دانشکده پزشکی
گروه ژنتیک وبیولوژی مولکولی

جهت اخذ کارشناسی ارشد رشته زیست فناوری پزشکی

ساخت و تائید سلول نوترکیب HEK-rabbit MCP-1 و بررسی بیان MCP-1 خرگوشی در سطح mRNA

شماره طرح تحقیقاتی:
۳۹۳۴۱۵

نویسنده:
ایلناز رحیم منش

تحت راهنمایی:
دکتر حسین خان احمد

زمستان ۱۳۹۳

چکیده:

مقدمه:

برای تولید نسل جدید داروها مانند آنتی بادی ها و آپتامرها، نیاز به تولید سلول با بیان بالای پروتئین هدف داریم. اولین قدم در تحقیقات ارزیابی موثر بودن دارو از طریق بررسی اثرات یک دارو بر مدل حیوانی بیماری مورد نیاز است. خرگوش به عنوان یک مدل حیوانی مناسب، در بسیاری از تحقیقات استفاده می شود.
کموکاین MCP-1 نقش کلیدی در بیماری های التهابی نظیر آترواسکلروزیس و گرفتگی مجدد عروق ایفا می کند. بر این اساس در این تحقیق سلول ترانسفورم شده ی 293T با بیان بالای rabbit MCP-1 تهیه و تایید شد (293 T/R-MCP-1).

روش ها:

در ابتدا سازه ی ژنی حاوی cDNA Rabbit MCP-1 سنتز و در پلاسمید pCDNA3.1 کلون شد.پلاسمید نوترکیب حاصل پس از هضم آنزیمی و خطی شدن به سلول 293T ترانسفکت شد و سلول ها به مدت یک ماه تحت درمان با هیگرومایسین قرارگرفتند. سپس به منظور بررسی بیان Rabbit MCP-1 واکنش Real time-PCR و فلوسایتومتری برای بررسی میزان بیان MCP-1 خرگوشی در سطح mRNA و پروتئین انجام شد.

نتایج:

انجام واکنش PCR روی ژنوم سلول 293 T انتخاب شده با پرایمر های اختصاصی،باند 737 bp مربوط به cDNA ژن MCP-1 خرگوشی را تکثیر نمود که نشانگر ادغام سازه ی ژنی حاوی cDNA Rabbit MCP-1 در ژنوم سلول 293T می باشد.
واکنش Relative Real Time افزایش 351.91±229.12 برابری MCP-1 خرگوشی را در سلول های ترانسفکت شده در سطح mRNA نسبت به گروه کنترل نشان داد.همچنین نتایج فلوسایتومتری بیانگربیان بالای پروتئین MCP-1 خرگوشی در سطح سلول بود.

بحث:

در بسیاری از تحقیقات نیاز به تولید پروتئین های هدف به میزان زیاد می باشد.در تولید پروتئین های نوترکیب حفظ تاخوردگی مناسب و تغییرات پس از ترجمه ای مناسب ضروری می باشد، به ویژه در مواردی که این تغییرات پس از ترجمه ای برای عملکرد طبیعی پروتئین ها ضروری باشد..در این تحقیق رده سلولی 293T با بیان بالای MCP-1 خرگوشی ساخته شد. از این سلول می توان در تحقیقات آینده برای تولید عوامل تشخیصی و دارویی استفاده نمود .

واژه های کلیدی:

سلول نوترکیب293T/ Rabbit-MCP-1،آترواسکلروزیس، گرفتگی مجدد عروق

فهرست مطالب

فصل اول/ مقدمه

۱.مقدمه ۱

۱-۱ بیماری آترواسکلروزیس ۲

۱-۲ روش های درمانی در آترواسکلروزیس، استنت گذاری و گرفتگی مجدد عروق ۲

۱-۳ بیان مسئله ۵

۱-۴ اهداف و سوالات پژوهشی ۷

فصل دوم/ مواد و روش ها

۲-۱ طراحی و ساخت وکتور بیانی pcDNA/R-MCP-1 ..... ۱۰

۲-۲ کشت و ترانسفکت سلول های293T با پلاسمید نوترکیب خطی شده ۱۶

۲-۳ بررسی ادغام سازه ی pcDNA/R-MCP-1 در ژنوم سلول های 293T ۱۷

۲-۴ بررسی بیان R-MCP-1 در سطح mRNA ۱۸

۲-۵ بررسی بیان R-MCP-1 در سطح پروتئین ۲۱

۲-۶ تجزیه و تحلیل داده ها در سطح آمار توصیفی ۲۱

فصل سوم/ نتایج

۳-۱ تایید وکتور بیانی pcDNA/R-MCP-1 ..... ۲۳

۳-۲ تایید سلول های ترانسفکت شده به روش انتخاب مثبت با هیگرومایسین ۲۸

۳-۳ تایید ادغام سازه ی pcDNA/R-MCP-1 در ژنوم سلول های293T ۲۹

۳-۴ تایید بیان R-MCP-1 در سطح mRNA ۳۰

۳-۵ تایید بیان R-MCP-1 در سطح پروتئین ۳۱

۳-۶ تجزیه و تحلیل داده ها در سطح آمار توصیفی ۳۲

فصل چهارم / بحث

بحث ۳۴

پیشنهادات ۴۰

فهرست منابع ۴۱

فهرست شکل ها

شکل ۳-۱ ..... ۲۳
شکل ۳-۲ ..... ۲۴
شکل ۳-۳ ..... ۲۵
شکل ۳-۴ ..... ۲۵
شکل ۳-۵ ..... ۲۶
شکل ۳-۶ ..... ۲۶
شکل ۳-۷ ..... ۲۷
شکل ۳-۸ ..... ۲۷
شکل ۳-۹ ..... ۲۸
شکل ۳-۱۰ ..... ۲۹
شکل ۳-۱۱ ..... ۳۰
شکل ۳-۱۲ ..... ۳۰
شکل ۳-۱۳ ..... ۳۱
شکل ۳-۱۴ ..... ۳۲
شکل ۴-۱ ..... ۳۸
شکل ۴-۲ ..... ۳۸

،

فهرست منابع:

1. Chaabane C, Otsuka F, Virmani R, Bochaton-Piallat ML. Biological responses in stented arteries. Cardiovascular research. 2013; 99 (2):353-63. Epub 2013/05/15.

2. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research. 2009; 29 (6):313-26. Epub 2009/05/16.

3. Hyduk SJ, Chan JR, Duffy ST, Chen M, Peterson MD, Waddell TK, et al. Phospholipase C, calcium, and calmodulin are critical for alpha4beta1 integrin affinity up-regulation and monocyte arrest triggered by chemoattractants. Blood. 2007; 109 (1):176-84. Epub 2006/09/09.

4. Rollins BJ. Chemokines. Blood. 1997; 90 (3):909-28. Epub 1997/08/01.

5. Mehrabian M, Sparkes RS, Mohandas T, Fogelman AM, Lusis AJ. Localization of monocyte chemotactic protein-1 gene (SCYA2) to human chromosome 17q11.2-q21.1. Genomics. 1991; 9 (1):200-3. Epub 1991/01/01.

6. Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. FEBS letters. 1989; 244 (2):487-93. Epub 1989/02/27.

7. Furutani Y, Nomura H, Notake M, Oyamada Y, Fukui T, Yamada M, et al. Cloning and sequencing of the cDNA for human monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). Biochemical and biophysical research communications. 1989; 159 (1):249-55. Epub 1989/02/28.

8. Craig MJ, Loberg RD. CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) in cancer bone metastases. Cancer metastasis reviews. 2006; 25 (4):611-9. Epub 2006/12/13.

9. Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, et al. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. Stem cells. 2007; 25 (10):2638-47. Epub 2007/07/07.

10. Xia Y, Frangogiannis NG. MCP-1/CCL2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy. Inflammation & allergy drug targets. 2007; 6 (2):101-7. Epub 2007/08/19.

11. Xia M, Sui Z. Recent developments in CCR2 antagonists. Expert opinion on therapeutic patents. 2009; 19 (3):295-303. Epub 2009/05/16.

12. Kim JS, Gautam SC, Chopp M, Zaloga C, Jones ML, Ward PA, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. Journal of neuroimmunology. 1995; 56 (2):127-34. Epub 1995/02/01.

13. Hickman SE, El Khoury J. Mechanisms of mononuclear phagocyte recruitment in Alzheimer's disease. CNS & neurological disorders drug targets. 2010; 9 (2):168-73. Epub 2010/03/09.

14. Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T, et al. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2002; 22 (1):115-20. Epub 2002/01/15.

15. Carr M, Roth S, Luther E, Rose S, TA S. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1994; 91 (9):3652-56.

16. Xu LL, Warren MK, Rose WL, Gong W, Wang JM. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. Journal of leukocyte biology. 1996; 60 (3):365-71.

17. Aukrust P, Ueland T, Muller F, Andreassen AK, Nordoy I, Aas H, et al. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. Circulation. 1998; 97 (12):1136-43. Epub 1998/04/16.
18. Conti P, Pang X, Boucher W, Letourneau R, Reale M, Barbacane RC, et al. Impact of Rantes and MCP-1 chemokines on in vivo basophilic cell recruitment in rat skin injection model and their role in modifying the protein and mRNA levels for histidine decarboxylase. Blood. 1997; 89 (11):4120-7. Epub 1997/06/01.
19. Kitamoto S, Egashira K. Gene therapy targeting monocyte chemoattractant protein-1 for vascular disease. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2002; 9 (6):261-5. Epub 2003/02/01.
20. Sako H, Miura S, Iwata A, Nishikawa H, Kawamura A, Matsuo K, et al. Changes in CCR2 chemokine receptor expression and plasma MCP-1 concentration after the implantation of bare metal stents versus sirolimus-eluting stents in patients with stable angina. Internal medicine. 2008; 47 (1):7-13. Epub 2008/01/08.
21. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. Nature. 1998; 394 (6696):894-7. Epub 1998/09/11.
22. Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T, et al. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2002;22(1):115-20. Epub 2002/01/15.
23. Kitamoto S, Egashira K. Gene therapy targeting monocyte chemoattractant protein-1 for vascular disease. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2002;9(6):261-5. Epub 2003/02/01.
24. Cipollone F, Marini M, Fazia M, Pini B, Iezzi A, Reale M, et al. Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with

restenosis after coronary angioplasty. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2001;21(3):327-34. Epub 2001/03/07.
25. Egashira K, Nakano K, Ohtani K, Funakoshi K, Zhao G, Ihara Y, et al. Local delivery of anti-monocyte chemoattractant protein-1 by gene-eluting stents attenuates in-stent stenosis in rabbits and monkeys. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2007;27 (12):2563-8. Epub 2007/09/22.
26. Arefieva TI, Krasnikova TL, Potekhina AV, Ruleva NU, Nikitin PI, Ksenevich TI, et al. Synthetic peptide fragment (65-76) of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) inhibits MCP-1 binding to heparin and possesses anti-inflammatory activity in stable angina patients after coronary stenting. Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ,et al. 2011;60 (10):955-64. Epub 2011/07/12.
27. Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. Biotechnology Advances 2012; 30: 1158–70.
28. Thomas P1, Smart TG. 293 T293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. J Pharmacol Toxicol Methods 2005; 51(3): 187-200.
29. Kim Y, Gu M. Advances in Aptamer Screening and Small Molecule Aptasensors. Adv Biochem Eng Biotechnol 2014; 140: 29–67.
30. Smith G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 1985; 1315-17.
31. Li M. Applications of display technology in protein analysis.Nat. Biotechnol. 2000; 18: 1251 – 56.
32. Dane K. Protein engineering by cell-surface display. Current Opinion in Biotechnology 2001; 12:395–9.

Abstract

Objective: To produce new generation of drugs such as antibodies and aptamers, cell with over expression of target protein is needed. First clinical trial step in evaluation of drug efficacy is assay on animal models. Rabbit as an appropriate animal model, is utilized in many preclinical trials. MCP-1 has a key role in inflammatory diseases like atherosclerosis and restenosis. Accordingly, we decided to produce an overexpressed rabbit MCP-1 (R-MCP1) transformed Human Embryonic kidney (293 T) 293T cell (293 T/R-MCP-1).

Methods: At first, gene construct containing cDNA of R-MCP-1 was constructed and subcloned in pCDNA3.1 plasmid. The pR-MCP-1 was linearized by *Bgl* II and 293 T cells were transfected by the linear plasmid then were treated with hygromycin as 30 days. To confirm the expression of rabbit MCP-1, expression was checked by Real- time PCR and flow cytometry.

Results: Gel electrophoresis of PCR product on genomic DNA of transfected 293 T cells showed a 737 bp band. Based on real- time PCR results, transfected cells showed 351.91±229.12 fold increase in R-MCP1 gene expression relative to 293 T 293T cells. The results of flow cytometry showed that about 85% of transfected cells were positive it and express R-MCP1.

Discussion: In most studeis, over expression of target protein is needed. In recombinant protein expression, accurate folding and proper post translational modifications (PTM) are needed .Specially when post translation modification is essential for protein function. In this research cells with overexpression of R-MCP1 have been constructed, which can be used in future research to prepare diagnostic and therapeutic agents like aptamers.

Keywords: Recombinant 293T/ Rabbit-MCP-1 cell, Atherosclerosis, Restenosis