مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۳۱۷/هفته دوم اسفند ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۵

ساخت و تعیین خصوصیت سلول نوترکیب HEK۲۹۳ T با بیان بالای Tim۳

مونا مبلغ ناصری[۱]، دکتر حسین خان‌احمد[۲]، ویدا همایونی[۳]، دکتر مزدک گنجعلی خانی حاکمی[۴]، دکتر منصور صالحی[۲]، ایلناز رحیم‌منش[۱]، راضیه تقی‌زاده[۱]، مهسا کلاهدوز[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گلیکوپروتئین Tim۳ (T-cell immunoglobulin and mucin domain۳) یکی از نشانگرهای سطح سلولی سلول‌های Th۱ (T helper۱) است که در بسیاری از بیماری‌های مرتبط با سیستم ایمنی، تغییر بیان دارد. این مطالعه، با هدف بررسی و افزایش بیان پروتئین Tim۳ در سطح سلول ۲۹۳T انجام شد.

روش‌ها: کاست بیانی Tim۳ از روی پلاسمید EX-W۲۶۸۲-M۶۷ با استفاده از پرایمرهای دارای جایگاه آنزیمی NheI و MluI تکثیر و در جایگاه‌های مربوط در پلاسمید pHygro ساب کلون شد. پلاسمید نوترکیب محتوی ژن Tim۳ (pH-Tim۳) پس از استخراج و خالص‌سازی، با آنزیم NheI خطی شد و در سلول‌های ۲۹۳T با استفاده از روش کلسیم فسفات ترانسفکت شد. سپس سلول‌های نوترکیب ۲۹۳T بیان کننده‌ی Tim۳ در محیط حاوی هیگرومایسین انتخاب مثبت شدند. پس از یک ماه بر روی DNA ژنومیک کلون‌های سلولی باقی‌مانده، واکنش PCR (Polymerase chain reaction) به منظور بررسی ادغام cDNATim۳ (Complementary DNA) در ژنوم سلول ۲۹۳T انجام شد. همچنین میزان بیان پروتئین Tim۳ در سطح سلول به روش فلوسایتومتری ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نتایج هضم آنزیمی با آنزیم‌های NheI و MluI بر روی پلاسمید p-H-Tim۳ باند ۲۳۱۲ و ۴۶۰۰ جفت بازی را نشان داد که تأیید کننده‌ی صحت کلونینگ است. در واکنش PCR بر روی DNA ژنومیک، باند ۱۱۰۰ جفت بازی تکثیر شد که نشانه‌ی ورود ژن Tim۳ در ژنوم سلول ۲۹۳T می‌باشد. همچنین در فلوسایتومتری، ۸۸ درصد سلول‌ها از نظر بیان Tim۳ مثبت بودند و شدت بیان در قسمت زیادی از سلول‌ها بالا بود.

نتیجه‌گیری: بیان پروتئین در سیستم‌های بیانی پروکاریوت‌ها از نظر زمان و هزینه بهتر از سیستم‌های یوکاریوتی است، اما در مورد پروتئین‌های دارای تغییرات پس از ترجمه، این سیستم بیانی جوابگو نیست. در برخی موارد ساختار فضایی طبیعی پروتئین در موقع لنگر انداختن بر سطح غشا، در تولید پروتئین‌های غشایی مانند Tim۳ در سیستم‌های یوکاریوتی، حفظ نمی‌شود. در نتیجه، برای استفاده در تحقیقات تهیه‌ی آنتی‌بادی‌هایی که اپی‌توپ‌های فضایی را می‌شناسند و یا انتخاب آپتامر، مناسب نمی‌باشند. بیان پروتئین Tim۳ در سطح سلول، می‌تواند ارایه دهنده‌ی پروتئین با ساختار فضایی طبیعی در پروژه‌های تولید آنتی‌بادی، نانوبادی و آپتامر باشد.

واژگان کلیدی: T-cell immunoglobulin and mucin domain ۳، ۲۹۳T، سلول نوترکیب

ارجاع: مونا مبلغ ناصری، خان‌احمد حسین، همایونی ویدا، گنجعلی خانی حاکمی مزدک، صالحی منصور، رحیم‌منش ایلناز، تقی‌زاده راضیه، کلاهدوز مهسا. **ساخت و تعیین خصوصیت سلول نوترکیب HEK۲۹۳ T با بیان بالای Tim۳.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۱۱۷): ۲۳۱۲-۲۳۲۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و زیست شناسی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه ژنتیک و زیست شناسی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی دکتری، گروه ایمنی شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، گروه ایمنی شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین خان‌احمد
Email: hossein_khanahmad@yahoo.com

مقدمه

در بیماری‌های مختلف الگوی پاسخ ایمنی سلولی می‌تواند به نفع Th۱ (T helper۱) یا Th۲ باشد. به عنوان مثال، فعال شدن بیش از حد Th۱ در بیماری‌های خودایمنی عضو خاص و ازدیاد حساسیت تأخیری رخ می‌دهد و پاسخ کنترل نشده‌ی Th۲ در بیماری‌هایی از قبیل آسم و آلرژی دیده می‌شود. به علاوه، سطح بالایی از Th۱۷ در بیماری‌های خودایمنی و التهابی گزارش شده است (۱). با تنظیم بیان مولکول‌های نقاط وارسی ایمنی که شامل مولکول‌های کمک تحریکی و کمک مهاری سلول‌های T می‌باشند و امواج مثبت یا منفی را القا می‌کنند، می‌توان یک روش درمانی نوین برای جلوگیری از عملکرد خودبه‌خودی فعال شدن یا مهار شدن سلول‌های T ارایه نمود. با کشف خانواده‌ی Tim (T-cell immunoglobulin and mucin domain) نمونه‌ای از مولکول‌های نقاط وارسی ایمنی شناخته شد (۲). گلیکوپروتئین‌های خانواده‌ی Tim از موج پپتید، منطقه‌ی گذر غشایی، دمین موسین، دمین ایمونوگلوبین و دمین سیتوپلاسمیک تشکیل شده‌اند. این خانواده، شامل هشت عضو روی کروموزم موشی ۱۱ (ناحیه‌ی ۱۱p۱/۱) و ۳ عضو روی کروموزوم شماره‌ی ۵ انسان در ناحیه‌ی ۵q۳۳/۲۵ می‌باشند (۳).

Tim۳، عضو جدید خانواده‌ی Tim، شامل ۷ اگزون است که پروتئین ۳۰۱ اسید آمینه‌ای را کد می‌کند و در سطح سلول‌های تمایز یافته‌ی $CD۴^+$ Th۱، $CD۸^+$ Th۱ و Th۱۷ بیان می‌شود (۴). بیان Tim۳ در سلول‌های ایمنی ذاتی شامل ماست‌سل‌های موشی، ماکروفاژها، سلول‌های NK (Natural killer)، NKT (Natural killer T)، مونوسیت و دندریتیک‌های انسانی که فاگوسیتوز سلول‌های آپوپتیک و عرضه‌ی متقاطع به آنتی‌ژن‌ها را واسطه‌گری می‌کنند نیز مشاهده شده است (۵).

Tim۳ به عنوان گیرنده‌ی ویژه در سطح سلول‌های Th۱ به لیگاند خود gal۹ (galectin۹) باند می‌شود. سلول‌های Th۱، IFNγ (Interferon gamma) تولید می‌کنند و باعث افزایش بیان galectin۹ در سطح سلول‌های APC (Antigen presenting cell) می‌شوند که در پی آن، مرگ سلولی در سلول‌های Th۱ $Tim۳^+$ ایجاد می‌شود (۶، ۲). علاوه بر gal۹، لیگاند دیگری که به تازگی در تعامل با Tim۳ تعریف شده است، فسفاتیدیل سرین می‌باشد. Tim۳ به عنوان گیرنده‌ی سلولی در سلول‌های APC بیان کننده‌ی Tim۳ به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح بیرونی غشای پلاسمایی سلول‌های آپوپتوتیک باند می‌شود. سپس سلول‌های آپوپتوتیک به یک فاگوزوم اسیدی منتقل می‌شوند و آنتی‌ژن‌های آن‌ها پس از پردازش، به سلول‌های T ارایه می‌گردد؛ از این رو، تسهیل فاگوسیته شدن سلول‌های آپوپتوتیک را خواهیم داشت (۷، ۲). عدم تعادل در پاسخ ایمنی، علت بسیاری از بیماری‌ها با مرگ و میر بالا به خصوص بیماری‌های خودایمنی است. از طرفی، پاسخ ایمنی مانع عمده‌ای در برابر پیوند موفق اعضا می‌باشد (۸، ۵). در بیماری‌های خودایمنی، بیماری‌های آتوپیک، عفونت‌های مزمن و سرطان، پاسخ‌های ایمنی نادرست و نامتعادل مشاهده شده است (۹).

بسیاری از تحقیقات بر وجود ارتباط میان پلی‌مورفیسم‌های متعدد در ژن کد کننده‌ی Tim۳ با ابتلا به بیماری‌های با واسطه‌ی ایمنی تأکید دارند (۲).

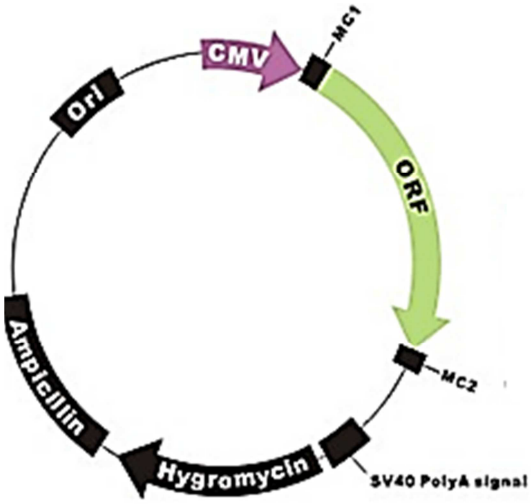
برای مثال، در مطالعات Kuchroo و همکاران در مدل‌های موشی EAE، Tim۳ یک تنظیم کننده‌ی منفی پاسخ سلول‌های Th۱ محسوب می‌شود؛ به طوری که بلوک Tim۳–Tim۳L موجب تنظیم منفی IFNγ تولید شده توسط سلول‌های T و تشدید بیماری‌های خودایمنی می‌گردد (۱۵–۱۰، ۲–۱).

نقش تعامل Tim۳–Tim۳L در القای تحمل نیز به اثبات رسیده است؛ با توجه به داده‌های به دست آمده، با تجویز مهار کننده‌های Tim۳، از عملکرد این پروتئین مهاری جلوگیری می‌شود و پاسخ‌های ایمنی در پیوند عضو و به دنبال آن، خطر پس زدن عضو پیوندی افزایش می‌یابد (۸، ۵). همچنین حضور Tim۳ در سلول‌های $CD8^+$ خسته در بیماری‌های مزمن ایمنی مثل عفونت ویروسی و سرطان، نقش مهم این پروتئین را در سیستم ایمنی مشخص می‌سازد (۲۱–۱۶). به علاوه، در تحقیقات گوناگون این نتیجه حاصل شده است که در مدل‌های موشی آسم و بیماری‌های آتوپیک، اختلال عملکرد مولکول‌های Tim۳ فنوتیپ بیماری را تغییر می‌دهد و موجب بهبودی علایم بیماری می‌گردد (۲۲، ۱۱).

نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که این پروتئین می‌تواند یک هدف مهم برای درمان بالقوه‌ی پاسخ‌های ایمنی باشد. برای شناخت بیشتر این پروتئین و ساخت آنتی‌بادی برای استفاده در تحقیقات، مقادیر زیاد Tim۳ لازم است. بنابراین در پژوهش حاضر، بیان Tim۳ در سطح سلول ۲۹۳T فزایش یافت و از سلول نمایش دهنده‌ی این پروتئین می‌توان در فرایندهای ایمنی‌سازی استفاده نمود. هدف از این تحقیق، تهیه‌ی رده‌ی سلولی ۲۹۳T با بیان پایدار پروتئین Tim۳ در سطح خود بود.

روش‌ها

پلاسمید PEZ–M۶۷ حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و هیگرومایسین، پروموتر CMV (Cytomegalo virus) و ORF (Open reading frame) ژن Tim۳ و موج پلی A یا PAS (Polyadenylation signal) SV۴۰ (Simian vacuolating virus۴۰) ساخت شرکت Genecopoeia (USA) خریداری شد.



شکل ۱. نقشه‌ی ژنی پلاسمید PEZ-M۶۷ حاوی cDNA Tim۳

ترانسفورماسیون و تمایز کلون‌های باکتری دارای پلاسمید PEZ-M۶۷

باکتری‌های Dam-‌ (GM۲۱۶۳) در محیط LB (Lysogeny broth) حاوی ۱۰۰ µg/ml آمپی‌سیلین رشد داده شد. سپس با روش $CaCl_2$ و شوک حرارتی بر اساس پروتکل مندل و هیگا (Mandel and Higa) مستعد پذیرفتن پلاسمید نوترکیب شد و پلاسمید PEZ-M۶۷ در آن ترانسفورم شد. کلون‌های رشد کرده، توسط واکنش Colony PCR (Colony polymerase chain reaction) بررسی شد.

واکنش Colony PCR توسط پرایمرهای طراحی شده‌ی زیر و مطابق با برنامه‌ی زمانی ۹۵ °C به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

AAAATGTCGTAACAACTCCGCCCC
۶۷:Primer forward PEZ-M

ACTCGAGCTATGGCATTGCAAAGCG
۶۷:Primer reverse PEZ-M

استخراج پلاسمید با دستورالعمل کیت استخراج پلاسمید Sol Gent Co kit (Korea) انجام گرفت و میزان خلوص و غلظت پلاسمید با دستگاه Nanodrop بررسی شد.

کلونینگ cDNA Tim۳ در پلاسمید pHygro

پلاسمید pHH، پلاسمیدی مشتق شده از PBGGT می‌باشد که کاست بیانی هیگرومایسین و ژن بتاگلوبین در آن کلون شده است. این پلاسمید به باکتری Ecoli. Top۱۰ F' (Escherichia coli) ترانسفورم شد و استخراج پلاسمید انجام گرفت. هضم پلاسمید pHH توسط آنزیم‌های SacI و XhoI انجام شد. سپس محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز الکتروفورز شد و باند مربوط به Backbone به طول ۴۶۰۰ bp از روی ژل بریده و توسط کیت شرکت Bioneer تخلیص شد. سپس Backbone پلاسمید با آنزیم pfu (Plaque-forming unit) و dNTP (Deoxynucleotide triphosphates) به مدت ۱۵دقیقه در دمای ۷۲ °C انکوبه شد تا 5'Overhang حاصل از هضم آنزیمی، Blunt گردد. حاصل واکنش تهدید شده با pfu با کیت Clean up تمیز گردید. به منظور Self-ligation پلاسمید پیش‌گفته، ۷ µl (۱ µg) از Backbone با ۲ µl بافر ۱۰x ۱ µl، آنزیم T۴ DNA ligase در واکنش ۲۰ µl با آنزیم T۴ لیگاز، Self-ligate شد و محصول Ligation در F' Ecoli. Top۱۰ ترانسفورم شد. محصول به دست آمده در این مرحله پلاسمید pHygro (pH) بود.

به منظور تکثیر قطعه‌ی Tim۳ موجود در پلاسمید PEZ-M۶۷، طراحی آغازگرهای Forward و Reveres با توجه به نکات استاندارد در طراحی پرایمر از جمله طول پرایمر، دمای اتصال، عدم تشکیل دایمر و لوپ یا حلقه و سایر موارد با استفاده از نرم‌افزار Gene runner نسخه‌ی ۳/۰۵ انجام گرفت. همچنین برای سهولت در مراحل کلونینگ دو جایگاه برش آنزیم محدود کننده‌ی *MluI* و *NheI* که در پلاسمید pH نیز موجود است، در دو پرایمر در نظر گرفته شد. توالی پرایمرهای طراحی شده به صورت زیر بود:

AAAGCTAGCTGCCACCTGACGTCTA
AGA۳: Forward Tim

ATTACGCGTTAAGATACATTGATGA
GTTTGGAC۳: Reveres Tim

قطعه‌ی مورد نظر توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از آنزیم pfu تکثیر شد. به منظور خروج ژن از پلاسمید نوترکیب و داخل نمودن آن به پلاسمید pH با جهت‌گیری صحیح، قطعه‌ی تکثیر شده و پلاسمید pH، توسط آنزیم‌های MluI و NheI در دو مرحله‌ی جداگانه با بافرهای مربوط، جهت هضم آنزیمی گذاشته شد. واکنش هضم در حجم ۲۰۰ µl و به قرار زیر بود:

میزان ۸۰ µl پلاسمید یا محصول PCR تمیز شده با کیت استخراج از ژل Bioneer (Korea)، ۲۰ µl بافر اختصاصی آنزیم، ۱۰۰ µl آب دو بار تقطیر و

۵ µl آنزیم NheI و MluI مخلوط و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. سپس محصول هضم آنزیمی از روی ژل ۱ درصد آگارز بریده شد و قطعه‌ی مورد نظر از ژل استخراج گردید.

واکنش Ligation بین پلاسمید خطی و محصول هضم PCR با استفاده از آنزیم T۴ DNA ligase و با استفاده از ۱۵ µl قطعه‌ی Tim۳ تکثیر و هضم شده و ۴ µl پلاسمید p-H خطی شده، ۳ µl بافر DNA ligase ۱۰x T۴ و ۳ µl PEG (Polyethylene glycol) و ۴ µl آب استریل انجام شد و محصول Ligation با روش $CaCl_2$ به باکتری TOP۱۰ Ecoli ترانسفورم شد.

صحت کلونینگ به روش PCR Colony، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن Tim۳ بررسی شد. غلظت عوامل PCR شامل PR ۱ µl، PF ۱ µl، $MgCl_2$ ۱ µl، dNTP (Nucleoside triphosphate) ۰/۵ µl، taq ۰/۲ µl و Buffer ۲/۵ µl بود که تحت برنامه‌ی PCR شامل ۹۵ °C به مدت ۴ دقیقه، ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۷۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه در ۳۰ سیکل انجام گرفت. بررسی محصول نهایی PCR با الکتروفورز روی ژل آگارز، رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و مشاهده‌ی آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV (Ultraviolet) و نشانگر ۱ kb انجام شد. در نهایت، پلاسمید با آنزیم NheI هضم گردید و پلاسمید pH-۳ Tim خطی از ژل آگارز استخراج گردید.

کشت و ترانسفکشن پلاسمید نوترکیب pH-Tim۳ به رده‌ی سلولی T۲۹۳

سلول‌های ۲۹۳T (رده‌ی سلولی کلیه‌ی جنین انسان ترانسفورم شده با T آنتی‌ژن ویروس SV۴۰) از انستیتو پاستور تهران خریداری شد و در فلاسک T۲۵ در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum) و ۱ درصد پنی‌سیلین- استرپتومایسین در ۳۷ °C و در انکوباتور با ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. حدود ۵×۱۰^۶ سلول ۲۹۳T در پلیت ۶ خانه کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت با پلاسمید خطی ترانسفکت گشت. میزان ۲۱ µg پلاسمید خطی، ۳۰۴ µl ddH_2O و ۱۱ µl از بافر TE (Tris-EDTA)، ۳۵ µl از محلول کلسیم فسفات به محلول DNA اضافه شد و سپس ۳۵۰ µl HBS۲X به آرامی و تحت ورتکس با حداکثر سرعت به محلول DNA افزوده گشت و روی کشت سلولی به صورت قطره قطره ریخته شد. بعد از ۴۸ ساعت، سلول‌ها به مدت ۴ هفته تحت تیمار با ۱۵۰ µg/ml هیگرومایسین قرار گرفتند.

بررسی بیان Tim۳ توسط سلول‌های ۲۹۳T ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب

DNA ژنومیک از یک میلیون سلول ۲۹۳T که تحت درمان با هیگرومایسین باقی مانده بودند، توسط کیت مربوط (Genet bio, USA) استخراج شد و به منظور ارزیابی الحاق Tim۳ در DNA ژنومیک، توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر گشت. برنامه‌ی PCR شامل ۹۷ °C به مدت ۳ دقیقه، ۹۷ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C ۳۰در ثانیه، ۷۲ °C در ۸۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ °C طی ۱۰ دقیقه در ۳۰ سیکل انجام گرفت. درصد سلول‌هایی که پس از انجام ترانسفکشن موفق به دریافت Tim۳ cDNA شده بودند، توسط تکنیک فلوسایتومتری و با استفاده از آنتی‌بادی Anti Tim۳ کونژوگه شده با PE

(Phycoerythrin) (Biolegend ۳۴۰۰۵) و ایزوتایپ (Biolegend ۴۰۰۱۱۱) سنجش شد.

به طور خلاصه، حدود $۱۰^۶$ سلول با مقدار ۵ µl از Anti Tim۳ آنتی‌بادی کونژوگه شده و آنتی‌بادی ایزوتایپ مناسب به مدت ۲۰ دقیقه در ۲ تیوپ مجزا، در اتاق تاریک انکوبه شد. نمونه‌ها پس از شستشو با PBS، از طریق دستگاه فلوسایتومتری (Facs Calibour, USA) آنالیز شدند.

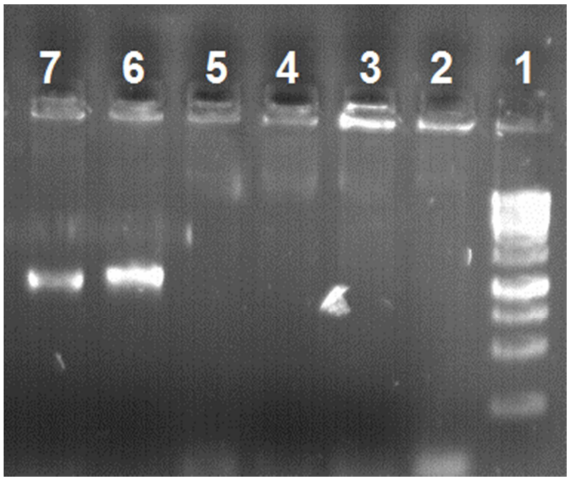
یافته‌ها

پلاسمید حاوی ژن Tim۳ تهیه شده (PEZ-M۶۷)، تنها با آنزیم Eco۳۱I خطی می‌شد و این آنزیم فعالیت مناسبی نداشت. بنابراین ژن Tim۳ تکثیر شد و از پلاسمید PEZ-M۶۷ به پلاسمید دیگری به نام pH منتقل گردید که حاوی سایت‌های آنزیمی بیشتر و در دسترس‌تر بود.

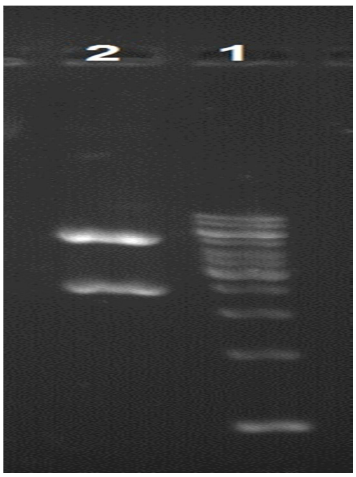
ترانسفورماسیون محصول Ligation بین کاست Tim۳ و پلاسمید pH خطی شده

در این مرحله، ۱۰ کلونی از کلونی‌های رشد یافته برای تهیه‌ی ماتریکس انتخاب شدند که از بین آن‌ها، کلونی‌هایی گزینش شدند. استخراج پلاسمید و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مورد این کلونی‌ها انجام گرفت. نمونه‌ای از محصول Colony PCR در شکل ۲ آمده است.

هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده از این کلونی‌ها توسط آنزیم‌های MluI و NheI انجام گرفت که ۲ باند حاصل از برش آنزیم در سایت‌های آنزیمی کلونی‌های دریافت کننده‌ی پلاسمید نوترکیب مشاهده شد و وجود پلاسمید نوترکیب در کلونی‌های باکتری تأیید گردید (شکل ۳).



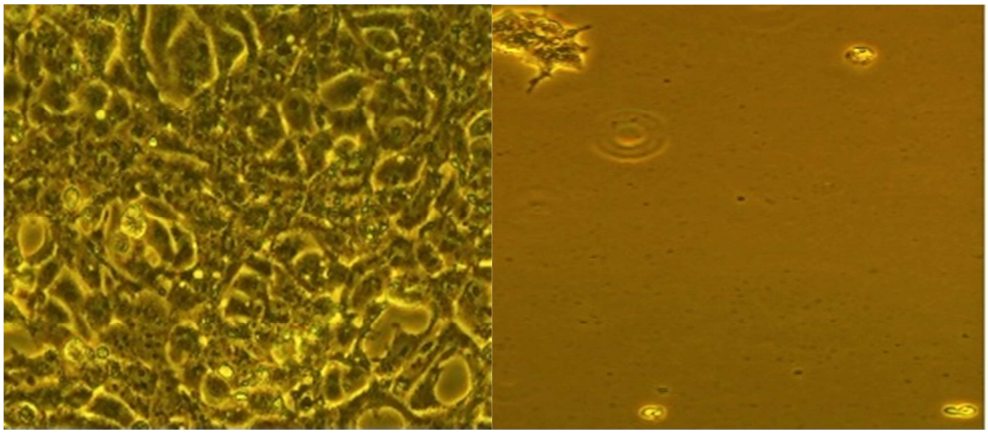
شکل ۲. تأیید صحت مراحل کلون کردن cDNA Tim۳ در پلاسمید pHH بر اساس نتایج واکنش Colony PCR
ستون ۱: نشانگر Kb ۱. ستون‌های ۲، ۳، ۴ و ۵: کلونی‌هایی که منفی بودند. ستون‌های ۶ و ۷: کلونی‌های مثبت که باند ۱۱۰۰ مربوط به cDNA Tim۳ را داشتند.



شکل ۳. الگوی الکتروفورزی هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب p-H-Tim۳
ستون ۱: نشانگر Kb ۱
ستون ۲: پلاسمید نوترکیب pH-Tim۳ که با آنزیم‌های NheI و MluI هضم شده است و باند bp ۲۳۱۲ و bp ۴۶۰۰ دیده می‌شود.

انتخاب سلول‌ها در محیط حاوی هیگرومایسین

تصویر سلول‌های ترانسفکت شده در زمان شروع و بعد از دو هفته تیمار با هیگرومایسین در شکل ۴ آمده است.

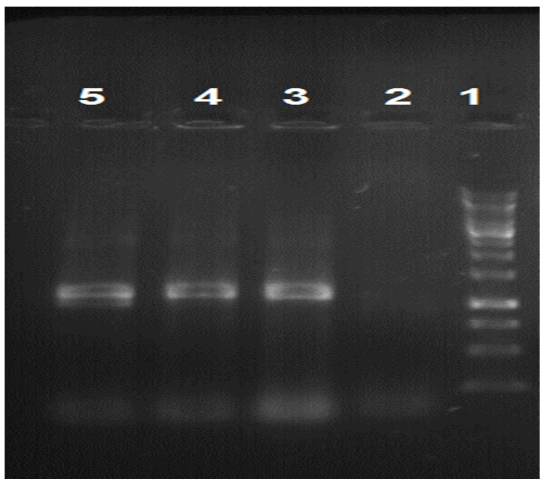


شکل ۴. سلول‌های HEK ۲۹۳T

A: قبل از درمان با هیگرومایسین **B**: دو هفته پس از درمان با هیگرومایسین

نتیجه‌ی PCR روی ژنوم سلول ترانسفکت شده

انجام واکنش PCR روی ژنوم سلول ترانسفکت شده، باند مربوط به قطعه‌ی cDNA Tim۳ به طول ۱۱۰۰ جفت باز را نشان داد (شکل ۵) که حاکی از دریافت و اینتگره شدن ژن درون سلول ۲۹۳T می‌باشد.



شکل ۵. الگوی الکتروفورزی محصول PCR (Polymerase chain reaction) روی ژنوم سلول ترانسفکت شده‌ی حاوی قطعه‌ی ژن Tim۳ و نمونه‌ی شاهد

ستون ۱: نشانگر Kb ۱

ستون ۲: شاهد منفی روی ژنوم ۲۹۳T ترانسفکت نشده

ستون‌های ۳ تا ۵: تکثیر cDNA Tim۳ روی ژنوم سلول ۲۹۳T ترانسفکت با cDNA Tim۳

نتایج فلوسایتومتری

نتایج فلوسایتومتری، میزان بیان ۸۸ درصدی Tim۳ در سطح سلول‌های ترانسفکت شده در ۱۴ روز بعد از ترانسفکشن سلول‌ها را آشکار می‌کند.

نتایج حاصل افزایش محسوسی را در سطح بیانی در سلول‌های ۲۹۳T ترانسفکت شده با وکتور پلاسمیدی در مقایسه با سطح بیانی پایه‌ی Tim۳ در گروه شاهد در سلول‌های ۲۹۳T نشان می‌دهد که مؤید بیان معنی‌دار Tim۳ در گروه ترانسفکت شده است ($P \leq ۰/۰۵۰$).

موارد در جداول ۶ و ۷ قابل مشاهده است.

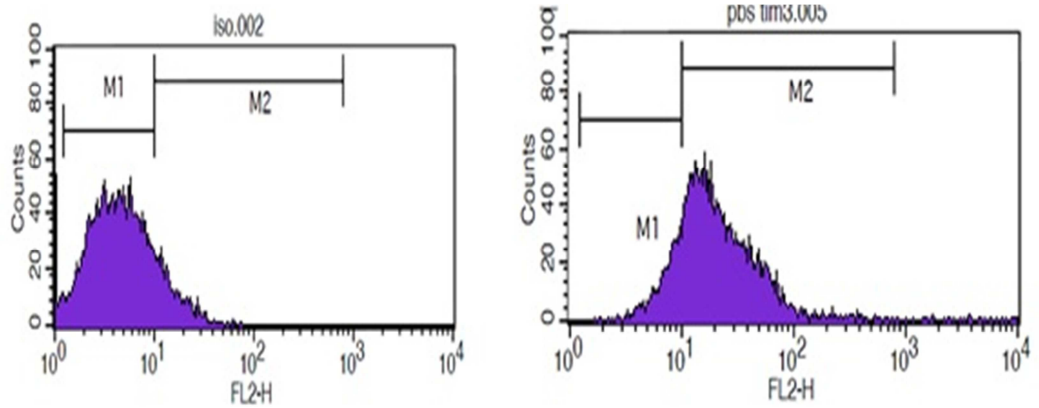
بحث

همزمان با کشف پروتئین‌های جدید، تحقیقات وسیعی در زمینه‌ی شناسایی عملکرد پروتئین شروع شد و در همه‌ی این تحقیقات، به پروتئین خالص به مقدار زیاد برای بررسی ساختار، فعالیت بیوشیمیایی و خصوصیات بیوفیزیکی آن نیاز است.

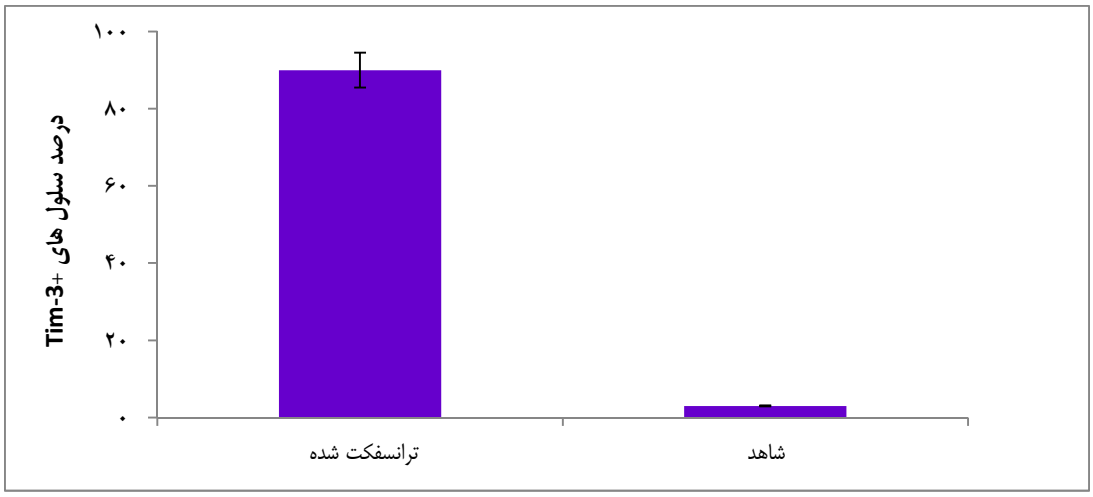
Tim۳ گلیکوپروتئین سطح سلولی است و برای داشتن پروتئین با عملکرد و خصوصیات بیوشیمیایی

و ساختار فضایی مناسب، باید در سیستم‌های بیانی رده‌ی سلولی پستانداران بیان و تخلیص شود. با این که بیان در سیستم‌های بیانی پروکاریوت‌ها از نظر زمان و هزینه، اقتصادی‌تر از سیستم‌های سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد، اما متأسفانه در مورد پروتئین‌های دارای تغییرات پس از ترجمه مانند فسفریلاسیون و گلیکوزیلاسیون، این سیستم بیانی جوابگو نیست؛ چرا که این تغییرات، در ساختار فضایی، عملکرد و خصوصیات آنتی‌ژنیک این پروتئین‌ها تأثیر دارد. از این رو، استفاده از سلول‌های رده‌ی پستانداران مانند CHO امری اجتناب ناپذیر است.

در بعضی از تحقیقات، پروتئین با ساختار فضایی به طور کامل طبیعی نیاز است. برای مثال، در مورد پروتئین‌های غشایی مانند Tim۳، پروتئین خالص شده از غشا یا پروتئین نوترکیب خالص نیز گاهی ساختار فضایی طبیعی را که پروتئین در موقع لنگر انداختن بر سطح غشا دارد، از دست می‌دهد و برای استفاده در برخی تحقیقات بررسی عملکرد یا حتی برای تهیه‌ی آنتی‌بادی‌هایی که اپی‌توپ‌های فضایی را می‌شناسند، مناسب نخواهد بود.



شکل ۶. نمودار فلوسایتومتری بیان پروتئین Tim۳ در سلول‌های ترانسفکت شده و سلول‌های ۲۹۳T ترانسفکت نشده



شکل ۷. میزان نسبی بیان Tim۳ برگرفته از آزمایش‌های متعدد فلوسایتومتری

از مزیت‌های استفاده از این سلول، داشتن ساختار فضایی طبیعی‌تر و وجود اپی‌توپ‌های فضایی است که ممکن است در پروتئین نوترکیب یا خالص شده از غشای سلول وجود نداشته باشد.

با توجه به عدم نیاز پروتئین‌های نمایش داده شده در سطح سلول به فرایندهای تخلیصی، بسیار مقرون به صرفه‌تر از پروتئین نوترکیب می‌باشند. آنتی‌بادی‌ها یا نانوبادی تولیدی حاصل از تزریق این پروتئین‌ها به حیوانات آزمایشگاهی، می‌تواند به منظور درمان و تشخیص بیماری‌ها به کار گرفته شود.

در مورد تحقیقات تهیه‌ی آپتامر بر ضد آنتی‌ژن‌های پروتئینی نیز اگر از روش ستون‌های کروماتوگرافی که آنتی‌ژن بر روی آن کونژوگه می‌شود، استفاده گردد، خرید ستون‌های گران قیمت و مقادیر بالای پروتئین نوترکیب لازم است. در روش Cell SELEX به جای استفاده از ستون کروماتوگرافی، از سلول‌هایی که آنتی‌ژن را بر سطح خود نمایش می‌دهند استفاده می‌گردد و با این کار، پروژه‌ی انتخاب آپتامر بسیار ارزان‌تر و در آزمایشگاه‌هایی که از نظر تجهیزات پیشرفته مانند HPLC (High-performance liquid chromatography) محروم هستند، قابل انجام می‌باشد.

این تحقیق، با هدف تهیه‌ی نانوبادی و انتخاب آپتامر علیه پروتئین Tim۳ انجام شد. از این رو، سلول با بیان بالای Tim۳ در سطح آن نیاز بود. ساخت آپتامر با استفاده از این پروتئین بیان شده، امکان عوارض ناخواسته‌ی دارویی ناشی از واکنش‌های ایمنی را کاهش می‌دهد.

لوکوس ژنی مولکول‌های Tim۳ اولین بار در موش‌های Balb/c مستعد ابتلا به آسم آشکار گشت. در مطالعات انجام گرفته، محققان که در جستجوی کلونی‌های سلولی وابسته به Th۱ بودند، Tim۳ در سطح سلول‌های Th۱ به عنوان نشانگر ویژه‌ی سطح سلولی شناخته شد (۲۴-۲۳).

در تحقیقی مشابه که توسط Chen و همکاران به منظور بررسی عملکرد پروتئین Tim۳ نوترکیب در سلول‌های آپوپتوتیک انجام گرفت، از وکتور بیانی پروکاریوتیک pET۲۸a-TIM۳-EGFP استفاده شد. در این مطالعه، با جمع‌آوری RNA ژن Tim۳ از نمونه‌ی خون محیطی انسان، کتابخانه‌ی cDNA ساخته شد و با ادغام قطعه‌ی TIM۳-۳EGFP در پلاسمید، کلونینگ در سویه‌ی Ecoli B۲۱ انجام شد و به منظور بررسی عملکرد Tim۳ در روند آپوپتوز، از این فیوژن پروتئین استفاده شد (۲۵).

با توجه به نیاز پروتئین GFP (Green fluorescent protein) به عنوان یک سیستم نظارت، به استفاده از میکروسکوپ فلوروسنس و همچنین حساسیت پایین آن در تشخیص سلول‌های مجزا و محدودیت کاربرد در مطالعات In vivo و همچنین استفاده از برچسب His۶ (Hexahistidine)، ممکن است در بیان پروتئین اختلال ایجاد کند.

در پژوهش حاضر، پروتئین غشایی تولید شد که بی‌نیاز از فرایندهای خالص‌سازی و پروتئین‌هایی نظیر GFP می‌باشد. در مطالعات قبلی، فرم ترشحی این پروتئین تولید شده بود. با وجود این پروتیئن‌های غشایی درصد بالایی از پروتئین‌های سلول را شامل می‌شوند و تولید انبوه این پروتئین‌ها حایز اهمیت است. بنابراین تولید فرم غشایی به میزان انبوه، می‌تواند گام مهمی در تحقیقات مربوط باشد. استفاده از سلول ۲۹۳T به

دلیل سهولت انجام ترانسفکشن و رشد سریع، انتخاب مناسبی است. از این رو، در این مطالعه سازه‌ای طراحی شده است تا بتوان پروتئین Tim۳ را در سلول یوکاریوتی کلون کرد و در نتیجه‌ی ادغام سازه‌ی بیانی انتقال یافته در DNA ژنومی سلول‌های هدف ۲۹۳T، بیان طولانی مدت از ژن مورد نظر میسر گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد مونا مبلغ ناصری به شماره‌ی ۳۹۲۵۳۲ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

References

1. Meyers JH, Sabatos CA, Chakravarti S, Kuchroo VK. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. Trends Mol Med 2005; 11(8): 362-9.
2. Anderson AC, Anderson DE. TIM-3 in autoimmunity. Curr Opin Immunol 2006; 18(6): 665-9.
3. Kuchroo VK, Dardalhon V, Xiao S, Anderson AC. New roles for TIM family members in immune regulation. Nat Rev Immunol 2008; 8(8): 577-80.
4. Li S, Peng D, He Y, Zhang H, Sun H, Shan S, et al. Expression of TIM-3 on CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of rheumatoid arthritis. APMIS 2014; 122(10): 899-904.
5. Yeung MY, McGrath M, Najafian N. The emerging role of the TIM molecules in transplantation. Am J Transplant 2011; 11(10): 2012-9.
6. Nagahara K, Arikawa T, Oomizu S, Kontani K, Nobumoto A, Tateno H, et al. Galectin-9 increases Tim-3+ dendritic cells and CD8+ T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions. J Immunol 2008; 181(11): 7660-9.
7. Yan J, Zhang Y, Zhang JP, Liang J, Li L, Zheng L. Tim-3 expression defines regulatory T cells in human tumors. PLoS One 2013; 8(3): e58006.
8. Rodriguez-Manzanet R, DeKruyff R, Kuchroo VK, Umetsu DT. The costimulatory role of TIM molecules. Immunol Rev 2009; 229(1): 259-70.
9. Lee J, Phong B, Egloff AM, Kane LP. TIM polymorphisms--genetics and function. Genes Immun 2011; 12(8): 595-604.
10. Su EW, Lin JY, Kane LP. TIM-1 and TIM-3 proteins in immune regulation. Cytokine 2008; 44(1): 9-13.
11. Vega-Carrascal I, Reeves EP, McElvaney NG. The role of TIM-containing molecules in airway disease and their potential as therapeutic targets. J Inflamm Res 2012; 5: 77-87.
12. Chae SC, Park YR, Shim SC, Yoon KS, Chung HT. The polymorphisms of Th1 cell surface gene Tim-3 are associated in a Korean population with rheumatoid arthritis. Immunol Lett 2004; 95(1): 91-5.
13. Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH, Freeman GJ. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. Nat Rev Immunol 2003; 3(6): 454-62.
14. Pan HF, Zhang N, Li WX, Tao JH, Ye DQ. TIM-3 as a new therapeutic target in systemic lupus erythematosus. Mol Biol Rep 2010; 37(1): 395-8.
15. Li X, Zhao YQ, Li CW, Yuan FL. T cell immunoglobulin-3 as a new therapeutic target for rheumatoid arthritis. Expert Opin Ther Targets 2012; 16(12): 1145-9.
16. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. Immunol Rev 2010; 235(1): 172-89.
17. McMahan RH, Golden-Mason L, Nishimura MI, McMahon BJ, Kemper M, Allen TM, et al. Tim-3 expression on PD-1+ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. J Clin Invest 2010; 120(12): 4546-57.
18. Sakuishi K, Jayaraman P, Behar SM, Anderson AC, Kuchroo VK. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity. Trends Immunol 2011; 32(8): 345-9.
19. Ngiow SF, von SB, Akiba H, Yagita H, Teng MW, Smyth MJ. Anti-TIM3 antibody promotes T cell IFN-gamma-mediated antitumor immunity and suppresses established tumors. Cancer Res 2011; 71(10): 3540-51.
20. Block MS, Markovic SN. The tumor/immune interface: clinical evidence of cancer immunosurveillance, immunoediting and immunosubversion. Am J Immunol 20091: 5(1): 29-49.
21. Zhuang X, Zhang X, Xia X, Zhang C, Liang X,

Gao L, et al. Ectopic expression of TIM-3 in lung cancers: a potential independent prognostic factor for patients with NSCLC. Am J Clin Pathol 2012; 137(6): 978-85.

22. Chae SC, Park YR, Lee YC, Lee JH, Chung HT. The association of TIM-3 gene polymorphism with atopic disease in Korean population. Hum Immunol 2004; 65(12): 1427-31.

23. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. Nature 2002; 415(6871): 536-41.

24. McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, Potter M, Kuchroo VK, Barsh GS, et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. Nat Immunol 2001; 2(12): 1109-16.

25. Chen Z, Qing J, Qin G, Hu L. Construction and characterization of bifunctional TIM-3-EGFP fusion proteins. Protein Expr Purif 2012; 86(1): 1-6.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 20.12.2014
Vol. 32, No. 317, 2nd Week, March 2015
Accepted: 14.02.2015

Producing Recombinant HEK293 T-cells with High Expression of T-cell Immunoglobulin and Mucin Domain-3 (Tim3) Protein

Mona Moballegh-Naseri[1], Hosein Khanahmad PhD[2], Vida Homayouni MSc[3], Mazdak Ganjalikahni-Hakemi PhD[4], Mansour Salehi PhD[2], Ilnaz Rahim-Manesh[1], Razieh Taghizadeh[1], Mahsa Kolahdooz[1]

Original Article

Abstract

Background: T-cell immunoglobulin and mucin domain-3 (Tim3) is known as a marker of cell surface of T-helper-1 (Th1) cell and has a key role in many diseases with cell-mediated immunity. Over expression of Tim3 has reported in autoimmune and atopic diseases. Though, many studies done about this inhibitory help protein molecules, but yet need more research. In research project on Tim3, native protein with proper post translation modification should be provided. In this study, Tim3 was expressed on the surface of HEK293 T-cell line.

Methods: Tim3 expression cassette was amplified from cDNA clone EX-W2682-M67 via polymerase chain reaction (PCR). The PCR product and pHygro plasmid were digested by NheI and MluI restriction enzymes. The linearized pHygro and digested PCR product were ligated together with T4 DNA ligase and transformed into Escherichia coli TOP 10 F'. The resulted pH-Tim3 plasmid was linearized with NheI and transfected into 293T cell line. The transfected cells were positive selected with hygromycin and their genomic DNA was extracted and PCR was done on them to amplify complementary DNA (cDNA) of Tim3. Also, protein expression levels were assessed via flow cytometry.

Findings: The result of PCR on selected cells confirmed integratioin of cDNA clone of Tim3 in genomic DNA. Based on flow cytometry, about 88% of cells were expressed Tim3 sharply.

Conclusion: In order to understand the role and mechanism of Tim3 protein, we need a large amount of purified native Tim3. Prokaryotic expression systems are simpler and cheaper than eukaryotic expression system, but they are not proper system for expression of proteins that modified after translation. Expression of membrane proteins like Tim3 on the surface of cell has even more native conformation in comparison with recombinant Tim3. The cells display Tim3 could be used in antibody, nanobody or aptamer production projects. In this project, we constructed a 293T cell which overexpressed Tim3 on its surface compared to untransfected ones.

Keywords: T-cell immunoglobulin and mucin domain (Tim3), 293T, Recombinant cell

Citation: Moballegh-Naseri M, Khanahmad H, Homayouni V, Ganjalikahni-Hakemi M, Salehi M, Rahim-Manesh I, et al. **Producing Recombinant HEK293 T-cells with High Expression of T-cell Immunoglobulin and Mucin Domain-3 (Tim3) Protein.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(317): 2312-23

1- MSc Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- PhD Student, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Hosein Khanahmad PhD, Email: hossein_khanahmad@yahoo.com