ساخت سویه بیانی مخمر نوترکیب مولد EpEX به‌عنوان انتخابی مناسب در تشخیص و درمان سرطان

مژده زمانی [۱](M.Sc Student)، عطیه هاشمی [۲*](Ph.D)، نجمه زارعی [۳](Ph.D)، هدی جهاندار [۴،۱](Ph.D)

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲ - بخش بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- بخش زیست فناوری پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۸۸۲۰۰۰۶۷ at_hashemi@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: تاریخ پذیرش:

چکیده

هدف: مولکول چسبان سلول اپیتلیال (EpCAM) یک گلیکوپروتئین غشایی است که بیان آن در اکثر تومورهای با منشأ اپیتلیالی افزایش می‌یابد و لذا می‌تواند در شناسایی و درمان سرطان‌ها با کمک روش‌های ایمونولوژیکی به‌عنوان یک هدف مناسب به‌کار گرفته شود. لذا تولید نوترکیب این پروتئین به فرم طبیعی حایز اهمیت می‌باشد. در دو دهه‌ی گذشته مخمر *پیکیا پاستوریس* به‌دلیل دارا بودن مزایای هر دو سیستم بیانی پستاندار و پروکاریوتی، به‌عنوان میزبان رایج در تولید پروتئین‌های نوترکیب مطرح بوده است. در این مطالعه *پیکیا* بیان‌کننده بخش خارج سلولی EpCAM ساخته شده است.

مواد و روش‌ها: ژن بهینه شده‌ی کدونی مولد پروتئین EpEX در محل‌های برشی آنزیم‌های *Xho*I و *Xba*I وکتور pPICZαB همسانه‌سازی شد. سازه نوترکیب با کمک الکتروپوراسیون در سویه GS115 وارد شد. کلون‌های مثبت با کمک PCR و با استفاده از جفت پرایمر مربوط به ژن *AOX1* ارزیابی شدند.

یافته‌ها: صحت ساخت سازه نوترکیب pPICZαB-EpEX با استفاده از توالی‌یابی و آنالیز آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *XhoI* و *Xba*I (باندهای ۳۵۰۶ و ۸۴۳ جفت باز) هم‌چنین *BamHI* (باندهای ۳۶۵۱ و ۶۹۸ جفت باز) تأیید شد. نتایج حاصل از غربالگری بر پایه PCR، زمانی‌که دو پرایمر مربوط به ژن *AOX1* به‌کار گرفته شد، نشان‌دهنده‌ی حضور دو باند (۲۲۰۰ و ۱۳۴۵ جفت باز) در کلون‌های نوترکیب بود.

نتیجه‌گیری: ساخت سویه مهندسی شده مولد EpEX در این مطالعه تأیید شد. از این سویه ساخته شده می‌توان در تولید پروتئین نوترکیب EpEX جهت اهداف تشخیصی و درمانی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: *پیکیا پاستوریس*، همسانه سازی مولکولی، EpEX، Epithelial cell adhesion molecule، سرطان

مقدمه

مولکول چسبان سلول اپیتلیال (EpCAM)، یک گلیکوپروتئین بین غشائی نوع یک است که بیان آن در سرطان‌های اپیتلیال افزایش می‌یابد. EpCAM یک پلی‌پپتید ۴۰ کیلودالتونی متشکل از ۳۱۴ اسیدآمینه است و ژن مولد آن روی کروموزوم شماره‌ی ۲ واقع شده است. این پروتئین از نظر ساختاری دارای یک دومین خارج سلولی انتهای آمینی، یک دومین گذرانده از غشا و یک دومین کوتاه سیتوپلاسمی است [۲،۱]. نتایج حاصل از مطالعات متعدد حاکی از حضور اتوآنتی‌بادی علیه بخش خارج سلولی پروتئین EpCAM در سرم بیماران مبتلا به کارسینومای روده است [۳]. از آن‌جائی‌که این اتوآنتی‌بادی‌ها در مراحل اولیه‌ی بیماری نیز قابل شناسایی هستند می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای بیولوژیکی در شناسایی زودهنگام این دسته از سرطان‌ها مفید باشند [۴]. بنابراین تولید نوترکیب بخش خارج سلولی این پروتئین به‌منظور طراحی سیستم‌های الایزا (ELISA) در تعیین سطح سرمی اتوآنتی‌بادی علیه این آنتی‌ژن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از طرفی دیگر حضور اتوآنتی‌بادی‌ها نشان‌دهنده‌ی شناسایی این آنتی‌ژن توسط سیستم ایمنی است. از این رو آنتی‌ژن EpCAM می‌تواند به‌عنوان یکی از اهداف ارزشمند در ایمونوتراپی غیرفعال به‌کمک آنتی‌بادی منوکلونال درمانی و ایمونوتراپی فعال به‌کمک شکل نوترکیب پروتئین محسوب شود [۶،۵]. بنابراین بیان شکل کامل و یا بخش

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

خارج سلولی پروتئین EpCAM هم در تشخیص و هم در درمان از ارزش ویژه‌ای برخوردار است.

با توجه به اهمیت بخش خارج سلولی پروتئین EpCAM در انواع سرطان‌ها و کاربردهای متعدد آن در پیشگیری، تشخیص و درمان، گزارشات متعددی مبنی بر بیان این پروتئین در میزبان‌های مختلف از جمله *اشریشیاکلی*، باکولوویروس و سلول‌های گیاهی منتشر شده است [۷-۹]. از آن‌جائی‌که گلیکوزیلاسیون برای این پروتئین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، به‌کارگیری سیستم‌های بیانی یوکاریوتی نظیر رده‌های سلولی پستانداران و سلول‌های حشره نظیر باکولوویروس مناسب به‌نظر می‌رسد. اما به‌دلیل مدت زمان طولانی کشت و پرهزینه بودن رشد در این سیستم‌ها دستیابی به پروتئین‌های گلیکوزیله نوترکیب مقرون به صرفه نخواهد بود [۱۰]. در این موارد مخمرها به‌عنوان سیستم‌های بیانی یوکاریوتی گزینه‌ی مناسبی به‌نظر می‌رسند. چرا که این یوکاریوت‌ها برخلاف سیستم‌های بیانی باکتریایی، علاوه بر گلیکوزیلاسیون و تسهیل انجام بسیاری از تغییرات پس از ترجمه‌ی معمول دیگر نظیر تاخوردگی صحیح، تشکیل پیوندهای دی سولفیدی، پردازش توالی سیگنالی و نیز پردازش پروتئولیتیک قادرند در محیط کشت ارزان خیلی سریع رشد کنند [۱۱،۱۲]. علاوه بر موارد ذکر شده، ویژگی‌های منحصر به فرد دیگر این یوکاریوت میکروبی، آن را در تولید زیست داروها، آنزیم‌های صنعتی [۹]، همچنین تولید و ترشح پروتئین‌هایی با منشاء انسانی، حیوانی، گیاهی، قارچی، باکتریایی و ویروسی پرکاربرد کرده است [۱۰،۱۲]. *پیکیا پاستوریس* (*Pichia pastoris*) یکی از متداول‌ترین میزبان‌های مخمری در تولید پروتئین‌های نوترکیب محسوب می‌شود که از متانول به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کند [۱۲]. با این وجود، تاکنون گزارشی مبنی بر بیان بخش خارج سلولی پروتئین EpCAM در *پیکیا پاستوریس* منتشر نشده است لذا در این مطالعه با توجه به کاربردهای متعدد این بخش پروتئینی در تشخیص و درمان و به‌منظور دستیابی به مقادیر بالایی از پروتئین با حلالیت و فعالیت بیولوژیکی مناسب از *پیکیا پاستوریس* به‌عنوان میزبان استفاده شده است. سویه GS115 به‌دست آمده در این مطالعه پایه‌ای را برای مطالعات بیانی EpEX در آینده فراهم خواهد کرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آنزیم‌های محدودکننده و لیگاز از Thermo Fisher، کیت استخراج پلاسمید GF-PL-050 از شرکت vivantis، کیت خالص‌سازی پلاسمید high pure PCR product purification kit از شرکت Roche، آنتی‌بیوتیک Zeocine از Invitrogen، PCR product (master mix) از Ampliqon و DNA ladder از شرکت سیناکلون خریداری شد.

سویه‌های میکروبی، پلاسمیدها و محیط کشت

E. coli DH5-α (اهدایی دکتر کرامتی) به عنوان میزبان برای دست‌کاری DNA و پیکیا پاستوریس سویه GS115 (بانک سویه انستیتوپاستور ایران) با فنوتیپ Mut مثبت برای مطالعات بیانی انتخاب شدند. وکتور pPICZαB که دارای پروموتور القایی *AOX1* پیکیا *پاستوریس* است از بانک ژن انستیتوپاستور ایران تهیه شد. *E. coli* DH5-α در محیط کشت Luria Bertani (LB) (حاوی تریپتون ۱ درصد وزنی-حجمی و عصاره مخمر ۰/۵ درصد و سدیم کلراید ۱ درصد و PH برابر با ۷ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) کشت داده شد. و نیز محیط کشت LB با درصد نمک پایین (حاوی تریپتون ۱ درصد وزنی-حجمی و عصاره مخمر ۰،۵ درصد و سدیم کلراید ۰/۵ درصد و PH برابر با ۷/۵) برای کشت انتخابی سویه‌های ترانسفورم شده مقاوم به زئوسین استفاده شد. به‌منظور جداسازی ترانسفرمنت‌های حاوی وکتور بیانی از آنتی‌بیوتیک زئوسین ۲۵ µg/ml و آمپی‌سیلین ۱۰۰ µg/ml در محیط کشت LB استفاده شد. سویه‌ی مخمر *پیکیا پاستوریس* در محیط YPD (حاوی ۱ درصد وزنی-حجمی عصاره مخمر و ۲ درصد پپتون و ۲ درصد دکستروز) کشت داده شد. در حالی‌که محیط کشت YPDS علاوه بر مقادیر ذکر شده حاوی سوربیتول ۱ مولار نیز می‌باشد. پلیت حاوی YPD آگار برای رشد *پیکیا پاستوریس* سویه GS115 و پلیت YPD آگار حاوی زئوسین زئوسین (غلظت µg/ml ۲۰۰) در انتخاب سویه‌های ترانسفورم شده‌ی *پیکیا پاستوریس* به‌کار گرفته شد.

ساخت سازه بیانی pPICZαB-EpEX

به منظور بیان کامل توالی انتهای آمینی EpEX، در طراحی سازه مربوطه، ژن مولد این پروتئین بلافاصله پس از سایت برشی Kex2 قرار داده شد. هم‌چنین یک قطعه‌ی ژنی مولد دنباله‌ی شش هیستیدینی در انتهای کربوکسیلیک ژن مورد نظر در جهت تسهیل در فرایند خالص‌سازی قرار داده شد [۱۳]. ژن مولد EpEX پس از بهینه‌سازی کدونی توسط شرکت سنتز شد. به منظور آماده‌سازی کاست بیانی، قطعه سنتز شده ژنی مولد EpEX از وکتور کلونینگ حد واسط به نام pGH-EpEX توسط دو آنزیم *XbaI* , *XhoI* برش داده شد و ژن مولد EpEX در وکتور pPICZαB طوری قرار گرفت تا پروموتر *AOX1* در قسمت بالا دست ژن مورد نظر قرار گیرد. سازه نهایی بیانی، pPICZαB-EpEX نام گرفت و به داخل سلول‌های باکتریایی مستعد *E. coli* DH5-α ترنسفورم شد. سپس سویه‌های ترانسفورم شده حامل pPICZαB-EpEX در محیط کشت LB با غلظت نمک پایین و غلظت زئوسین برابر با ۲۵ µg/mL انتخاب شدند. به منظور تأیید

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

حضور ژن مولد EpEX در سازه بیانی pPICZαB-EpEX، وکتور نوترکیب با دو جفت آنزیم (*XhoI* و *XbaI*) هم‌چنین *BamHI* برش داده شد. علاوه بر آن، صحت وکتور نوترکیب به کمک توالی‌یابی مورد تأیید قرار گرفت. روش عمومی دست‌کاری ژنتیکی بر اساس روش‌های استاندارد انجام شد. آنزیم‌های محدودالاثر و لیگاز از شرکت Thermo Fisher Scientific (USA) تهیه شد. ترکیبات شیمیایی از منابع شیمیایی استاندارد تهیه شدند.

ترانسفورماسیون *پیکیا پاستوریس* و انتخاب کلونی‌های نوترکیب

وکتور خطی شده‌ی pPICZαB-EpEX توسط آنزیم *SacI* برای ترانسفورم کردن *پیکیا پاستوریس* سویه‌ی مستعد GS115 طبق پروتکل استفاده شد. بدین ترتیب که سویه‌ی مستعد، با رشد GS115در محیط YPD مایع و شست و شو با آب سرد و سوربیتول حاصل شد. ۵ میکروگرم از وکتور خطی شده pPICZαB–EpEX و نیز وکتور مادر که فقط شامل pPICZαB می‌باشد (به عنوان کنترل منفی) با ۸۰ میکرولیتر سلول‌های مستعد شده، مخلوط شد. سپس جهت الکتروپوراسیون و تکمیل فرایند ترانسفورماسیون از دستگاه Gene Pulser Xcell (BioRad, Germany) با تنظیمات ۱۵۰۰ ولت و ظرفیت ۲۵ میکروفاراد و مقاومت ۲۰۰ اهم استفاده شد. سپس سویه‌های ترانسفورم شده به مدت ۷–۴ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت YPDSبا غلظت زئوسین ۲۰۰ µg/ml انکوبه شد که پس از طی این مدت کلونی‌های ترانسفورم شده ظاهر شدند. سلول‌های GS115 به تنهایی بدون افزودن DNA نیز تحت ترانسفورماسیون قرار گرفتند و به عنوان کنترل منفی برای پروسه الکتروپوراسی‌ون استفاده شدند.

استخراج ژنوم مخمر

به منظور استخراج ژنوم مخمر از روش لیتیم استات– سدیم دو دسیل سولفات (LiOAc-SDS)استفاده شد [۱۴]. بدین ترتیب که تک کلون ایجاد شده روی پلیت در ۱۰۰ µL محلول حاوی لیتیم استات ۲۰۰ mM و SDS یک درصد وارد می‌شود. پس از 5min انکوباسیون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰۰µL اتانل ۹۶–۱۰۰ درصد به محتویات افزوده شد و ورتکس شد. سپس پلت همراه با ژنوم به کمک سانتریفوژ رسوب داده شد و با اتانل ۷۰ درصد شستشو داده شد. در نهایت پلت در۱۰۰ µL آب حل شد و پس از سانتریفیوژ، ۱ µL از بخش سوپرناتانت برای PCR به‌کارگرفته شد.

آنالیز سویه‌های ترانسفورم شده *پیکیا پاستوریس* توسط PCR

به منظور آنالیز حضور سازه ژنی pPICZαB-EpEX در کلونی‌های مقاوم به زئوسین از روش PCR استفاده شد. فرایند PCR با استفاده از یک جفت پرایمر انجام شد. در این واکنش از دو پرایمر ریورس و فوروارد اختصاصی ژن *AOX1* ('GACTGGTTCCAATTGACAAGC3'5) و ('GCAAATGGCATTCTGACATCC3'5) استفاده شد. در تمام واکنش‌ها از سویه‌ی GS115 ترانسفورم شده با پلاسمید pPICZαB به عنوان کنترل منفی استفاده شد. به این گونه که در ۳۰ سیکل که هر سیکل شامل مراحل ۹۵ درجه برای ۱ دقیقه و ۵۸ درجه برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه برای ۱ دقیقه انجام شد.

نتایج

ساخت سازه نوترکیب pPICZαB-EpEX

مشاهده سه قطعه به اندازه‌های ۲۸۸۵، ۵۷۱ و ۳۲۸ جفت باز در هضم توسط جفت آنزیم *HindIII* و *BamHI* تأییدکننده ساخت سازه pGH-EpEX توسط شرکت است (شکل A۱). خروج قطعه ژنی مولد EpEX از pGH-EpEX توسط دو آنزیم *XbaI* و *XhoI* صورت گرفت که مشاهده دو باند به طول‌های ۲۹۴۱ و ۸۴۳ جفت باز نشان‌دهنده هضم کامل است (شکل B۱). هم‌چنین مشاهده قطعاتی به طول ۲۷۸۸ و ۸۰۵ جفت باز در هضم توسط آنزیم‌های *BamHI* و *Hindlll* تأییدکننده حامل pPICZαB است (شکل A۲). به‌منظور آماده‌سازی حامل بیانی pPICZαB برای کلونینگ، این حامل توسط دو آنزیم *XbaI* و *XhoI* هضم شد که مشاهده یک باند به طول ۳۵۰۶ جفت باز نشان‌دهنده هضم کامل این حامل است (شکل B۲).

پس از ترانسفورم کردن سلول‌های مستعد DH5-α با محصول الحاق یا لیگاسیون pPICZαB و pGH-EpEX هضم آنزیمی شده با استفاده از دو آنزیم *XbaI* و *XhoI* و انجام کشت پلیت ۹ خانه از تک کلون‌های حاصل، محتوای پلاسمید تک کلون‌ها استخراج گردید. به‌منظور تأیید تشکیل پلاسمید نوترکیب، محصول استخراج با دو جفت آنزیم *XhoI* و *XbaI* هم‌چنین *BamHI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. مشاهده دو قطعه به اندازه‌های ۳۵۰۶ و ۸۴۳ جفت باز در هضم توسط جفت آنزیم *XhoI* و *XbaI* (شکل A۳) هم‌چنین مشاهده قطعاتی به طول ۳۶۵۱ و ۶۹۸ جفت باز در هضم توسط آنزیم *BamHI* تأییدکننده تشکیل پلاسمید نوترکیب pPICZαB-EpEX است (شکل– B۳). تعیین توالی پلاسمید نوترکیب با استفاده از پرایمرهای *AOX1* نشان‌دهنده‌ی صحت سازه ژنی از لحاظ ورود ژن، جهت صحت ورود ژن و عدم وجود جهش در توالی ژن است.

ورود سازه نوترکیب pPICZαB-EpEX به مخمر *پیکیا پاستوریس* با استفاده از روش الکتروپوراسیون

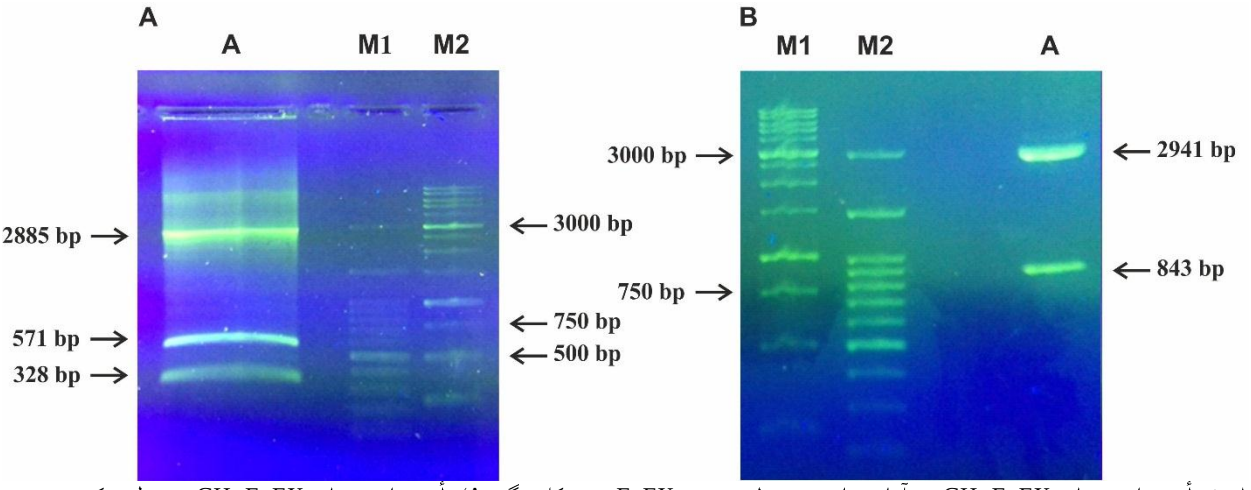
مخلوط وکتور خطی‌شده‌ی pPICZαB–EpEX توسط آنزیم *SacI* و سلول‌ها در معرض پالس الکتریکی قرار گرفت و در نتیجه‌ی تشکیل منافذ موقتی در غشا سلولی، DNA به داخل

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

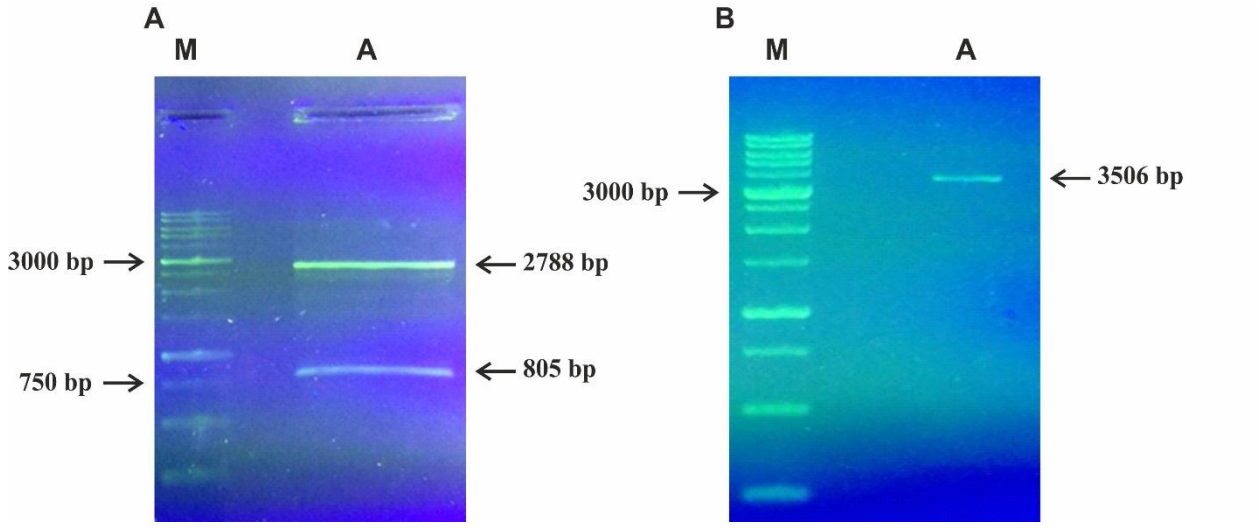
سلول جذب شد. پس از گذشت ۷-۴ روز از کشت این مخلوط بر روی محیط کشت YPDS آگار حاوی ۲۰۰µg/ml از آنتی‌بیوتیک زئوسین کلونی‌های حاصل مشاهده شد (شکل ۴).

تأیید ورود حامل بیانی نوترکیب pPICZαB-EpEX به ژنوم مخمر با استفاده از روش PCR

واکنش PCR با استفاده از دو پرایمر ریورس و فوروارد اختصاصی ژن *AOX1* منجر به تکثیر قطعات با اندازه‌های ۲۲۰۰ و ۱۳۴۵ جفت باز شد. از آن‌جائی‌که GS115 یک میزبان mut + است تکثیر ژنوم با استفاده از این جفت پرایمر منجر به تکثیر قطعه‌ی ۲۲۰۰ جفت بازی خواهد شد. ۱۳۴۵ جفت باز حاصل تکثیر قطعه‌ای از ژنوم است که با اینسرت اینتگره شده است (شکل ۵).

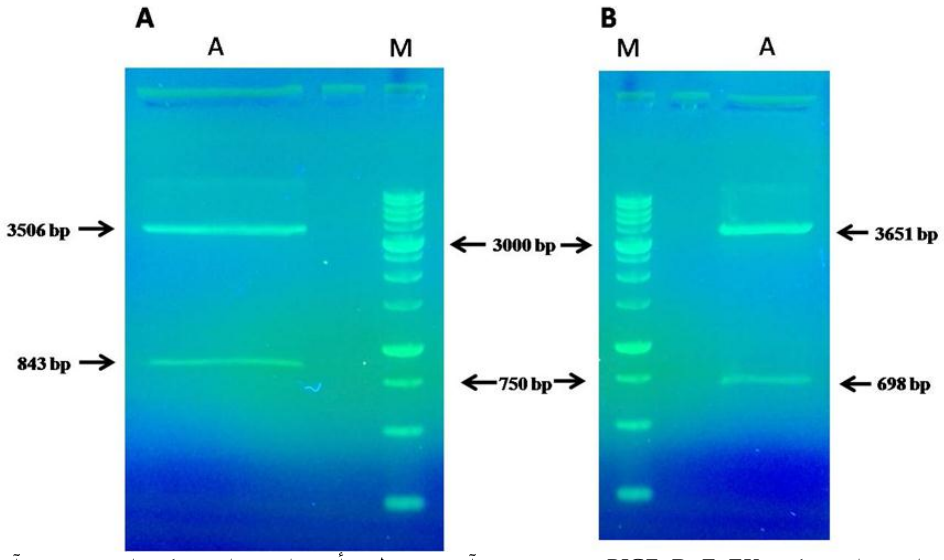


شکل ۱. تأیید ساخت سازه pGH- EpEX و آماده سازی ژن مولد پروتئین EpEX جهت کلونینگ. A) تأیید ساخت سازه pGH- EpEX توسط شرکت به روش هضم آنزیمی. مشاهده سه قطعه به اندازه‌های ۲۸۸۵، ۵۷۱ و ۳۲۸ جفت باز در ستون A ژل الکتروفوز ناشی از هضم آنزیمی توسط جفت آنزیم *HindIII* و *BamHI* تأیید کننده ساخت سازه pGH- EpEX توسط شرکت است. B) خروج قطعه ژنی مولد EpEX از pGH- EpEX توسط دو آنزیم *XbaI* و *XhoI*. مشاهده دو باند به طولهای ۲۹۴۱ و ۸۴۳ جفت باز در ستون A ژل الکتروفوز نشان دهنده هضم کامل است. ستون M: DNA مارکر یک کیلو جفت باز.

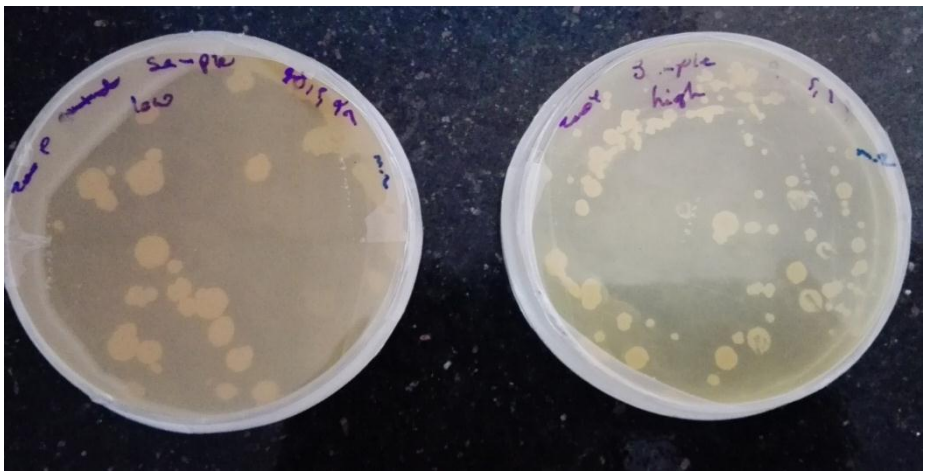


شکل ۲. تأیید و آماده سازی حامل بیانی pPICZαB جهت کلونینگ. A) تأیید حامل pPICZαB به روش هضم آنزیمی. مشاهده قطعاتی به طول ۲۷۸۸ و ۸۰۵ جفت باز در هضم توسط با آنزیم‌های*BamHI* و *Hindlll* تأیید کننده حامل pPICZαB است. B) به‌منظور آماده سازی حامل بیانی pPICZαB برای کلونینگ، این حامل توسط دو آنزیم *XbaI* و *XhoI* هضم شد که مشاهده یک باند به طول۳۵۰۶ جفت باز نشان دهنده هضم کامل است. ستون M: DNA مارکر یک کیلو جفت باز.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]



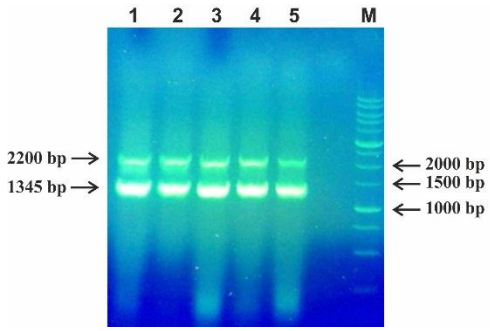
شکل ۳. تأیید ساخت سازه نوترکیب pPICZαB- EpEX به روش هضم آنزیمی. به‌منظور تأیید ساخت سازه نوترکیب از روش هضم آنزیمی استفاده شد. مشاهده A) دو نوار ۳۵۰۶ و ۸۴۳ جفت باز در ستون A ژل الکتروفوز ناشی از هضم آنزیمی توسط جفت آنزیم *XbaI* و *XhoI* همچنین B) قطعاتی به طول ۳۶۵۱ و ۶۹۸ جفت باز در ستون A ژل الکتروفوز ناشی از هضم آنزیمی توسط آنزیم *BamHI*، تأیید کننده صحت ساخت سازه نوترکیب می‌باشد. ستون A: قطعات بریده شده توسط آنزیم‌ها، ستون M: DNA مارکر یک کیلو جفت باز.



شکل ۴. ورود سازه نوترکیب pPICZαB- EpEX به مخمر پیکیا پاستوریس با استفاده از روش الکتروپوراسیون. مخلوط DNA و سلول‌ها در معرض پالس الکتریکی قرار گرفت و درنتیجه‌ی تشکیل منافذ موقتی در غشا سلولی، سازه نوترکیب به داخل سلول وارد شد. پس از گذشت ۷-۴ روز از کشت این مخلوط بر روی محیط کشت YPDS آگار حاوی ۲۰۰ µg/ml از آنتی‌بیوتیک زئوسین کلونی های حاصل مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

تولید یك محصول نوترکیب با انتخاب یك میزبان مناسب آغاز می‌شود. در این راستا مهم‌ترین معیارهای مورد نظر شامل کیفیت، کمیت و میزان محصول است که ارتباط مستقیمی با کاربرد نهایی آن محصول دارد. کلید موفقیت برای افزایش تولید محصول، شناسایی تمام محدودیت‌هایی است که در مراحل ساخت آن نقش دارند. در حدود ۲۰ درصد از پروتئین‌های نوترکیب دارویی در میزبان‌های مخمری، ۳۰ درصد از آن‌ها در باکتری *اشریشیاکلی* و ۵۰ درصد در سلول‌های یوکاریوتی تولید می‌شوند. علی‌رغم این واقعیت، امروزه گرایش فراوانی برای جایگزینی میزبان‌های میکروبی اصلاح شده نظیر مخمر و باکتری با سلول‌های یوکاریوتی



شکل ۵. تأیید ورود حامل بیانی نوترکیب pPICZαB- EpEX به ژنوم مخمر با استفاده از روش PCR. واکنش PCR با استفاده از دو پرایمر ریورس و فوروارد اختصاصی ژن *AOX1* منجر به تکثیر قطعات با اندازه‌های ۲۲۰۰ و ۱۳۴۵ جفت باز (ستون ۵-۱) در کلونهای ۱ الی ۵ شد. ستون M: DNA مارکر یک کیلو جفت باز.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

وجود دارد [۱۵]. از سویی دیگر، میزبان‌های باکتریایی فاقد توانایی تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌ها هستند و بیش‌تر پروتئین‌های تولیدشده در آن‌ها به مرور زمان فعالیت خود را از دست می‌دهند. به همین دلیل کاربرد باکتری برای تولید پروتئین‌های پیچیده و نیازمند اصلاحات پس از ترجمه، در عمل حذف شده است [۱۶،۱۵] و در میان میزبان‌های میکروبی، مخمرها از جمله میکروارگانیسم‌های مناسب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب به شمار می‌روند چرا که مخمر به‌عنوان یک یوکاریوت قادر است به‌مدد تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌های نوترکیب را با تاخوردگی صحیح، حلالیت بالا و درنتیجه با فعالیت بیولوژیکی مناسب تولید کند. علاوه بر آن، محصولات نوترکیب تولید شده عاری از عوامل آلوده‌کننده‌ای نظیر اندوتوکسین و عوامل ویروسی و انکوژنیک هستند [۱۷]. لذا در این مطالعه با توجه به اهمیت بخش خارج سلولی پروتئین EpCAM در انواع سرطان‌ها و کاربردهای متعدد آن در پیشگیری، تشخیص و درمان از یک طرف و به‌منظور دستیابی به مقادیر بالایی از پروتئین با حلالیت و فعالیت بیولوژیکی مناسب بر اساس آن‌چه در مورد پروتئین‌های بیان شده در *پیکیا پاستوریس* منتشر شده است از طرفی دیگر، ژن مولد EpEX به‌طور موفقیت‌آمیزی در ژنوم میزبان *پیکیا پاستوریس* وارد شد تا برای مطالعات بیانی آینده به‌کار گرفته شود. تاکنون پروتئین‌های متعددی به‌طور موفقیت‌آمیز در *پیکیا پاستوریس* بیان شده‌اند. به‌عنوان مثال لگومان یک پروتئاز لیزوزومی است که در تعداد زیادی از تومورهای انسانی افزایش بیان می‌یابد. به‌منظور بررسی عملکردهای این آنزیم در مطالعه‌ای که نتایج آن در سال ۲۰۱۸ منتشر شد، فرم نوترکیب آن در *پیکیا پاستوریس* با مقادیر بالا و به شکل فعال تولید شد [۱۸]. تاکیپلسین که یک آنتی‌بیوتیک پپتیدی است می‌تواند علیه گستره وسیعی از موجودات شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و حتی سلول‌های سرطانی مؤثر باشد. در مطالعه‌ای که نتایج آن اخیراً منتشر شد به‌منظور دستیابی به مقادیر بالا از این ترکیب پپتیدی، توالی ژن مولد آن پس از بهینه‌سازی کدونی، در حامل بیانی کارآمد pGAPZα B همسانه‌سازی شد و به داخل ژنوم سویه GS115 پیکیا پاستوریس با کمک الکتروپوراسیون وارد شد. نتایج نشان داد که این میزبان بیانی توانسته است تاکیپلسین را به شکل فعال در محیط کشت خود ترشح کند [۱۹]. این دسته از مطالعات نشان‌دهنده قابلیت این میزبان در تولید پروتئین مورد نظر ماست. گزارشات متعددی مبنی بر بیان EpEX در میزبان‌های مختلف از جمله اشریشیاکلی، باکولوویروس و سلول‌های گیاهی منتشر شده است. به‌عنوان مثال این پروتئین در سال ۲۰۰۵ به‌صورت یک پروتئین اتصالی (Fusion protein) در *اشریشیاکلی* سویه‌ی M15 بیان شد و مورد مطالعه قرار گرفت [۹]. در سال ۲۰۱۴ در راستای تولید ایمونوتوکسین بخش خارج سلولی EpCAM در میزبان *اشریشیاکلی* بیان شد [۷]. در مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۱۵ انجام شد به‌منظور تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال در خرگوش این پروتئین توسط گروهی از محققین در *اشریشیاکلی* بیان شد [۲۰]. علاوه بر *اشریشیاکلی* به‌دلیل توانایی باکولوویروس در بیان بالای پروتئین‌های نوترکیب ایمونوژنیک، در مطالعات متعددی از این سیستم بیانی به‌منظور تولید آنتی‌ژن EpCAM برای مقاصد درمانی و تشخیصی استفاده شده است. به‌عنوان مثال در سال ۲۰۰۳ این آنتی‌ژن وابسته به تومور بیان شده در باکولوویروس به‌عنوان واکسن مورد استفاده قرارگرفت [۲۱]. در مطالعه‌ای دیگر دومین خارج سلولی این پروتئین در این سیستم بیانی تولید و محصول به‌عنوان واکسن به‌کار گرفته شد [۶]. هم‌چنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ انجام گرفت، به‌منظور طراحی سیستم‌های الایزا مناسب در تعیین سطح شکل محلول بخش خارج سلولی پروتئین EpCAM در سرم بیماران مبتلا به سرطان، این پروتئین در سیستم بیانی باکولوویروس بیان شد [۸]. این پروتئین تاکنون در سیستم بیانی گیاهی نیز تولید شده است. در این مطالعه میزان ایمنی‌زایی آنتی‌ژن بیان شده با پروتئین تولید شده در سلول حشره مقایسه شده است. چنین به‌نظر می‌رسد که ایمنی فعال ناشی از این آنتی‌ژن تولیدی در بیماران مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ تأثیر قابل توجهی بر مهار متاستاز دارد [۹].

وکتور به‌کار گرفته شده در این مطالعه pPICZαB است. به دلیل حضور توالی سیگنال ترشحی فاکتور آلفا، تاکنون بیان ترشحی پروتئین‌های متعدد با موفقیت در *پیکیا پاستوریس* انجام شده است. به‌عنوان مثال فرومدی و همکاران در سال ۲۰۱۶ موفق شدند با استفاده از وکتور pPICZα پروتئین نوترکیب رسپتور فاکتور رشد اپیدرمی انسانی– ۲ را به‌صورت ترشحی در *پیکیا* بیان کنند [۲۲]. هم‌چنین سویه مهندسی شده مولد پروتئین anti-EpEX-scfv توسط قلی‌زاد و همکاران ساخته شد. به این ترتیب که ژن بهینه‌شده‌ی کدونی مولد پروتئین نوترکیب در وکتور pPICZαB وارد شد. سازه نوترکیب با کمک الکتروپوراسیون در سویه GS115 وارد شد و کلون‌های مثبت با کمک PCR و با به‌کارگیری سه جفت پرایمر ارزیابی شدند [۲۳]. ترجیح کدونی یکی از عوامل مؤثر بر بیان ژن‌های هترولوگ در *پیکیا پاستوریس* است. بر اساس مطالعات پیشین بهینه‌سازی کدونی بر اساس ترجیح کدونی مخمر باعث افزایش تولید و فعالیت پروتئین نوترکیب بیان شده در این میزبان می‌شود [۲۴]. در مطالعه حاضر، ژن مولد EpCAM بر اساس ترجیح کدونی مخمر *پیکیا پاستوریس* بهینه شده است. مشابه پژوهش پیش‌رو، در مطالعه‌ای پیشین ژن مولد اندواینولیناز استخراج شده از *آسپرژیلوس نایجر*

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

قبل از بیان بر اساس ترجیح کدونی *پیکیا پاستوریس* بهینه شد. نتایج نشان داد که فرم بهینه پروتئین به مقدار بیش‌تر و با فعالیت بالاتر (حدود ۴،۱۸ برابر) نسبت به فرم بهینه نشده ژن در این میزبان بیان شده است [۲۵]. هم‌چنین بر اساس مطالعه انجام گرفته در سال ۲۰۱۴، محققین دریافتند که بهینه‌سازی کدونی می‌تواند بیان پروتئین سیستاتین C انسانی را ۳ تا ۵ برابر افزایش دهد [۲۶]. این افزایش میزان بیان می‌تواند ناشی از تأثیر مثبت بر کارآمدی طویل‌سازی در مرحله ترجمه باشد [۲۷]. در همین راستا، مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۳ افزایش بیان دمین F2 پروتئین EBA-175 در دو میزبان *اشریشیاکلی* و *پیکیا پاستوریس* را گزارش کرد [۲۸].

تخریب آنزیمی و یا به‌کارگیری بیدهای شیشه‌ای دو روش متداول جهت حذف دیواره سلولی مخمر به‌منظور استخراج سریع و کارآمد ژنوم است. به عنوان مثال جهت استخراج ژنوم در پژوهشی که در سال ۲۰۱۸ انجام شد، از بیدهای شیشه‌ای و دستگاه Smash & Grab استفاده شد. این روش‌ها علی‌رغم کارآمدی نیازمند به‌کارگیری تجهیزات خاص در آزمایشگاه بوده هم‌چنین روش‌هایی زمانگیر و پرهزینه هستند [۲۹]. با استفاده از استات لیتیوم و SDS، محتوای ژنومیک مخمر سریع و کم هزینه توسط Lõoke و همکارانش استخراج شد. ضمن داشتن قابلیت انجام در سویه‌های مختلف مخمری نظیر *هانسونلا پلی‌مرفیا*، *ساکارومایسس سرویزیه* و *پیکیا پاستوریس*، این روش در زمان کوتاه ۱۵ دقیقه و بدون نیاز به استفاده از آنزیم و یا دمای بالا هم‌چنین دستگاه آزمایشگاهی با قدرت استخراج بالا قابل انجام است [۱۴]. در مطالعه حاضر از این روش استفاده شد. هم‌راستا با مطالعه ما، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ انجام گرفت، جهت استخراج ژنوم *پیکیا پاستوریس* حاوی ژن مولد قطعه تک زنجیره‌ای آنتی‌بادی علیه نورفلوکساسین از این روش استفاده شد [۳۰].

به‌منظور تأیید ورود ژن به‌داخل ژنوم مخمر از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با کمک جفت پرایمر متصل‌شونده به ژن مولد الکل اکسیداز (*AOX1*) استفاده شد. در مورد سویه‌هایی نظیر GS115 که mut + هستند، در صورت به‌کارگیری این جفت پرایمر انتظار داریم پس از الکتروفورز، باندهای ۲۲۰۰ و ۵۹۲ جفت باز در مورد حالت پایه (زمانی‌که پلاسمید pPICZαB بدون اینسرت ژن مورد نظر) مشاهده شود به‌دلیل آن‌که فاصله دو جایگاه اتصال پرایمر فوروارد و ریورس *AOX1* روی پلاسمیدی که اینتگره شده است ۵۹۲ نوکلئوتید است. در صورتی‌که اینسرتی هم وارد این بخش شده باشد باندهای حاصله ۲۲۰۰ و باندی مربوط به مجموع اندازه اینسرت و ۵۹۲ خواهد شد. مطابق با انتظار باندهای ۱۳۴۵ و ۲۲۰۰ جفت باز در مورد ژنوم حاوی پلاسمید همراه با ژن مولد پروتئین EpEX مشاهده شد (شکل ۵). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ انجام گرفت، به‌منظور تأیید ورود ژن مولد توپوایزومراز انسانی به‌داخل ژنوم سویه X33 که mut + است از همین جفت پرایمر استفاده شد. حضور دو باند ۲۲۰۰ و ۲۳۰۰ جفت باز در ژل الکتروفورز مؤید ورود ژن مورد نظر به‌داخل ژنوم X33 است [۳۱]. هم‌چنین در مطالعه‌ای مشابه این جفت پرایمر توانست ورود ژن مولد scfv علیه CD22 به‌داخل ژنوم پیکیا پاستوریس سویه GS115 را تأیید کند [۳۲].

در این مطالعه سویه نوترکیب GS115 که حاوی ژن مولد EpEX در ژنوم خود می‌باشد ساخته شد و سویه ساخته شده با استفاده از روش PCR مورد تأیید قرار گرفت. پیشنهاد می‌شود از این سویه نوترکیب در تحقیقات بعدی مرتبط با سرطان استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (طرح تحقیقاتی با شماره پرونده ۱۳۱۴) انجام شده است. هم‌چنین کلیه مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دارویی این دانشکده انجام شده است.

منابع

[1] Baeuerle P, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. Br J Cancer 2007; 96: 417.

[2] Tutlewska K, Lubinski J, Kurzawski G. Germline deletions in the EPCAM gene as a cause of Lynch syndrome–literature review. Hered Cancer Clin Pract 2013; 11: 9.

[3] Schmetzer O, Moldenhauer G, Nicolaou A, Schlag P, Riesenberg R, Pezzutto A. Detection of circulating tumor-associated antigen depends on the domains recognized by the monoclonal antibodies used: N-terminal trimmed EpCAM-levels are much higher than untrimmed forms. Immunol Lett 2012; 143: 184-192.

[4] Chen H, Werner S, Tao S, Zörnig I, Brenner H. Blood autoantibodies against tumor-associated antigens as biomarkers in early detection of colorectal cancer. Cancer Lett 2014; 346: 178-187.

[5] Simon M, Stefan N, Plückthun A, Zangemeister-Wittke U. Epithelial cell adhesion molecule-targeted drug delivery for cancer therapy. Expert Opin Drug Deliv 2013; 10: 451-468.

[6] Mellstedt H, Fagerberg J, Frödin JE, Hjelm-Skog AL, Liljefors M, Markovic K, et al. Ga733/EpCAM as a target for passive and active specific immunotherapy in patients with colorectal carcinoma. Ann N Y Acad Sci 2000; 910: 254-262.

[7] Lv M, Qiu F, Li T, Sun Y, Zhang C, Zhu P, et al. Construction, expression, and characterization of a recombinant immunotoxin targeting EpCAM. Mediat Inflamm 2015; 2015.

[8] Abe H, Kuroki M, Imakiire T, Yamauchi Y, Yamada H, Arakawa F, et al. Preparation of recombinant MK-1/Ep-CAM and establishment of an ELISA system for determining soluble MK-1/Ep-CAM levels in sera of cancer patients. J Immunol Methods 2002; 270: 227-233.

[9] Verch T, Hooper DC, Kiyatkin A, Steplewski Z, Koprowski H. Immunization with a plant-produced colorectal cancer antigen. Cancer Immunol Immunother 2004; 53: 92-99.

[10] Damasceno LM, Huang C-J, Batt CA. Protein secretion in Pichia pastoris and advances in protein production. Appl Microbiol Biotechnol 2012; 93: 31-39.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[11] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. Yeast 2005; 22: 249-270.

[12] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Appl Microbiol Biotechnol 2014; 98: 5301-5317.

[13] Yousefian S, Dehnavi E, Borjian Burojeni M. Secretive expression of bacterial β-xylosidase gene including hexahistidin-tag in Pichia pastoris. Koomesh 2013; 14: 389-395. (Persian).

[14] Lõoke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. Biotechniques 2011; 50: 325-328.

[15] Cereghino GPL, Cregg JM. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. Curr Opin Biotechnol 1999; 10: 422-427.

[16] Egli T, Van Dijken J, Veenhuis M, Harder W, Fiechter A. Methanol metabolism in yeasts: regulation of the synthesis of catabolic enzymes. Arch Microbiol 1980; 124: 115-121.

[17] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in Pichia pastoris. Mol Biotechnol 2000; 16: 23-52.

[18] Zhao T, Li Z, Guo Z, Wang A, Liu Z, Zhao Q, et al. Functional recombinant human Legumain protein expression in Pichia pastoris to enable screening for Legumain small molecule inhibitors. Protein Expr Purif 2018; 150: 12-16.

[19] Li H, Ali Z, Liu X, Jiang L, Tang Y, Dai J. Expression of recombinant tachyplesin I in Pichia pastoris. Protein Expr Purif 2019; 157: 50-56.

[20] Park SH, Kim AY, Ma SH, Kim HM, Kang HS, Maeng JS, et al. Purification of human carcinoma antigen GA733-2 expressed in Escherichia coli and production of its polyclonal antibody in rabbit. Anim Cells Syst 2015; 19: 188-193.

[21] Ullenhag GJ, Frödin J-E, Mosolits S, Kiaii S, Hassan M, Bonnet MC, et al. Immunization of colorectal carcinoma patients with a recombinant canarypox virus expressing the tumor antigen Ep-CAM/KSA (ALVAC-KSA) and granulocyte macrophage colony-stimulating factor induced a tumor-specific cellular immune response. Clin Cancer Res 2003; 9: 2447-2456.

[22] Foroumadi S, Rajabibazl M, Hosseini SH, Rajabi S, Shahidi S, Daraei A, et al. Expression and characterization of recombinant human epidermal growth factor receptor antigene (HER-2) as an indicator of breast cancer in yeast fermented systems. Koomesh 2016; 18: 110-116. (Persian).

[23] Mohammadgholizad F, Hashemi A. Construction of recombinant Pichia pastoris expressing single-chain antibody fragment against extracellular domain of EpCAM. Koomesh 2019. (Persian).

[24] Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: Characteristics and identification: 1990, 2nd ed. Cambridge Univ 1983.

[25] He M, Wu D, Wu J, Chen. Enhanced expression of endoinulinase from Aspergillus niger by codon optimization in Pichia pastoris and its application in inulooligosaccharide production. J Ind Microbiol Biotechnol 2014; 41: 105-114.

[26] Li Y, Li D, Xu X, Cui M, Zhen H, Wang Q. Effect of codon optimization on expression levels of human cystatin C in Pichia pastoris. Genet Mol Res 2014; 13: 4990-5000.

[27] Hu S, Li L, Qiao J, Guo Y, Cheng L, Liu J. Codon optimization, expression, and characterization of an internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in Pichia pastoris. Protein Expr Purif 2006; 47: 249-257.

[28] Yadava A, Ockenhouse CF. Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. Infect Immun 2003; 71: 4961-4969.

[29] Tsygankov M, Padkina M. Influence of PDI Gene Overexpression on the Production of Heterologous Proteins in Yeast Pichia pastoris. Russ J Genet 2018; 8: 197-205.

[30] Mala J, Puthong S, Maekawa H, Kaneko Y, Palaga T, Komolpis K, et al. Expression and characterization of functional single-chain variable fragment against norfloxacin in Pichia pastoris GS115. Int Food Res J 2018; 25: 1726-1732.

[31] Chan MK, Lim SK, Miswan N, Chew AL, Noordin R, Khoo BY, et al. Expression of stable and active human DNA topoisomerase I in pichia pastoris. Protein Expr Purif 2018; 141: 52-62.

[32] Zarei N, Vaziri B, Shokrgozar MA, Mahdian R, Fazel R, Khalaj V, et al. High efficient expression of a functional humanized single-chain variable fragment (scFv) antibody against CD22 in Pichia pastoris. Appl Microbiol Biot 2014; 98: 10023-10039.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Volume 21, Issue 4 (Autumn 2019), 735-742

Construction of recombinant yeast expressing EpEX as a suitable candidate in cancer diagnosis and therapy

Mozhdeh Zamani (M.Sc Student)[1], Atieh Hashemi (Ph.D)[*2], Najmeh Zarei (Ph.D)[3], Hoda Jahandar (Ph.D)[1,4]
1- Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2-Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3-Department of Medical Biotechnolgy, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
4- Pharmaceutical Sciences Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 21-88200067 at_hashemi@sbmu.ac.ir
Received: ; Accepted:

Introduction*:* Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is a membrane glycoprotein that is overexpressed on the majority of tumor cells of epithelial origin and thereby can be used as a target of immunodetection and immunotherapy of cancer. So, it is important to produce this protein in its native form. Interestingly, during the last two decades, the yeast *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) has become a popular host for the production of recombinant proteins because it combines the advantages of both mammalian and prokaryotic expression systems. In this study, the *Pichia* expressing EpCAM extracellular domain (EpEX) was constructed.

Materials and Methods*:* The codon optimized gene encoding EpEX protein was cloned in the XhoI and XbaI restriction sites of the pPICZαB vector. The constructed plasmid was integrated into GS115 strain by electroporation. Positive clones were evaluated by PCR using *AOX1* primers.

Results: Sequencing as well as restriction enzyme analysis utilizing *XhoI* and *XbaI* (3506, 843 bp bands), as well as *BamHI* (3651, 698 bp bands) confirmed construction of recombinant EpEX pPICZαB. PCR based screening results of integrants showed two bands (2200 and 1345 bp), when *AOX1* primer set was used.

Conclusion: These findings imply that the engineered strain was constructed. The constructed strain can be used in EpEX recombinant protein production for diagnostic and therapeutic purposes.

Keywords*: Pichia pastoris*, Molecular Cloning, EpEX, Epithelial Cell Adhesion Molecule, Neoplasms

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]