

کار آیی ترشح و گاما کربوکسیلاسیون فاکتور IX نو ترکیب انسانی در سلول های پایدار دروزوفیلا

سمیرا خلیل زاده^۱، جعفر وطن دوست^۲

چکیده

سابقه و هدف

فاکتور IX طی بلوغ خود در کبد، نیازمند کربوکسیلاسیون اسید آمینه های گلو تامیک در ناحیه گلا می باشد که در ترشح و فعالیت آن نقش دارد. با توجه به ناکارآمدی سیستم بیانی پستانداران در ترشح و گاما کربوکسیلاسیون کامل فاکتورهای انعقادی نو ترکیب و فعالیت بالاتر آنزیم گاما کربوکسیلاز در سامانه دروزوفیلا (S2)، مطالعه حاضر با هدف بررسی قابلیت این سامانه در گاما کربوکسیلاسیون و لذا ترشح و فعالیت فاکتور IX انجام شد.

مواد و روش ها

در این پژوهش تجربی، به دنبال ترآلایی سلول های S2 با وکتور pMT-hFIX، برای ارزیابی کمی بیان و فعالیت فاکتور IX از روش الایزا و aPTT و برای بررسی گاما کربوکسیلاسیون فاکتور IX از روش رسوب دهی پروتئین های محیط کشت به وسیله باریوم سیترات استفاده شد. نمونه ها در سه روز متوالی و با سه تکرار و توسط آزمون های واریانت آنوا و دانکن در سطح ۵٪ بررسی شدند.

یافته ها

نتایج آزمون انعقاد، ترشح فاکتور IX فعال توسط سلول های S2 پایدار را نشان داد. هم چنین ارزیابی کمی فاکتور IX در محیط کشت و لیز سلولی با الایزا، کارآیی ۹۴ درصدی ترشح را نشان داد. نتایج الایزا نیز در ارزیابی کمی فاکتور IX رسوب داده شده با باریوم سیترات نشان داد که حدود ۴۵٪ از فاکتور IX مترشحه از سلول های S2، کاملاً کربوکسیله اند.

نتیجه گیری

فعالیت فاکتور IX و رسوب آن توسط باریوم سیترات موید قابلیت سلول های S2 برخلاف سایر سلول های حشرات در گاما کربوکسیلاسیون فاکتور IX است. نتایج تحقیق، شواهد متقاعد کننده ای را فراهم می کند که گاما کربوکسیلاز دروزوفیلا، گاما کربوکسیلاسیون لازم که برای ترشح و فعالیت انعقادی فاکتور IX لازم است را انجام می دهد.

کلمات کلیدی: فاکتور IX انعقادی، هموفیلی B، گاما گلو تامیل کربوکسیلار، پپتیدگلا

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۴

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۱۷

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی - گروه زیست شناسی - دانشگاه حکیم سبزواری - سبزوار - ایران

۲- مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک مولکولی - استادیار دانشکده علوم پایه دانشگاه حکیم سبزواری - سبزوار - ایران

مقدمه

یکی از مشخص ترین تغییرات پس از ترجمه در پروتئین های وابسته به ویتامین K (Vitamin K-dependent, VKD)، گاما کربوکسیلاسیون ناحیه غنی از اسید آمینه های گلوتامات (Glu) و تبدیل آن ها به گاما کربوکسی گلوتامات یا گلا (Gla) می باشد (۱). ایجاد این رزیدوهای گاما کربوکسی گلوتامیک اسید، برعهده آنزیم گاما کربوکسیلاز است. تا پیش از این اعتقاد بر این بود که این آنزیم تنها در سیستم های بیانی پستانداران وجود دارد و سلول های حشرات از جمله سلول های S2 دروزوفیلایی، فاقد فعالیت گاما کربوکسیلازی هستند و یا آنزیم گاما کربوکسیلاز قابلیت شناسایی پروپیتید پروتئین های VKD را ندارد. بررسی های بعدی نشان داد که آنزیم گاما کربوکسیلاز علاوه بر مهره داران، در دو بی مهره دروزوفیلا ملانوگاستر و نوعی حلزون Molluscs متعلق به جنس Conus نیز وجود دارد (۲-۴).

یک تفاوت اصلی بین آنزیم دروزوفیلایی و انسانی این است که از انتهای کربوکسی، ۸۶ اسید آمینه کمتر از آنزیم انسانی دارد اما حذف آن اثری بر فعالیت آنزیم انسانی ندارد. هر چند سوبستراهای طبیعی آنزیم گاما کربوکسیلاز دروزوفیلایی تاکنون مشخص نشده است اما این آنزیم می تواند پروپیتید فاکتور IX و پروترومبین انسانی را به عنوان سوبسترا شناسایی و ناحیه گلای آن ها را کربوکسیله کند. حتی آنزیم گاما کربوکسیلاز دروزوفیلایی در شرایط *in vitro* دارای تمایل بالاتری برای شناسایی سوبستراهای واجد پروپیتید فاکتور IX و پروترومبین نسبت به حالت بدون پروپیتید است (۵). از طرفی نشان داده شده است که در شرایط و مقادیر یکسان، محصول کربوکسیله به دست آمده از آنزیم گاما کربوکسیلاز دروزوفیلا (dγC) حدود ۵ برابر آنزیم گاما کربوکسیلاز انسانی (hγC) است (۵). لذا به نظر می رسد گاما کربوکسیلاز از نظر خواص و مکانیسم کربوکسیلازی در مهره داران و بی مهره ها مشابه است و هر دو قادرند که سوبستراهای همدیگر را کربوکسیله کنند. هم چنین موتاسیون F16A باعث حذف کربوکسیلاسیون (کاهش ۹۰٪) به وسیله هر دو آنزیم کربوکسیلاز دروزوفیلا و انسانی می شود (۵). انتظار می رود سامانه بیانی S2 از

کارآیی بالایی برای کربوکسیلاسیون، ترشح و بازیافت فاکتورهای خونی وابسته به ویتامین K برخوردار باشد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی توانایی و کارآیی گاما کربوکسیلاسیون فاکتور IX انعقادی در سلول های S2 نسبت به سیستم های بیانی پستانداران بود.

مواد و روش ها

سوش باکتری، پلاسمیدها، سلول های S2:

در یک مطالعه تجربی، سوش DH5α باکتری *E.coli* (استراتژن - آمریکا) برای مراحل کلونینگ استفاده شد. کتابخانه cDNA کبدی برای جداسازی cDNA انسانی از شرکت MRC (انگلستان) خریداری گردید. پلاسمیدهای pMT-V5-HisA، pCoHygro و سلول های دروزوفیلایی شناسیدر ۲ (S2) از شرکت اینویتروزن (آمریکا) تهیه گردید.

محیط کشت، آنزیم ها، مواد شیمیایی و کیت ها:

محیط کشت LB (Luria-Bertani) به عنوان محیط کشت باکتری استفاده شد و آمپی سیلین (۱۰۰ µg/mL) محیط کشت) در صورت نیاز به وجود محیط کشت انتخابی استفاده شد. محیط کشت دروزوفیلایی (Schneider's Drosophila Medium)، پنی سیلین G، استرپتومایسین، هایگرومایسین و میتومایسین از شرکت سیگما (آلمان) خریداری گردید. اولیگونوکلوئوتیدها به وسیله شرکت بیونر (کره) ساخته شدند. همه آنزیم های مورد استفاده در هضم برشی و PCR و هم چنین کیت های تخلیص PCR، تخلیص پلاسمید و تهیه RNA از شرکت رُوش (آلمان) خریداری شد. کیت InstT/Aclone از شرکت فرمتاز، کیت الایزای مخصوص فاکتور IX و مواد مربوط به آزمون انعقاد یک مرحله ای از شرکت دیاگنوستیک (فرانسه) فراهم گردید. ویتامین K برای القا نیز از شرکت رُوش (آلمان) تهیه شد. هم چنین مارکر DNA و مارکر پروتئین از فرمتاز خریداری گردید.

ساخت سازه های بیانی:

به منظور ساخت پلاسمید بیان کننده فاکتور IX انسانی که به صورت اختصاصی در سلول های دروزوفیلا بیان

آرامی حرکت داده تا خوب مخلوط شود. پس از انجام ترآلایی سلول‌ها به مدت ۱۶-۶ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پس از آن محیط سلول‌ها با محیط تازه و گرم تعویض شد.

تهیه کلون‌های پایدار:

برای دستیابی به رده سلولی پایدار از سلول‌های S2، پلاسمید مورد نظر همراه با پلاسمید انتخابی pCoHygro ژن مقاومت به هایگرومایسین را دارد ترآلایی شد. به منظور انتخاب سلول‌های نو ترکیب، ۴۸ ساعت پس از ترآلایی، هایگرومایسین با غلظت ۳۰۰ µg/mL به محیط کشت سلول‌ها افزوده شد. ۷-۱۰ روز پس از تیمار با هایگرومایسین در سلول‌های ترآلوده شده، کلنی‌های مقاوم از طریق استفاده از میتومایسین جدا شدند. در این روش حدود ۱۵۰ میلیون سلول عادی ترآلوده نشده به مدت ۴ ساعت در مجاورت با میتومایسین قرار داده شدند. میتومایسین به طور کوالانته به DNA متصل شده و از تکثیر آن جلوگیری می‌کند هر چند که سلول‌ها زنده می‌مانند (۶، ۷). پس از سانتریفوژ و شستشو با PBS (Phosphate buffered Saline)، این سلول‌ها با تراکم 3×10^6 cell/mL در پلیت‌های ۲۴ خانه منتقل شدند. از طرفی سلول‌های ترآلوده شده مخلوط سلولی پایدار به گونه‌ای رقیق‌سازی شدند که در هر ۱۰۰ میکرولیتر، به طور میانگین تنها یک سلول وجود داشته باشد. این مقدار به سلول‌های عادی ترآلوده نشده و تیمار شده با میتومایسین در پلیت ۲۴ خانه اضافه می‌شوند. بعد از ۲ هفته از کشت سلول‌ها در محیط واجد هایگرومایسین، سلول‌های پایدار که از یک کلون رشد کرده‌اند از نظر بیان و فعالیت فاکتور IX بررسی و به پلیت ۱۲ و ۶ خانه منتقل شدند.

ارزیابی بیان و فعالیت فاکتور IX نو ترکیب:

به منظور بررسی وجود فاکتور IX در محیط کشت سلول‌های ترآلوده شده، محیط کشت سلول‌ها در روزهای اول، دوم و سوم پس از افزودن ویتامین K1 (۵۰۰ µg/mL) و القا با سولفات مس (۵۰۰ µg/mL)، جمع‌آوری شد و پس از سانتریفوژ، محلول رویی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز

گردد، از پلاسمید pMT-V5-His A با طول ۳۵۳۸ جفت باز استفاده شد. برای انتقال cDNA فاکتور IX به داخل این وکتور بیانی لازم بود که جایگاه‌های برشی مناسب در دو انتهای cDNA قرار داده شود. لذا با استفاده از دو آغازگر hFIX-KpnI (5'GGG GTAC/ CGC CAC CAT GCA) و hFIX-XhoI (3'CCGC/ TCG) و (GCG CGT GAAC 3' cDNA (AGA TCC ATC TTT CAT TAA GTG AGC3' فاکتور IX با انتهای دلخواه از کتابخانه cDNA کبد، pfu-PCR گردید. محصول cDNA به دست آمده بعد از استخراج از ژل و آدنیله کردن، در T- وکتور، سلول‌های دنبال واکنش الحاق محصول PCR به T- وکتور، سلول‌های پذیرای DH5α با پلاسمید نو ترکیب ترانسفورم شدند. بعد از استخراج و برش پلاسمید حاصله (T.V-hFIX) با آنزیم‌های XhoI و KpnI، خروج cDNA فاکتور IX، تخلیص از ژل و هم چنین برش پلاسمید pMT-V5-His A با آنزیم‌های XhoI و KpnI، عمل اتصال بین cDNA و پلاسمید pMT-V5-His A صورت گرفت که منجر به ساخت پلاسمید pMT-hFIX گردید.

کشت سلول و ترآلایی:

کشت سلول‌های S2 در محیط کشت اختصاصی آن با تراکم ۱ تا ۲ میلیون سلول به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت انجام شد. سلول‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و بدون CO₂ قرار داده شدند و هر چهار الی پنج روز، پاساژ داده می‌شد. ترآلایی سلول‌های S2 با روش کلسیم فسفات انجام شد. ۲۴ ساعت قبل از ترآلایی، ۳ میلی‌لیتر از سلول‌ها با تراکم سلولی 10^6 سلول برای هر میلی‌لیتر به ظرف کشت ۶ خانه‌ای منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. قبل از ترآلایی، ۳۰۰ میکرولیتر از مخلوط ترآلایی شامل ۳۶ میکرولیتر از CaCl₂ دو مولار، ۱۰-۵ میکروگرم از DNA و آب تزریقی در یک لوله استریل فراهم شد. سپس یک حجم از این مخلوط با یک حجم از HEPES 2x قطره قطره خوب مخلوط و تا ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. به ازای هر ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت، ۰/۲ میلی‌لیتر از مخلوط ترآلایی به محیط کشت سلولی اضافه شد و به

آنالیز آماری:

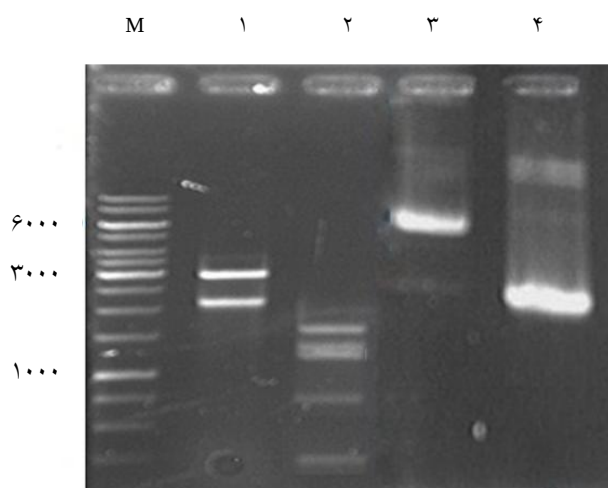
همه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام شد.

یافته‌ها

ساخت سازه‌های بیانی:

بعد از کلونینگ cDNA فاکتور IX در T- وکتور و ساب کلونینگ آن در وکتور A PMT-V5-His، پلاسمید نوترکیب pMT-hFIX ایجاد شد. پلاسمید نوترکیب حاصل به شکل سوپرکویل سنگین‌تر از A PMT-V5-His حرکت می‌کند که مؤید کلون شدن قطعه مذکور در PMT-V5-His A است.

صحت کلون شدن قطعه مذکور با استفاده از برش پلاسمید pMT-hFIX با آنزیم‌های Hind III و DraI نیز تایید شد (نمودار ۱). برای بررسی عدم وجود جهش در فاکتور IX کلون شده در A PMT-V5-His، این پلاسمید با استفاده از یک جفت آغازگر عمومی promoter T7 و BGH-r از داخل وکتور تعیین توالی گردید. بررسی توالی نشان‌دهنده صحت کلونینگ و عدم وجود جهش در فاکتور IX بود.



نمودار ۱: تایید کلون شدن قطعه cDNA فاکتور IX با استفاده از برش پلاسمید pMT-hFIX با آنزیم‌های DraI (ردیف ۱) و Hind III (ردیف ۲). الگوی حرکتی پلاسمید A PMT-V5-His (ردیف ۳) و پلاسمید نوترکیب pMT-hFIX (ردیف ۴). M: مارکر ۱ Kb.

گردید. آنتی ژن فاکتور IX نوترکیب انسانی بیان شده در محیط کشت سلول‌های ترآلوده شده با روش ساندریجی الایزا بر روی میکروپلیت‌ها که با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ضد فاکتور IX که در کیت الایزا مهیا شده بود، آشکار شد. برای بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور IX در محیط کشت، از آزمایش aPTT استفاده گردید. برای تعیین فعالیت بیولوژیک فاکتور IX بیان شده توسط سلول‌های ترآلوده شده، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت جمع‌آوری شده از هر نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر از پلاسمای فاقد فاکتور IX و ۱۰۰ میکرولیتر از PTT فعال شده مخلوط و دقیقاً ۳ دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر کلسیم کلرید ۲۵ mM از قبل گرم شده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آن اضافه و زمان انعقاد اندازه‌گیری گردید. فعالیت انعقادی هر نمونه بر اساس نمودار استاندارد تعیین شد. منحنی استاندارد انعقاد با استفاده از رسم زمان انعقاد علیه فعالیت انعقادی رقت‌های مختلف از پلاسمای طبیعی سیراته روی نمودار log-log ترسیم شد.

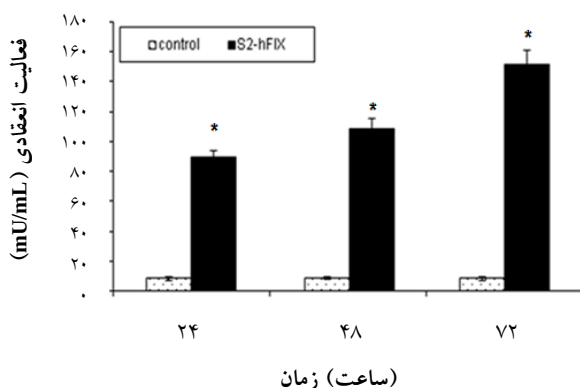
رسوب‌دهی پروتئین‌های محیط کشت به وسیله باریوم سیترات:

برای بررسی کربوکسیلاسیون فاکتور IX در سلول‌های S2، از روش جذب پروتئین‌های وابسته به ویتامین K کربوکسیله به نمک باریوم سیترات استفاده شد. در این روش به محیط کشت سلولی ۰/۴٪ سدیم سیترات و ۵٪ باریوم کلراید اضافه شد و به مدت یک ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار داده شد. بعد از سانتریفوژ، رسوب و محلول رویی به ترتیب برای بررسی فاکتور IX جذب شده و جذب نشده نگهداری شد. رسوب حاصل با ۵ mM کلرید باریوم سرد شستشو داده شد و سانتریفوژ گردید. نهایتاً رسوب در ۰/۱ M سدیم سیترات و ۱۰٪ آمونیوم سولفات حل گردید. بعد از سانتریفوژ، محلول نهایی برای بررسی فاکتور IX کربوکسیله در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای بررسی درصد بازیافت فاکتور IX نسبت به مقدار اولیه، مقدار فاکتور IX قبل و بعد از رسوب به وسیله الایزا اندازه‌گیری شد.

پایدار مشاهده گردید. فعالیت در هر دو حالت کنترل در سلول‌های ترانسفکت نشده صفر و در سلول‌های پایدار القا نشده حدود ۵ mU/mL می‌باشد.

جدول ۱: مقادیر میانگین فعالیت انعقادی فاکتور IX در دو گروه کنترل و مترشح از سلول‌های نو ترکیب پایدار S2-hFIX

زمان	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳	میانگین فعالیت	انحراف معیار
۲۴	۹۳	۹۱	۸۸	۹۰/۶	۲/۵
۴۸	۱۰۸	۱۰۶	۱۱۳	۱۰۹	۳/۶
۷۲	۱۵۸	۱۵۰	۱۵۱	۱۵۳	۴/۳
کنترل	۶	۸	۹	۷/۶	۱/۵



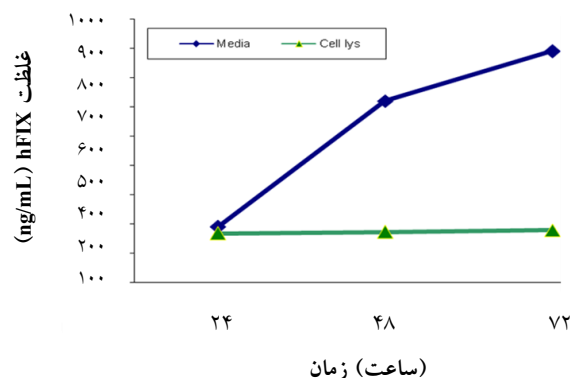
نمودار ۳: مقایسه فعالیت انعقادی فاکتور مترشح از سلول‌های نو ترکیب پایدار S2-hFIX با سلول‌های پایدار القا نشده به عنوان نمونه کنترل (کنترل)، در زمان‌های مختلف بعد از القا. ستاره‌ها نشان‌دهنده معناداری نمونه‌ها در مقایسه با کنترل با استفاده از آنالیز واریانس است ($p < 0.05$).

رسوب فاکتور IX:

قبل و بعد از تیمار محیط کشت سلول‌های پایدار S2 تولیدکننده فاکتور IX با نمک باریوم سیترات، الگوی حرکتی فاکتور IX ترشح شده در مقایسه با فاکتور IX استاندارد تخلیص شده از پلاسمای نرمال (۱ µg) در چاهک) در SDS-PAGE بررسی شد. همان طور که از نمودار ۴ مشخص است، این روش برای جذب

بررسی بیان فاکتور IX در سلول‌های S2-hFIX:

برای ارزیابی بیان دایم فاکتور IX در سلول‌های S2-hFIX، محیط کشت و هم‌چنین لیز سلولی سلول‌های پایدار و القا شده و نمونه‌های کنترل برای آزمون الیزا مورد استفاده قرار گرفتند. مقدار فاکتور IX ترشح شده در محیط کشت در روز اول، دوم و سوم بعد از القا با سولفات مس و اضافه کردن ویتامین K1 به ترتیب ۲۹۰ ng/mL، ۷۲۰ ng/mL و ۸۹۰ ng/mL بود. این در حالی است که مقدار فاکتور IX درون سلول‌های S2-hFIX در تمام دوره بعد از القا در سطح حداقل و حدود ۲۵۰ ng/mL بود (نمودار ۲).



نمودار ۲: بررسی بیان فاکتور IX پایدار در سلول‌های نو ترکیب S2-hFIX، در زمان‌های مختلف بعد از القا، بر اساس آزمایش الیزا بر روی نمونه‌های گرفته شده از محیط کشت (Media) و لیز سلولی (lys Cell).

بررسی فعالیت فاکتور IX نو ترکیب در سلول‌های S2-hFIX فعالیت انعقادی فاکتور IX در محیط سلول‌های پایدار S2-hFIX در مقایسه با کنترل در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از القا با سولفات مس و افزودن ویتامین K1، بررسی گردید.

میانگین فعالیت انعقادی فاکتور IX ترشح شده از سلول‌های S2-hFIX در روز اول، دوم و سوم به ترتیب ۹۰ mU/mL، ۱۰۹ mU/mL و ۱۵۳ mU/mL بود (جدول ۱). همان طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، بیشترین فعالیت بیولوژیک در ۷۲ ساعت بعد از القای سلول‌های

مقدار کلی بیان شده آن پروتئین تعریف می‌شود (۸). بر اساس این تعریف، کارایی ترشح فاکتور IX در سلول‌های S2 در روزهای اول، دوم و سوم بعد از القا به ترتیب ۵۳، ۷۴ و ۷۸ درصد بود (نمودار ۵). این بدان معناست که فاکتور IX به دام افتاده در داخل سلول در طول دوره کشت سلولی آزاد می‌شود.

بحث

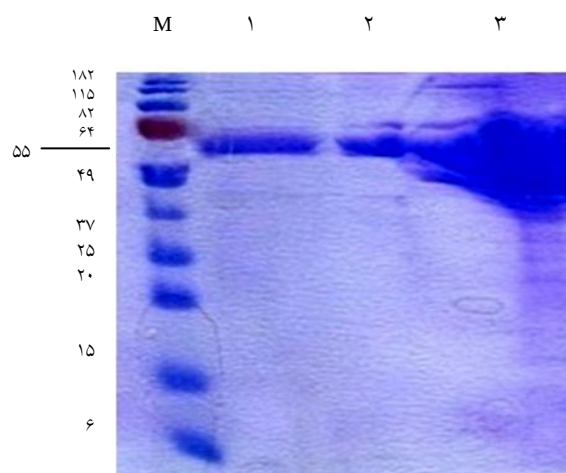
با توجه به مشکلات سلول‌های پستانداران از جمله آهستگی رشد، پایین بودن بقای سلولی و ناپایداری آن‌ها، سامانه‌های بیانی حشرات و به ویژه سلول‌های دروزوفیلایی S2 می‌توانند جایگزین مناسبی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب در سطح بالا باشند. یکی از مزایای اصلی این سامانه در مقایسه با سیستم‌های پروکاریوتی، توانایی آن‌ها در تولید انبوه پروتئین‌های یوکاریوتی است که نیاز به تغییرات پس از ترجمه دارند. مزیت دیگر این سامانه، توانایی آن‌ها در تولید پروتئین‌ها در مقیاس وسیع و در زمانی نسبتاً کوتاه (برخلاف سیستم‌های پستانداران) است (۹). هم چنین از آن جایی که تراکم رده‌های سلولی حشرات نسبت به سلول‌های پستانداران بیشتر است، به همین منظور حجم کوچکی از محیط کشت هم برای رشد آن‌ها کافی به نظر می‌رسد (۱۰).

از مزایای قابل توجه سامانه بیانی S2 می‌توان به قدرت بیان بیشتر نسبت به سلول‌های حشرات دیگر از قبیل Sf9 (۱۰ تا ۲۰ برابر)، تغییرات بعد از ترجمه یوکاریوتی از جمله گاما کربوکسیلاسیون، عدم لیز سلول‌ها، عدم تداخل و میانکنش بین پروتئین بیانی با پروتئین‌های رده سلولی، زمان کوتاه تهیه رده سلولی پایدار (حدود ۲-۳ هفته)، رشد با دانسیته بالا، رشد در دمای اتاق و عدم نیاز به CO₂ اشاره کرد (۱۴-۱۱، ۹، ۵، ۲).

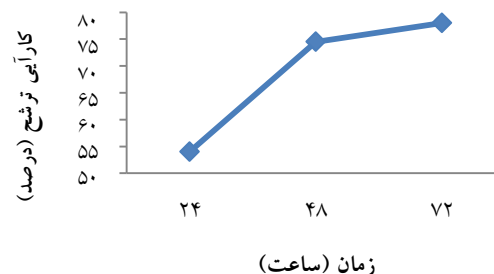
سلول‌های S2 نسبت به سایر رده‌های سلولی حشرات و سلول‌های پستانداران در برابر تغییرات pH، دما، اکسیژن و اسمولالیتیه مقاوم می‌باشند لذا ممکن است سلول S2 برای بیش از یک ماه بدون تغییر محیط، کشت شوند (۱۵). هم چنین این سامانه بیانی یک سامانه غیرلیتیک و برپایه وکتورهای پلاسمیدی است (۱۳). بررسی‌ها نشان داده‌اند که

پروتئین‌های کربوکسیله کارا بود. هم چنین نتایج نشان داد فاکتور IX مترشحه از سلول‌های نو ترکیب به عنوان یک پروتئین کربوکسیله توسط سیترات باریوم جذب و از سایر پروتئین‌های محیط کشت جدا شد.

مقدار فاکتور IX بازیابی شده از رسوب سیترات باریوم که با الیزا تایید شد، نشان داد که در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ درصد بازیافت فاکتور IX به ترتیب ۲۹، ۳۱ و ۴۵ درصد است. بر اساس این نتایج حدود نیمی از فاکتور IX بیان شده به وسیله سلول‌های S2-hFIX رسوب نگردید.



نمودار ۴: الگوی حرکتی فاکتور IX ترشح شده از سلول‌های نو ترکیب S2-hFIX در SDS-PAGE قبل (۳) و بعد از رسوب (۲). ردیف ۱ فاکتور IX استاندارد. M: مارکر.



نمودار ۵: کارایی ترشح فاکتور IX در سلول‌های S2

کارایی ترشح:

کارایی ترشح یک پروتئین با نسبت بخش ترشح شده و

حدود ۰/۹ mg/L است که در مقایسه با گزارش‌های بیان در سلول‌های CHO و سلول‌های MSCs_hAM بسیار بیشتر است (۲۲، ۲۳). هم چنین فعالیت بالای فاکتور IX (۱۵۳ mU/mL) نشان‌دهنده فعالیت بالای آنزیم گاما کربوکسیلاز در دروزوفیلا نسبت به این آنزیم در پستانداران است.

چندین روش مختلف برای بررسی و تشخیص فاکتور IX نو ترکیب فعال از فاکتور IX غیر فعال استفاده می‌شود که همه آن‌ها بر پایه تغییرات کوفورماسیونی دومین گلا می‌باشد (۲۴). رسوب باریوم سیترات یکی از اولین روش‌های استفاده شده است که به عنوان روش تقریباً کارآمد در جداسازی پروتئین‌های کربوکسیله و فعال از جمعیت غیر فعال مورد توجه است (۲۴). در این روش، از خاصیت پروتئین‌های وابسته به ویتامین K در جذب نمک باریوم سیترات از طریق اسید آمینه‌های گاما کربوکسی گلو تامیک استفاده می‌شود و مولکول‌هایی که به طور ضعیف یا اصلاً کربوکسیله نشده‌اند، نمی‌توانند به وسیله یون‌های باریوم جذب و رسوب گردند، بنابراین به صورت محلول در سوپرناتانت باقی می‌مانند.

ارزیابی کمی فاکتور IX رسوب داده شده نشان داد که حدود ۳۰-۴۵ درصد از فاکتور IX مترشح از سلول‌های S2 جذب و رسوب شده‌اند و بنابراین به احتمال زیاد به طور کامل کربوکسیله هستند. براین اساس حدود ۵۵-۷۰ درصد از فاکتور IX بیان شده جذب و رسوب نگردیده که ممکن است این قسمت از فاکتور IX ساخته شده به طور جزئی یا اصلاً کربوکسیله نشده باشد. هر چند که هم فعالیت انعقادی و هم رسوب با باریوم سیترات نشان می‌دهد که قسمتی از فاکتور IX انسانی مترشح از سلول‌های S2 به طور صحیح گاما کربوکسیله شده‌اند اما تاکنون تعریف دقیقی از کربوکسیلاسیون صحیح پروتئین‌های وابسته به ویتامین K ارایه نشده است. نتایج تحقیقات و پژوهش‌ها نشان داده است که تمام واحدهای اسید گلو تامیک در ناحیه گلا نقش کلیدی و اساسی ندارند. فاکتور ۹ دارای ۱۲ واحد اسید آمینه گلو تامیک در دومین گلای خود است و اسیدهای آمینه شماره ۷، ۸، ۱۵، ۱۷، ۲۰، ۲۱، ۲۶، ۲۷، ۳۰، ۳۳، ۳۶ و ۴۰، واحدهای اسید آمینه

وکتورهای بیانی این نوع سامانه به صورت چند نسخه به داخل کروموزوم سلول‌های S2 دروزوفیلا وارد می‌شوند و این سلول‌ها توانایی ورود بالغ بر ۱۰۰ نسخه از یک کاست بیانی را به ژنوم خود در یک رخداد تراآلایی دارند (۱۷، ۱۶). به این ترتیب برای تثبیت رده سلولی پایدار با سطح بیان بالا، نیاز به دوره زمانی طولانی تکثیر پلاسمید نیست (۹). با توجه به مزایای زیاد این سیستم، برخلاف محصولات موجود در پستانداران و سیستم‌های بیانی آن‌ها که به طور معمول در انتها دارای گالاکتوز و اسید سیالیک می‌باشند، محصولات گلیکوزیلاسیونی در حشرات و سیستم‌های بیانی آن‌ها به صورت انتهایی با واحد مانوزی کم یا انتهایی با واحد مانوزی زیاد و هیبرید با انتهای -N استیل گلوکز آمین دار می‌باشد (۱۸، ۸).

یکی از اولین گزارش‌ها در به کارگیری این سامانه، بیان دوپامین بتا هیدروکسیلاز (DBH) به میزان ۱۶ mg/L در مقیاس زیاد و ایترولوکین ۵ انسانی به میزان ۲۲ mg/L در سلول‌های S2 در فلاسک‌های ۱ لیتری بوده است (۲۰، ۱۹). میزان بازدهی و تولید ایتروپویتین نو ترکیب انسانی نیز در سیستم بیانی S2 پس از کشت در فلاسک‌های ۵۰۰ mL به مقدار ۱۸ mg/L گزارش شده است (۸). هم چنین پلاسمینوژن انسانی در سلول‌های S2 در فلاسک‌های ۱ لیتری به میزان ۱۰ mg/L تولید شد (۲۱). تاکنون بیان پروتئین‌های نو ترکیب وابسته به ویتامین K که برای فعالیت خود نیازمند کربوکسیلاسیون اسید آمینه‌های گلو تامیک در انتهای آمینوی خود هستند، در این سامانه صورت نگرفته است. زیرا تصور می‌شد سلول‌های حشرات از جمله سلول‌های S2 دروزوفیلا بی فاقد فعالیت گاما کربوکسیلازی هستند و یا آنزیم گاما کربوکسیلاز قابلیت شناسایی پروپیتید این نوع پروتئین‌ها را ندارد (۲). به دنبال آزمایش‌های باندیو پادیای در شرایط *in vitro* و مطالعه‌های قبلی ما، مشخص گردید که نه تنها سلول‌های S2 برخلاف سایر حشرات واجد فعالیت گاما کربوکسیلازی اند بلکه آنزیم گاما کربوکسیلاز دروزوفیلا ۵ برابر، محصول گاما کربوکسیله بیشتری تولید می‌کند (۱۲، ۵). نتایج این تحقیق نیز این مطلب را تایید می‌کند. بررسی غلظت فاکتور IX نو ترکیب ترشح شده از سلول‌های S2، حاکی از بیان

نتیجه گیری

داده های این مطالعه نشان می دهد که سلول های S2، فاکتور IX فعال بیولوژیکی را بیان می کنند و لذا پیشنهاد می کند که سلول های S2 قادر به کربوکسیلاسیون فاکتور IX انسانی می باشند. در واقع فعالیت انعقادی فاکتور IX مترشح از سلول های S2، شواهد متقاعد کننده ای را فراهم می کند که سلول های S2 دروزوفیلیا، گاما کربوکسیلاسیون لازم را که برای فعالیت انعقادی لازم است انجام می دهند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه حکیم سبزواری به خاطر حمایت مالی پروژه، هم چنین آقای دکتر زمردی پور (پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) و خانم دکتر Mettine Bos (مرکز پزشکی دانشگاه لیدن هلند) به دلیل در اختیار قرار دادن برخی سلول ها و مواد، کمال تشکر را داریم.

گلوتامیک هستند. جهش در اسیدهای آمینه گلوتامیک در موقعیت های ۷، ۱۵، ۲۰، ۲۷، ۳۳ باعث کاهش شدید در فعالیت بیولوژیک فاکتور ۹ می شود، اما جهش در سایر موقعیت ها تاثیر چندانی روی فعالیت بیولوژیک این فاکتور ندارد (۲۵).

بنابراین از آن جایی که تنها ۵ اسید آمینه گلوتامیک از ۱۲ اسید آمینه گلوتامیک موجود در دومین گلا برای فعالیت بیولوژیک فاکتور IX کافی است، لذا به نظر می رسد که فاکتور IX که به طور ناقص کربوکسیله شده ولی واجد فعالیت اند، در سوپرناتانت وجود داشته باشد. این فرض با نتایج کارآیی ترشح نیز تایید می شود. کارآیی حدود ۸۰ درصدی ترشح فاکتور IX به وسیله سلول های S2 نشان می دهد که حدود ۲۰٪ فاکتور IX بیان شده در داخل سلول نگه داشته می شود. لذا بسیاری از پروتئین های فاکتور IX در محیط کشت ممکن است به طور کامل کربوکسیله نشده اند اما بدلیل کربوکسیلاسیون حداقل ۵ اسید آمینه در ناحیه گلا، قادر به ترشح شده اند.

References :

- 1- Khorshidi S, Zomorodipour A, Behmanesh M, Vatandoost J, Bos MH. Functional expression of the human coagulation factor IX using heterologous signal peptide and propeptide sequences in mammalian cell line. *Biotechno Lett* 2015; 37(9): 1773-81.
- 2- Li T, Yang CT, Jin D, Stafford DW. Identification of a *Drosophila* vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase. *J Biol Chem* 2000; 275(24): 18291-6.
- 3- Walker CS, Shetty RP, Clark K, Kazuko SG, Letsou A, Olivera BM, *et al.* On a Potential Global Role for Vitamin K-dependent gamma-carboxylation in animal systems. Evidence for a gamma-glutamyl carboxylase in *Drosophila*. *J Biol Chem* 2001; 276(11): 7769-74.
- 4- Czerwicz E, Begley GS, Bronstein M, Stenflo J, Taylor K, Furie BC, *et al.* Expression and characterization of recombinant vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase from an invertebrate, *Conus textile*. *Eur J Biochem* 2002; 269(24): 6162-72.
- 5- Bandyopadhyay P, Clark K, Stevenson B, Rivier J, Olivera B, Golik K, *et al.* Biochemical characterization of *Drosophila* gamma-glutamyl carboxylase and its role in fly development. *Insect Mol Biol* 2006; 15(2): 147-56.
- 6- Zhou D, Lin G, Zeng SC, Xiong B, Xie PY, Cheng DH, *et al.* Trace levels of mitomycin C disrupt genomic integrity and lead to DNA damage response defect in long-term-cultured human embryonic stem cells. *Arch Toxicol* 2015; 89(1): 33-45.
- 7- Daker M, Bhuvanendran S, Ahmad M, Takada K, Khoo AS. Dereglulation of lipid metabolism pathway genes in nasopharyngeal carcinoma cells. *Mol Med Rep* 2013; 7(3): 731-41.
- 8- Kim YK, Shin HS, Tomiya N, Lee YC, Betenbaugh MJ, Cha HJ. Production and N-glycan analysis of secreted human erythropoietin glycoprotein in stably transfected *Drosophila* S2 cells. *Biotechnol Bioeng* 2005; 92(4): 452-61.
- 9- Kim KR, Kim YK, Cha HJ. Recombinant baculovirus-based multiple protein expression platform for *Drosophila* S2 cell culture. *J Biotechnol* 2008; 133(1): 116-22.
- 10- Kollwe C, Vilcinskas A. Production of recombinant proteins in insect cells. *Am J Biochem Biotechnol* 2013; 9: 255-71.
- 11- Bernard A, Kost T, Overton L, Cavegn C, Young J, Bertrand M, *et al.* Recombinant protein expression in a *Drosophila* cell line: comparison with the baculovirus system. *Cytotechnology* 1994; 15(1-3): 139-44.
- 12- Vatandoost J, Zomorodipour A, Sadeghizadeh M, Aliyari R, Bos MH, Ataei F. Expression of biologically active human clotting factor IX in *Drosophila* S2 cells: γ -carboxylation of a human vitamin K-dependent protein by the insect enzyme. *Biotechnol Prog* 2012; 28(1): 45-51.
- 13- Moraes AM, Jorge SA, Astray RM, Suazo CA, Riquelme CEC, Augusto EF, *et al.* *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: from gene cloning to bioprocess development.

- Biotechnol Adv 2012; 30(3): 613-28.
- 14- Vatandoost J, Zomorodipour A. Optimization of transfection and stable expression of human factor IX in *Drosophila* S2 cells. *Journal of Cell and Molecular Research* 2015; 27(4): 598-610.
 - 15- Benting J, Lecat S, Zacchetti D, Simons K. Protein expression in *Drosophila* Schneider cells. *Anal Biochem* 2000; 278(1): 59-68.
 - 16- Cherbas L, Cherbas P. "Parahomologous" gene targeting in *Drosophila* cells: an efficient, homology-dependent pathway of illegitimate recombination near a target site. *Genetics* 1997; 145(2): 349-58.
 - 17- Jorge SA, Santos AS, Spina A, Pereira CA. Expression of the hepatitis B virus surface antigen in *Drosophila* S2 cells. *Cytotechnology* 2008; 57(1): 51-9.
 - 18- Vatandoost J, Khalili L. Glycosylation Engineering of Human Recombinant Proteins in New S2 System. *Journal of Knowledge & Health* 2016; 10(3): 44-51. [Article in Farsi]
 - 19- Li B, Tsing S, Kosaka A, Nguyen B, Osen E, Bach C, *et al.* Expression of human dopamine beta-hydroxylase in *Drosophila* Schneider 2 cells. *Biochem J* 1996; 313(Pt 1): 57-64.
 - 20- Johanson K, Appelbaum E, Doyle M, Hensley P, Zhao B, Abdel-Meguid SS, *et al.* Binding Interactions of Human Interleukin 5 with Its Receptor α Subunit Large Scale Production, Structural, And Functional Studies Of *Drosophila*-Expressed Recombinant Proteins. *J Biol Chem* 1995; 270(16): 9459-71.
 - 21- Nilsen SL, Castellino FJ. Expression of Human Plasminogen in *Drosophila* Schneider S2 Cells. *Protein Expres Purif* 1999; 16(1): 136-43.
 - 22- Kaufman R, Wasley L, Furie B, Furie B, Shoemaker C. Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1986; 261(21): 9622-8.
 - 23- Paridar M, Amirizadeh N, Habibi Roudkenar M, Amiri F, Abolghasemi H, Jalili MA. Expression of Recombinant Coagulation Factor IX in Human Amniotic Membrane-derived Mesenchymal Stem Cells: A New Strategy to Gene Therapy of Hemophilia B. *Iranian Journal of Blood and Cancer* 2014; 6(3): 133-41.
 - 24- Lindsay M, Gil GC, Cadiz A, Velander WH, Zhang C, Van Cott KE. Purification of recombinant DNA-derived factor IX produced in transgenic pig milk and fractionation of active and inactive subpopulations. *J Chromatogr A* 2004; 1026(1): 149-57.
 - 25- Stenflo J, Dahlback B. Vitamin K-dependent proteins in blood coagulation. In: *The Molecular Basis of Blood Diseases*. 2nd ed. New York: W.B.Saunders company; 2001. p. 147-56.

Original Article

The efficiency of secretion and γ -carboxylation of recombinant human factor IX in stable drosophila cells

Khalilzadeh S.¹, Vatandoost J.¹

¹Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

Abstract

Background and Objectives

Human factor IX (hFIX) during maturation in the liver requires carboxylation of glutamic amino acids in the Gla domain, which is involved in its secretion and activity. Due to the deficiency of mammalian expression systems in the secretion and fully γ -carboxylation of recombinant coagulation factors and higher activity of γ -carboxylase enzyme in *Drosophila* S2 system, the present study was performed to evaluate ability of this system in γ -carboxylation, secretion and activity of recombinant hFIX.

Materials and Methods

In this study, following transfection of S2 cells with pMT-hFIX vector, the ELISA and aPTT tests were used to evaluate the expression and activity of recombinant hFIX. In addition, γ -carboxylation of factor IX was approved by barium citrate precipitation. The samples were analyzed on three consecutive days and being repeated three times.

Results

The coagulation results showed the secretion of active recombinant hFIX by stable S2 cells. Quantitative assessment of recombinant hFIX in medium and cell lysis with ELISA showed 94% secretion efficiency. The results of ELISA on precipitated FIX with barium citrate also indicated that about 45% of secreted recombinant hFIX from S2 cells are fully carboxylated.

Conclusions

Activity and barium citrate precipitation of recombinant hFIX confirmed the ability of S2 cells, unlike other insect cells, in the γ -carboxylation of factor IX. So, our results provide convincing evidence that *Drosophila* γ -carboxylase perform necessary γ -carboxylation required for secretion and coagulation activity of recombinant hFIX.

Key words: Coagulation factor IX, Hemophilia B, gamma-glutamyl carboxylase, GALA peptide

Received: 25 Nov 2015

Accepted: 5 Apr 2016

Correspondence: Vatandoost J., PhD of Molecular Genetics. Assistant Professor of Hakim Sabzevari University. P.O.Box: 397, Sabzevar, Iran. Tel: (+9851) 44013329; Fax: (+9851) 44013329
E-mail: j.vatan@hsu.ac.ir