتئین ها با استفاده از روش SDS-PAGE انجام شد. باندهای حاصل از الکتروفورز عمودی SPD-CD40L تخلیص شده از محیط کشت سلول های HEK293 به دست آمده از کشت ۲۴ و ۴۸ ساعته، با مطالعه های مشابه قبلی هم خوانی داشت (شکل ۳). باندهای ۵۸ و ۶۴ کیلو دالتونی نشان دهنده سطوح مختلف گلیکوزیلاسیون پروتئین نو ترکیب می باشند. اختصاصیت پروتئین نو ترکیب SPD-CD40L با استفاده از روش الایزا تایید شد. در این روش پس از اتصال پروتئین به کف پلیت و افزودن آنتی بادی اختصاصی (آنتی بادی Anti-CD40L)، آنتی بادی کونژوگه با HRP اضافه گردید که پس از مواجهه با سوسترای TMB سبب واکنش رنگزا شد. تشکیل محصول رنگی حاصل از واکنش آنزیمی، نشان دهنده 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 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 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 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 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 هگزامری 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 نوترکیب SP-D-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 SP-D-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 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 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

مطالعه حاضر اولین مرحله در راستای رسیدن به سوی هدف مذکور است. بنابراین مقایسه اثر CD40L مالتی مری نو ترکیب 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 نو ترکیب 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 دانشجوی 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 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- تراپیری و ۴- تراپیری CD40L را بیان کرده و به صورت *in vivo* مورد مطالعه قرار دادند، بررسی‌های وزن مولکولی پروتئین نو ترکیب 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 نو ترکیب (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:

- 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- Antoniadis 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, 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, Bousoulade 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- 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

Shokoohian 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