مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۲٤/هفته چهارم فروردین ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۵

ساخت و تعیین خصوصیت سلول نوترکیب HEK با بیان بالای TOSO/FAIM3 و ارزیابی بیان آن

ناهید حیدری هفشجانی[۱]، شمسی نادری[۱]، دکتر رسول صالحی[۲]، دکتر پروانه نیک‌پور[۳]، مهران مدرس صادقی[۴]، زهرا حجازی[۵]، دکتر حسین خان‌احمد[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پروتئین‌های غشایی در فرایندهای سلولی با ارزش شامل انتقال سیگنال، عبور و مرور مواد و ارتباطات سلولی نقش دارند و به منظور درمان بیماری‌ها و اختلالات، مورد هدف داروها قرار می‌گیرند. سیستم‌های بیانی متفاوتی برای تولید میزان زیادی از این پروتئین‌ها به کار رفته‌اند که سلول‌های پستانداران با تولید ساختارهای نزدیک به فرم طبیعی این پروتئین‌ها مناسب‌ترین آن‌ها هستند. TOSO/FAIM3 (Fas apoptosis inhibitory molecule)، یک پروتئین غشایی به شدت حفاظت شده است که نقش مهمی را در بقا، نظارت بر سیستم ایمنی و هموستاز بر عهده دارد. هدف از این مطالعه، بیان TOSO به میزان زیاد در سطح سلول HEK-293T (Human embryonic kidney-293T) می‌باشد.

روش‌ها: وکتور بیانی یوکاریوتیک pEZ-M67-TOSO به منظور تکثیر پلاسمید در باکتری Escherichia coli سویه‌ی TOP10F' ترانسفورم شد. سپس، پلاسمید استخراج شد و با آنزیم محدودالاثر Eco31I مورد هضم آنزیمی قرار گرفت تا پلاسمید خطی شود. پس از آن، سلول‌های HEK-293T با پلاسمید خطی ترانسفکت شدند و به منظور غربالگری سلول‌های پایدار بیان کننده‌ی TOSO، تحت تیمار با هیگرومایسین قرار گرفتند. کلون‌های مقاوم پس از سه هفته تکثیر شدند. سپس، DNA کروموزومی از سلول‌های ترانسفکت شده استخراج شد و حضور cDNA TOSO در ژنوم HEK-293T به وسیله‌ی روش PCR (Polymerase chain reaction) مورد سنجش قرار گرفت. علاوه بر این، برای بررسی میزان بیان TOSO از روش Real-time PCR استفاده گردید.

یافته‌ها: ورود cDNA TOSO در داخل ژنوم سلول‌های انتخاب شده، تأیید گردید. سلول‌های HEK-293T، mRNA TOSO را به میزان متوسط ۱۷۰۰ مولکول در هر سلول بیان کردند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های HEK-293T به دلیل سهولت در ترانسفکشن و رشد سریع، مناسب‌ترین گزینه برای بیان پروتئین می‌باشند. بیان غشایی پروتئین TOSO حتی نسبت به پروتئین نوترکیب خالص شده از سیستم بیانی رده‌ی سلولی پستانداران نیز تاخوردگی طبیعی‌تری دارد. از رده‌ی سلولی HEK-293T ساخته شده در این تحقیق که با بیان بالای TOSO همراه بود، در مطالعات بعدی جهت تعیین خصوصیت و ساختار بیوفیزیکی و بیوشیمیایی آن و تحقیقات دارویی و زیستی می‌توان استفاده نمود.

واژگان کلیدی: TOSO/FAIM3، نوترکیب، رده‌ی سلولی کلیه‌ی جنین انسان

ارجاع: حیدری هفشجانی ناهید، نادری شمسی، رسول صالحی، نیک‌پور پروانه، مدرس صادقی مهران، حجازی زهرا، خان‌احمد حسین. **ساخت و تعیین خصوصیت سلول نوترکیب HEK با بیان بالای TOSO/FAIM3 و ارزیابی بیان آن.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۴): ۸۲-۱۷۱

۱- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۶- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان، پژوهشکده‌ی پیشگیری اولیه از بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین خان‌احمد
Email: hossein_khanahmad@yahoo.com

مقدمه

بررسی پروتئین‌های غشایی به عنوان موضوع جالبی در زمینه‌ی تحقیقات بیولوژی مطرح می‌گردد؛ چرا که که این دسته از پروتئین‌ها در فرایندهای وسیع سلولی از جمله انتقال سیگنال، انتقال مواد و ارتباطات بین سلولی نقش دارند و به همین دلیل در بسیاری از بیماری‌ها و اختلالات سلولی به عنوان هدفی برای داروها و عوامل درمانی به شمار می‌روند (۱). اگرچه پروتئین‌های غشایی ۳۰-۲۰ درصد ژنوم را به خود اختصاص می‌دهند، اما ساختار این پروتئین‌ها کمتر شناخته شده است (۲). در حقیقت، تنها حدود ۲ درصد از ساختار پروتئین‌های موجود در بانک اطلاعاتی پروتئین (Protein data bank یا PDB) به پروتئین‌های غشایی تعلق دارد (۳) که دلیل این کمبود، اطلاعات متعدد است و می‌تواند به این حقیقت مربوط گردد که سطح بیان پروتئین‌های غشایی نوترکیب کمتر از پروتئین‌های سیتوپلاسمی است.

در حالی که پروتئین‌های غشایی فراوان و با پایداری مناسب از قبیل پروتئین‌های غشایی جفت شده با G-، از بافت طبیعی جداسازی شده‌اند، اما بیشتر پروتئین‌های غشایی بیان طبیعی کمی دارند و خالص‌سازی مقادیر کافی این پروتئین‌ها از منابع طبیعی با بازده‌ی کمی همراه است. بنابراین تحقیقات در مورد طیف وسیعی از سیستم‌های بیانی به منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب غشایی برای تعیین خصوصیت بیوفیزیکی و ساختاری این دسته از پروتئین‌ها صورت گرفته است (۴).

TOSO/FAIM3 (Fas apoptotic inhibitory molecule) پروتئین غشای پلاسمایی حاوی یک ناحیه‌ی خارج سلولی است که با دامنه‌ی متغیر ایمونوگلوبولین همولوژی دارد. همچنین، دارای یک ناحیه‌ی سیتوپلاسمی است که شباهت نسبی با سرین- ترئونین فعال شده با FAS دارد. TOSO اولین بار به عنوان مولکول بیان شده بر روی سلول‌های T فعال معرفی گردید و سلول‌های T را از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده محافظت کرد. TOSO این کار را با تأثیر بر روی مسیر سیگنالینگ رسپتور FAS انجام داده، سلول را از آپوپتوز نجات می‌دهد (۵). این مولکول به میزان زیادی بر روی سلول‌های B بیان می‌شود و نقش آن در ایجاد لو کمی CLL (Chronic lymphocyte leukemia) (سرطان لنفوسیت‌های B) مشخص شده است. به علت تمایل بالای TOSO به IgM (Immunoglobulin M)، آن را FCμR نیز نامیده‌اند؛ چرا که TOSO بر روی سلول‌های B، به IgM کونژوگه با آنتی‌ژن‌ها متصل می‌شود و پس از به داخل کشیده شدن آن، توسط TOSO تخریب می‌گردد. از همین خاصیت برای ورود داروهای ضد سرطان به صورت کونژوگه‌های متصل به IgM به درون لنفوسیت‌های B الهام گرفته شده است (۷-۶).

مولکول TOSO در سلول‌های β پانکراس نیز بیان شده است و کاهش میزان آن با دیابت نوع ۲ ارتباط دارد. در دیابت نوع ۲ حجم توده‌ی سلولی سلول‌های β پانکراس کاهش می‌یابد و بیان TOSO منجر به بقای سلول‌های β می‌گردد. در واقع این مولکول، پروتئین مهار کننده‌ی آپوپتوز به واسطه‌ی FAS (FAIM3) نام گرفته است که تنظیم مسیر آپوپتوز القا شده با رسپتور FAS را در بالادست کاسپاز ۸ بر عهده دارد (۸). تحقیقات نشان داده است که آنتی‌بادی‌های ضد TOSO می‌تواند آپوپتوز القا شده با

TNF-α (Tumor necrosis factor-α) را القا نماید (۹). بنابراین، مطالعه و بررسی TOSO به عنوان یک ابزار قدرتمند می‌تواند در شناسایی داروهای درمانی ارزشمند باشد.

با این حال، ویژگی‌های بیوفیزیکی و خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین غشایی TOSO به تحقیقات بیشتری نیاز دارد. روش اصلی جهت تعیین ساختار مولکولی پروتئین‌ها، کریستالوگرافی اشعه‌ی X (X-ray crystallography) و اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیس هسته‌ای (Nuclear magnetic resonance یا NMR) است و برای رسیدن به این هدف، مقادیر فراوانی پروتئین خالص احتیاج است و کابرد سیستم‌های بیانی مطلوب به منظور تولید پروتئین‌های غشایی در مقیاس فراوان می‌تواند مفید باشد (۱۰).

سلول‌های پستانداران برای بیان موفقیت‌آمیز تعداد وسیعی از پروتئین‌های پیچیده از جمله پروتئین‌های غشایی به کار برده می‌شوند که دلیل آن را می‌توان توانایی فوق‌العاده‌ی این سلول‌ها در تغییرات پس از ترجمه‌ای، ماشین انتقال طبیعی و محیط لیپیدی نزدیک به سلول‌های طبیعی دانست (۱۱). این سلول‌ها برای تولید داروهای نوترکیب در حجم فراوان (مانند آنتی‌بادی‌ها) به منظور کاربردهای تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۲). تاکنون پروتئین‌های غشایی عملکردی در سلول‌های HEK-293T (Human embryonic kidney-293T)، CHO (Chinese hamster ovary)، Cos-1 و BHK (Baby Hamster Kidney) (۱۶-۱۳) با موفقیت بیان شده‌اند.

با توجه به مطالب ذکر شده، برای فهم عملکردهای پروتئین‌های غشایی و ساختار و نقش آن‌ها به منظور توسعه و پیشرفت داروها و عوامل درمانی، نیاز به سیستم‌های تولید پروتئین‌های غشایی به میزان فراوان احساس می‌گردد. در تحقیق حاضر رده‌ی سلولی HEK-293T برای بیان پایدار پروتئین غشایی نوترکیب TOSO به کار گرفته شد و بیان TOSO با روش‌های مولکولی سنجش گردید.

روش‌ها

انتقال، تکثیر پلاسمید و هضم آنزیمی: پلاسمید pEZ-M67-TOSO (Gene Copoeia, USA) حاوی cDNA TOSO، پروموتر CMV (Promoter) (Cytomegalovirus) و ژن مقاومت آمپی‌سیلین و هیگرومایسین می‌باشد. به منظور تکثیر پلاسمید مذکور، ابتدا باکتری Escherichia coli سویه‌ی TOP10F' (انستیتو پاستور، ایران) مستعد شده با استفاده از روش شوک گرمایی و توسط روش شیمیایی $CaCl_2$ (کلرید کلسیم) ترانسفورم شد (۱۴). باکتریهای ترانسفورم شده در پلیت LB Agar (Lysogeny broth agar) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین (Roche, Germany) کشت داده شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از انکوباسیون محیط‌های کشت و تهیه‌ی ماتریس در روز بعد، یکی از کلنی‌ها (حاوی پلاسمید pEZ-M67-TOSO) در شرایط استریل برداشت و در محیط کشت مایع LB حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین تلقیح شد و به مدت ۱۶-۱۲ ساعت داخل Shaker انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از این مدت، رسوب باکتریایی با استفاده از سانتریفوژ به مدت ۳ دقیقه و سرعت ۹۰۰۰ دور در

دقیقه تهیه گردید و با استفاده ازکیت استخراج پلاسمید (Feldan, Canada) و بر اساس پروتکل کیت، پلاسمیدها استخراج شد.

پلاسمید pEZ-67-TOSO حاصل از استخراج، ابتدا توسط آنزیم Eco31I (Fermentas) برش داده شد. به منظور مشاهده‌ی نتیجه و اطمینان از عملکرد آنزیم، محصول به دست آمده توسط الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد بررسی گردید. محصول برش آنزیمی در نهایت با استفاده ازکیت Cleanup (Bioneer, Korea) خالص شد.

ترانسفکشن: ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن، تعداد ۱۰۶ × ۵ سلول HEK-293T (انستیتو پاستور، تهران) در یک پلیت ۱۰ سانتی‌متری و در محیط DMEM (Dulbecco's Minimal Eagle Medium) به همراه ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum)، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و دی‌اکسید کربن ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد. زمانی که تراکم سلول‌ها به ۷۰-۶۰ درصد رسید، ترانسفکشن با روش استاندارد رسوب DNA- فسفات کلسیم انجام گرفت.

۴۰ میکروگرم DNA (پلاسمید برش یافته تحت تأثیر آنزیم Eco31I) در ۶۹۴ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل حل شد و ۲۵ میکرولیتر بافر TE1X و ۸۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۲/۵ مولار به آن اضافه و مخلوط گردید. سپس ۸۰۰ میکرولیتر از محلول HBS2X به صورت قطره قطره در حال ورتکس شدن در زمان یک دقیقه به آن اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، مخلوط به دست آمده قطره قطره به سلول‌های موجود در پلیت کشت اضافه و سپس پلیت در انکوباتور نگهداری گردید. ۱۲ ساعت بعد محیط کشت تعویض شد و ۴۸ ساعت بعد ۱۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین (Roche, Germany) به محیط کشت افزوده شد. تیمار سلول‌ها با هیگرومایسین ۲۱ روز به طول انجامید و در نهایت کلون‌های مقاوم به هیگرومایسین تکثیر شدند. ترانسفکشن سلول‌های HEK با پلاسمید خطی، امکان ادغام تصادفی آن با DNA ژنومی سلول‌های HEK و به طور طبیعی بیان پایدار پروتئین TOSO را افزایش می‌دهد.

PCR (Polymerase chain reaction) بر روی DNA ژنومیک کلون‌های باقی‌مانده: تعداد یک میلیون از سلول‌های باقی‌مانده‌ی تحت درمان با هیگرومایسین برداشته شد و DNA ژنومیک آن با استفاده از کیت تخلیص DNA (Genet bio,USA) استخراج گردید. سپس بر روی آن با پرایمرهای جلوبر 5'- TTGGCCACTTTACTTCCTGC-3' و معکوس 5'- AGCTAGGCAGGAACATTAATG-3' که با نرم‌افزار Gene Runner طراحی شده بود، واکنش PCR گذاشته شد.

مقادیر مورد استفاده در واکنش PCR شامل ۵ میکرولیتر 10X PCR buffer، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم به غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر dNTP (Deoxynucleotide) به غلظت ۲۰۰ میکرومولار، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۰/۴ میکرومولار، ۴ میکرولیتر آنزیم و ۱۰۰ نانوگرم (در ۱ میکرولیتر) DNA ژنومی سلول‌های HEK-293T به عنوان الگو در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر بود. تکثیر با استفاده از ترموسایکلر BioRad و با برنامه‌ی Hot Start به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد و

سپس افزودن آنزیم و در ادامه ۳۰ ثانیه در دمای ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱دقیقه و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۳۰ دور در دقیقه و در انتها ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. محصول به دست آمده روی ژل آگاروز ۱ درصد، الکتروفورز و بررسی گردید.

استخراج RNA: RNA از تعداد یک میلیون سلول HEK طبیعی و ترانسفکت شده، با استفاده از کیت RNX (سینا ژن، ایران) و بر اساس دستورالعمل کیت استخراج شد. سپس ۱ میکرولیتر از آن برداشته (با رقت ۱:۱۰۰) و جذب آن در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. همچنین، کیفیت RNA با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز مورد سنجش قرار گرفت.

سنتز cDNA: پیش از سنتز cDNA و جهت حذف آلودگی احتمالی به DNA، RNA با (۱۰U) ۱ میکرولیتر DNaseI (Thermo Scientific, USA) انکوبه شد. به این ترتیب که ۱ میکروگرم از RNA با ۱ میکرولیتر از DNase I و ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X مربوط مخلوط گردید و حجم نهایی با آب تهدید شده با DEPC (Diethylpyrocarbonate) به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط ابتدا ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته، سپس ۱ میکرولیتر از محلول ۲۵ میلی‌مولار EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد تا آنزیم DNaseI غیر فعال گردد. cDNA در این مرحله با استفاده از کیت First strand cDNA synthesis (Thermo Scientific, USA) و پرایمر Oligo (dT) و بر اساس پروتکل کیت ساخته شد و پس از اتمام مراحل، cDNA سنتز شده برای نگهداری طولانی مدت در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت.

Real-time PCR: مخلوط واکنش جهت انجام Real-time PCR شامل ۲۵ نانوگرم از نمونه‌ی cDNA، ۱۰ میکرولیتر SYBR Green PCR master mix thermo scientific (USA) و ۰/۷ میکرولیتر (۰/۳۵ میکرومولار) از هر جفت پرایمرها بود. واکنش Real-time PCR در دستگاه Thermal cycler StepOnePlus ABI (USA) انجام شد. بیان ژن هدف با توجه به سطح بیان ژن β-actin به عنوان ژن کنترل در نظر گرفته شد. توالی پرایمرهای TOSO و β-actin به ترتیب PF-TOSO 5’- TGAATGTCCACAGTGAATACG -3’، PR-TOSO 5’-AGCTGGTGTGGTAACTCTGG-3’ و PF β-actin 5’- TTCGAGCAAGAGATGGCCA-3’ و PR β-actin 5’- CACAGGACTCCATGCCCAG-3’ می‌باشد.

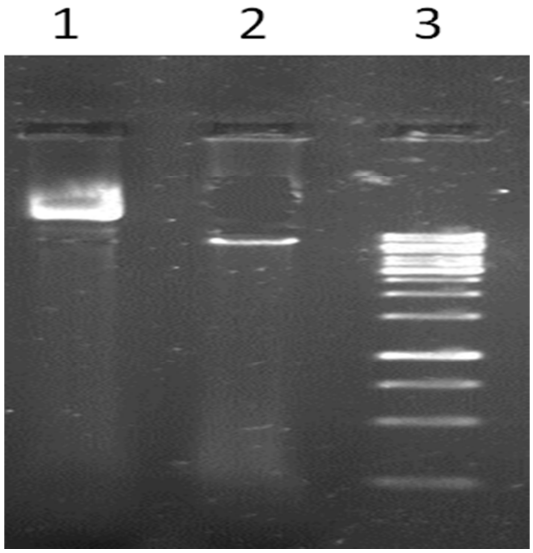
پرایمرهای ژن هدف با Gene Runner طراحی شدند. در ضمن، تمام واکنش‌ها در سه تیوب (۳ بار تکرار) انجام و داده‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ محاسبه گردید. از طرف دیگر، جهت به دست آوردن تعداد مولکول mRNA TOSO در هر سلول، روش Absolute و منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا غلظت پلاسمید pEZ-M67-TOSO با نانودراپ خوانده شد و تعداد مولکول پلاسمید در هر میکرولیتر با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین برای

محاسبه‌ی تعداد نسخه‌ی DNA دو رشته‌ای محاسبه گردید و با رقیق‌سازی، سریال غلظت‌های 10^{3} تا 10^{10} ساخته شد و روی این غلظت‌ها و نمونه‌ی cDNA واکنش Real-time PCR گذاشته و منحنی استاندارد رسم گردید.

جهت تحلیل داده‌ها آزمون آماری t بر اساس سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها

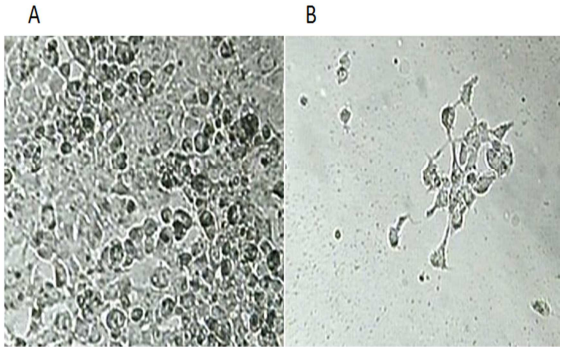
به دنبال مراحل تکثیر پلاسمید pEZ-M67-TOSO در باکتری Escherichia coli سویه‌ی 'TOP10F، پلاسمید استخراج و هضم شده با آنزیم Eco31I بر روی ژل آگارز ۱ درصد و در کنار نشانگر وزن مولکولی یک کیلو باز الکتروفورز شد (شکل ۱).



شکل ۱. برش پلاسمید pEZ-M67-TOSO با آنزیم Eco31I
پلاسمید حلقوی (قسمت ۱)، پلاسمید خطی شده (7214bp)
(قسمت ۲) و نشانگر ۱ کیلو باز (شرکت فرمتاز) (قسمت ۳)

کشت و جداسازی سلول‌های HEK-293T مقاوم به داروی هیگرومایسین

بیان پایدار سلول‌های HEK-293T زمانی اتفاق می‌افتد که ادغام تصادفی پلاسمید برش یافته به داخل DNA ژنومیک سلول‌های HEK-293T رخ دهد. بعد از ۲۱ روز، شش کلنی سلولی در نقاط مختلف پلیت زنده ماندند و تکثیر شدند (شکل ۲).



شکل ۲. سلول‌ها یک روز بعد از ترانسفکشن (قسمت A) و زنده ماندن کلون‌های مقاوم به هیگرومایسین پس از ۱۴ روز (قسمت B)

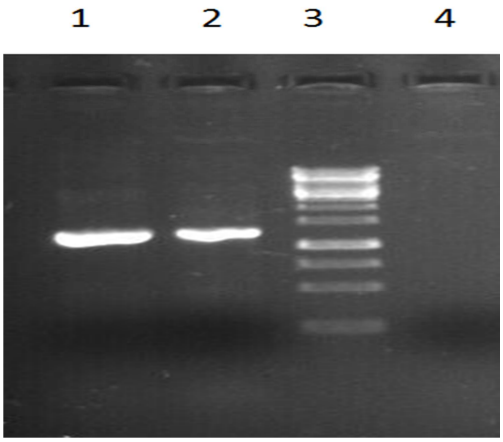
تأیید ادغام pEZ-M67-TOSO در DNA ژنومی HEK-293T توسط PCR

نتیجه‌ی فرایند PCR بر روی DNA ژنومیک، تکثیر باند ۱۱۷۴ جفت باز را نشان داد که تأیید کننده‌ی ادغام تصادفی پلاسمید خطی pEZ-M67-TOSO در DNA ژنومی سلول‌های HEK-293T می‌باشد (شکل ۳).

سنجش بیان cDNA TOSO با استفاده از Real-time PCR

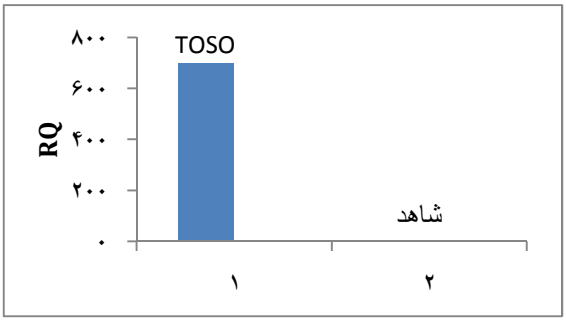
پس از استخراج RNA از سلول‌های HEK-293T طبق پروتکل ذکر شده، غلظت، خلوص و کیفیت RNA به ترتیب با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر نانودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز مورد سنجش

قرار گرفت و نشان داد که RNAهای استخراج شده از سلول‌ها از کیفیت مطلوبی برخوردار می‌باشند. همچنین، نتایج آزمون بیان mRNA TOSO توسط فرایند Real-time PCR در سلول‌های HEK-293T ترانسفکت شده با پلاسمید خطی pEZ-M67-TOSO نسبت به سلول های ترانسفکت نشده، نشان داد که این میزان ۷۱۵/۵ برابر شده است (شکل ۴).

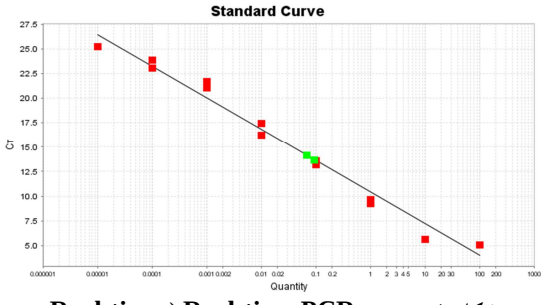


شکل ۳. الکتروفورز محصول PCR (Polymerase chain reaction) بر روی DNA ژنومیک سلول‌های HEK-293T (Human embryonic kidney-293T) فرایند PCR بر روی DNA سلول‌های ترانسفکت شده (۱۱۷۴ جفت باز) تکثیر شد (قسمت‌های ۱ و ۲)، نشانگر ۱ کیلو باز (شرکت فرمنتاز) (قسمت ۳) و PCR بر روی DNA سلول‌های ترانسفکت نشده که باندی مشاهده نشد (قسمت ۴).

نتیجه‌ی بررسی مطلق تعداد mRNA بیان شده در هر سلول با روش آنالیز Absolute و رسم منحنی استاندارد با نمونه‌های پلاسمیدی دارای تعداد کپی مشخص نشان داد که در هر سلول ترانسفکت شده، حدود ۱۷۰۰ مولکول mRNA از ژن TOSO بیان می‌شود (شکل ۵). نمونه‌های cDNA سلول ترانسفکت شده دارای میانگین تعداد $۸/۵ \times ۱۰^{۶}$ در یک میکرولیتر cDNA می‌باشد. بنابراین در ۲۰ میکرولیتر، $۱/۷ \times ۱۰^{۷}$ سلول بیان می‌شود. به دلیل این‌که از هر ۱۰ میکرولیتر RNA، مقدار ۲۰ میکرولیتر cDNA ساخته می‌شود و در کل ۵۰ میکرولیتر RNA از تعداد یک میلیون سلول تخلیص می‌گردد، پس $۱/۷ \times ۱۰^{۸}$ مولکول RNA برای TOSO در یک میلیون سلول و در هر سلول ۱۷۰۰ مولکول mRNA TOSO بیان می‌شود. ژن‌هایی که بیان بالایی در سلول دارند، آن‌هایی هستند که بیشتر از ۱۰۰۰ تا ۱۲۰۰۰ مولکول mRNA در هر سلول دارند و در مورد TOSO می‌توان گفت که در این طیف قرار می‌گیرد و بیان بالایی دارد.



شکل ۴. نتایج بررسی بیان mRNA TOSO توسط Real-time PCR (Real-time Polymerase chain reaction) (افزایش ۷۱۵/۵ برابری)



شکل ۵. نتیجه‌ی Real-time PCR (Real-time Polymerase chain reaction) با منحنی استاندارد و محاسبه‌ی قطعی تعداد مولکول mRNA بیان شده در هر سلول

با محاسبات انجام شده در هر سلول، ۱۷۰۰۰مولکول mRNA TOSO بیان می‌گردد.

بحث

پروتئین غشایی TOSO/FAIM3، نقش مهمی را در سیستم ایمنی از جمله تسهیل همکاری بین سلول‌های ایمنی T و B، فعالیت کمپلمان و افزایش سایتوتوکسیسیتی سلولی وابسته به آنتی‌بادی ایفا می‌کند (۷). به همین دلیل در ایجاد بعضی از بیماری‌ها از جمله سرطان (۱۷) و بیماری‌های خودایمنی (۱۸) دخالت دارد. زمان زیادی از شناسایی این پروتئین نمی‌گذرد و مانند بیشتر پروتئین‌های دیگر، برای بررسی ساختار و عملکرد در ابتدای شناسایی، به مقادیر زیادی از پروتئین به شکل خالص و با ساختار و تاخوردگی طبیعی نیاز است. افزایش سطح بیان پایدار TOSO در رده‌ی سلولی ترانسفکت شده، قدمی اساسی در جهت پیشرفت‌های بیشتر در تعیین خصوصیت بیوفیزیکی، تعیین ساختار و مطالعه‌ی عملکرد پروتئین به منظور طراحی داروهای مؤثر می‌باشد.

مسأله‌ای که برای بیان پروتئین غشایی TOSO وجود دارد، همان مشکل شایع برای بیان سایر پروتئین‌های غشایی یعنی سطح بیان پایین ذاتی این دسته از پروتئین‌ها است که آنالیز آن‌ها را با مشکل مواجه می‌کند. سیستم‌های بیانی متنوعی برای بیان این دسته از پروتئین‌های غشایی به کار رفته است که از آن جمله می‌توان به بیان در باکتری‌ها (۱۹)، مخمرها (۲۰)، سلول‌های حشرات (۲۱)، سلول‌های جانوری (۲۲) و حتی سیستم‌های فاقد سلول (۲۳) اشاره کرد؛ در حالی که هر کدام از این سیستم‌ها مزایای منحصر به فرد خود را دارند. سلول‌های جانوری به منظور تولید پروتئین‌های غشایی نسبت به سیستم‌های بیانی دیگر، دارای عملکرد مناسبی می‌باشند (۲۴).

در مطالعه‌ی حاضر، امکان بیان پروتئین غشایی TOSO در سلول‌های HEK-293T بررسی گردید. این سلول‌ها به طور وسیع به منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۱)؛ چرا که به راحتی رشد کرده، تکثیر می‌شوند و خیلی آسان ترانسفکت می‌گردند. به عبارت دیگر، در بیان بالای یک پروتئین در سیستم‌های بیانی گاهی عدم موفقیت وجود دارد. به طور مثال، در بیان پروتئین با سیستم‌های کارامد وکتورهای pET، گاهی شبیه‌سازی سازه در چندین نوع از وکتور pET ضروری است تا یکی از آن‌ها بیان بدهد. گاهی بیان بالای یک پروتئین می‌تواند باعث اثرات سوئی در سلول شود و یا برعکس باعث افزایش رشد سلول گردد. در مطالعه‌ی حاضر سلول‌های ترانسفکت شده به طور واضح سرعت رشد بیشتری نسبت به سلول‌های ترانسفکت نشده داشتند؛ هرچند برای اثبات این ادعا به انجام آزمایش‌هایی مانند MTT assay نیاز است، اما پلیت‌های کشت سلول ترانسفکت شده با وجود فشار ناشی از درمان با هیگرومایسین خیلی سریع‌تر به تعویض محیط و پاساژ به صورت مکرر نیاز داشتند.

مرحله‌ی اولیه به منظور بیان پروتئین غشایی TOSO، ورود DNA خارجی (که حاوی cDNA TOSO می‌باشد) به درون ژنوم سلول‌های HEK-293T می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر ورود DNA خارجی به درون کروموزوم سلول‌های HEK-293T به صورت تصادفی صورت گرفت و

این فرایند توسط شکست‌های ذاتی ژنوم سلول انجام شد. لازم به ذکر است که در این مکانیسم ماشین ترمیم DNA سلولی دخالت دارد (۲۵). بیان عملکردی پروتئین‌های غشایی در سلول‌های HEK-293T پیش‌تر در مورد تعدادی از این پروتئین‌ها نشان داده شده است که بیشتر از اعضای خانواده‌ی گیرنده‌های همراه با G-proteins بوده‌اند (۱۰، ۲۶-۲۷).

بیان پروتئین‌های نوترکیب پیچیده همچون پروتئین‌های غشایی، منجر به ایجاد استرس درونی بر روی سلول می‌شود که ممکن است بر رشد و بقای سلول تأثیرگذار باشد. این امر در مورد سلول‌های HEK-293T بیان کننده‌ی پروتئین‌های غشایی نیز صادق است (۲۸). بیان پروتئین‌های غشایی در سطح فراوان ممکن است منجر به تجمع پروتئین‌ها در شبکه‌ی آندوپلاسمی و فعال شدن پاسخ پروتئین‌های محافظتی همچون (Unfolded protein response) UPR گردد (۲۹)؛ در حالی که UPR نوعی مکانیسم محافظتی برای سلول به شمار می‌رود و این فرایند می‌تواند منجر به آپوپتوز و مرگ سلولی شود (۳۰). با این حال، پروتئین غشایی FAIM3 نوعی پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک می‌باشد که در شروع مسیر سیگنالینگ مهار آپوپتوز سلولی نقش دارد. نقش این پروتئین غشایی پیش‌تر در ایجاد رده‌ی سلولی CHO پایدار تأیید شده است؛ به طوری که سلول‌های CHO مهندسی شده با ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک درون سلولی و غشایی، بقای طولانی مدتی نسبت به همان رده‌ی سلولی طبیعی دارند و بنابراین در مدت زمان بیشتری محصول مورد نظر را تولید می‌نمایند. حتی ثابت شده است که سلول‌های مهندسی شده‌ی CHO توسط FAIM و در شرایط القای خاص، عملکرد بهتری نسبت به سایر سلول‌های مهندسی شده توسط دیگر ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک دارند (۳۱).

از سلول HEK-293T با بیان فراوان FAIM3 می‌توان به عنوان یک رده‌ی سلولی مهندسی شده برای تولید سایر پروتئین‌های ترشحی نوترکیب در تحقیقات آینده بهره برد. همچنین، از رده‌ی سلولی ایجاد شده می‌توان در تهیه‌ی آنتی‌بادی مونوکلونال، نانوبادی و آپتامر استفاده کرد. با توجه به این‌که در پروتئین‌های غشایی نوترکیب خالص شده نیز گاهی ساختار طبیعی پروتئین از بین می‌رود و بعضی از اپی‌توپ‌های فضایی فقط در فرم لنگر انداخته در غشای پروتئین امکان بروز می‌یابند، بنابراین، استفاده از فرم نمایش سطح سلولی این پروتئین‌ها علاوه بر حفظ ساختار و اپی‌توپ‌های طبیعی این پروتئین‌ها در پروژه‌های تولید آنتی‌بادی و آپتامر، فرایندهای وقت‌گیر و هزینه‌بر تخلیص پروتئین را میانبر می‌زند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد ناهید حیدری هفشجانی با شماره‌ی ۳۹۲۱۹۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد.

References

1. Tan S, Tan HT, Chung MC. Membrane proteins and membrane proteomics. Proteomics 2008; 8(19): 3924-32.

2. Wallin E, von HG. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. Protein Sci

1998; 7(4): 1029-38.
3. Mao L, Vaiphei ST, Shimazu T, Schneider WM, Tang Y, Mani R, et al. The E. coli single protein production system for production and structural analysis of membrane proteins. J Struct Funct Genomics 2010; 11(1): 81-4.
4. Andrell J, Tate CG. Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. Mol Membr Biol 2013; 30(1): 52-63.
5. Song Y, Jacob CO. The mouse cell surface protein TOSO regulates Fas/Fas ligand-induced apoptosis through its binding to Fas-associated death domain. J Biol Chem 2005; 280(10): 9618-26.
6. Kubagawa H, Oka S, Kubagawa Y, Torii I, Takayama E, Kang DW, et al. Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans. J Exp Med 2009; 206(12): 2779-93.
7. Kaveri SV, Silverman GJ, Bayry J. Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. J Immunol 2012; 188(3): 939-45.
8. Dharmadhikari G, Muhle M, Schulthess FT, Laue S, Oberholzer J, Pattou F, et al. TOSO promotes beta-cell proliferation and protects from apoptosis. Mol Metab 2012; 1(1-2): 70-8.
9. Nguyen XH, Lang PA, Lang KS, Adam D, Fattakhova G, Foger N, et al. Toso regulates the balance between apoptotic and nonapoptotic death receptor signaling by facilitating RIP1 ubiquitination. Blood 2011; 118(3): 598-608.
10. Tate CG, Haase J, Baker C, Boorsma M, Magnani F, Vallis Y, et al. Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. Biochim Biophys Acta 2003; 1610(1): 141-53.
11. Chaudhary S, Pak JE, Pedersen BP, Bang LJ, Zhang LB, Ngaw SM, et al. Efficient expression screening of human membrane proteins in transiently transfected Human Embryonic Kidney 293S cells. Methods 2011; 55(4): 273-80.
12. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat Biotechnol 2004; 22(11): 1393-8.
13. Eifler N, Duckely M, Sumanovski LT, Egan TM, Oksche A, Konopka JB, et al. Functional expression of mammalian receptors and membrane channels in different cells. J Struct Biol 2007; 159(2): 179-93.
14. Prather PL, McGinn TM, Claude PA, Liu-Chen LY, Loh HH, Law PY. Properties of a kappa-opioid receptor expressed in CHO cells: interaction with multiple G-proteins is not specific for any individual G alpha subunit and is similar to that of other opioid receptors. Brain Res Mol Brain Res 1995; 29(2): 336-46.
15. Chelikani P, Reeves PJ, Rajbhandary UL, Khorana HG. The synthesis and high-level expression of a beta2-adrenergic receptor gene in a tetracycline-inducible stable mammalian cell line. Protein Sci 2006; 15(6): 1433-40.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
17. Vire B, David A, Wiestner A. TOSO, the Fcmicro receptor, is highly expressed on chronic lymphocytic leukemia B cells, internalizes upon IgM binding, shuttles to the lysosome, and is downregulated in response to TLR activation. J Immunol 2011; 187(8): 4040-50.
18. Brenner D, Brustle A, Lin GH, Lang PA, Duncan GS, Knobbe-Thomsen CB, et al. Toso controls encephalitogenic immune responses by dendritic cells and regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111(3): 1060-5.
19. Bruni R, Kloss B. High-throughput cloning and expression of integral membrane proteins in Escherichia coli. Curr Protoc Protein Sci 2013; 74: Unit.
20. Parker JL, Newstead S. Method to increase the yield of eukaryotic membrane protein expression in Saccharomyces cerevisiae for structural and functional studies. Protein Sci 2014; 23(9): 1309-14.
21. Bouvier M, Menard L, Dennis M, Marullo S. Expression and recovery of functional G-protein-coupled receptors using baculovirus expression systems. Curr Opin Biotechnol 1998; 9(5): 522-7.
22. Ames R, Nuthulaganti P, Fornwald J, Shabon U, van der Keyl H, Elshourbagy N. Heterologous expression of G protein-coupled receptors in U-2 OS osteosarcoma cells. Receptors Channels 2004; 10(3-4): 117-24.
23. Klammt C, Lohr F, Schafer B, Haase W, Dotsch V, Ruterjans H, et al. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. Eur J Biochem 2004; 271(3): 568-80.
24. Sarramegna V, Talmont F, Demange P, Milon A. Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. Cell Mol Life Sci 2003; 60(8): 1529-46.
25. Domingue JC, Ao M, Sarathy J, George A, Alrefai WA, Nelson DJ, et al. HEK-293 cells expressing the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR): a model for studying regulation of Cl- transport. Physiol

Rep 2014; 2(9).
26. Chaudhary S, Pak JE, Gruswitz F, Sharma V, Stroud RM. Overexpressing human membrane proteins in stably transfected and clonal human embryonic kidney 293S cells. Nat Protoc 2012; 7(3): 453-66.
27. Wu W, Wang Y, Deng XL, Sun HY, Li GR. Cholesterol down-regulates BK channels stably expressed in HEK 293 cells. PLoS One 2013; 8(11): e79952.
28. Cudna RE, Dickson AJ. Endoplasmic reticulum signaling as a determinant of recombinant protein expression. Biotechnol Bioeng 2003; 81(1): 56-65.
29. Knowlton AA. Life, death, the unfolded protein response and apoptosis. Cardiovasc Res 2007; 73(1): 1-2.
30. Wong DC, Wong KT, Nissom PM, Heng CK, Yap MG. Targeting early apoptotic genes in batch and fed-batch CHO cell cultures. Biotechnol Bioeng 2006; 95(3): 350-61.
31. Wurtele H, Little KC, Chartrand P. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. Gene Ther 2003; 10(21): 1791-9.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 03.12.2014
Vol. 33, No. 324, 4th Week, April 2015
Accepted: 14.02.2015

Construction and Characterization of Recombinant HEK Cell Over-Expressing TOSO/FAIM3 and Evaluation of its Expression

Nahid Heidari-Hafshejani MSc[1], Shamsi Naderi MSc[1], Rasoul Salehi PhD[2], Parvaneh Nikpour PhD[3], Mehran Modares-Sadeghi MSc[4], Zahra Hejazi[1], Hossein Khanahmad PhD[5]

Original Article

Abstract

Background: Integral membrane proteins involve in a variety of valuable cellular processes including signal transduction, transport and cell-to-cell communication. Thus, due to their importance, are targeted to treatment of diseases or disorders. To achieve this goal, it is necessary to obtain adequate membrane proteins. A variety of expression systems have been used to overexpress these proteins but mammalian cells can produce membrane proteins structurally close to natural form of them and are favourable for this purpose. TOSO/FAIM3 (Fas Apoptosis Inhibitory Molecule), highly conserved membrane protein, playing important role in cell survival, immune surveillance, and homeostasis and in this study was overexpressed on HEK-293T membrane.

Methods: Eukaryotic expression vector pEZ-M67-TOSO was transformed into Escherichia coli top 10F' strain to multiply. Then, the plasmid was extracted and digested with restriction enzyme Eco31I to make a linear plasmid. Subsequently, HEK-293T cells were transfected with linear plasmid and treated with hygromycin to select TOSO expressing stable cells. After three weeks, resistant colons were expanded, Chromosomal DNA and total RNA were extracted and the presence of TOSO-cDNA in HEK-293T genome and the expression level of TOSO were evaluated using polymerase chain reaction (PCR) and Real-time PCR methods, respectively.

Findings: The integration of TOSO expressing cassette in HEK-293T genome was confirmed. HEK-293 cells expressed 1700 mRNA TOSO molecule/cell which was in the range of protein with abundant expression.

Conclusion: Mammalian cells represent membrane proteins in desirable form versus other expression systems. For this reason, we used HEK-293T cells to overexpress transmembrane TOSO protein. In this investigation, we successfully constructed the HEK-293 cell line with stable TOSO overexpression, which will facilitate further researches to characterize biophysical and biochemical structure and function of TOSO and pharmaceutical biological researches about it.

Keywords: HEK-293T, Recombinant TOSO/FAIM3, Overexpression

Citation: Heidari-Hafshejani N, Naderi Sh, Salehi R, Nikpour P, Modares-Sadeghi M, Hejazi Z, et al. **Construction and Characterization of Recombinant HEK Cell Over-Expressing TOSO/FAIM3 and Evaluation of its Expression.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(324): 171-82

1- Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- PhD Candidate, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Pediatric Inherited Diseases Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-Communicable Diseases, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Hossein Khanahmad PhD, Email: hossein_khanahmad@yahoo.com