دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال نوزدهم– شماره ۱۰۰
شهریور ۱۳۹۱

تهیه سازه‌های مناسب به‌منظور بیان ژن اینترفرون گامای انسانی در *Leishmania tarentolae*

نویسندگان: نوشین داودی[1*]، محمدمهدی عطارپور یزدی[2]،اعظم همتی[3] و حسین سلطانی نژاد[3]

۱. استادیار- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲. مربی- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳. کارشناس ارشد مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی- انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: نوشین داودی **Email: davoudi@pasteur.ac.ir**

دریافت: ۹۱/۳/۳۰
آخرین اصلاح‌ها: ۹۱/۶/۲۹
پذیرش: ۹۱/۷/۱۱

چکیده

مقدمه و هدف: افزایش کاربردهای درمانی برای اینترفرون گامای انسانی نوترکیب (hrIFNγ) که یک سایتوکین پیش‌التهابی ضدویروسی است، موجب گسترش روش‌های بهینه‌سازی تولید آن شده‌است؛ در این مطالعه، تولید این گلیکوپروتئین در سیستم یوکاریوتی تک‌سلولی **Leishmania tarentolae** که از مارمولک **tarentolae annularis** به‌دست‌می‌آید، برای بیان ژن هترولوگ مورد بررسی قرارگرفته‌است.

مواد و روش‌ها: به‌منظور تکثیر cDNA ژن IFNγ از روش RT-PCR روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تحریک‌شده با فیتوهماگلوتینین یک فرد ایرانی سالم استفاده‌شد و به‌منظور بیان پروتئین hrIFNγ، cDNA تکثیرشده در دو کاست بیانی کلون شد. به نحوی که هر کاست بیانی دارای یک کپی از ژن hIFNγ بود؛ این کاست‌های بیانی با روش الکتروپوریشن در جایگاه ژن RNA ریبوزومی (ssu) .L tarentolae وارد شدند. پس از ترانسفورم، کلون‌های ترانسفورم‌شده در حضور آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی انتخاب‌شدند.

نتایج: سازه‌های مورد نیاز بیان اینترفرون گامای انسانی در سلول‌های **L. tarentolae** تهیه و به داخل سلول انگل وارد شد و کارایی سازه‌ها، با تکنیک وسترن بلات تأییدشد.

نتیجه‌گیری: تاکنون انواع مختلفی از سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی به‌عنوان سیستم‌های بیانی در تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده‌شده‌اند ولی به دلیل ویژگی‌هایی، اغلب در بیان این گلیکوپروتیین ناموفق بوده‌اند. سیستم به‌کاررفته در این مطالعه از خصوصیاتی ویژه ازقبیل سرعت رشد بالا، شرایط کشت ارزان و گلیکوزیلاسیون مناسب گلیکوپروتیین‌ها بهره‌مند است که می‌تواند برای تولید پروتئین نوترکیب به‌کاررود.

واژگان کلیدی: اینترفرون گامای انسانی نوترکیب، جایگاه ریبوزومی (ssu)، لیشمانیا تارنتولی

مقدمه

تاکنون انواعی مختلف از سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی ازجمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، حشرات، سلول‌های پستانداران، گیاهان و حیوانات ترانس‌ژن به‌عنوان سیستم‌های بیانی به‌منظور تولید پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرارگرفته‌اند (۱ و ۲)؛ به‌طور کلی در باکتری‌ها به دلیل اینکه قادر نیستند باندهای دی‌سولفیدی گلیکوپروتئین‌ها و شاخه‌های گلیکان بسازند، سیستم بیان پروتئین آنها به‌خوبی و به طرزی صحیح انجام‌نمی‌گیرد؛ همچنین، تلاش‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های حشره و ساکارومایسس سرویزیه نیز به دلیل ساختار غیرطبیعی پروتئین‌ها، ترشح ضعیف در محیط کشت و گلیکوزیلاسیون زیاد چندان رضایت‌بخش نیست (۳)؛ بنابراین وجود یک سیستم بیان یوکاریوتی جایگزین، به‌منظور حل مشکلات یادشده و تولید پروتئین‌های نوترکیب ضروری می‌نماید.

خانواده تریپانوزوماتیدا شامل چندین نوع پارازیت روی انسان است که پارازیت‌های اصلی آن شامل تعدادی از گونه‌های جنس لیشمانیا و تریپانوزوما هستند (۴). از سال ۱۹۸۶ نشان‌داده‌شد که Leishmania protozoan یک تریپانوزوماتید فلاژل‌دار است که می‌تواند در بیان ژن‌های خارجی استفاده‌شود (۴ و ۵). در میان خانواده تریپانوزوماتیدا (L.tarentolae) Leishmania tarentolae یک پارازیت غیربیماری‌زا است که از نوعی مارمولک به‌دست‌آمده و به‌عنوان یک سیستم بیان یوکاریوتی مستعد توسعه‌یافته‌است که باعث بیان بیشتر اریتروپروتئین‌ها و فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن بافتی می‌شود (۶، ۷ و ۸). اینترفرون گامای انسانی (hIFNγ)، یک گلیکوپروتئین ترشحی با وزن مولکولی ۲۵KD است که دو سایت مستعد گلیکوزیلاسیون دارد (۹)؛ این گلیکوپروتئین ترشحی، محصول لنفوسیت T فعال‌شده و Natural killer cells بوده، به دلیل اینکه یک سایتوکین پیش‌التهابی ضدویروسی است، کاربردهای درمانی گوناگونی دارد. در سال‌های ۱۹۸۲ تا ۱۹۹۶، پروتئین IFNγ بیان‌شده در Ecoli (همان‌طورکه در گذشته اشاره‌شد)، قادر به انجام تغییرهای پس از ترجمه به‌منظور گلیکوزیله‌کردن محصول Pr نبود (۱۰ و ۱۱)؛ در مطالعه‌ای دیگر در سال ۱۹۸۳، ژن اینترفرون گاما در ساکارومایسس سرویزیه تحت کنترل فسفوگلیسرات کیناز (PGK) کلون شد؛ اما میزان بیان، چندان رضایت‌بخش نبود (۱۲)؛ همانند مخمر، میزان بیان hIFNγ در سلول‌های CHO (chinese hamster ovary) نیز چندان مورد انتظار نبود (۱۳). در مطالعه حاضر کلونینگ و بیان cDNA ژن hIFNγ برای پی‌بردن به میزان کاربرد پروتوزوآها در تولید Pr دارویی نوترکیب انسانی مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

تکثیر cDNA ژن IFNγ: ژن hIFNγ با استفاده از روش RT-PCR از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تحریک شده با فیتوهماگلوتینین یک فرد سالم ایرانی خالص‌سازی‌شد؛ به این منظور، ابتدا سلول‌ها کشت‌داده‌شدند و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۶°c در انکوباتور قرارگرفتند و کل RNA از تعداد ۳×۱۰^{۸} سلول و با استفاده از عامل ترایزول استخراج‌شد (Gibco, UK)؛ به این ترتیب که ماده ته‌نشین‌شده حاصل از شستشوی سلول‌ها در ۱/۵mL ترایزول حل‌می‌شود و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴°c در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژشده، سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری‌می‌شود. به‌نحوی‌که به‌ازای هر ۱mL ترایزول، ۰/۲ml کلروفرم اضافه می‌شود؛ سپس آن را تکان‌داده، به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری‌می‌شود؛ به‌طور مجدد، سانتریفیوژ به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°c و ۱۲۰۰۰rpm به‌منظور خارج‌کردن فاز آبی انجام‌می‌گیرد. پس از سانتریفیوژ، ۰/۷۵ml، ایزوپروپانول به مخلوط اضافه می‌شود و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق باقی‌می‌ماند و مانند مراحل گذشته، محلول به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm و دمای ۴°c سانتریفیوژمی‌شود و درنهایت، RNA ته‌نشین‌شده به‌وسیله

اتانل ۷۵ درصد شسته و در ۳۰µL آب حل‌می‌شود؛ در مرحله بعد، cDNA با استفاده از کیت cDNA سنتتاز تک-رشته‌ای (Fermentas, lithuania) براساس دستورالعمل بیان‌شده ساخته‌شد. به این منظور، ۱µL از الیگو dT (۵۰pmol/µL)، به میزان ۱ تا ۵ میکروگرم از RNA اضافه می‌شود و حجم نهایی واکنش به ۱۱µL افزایش‌می‌یابد و مخلوط واکنش به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°c نگهداری-می‌شود و سپس به‌سرعت، روی یخ خنک می‌شود؛ در مرحله بعد، ۲µL از ۱۰ mM dNTP، ۲µL آنتی RNase و ۴µL بافر واکنش ۵x اضافه می‌شود تا اینکه حجم نهایی واکنش به‌وسیله آب به ۱۹µL افزایش‌می‌یابد. پس از نگهداری مخلوط واکنش حاصل در دمای ۳۷°c به‌مدت ۵ دقیقه، مقدار ۴۰ واحد از آنزیم Moloney murine Leukemia virus reverse transcriptase اضافه می‌شود و پس از اضافه‌کردن آنزیم، مخلوط واکنش به‌مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷°c یا ۱۰ دقیقه در۷۰°c نگهداری‌می‌شود و درنهایت، این مخلوط در دمای ۷۰°c- فریزمی‌شود.

نحوه ساخت وکتورهای بیانی نوترکیب

به این منظور، محصول PCR تخلیص‌شده، درون پلاسمید PTZ57R با استفاده از کیت InsT/Aclone ™ Product cloning kit کلون‌شد (Fermentas, Lithuania) و پلاسمید نوترکیب به روش Sequencing آنالیزشد. ژن IFNγ کلون‌شده به‌وسیله پرایمرهای F- IFN5'GGCGGATCCATGCAGGACCCATATGTA3' و R- IFN5'GGCGGATCCTTACTGGGATGCTCTTCGAC 3' که دارای سایت برش *BamH*I در هر انتهای 5' هستند، به‌وسیله روش PCR تکثیرشد، به‌نحوی‌که قطعه IFNγ خالص‌شده، درون پلاسمیدهای بیانی PFX1.4Hyg و PFX1.4sat (Jena Bioscence, , Germany) کلون‌شد؛ روش کار به‌صورت خلاصه شرح‌داده‌می‌شود:

برای قرارگیری قطعه IFNγ خالص‌شده، درون پلاسمیدهای بیانی PFX1.4Hyg و PFX1.4sat ابتدا وکتورهای بیانی PFX1.4sat و PFX1.4hyg پس از برش با آنزیم *Bgl*I به‌منظور تأیید هضم آنزیمی صحیح، روی ژل آگاروز الکتروفورز شدند؛ این برش آنزیمی، سبب جداسازی یک قطعه ۰/۷kb از هریک از پلاسمید ۸/۲kb (PFX1.4sat) و پلاسمید ۸/۷kb (PFX1.4hyg) شد؛ سپس ژن IFNγ در سایت *Bgl*I کلون شد.

پس از اینکه پلاسمیدهای نوترکیب PFX1.4sat.IFNγ و PFX1.4Hyg.IFNγ به‌وسیله کیت استخراج پلاسمید تجاری (Qiagen GMbh, Germany) خالص شدند، وجود ژن اینترفرون گاما به‌وسیله آنالیز چندین آنزیم برشی (restriction analysis) و سکانس‌کردن به‌وسیله پرایمرهای Forward و reverse M13 مورد تأیید قرارگرفت.

کشت و انتقال به انگل *L. tarentolae*

به‌منظور انجام ترانسفکشن از سلول‌های *L. tarentolae* کشت‌داده‌شده در محیط BHI (Brain Heart Fusion) شرکت (DIFCO, USA) حاوی ۵µg/mL همین، استفاده-شد (Sigma, USA) و عمل ترانسفکشن به روش الکتروپوریشن، روی پروماستیگوت‌های کشت‌شده در لوله آزمایش صورت‌گرفت (۱۴).

برای انتقال قطعه مورد نظر به انگل، ۱۵ میکروگرم از وکتور pF4X1.4sat–IFN (در مرحله اول) و وکتور pF4X1.4hyg-IFN (در مرحله دوم) توسط آنزیم *SwaI* هضم‌شد؛ نتیجه هضم آنزیمی وکتور بیانی، یک قطعه ۲/۹ kbp شامل قسمت‌های مربوط به تکثیر در باکتری E.coil بود؛ همچنین، قطعات بزرگ‌تر ۵/۱ kbp و ۵/۶ kbp به‌ترتیب از پلاسمیدهای بیان‌شده خارج شد؛ این قطعات، حاوی قسمتی از توالی‌های ژنوم انگل است که دربرگیرنده ژن اینترفرون گاما و مارکر آنتی‌بیوتیکی است؛ سپس قطعات DNA بریده‌شده با استفاده از کیت کیاژن، از ژل آگارز ۰/۸ درصد استخراج‌شدند و با استفاده از الکتروپوریشن در دو مرحله به سلول انگل انتقال‌یافتند (شکل شماره ۳). پس از اولین مرحله ترانسفکشن با sat.IFNγ، سلول‌ها در محیط BHI نیمه-جامد دارای ۶۰µg/ml نورزوتریسین برای انتخاب کلون-های مقاوم کشت‌داده‌شدند؛ در مرحله بعد، کلون‌های منفرد انتخاب‌شدند و به پلیت‌های ۲۴ خانه منتقل شدند و به‌ترتیب از پلیت‌های یادشده به فلاسک‌های کشت

بافت ۲۵ml دارای آنتی‌بیوتیک انتخابی (نورزئوترایسین ClonNAT, Jena, Germany)، منتقل شدند؛ سپس، آنالیز PCR روی DNA ژنومیک جداشده از کلون‌های مقاوم به نورزوترایسین، به‌منظور تأیید ترانسفکشن انجام‌گرفت. پس از تأیید ترانسفکشن اول به‌وسیله PCR، دومین مرحله ترانسفکشن با استفاده از قطعه hyg -IFNγ انجام‌شد و سلول‌های ترانسفورم‌شده، روی محیط نیمه‌جامد دارای ۵۰µg/ml هیگرومایسین و ۶۰µg/ml آنتی‌بیوتیک نورزوترایسین کشت‌داده‌شدند؛ درنهایت کلون‌های دارای دو ژن مقاومت در محیط مایع BHI حاوی دو آنتی‌بیوتیک یادشده، منتقل و تکثیر شدند.

انتخاب کلنی‌های *L. tarentolae* ترانسفورم‌شده

به‌منظور تأیید ورود کاست دارای ژن اینترفرون گاما نوترکیب مورد نظر به داخل ژنوم لیشمانیا، روی DNA ژنومیک حاصل از کلنی‌های خالص‌شده مقاوم به هیگرومایسین و نورزوترایسین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی hyg و sat، PCR صورت‌گرفت؛ همچنین ورود کاست یادشده به داخل لوکوس ssu (18 s rRNA) با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای hyg forward یا satو reverse اختصاصی ssu مورد تأیید قرارگرفت.

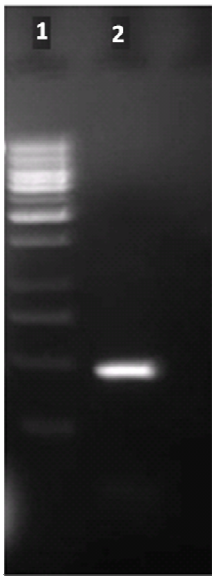
آزمایش وسترن بلات

در آزمایش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوش علیه اینترفرون گامای انسانی، وجود این پروتئین در لیز سلول‌های ترانسفورم‌شده شناسایی شد. پس از استخراج پروتئین هر دو نوع سلول نوع وحشی و ترانسفورم‌شده از سلول لیزشده (۸)، ۲۰µg از هر نمونه، روی ژل SDS-PAGE برده‌شد. ژل پلی‌آکریلامید به‌وسیله کوماسی بلو G-250 رنگ‌آمیزی و با استفاده از آب MQ رنگ‌بری‌شد و درنهایت، روش وسترن بلاتینگ به‌وسیله یک‌سری مراحل استاندارد و روی ژل آکریلامید مشابه ژل یادشده انجام‌شد (۱۵)؛ همچنین در ابتدا آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوش علیه اینترفرون گامای انسانی (Abcam, uk) و سپس آنتی‌بادی ثانویه IgG-HPR (Dako, UK) به‌عنوان آنتی‌بادی دوم استفاده‌شدند.

نتایج

کلون cDNA ژن اینترفرون گاما

cDNA ژن hIFNγ با روش RT-PCR ساخته‌شد (در قسمت مواد و روش‌ها بیان‌شدند) و PCR روی DNA استخراج‌شده از سلول‌ها با استفاده از پرایمرهایی که در انتهای خود، سایت‌های برشی *BamH*I 5' دارند، انجام‌شد. پس از الکتروفورز، فقط یک باند دارای سایز حدود ۵۰۰bp روی ژل آگاروز مشاهده‌شد (شکل شماره ۱)؛ همچنین تأیید کلونینگ ژن مورد نظر با استفاده از آنزیم‌های برشی و سکانس DNA انجام‌گرفت. نتیجه BLAST توالی به‌دست‌آمده با mRNA ژن hIFNγ شباهت ۱۰۰ درصد را نشان‌داد (Gen-Bank: AF506749.1).



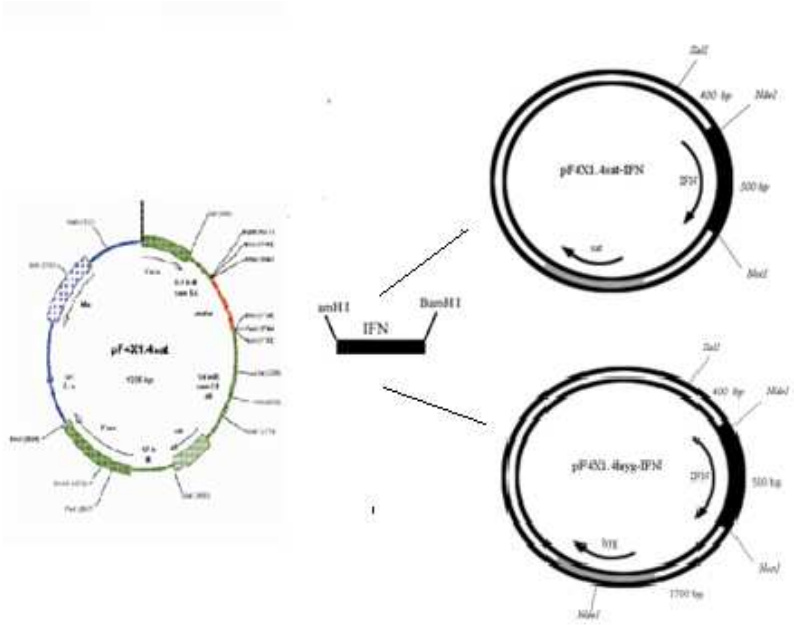
شکل شماره ۱. ستون ۱: مارکر 1kb استاندارد، ستون ۲: تأیید نهایی محصول PCR ژن اینترفرون گاما با وزن حدود ۵۰۰bp.

کاست‌های بیانی ژن hIFNγ

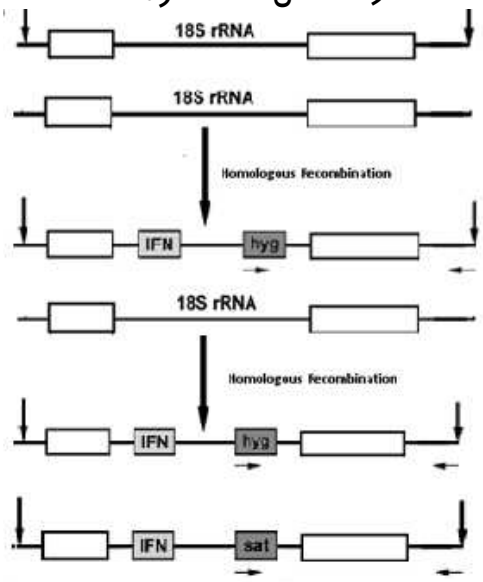
شکل شماره ۲، تصویر شماتیک Ligation ژن اینترفرون گاما در قطعه ۷/۵kb از وکتور PFX1.4sat اختصاصی لیشمانیا را نشان‌می‌دهد. تنها تفاوت میان دو وکتور بیانی، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک است که در اینجا وکتور بیانی PFX1.4hyg نشان‌داده‌نشده‌است.

انتقال به سلول‌های *L. tarentolae*

به‌منظور انتقال دو سازه تهیه‌شده به درون انگل از روش الکتروپوریشن استفاده‌شد. الکتروپوریشن در دو مرحله و هربار با استفاده از یک سازه حاوی مارکر آنتی‌بیوتیکی هیگرومایسین یا نورزئوترایسین انجام‌گرفت (شکل شماره ۳).



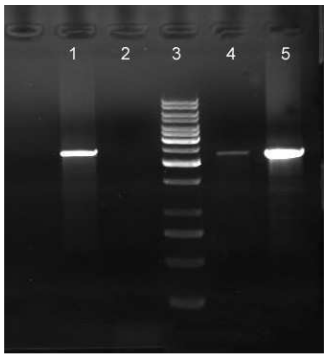
شکل شماره ۲. تصویر شماتیک از پلاسمید PFX1.4-IFNγ که برای بیان پروتئین hrIFNγ به‌کاررفته‌است. دو وکتور که فقط در ژن آنتی‌بیوتیک: هیگرومایسین یا نورزئوترایسین متفاوت‌اند ساخته‌شدند. از هر یک از آنها در مراحل ترانسفکشن استفاده‌خواهدشد.



شکل شماره ۳. نمایش شماتیک نحوه قرارگیری سازه‌های حاوی ژن IFNγ در لوکوس ssu (18 s rRNA): همان‌طورکه مشاهده‌می‌شود، پس از دو بار ترانسفکشن هر دو آلل لوکوس ssu حاوی ژن IFNγ و ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی هیگرومایسین Hyg و نورزئوترایسین sat هستند.

تأیید سلول نوترکیب به‌دست‌آمده

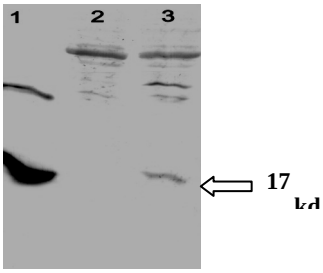
پس از ترانسفکشن، ابتدا غربالگری سلول‌های به‌دست‌آمده با استفاده از مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط‌های کشت حاوی نورزئوتریسین و هیگرومایسین انجام‌شد؛ سپس سلول‌های مقاوم به هر دو آنتی‌بیوتیک کشت‌داده‌شد (در بخش روش‌ها شرح‌داده‌شده‌است) و روی آنها آزمایش PCR انجام‌گرفت. با استفاده از PCR وارد‌شدن ژن hIFN-γ (۴۶۰bp)، sat (۵۰۰bp) و hyg (۱۰۰۰bp) درون DNA ژنومیک سلول‌های نوترکیب تأییدشدند؛ علاوه‌براین، هم در سلول‌های نوع وحشی و هم در سلول‌های ترانسفورم‌شده با کاست PFX1.4sat.IFN-γ، ورود کاست sat.IFN-γ در لوکوس مورد نظر (ssu) با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای sat forward و ssu reverse تأییدشد و باند ۲/۳kb مورد انتظار، فقط در سلول‌های ترانسفورم‌شده با PFX1.4sat.IFN-γ مشاهده‌شد (شکل شماره ۴) و ورود صحیح کاست IFN-γ دلالت‌دارد. پس از واردسازی دومین سازه که دارای ژن مقاومت Hyg است، PCR با پرایمرهای hyg forward و ssu reverse نیز انجام‌شد و باند ۲/۸kb مورد انتظار به‌دست‌آمد.



شکل شماره ٤. تأیید قرارگیری درست کاست ژنی تهیه‌شده در لوکوس ssu ریبوزومال rRNA با استفاده از پرایمرهای sat forward و ssu reverse. لازم به ذکر است که پرایمر ssu reverse در خارج از کاست و روی DNA ژنومیک لوکوس مورد نظر قرارمی‌گیرد (توضیح در متن). ۱-نمونه تست یک؛ ۲-نمونه نوع وحشی؛ ۳-مارکر؛ ٤-نمونه تست دو و ۵-نمونه تست سه، باند ۲۳۰۰ بازی به‌دست‌آمده قرارگیری کاست ژنی حامل IFNg در سایت مورد نظر را تأییدمی‌کند. این باند در سوش وحشی وجودندارد.

وسترن بلات

بیان hrIFNγ، توسط آنالیز وسترن بلات بررسی‌شد. باند پروتئین ۱۷KD (شکل شماره ۵، لاین ۱) هم درخصوص اینترفرون گامای تجاری و هم درخصوص hrIFNγ به‌دست‌آمده از کلون‌های ترانسفورم‌شده قابل‌مشاهده است. در سلول‌های نوع وحشی، این پروتئین به‌وسیله آنتی‌بادی پلی‌کلونال شناسایی‌نشده‌است که عدم وجود این پروتئین را نشان‌می‌دهد (شکل شماره ۵).



شکل شماره ۵. آزمایش western blot تأیید وجود پروتئین اینترفرون گاما در سلول انگل ترانسفکت‌شده. ستون ۱- استاندارد انترفرون گاما؛ ستون۲- لیز سلول لیشمانیا نوع وحشی (فاقد باند اینترفرون) و ستون ۳- لیز سلول لیشمانیا ترانسفکت‌شده (تولیدکننده اینترفرون نوترکیب)

بحث

یکی از سیستم‌های بیان یوکاریوتی مستعد برای تولید سطحی بالا از پروتئین‌های نوترکیب دارویی فعال، پارازیت *Leishmania tarentolae* است که از نوعی مارمولک به‌دست‌آمده‌است (۶ و ۱۶)؛ این پارازیت به دلایل مختلف ازجمله سرعت رشد بالا در مقایسه با سلول‌های پستانداران، امکان کشت در حجم بالا، داشتن محیط کشت ساده، غیربیماری‌زابودن برای انسان و وجود شباهت‌های ساختاری الیگوساکاریدی انگل لیشمانیا با الیگوساکاریدهای پستانداران از نظر وجود باقیمانده‌های یادشده و گالاکتوز N-Linked اهمیت فراوانی یافته‌است؛ به‌نحوی‌که تولید پروتئین در این

پارازیت نشان‌دهنده این نکته است که *L. tarentolae* می‌تواند به‌عنوان میزبانی مناسب برای تولید سطحی بالا از پروتئین‌های هترولوگ به‌کاررود (۶، ۸، ۱۷ و ۱۸).

باوجوداینکه Leishmania دارای محدودیت‌هایی مانند نیاز به محیط کشت تهیه‌شده با سرم و سرعت رشد پایین است، هر دو نوع گلیکوپروتئین نوترکیب دارویی و غیردارویی، مانند اریتروپروتئین انسانی، فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی و Laminin332 در این پارازیت تولید-شده‌اند و در همه حالات پروتئین بیان‌شده دارای فعالیت بیولوژیکی بوده‌است (۶، ۸ و ۱۹). لیشمانیا دارای ساختاری جالب برای بیان ژن‌هاست و Sequencing جدید روی ژنوم انواع لیشمانیا، نشان‌دهنده این نکته است که ژن‌های کدکننده پروتئین به‌صورت واحدهای پلی‌سیسترونیک قرارگرفته‌اند (۲۰ تا ۲۳). قابل‌اشاره است که نسخه‌برداری روی کروموزوم‌های این پارازیت بدون داشتن پروموتورهای مشخص RNA PolymeraseII یا دیگر معیارهای معمول رونویسی انجام‌می‌شود (۲۴)؛ درمجموع نتایج مطالعات، شباهت ترشحات درونی Trypanosomatidae به سیستم‌های دارای بیان بالای یوکاریوتی مانند Cell line پستانداران را نشان‌می‌دهند (۲۰، ۲۵ و ۲۶).

در این مطالعه، بدین دلیل که نواحی بین‌ژنی غیرقابل‌ترجمه، نقشی مهم در تغییرهای پس از رونویسی در trypanosomidae دارند (۲۷)، تلاش‌شد تا پروتئین hIFN-γ نوترکیب *L.tarentolae* تولیدشود؛ بنابراین cDNA ژن اینترفرون گاما میان دو ناحیه غیرقابل‌ترجمه در وکتورهای بیانی تجاری، کلون‌شد. به‌منظور افزایش میزان بیان، دوکاست بیانی که هریک، دارای یک کپی از cDNA ژن اینترفرون گاما بودند، ساخته‌شدند و به داخل سلول‌های لیشمانیا انتقال‌یافتند؛ به این منظور، cDNA ژن اینترفرون گاما به جایگاه ژن 18 s rRNA (ssu) وارد شد که یک لوکوس تکراری با سرعت بالای رونویسی در ژنوم *L. tarentolae* است (۱۶) و سبب افزایش سطح بیان می‌شود.

پروتئین اینترفرون گاما یک پروتئین دارویی با طیفی وسیع از فعالیت‌های بیولوژیکی است که سبب تمایز سلول‌های T، B و افزایش بیان مولکول‌های MHCI,II می‌شود و در درمان تعدادی از بیماری‌های سرطان، ویروسی و ایمنی به‌کارمی‌رود؛ این موضوع، سبب جلب توجه و تلاش دانشمندان برای تولید این پروتئین در سیستم‌های بیانی مختلف شده‌است. گلیکوزیلاسیون معمول پروتئین IFN-γ به افزایش زمان فعالیت بیولوژیکی و همچنین مقاومت به پروتئاز در این پروتئین منجرمی‌شود (۹).

اگرچه E.coli ممکن است به‌عنوان یک میزبان مناسب با سطح نسبی بیان بالا مطرح شود (۵ و ۱۱)، نداشتن تغییرها پس از ترجمه و نیاز به مرحله refolding، هنوز به‌عنوان یک مشکل حاد در این میزبان قابل‌بررسی است؛ بااین‌حال *L. tarentolae* به‌عنوان یک سیستم بیان ژنی یوکاریوتی و به دلیل گلیکوزیلاسیون و تشکیل باند دی-سولفید نسبت‌به دیگر سیستم‌های بیانی ارجحیت‌دارد (۲۸)؛ بنابراین در این پارازیت، پروتئین hrIFNγ به-راحتی قادر به تشکیل و نیز دارای فعالیت بالا و مقاوم به پروتئاز است. مطالب یادشده در بالا تأکیدمی‌کند که سیستم بیان ژنی در پارازیت Leishmania، ترکیبی از مزایای هر دو سیستم پروکاریوتی و یوکاریوتی است؛ به‌هرحال، افزایش تعداد copy number ژن مورد نظر و درنتیجه، میزان بیان آن به‌وسیله انتقال دومین کاست بیانی به کلون‌های ترانسژنیک و با استفاده از شدت باندهای حاصل‌شده بررسی‌شد (داده‌ها نشان‌داده‌نشده-اند) و مشابه این نتایج، پیش‌تر توسط محققان در تولید پروتئین‌های دیگر گزارش‌شده‌اند (۶، ۸، ۱۶ و ۲۹).

در مرحله بعد به‌دنبال آن هستیم که با افزایش میزان کشت سلول لیشمانیا تارنتولی به حجم بالا و خالص-سازی پروتئین سلولی با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی، وجود و میزان بیان این پروتئین را در سلول نشان‌دهیم.

منابع

1. Kim CH, Oh Y, Lee TH. Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells. Gene 1997; 199 (1-2): 293-301.

2. Zhu J, Contreras R, Fries W. Construction of stable laboratory and industrial yeast strains expressing a foreign gene by integrative transformation using a dominant selection system. Gene 1986; 50 (1-3): 225-37.

3. Ogrydziak DM. Yeast extracellular proteases. Crit Rev Biotechnol 1993; 13: 1-55.

4. Hughes AL, Piontkivska H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of Trypanosoma and six other genera. Mol Biol Evol 2003; 20(4): 644-52.

5. Zhang WW, Charest H, Matlashewski G. The expression of biologically active human p53 in Leishmania cells: a novel eukaryotic system to produce recombinant proteins. Nucleic Acids Res 1995; 23(20): 4073-80.

6. Breitling R, Klingner S, Callewaert N, Pietrucha R, Geyer A, Ehrlich G, Hartung R, Muller A. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. Protein Expr Purif 2002; 25(2): 209-18.

7. Clayton C, Hausler T, Blattner J. Protein trafficking in kinetoplastid protozoa. Microbiol Rev 1995; 59(3): 325-44.

8. Hemayatkar M, Mahboudi F, Majidzadeh A.K, Davami F, Vaziri B, Barkhordari F, Adeli A, ahdian R, Davoudi N. Increased expression of recombinant human tissue plasminogen activator in leishmania tarentolae. BiotechnoI J 2010; 5: 1198-1206.

9. Sareneva T, Pirhonen J, Cantell K, Kalkkinen N, Kunen IJ. Role of N-glycosylation in the synthesis, dimerization and secretion of human interferon-γ. Biochem. J. 1994; 303: 831-840.

10. Arora D, Khanna N. Method for increasing the yield of properly folded recombinant human gamma interferon from inclusion bodies. J Biotechnol 1996; 52 (2): 127-33.

11. Khalilzadeh R, Shojaosadati SA, Bahrami A, Maghsoudi N. Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of Escherichia coli. Biotechnol let 2003; 25:1989-1992.

12. Derynck R, Singh A, Goeddel DV. Expression of the human interferon-gamma cDNA in yeast. Nucleic Acids Res 1983; 11(6): 1819-37.

13. Zamani A, Pour-Jafari H, Elahi SM, Moghadam-Nazem N, Massie B. Inducible expression of human gamma interferon. Iran Biomed J 2006; 10 (4): 197-202.

14. Beverley SM, Clayton CE. Transfection of Leishmania and Trypanosoma brucei by electroporation. Methods Mol. Biol 1993; 21: 333–348.

15. Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, Wingfield PT. Short protocol in protein science: a compendium of methods from current protocols in protein science. New York: John Wiley and Sons; 2003: pp: 43-47.

16. Soleimani M, Mahboudi F, Davoudi N, Amanzadeh A, Azizi M, Adeli A, Rastegar H, Barkhordari F, Mohajer-Maghari B. Expression of human tissue plasminogen activator in the trypanosomatid protozoan Leishmania tarentolae. Biotechnol Appl Biochem 2007; 48 (1): 55-61.

17. Fritsche C, Sitz M, Wolf M, Pohl HD. Characterization of the growth behavior of Leishmania tarentolae: a new expression system for recombinant proteins. J Basic Microbiol 2007; 47(5): 384-93.

18. Kushnir S, Gase K, Breitling R, Alexandrov K. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host Leishmania tarentolae. Protein Expr Purif 2005; 42(1): 37-46.

19. Phan HP, Sugino M, Niimi T. The production of recombinant human laminin-332 in a Leishmania tarentolae expression system. Protein Expr Purif 2009; 68: 79-84.

20. Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol Biochem Parasitol 2007; 156 (2): 93-101.

21. Haile S, Papadopoulou B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. Curr Opin Microbiol 2007; 10 (6): 569-77.

22. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. Science 2005; 309 (5733): 436-42.

23. Cristina Orlando T, Gustavo Mayer M, David A. RNA polymerase I promoter and splice acceptor site recognition affect gene expression in non-pathogenic Leishmania species. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102 (7): 891-4.

24. Martínez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Transcription of Leishmania major Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. Mol Cell 2003; 11(5): 1291-9.

25. Basile G, Peticca M. Recombinant protein expression in Leishmania tarentolae. Mol Biotechnol 2009; 43: 273-278.

26. Ralton JE, Mullin KA, Malcolm J M. Intracellular trafficking of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins and free GPIs in Leishmania mexicana. Biochem J 2002; 363 (Pt 2): 365-75.

27. Teixeira SM. Control of gene expression in Trypanosomatidae. Braz J Med Biol Res 1998; 31: 1503-1516.

28. Fernandez-Robledo JA, Vasta GR. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. Trends Parasitol 2010; 26 (5): 244-54.

29. Dortay H, Mueller-Roeber B. A highly efficient pipeline for protein expression in Leishmania tarentolae using infrared fluorescence protein as marker.Microbiol Cell Factories 2010; 9-29.

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University Seventeenth Year, No.100 August, September 2012

Received: 19/6/2012
Last revised: 19/9/2012
Accepted: 2/10/2012

Development of expression constructs for production of human recombinant IFNγ in *Leishmania tarentolae*

Noushin Davoudi[1*], Mohammad Mehdi Attarpour Yazdi[2], Azam Hemmati[3], Hossein Soltaninejad[3]

1. Assistant Professor - Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
2. Microbiology Department, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
3. M.Sc. - Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

E-mail: davoudi@pasteur.ac.ir

Abstract

Background and Objective: The aim of the present study was to express recombinant human interferon-gamma in *Leishmania tarentolae*. The Leishmania expression system represents the combination of easy handling known from bacterial expression systems with the potential of a eukaryotic protein expression, folding and modification system. The trypanosomatid protozoan host *Leishmania tarentolae* was isolated from lizard and is not pathogenic to mammals.

Materials and Methods: In this study, two constructs were developed for expression of recombinant human interferon-gamma (hrIFNγ) in *L. tarentolae.* Each one of constructs carries an antibiotic resistant gene such as Hygromycin and Nourseothericin. For high level expression of the human interferon-gamma, developed DNA cassette that contains interferon-gamma (IFNγ) cDNA was designed to integrate into a genomic small subunit rRNA locus of *L. tarentolae* by homologous recombination.

Results: The integration of the expression cassette into the ssu locus was confirmed by diagnostic PCR of the genomic DNA of transgenic strain.

Conclusion: Although it has been shown that *E. coli* might be considered as a suitable host with a relatively high level of expression and lack of posttranslational modifications and the need for refolding stages are still big challenges. In contrast, *L. tarentolae* is eukaryotic gene expression machinery, which includes full glycosylation and disulfide bond formation, and thus represents a potential advantage over other expression systems. These facts confirm that the gene expression system using Leishmania parasites combines many of the advantages of both prokaryotic and eukaryotic expression systems.

Key words: hrIFNγ, ssu locus, *L. tarentolae*