

تولید هورمون رشد انسانی نو ترکیب 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 پذیرش: ۹۱/۵/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های کشت شده پستانداران به خاطر توانایشان در ایجاد ساختار صحیح پروتئین، تجمع و اصلاحات پس از ترجمه‌ای، سیستم مطلوبی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب با کاربردهای کلینیکی هستند، بنابراین زمانی که یک پروتئین در سلول‌های پستانداران بیان شود در مقایسه با سایر میزبان‌ها از جمله باکتری‌ها، کیفیت و اثر 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 نو ترکیب (rhGH = recombinant human Growth Hormone) توسط یک کلون پایدار از سلول‌های CHO نو ترکیب (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 LHRE (Lactogenic 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 HEK293 Human Embryonic Kidney 293 cells 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 نو ترکیب (rCHO) به خوبی تولید کننده rhGH می‌باشد. از طرفی نتایج حاصل از سیستم بررسی فعالیت زیستی نشان دادند که rhGH یوکاریوت به خوبی فرایند سیگنالینگ درون سلولی را القا می‌کند و حتی در مقایسه با نوع تجاری موجود، نوع یوکاریوت دارای فعالیت زیستی بهتری می‌باشد.

نتیجه گیری: سلول‌های کشت شده پستانداران میزبان‌های بسیار مناسب و ایمنی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب با کاربردهای کلینیکی می‌باشند. روش سیستم گزارشگر ژنی (Gene reporter assay) یک روش بسیار حساس، کارآمد و دقیق و ایمن برای بررسی فعالیت زیستی پروتئین‌های نو ترکیب می‌باشد.

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

مقدمه

(NSO)، کلیه کودک هامستر Baby Hamster (Kidney (BHK)، کلیه جنین انسان (HEK-293) و Human Embryonic Kidney 293 cells) سلول‌های شبکیه انسان نیز در این زمینه کاربرد دارند (۲). ویژگی‌هایی که سلول‌های CHO را به یک رده سلولی مناسب برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب 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 گونه‌ای که اجازه ورود و بیان DNA خارجی را داده و به میزان زیادی پروتئین خارجی را بیان کند، قابلیت تولید

پروتئین‌های درمانی نو ترکیب چهره پزشکی مدرن را در دهه‌های گذشته تغییر داده‌اند و به طور پیوسته درمان‌های موثر و مطلوبی برای بیماری‌های متعدد و مشکل‌آفرین ارائه داده‌اند. حدود ۶۰ تا ۷۰٪ پروتئین‌های دارویی نو ترکیب در سلول‌های پستانداران تولید شده‌اند (۱). علی‌رغم فراوانی رده‌های سلولی در دسترس، امروزه حدود ۷۰٪ پروتئین‌های درمانی نو ترکیب توسط سلول‌های تخمدان هامستر چینی (CHO) ساخته می‌شوند. اگرچه رده‌های سلولی دیگری مانند رده سلولی مشتق شده از ملانوما موشی

یک سیستم گزارشگر به معنی تبدیل اثر یک مولکول 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 روش های سنجش توسط سیستم های 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 لومینسنس (نورتابی شیمیایی) قابل تشخیص است. هر دو پردازش ها فوتون هایی را به عنوان نتیجه انتقال انرژی از لایه های مولکولی حالت تحریک به سطوح پایین تر ایجاد می کنند، اما تفاوت در نوع اوربیتال های تحریک شده است.

کلاس های زیادی از بیولومینسانس در سیر تکاملی وجود دارد. لوسیفرازهایی که به طور گسترده در سنجش ها استفاده می شوند: لوسیفراز حشرات (سوسک) شامل فایرفلای لوسیفراز (Firefly luciferase)، رنیلای لوسیفراز (Renilla luciferase)، کلیک بیتل لوسیفرازها (Click beetle luciferase) (لوسیفرازهای گرفته شده از حشرات دارای کاربردهای گسترده و دامنه وسیعی از رنگ های لومینسانس را ایجاد می کنند) و آکوورین است. در این بین لوسیفرازهای به دست آمده از حشرات دارای کاربردهای گسترده ای هستند و روز به روز 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 دهنده ها، بررسی مسیرهای انتقال پیام درون سلولی و کاربرد به عنوان بیوسنسورها (Biosensores)، بررسی اثر مداخله ای RNA به روش هایی مانند تشخیص جفت های واکنش دهنده در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از یک سیستم شناخته شده به عنوان یکی از دو سیستم هیبرید شده، انتقال انرژی رزونانس

پروتئین به صورت گلیکوزیله، انجام اصلاحات پس از ترجمه ای که برای فعالیت زیستی پروتئین لازم است، ایمن بودن سلول ها به گونه ای که هیچ ماده سمی اضافه ای به پروتئین تولید شده نمی افزاید. از طرف دیگر در مطالعه ای، 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 سلول های CHO متجاوز از ۳۰ میلیارد دلار در سرتاسر جهان است (۱).

به طور کلی سیستم های 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 سلول ها به کار می روند. 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، سلول ها از نظر حضور پروتئین گزارشگر که می تواند خود پروتئین Green fluorescent protein (GFP) یا فعالیت آنزیمی آن (آنزیم لوسیفراز) باشد، بررسی می شوند. از ویژگی های ایده آل یک پروتئین گزارشگر در این سیستم این است که به صورت درون سلولی بیان نشده، بررسی آن حساس، کمی، سریع، آسان، تجدیدپذیر و ایمن باشد (۳).

پروتئین های گزارشگر می توانند از طریق تشخیص خصوصیات ذاتی از قبیل فعالیت آنزیمی، خصوصیات اسپکتروفوتومتتری (Spectrophotometry) و یا به طور غیرمستقیم با سنجش بر پایه آنتی بادی مورد ارزیابی قرار گیرند. به طور کلی سنجش های آنزیمی به علت مقدار کم آنزیم گزارشگر مورد نیاز برای تولید سطوح قابل تشخیص تولیدات واکنش، کاملاً حساس هستند.

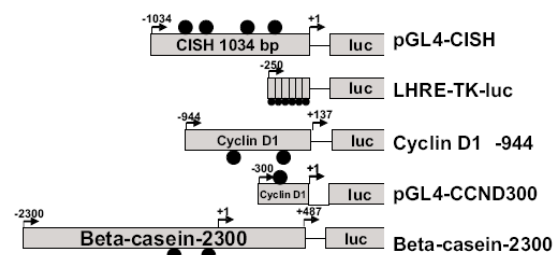
متابولیسم و ایمنی می باشد. به طور کلی فعالیت هورمون رشد به صورت دو گروه آنابولیک و لیپولیتیک مشخص می شود و دارای اثرات مهمی روی متابولیسم پروتئین، لیپید و کربوهیدرات و کلاً تنظیم موقعیت کلی رشد در کودکی و بزرگسالی می باشد. از سایر فعالیت های آن تحریک تقسیم و تکثیر سلول های غضروفی، افزایش رسوب کلسیم و معدنی شدن استخوان، تحریک رشد سلول در هر اندامی از بدن انسان، افزایش متابولیسم، ترمیم سلول های تخریب شده، محرک سنتز پروتئین، کاهش تجزیه پروتئین ها، تحریک سیستم ایمنی، افزایش تجزیه لیپیدها، افزایش انتقال گلوکز، بهبود مثبت تعادل نیتروژن و افزایش زیاد در جذب آمینواسید می باشد (۱۱).

در این پژوهش ابتدا هورمون رشد انسانی نو ترکیب توسط سلول های نو ترکیب 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 نو ترکیب 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 بتاکازین، پروموتور (TK(thymidine kinase promoter) و ژن تحت کنترل آن، Luc کد کننده برای آنزیم فایرفلای لوسیفراز می باشد و امکان بررسی و اندازه گیری انتقال پیام ایجاد شده توسط GH در سلول های ترانسفورم شده با ژن GHR را فراهم می کند (۱۲).

روش بررسی

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

بیولومینسانسی (BRET) (Bioluminescence resonance energy transfer) و تصویر برداری از سلول زنده (۵). سیستم های گزارشگر لوسیفرازی دارای کاربردهای گسترده ای در نمایش وقایع سلولی وابسته به تنظیم رونویسی و بیان ژن به وسیله آبخارهای انتقال پیام (برای مثال RPL/JAK2/STAT5) می باشند. از نمونه ساختارهای گزارشگر در این زمینه می توان به مواردی مانند LHRE-TK-Luc، Cyclin D1 - 944، β -Casein -344 و β -Casein -2300 اشاره کرد. شکل ۱ نمونه هایی از نواحی پروموتوری قابل شناسایی توسط دایمر STAT5 به منظور بررسی مسیر RPL/JAK2/STAT5 می باشد (۶) (شکل ۱). هورمون رشد انسانی (hGH) (human Growth Hormone) یا سوماتوتروپین یک پپتید تک زنجیره کوچک است که توسط سوماتوتروف های (Somatotrophs) اسید دوست بخش جلویی غده هیپوفیز که حدود ۵۰٪ از غده را تشکیل می دهند 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 می شود 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 ۱۸۲ و ۱۸۹ (لوپ کوچک) بسته بندی شده است (۹ و ۱۰). این هورمون دارای فعالیت های زیادی در زمینه رشد و نمو،



شکل ۱. نواحی پروموتوری از سیستم های گزارشگر معمول برای بررسی مسیر RPL/JAK2/STAT5. نواحی اتصال دایمر STAT5 توسط دایره های سیاه رنگ مشخص شده است (۶).

منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین نو ترکیب 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 نیتروسولوز، 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 می باشد و در صورت انتقال به درون سلول، باعث بیان گیرنده هورمون رشد در سطح سلول می شود. در صورت اضافه کردن هورمون رشد کارا به محیط سلول باعث شروع فرایند انتقال پیام و انتقال آن به هسته سلول می شود. پلازمید LHRE کدکننده آنزیم لوسیفراز است، در صورت شروع فرایند انتقال پیام هورمون رشد در سلول و ورود پلازمید LHRE به سیتوپلاسم سلول، دایمر STAT5 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 سوستر با به مخلوط لیز سلولی، آنزیم با سوستر 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 بفر

سلول ها عبارت است از: محیط کشت Dulbecco's DMEM/Ham's F12 Modification of Eagle's Medium/Hams F12 Fetal FCS) (Gibco، آمریکا) دارای ۱۰٪ سرم (calf serum، از شرکت Gibco، آمریکا)، ۱٪ از مخلوط آنتی بیوتیک پنی سیلین- استرپتومایسین (P/S از شرکت Gibco، آمریکا) و در شرایط انکوباتور CO₂ دار (۵٪ CO₂) دارای رطوبت و دمای ۳۷°C کشت داده شد. برای به دست آوردن کلون پایدار از رده سلولی rCHO تولیدکننده rhGH، آنتی بیوتیک جنتیسین (شرکت Sigma، آمریکا) با غلظت ۴۰۰ µg/ml به محیط کشت سلول ها اضافه شد و پس از به دست آوردن کلون پایدار با غلظت ۲۰۰ µg/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 و ۳۴°C نیز صورت گرفت.

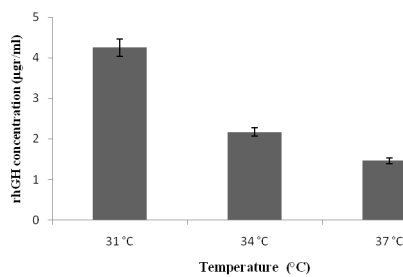
بررسی تولید rhGH توسط سلول های

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، ۲۰ µl از نمونه های مجهول به هر چاهک الیزا که قبلا توسط آنتی بادی ضد hGH پوشیده شده، اضافه شد و سپس ۲۰۰ µl 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، سوستر با مدت ۲۰ دقیقه به چاهک ها افزوده شد و در نهایت واکنش توسط محلول بلاک کننده (Blocking) متوقف شد. در پایان نتایج در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده 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

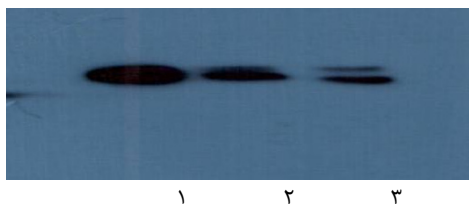
مقایسه ای بین میزان تولید rhGH در دماهای مختلف صورت گرفت (نمودار ۱). چنانکه مشاهده می شود، تغییر دما اثر قابل ملاحظه ای بر میزان تولید rhGH داشته و بیشترین میزان تولید در دمای ۳۱°C به دست آمده است (نمودار ۱).

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 شکل ۲ 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 نو ترکیب (rhGH) به روش سیستم گزارشگر ژنی: ابتدا به روش گفته شده ترانسفکشن سلول های 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



نمودار ۱- مقایسه غلظت rhGH تولید شده در دماهای مختلف به روش الیزا.



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

نمکی فسفات (PBS Phosphate Buffer Saline) 1X، تریپسینه کردن سلول ها و سانتریفوژ، شمارش سلول ها به کمک رنگ آمیزی با محلول ۰/۴٪ تریپان بلو، انتقال سلول ها به تعداد سلول بر میلی لیتر 1.05×10^5 از سلول های Hek293 به پلیت های ۱۲ خانه کشت سلول (در هر خانه ۱ میلی لیتر محیط کشت) و کشت شبانه در انکوباتور 37°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 سلول ها و بافر ترانسفکشن کلسیم فسفات و در آخر قراردادن پلیت در انکوباتور 37°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 منظور مراحل 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 ۵٪ دگسامتازون) دارای غلظت های متفاوت هورمون رشد انسانی تجاری (Samtropin) و هورمون رشد نو ترکیب تولید شده توسط سلول های rCHO.

بررسی نتایج به کمک دستگاه لومینومتر:

پس از ۲۴ ساعت از القا توسط hGH، محیط رویی سلول ها حذف، شستشو با 1X PBS داده، سلول ها به کمک ۱۵۰ میکرولیتر بافر لیز کننده لیز شده، انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط لیز شده سلول ها 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 اندازه گیری و ثبت می کنیم.

یافته ها

پس از کشت سلول های نو ترکیب 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 نو ترکیب نسبت به کنترل (سلول CHO ترانسفورم نشده)،

مقایسه شده است (نمودار ۳).

چنانچه مشاهده می‌شود rhGH تولید شده توسط میزبان یوکاریوت بیان آنزیم لوسیفراز را القا کرده است، لذا نتیجه می‌شود هورمون رشد نو ترکیب تولید شده از نظر زیستی فعال بوده توانایی اتصال به گیرنده خود و انتقال پیام به درون سلول را دارا می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری

هورمون رشد انسانی (hGH) یک پلی پپتید مشتق شده از غده هیپوفیز با طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی شامل تولید سوخت و ساز پروتئین و چربی، تکثیر و تمایز سلولی و رشد و بلوغ بدن می‌باشد. به دلیل نقش‌های گسترده هورمون در بیولوژی طبیعی بدن، این هورمون دارای کاربردهای بالینی زیادی شامل درمان کوتاهی‌ها، بهبود رشد و نمو، شکستگی‌ها، خونریزی‌ها و درمانی کمکی برای بیماری‌هایی مانند ایدز می‌باشد.

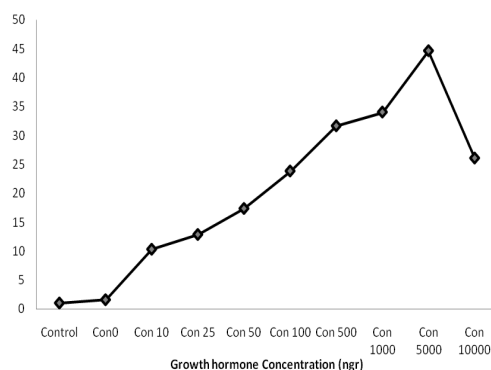
سلول‌های کشت شده پستانداران به خاطر توانایشان در ایجاد ساختار صحیح پروتئین، تجمع و اصلاحات پس از ترجمه‌ای، سیستم مطلوبی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب با کاربردهای کلینیکی هستند. بنابراین زمانی که یک پروتئین در سلول‌های پستانداران بیان می‌شود، در مقایسه با زمانی که در سایر میزبان‌ها از جمله باکتری‌ها، گیاهان و مخمر بیان می‌شود، کیفیت و اثر بهتری دارد. اخیراً، قابلیت تولید سلول‌های کشت شده پستانداران در بیوراکتورها در برخی موارد در حد گرم در لیتر افزایش یافته است یعنی حدود ۱۰۰ برابر نسبت به آنچه در گذشته به وسیله این سلول‌ها به دست می‌آمد. به دلیل ویژگی‌های مناسب رده سلولی تخمدان هامستر چینی از جمله رشد سریع، انتقال راحت و موثر ژن به سلول و قابلیت سلول‌ها برای انجام اصلاحات پس از ترجمه امروزه به عنوان سیستم غالب برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب مخصوصاً با کاربردهای درمانی و در حجم وسیع می‌باشد (۱۳ و ۱۴).

در این پژوهش rhGH بدون هیچ دنباله اضافی توسط سلول‌های ترانسفورم شده CHO تولید، به

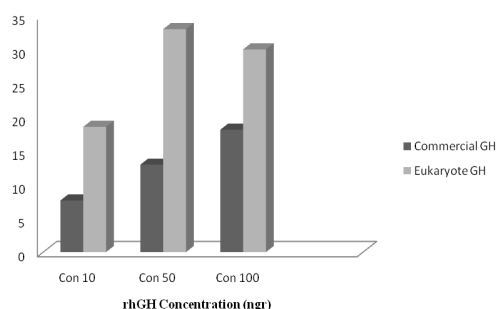
خطای زمینه‌ای یا noise دستگاه کرده (RLU/noise)، عدد حاصله نشان دهنده چند برابر شدن انتقال پیام و القاء بین غلظت‌های مختلف است.

چنانچه در نمودار ۲ مشاهده می‌شود تا غلظت ۵۰۰ نانوگرم هورمون رشد میزان انتقال پیام داخل سلولی و به دنبال آن تولید آنزیم لوسیفراز افزایش یافته و پس از آن روند کاهشی داشته است (نمودار ۲).

در مرحله بعد غلظت rhGH تولید شده توسط سلول یوکاریوت تولید شده در دمای ۳۱°C به روش الیزا تعیین و سپس با غلظت مشخص فرایند القاء صورت گرفته و با نوع rhGH تجاری



نمودار ۲- مقایسه سیگنالینگ ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف hGH تجاری؛ محور افقی: غلظت‌های مختلف هورمون رشد بر حسب نانوگرم در هر میلی لیتر، محور عمودی: میزان چند برابر شدن لومینسانس حاصل از انتقال پیام توسط غلظت‌های مختلف هورمون رشد.



نمودار ۳- مقایسه سیگنالینگ ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف hGH تجاری و rhGH تولید شده توسط سلول rCHO؛ محور افقی: غلظت‌های مختلف هورمون رشد بر حسب نانوگرم در هر میلی لیتر، محور عمودی: میزان چند برابر شدن لومینسانس حاصل از انتقال پیام توسط غلظت‌های مختلف هورمون رشد.

فعال شدن STAT 1, 3, 5 می‌شود (۲۱ و ۲۲). از مزیت های استفاده از سیستم LHRE برای بررسی مسیر انتقال پیام GH می‌توان 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 می‌شود. به علاوه LHRE یک سیستم اختصاصی با واسطه STAT5 (و نه سایر مولکول های STAT) را فراهم می‌کند 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 می‌باشد. 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 سال ۱۳۸۹ و می‌باشد 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

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 می‌باشد، از میان عوامل بررسی شده موثرترین عامل بر افزایش میزان تولید rhGH، کاهش دما تا ۳۱°C می‌باشد که در این حالت نسبت به دمای ۳۷°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 سیستم ها به ابزاری قدرتمند در زمینه تحقیقات زیستی و دارویی تبدیل شده و مرتباً بر کاربردهای این سیستم ها افزوده می‌شود (۶). هورمون رشد دارای اعمال گسترده زیستی از جمله رشد و تمایز سلول ها می‌باشد که با واسطه تمایل زیاد برای اتصال به گیرنده خود در سطح سلول ها نقش خود را ایفا می‌کند. گیرنده هورمون رشد (GHR=Growth Hormone Receptor) متعلق به ابرخانواده گیرنده های سایتوکائینی کلاس یک می‌باشد که به طور خلاصه با اتصال GH به GHR، باعث دایمر شدن دو مولکول GHR و به دنبال آن فعال شدن کیناز JAK2 می‌شود. 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

- 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.
- 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 accumulation and amino acid accrual in 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-length receptor 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.

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 data 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.