

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

نویسندگان: نوشین داودی^{۱*}، محمدمهدی عطارپور یزدی^۲، اعظم همتی^۳ و حسین سلطانی نژاد^۳

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

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

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

Email: davoudi@pasteur.ac.ir

* نویسنده مسئول: نوشین داودی

چکیده

مقدمه و هدف: افزایش کاربردهای درمانی برای اینترفرون گامای انسانی نوترکیب (hrIFN γ) 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 قرار گرفته‌است.

مواد و روش‌ها: به‌منظور تکثیر cDNA ژن IFN γ از روش RT-PCR روی سلول‌های تک‌سته‌ای خون محیطی تحریک‌شده با فیتوهماگلوآنین یک فرد ایرانی سالم استفاده شد و به‌منظور بیان پروتئین hrIFN γ ، cDNA تکثیرشده در دو کاست بیانی کلون شد. به نحوی که هر کاست بیانی دارای یک کپی از ژن hrIFN γ بود؛ این کاست‌های بیانی با روش الکتروپوریشن در جایگاه ژن RNA ریپوزومی (ssu) *L. tarentolae* وارد شدند. پس از ترانسفورم، کلون‌های ترانسفورم‌شده در حضور آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی انتخاب شدند.

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 تأیید شد.

نتیجه‌گیری: تاکنون انواع مختلفی از سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی به‌عنوان سیستم‌های بیانی در تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده شده‌اند ولی به دلیل ویژگی‌هایی، اغلب در بیان این گلیکوپروتئین ناموفق بوده‌اند. سیستم به‌کاررفته در این مطالعه از خصوصیات ویژه از قبیل سرعت رشد بالا، شرایط کشت ارزان و گلیکوزیلاسیون مناسب گلیکوپروتئین‌ها بهره‌مند است که می‌تواند برای تولید پروتئین نوترکیب به‌کار رود.

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

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

دریافت: ۹۱/۳/۳۰

آخرین اصلاح‌ها: ۹۱/۶/۲۹

پذیرش: ۹۱/۷/۱۱

مقدمه

تاکنون انواعی مختلف از سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، حشرات، سلول‌های پستانداران، گیاهان و حیوانات ترانس ژن به عنوان سیستم‌های بیانی به منظور تولید پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱ و ۲)؛ به طور کلی در باکتری‌ها به دلیل اینکه قادر نیستند باندهای دی‌سولفیدی گلیکوپروتئین‌ها و شاخه‌های گلیکان بسازند، سیستم بیان پروتئین آنها به خوبی و به طریقی صحیح انجام نمی‌گیرد؛ 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، به منظور 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 نشان داده شد که *Leishmania protozoan* یک تریپانوزوماتید فلاژلدار است که می‌تواند در بیان ژن‌های خارجی استفاده شود (۴ و ۵). در میان خانواده تریپانوزوماتیدا (*L. tarentolae*) *Leishmania tarentolae* یک پارازیت غیربیماری‌زا است که از نوعی مارمولک به دست آمده و به عنوان یک سیستم بیان یوکاریوتی مستعد توسعه یافته است که باعث بیان بیشتر اریتروپروتئین‌ها و فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن بافتی می‌شود (۶، ۷ و ۸). اینترفرون گامای انسانی (hIFN γ)، یک گلیکوپروتئین ترشحي با وزن مولكولى ۲۵KD است که دو سایت مستعد گلیکوزیلاسیون دارد (۹)؛ این گلیکوپروتئین ترشحي، محصول لنفوسیت T فعال شده و Natural killer cells بوده، به دلیل اینکه یک سایتوکین پیش‌التهابی ضد ویروسی است، کاربردهای

درمانی گوناگونی دارد. در سال‌های ۱۹۸۲ تا ۱۹۹۶، پروتئین IFN γ بیان شده در *E. coli* (همان‌طور که در گذشته اشاره شد)، قادر به انجام تغییرهای پس از ترجمه به منظور گلیکوزیله کردن محصول Pr نبود (۱۰ و ۱۱)؛ در مطالعه‌ای دیگر در سال ۱۹۸۳، ژن اینترفرون گاما در ساکارومایسس سرویزیه تحت کنترل فسفوگلیسرآت کیناز (PGK) کلون شد؛ اما میزان بیان، چندان رضایت‌بخش نبود (۱۲)؛ همانند مخمر، میزان بیان hIFN γ در سلول‌های CHO (chinese hamster ovary) نیز چندان مورد انتظار نبود (۱۳). در مطالعه حاضر کلونینگ و بیان cDNA ژن hIFN γ برای پی‌بردن به میزان کاربرد پروتوزوآها در تولید Pr دارویی نوترکیب انسانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تکنیک cDNA ژن IFN γ : ژن hIFN γ با استفاده از روش RT-PCR از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تحریک شده با فیتوماگلوترینین یک فرد سالم ایرانی خالص - سازی شد؛ به این منظور، ابتدا سلول‌ها کشت داده شدند و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۶°C در انکوباتور قرار گرفتند و کل RNA از تعداد 3×10^6 سلول و با استفاده از عامل ترایزول استخراج شد (Gibco, UK)؛ به این ترتیب که ماده ته‌نشین شده حاصل از شستشوی سلول‌ها در ۱/۵mL ترایزول حل می‌شود و به مدت ۱۰ دقیقه در ۴°C در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده، سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می‌شود. به نحوی که به ازای هر ۱mL ترایزول، ۰/۲ml کلروفرم اضافه می‌شود؛ سپس آن را تکان داده، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می‌شود؛ به طور مجدد، سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C و ۱۲۰۰۰rpm به منظور خارج کردن فاز آبی انجام می‌گیرد. پس از سانتریفیوژ، ۰/۷۵ml ایزوپروپانول به مخلوط اضافه می‌شود و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق باقی‌مانده ماند و مانند مراحل گذشته، محلول به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm و دمای ۴°C سانتریفیوژ می‌شود و در نهایت، RNA ته‌نشین شده به وسیله

جداسازی یک قطعه ۰/۷kb از هر یک از پلاسمید ۸/۲kb (PFX1.4sat) و پلاسمید ۸/۷kb (PFX1.4hyg) شد؛ سپس ژن IFN γ در سایت *Bgl*II کلون شد.

پس از اینکه پلاسمیدهای نو ترکیب PFX1.4sat.IFN γ و PFX1.4Hyg.IFN γ به وسیله کیت استخراج پلاسمید تجاری (Qiagen GmbH, Germany) خالص شدند، وجود ژن اینترفرون گاما به وسیله آنالیز چندین آنزیم برشی (restriction analysis) و سکانس کردن به وسیله پرایمرهای Forward و reverse M13 مورد تأیید قرار گرفت.

کشت و انتقال به انگل *L. tarentolae*

به منظور انجام ترانسفکشن از سلول‌های *L. tarentolae* کشت داده شده در محیط BHI (Brain Heart Fusion) شرکت (DIFCO, USA) حاوی ۵ μ g/mL همین، استفاده شد (Sigma, USA) و عمل ترانسفکشن به روش الکتروپوریشن، روی پروماستیگوت‌های کشت شده در لوله آزمایش صورت گرفت (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 *Swa*I هضم شد؛ نتیجه هضم آنزیمی وکتور بیانی، یک قطعه ۲/۹ kbp شامل قسمت‌های مربوط به تکثیر در باکتری *E. coli* بود؛ همچنین، قطعات بزرگتر ۵/۱ kbp و ۵/۶ kbp به ترتیب از پلاسمیدهای بیان شده خارج شد؛ این قطعات، حاوی قسمتی از توالی‌های ژنوم انگل است که دربرگیرنده ژن اینترفرون گاما و مارکر آنتی‌بیوتیکی است؛ سپس قطعات DNA بریده شده با استفاده از کیت کیاژن، از ژل آگارز ۰/۸ درصد استخراج شدند و با استفاده از الکتروپوریشن در دو مرحله به سلول انگل انتقال یافتند (شکل شماره ۳). پس از اولین مرحله ترانسفکشن با sat.IFN γ ، سلول‌ها در محیط BHI نیمه-جامد دارای ۶۰ μ g/ml نوزوترایسین برای انتخاب کلون-های مقاوم کشت داده شدند؛ در مرحله بعد، کلون‌های منفرد انتخاب شدند و به پلیت‌های ۲۴ خانه منتقل شدند و به ترتیب از پلیت‌های یاد شده به فلاسک‌های کشت

اتانل ۷۵ درصد شسته و در ۳۰ μ L آب حل می‌شود؛ در مرحله بعد، cDNA با استفاده از کیت سنتتاز تک-رشته‌ای (Fermentas, lithuania) براساس دستورالعمل بیان شده ساخته شد. به این منظور، ۱ μ L از الیگو dT (۵۰ μ mol/ μ L)، به میزان ۱ تا ۵ میکروگرم از RNA اضافه می‌شود و حجم نهایی واکنش به ۱۱ μ L افزایش می‌یابد و مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ $^{\circ}$ C نگهداری می‌شود و سپس به سرعت، روی یخ خنک می‌شود؛ در مرحله بعد، ۲ μ L از ۱۰ mM dNTP، ۲ μ L آنتی RNase و ۴ μ L بافر واکنش ۵x اضافه می‌شود تا اینکه حجم نهایی واکنش به وسیله آب به ۱۹ μ L افزایش می‌یابد. پس از نگهداری مخلوط واکنش حاصل در دمای ۳۷ $^{\circ}$ C به مدت ۵ دقیقه، مقدار ۴۰ واحد از آنزیم Moloney murine Leukemia virus reverse transcriptase اضافه می‌شود و پس از اضافه کردن آنزیم، مخلوط واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ $^{\circ}$ C یا ۱۰ دقیقه در ۷۰ $^{\circ}$ C نگهداری می‌شود و در نهایت، این مخلوط در دمای ۷۰ $^{\circ}$ C فریز می‌شود.

نحوه ساخت وکتورهای بیانی نو ترکیب

به این منظور، محصول PCR تخلیص شده، درون پلاسمید PTZ57R با استفاده از کیت InsT/AcloneTM Product cloning kit (Fermentas, Lithuania) کلون شد و پلاسمید نو ترکیب به روش Sequencing آنالیز شد. ژن IFN γ کلون شده به وسیله پرایمرهای

IFN5'GGCGGATCCATGCAGGACCCATATGTA3'
R- و F-
IFN5'GGCGGATCCCTTACTGGGATGCTCTTCGAC
3' که دارای سایت برش *Bam*HI در هر انتهای 5' هستند، به وسیله روش PCR تکثیر شد، به نحوی که قطعه IFN γ خالص شده، درون پلاسمیدهای بیانی PFX1.4Hyg و PFX1.4sat (Jena Bioscience, , Germany) کلون شد؛ روش کار به صورت خلاصه شرح داده می‌شود:

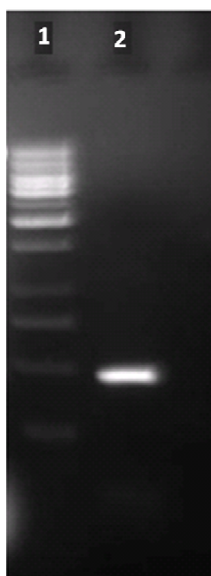
برای قرارگیری قطعه IFN γ خالص شده، درون پلاسمیدهای بیانی PFX1.4Hyg و PFX1.4sat ابتدا وکتورهای بیانی PFX1.4hyg و PFX1.4sat پس از برش با آنزیم *Bgl*II به منظور تأیید هضم آنزیمی صحیح، روی ژل آگاروز الکتروفورز شدند؛ این برش آنزیمی، سبب

ثانویه IgG-HPR (Dako, UK) به عنوان آنتی‌بادی دوم استفاده شدند.

نتایج

کلون cDNA ژن اینترفرون گاما

cDNA ژن hIFN γ با روش RT-PCR ساخته شد (در قسمت مواد و روش‌ها بیان شدند) و PCR روی DNA استخراج شده از سلول‌ها با استفاده از پرایمرهایی که در انتهای خود، سایت‌های برشی *Bam*HI 5' دارند، انجام شد. پس از الکتروفورز، فقط یک باند دارای سایز حدود 500bp روی ژل آگاروز مشاهده شد (شکل شماره ۱): همچنین تأیید کلونینگ ژن مورد نظر با استفاده از آنزیم‌های برشی و سکانس DNA انجام گرفت. نتیجه BLAST توالی به دست آمده با mRNA ژن hIFN γ شباهت ۱۰۰ درصد را نشان داد (Gen-Bank: AF506749.1).



شکل شماره ۱. ستون ۱: مارکر 1kb استاندارد، ستون ۲: تأیید نهایی محصول PCR ژن اینترفرون گاما با وزن حدود 500bp.

کاست‌های بیانی ژن hIFN γ

شکل شماره ۲، تصویر شماتیک Ligation ژن اینترفرون گاما در قطعه 7/5kb از وکتور PFX1.4sat اختصاصی لیسمانیا را نشان می‌دهد. تنها تفاوت میان دو وکتور بیانی، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک است که در اینجا وکتور بیانی PFX1.4hyg نشان داده نشده است.

بافت 25ml دارای آنتی‌بیوتیک انتخابی (نورزوتراپسین (ClonNAT, Jena, Germany)، منتقل شدند؛ سپس، آنالیز PCR روی DNA ژنومیک جدا شده از کلون‌های مقاوم به نورزوتراپسین، به منظور تأیید ترانسفکشن انجام گرفت. پس از تأیید ترانسفکشن اول به وسیله PCR، دومین مرحله ترانسفکشن با استفاده از قطعه IFN γ -hyg انجام شد و سلول‌های ترانسفورم شده، روی محیط نیمه جامد دارای 50 μ g/ml هیگرومایسین و 60 μ g/ml آنتی‌بیوتیک نورزوتراپسین کشت داده شدند؛ در نهایت کلون‌های دارای دو ژن مقاومت در محیط مایع BHI حاوی دو آنتی‌بیوتیک یاد شده، منتقل و تکثیر شدند.

انتخاب کلنی‌های *L. tarentolae* ترانسفورم شده

به منظور تأیید ورود کاست دارای ژن اینترفرون گاما نو ترکیب مورد نظر به داخل ژنوم لیسمانیا، روی DNA ژنومیک حاصل از کلنی‌های خالص شده مقاوم به هیگرومایسین و نورزوتراپسین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی hyg و sat، PCR صورت گرفت؛ همچنین ورود کاست یاد شده به داخل لوکوس ssu (18 s rRNA) با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای hyg forward و sat reverse اختصاصی ssu مورد تأیید قرار گرفت.

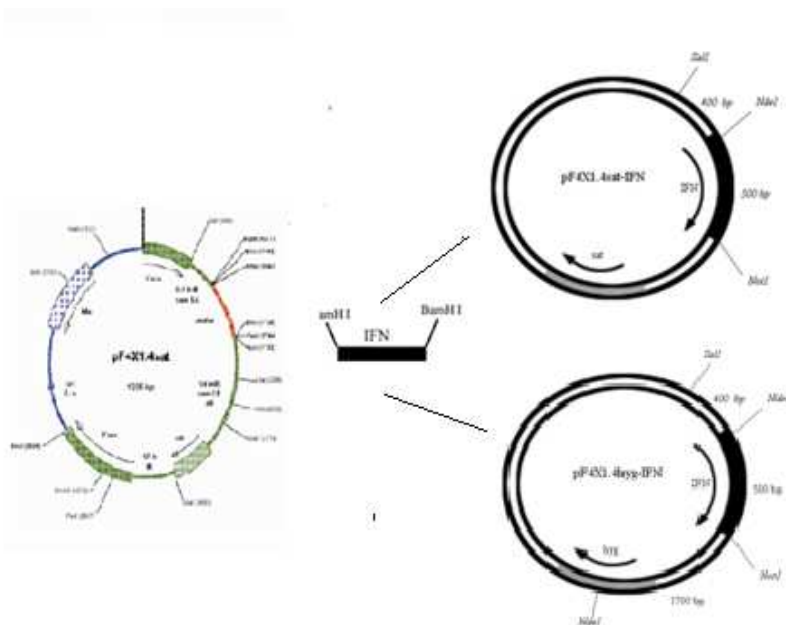
آزمایش وسترن بلات

در آزمایش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی پلی-کلونال خرگوش علیه اینترفرون گامای انسانی، وجود این پروتئین در لیز سلول‌های ترانسفورم شده شناسایی شد. پس از استخراج پروتئین هر دو نوع سلول نوع وحشی و ترانسفورم شده از سلول لیز شده (۸)، 20 μ g از هر نمونه، روی ژل SDS-PAGE برده شد. ژل پلی-آکرلامید به وسیله کوماسی بلو G-250 رنگ آمیزی و با استفاده از آب MQ رنگ‌بری شد و در نهایت، روش وسترن بلاتینگ به وسیله یک سری مراحل استاندارد و روی ژل آکرلامید مشابه ژل یاد شده انجام شد (۱۵)؛ همچنین در ابتدا آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوش علیه اینترفرون گامای انسانی (Abcam, uk) و سپس آنتی‌بادی

انتقال به سلول‌های *L. tarentolae*

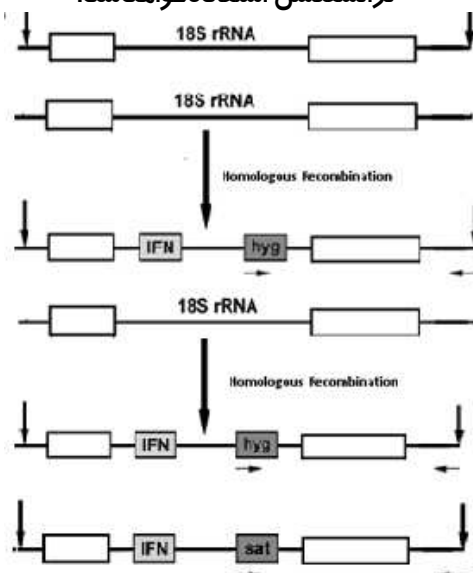
مرحله و هربار با استفاده از یک سازه حاوی مارکر آنتی‌بیوتیکی هیگرومایسین یا نورزئوترایسین انجام گرفت (شکل شماره ۳).

به‌منظور انتقال دو سازه تهیه‌شده به درون انگل از روش الکتروپوریشن استفاده شد. الکتروپوریشن در دو



شکل شماره ۲. تصویر شماتیک از پلاسمید PFX1.4-IFN γ که برای بیان پروتئین hrIFN γ به کار رفته است. دو وکتور که فقط در ژن آنتی‌بیوتیک: هیگرومایسین یا نورزئوترایسین متفاوت‌اند ساخته شدند. از هر یک از آنها در مراحل

ترانسفکشن استفاده خواهد شد.

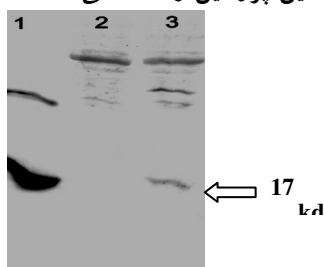


شکل شماره ۳. نمایش شماتیک نحوه قرارگیری سازه‌های حاوی ژن IFN γ در لوکوس ssu (18 s rRNA): همان‌طور که مشاهده می‌شود، پس از دو بار ترانسفکشن هر دو آلل لوکوس ssu حاوی ژن IFN γ و ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی هیگرومایسین Hyg و نورزئوترایسین sat هستند.

قرارگیری کاست ژنی حامل IFN γ در سایت مورد نظر را تأیید می‌کند. این باند در سوش وحشی وجود ندارد.

وسترن بلات

بیان hrIFN γ توسط آنالیز وسترن بلات بررسی شد. باند پروتئین ۱۷KD (شکل شماره ۵، لاین ۱) هم در خصوص اینترفرون گامای تجاری و هم در خصوص hrIFN γ به دست آمده از کلون‌های ترانسفورم شده قابل مشاهده است. در سلول‌های نوع وحشی، این پروتئین به وسیله آنتی‌بادی پلی‌کلونال شناسایی نشده است که عدم وجود این پروتئین را نشان می‌دهد (شکل شماره ۵).



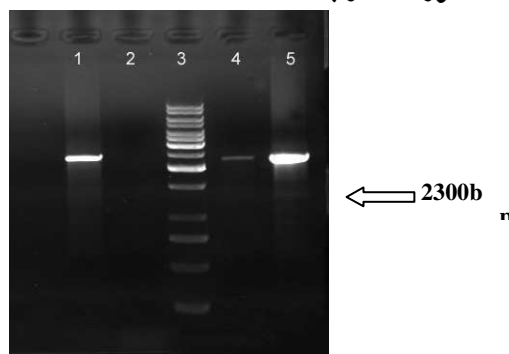
شکل شماره ۵. آزمایش western blot تأیید وجود پروتئین اینترفرون گاما در سلول انگل ترانسفکت شده. ستون ۱- استاندارد اینترفرون گاما؛ ستون ۲- لیز سلول لیثمانیا نوع وحشی (فاقد باند اینترفرون) و ستون ۳- لیز سلول لیثمانیا ترانسفکت شده (تولیدکننده اینترفرون نو ترکیب)

بحث

یکی از سیستم‌های بیان یوکاریوتی مستعد برای تولید سطحی بالا از پروتئین‌های نو ترکیب دارویی فعال، پارازیت *Leishmania tarentolae* است که از نوعی مارمولک به دست آمده است (۶ و ۱۶)؛ این پارازیت به دلایل مختلف از جمله سرعت رشد بالا در مقایسه با سلول‌های پستانداران، امکان کشت در حجم بالا، داشتن محیط کشت ساده، غیربیماری‌زا بودن برای انسان و وجود شباهت‌های ساختاری الیگوساکاریدی انگل لیثمانیا با الیگوساکاریدهای پستانداران از نظر وجود باقیمانده‌های یاد شده و گالاکتوز N-Linked اهمیت فراوانی یافته است؛ به نحوی که تولید پروتئین در این

تأیید سلول نو ترکیب به دست آمده

پس از ترانسفکشن، ابتدا غربالگری سلول‌های به دست آمده با استفاده از مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط‌های کشت حاوی نوزوترایسین و هیگرومایسین انجام شد؛ سپس سلول‌های مقاوم به هر دو آنتی‌بیوتیک کشت داده شد (در بخش روش‌ها شرح داده شده است) و روی آنها آزمایش PCR انجام گرفت. با استفاده از PCR وارد شدن ژن hIFN- γ (۴۶۰bp)، sat (۵۰۰bp) و hyg (۱۰۰۰bp) درون DNA ژنومیک سلول‌های نو ترکیب تأیید شدند؛ علاوه بر این، هم در سلول‌های نوع وحشی و هم در سلول‌های ترانسفورم شده با کاست sat.IFN- γ در لوکوس مورد نظر (ssu) با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای sat forward و ssu reverse تأیید شد و باند ۲/۳kb مورد انتظار، فقط در سلول‌های ترانسفورم شده با PFX1.4sat.IFN- γ مشاهده شد (شکل شماره ۴) و ورود صحیح کاست IFN- γ دلالت دارد. پس از واردسازی دومین سازه که دارای ژن مقاومت Hyg است، PCR با پرایمرهای hyg forward و ssu reverse نیز انجام شد و باند ۲/۸kb مورد انتظار به دست آمد.



شکل شماره ۴. تأیید قرارگیری درست کاست ژنی تهیه شده در لوکوس ssu ریپوزومال 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 قرار می‌گیرد (توضیح در متن). ۱- نمونه تست یک؛ ۲- نمونه نوع وحشی؛ ۳- مارکر؛ ۴- نمونه تست دو و ۵- نمونه تست سه، باند ۲۳۰۰ بازی به دست آمده

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 به کار می‌رود؛ این موضوع، سبب جلب توجه و تلاش دانشمندان برای تولید این پروتئین در سیستم‌های بیانی مختلف شده است. گلیکوزیلاسیون معمول پروتئین IFN- γ به افزایش زمان فعالیت بیولوژیکی و همچنین مقاومت به پروتئاز در این پروتئین منجر می‌شود (۹).

اگرچه E.coli ممکن است به عنوان یک میزبان مناسب با سطح نسبی بیان بالا مطرح شود (۵ و ۱۱)، نداشتن تغییرها پس از ترجمه و نیاز به مرحله refolding، هنوز به عنوان یک مشکل حاد در این میزبان قابل بررسی است؛ با این حال *L. tarentolae* به عنوان یک سیستم بیان ژنی یوکاریوتی و به دلیل گلیکوزیلاسیون و تشکیل باند دی-سولفید نسبت به دیگر سیستم‌های بیانی ارجحیت دارد (۲۸)؛ بنابراین در این پارازیت، پروتئین hrIFN γ به راحتی قادر به تشکیل و نیز دارای فعالیت بالا و مقاوم به پروتئاز است. مطالب یادشده در بالا تأکیدی کند که سیستم بیان ژنی در پارازیت *Leishmania*، ترکیبی از مزایای هر دو سیستم پروکاریوتی و یوکاریوتی است؛ به هر حال، افزایش تعداد copy number ژن مورد نظر و در نتیجه، میزان بیان آن به وسیله انتقال دومین کاست بیانی به کلون‌های ترانسژنیک و با استفاده از شدت باندهای حاصل شده بررسی شد (داده‌ها نشان داده نشده-اند) و مشابه این نتایج، پیش‌تر توسط محققان در تولید پروتئین‌های دیگر گزارش شده‌اند (۶، ۸، ۱۶ و ۲۹).

در مرحله بعد به دنبال 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 نشان دهیم.

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

با وجود اینکه *Leishmania* دارای محدودیت‌هایی مانند نیاز به محیط کشت تهیه شده 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 بیان شده دارای فعالیت بیولوژیکی بوده است (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 به صورت واحدهای پلی‌سیسترونیک قرار گرفته‌اند (۲۰ تا ۲۳). قابل اشاره است که نسخه برداری روی کروموزوم‌های این پارازیت بدون داشتن پروموتورهای مشخص RNA PolymeraseII یا دیگر معیارهای معمول رونویسی انجام می‌شود (۲۴)؛ در مجموع نتایج مطالعات، شباهت ترسحات درونی Trypanosomatidae به سیستم‌های دارای بیان بالای یوکاریوتی مانند Cell line پستانداران را نشان می‌دهند (۲۰، ۲۵ و ۲۶).

در این مطالعه، بدین دلیل که نواحی بین‌ژنی غیرقابل ترجمه، نقشی مهم در تغییرهای پس از رونویسی در trypanosomidae دارند (۲۷)، تلاش شد تا پروتئین hIFN- γ نوترکیب *L. tarentolae* تولید شود؛ بنابراین cDNA ژن اینترفرون گاما میان دو ناحیه غیرقابل ترجمه در وکتورهای بیانی تجاری، کلون شد. به منظور افزایش میزان بیان، دو کاست بیانی که هریک، دارای یک کپی از cDNA ژن اینترفرون گاما بودند، ساخته شدند و به داخل سلول‌های لیشمانیا انتقال یافتند؛ 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.

منابع

- 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.
- 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.
- Ogrydziak DM. Yeast extracellular proteases. *Crit Rev Biotechnol* 1993; 13: 1-55.
- 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.
- 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.
- 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.
- Clayton C, Hausler T, Blattner J. Protein trafficking in kinetoplastid protozoa. *Microbiol Rev* 1995; 59(3): 325-44.
- 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. *Biotechnol J* 2010; 5: 1198-1206.
- 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.
- 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.
- 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.
- Derynck R, Singh A, Goeddel DV. Expression of the human interferon-gamma cDNA in yeast. *Nucleic Acids Res* 1983; 11(6): 1819-37.
- 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.
- Beverly SM, Clayton CE. Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. *Methods Mol. Biol* 1993; 21: 333-348.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 156 (2): 93-101.
- Haile S, Papadopoulou B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10 (6): 569-77.
- Ivens AC, Peacock CS, Wortley EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 2005; 309 (5733): 436-42.
- 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.
- 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.
- Basile G, Peticca M. Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol* 2009; 43: 273-278.
- 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.
- Teixeira SM. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 1503-1516.
- Fernandez-Robledo JA, Vasta GR. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends Parasitol* 2010; 26 (5): 244-54.
- 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 IFN γ in *Leishmania tarentolae*

Noushin Davoudi^{1*}, Mohammad Mehdi Attarpour Yazdi², Azam Hemmati³, Hossein Soltaninejad³

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 (hrIFN γ) 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 (IFN γ) 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: hrIFN γ , ssu locus, *L. tarentolae*