مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۸۲/هفته چهارم اردیبهشت ماه ۱۳۹۱
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۱۵

بهبود بیان پروتئین اینترفرون بتای انسانی در سیستم بیان‌گذرای سلول‌های CHO DG44 با ایجاد یک تغییر در اولویت کدونی توالی ناپایدار کننده‌ی انتهای ژن اینترفرون بتا (CRID)

زهرا بزی[۱]، دکتر حسن کربکندی[۲]، دکتر بتول هاشمی بنی[۳]، دکتر زهره حجتی[۴]، امین مرادی حسن‌آباد[۱]، دکتر محمدرضا مراثی[۵]

چکیده

مقدمه: بهینه‌سازی تولید اینترفرون بتا در سلول‌های CHO (Chinese hamster ovary) به عنوان یک میزبان بیانی که قادر به تولید پروتئین دارویی با کیفیت بالا می‌باشد، جهت کاهش قیمت و سرعت تولید این پروتئین نوترکیب دارویی از اهمیت زیادی برخوردار است. هدف این مطالعه، بررسی تأثیر پایداری mRNA به واسطه‌ی ایجاد یک تغییر در اولویت کدونی در ناحیه‌ی ناپایدارکننده‌ی انتهای پروتئین اینترفرون بتا (CRID یا Coding region instability determinant) و بررسی اثر این موتاسیون‌ها بر روی میزان بیان‌گذرای سلول‌های CHO به عنوان فاکتوری در راستای بهبود بیان ژن بود.

روش‌ها: با استفاده از جدول اولویت کدونی (هامستر چینی) Cricetulus griseus، ۴ موتاسیون مورد نیاز برای ایجاد یک اولویت کدونی در توالی CRID ژن اینترفرون بتای انسانی طراحی شد. با روش SOEing PCR (Polymerase chain reaction-splicing by overlapping extension) در ناحیه‌ی CRID از ژن اینترفرون بتا موتاسیون‌های مورد نظر ایجاد شد و به وسیله‌ی کیت Express in® درون سلول‌های CHO ترانسفکت گردید. میانگین میزان اینترفرون بتای تولید شده توسط سلول‌های CHO ترانسفکت شده با ژن موتانت اینترفرون بتا با استفاده از کیت ELISA مخصوص این ماده با میانگین میزان اینترفرون بتای تولید شده توسط سلول‌های CHO ترانسفکت شده با ژن طبیعی مقایسه گردید.

یافته‌ها: موتاسیون‌های انجام شده به وسیله‌ی بررسی ژل و توالی‌یابی قطعات حاصل تأیید گردید. موتاسیون‌های حاصل جهت ایجاد یک اولویت کدونی در توالی CRID پس از تراسفکت کردن ژن موتانت در سلول‌های CHO سبب افزایش معنی‌دار ۲/۹ برابری ($P < ۰/۰۵$) در میزان اینترفرون بتای تولید شده توسط سلول‌های CHO ترانسفکت شده با ژن موتانت نسبت به میزان اینترفرون بتای تولید شده توسط سلول‌های CHO ترانسفکت شده با ژن طبیعی گردید.

نتیجه‌گیری: موتاسیون‌های مدنظر با موفقیت انجام گردید و نشان داده شد که انجام این جهش‌ها در توالی ناپایدار کننده‌ی انتهایی CRID می‌تواند به صورت معنی‌داری باعث افزایش پایداری و در نتیجه افزایش غلظت اینترفرون تولید شده در محیط کشت شود. این موتاسیون‌ها جدید بودند و تأثیر قابل توجه آن‌ها نیز به اثبات رسید. در مجموع، نتایج این تحقیق جالب توجه و کاربردی به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: اینترفرون بتا، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، Codon Bias، CRID

مقدمه

اینترفرون بتا (IFNβ) یک گلیکوپروتئین کروی با ۱۶۶ اسید آمینه است که ۲۰ درصد آن را بنیان‌های قندی تشکیل می‌دهند (۱). از IFNβ در کلینیک به طور

۱ گروه علوم تشریحی و بیولوژی ملکولی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲ استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳ استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴ گروه زیست شناسی دانشکده ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۵ دانشیار، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران۲ استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسن کربکندی
Email: korbekandi@pharm.mui.ac.ir

مؤثری به عنوان خط اول برای درمان و بهبود علایم Multiple sclerosis استفاده می‌شود (۴-۲). همچنین مطالعات زیادی نشان داده است که از IFNβ می‌توان برای درمان بیماری‌های خودایمنی (۵)، مهار تکثیر سلولی و مهار رگ‌زایی و در نتیجه درمان سرطان (۷-۶) و درمان عفونت‌های ویروسی (۹-۸) استفاده کرد.

امروزه فرم نوترکیب IFNβ بیشتر توسط باکتری‌ها و سلول‌های CHO (Chinese hamster ovary) تولید می‌شود، ولی IFNβ تولیدی در باکتری که به نام rhIFN-β1b شناخته می‌شود، کارایی پایین‌تری نسبت به فرم گلیکوزیله دارد (۱۰). همچنین تزریق مداوم آن نیز ایجاد اثرات جانبی در فرد بیمار می‌کند (۱۱). ولی حرکت الکتروفورزی پروتئین تولید شده در سلول‌های CHO، که به نام rhIFN-β1a شناخته می‌شود، بر روی SDS PAGE مشابه اینترفرون انسانی می‌باشد. الگوی گلیکوزیلاسیون این پروتئین دارای بیشترین شباهت با فرم طبیعی IFNβ است و در بدن غیر ایمونوژن و فعال می‌باشد. به همین دلیل سلول‌های CHO میزبان ترجیحی برای تولید این پروتئین نوترکیب است (۱۲).

در این میان بیان گذرا تکنولوژی جدیدی است که به تازگی برای تولید سریع و زیاد پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس صنعتی مورد توجه قرار گرفته است (۱۳). این سیستم نیازی به بیان پایدار و فرایند طولانی و وقت‌گیر انتخاب کلنی پایدار ندارد و خطر آلودگی و تغییر رده‌ی سلولی به دلیل استفاده‌ی درازمدت از آن نیز وجود ندارد. به همین دلیل تلاش‌های زیادی برای بهینه‌سازی و افزایش مقیاس تولید پروتئین‌های نوترکیب در این سیستم صورت گرفته است (۱۴).

برای این منظور کارهای زیادی مانند بهینه‌سازی وکتور بیانی، بهینه‌سازی شرایط تولید، افزایش قدرت تولیدکنندگی سلول و بهینه‌سازی محیط کشت برای بهبود بیان پروتئین IFNβ در این سیستم صورت گرفته است (۱۶-۱۵).

با اطلاعات روزافزونی که در مورد مکانیسم تنظیم بیان ژن‌ها به دست می‌آید، مشخص شده است که فرایند پردازش ژن یکی از مراحل مهم در تنظیم بیان ژن پس از رونویسی و کنترل میزان بیان پروتئین در سیستم سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد. میزان رونویسی، ویرایش اولیه، انتقال mRNA و میزان تخریب mRNA تعیین کننده‌ی میزان بیان پروتئین مورد نظر در سلول‌های پستانداران است (۱۷).

از مشکلات تولید زیاد IFNβ در سلول‌های پستانداران وجود توالی‌های ناپایدار کننده‌ی غنی از AU (AU rich elements یا ARE) در 3'-UTR و ناحیه‌ی ناپایدار کننده‌ی انتهای پروتئین IFNβ (CRID یا Coding region instability determinant) این ژن می‌باشد (۱۸). این توالی‌ها حاوی تکرارهایی از توالی ۵ تای AUUUA می‌باشند که به نظر می‌رسد مسؤول پایداری و تنظیم بیان این mRNA باشند (۱۹).

حذف مستقل هر کدام از این نواحی باعث پایداری نسبی mRNA این ژن و حذف هر دوی آن‌ها باعث افزایش قابل توجه در نیمه عمر mRNA ژن IFNβ می‌گردد (۱۸). همچنین مطالعات نشان داده است که نواحی ARE در IFNβ سبب یک فرایند آدنیلاسیون غیر همزمان می‌گردد که مختص خانواده‌ی دوم از توالی ARE می‌باشد. مطالعات حذفی نشان‌دهنده‌ی دخالت توالی ۳۲ نوکلئوتیدی داخل ناحیه‌ی کدکننده‌ی ژن CRID به همراه ناحیه‌ی موجود در 3′-UTR در کوتاه شدن توالی دم پلی A هستند.

www.mui.ac.ir

این پدیده مستقل از ترجمه و مستقل از فرایند تحریک می‌باشد (۲۰). به دلیل این که در فرایند تولید پروتئین IFNβ نمی‌توان انتهای کد کننده‌ی ژن را حذف کرد، بهینه‌سازی کدونی تکنیک جدیدی است که در آن از زوال‌پذیری کدون‌های اسیدهای آمینه و وجود ۶۱ کد برای ۲۰ اسید آمینه جهت بهبود و افزایش کارایی بیان پروتئین مورد نظر در موجودات زنده‌ی مختلف می‌توان استفاده کرد (۲۴-۲۱).

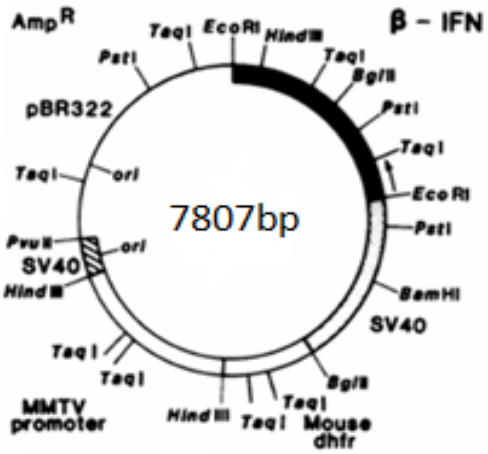
بهینه‌سازی کدونی شامل حذف توالی‌های تکراری و مهار کننده مثل عناصر غنی از AU و ساختارهای ثانویه‌ی RNA، جایگاه‌های برشی که باعث تأثیر بر روی میزان بیان mRNA مورد نظر می‌شود و مطابقت دادن اولویت کدونی اسید آمینه با محتوای tRNA سلول مورد نظر می‌شود که باعث افزایش بیان پروتئین در نظر گرفته شده می‌گردد (۲۷-۲۵). از این رو از تغییر اولویت کدونی برای حذف نواحی ناپایدار کننده و در نتیجه افزایش پایداری mRNA و بهبود بیان پروتئین استفاده شده است (۲۹-۲۸، ۱۷). با توجه به این مطالب هدف از این مطالعه، بهبود بیان IFNβ با تغییر اولویت کدونی بر روی ناحیه‌ی انتهای توالی کد کننده‌ی پروتئین IFNβ (CRID) در سیستم بیان‌گذرای سلول‌های CHO بود.

روش‌ها

پلاسمید و ژن IFNβ انسانی (rhIFN-β):

در این مطالعه از پلاسمید pSVM استفاده گردید (شکل ۱). این وکتور یک پلاسمید کلونینگ و بیانی با طول ۶۴۷۵ bp است که در سیستم سلول‌های یوکاریوتی مورد استفاده قرار گرفته است و مارکر انتخابی آن برای کلونینگ در پروکاریوت‌ها ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و برای سیستم‌های یوکاریوتی ژن دهیدروفولات رودکتاز می‌باشد. ژن IFNβ انسانی با طول ۱۴۵۳ نوکلئوتید در جایگاه آنزیمی EcoRI این پلاسمید کلون می‌شود. علاوه بر ژن IFNβ انسانی، پروموتور آن نیز در پلاسمید مورد نظر وارد شده است که بدون القا قادر به بیان است (۱۰).

ساختار پلاسمید pSVM + IFNβ:



شکل ۱. ساختار پلاسمید pSVM که ژن IFNβ در آن کلون شده است.

طراحی پرایمر:

پس از مشخص کردن توالی ناپایدارکننده‌ی انتهای پروتئین IFNβ (۳۰، ۲۰) با استفاده از جدول اولویت کدونی هامستر چینی (Cricetulus griseus)، ۴ موتاسیون انتخاب شد و ۲ جفت پرایمر برای Polymerase chain reaction-) SOEing PCR (splicing by overlapping extension با استفاده از نرم‌افزار Generuuner® با توالی‌های زیر طراحی و برای سنتز به شرکت تکاپو زیست فرستاده شد. این پرایمرها باعث ایجاد دو قطعه‌ی ۵۷۱ bp و ۹۰۰ bp تایی از ژن IFNβ می‌شوند.

www.mui.ac.ir

F1 = GGAATTCTCAGGTCGTTTGC
R1 = TCAGCCTGTTGATGAAGTAGAAG
F2 = CTACTTCATCAACAGGCTGACAG
R2 =GGAATTCTAACTTTATGATGAGAGAA

پرایمرهای F1 و R1 باعث ایجاد یک قطعه‌ی ۹۰۰ نوکلئوتیدی و پرایمرهای F2 و R2 باعث ایجاد یک قطعه‌ی ۵۷۱ نوکلئوتیدی از ژن IFNβ می‌شوند.

ایجاد موتاسیون به روش SOEing PCR:

این روش یکی از روش‌های بسیار کارامد در ایجاد موتاسیون می‌باشد که برای ایجاد موتاسیون از ۳ مرحله PCR جدا استفاده می‌کند. برای ایجاد موتاسیون‌های مورد نظر از آنزیم PFU polymerase ® (Fermentase) که دارای خاصیت تصحیح اشتباه است، استفاده گردید؛ اما برای Set up کردن ابتدایی PCR از آنزیم Taq polymerase (Fermentase)® استفاده شد. واکنش PCR مرحله‌ی اول و دوم طبق جدول ۱ برای هر یک از قطعات صورت گرفت.

با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل (۲۷۸۰۴) Qiagene® دو قطعه‌ی ۵۷۱ و ۹۰۰ جفت بازی از ژل استخراج گردید و به نسبت مساوی مخلوط شد. این مخلوط در واکنش سوم PCR برای متصل کردن قطعات مورد استفاده قرار گرفت. در ۱۰ سیکل اول بدون پرایمر، آنیله شدن در دمای ۴۸ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام پذیرفت و در ۲۰ سیکل دوم با استفاده از پرایمرهای F1/R2، آنیله شدن در دمای ۴۹ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد.

کلون کردن ژن موتاسیون یافته در پلاسمید pSVM:

ازآن جایی که که دو انتهای ژن اینترفرون موتاسیون یافته دارای جایگاه برش آنزیم EcoR1 می‌باشد، با استفاده از برش توسط آنزیم EcoR1، ژن مورد نظر طی واکنش اتصال (Ligation) وارد پلاسمید pSVM گردید و در باکتری E.coli XL-1 Blue پروتکل ترانسفورماسیون کتاب Sambrook ترانسفورم شد (۳۰). پس از استخراج پلاسمیدهای حاوی ژن توسط کیت استخراج پلاسمید (۱۲۱۲۵) Qiagene، پلاسمیدها برای تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست فرستاده شدند.

کشت سلول‌ها:

سلول‌های $CHO\text{-}DG_{44}$ از انسیتو پاستور ایران خریداری شد. برای کشت این سلول‌ها از محیط پایه‌ی DMEM High glucose (Gipco) که به آن ۱۰ درصد سرم گاوی (Fetal bovine serum یا FBS) (Gipco) و ۰/۱ درصد آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین/پنی‌سیلین (Sigma) اضافه شده بودند، استفاده شد. علاوه بر محیط پایه مقادیر ۰/۱ میلی‌مول هیپوگزانتین (Sigma) و ۰/۰۱ میلی‌مول تیمیدین (Sigma) به این محیط کشت افزوده گردید. این سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار گاز CO_2 ۵ درصد به صورت سوسپانسیون کشت و پاساژ داده شدند.

جدول ۱. واکنش PCR مرحله‌ی اول و دوم برای هر یک از قطعات

نام قطعه	پرایمرها	Annealing (درجه‌ی سانتی‌گراد)	Mgso4 (میلی‌مول)	dNTPs (میلی‌مول)	پرایمر (پیکومول)
۹۰۰ Bp	F1/R1	۵۲	۱/۵	۰/۰۲	۱۰
۵۷۱ Bp	F2/R2	۵۰	۱/۵	۰/۰۲	۱۰

www.mui.ac.ir

ترانسفکشن پلاسمیدها درون سلول‌های CHO:

پلاسمیدهای حاوی ژن موتاسیون یافته و ژن طبیعی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید K-۱۰۰۰ (Genet bio) استخراج گردید و سپس با استفاده از کیت (Express-in) ،open biosystem (ETR4621) به داخل سلول‌ها ترانسفکت گردیدند. ترانسفکشن در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای با مقادیر $۱۰^{۳}$ × ۱۰ سلول، ۰/۵ میکروگرم پلاسمید و ۲/۵ میکروگرم Reagent ترانسفکشن انجام شد.

برای این منظور پس از شمارش سلول‌ها با لام نئوبار مقادیر مناسب سلول برای سه تکرار محاسبه گردید و طبق پروتکل کیت ترانسفکشن مراحل ترانسفکشن انجام شد.

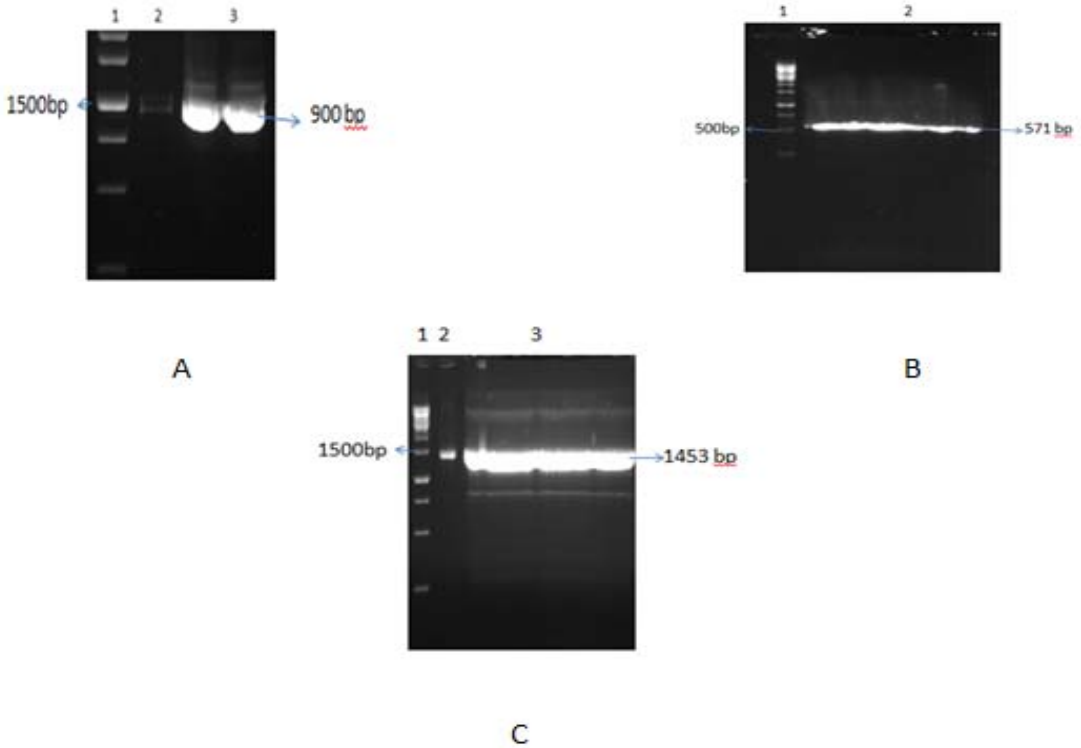
اندازه‌گیری غلظت IFNβ:

برای این منظور مایع رویی محیط کشت پس از ۴۸ ساعت جمع‌آوری و با استفاده از کیت ELISAی IFNβای انسانی KAC1201 (Invitrogene) فرم فعال IFNβ در محیط کشت اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

ایجاد موتاسیون به روش SOEing PCR

برای ارزیابی تغییر اولویت کدونی نیاز به ایجاد ۴ موتاسیون در ناحیه‌ی CRID ژن IFNβ بود. PCR با استفاده از SOEing PCR طی سه مرحله صورت پذیرفت (شکل ۲). تصاویر ژل‌های A، B و C در شکل ۲، نتایج ژل الکتروفورز قطعات اول، دوم و



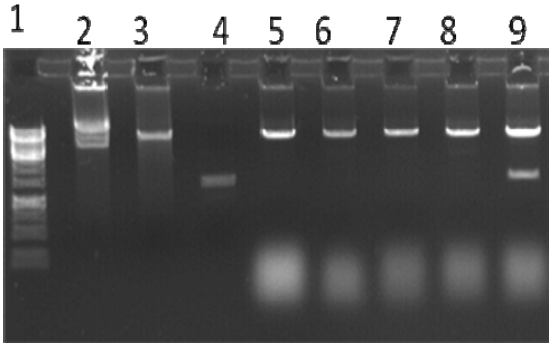
شکل ۲. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز قطعات حاصل از ۳ مرحله‌ی SOEing PCR. ژل A، قطعه‌ی حاصل از PCR مرحله‌ی اول را نشان می‌دهد که ستون اول مربوط به Ladder 1kb و ستون دوم و سوم مربوط به قطعات bp ۹۰۰ می‌باشد. ژل B قطعه‌ی حاصل از PCR دوم را نشان می‌دهد که ستون اول مربوط به Ladder 1kb و ستون دوم مربوط به قطعه‌ی bp ۵۷۱ می‌باشد. ژل C قطعه‌ی کامل IFNβ حاوی موتاسیون می‌باشد. ستون اول مربوط به Ladder 1kb و ستون دوم مربوط به ژن IFNβای طبیعی و ستون سوم مربوط به ژن IFNβای موتاسیون یافته‌ی سرهم بندی شده می‌باشد.

www.mui.ac.ir

نهایی را نشان می‌دهند. همان طور که مشاهده می‌شود قطعات با اندازه‌های مورد نظر ایجاد شده بودند.

کلون کردن ژن موتاسیون یافته در پلاسمید:

شکل ۳ نشان دهنده‌ی هضم پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری‌هایی که از مرحله‌ی لیگاسیون به دست آمده‌اند با آنزیم EcoR1 می‌باشد. این کار باعث خارج شدن ژن از پلاسمید می‌شود و جهت تأیید کلون شدن ژن‌های موتاسیون یافته در پلاسمید pSVM صورت پذیرفت.



شکل ۳. هضم پلاسمیدهای استخراج شده بعد از مرحله‌ی لیگاسیون با آنزیم EcoR1. ستون اول مربوط به Ladder 1kb، ستون دوم مربوط به پلاسمید برش نخورده، ستون سوم مربوط به پلاسمید برش خورده، ستون چهارم مربوط به ژن اینترفرون، ستون پنجم تا هشتم مربوط به پلاسمیدهای برش خورده‌ی بدون ژن و ستون نهم مربوط به پلاسمید برش خورده‌ی حاوی ژن موتاسیون یافته می‌باشد.

تأیید انجام موتاسیون به وسیله‌ی تعیین توالی:

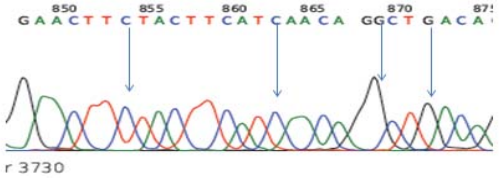
سازه‌ی (Construct) ساخته شده حاوی ژن IFNβ موتاسیون یافته برای تأیید ایجاد موتاسیون‌ها به شرکت تکاپو زیست فرستاده شد و توسط دستگاه LTD sequenceing تعیین توالی گردید. نتایج حاصل نشان دهنده‌ی موفقیت آمیز بودن SOEing PCR در ایجاد موتاسیون‌های مورد نظر بود. در شکل‌های ۴ و ۵ می‌توان توالی طبیعی را با توالی موتاسیون یافته که تعیین توالی شده‌اند، مقایسه نمود.

مقایسه‌ی میانگین بیان IFNβ انسانی در ژن طبیعی و موتانت:

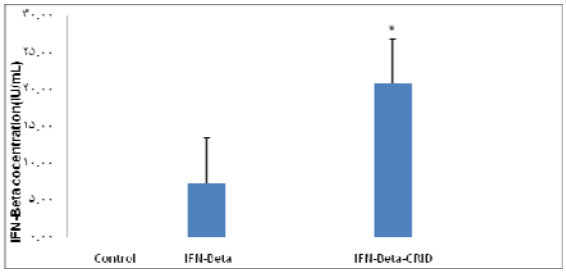
موتاسیون‌های حاصل جهت ایجاد یک اولویت کدونی در توالی CRID و ترانسفکت کردن ژن موتانت در سلول‌های CHO سبب افزایش معنی‌دار ۲/۹ برابری ($P < ۰/۰۵$) در میزان IFNβ تولید شده نسبت به میزان IFNβ تولید شده توسط سلول‌های CHO ترانسفکت شده با ژن طبیعی گردید (شکل ۶).

GAACTTTTACTTCATTAACAGACTTACA

شکل ۴. توالی CRID ژن IFNβ طبیعی. نوکلئوتیدهای که زیر آن خط کشیده شده است، نوکلئوتیدهای هدف برای ایجاد موتاسیون می‌باشند.



شکل ۵. نتایج تعیین توالی ژن موتاسیون یافته در ناحیه‌ی CRID. نوکلئوتیدهایی که با پیکان به آن اشاره شده است، موتاسیون‌های هدف ایجاد شده می‌باشند.



شکل ۶. غلظت IFNβ تولید شده در محیط کشت حاوی سلول‌های تراسفکت شده به وسیله‌ی ژن طبیعی و موتاسیون یافته در ناحیه‌ی CRID. غلظت IFNβ به وسیله‌ی روش ELISA و با استفاده از منحنی کالیبراسیون IFNβ استاندارد تعیین گردید. تعداد تکرار آزمایش ۳ بار و معنی‌دار بودن (*) با استفاده از آزمون One-way ANOVA تعیین گردید ($n = ۳$، $P < ۰/۰۵$).

بحث

در این مطالعه با در نظر گرفتن قسمتی از توالی که باعث ناپایداری mRNA ژن IFNβ می‌گردید (۳۱، ۲۰) و پس از بررسی بر روی مکانیسم و نحوه‌ی عملکرد آن، موتاسیون‌های مناسب برای غیر فعال‌سازی این ناحیه‌ی ناپایدار کننده طراحی شد و با استفاده از یک جفت پرایمر به طور همزمان ۴ موتاسیون طراحی شده به صورت موفقیت‌آمیزی در ژن انجام گردید. در این مطالعه نشان داده شد که با ایجاد تغییرات محدودی در اولویت کدونی بدون تغییر در توالی اسید آمینه‌ای در توالی موجود در انتهای پروتئین IFNβ می‌توان میزان بیان IFNβ را در سیستم بیان گذرا بهبود بخشید. این موضوع به دلیل کاهش محتوای AU در توالی ناپایدار کننده‌ی ژن اینترفرون است که پیش از این مشخص شده بود باعث ناپایداری ژن IFNβ می‌گردد (۱۹–۱۸). مطالعات قبلی در مورد این ژن نشان داده بود که حذف این نواحی غنی از AU باعث بهبود پایداری mRNA می‌شود (۲۰–۱۸).

درک صحیح از مکانیسم‌ها و توالی‌های مهم درگیر در فرایند پردازش ژن و ویرایش اولیه و انتقال mRNA و نیمه عمر mRNA به عنوان فاکتورهای تعیین کننده در میزان بیان پروتئین مورد نظر در سلول‌های پستانداران حایز اهمیت هستند (۱۷).

با شناسایی این مکانیسم‌ها و توالی‌های درگیر در آن می‌توان با ایجاد کمترین تغییرات در ساختار mRNA و تحت‌الشعاع قرار دادن برهم‌کنش‌های mRNA با سایر فاکتورهای سلولی، این توالی‌های کاهنده در میزان بیان پروتئین را حذف یا از کارایی آن‌ها کاست. همان طور که پیش از این اشاره شد بهینه‌سازی کدونی رویکردد جدیدی است که یکی از اهداف آن حذف این عنصر کاهنده در ژن مورد نظر و در نتیجه بهبود میزان بیان پروتئین است (۲۷–۲۵).

در مطالعات قبلی در مورد ژن‌های دیگر، از بهینه‌سازی کدونی برای کاهش سطح دی‌نوکلئوتید AU و در نتیجه غیر فعال‌سازی توالی‌های ناپایدار کننده‌ی موجود در آن‌ها استفاده شده است. افزایش پایداری mRNA، موجب بهبود بیان پروتئین مربوط گردیده است (۲۵–۲۴، ۱۷).

تفسیر علت افزایش غلظت IFNβی تولیدی در این مطالعه را شاید بتوان به دلیل بهبود پایداری mRNA به دلیل افزایش نیمه عمر mRNA دانست. بدین ترتیب میزان در دسترس قرار گرفتن آن توسط دستگاه پروتئین‌سازی سلول بالا می‌رود و در نتیجه میزان بیان آن در سلول افزایش می‌یابد.

با تحقیقاتی که در مورد تنظیم بیان ژن IFNβ صورت گرفته است، در کنار استفاده از دیگر فاکتورها برای بهبود بیان این پروتئین می‌توان از بهینه‌سازی کدونی برای حذف و غیر فعال‌سازی هر دو توالی ناپایدار کننده‌ی ژن IFNβ استفاده کرد و تأثیر آن را هم بر روی میزان پایداری mRNA و همچنین بر روی میزان بیان ژن IFNβ در سیستم بیان گذرا و همین طور سیستم بیان پایدار سنجید.

نتیجه‌گیری

موتاسیون‌های مد نظر با موفقیت انجام گردید و نشان داده شد که انجام این جهش‌ها در توالی ناپایدار کننده‌ی انتهایی (CRID) می‌تواند به صورت معنی‌داری باعث افزایش پایداری و در نتیجه افزایش غلظت اینترفرون تولید شده در محیط کشت شود. این موتاسیون‌ها جدید بودند و تأثیر قابل توجه آن‌ها نیز به اثبات رسید. در کل، نتایج این تحقیق جالب توجه و کاربردی به نظر می‌رسد.

www.mui.ac.ir

References

1. Karpusas M, Whitty A, Runkel L, Hochman P. The structure of human interferon-beta: implications for activity. Cell Mol Life Sci 1998; 54(11): 1203-16.
2. Weinstock-Guttman B, Ramanathan M,Zivadinov R. Interferon-beta treatment for relapsing multiple sclerosis. Expert Opin Biol Ther 2008; 8(9): 1435-47.
3. Corboy JR, Goodin DS, Frohman EM. Disease-modifying Therapies for Multiple Sclerosis. Curr Treat Options Neurol 2003; 5(1): 35-54.
4. Goldberg LD, Edwards NC, Fincher C, Doan QV, Al-Sabbagh A, Meletiche DM. Comparing the cost-effectiveness of disease-modifying drugs for the first-line treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. J Manag Care Pharm 2009; 15(7): 543-55.
5. Meyer O. Interferons and autoimmune disorders. Joint Bone Spine 2009; 76(5): 464-73.
6. Sims TL, McGee M, Williams RF, Myers AL, Tracey L, Hamner JB, et al. IFN-beta restricts tumor growth and sensitizes alveolar rhabdomyosarcoma to ionizing radiation. Mol Cancer Ther 2010; 9(3): 761-71.
7. Taylor KL, Leaman DW, Grane R, Mechti N, Borden EC, Lindner DJ. Identification of interferon-beta-stimulated genes that inhibit angiogenesis in vitro. J Interferon Cytokine Res 2008; 28(12): 733-40.
8. Haasbach E, Droebner K, Vogel AB, Planz O. Low-dose interferon Type I treatment is effective against H5N1 and swine-origin H1N1 influenza A viruses in vitro and in vivo. J Interferon Cytokine Res 2011; 31(6): 515-25.
9. Arase Y, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Suzuki Y, Kawamura Y, et al. Efficacy and safety of combination therapy of natural human interferon beta and ribavirin in chronic hepatitis C patients with genotype 2 and high virus load. Intern Med 2010; 49(11): 965-70.
10. Mc Cormick FP, Innis MA, Ringold GM. Human interferon β (IFN-β) produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells. [US patent; NO: 5795779]. 1988. [Online]. Available from: URL: http://patents.justia.com/1998/05795779.html
11. Malucchi S, Sala A, Gilli F, Bottero R, Di SA, Capobianco M, et al. Neutralizing antibodies reduce the efficacy of betaIFN during treatment of multiple sclerosis. Neurology 2004; 62(11): 2031-7.
12. Conradt HS, Egge H, Peter-Katalinic J, Reiser W, Siklosi T, Schaper K. Structure of the carbohydrate moiety of human interferon-beta secreted by a recombinant Chinese hamster ovary cell line. J Biol Chem 1987; 262(30): 14600-5.
13. Baldi L, Hacker DL, Adam M, Wurm FM. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. Biotechnol Lett 2007; 29(5): 677-84.
14. Muller N, Derouazi M, Van TF, Wulhfard S, Hacker DL, Jordan M, et al. Scalable transient gene expression in Chinese hamster ovary cells in instrumented and non-instrumented cultivation systems. Biotechnol Lett 2007; 29(5): 703-11.
15. Han YK, Koo TY, Lee GM. Enhanced interferon-beta production by CHO cells through elevated osmolality and reduced culture temperature. Biotechnol Prog 2009; 25(5): 1440-7.
16. Fischer D, Bernard A, Ducommun P, Rossi M. Process for the preparation of glycosylated interferon beta. [European Patent Application EP1917276]. 2008. [Online]. Available from: URL: http://www.freepatentsonline.com/EP1917276.html
17. Hung F, Deng L, Ravnikar P, Condon R, Li B, Do L, et al. mRNA stability and antibody production in CHO cells: improvement through gene optimization. Biotechnol J 2010; 5(4): 393-401.
18. Raj NB, Pitha PM. 65-kDa protein binds to destabilizing sequences in the IFN-beta mRNA coding and 3' UTR. FASEB J 1993; 7(8): 702-10.
19. Kruys V, Wathelet M, Poupart P, Contreras R, Fiers W, Content J, et al. The 3' untranslated region of the human interferon-beta mRNA has an inhibitory effect on translation. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84(17): 6030-4.
20. Paste M, Huez G, Kruys V. Deadenylation of interferon-beta mRNA is mediated by both the AU-rich element in the 3'-untranslated region and an instability sequence in the coding region. Eur J Biochem 2003; 270(7): 1590-7.
21. Woo JH, Liu YY, Mathias A, Stavrou S, Wang Z, Thompson J, et al. Gene optimization is necessary to express a bivalent anti-human anti-T cell immunotoxin in Pichia pastoris. Protein Expr Purif 2002; 25(2): 270-82.
22. Wu L, Barry MA. Fusion protein vectors to increase protein production and evaluate the immunogenicity of genetic vaccines. Mol Ther 2000; 2(3): 288-97.
23. Te'o VS, Cziferszky AE, Bergquist PL, Nevalainen KM. Codon optimization of xylanase gene xynB from the thermophilic bacterium Dictyoglomus thermophilum for expression in the filamentous fungus Trichoderma reesei. FEMS Microbiol Lett 2000; 190(1): 13-9.
24. Valencik ML, McDonald JA. Codon optimization markedly improves doxycycline regulated gene expression in the mouse heart. Transgenic Res 2001; 10(3): 269-75.

25. van Gaal EV, Hennink WE, Crommelin DJ, Mastrobattista E. Plasmid engineering for controlled and sustained gene expression for nonviral gene therapy. Pharm Res 2006; 23(6): 1053-74.
26. Duan J, Antezana MA. Mammalian mutation pressure, synonymous codon choice, and mRNA degradation. J Mol Evol 2003; 57(6): 694-701.
27. Graf M, Scho¨dl T, Wagner R. Rationals of gene design and de novo gene constructions. In: Fu P, Latterich M, Panke S, editors. Systems biology and synthetic biology.Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2009.
28. Anson DS, Dunning KR. Codon-optimized reading frames facilitate high-level expression of the HIV-1 minor proteins. Mol Biotechnol 2005; 31(1): 85-8.
29. Fath S, Bauer AP, Liss M, Spriestersbach A, Maertens B, Hahn P, et al. Multiparameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene expression. PLoS One 2011; 6(3): e17596.
30. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. 382-5.
31. Khabar KS, Young HA. Post-transcriptional control of the interferon system. Biochimie 2007; 89(6-7): 761-9.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 30, No 182 4th week, May 2012 Received: 15.1.2012 Accepted: 3.4.2012

Improvement of Interferon-Beta Production in Transient Expression System of CHO DG44 by a Codon Bias Change in Instability Sequence (CRID) of C-terminal of Interferon Beta Gene

Zahra Bezi[1], Hassan Korbekandi PharmD, PhD[2], Batool Hashemibeni PhD[3], Zohreh Hojjati PhD[4], Amin Moradi Hassanabad[1], Mohammad Reza Marasi PhD[5]

Abstract

Background: Improvement of mRNA stability and therefore, production of interferon beta (IFNβ) in Chinese hamster ovary (CHO) cell, as a recombinant protein expression system, is very important. The aim of this study was to investigate this effect by creating a codon bias change in instability sequence located in C-terminal of interferon beta protein (Coding region instability determinant or CRID).

Methods: Mutations were designed in 4 points, according to codon bias table of *Cricetulus griseus*, using polymerase chain reaction/splicing by overlapping extension (SOEing PCR) method inside the CRID of interferon beta gene. The concentration of interferon beta in the medium of Chinese hamster ovary cell was determined using ELISA test kit.

Findings: The mutations were verified by gel-electrophoresis and sequencing the resultant DNA. The mutations in resulted in a significant (2.9 times) increase in interferon-β concentration ($P < 0.05$).

Conclusion: The mutations in CRID could significantly increase the stability of mRNA and the resultant Interferon β concentration in the medium. These mutations were novel and their effectiveness was proved.

Keywords: Interferon beta, Polymerase chain reaction/splicing by overlapping extension (SOEing PCR), C-terminal of interferon beta protein (CRID), Codon bias, Chinese hamster ovary

[1] Department of Anatomy and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Genetics & Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[4] Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
[5] Associate Professor, Department of Epidemiology, School of Public Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Hassan Korbekandi PharmD, PhD, Email: korbekandi@pharm.mui.ac.ir