تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب توسط سلول تخمدان هامستر چینی و بررسی فعالیت زیستی آن به روش سنجش گزارشگر ژنی

***مرضیه رضائی:** کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان،اصفهان، ایران. (*نویسنده مسئول). bio_mrezaei@yahoo.com
دکتر سید حمید زرکش اصفهانی: دانشیار ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های کشت شده پستانداران به خاطر تواناییشان در ایجاد ساختار صحیح پروتئین، تجمع و اصلاحات پس از ترجمه‌ای، سیستم مطلوبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب با کاربردهای کلینیکی هستند، بنابراین زمانی که یک پروتئین در سلول‌های پستانداران بیان شود در مقایسه با سایر میزبان‌ها از جمله باکتری‌ها،کیفیت واثر بهتری، دارد. سیستم‌های گزارشگر ژنتیکی (Gene reporter systems) به عنوان ابزاری برای مطالعه تنظیم و بیان ژن‌ها در سلول‌های یوکاریوتی (Eukaryotic) می‌باشند. ژن‌های گزارشگر دارای کاربردهای ویژه‌ای هستند و اغلب به عنوان شاخصی برای فعالیت رونویسی در سلول‌ها به کار می‌روند.

روش کار: در این پژوهش تجربی ابتدا هورمون رشد انسانی نوترکیب (rhGH= recombinant human Growth Hormone) توسط یک کلون پایدار از سلول‌های CHO نوترکیب (recombinant Chinese Hamster Ovary) تولید و با روش‌هایی مانند الیزا (ELISA = Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) و وسترن بلات(Western blotting)تولید آن اثبات گردید. سپس فعالیت زیستی هر دو نوع rhGH یوکاریوت و نوع تجاری به روش سیستم گزارشگر ژنی (سیستم گزارشگر LHRE-TK-Luc) بررسی و بایکدیگر مقایسه شدند. این سیستم شامل (Lactogenic LHRE Hormone Responsive Element)، پروموتور TK (Thymidine Kinase promoter) و ژن تحت کنترل آن، Luc کدکننده برای آنزیم فایرفلای لوسیفراز (Firefly luciferase) می‌باشد و امکان بررسی و اندازه‌گیری انتقال پیام ایجاد شده توسط GH در سلول‌های ترانسفورم شده با ژن GHR را فراهم می‌کند. برای این منظور از سلول‌های Human Embryonic Kidney 293 cells HEK293 ترانسفکت شده با گیرنده هورمون رشد استفاده شد و فرایند انتقال پیام درون سلولی القا شده توسط rhGH و در نتیجه بیان آنزیم لوسیفراز و به دنبال آن تولید نور توسط دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج اولیه نشان دادند که میزبان نوترکیب (rCHO) به خوبی تولید کننده rhGH می باشد. از طرفی نتایج حاصل از سیستم بررسی فعالیت زیستی نشان دادند که rhGH یوکاریوت به خوبی فرایند سیگنالینگ درون سلولی را القا می کند و حتی در مقایسه با نوع تجاری موجود، نوع یوکاریوت دارای فعالیت زیستی بهتری می‌باشد.

نتیجه‌گیری: سلول های کشت شده پستانداران میزبان های بسیار مناسب و ایمنی برای تولید پروتئین های نوترکیب با کاربردهای کلینیکی می باشند. روش سیستم گزارشگر ژنی (Gene reporter assay) یک روش بسیار حساس، کارا، دقیق و ایمن برای بررسی فعالیت زیستی پروتئین های نوترکیب می باشد.

کلیدواژه‌ها: سلول تخمدان هامستر چینی، هورمون رشد انسانی نوترکیب، سنجش زیستی، سیستم گزارشگر ژن، الیزا.

مقدمه

پروتئین های درمانی نوترکیب چهره پزشکی مدرن را در دهه های گذشته تغییر داده اند و به طور پیوسته درمان های موثر و مطلوبی برای بیماری های متعدد و مشکل آفرین ارائه داده اند. حدود ۶۰ تا ۷۰٪ پروتئین های دارویی نوترکیب در سلول های پستانداران تولید شده اند(۱). علی‌رغم فراوانی رده‌های سلولی در دسترس، امروزه حدود ۷۰٪ پروتئین های درمانی نوترکیب توسط سلول های تخمدان هامستر چینی (CHO) ساخته می‌شوند. اگرچه رده های سلولی دیگری مانند رده سلولی مشتق شده از ملانومای موشی (NSO)، کلیه کودک هامستر Baby Hamster Kidney (BHK)، کلیه جنین انسان (HEK-293 Human Embryonic Kidney 293 cells)و سلول های شبکیه انسان نیز در این زمینه کاربرد دارند (۲). ویژگی‌هایی که سلول‌های CHO را به یک رده سلولی مناسب برای تولید پروتئین های نوترکیب انسانی به ویژه با کاربردهای بالینی مناسب می‌کنند, عبارتند از: توانایی کشت به حالت معلق در تراکم بالا به جای حالت چسبیده، قابلیت اصلاحات ژنتیکی به گونه ای که اجازه ورود و بیان DNA خارجی را داده و به میزان زیادی پروتئین خارجی را بیان کند، قابلیت تولید

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

پروتئین به صورت گلیکوزیله، انجام اصلاحات پس از ترجمه‌ای که برای فعالیت زیستی پروتئین لازم است، ایمن بودن سلول‌ها به گونه ای که هیچ ماده سمی اضافه ای به پروتئین تولید شده نمی‌افزاید. از طرف دیگر در مطالعه‌ای، مشخص شد که ۴۴ ویروس بیماریزای انسان که انواع مهم آن عبارتند از: HIV، آنفلونزا، فلج اطفال، هرپس و سرخک ,قابلیت همانندسازی در این رده سلولی را ندارند. بر اساس موارد گفته شده، تجربیات به دست آمده طی دو دهه و آزمایشات ایمنی سازمان بهداشت جهانی، پروتئین های درمانی تولید شده توسط این رده سلولی را بدون هیچ مشکلی تایید می کند، به نحوی که امروزه فروش سالانه محصولات تولید شده توسط سلول‌های CHO متجاوز از ۳۰ میلیارد دلار در سرتاسر جهان است (۱).

به طور کلی سیستم‌های گزارشگر ژنی (Gene reporter assay) روشی است به منظور مطالعه تنظیم و بیان ژن های یوکاریوتی. ژن های گزارشگر دارای کاربردهای ویژه ای هستند و اغلب به عنوان شاخصی برای فعالیت رونویسی در سلول‌ها به کار می‌روند. به طور معمول یک ژن گزارشگر با یک توالی پروموتوری در یک وکتور بیانی که وارد سلول شده است، همراه می شود. به دنبال انتقال وکتور به سلول، سلول‌ها از نظر حضور پروتئین گزارشگر که می‌تواند خود پروتئین Green fluorescent protein (GFP) یا فعالیت آنزیمی آن (آنزیم لوسیفراز) باشد، بررسی می‌شوند. از ویژگی های ایده‌ال یک پروتئین گزارشگردر این سیستم این است که به صورت درون سلولی بیان نشده، بررسی آن حساس، کمّی، سریع، آسان، تجدیدپذیر و ایمن باشد (۳).

پروتئین‌های گزارشگر می‌توانند از طریق تشخیص خصوصیات ذاتی از قبیل فعالیت آنزیمی، خصوصیات اسپکتروفوتومتری (Spectrophotometry) و یا به طور غیرمستقیم با سنجش بر پایه آنتی‌بادی مورد ارزیابی قرار گیرند. به طور کلی سنجش‌های آنزیمی به علت مقدار کم آنزیم گزارشگر مورد نیاز برای تولید سطوح قابل تشخیص تولیدات واکنش، کاملاً حساس هستند.

یک سیستم گزارشگر به معنی تبدیل اثر یک ملکول زیستی به یک پارامتر قابل مشاهده و اندازه گیری می باشد. اگر چه به صورت تئوری روش های زیادی برای این منظور وجود دارد اما در عمل روش‌های سنجش توسط سیستم‌های گزارشگر، قابلیت انجام سریع، دقیق و حساس مورد نیاز برای غربالگری مؤثر را دارند مثلاً بر پایه تولید فوتون. تولید فوتون اصولاً از طریق فلورسنس و کمی لومینیسنس (نورتابی شیمیایی) قابل تشخیص است. هر دو پردازش‌ها فوتون‌هایی را به عنوان نتیجه انتقال انرژی از لایه های مولکولی حالت تحریک به سطوح پایین‌تر ایجاد می کنند، اما تفاوت در نوع اوربیتال‌های تحریک شده است.

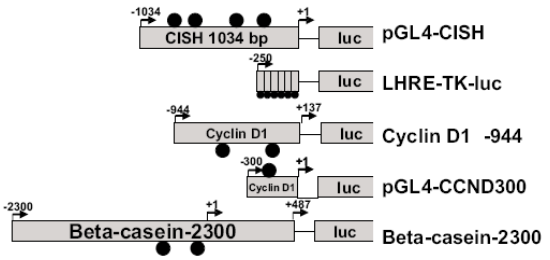
کلاس‌های زیادی از بیولومینسانس در سیر تکاملی وجود دارد. لوسیفرازهایی که به طور گسترده در سنجش‌ها استفاده می‌شوند: لوسیفراز حشرات(سوسک) شامل فایرفلای لوسیفراز (Firefly luciferase)، رنیلا لوسیفراز (Renila luciferase)، کلیک بیتل لوسیفرازها (Click beetle luciferase) (لوسیفرازهای گرفته شده از حشرات دارای کاربردهای گسترده و دامنه وسیعی از رنگ‌های لومینسانس را ایجاد می‌کنند) و آکوورین است. در این بین لوسیفرازهای به دست آمده از حشرات دارای کاربردهای گسترده‌ای هستند و روزبه‌روز بر کاربردشان افزوده می شود.فایرفلای لوسیفراز پرکاربردترین لوسیفراز در سیستم های گزارشگر است (۴).

تحقیقات پایه در بیولومینسانس منجر به کاربردهای زیادی در این زمینه مخصوصاً در بیولوژی مولکولی شده است. برخی کاربردهای آن عبارت است از: مشخص کردن عملکرد عوامل ژنتیکی Cis-acting مانند پروموتورها و افزایش دهنده‌ها، بررسی مسیرهای انتقال پیام درون سلولی و کاربرد به عنوان بیوسنسورها (Biosensores)، بررسی اثر مداخله ای RNA به روش هایی مانند تشخیص جفت‌های واکنش دهنده در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از یک سیستم شناخته شده به عنوان یکی از دو سیستم هیبرید شده، انتقال انرژی رزونانس

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

بیولومینسانسی (BRET) (Bioluminescence resonance energy transfer) و تصویر برداری از سلول زنده (۵). سیستم‌های گزارشگر لوسیفرازی دارای کاربردهای گسترده‌ای در نمایش وقایع سلولی وابسته به تنظیم رونویسی و بیان ژن به وسیله آبشارهای انتقال پیام (برای مثال RPL/JAK2/STAT5) می‌باشند. از نمونه ساختارهای گزارشگر در این زمینه می‌توان به مواردی مانند LHRE-TK-Luc، Cyclin D1 - 944، β- Casein -344 و β-Casein -2300 اشاره کرد. شکل ۱ نمونه‌هایی از نواحی پروموتوری قابل شناسایی توسط دایمر STAT5 به منظور بررسی مسیر RPL/JAK2/STAT5 می‌باشد(۶)(شکل ۱). هورمون رشد انسانی (hGH) (human Growth Hormone) یا سوماتوتروپین یک پپتید تک زنجیره کوچک است که توسط سوماتوتروف‌های (Somatotrophs) اسید دوست بخش جلویی غده هیپوفیز که حدود ۵۰٪ از غده را تشکیل می‌دهند ساخته شده و به جریان خون آزاد می شود (۷). hGH بوسیله ژن GHN قرار گرفته در یک گروه ۵ تایی ژنی روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ کد می‌شود و دارای دامنه وسیعی از عملکردهای بیولوژیک می باشد (۸). چندین فرم از این هورمون در بدن وجود دارد اما نوع غالب آن دارای ۱۹۱ آمینواسید است با وزنی معادل ۲۲ کیلودالتون که در ۴ ساختار آلفا-هلیکس با دو پل دی سولفیدی بین آمینواسیدهای ۵۳ و ۱۶۵ (لوپ بزرگ) و آمینواسیدهای ۱۸۲و۱۸۹ (لوپ کوچک) بسته بندی شده است (۹و۱۰). این هورمون دارای فعالیت های زیادی در زمینه رشد و نمو، متابولیسم و ایمنی می باشد. به طور کلی فعالیت هورمون رشد به صورت دو گروه آنابولیک و لیپولیتیک مشخص می‌شود و دارای اثرات مهمی روی متابولیسم پروتئین، لیپید و کربوهیدرات و کلاً تنظیم موقعیت کلی رشد در کودکی و بزرگسالی می‌باشد. از سایر فعالیت های آن تحریک تقسیم و تکثیر سلول های غضروفی، افزایش رسوب کلسیم و معدنی شدن استخوان، تحریک رشد سلول در هر اندامی از بدن انسان، افزایش متابولیسم، ترمیم سلول‌های تخریب شده، محرک سنتز پروتئین، کاهش تجزیه پروتئین‌ها، تحریک سیستم ایمنی، افزایش تجزیه لیپیدها، افزایش انتقال گلوکز، بهبود مثبت تعادل نیتروژن و افزایش زیاد در جذب آمینواسید می‌باشد (۱۱).

در این پژوهش ابتدا هورمون رشد انسانی نوترکیب توسط سلول های نوترکیب CHO تولید شده و پس از اثبات تولید و تعیین غلظت hGH تولیدی به روش هایی مانند الیزا و وسترن بلات، به منظور بررسی فعالیت زیستی هورمون نوترکیب از روش سیستم گزارشگر ژنی متشکل از دو پلازمید GHRFL (Growth hormone receptor full length) تولید کننده گیرنده هورمون رشد و LHRE Lactogenic Hormone Responsive (Element) تولید کننده آنزیم لوسیفراز استفاده شده است. سیستم گزارشگر LHRE-TK-Luc شامل LHRE (عامل اتصال یابنده به مولکول STAT5) مشتق شده از پروموتور ژن بتاکازئین، پروموتور TK(thymidine kinase promoter) و ژن تحت کنترل آن، Luc کد کننده برای آنزیم فایرفلای لوسیفراز می‌باشد و امکان بررسی و اندازه گیری انتقال پیام ایجاد شده توسط GH در سلول های ترانسفورم شده با ژن GHR را فراهم می‌کند (۱۲).



شکل۱. نواحی پروموتوری از سیستم های گزارشگر معمول برای بررسی مسیر PRL/JAK2/STAT5. نواحی اتصالی دایمر STAT5 توسط دایره های سیاه رنگ مشخص شده است(۶).

روش بررسی

رده سلولی و شرایط کشت: در این مطالعه تجربی به منظور تولید hGH از سلول های CHO نوترکیب (rCHO) ترانسفکت شده با وکتور pSeqTag از شرکت Invitrogen آمریکا دارای توالی ژن hGH استفاده شده است. شرایط کشت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

سلول ها عبارت است از: محیط کشت Dulbecco's DMEM/Ham's F12 Modification of Eagle's Medium/Hams F12 (Gibco، آمریکا) دارای ۱۰٪ سرم (Fetal calf serum FCS ، از شرکت Gibco، آمریکا)، ۱٪ از مخلوط آنتی بیوتیک پنی سیلین- استرپتومایسین (P/S از شرکت Gibco، آمریکا) و در شرایط انکوباتور CO_2 دار (۵٪ CO_2) دارای رطوبت و دمای۳۷°C کشت داده شد. برای به دست آوردن کلون پایدار از رده سلولی rCHO تولیدکننده rhGH، آنتی بیوتیک جنتیسین (شرکت Sigma، آمریکا) با غلظتμg/ml ۴۰۰ به محیط کشت سلول ها اضافه شد و پس از به دست آوردن کلون پایدار با غلظت ۲۰۰μg/ml به محیط اضافه شد. به منظور افزایش میزان تولید rhGH و طبق منابع موجود، پس از به دست آوردن کلون پایدار از سلول ها، کشت در دمای ۳۱°C و۳۴°C نیز صورت گرفت.

بررسی تولید rhGH توسط سلول های rCHO به روش الیزا و وسترن بلات: به منظور بررسی تولید و تعیین غلظت rhGH در محیط کشت از کیت تجاری الیزا مخصوص اندازه گیری hGH (از شرکت Radim، ایتالیا) استفاده شد. به طور خلاصه، ۲۰μl از نمونه های مجهول به هر چاهک الیزا که قبلا توسط آنتی بادی ضد hGH پوشیده شده، اضافه شدو سپس ۲۰۰μl از آنتی بادی نشاندار شده با آنزیم به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شد. پس از آن محتوی چاهک ها دور ریخته شده و ۳ بار شستشو توسط محلول صورت گرفت. در مرحله آخر، سوبسترا به مدت ۲۰ دقیقه به چاهک‌ها افزوده شد و در نهایت واکنش توسط محلول بلاک کننده (Blocking) متوقف شد. در پایان نتایج در طول موج ۴۵۰ نانومترخوانده و غلظت rhGH طبق محلول های استاندارد موجود در کیت به دست آمد. کلیه مراحل فوق شامل تولید در دماهای مختلف و اندازه گیری غلظت rhGH در ۳ تکرار انجام شد.

پس از بررسی تولید rhGH در محیط کشت، به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین نوترکیب تولیدی از روش وسترن بلات استفاده شد. در این راستا ابتدا محیط کشت سلول ها بر روی ژل ۱۲٪ آکریل آمید ران شده و پس از انتقال به کاغذ نیتروسلولز، توسط آنتی بادی اولیه (بر ضد هورمون رشد انسانی 10A7) و آنتی بادی ثانویه (بر ضد ایمونوگلوبولین موش mouse Anti IgG) رنگ آمیزی شده و نتایج حاصله روی فیلم رادیولوژی ثبت گردید.

بررسی فعالیت زیستی rhGH به روش سیستم گزارشگر ژنی: در این مرحله به منظور بررسی کارایی زیستی و فعالیت rhGH تولیدی از روش سیستم گزارشگر ژنی استفاده شد. به این منظور از دو پلازمید GHRfl و LHRE استفاده شدند. پلازمید GHRfl (پلازمید pcDNA1) دارای ژن کدکننده گیرنده هورمون رشد انسانی می‌باشد و در صورت انتقال به درون سلول، باعث بیان گیرنده هورمون رشد در سطح سلول می‌شود. در صورت اضافه کردن هورمون رشد کارا به محیط سلول باعث شروع فرایند انتقال پیام و انتقال آن به هسته سلول می‌شود. پلازمید LHRE کد کننده آنزیم لوسیفراز است، در صورت شروع فرایند انتقال پیام هورمون رشد در سلول و ورود پلازمید LHRE به سیتوپلاسم سلول، دایمرSTAT5 به پروموتور آنزیم لوسیفراز بخش LHRE بر روی این پلازمید متصل , باعث بیان این آنزیم در سلول می شود و در نتیجه با اضافه کردن سوبسترا به مخلوط لیز سلولی، آنزیم با سوبسترا واکنش داده و نور حاصله توسط دستگاه لومینومتر اندازه گیری و ثبت می شود. در راستای اهداف فوق، ابتدا سلول های rCHO کشت و پس از فیلتر کردن عصاره کشت سلول، غلظت rhGH تولیدی به روش الیزا تعیین می شود. در مرحله بعد، تکثیر پلازمیدهای GHRfl و LHRE توسط باکتری E.coli TOP10، استخراج پلازمید توسط کیت Nanoplus Bioneer و تعیین غلظت پلازمیدهای استخراجی به روش اسپکتروفوتومتری انجام شد. در ادامه کشت سلول های Hek293 در فلاسک T25، پس از رسیدن به تراکم لازم، شستشوی سلول ها با بافر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

نمکی فسفات Phosphate Buffer Saline (PBS 1X)، تریپسینه کردن سلول‌ها و سانتریفوژ، شمارش سلول ها به کمک رنگ آمیزی با محلول ۰/۴٪ تریپان‌بلو، انتقال سلول‌ها به تعداد سلول بر میلی لیتر ۱۰۵× ۱/۵ از سلول های Hek293 به پلیت‌های ۱۲ خانه کشت سلول (در هر خانه ۱ میلی لیتر محیط کشت) و کشت شبانه در انکوباتور ۳۷°C، CO_2 ۵٪. پس از رسیدن به تراکم لازم، جایگزینی محیط کشت سلول ها با محیط کشت غنی حاوی سرم، گلوتامین و بافر هپس و در نهایت اضافه کردن مخلوط ترانسفکشن شامل پلازمیدهای GHRfl و LHRE (ترانسفکشن توام) به سلول‌ها و بافر ترانسفکشن کلسیم فسفات و در آخر قراردادن پلیت در انکوباتور ۳۷°C، CO_2 ۵٪ به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. پس از ۲۴ ساعت از ترانسفکشن سلول ها، زمان القا فرا می رسد. به این منظورمراحل زیر اجرا شد: حذف محیط رویی سلول ها و اضافه کردن محیط فقیر (محیط کشت DMEM/F12 دارای ۱٪ P/S، ۱٪ L-گلوتامین و ۰/۵٪ دگسامتازون) دارای غلظت‌های متفاوت هورمون رشد انسانی تجاری (Samtropin) و هورمون رشد نوترکیب تولید شده توسط سلول‌های rCHO.

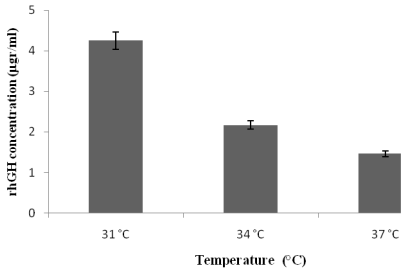
بررسی نتایج به کمک دستگاه لومینومتر:
پس از ۲۴ ساعت از القا توسط hGH، محیط رویی سلول‌ها حذف، شستشو با PBS 1X داده، سلول‌ها به کمک ۱۵۰میکرولیتر بافر لیز کننده لیز شده، انتقال ۱۰۰میکرولیتر از مخلوط لیز شده سلول‌ها به لوله لومینومتر و افزودن ۱۰ میکرولیتر سوبسترا به هر لوله نیز انجام می شود. سپس به مدت نهایتاً ۵ ثانیه لوله را ورتکس کرده و نور تولید شده را توسط دستگاه اندازه‌گیری و ثبت می‌کنیم.

یافته‌ها

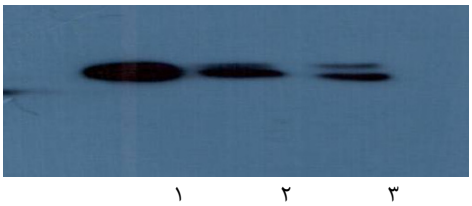
پس از کشت سلول های نوترکیب CHO و به دست آوردن کلون پایدار از این سلول ها، یک تست الیزای اولیه انجام شد و پس از اثبات تولید rhGH در محیط کشت سلول های نوترکیب نسبت به کنترل (سلول CHO ترانسفورم نشده)، مقایسه ای بین میزان تولید rhGH در دماهای مختلف صورت گرفت (نمودار۱). چنانکه مشاهده می شود ,تغییر دما اثر قابل ملاحظه ای بر میزان تولید rhGH داشته و بیشترین میزان تولید در دمای ۳۱°C به دست آمده است (نمودار۱).

در مرحله بعد با استفاده از روش وسترن بلات، وزن مولکولی rhGH تولیدی تعیین و با نمونه تجاری موجود در بازار مقایسه شد. چنانچه در شکل۲ مشاهده می شود، rhGH تولیدی وزنی معادل hGH تجاری موجود در بازار (حدود ۲۲ کیلودالتون) دارا می باشد (شکل ۲).

بررسی فعالیت زیستی هورمون رشد نوترکیب (rhGH) به روش سیستم گزارشگر ژنی: ابتدا به روش گفته شده ترانسفکشن سلول‌های Hek 293 با دو پلازمید GHRfl و LHRE و سپس فرایند القاء با غلظت های مختلف hGH تجاری صورت گرفته، میزان نور لومینسانس تولید شده در غلظت های مختلف با یکدیگر مقایسه شدند. به منظور مقایسه میزان القا توسط غلظت های مختلف هورمون رشد، میزان عددی به دست آمده از دستگاه لومینومتر را تقسیم بر میزان



نمودار۱- مقایسه غلظت rhGH تولید شده در دماهای مختلف به روش الیزا.



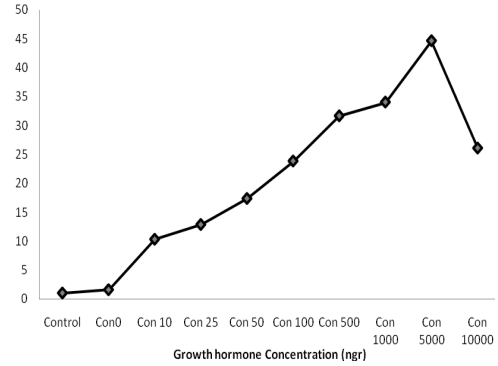
شکل۲- وسترن بلات به منظور تعیین وزن مولکولی rhGH تولید شده، چاهک ۱: هورمون رشد تجاری (سام تروپین)، چاهک ۲و۳: هورمون رشد تولید شده توسط سلول CHO

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

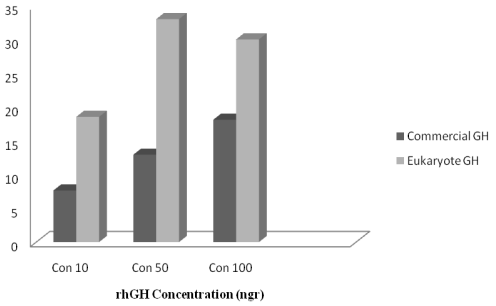
خطـــای زمینـــه‌ای یـــا noise دســـتگاه کـــرده (RLU/noise)، عدد حاصله نشان دهنده چند برابر شدن انتقال پیام و القاء بین غلظـت هـای مختلـف است.

چنانچه در نمودار۲ مشاهده می شـود تـا غلظـت ۵۰۰ نانوگرم هورمون رشد میزان انتقال پیام داخل سلولی و به دنبال آن تولید آنزیم لوسیفراز افزایش یافتـه و پـس از آن رونـد کاهشـی داشـته اسـت (نمودار۲).

در مرحله بعد غلظت rhGH تولید شـده توسـط سلول یوکاریوت تولیـد شـده در دمـای ۳۱°C بـه روش الایـزا تعیـین و سـپس بـا غلظـت مشـخص فرایند القاء صورت گرفته و بـا نـوع rhGH تجـاری



نمودار۲- مقایسه سیگنالینگ ایجاد شـده توسـط غلظـت‌هـای مختلـف hGH تجاری؛ محور افقی: غلظت‌های مختلف هورمون رشد بر حسـب نانوگرم در هـر میلـی لیتـر، محـور عمـودی: میـزان چنـد برابـر شـدن لومینسانس حاصل از انتقال پیام توسط غلظـت‌هـای مختلـف هورمـون رشد.



نمـودار۳- مقایسـه سـیگنالینگ ایجـاد شـده توسـط غلظـت‌هـای مختلفhGH تجاری و rhGH تولید شده توسط سلول rCHO؛ محور افقی: غلظت‌های مختلف هورمون رشد بر حسب نانوگرم در هـر میلـی لیتر، محور عمودی: میزان چند برابر شدن لومینسانس حاصل از انتقـال پیام توسط غلظت‌های مختلف هورمون رشد.

مقایسه شده است (نمودار۳).

چنانچـه مشـاهده مـی‌شـود rhGH تولیـد شـده توسط میزبان یوکاریوت بیان آنزیم لوسیفراز را القا کرده اسـت، لـذا نتیجـه مـی‌شـود هورمـون رشـد نوترکیب تولیـد شـده از نظـر زیسـتی فعـال بـوده توانایی اتصال بـه گیرنـده خـود و انتقـال پیـام بـه درون سلول را دارا می‌باشد.

بحث ونتیجه‌گیری

هورمون رشـد انسـانی (hGH) یـک پلـی پپتیـد مشتق شده از غـده هیپـوفیز بـا طیـف وسـیعی از فعالیت‌های زیستی شـامل تولیـدو سـوخت و سـاز پروتئین و چربی، تکثیـر وتمـایز سـلولی و رشـد و بلوغ بدن می باشد. به دلیـل نقـش هـای گسـترده هورمون در بیولوژی طبیعـی بـدن, ایـن هورمـون دارای کاربردهـای بـالینی زیـادی شـامل درمـان کوتـاهی‌هـا، بهبـود رشـد و نمـو، شکسـتگی‌هـا، خونریزی ها و درمانی کمکـی بـرای بیمـاری هـایی مانند ایدز می باشد.

سلول‌هـای کشـت شـده پسـتانداران بـه خـاطر تواناییشان در ایجاد ساختار صحیح پروتئین، تجمع و اصلاحات پس از ترجمه‌ای، سیستم مطلوبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب با کاربردهای کلینیکی هسـتند. بنـابراین زمـانی کـه یـک پـروتئین در سلول‌های پستانداران بیان می‌شود , در مقایسه بـا زمانی که در سایر میزبان‌هـا از جملـه بـاکتری‌هـا، گیاهان و مخمر بیان می‌شود, کیفیت و اثر بهتـری دارد. اخیراً، قابلیت تولید سـلول‌هـای کشـت شـده پستانداران در بیوراکتورها در برخی مـوارد در حـد گرم در لیتر افزایش یافته است یعنـی حـدود ۱۰۰ برابر نسبت بـه آنچـه در گذشـته بـه وسـیله ایـن سلول‌ها به دست می‌آمـد. بـه دلیـل ویژگـی هـای مناسـب رده سـلولی تخمـدان هامسـتر چینـی از جمله رشد سریع، انتقال راحت و موثر ژن به سلول و قابلیت سلول هـا بـرای انجـام اصـلاحات پـس از ترجمه امروزه به عنوان سیستم غالب بـرای تولیـد پروتئین هـای نوترکیـب مخصوصـاً بـا کاربردهـای درمانی و در حجم وسیع می‌باشد (۱۳و۱۴).

در این پژوهش rhGH بدون هیچ دنبالـه اضـافی توسط سلول های ترانسفورم شده CHO تولیـد، بـه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

محیط کشت آزاد شده و به راحتی با روش الایزا تولید آن در محیط کشت سلولی بررسی شد. میزان تولید اولیه توسط سلول های CHO بدون هیچ تیمار خاص در حد میکروگرم در هر لیتر می‌باشد که این میزان در مقایسه با نوع پروکاریوت آن ناچیز است. از آنجایی که افزایش محصول پروتئینی و کاهش هزینه های تولید هدف اصلی در زمینه بیوتکنولوژی تولید پروتئین نوترکیب می باشد، از میان عوامل بررسی شده موثرترین عامل بر افزایش میزان تولید rhGH، کاهش دما تا۳۱°C می‌باشد که در این حالت نسبت به دمای۳۷°C میزان تولید بیش از ۲ برابر افزایش یافت. تاکنون تحقیقات بسیاری در زمینه اثر کاهش دما بر میزان تولید پروتئین توسط سلول های پستانداران صورت گرفته است که نتایج پژوهش حاضر با نتایج تحقیقات قبلی همخوانی دارد (۱۵-۲۰).

تنوع و سادگی کار با سیستم های گزارشگر ژنی باعث شده این سیستم‌ها به ابزاری قدرتمند در زمینه تحقیقات زیستی و دارویی تبدیل شده و مرتباً بر کاربردهای این سیستم‌ها افزوده می‌شود(۶). هورمون رشد دارای اعمال گسترده زیستی از جمله رشد و تمایز سلول ها می باشد که با واسطه تمایل زیاد برای اتصال به گیرنده خود در سطح سلول ها نقش خود را ایفا می کند. گیرنده هورمون رشد (GHR=Growth Hormone Receptor) متعلق به ابرخانواده گیرنده‌های سایتوکاینی کلاس یک می باشد که به طور خلاصه با اتصال GH به GHR، باعث دایمر شدن دو مولکول GHR و به دنبال آن فعال شدن کیناز JAK2 می شود. فعال شدن JAK2 باعث فسفوریله شدن نواحی تیروزینی GHR و خود مولکول JAK2 شده و در نتیجه فراهم شدن مکان های اتصالی برای گروهی از پروتئین های سیتوپلاسمی به نام عوامل انتقال دهنده سیگنال و فعال کننده رونویسی (STAT)، فسفوریله شدن و دایمر شدن مولکول های STAT، انتقال دایمرهای STAT به هسته سلول و اتصال به عوامل اختصاصی متصل شونده به STAT و در نهایت تحریک پروموتور ژن هدف و شروع رونویسی از آن می‌شود. GH باعث فعال شدن STAT 1, 3, 5 می‌شود (۲۱و۲۲).

از مزیت های استفاده از سیستم LHRE برای بررسی مسیر انتقال پیام GH می توان به دقت و حساسیت بسیار بالا و عدم نیاز به سیستم های گزارشگر نیازمند به GH نشاندار شده با مواد رادیواکتیو اشاره کرد. از طرفی در این سیستم علاوه بر بررسی اتصال rhGH به گیرنده، انتقال پیام ایجاد شده نیز بررسی می شود. به علاوه LHRE یک سیستم اختصاصی با واسطه STAT5 (و نه سایر مولکول های STAT) را فراهم می کند و زمینه را برای سایر مطالعات مولکولی فراهم می‌کند.

نتایج بررسی فعالیت زیستی rhGH تولید شده توسط میزبان یوکاریوت (رده سلولی CHO) در این پژوهش نشان داد که به خوبی فرایند انتقال پیام و القا را انجام داده و از نظر زیستی فعال و دارای ساختار صحیحی می باشد. همچنین مشاهده شد در مقایسه با نوع تجاری، rhGH تولید شده توسط سلول CHO دارای سیگنالینگ بالاتری می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه خانم مرضیه رضائی در رشته میکروبیولوژی در مقطع کارشناسی ارشد به راهنمایی آقای دکتر سید حمید زرکش اصفهانی در سال۱۳۸۹ و می باشد که با حمایت دانشگاه اصفهان اجرا شده است.

منابع

1. Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu W,Yap MGS. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. Chemical Engineering Progress. 2007; 103(10): 40.
2. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature biotechnology. 2004;22(11): p. 1393-1398.
3. Li X, Zhao X, Fang Y, Jiang X, Duong T, Fan C, et al. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. Journal of Biological Chemistry. 1998;273(52): 34970.
4. Wood KV. The chemistry of bioluminescent reporter assays. Promega Notes. 1998; 65: 14–20.
5. Brasier AR, Ron D. Luciferase reporter gene

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

assay in mammalian cells. Methods in enzymology. 1992; 216: 386-397.

6. Fang F, Antico G, Zheng J, Clevenger CV. Quantification of PRL/Stat 5 signaling with a novel pGL 4-CISH reporter. BMC biotechnology. 2008; 8(1): 11.

7. Vance M, Mauras N, Growth hormone therapy in adults and children. New England Journal of Medicine. 1999; 341(16): 1206.

8. Zhan X, Giorgianni F, Desiderio D, Proteomics analysis of growth hormone isoforms in the human pituitary. Proteomics. 2005; 5(5): 1228-1241.

9. Shin NK, Kim DY, Shin CS, Hong MS, Lee J, Shin HCl. High-level production of human growth hormone in Escherichia coli by a simple recombinant process. Journal of biotechnology. 1998; 62(2): 143-151.

10. Sereikaite J, Statkute A, Morkunas M, Borromeo V, Secchi C, Bumelis VA. Production of recombinant mink growth hormone in E. coli. Microbial Cell Factories.2006; 5: 15.

11. Fong Y, Rosenbaum M, Tracey K J, Raman G, Hesse D G, Matthews DE, et al. Recombinant growth hormone enhances muscle myosin heavy-chain mRNA accmulation and amino acid accrualin humans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.1989; 86(9): 3371.

12. Ross RJM, Esposito N, Shen XY, Von Laue S, Chew SL, Dobson PR, et al. A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-lengthreceptor and generates large amounts of binding protein. Molecular Endocrinology. 1997;11(3): 265.

13. Kumar N,Gammell P, Clynes M. Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. Cytotechnology. 2007; 53(1): 33-46.

14. Yoon SK, Hong JK, Choo SH, Song JY, Park HW, Lee GM. Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: cell growth and recombinant protein production. Journal of biotechnology.2006; 122(4): 463-472.

15. Furukawa K, Ohsuye K. Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal -amidating enzyme. Cytotechnology.1998;26(2): 153-164.

16. Kaufmann H, Mazur X, Fussenegger M, Bailey JE. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. Biotechnology and bioengineering. 1999; 63(5): 573-582.

17. Schatz SM, Kerschbaumer RJ, Gerstenbauer G, Kral M, Dorner F, Scheiflinger F. Higher expression of Fab antibody fragments in a CHO cell line at reduced temperature. Biotechnology and bioengineering. 2003; 84(4): 433-438.

18. Fox SR, Patel UA, Yap MGS, Wang DIC. Maximizing interferon production by chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: Experimental and modeling. Biotechnology and bioengineering. 2004;85(2): 177-184.

19. Fogolin MB, Wagner R, Etcheverrigaray M, Kratje R. Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. Journal of biotechnology. 2004; 109(1-2): 179-191.

20. Bollati Fogolin M, Forno G, Nimtz M, Conradt HS, Etcheverrigaray M, Kratje R. Temperature Reduction in Cultures of hGM CSF expressing CHO Cells: Effect on Productivity and Product Quality. Biotechnology progress.2005;21(1): 17-21.

21. Sakatani T, Kaji H, Takahashi Y, Iida K, Okimura Y, Chihara K. Lactogenic hormone responsive element reporter gene activation assay for human growth hormone. Growth Hormone & IGF Research. 2003; 13(5): 275-281.

22. Marins LF, Iyengar A, Maclean N, Levy JA, Sohm F. Simultaneous overexpression of GH and STAT5b genes inhibits the STAT5 signalling pathway in tilapia (Oreochromis niloticus) embryos. Genetics and Molecular Biology.2002; 25: 293-298.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]

Original Article

Production of recombinant human growth hormone by eukaryotic CHO cell and measurement of its biological activity by gene reporter assay

***Marzeieh Rezaei,** MSc.,Biologist,Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran. (*Corresponding author). bio_mrezaei@yahoo.com
Seyyed Hamid Zarkesh-Esfahani, Associate professor of Immunology. Immunologist, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

Abstract

Background: Cultivated mammalian cells, because of their capacity for proper protein folding, assembly and post–translational modification, have become the dominant system for production of recombinant proteins in clinical application. Therefore, the quality and efficacy of protein can be superior when expressed in mammalian cells compared to other hosts such as bacteria. Gene reporter systems have contributed greatly to the study of eukaryotic gene expression and regulation. Although reporter genes have played a significant role in numerous applications, both in vitro and in vivo, they are most frequently used as indicators of transcriptional activity in cells. Luciferase-reporter assays are widely used to monitor the cellular events related to transduction and gene expression regulated by specific cascades, such as PRL/Jak2/Stat5 pathway.

Methods: In this study, recombinant human growth hormone (rhGH) was produced in eukaryotic Chinese hamster ovary (CHO) cell and production and concentration of rhGH verified by ELISA and western blotting. Then, the biological activity of rhGH was assessed by a gene reporter assay system (containing LHRE, TK promoter and Luc gene), using HEK 293 cells transfected with GH receptor and response element for STAT-5 measuring luciferase activity on a Berthold luminometer.

Results: The date showed that rhGH could be produced by eukaryotic host in good quantities as assessed by ELISA and western blotting. The results of gene reporter assay showed that rhGH produced by CHO cells is able to induce GH intracellular cell signaling. The rhGH produced by CHO cells showed higher bioactivity when compared to commercial GH.

Conclusion: rhGH could be produced in mammalian cell lines at high levels with higher bioactivity. Gene reporter assay is a sensitive, quantitative, rapid, easy, reproducible and safe system for assessment of bioactivity of recombinant proteins such as rhGH.

Keywords: Chinese hamster ovary (CHO), Human growth hormone (hGH), Bioassay, Gene reporter assay, ELISA.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-18]