مجله دانش و تندرستی، دوره ۱۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.1234/knh.v10i3.714

مرور نظام‌مند

مهندسی گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های نوترکیب انسانی در سیستم جدید بیانی S2

جعفر وطن‌دوست*[۱]، لیلا خلیلی[۲]

۱- دانشگاه حکیم سبزواری- دانشکده علوم پایه- گروه زیست‌شناسی- استادیار.

۲- دانشگاه حکیم سبزواری- دانشکده علوم پایه- گروه زیست‌شناسی- دانشجوی کارشناسی ارشد.

تاریخ دریافت:۱۳۹۳/۸/۵، **تاریخ پذیرش:**۱۳۹۳/۱۰/۶

چکیده

برای دستیابی به بیان بالای بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب و پیچیده از سامانه‌های بیانی حشرات استفاده می‌شود اما حشرات در سنتز محصولات N- گلیکانی شبیه پستانداران ناتوانند. محصولات گلیکوزیلاسیونی در حشرات حاوی واحدهای مانوزی کم یا زیاد انتهایی می‌باشد. دلیل اصلی این ناتوانی، پایین بودن سطح فعالیت تعدادی از آنزیم‌ها شامل β- N، (۱-۲) استیل گلوکز آمین ترانسفراز I و II، β- (۱-۴)، گالاکتوزیل ترانسفراز، α (۲-۳) و α (۲- ۶)- سیالیل ترانسفراز می‌باشد. از طرفی یک هگزوآمیدیناز که سبب حذف N- استیل گلوکزآمین از انتهای محصول گلیکانی شده و مانع از اتصال گالاکتوز و اسید سیالیک به محصولات گلیکانی می‌شود، در حشرات کشف شده است. لذا می‌توان حشرات را در جهت تولید محصولات گلیکوزیلاسیونی مشابه پستانداران مهندسی کرد و عوامل مهارکننده سنتز محصولات سیالیل‌دار و گالاکتوزدار را از پیش‌رو برداشت. لذا در این مقاله مروری سیستمیک به مسیرهای آنزیمی گلیکوزیلاسیون در پستانداران و حشرات و مهندسی مسیرهای ممکن گلیکوزیلاسیون در سلول‌های حشره دروزوفیلایی S2، پرداخته شده است.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های حشره دروزوفیلا، گلیکوزیلاسیون، N- استیل گلوکز آمیدیناز، هگزوآمیدیناز.

***نویسنده مسئول:** سبزوار دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، **تلفن:**۰۵۱-۴۴۰۱۳۳۲۹، **نمابر:**۰۵۱-۴۰۰۳۳۶۵، **Email:**j.vatan@hsu.ac.ir

ارجاع: وطن‌دوست جعفر، خلیلی لیلا. مهندسی گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های نوترکیب انسانی در سیستم جدید بیانی S2. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۴؛۱۰(۳):۴۵-۵۲.

مقدمه

برای تولید پروتئین‌های دارویی در اغلب موارد تغییرات بعد از ترجمه لازم است و سامانه‌های بیانی پستانداران در این رابطه معمولاً اولین انتخاب هستند. هرچند سامانه‌های بیانی پستانداران جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی، استفاده می‌شوند اما باتوجه به مشکلات تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب در آنها، سامانه‌های بیانی حشرات می‌توانند جایگزین مناسبی برای دستیابی به بیان بالای بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب و پیچیده مورد توجه قرار گیرند (۱). در سال‌های اخیر رده سلولی اشنایدر (S2) از حشره دروزوفیلا به‌عنوان میزبان برای بیان پروتئین‌های هترولوگ معرفی شده و پروتئین‌های زیادی توسط این سیستم بیان شده است (۲). گزارشات زیادی از استفاده از این سیستم جدید برای بیان پروتئین‌های نوترکیب انسانی و غیرانسانی وجود دارد (۳). ما نیز در تحقیقات قبلی، رده سلولی S2 مشتق از دروزوفیلا را برای تولید عامل انعقادی ۹ انسانی مورد آزمایش و بررسی قرار دادیم و نشان داده شد که بیان عامل ۹ انسانی در سلول‌های حشره S2 بسیار بیشتر از سلول‌های پستانداران CHO است. همچنین فعالیت بیولوژیکی عامل ۹ و رسوب آن توسط باریوم سیترات موید قابلیت سلول‌های S2 برخلاف سایر سلول‌های حشرات در گاما کربوکسیلاسیون عامل ۹ بود (۲، ۴ و ۵).

بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب ساختار گلیکوپروتئینی دارند و اضافه شدن واحدهای قندی با اتصال از نوع N و O- گلیکوزیدی از تغییرات پس از ترجمه‌ای است که باید در پروتئین انجام شود (۶). همچنین باید توجه داشت که گلیکوزیلاسیون از نظر ناهمگنی به دو صورت ناهمگنی بزرگ (Macroheterogeneity) و ناهمگنی کوچک (Microheterogeneity) تقسیم می‌شود. ناهمگنی بزرگ شامل تنوع در تعداد بالقوه جایگاه‌های گلیکوزیلاسیونی و ناهمگنی کوچک شامل تنوع ساختاری اولیگوساکاریدهایی است که به جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون متصل می‌شوند. ناهمگنی بزرگ و ناهمگنی کوچک به شرایط رشد سلول، محل قرارگیری جایگاه‌های بالقوه گلیکوزیلاسیونی و به‌ویژه سیستم بیانی به‌کار برده شده بستگی دارد (۷). عدم یکسانی در گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها در سیستم‌های بیانی مختلف، یک چالش بزرگ در توسعه پروتئین‌های نوترکیب درمانی با ویژگی‌های سازگار یافته می‌باشد. محصولات موجود در پستانداران و سیستم‌های بیانی آنها به‌طور معمول در انتها دارای گالاکتوز و اسید سیالیک می‌باشند در حالی‌که محصولات گلیکوزیلاسیونی در حشرات و سیستم‌های بیانی آنها به‌صورت انتهایی با واحد مانوزی کم یا انتهایی با واحد مانوزی زیاد و هیبرید با انتهای N- استیل گلوکز آمین‌دار می‌باشد (۸ و ۹). از طرفی زیر واحد قندی انتهایی اتصال یافته نقش مهمی در نیمه عمر پروتئین موردنظر در شرایط درون سلول دارد. گلیکوپروتئین‌هایی با انتهای مانوزدار و N- استیل گلوکز آمین‌دار که در حشرات تولید می‌شود، فوراً توسط ماکروفاژهای موجود در گردش خون جمع‌آوری می‌شوند در حالی‌که محصولات گلیکوزیلاسیونی پستانداران با انتهای سیالیل‌دار توسط مکانیسم‌های حذفی قابل تشخیص نبوده و به مدت طولانی‌تری در گردش خون باقی می‌مانند (۷).

بنا به تفاوت‌های گفته شده بین حشرات و پستانداران، گلیکوپروتئین‌های مشتق شده از حشرات نسبت‌به پستانداران در شرایط درون سلول کمتر فعال می‌باشند (۷، ۱۰ و ۱۱). لذا مطالعه ساختارهای اولیگوساکاریدی و فعالیت آنزیم‌های درون‌زاد (Endogenous) در حشرات ضروری است تا ما بتوانیم تشخیص دهیم که کدام آنزیم‌ها برای تولید محصولات ضروری بوده و وجود کدام آنزیم‌ها مانعی در جهت تولید محصول موردنظرمان است. بنابراین برای درک بهتر تفاوت محصولات تولیدی در سیستم‌های بیانی مختلف و مهندسی مسیرهای ممکن گلیکوزیلاسیون در سلول‌های حشره دروزوفیلایی S2، باید به مسیرهای آنزیمی گلیکوزیلاسیون در پستانداران و حشرات پرداخته شود.

پروتئین‌های تازه سنتز شده در مسیرهای مختلف در داخل لومن شبکه آندوپلاسمی گلیکوزیله می‌شوند. گلیکوزیلاسیونی که در شبکه آندوپلاسمی اتفاق می‌افتد به‌عنوان هسته گلیکوزیلاسیونی شناخته می‌شود که یک هسته ثابت با ۱۴ واحد قندی است و به‌دنبال آن در گلژی گلیکوزیلاسیون نهایی صورت می‌گیرد. آغاز ساخته شدن هسته گلیکوزیلاسیونی در سمت سیتوزولی شبکه آندوپلاسمی صورت می‌گیرد. واحدهای قندی ابتدا بر روی یک انتقال‌دهنده‌ی لیپیدی به نام دولیکول منتقل می‌شوند که این حامل لیپیدی مشتقی از واحدهای ایزوپرنی می‌باشد. مراحل انتقال واحدهای قندی از انتقال‌دهنده دولیکول بر روی اسیدآمینه آسپارژین در توالی Asn-Xaa-Ser/Thr- به‌عنوان بالقوه‌ترین جایگاه N-گلیکوزیله شونده پروتئین‌ها مشاهده می‌شود (۱۲).

در مسیر گلیکوزیلاسیونی پستانداران، ابتدا در بخش سیتوزولی دو واحد N- استیل گلوکز آمین توسط آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز غشایی از دهنده نوکلئوتید فعال (UDP-GlcNAc) به‌صورت N- استیل گلوکز آمین فسفاته بر روی دولیکول منتقل می‌شود تا تولید (GlcNAc-P-P-Dol) کند. سپس پنج واحد مانوز از دهنده نوکلئوتیدی (GDP-Man) توسط آنزیم سیتوبیوزیل دی فسفو دولیکول β- D-مانوزیل ترانسفراز بر روی دولیکول منتقل می‌شوند. یک انتقال‌دهنده غشایی به‌نام دولیکول فسفات فلیپاز این مجموعه ۷ واحد قندی متصل به دولیکول را چرخانده و به سمت لومنی غشا منتقل می‌کند. به‌علاوه هر یک از واحدهای مانوز که قرار است به انتهای این مجموعه متصل شوند توسط سایر دولیکول فسفات‌های

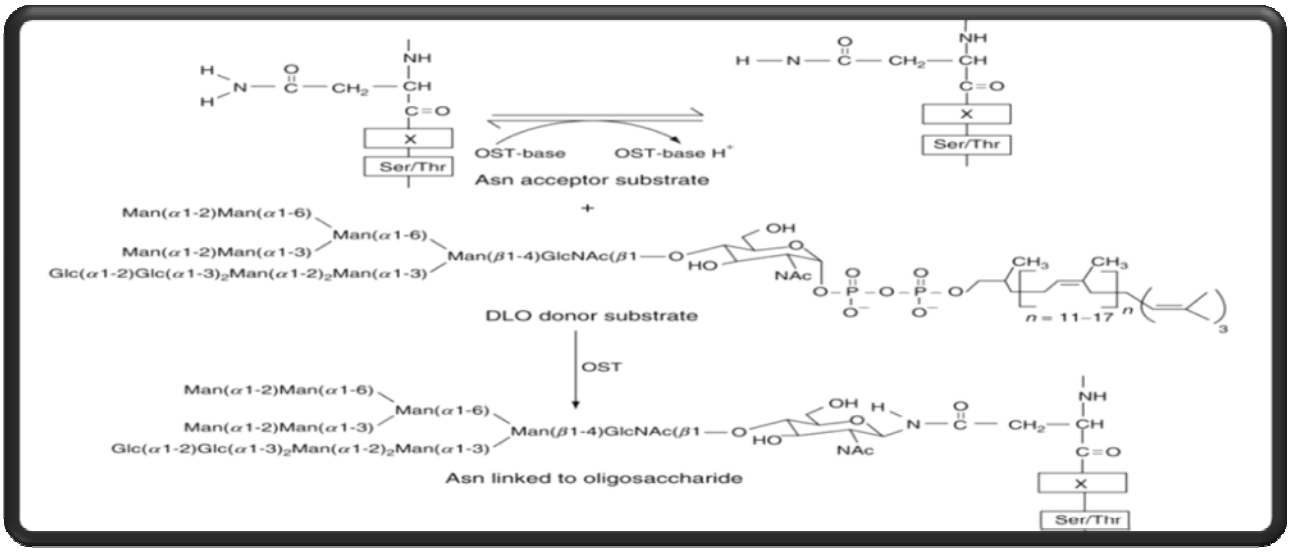
غشایی از سمت سیتوزولی به سمت لومن انتقال پیدا می‌کنند. آنزیم مانوزیل ترانسفراز، ۴ واحد مانوز و آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز سه واحد گلوکز را که توسط انتقال‌دهنده دولیکولی از سمت سیتوزولی وارد بخش لومنی شده است، به انتهای حدواسط تولید شده اضافه می‌کند تا حدواسطGlc3Man9GlcNAc2 را تولید کنند (۷). آنزیم ترانسفراز اولیگوساکاریدی (OST: Oligosaccharides transferase) به حدواسط Glc3Man9GlcNAc2، اولین اولیگوساکارید متصل به لیپید (LLOs: lipid-linked oligosaccharides)، متصل شده و سبب برش باند فسفاته و جدا شدن آن از انتقال‌دهنده لیپیدی می‌شود و آن را بر روی آسپارژین در توالی پلی‌پپتید منتقل می‌کند. سوبسترای اولیگوساکاریدی انتقال یافته به شبکه آندوپلاسمی تحت ویرایش به‌وسیله آنزیم‌های موجود در شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی قرار می‌گیرند و محصولات نهایی متفاوت را در حشرات و پستانداران تولید می‌کند (۷).

در پستانداران پردازش محصولات N– گلیکانی با حذف گلوکز و مانوز آغاز می‌شود و در این مسیر چندین حدواسط تولید می‌شود. اول آنزیم α، (۱– ۲) گلوکوزیدازI سبب حذف یک واحد گلوکز با اتصال α، (۱–۲) می‌شود و سپس آنزیم α، (۱–۳) گلوکوزیدازII سبب حذف دو زیر واحد گلوکز دیگر با اتصال α، (۱–۳) می‌شود. در ادامه آنزیم α، (۱–۲) مانوزیداز سبب حذف چهار واحد مانوز می‌شود که سبب تولید حدواسط Man5GlcNAc2 می‌گردد. چندین مانوزیداز از ژنوم پستانداران تخلیص و کلون شده است که در واحد مانوزی که حذف می‌کنند، تفاوت دارند. مثلاً آنزیم α، (۱– ۲) مانوزیداز جداسازی شده از شبکه آندوپلاسمی کبد موش، سبب حذف فقط یک مانوز با پیوند α (۱-۲) شده و تولید Man8GlcNAc2 به‌عنوان سوبسترای حد واسط می‌کند. α، (۱–۲) مانوزیداز تخلیص شده از دستگاه گلژی پستانداران شامل α، (۱–۲) مانوزیداز IA و IB و IC است که سبب حذف سه مانوز دیگر با پیوند α، (۱– ۲) و تولید حدواسط Man5GlcNAc2 می‌کند. این حدواسط در حضور گلوکوزیل ترانسفرازهای متفاوت، محصولات N– گلیکانی مختلف تولید می‌کند (۱۳). بعد از مراحل فوق، اولین مرحله سنتز محصولات N– گلیکانی، انتقال یک N–استیل گلوکز آمین توسط آنزیم β– N– استیل گلوکز آمین ترانسفراز I از نوکلئوتید انتقال‌دهنده یعنی UDP-GlcNAc بر روی مانوز با پیوند α، (۱–۳) می‌باشد که حدواسط GlcNAcMan5GlcNAc2 تولید می‌شود. در ادامه یک واحد قندی فوکوز توسط آنزیم α، (۱–۶) فوکوزیل ترانسفراز به زیر واحد N– استیل گلوکز آمین اتصال پیدا می‌کندکه این واحد N– استیل گلوکز آمین با پیوند β، (۱–۲) به واحد مانوزی متصل است. سپس α– مانوزیدازII که سبب حذف یک واحد مانوز با پیوند α، (۱–۶) و واحد دیگر با پیوند α– (۱ و ۳) می‌شود و محصول حد واسط فوکوزدار GlcNAcMan3[Fucα(1,6)]GlcNAc2 را تولید می‌کند. به‌دنبال عملکرد α– مانوزیدازII، دومین N– استیل گلوکز آمین با پیوند β، (۱–۲) توسط آنزیم β–N– استیل گلوکز آمین ترانسفرازII به واحد مانوز با پیوند α، (۱–۶) انتقال می‌یابد. ادامه مسیر به‌وسیله انتقال گالاکتوز توسط آنزیم β، (۱–۴) گالاکتوزیل ترانسفراز به واحد N– استیل گلوکز آمین انتهایی کاتالیز می‌شود. محصولات N– گلیکانی در پستانداران در انتها توسط اسید سیالیک کلاهک‌دار می‌شود. مرحله سیالیل‌دار شدن شامل انتقال سیالیل توسط نوکلئوتید انتقال‌دهنده CMP-Neu5Ac بر روی واحد گالاکتوز در گلیکان پذیرنده می‌باشد. اتصال اسید سیالیک اغلب با پیوند α، (۲–۶) صورت می‌گیرد که آنزیم β– گالاکتوزید α، (۲–۶) سیالیل ترانسفراز آن را کاتالیز می‌کند (۷ و ۱۴).

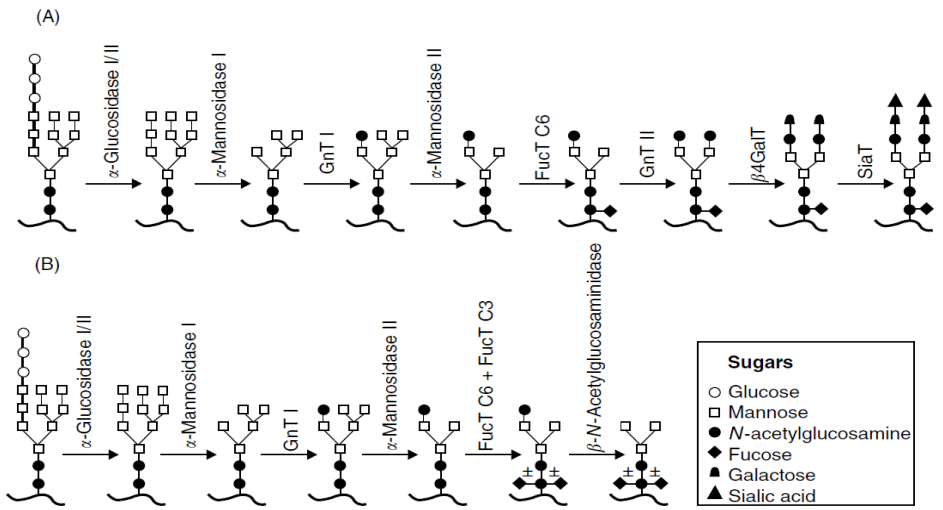
مسیر گلیکوزیلاسیون در حشرات تا تولید حدواسط ۱۴ واحد قندی با پستانداران مشابه می‌باشد و در واقع فرآیندهای پیرایشی که در شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی اتفاق می‌افتد اندکی با هم تفاوت دارند. طبق مطالعاتی که روی حشرات لپیدوپتران (Lepidopteron) انجام شده است مشخص شد که محصولات N– گلیکانی آنها شامل پوکی مانوز و اولیگومانوز می‌باشد (۱۵). وجود محصولات پوکی مانوز و اولیگومانوز به‌نظر حاکی از وجود آنزیم‌های α، (۱–۲)گلوکوزیدازI و α، (۱–۳) گلوکوزیدازII و α، (۱–۲) مانوزیداز در حشرات بوده در حالی‌که استفاده از مهارکننده مخصوص آنزیم‌ها، عدم وجود α، (۱–۲) گلوکوزیدازI و α، (۱-۳) گلوکوزیدازII را ثابت می‌کند (۱۵). از طرف دیگر α– گلوکوزیداز I و α– گلوکوزیداز II و α– مانوزیداز از اندامک گلژی سلول‌های حشرات جداسازی شده است که توانایی تولید محصولات گلیکانی را به حشرات می‌دهد. α– مانوزیداز که از Sf9 تخلیص شده است محصولات Man6GlcNAc2، Man7GlcNAc2، Man8GlcNAc2، Man9GlcNAc2 و Man9GlcNAc2 را به‌عنوان سوبسترا می‌شناسد که تا این مرحله یعنی حذف مانوز و گلوکز به مانند پستانداران ولی توسط آنزیم‌های متفاوت‌تر از انواع موجود در پستانداران انجام می‌شود (۱۶). در شکل (۲) به‌صورت شماتیک مراحل گلیکوزیلاسیونی در حشرات و پستانداران مشاهده می‌شود.

آنزیم β–N– استیل گلوکز آمین ترانسفرازI که در اضافه کردن N– استیل گلوکز آمین به زیرواحد مانوز با پیوند α– (۱ و ۳) نقش دارد، از دروزوفیلا ملانوگاستر جداسازی و کلون شده است و فعالیت آن در حشرات Sf9، Sf21، Mb0503 و Bm-N نیز مشاهده شده است (۱۵). در ادامه دو واحد مانوز با پیوند α، (۱–۲) و α، (۱–۳) توسط آنزیم α– مانوزیدازII حذف می‌شود که فعالیت این آنزیم در حشرات نیز مشاهده شده است. مانند پستانداران، حضور N– استیل گلوکز آمین برای فعالیت این آنزیم ضروری است. در ادامه واحد قندی فوکوز،

توسط آنزیم α، (۱-۶) فوکوزیل ترانسفراز بر روی حدواسط تولید شده انتقال می‌یابد. در حشرات حضور آنزیم α، (۱-۳) فوکوزیل ترانسفراز قابل تأمل است، که سبب اضافه شدن واحد فوکوز دیگری با پیوند α، (۱-۳) به حدواسط موردنظر می‌شود تا محصول [GlcNAcMan5GlcNAc2Fuc(α(۱-۳)(۱-۶)۱] تولید شود. همان‌طور که مشخص است، این حدواسط تولید شده علاوه‌بر داشتن فوکوز با پیوند α، (۱-۶)، دارای یک فوکوز دیگر با پیوند α، (۱-۳) می‌باشد. حضور همین آنزیم یک محدودیت برای حشرات است که نمی‌توانند محصولات N- گلیکانی پستانداران را تولید کنند (۱۷ و ۱۸). در حشرات آنزیم بعدی عملکردی بجای β-N- استیل گلوکز آمین ترانسفرازII که سبب انتقال دومین N- استیل گلوکز آمین به انتهای حدواسط می‌شد،آنزیم β- N- استیل گلوکوزآمیدیناز می‌باشد که سبب حذف N- استیل گلوکز آمین از انتهای حدواسط [GlcNAcMan5GlcNAc2Fuc (۱-۶) و (۱-۳)،α] می‌شود. در



شکل ۱- مراحل انتقال حدواسط Glc3Man9GlcNAc2 از روی انتقال‌دهنده لیپیدی دولیکول بر روی زیر واحد آسپارژین (۷)



شکل ۲-مراحل مختلف گلیکوزیلاسیونی درپستانداران (A) و حشرات (B)(۹)

پستانداران در طی مسیر گلیکوزیلاسیونی، انتقال گالاکتوز بر روی این واحد N- استیل گلوکز آمین صورت می‌گیرد که اسید سیالیک نیز بر روی واحد گالاکتوز می‌نشیند. پس وجود آنزیم β-N- استیل گلوکوزآمیدیناز نیز محدودیت دیگری برای تولید محصولات سیالیل‌دار

شده در حشرات می‌باشد (۱۸). لذا اگر بخواهیم عوامل بلوکه‌کننده سنتز محصولات N– گلیکانی پستانداران را در حشرات دسته‌بندی کنیم شامل شش مورد مختلف می‌باشند:

۱– نبود فعالیت آنزیم α–(۱ و ۲) گلوکوزیداز I

۲– نبود فعالیت آنزیم α– (۱ و ۳) گلوکوزیداز II

۳– نبود فعالیت آنزیم β– N – استیل گلوکز آمین ترانسفراز II

۴– نبود فعالیت آنزیم β– گالاکتوزید α– (۲ و ۶) سیالیل ترانسفراز

۵– فعال بودن آنزیم α- (۱ و ۳) فوکوزیل ترانسفراز

۶– فعال بودن آنزیم β– N– استیل گلوکوزآمیدیناز

در مسیر N– گلیکوزیلاسیونی نیاز به چندین قند و نوکلئوتید انتقال‌دهنده می‌باشد که انواع معمول آنها شامل گلوکز، گالاکتوز، مانوز، فوکوز، N– استیل گلوکز آمین و N – استیل نورامینیک و نوکلئوتیدهای انتقال‌دهنده شامل UDP-Glc، UDP-Gal، GDP-Man، GDP-Fuc، UDP-GlcNAc و CMP-Neu5Ac هستند. Tomia طی استفاده از روش‌های سنجش گلوکوزیدازی برای سنجش کمی قندهای مسیر N– گلیکوزیلاسیونی متوجه شد که همه قندها و نوکلئوتیدهای انتقال‌دهنده قندی در سطح کافی در حشرات وجود دارند، اما بر خلاف پستانداران، CMP-Neu5Ac به اندازه کافی در حشرات دیده نمی‌شود (۷). CMP-Neu5Ac به‌عنوان انتقال‌دهنده اسید سیالیک، در انتهای مراحل سیالیل‌دار شدن نقش دارد و توسط N – استیل گلوکز آمین طی یک سری مراحل آنزیمی سنتز می‌شود. طی مطالعات انجام شده مشخص شد که سطح آن در حشرات خیلی خیلی ناچیز است (۱۷). همچنین مشخص شده است که ترکیب Neu5Ac در حشرات دیده نمی‌شود. افرتز گزارش کرد که فعالیت ویژه آنزیم N- UDP – استیل گلوکز آمین اپی‌مراز که در مسیر سنتزی اسید سیالیک از ترکیب CMP-Neu5Ac نقش دارد در Sf9، ۳۰ ساعت کمتر از انواع جدا شده در کبد رت است و فعالیت آنزیم ManNAc کیناز ۵۰ ساعت بیشتر از اپی‌مراز در حشرات است (۱۷).

امروزه کلون کردن ژن‌های پروتئین‌های خاص که از نظر بیوشیمیایی و ایمونولوژی شناخته شده‌اند، مورد توجه قرار گرفته است. تکنولوژی DNA نوترکیب ما را قادر می‌سازد که ژن‌های کدکننده قسمتی از یک زنجیره پپتیدی یا کل آن را ساخته و در یک حامل مناسب بیان نماییم. تکنیک کلون کردن ژن بسیار گسترده و مقرون به صرفه می‌باشد، اما یکی از محدودیت‌های کلون کردن ژن این است که آنتی‌ژن‌های کربوهیدراتی را نمی‌توان مستقیماً به‌وسیله تکنولوژی DNA نوترکیب تولید کرد. سیستم بیولوژی و مهندسی متابولیک امکان مهندسی در بسیاری از ساختارها و فرایندهای سلولی را می‌دهد که یکی از این فرآیندها، گلیکوزیلاسیون در سطح پروتئین‌ها می‌باشد و در واقع امکان دستکاری سلول‌ها را برای سنتز محصولات منحصر به فرد و مهندسی بعضی مسیرهای آنزیمی را به دانشمندان می‌دهد (۱۱). دستاوردهای حاصل از مطالعات اخیر مهندسی متابولیک، حاکی از آن است که این تکنولوژی برای گسترش تولید فراورده‌های نوترکیب گلیکوپروتئینی، در رده سلولی حشراتی مثل دروزوفیلا و لپیدوپتران که توسط وکتور بیانی ترانسفکت شده‌اند، به‌کار می‌رود. اصول مطالعات ژنتیک مولکولی عموماً در مورد گلیکوزیلاسیون حشرات بوده است که چندین آنزیم مسیر، فقط در تعداد انگشت‌شماری از حشرات وجود دارد (۱۹). طبق مطالعاتی که انجام شد فعالیت β– N– استیل گالاکتوزآمین ترانسفرازII در حشرات Sf9، Sf21، Mb0503 و Bm-N تا حدودی آشکار شده است و همچنین فعالیت آنزیم گالاکتوزیل ترانسفراز نیز به‌صورت خیلی ناچیز مشاهده شده است (۲۰ و ۲۱).

همان‌طورکه در جدول (۱) نیز آشکارا دیده می‌شود فعالیت آنزیم گالاکتوزیل ترانسفراز در Sf9، Tn-5B1-4 و Mb0503 آنقدر پایین است که در نظر گرفته نمی‌شود. در حشراتی هم که سطح فعالیتی آنزیم گالاکتوزیل ترانسفراز پایین است می‌توان از وکتور بیانی باکلوویروس جهت بیان این آنزیم‌ها استفاده کرد. بر این اساس اولین ژن کدکننده آنزیم β– N– استیل گالاکتوزآمین ترانسفراز از پستانداران در سال ۱۹۸۶ و اولین ژن کدکننده مانوزیداز از دروزوفیلا در سال ۱۹۹۵ جداسازی شد. سپس با کلون کردن ژن‌های کدکننده این آنزیم‌های مسیر گلیکوزیلاسیونی در وکتور بیانی باکلوویروس، توانایی بیان این آنزیم‌ها را به حشرات دادند (۲۱). یکی از آزمایش‌هایی که در سال ۱۹۹۶ توسط Jarvis و win انجام شد آشکار کرد که استفاده از ژن کدکننده آنزیم β– (۱ و ۴) گالاکتوزیل ترانسفراز گاوی در وکتور بیانی باکلوویروس تحت کنترل پروموتور ویروسی، سبب بیان آنزیم فعال β– (۱ و ۴) گالاکتوزیل ترانسفراز در حشرات آلوده به این وکتور می‌شود.

جدول ۱– سنجش فعالیت آنزیم‌های گالاکتوزیل ترانسفراز و N – استیل گلوکز آمین ترانسفراز در انواعی از حشرات (۸)

رده سلولی حشرات	فعالیت آنزیم β- N – استیل گالاکتوزآمین ترانسفراز (مول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین)	فعالیت آنزیم گالاکتوزیل ترانسفراز (مول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین)
Trichoplusia ni (BTI-TN-5B1-4)	۹۴	۷
Spodoptera frugiperda (Sf9)	۳۴	۳
Mamestra brassica (IZD-Mb0503)	۶۴	۷

در رده سلولی حشره T.ni فعالیت β– N– استیل گالاکتوزآمین ترانسفراز خیلی بالا است ولی حضور آنزیم β–N– استیل گلوکوزآمیدیناز مانع از فعالیت ویژه آن می‌شود. اولین بار β– N– استیل گلوکوزآمیدیناز در گلژی مربوط به رده سلولی حشرات جداسازی

و شناسایی شد. واناتابل گزارش کرد در صورتی که بتوان با استفاده از یک ترکیب مهارکننده، فعالیت این آنزیم را مهار کرد می‌توان محصولات سیالیل‌دار شده و گالاکتوز دار شده را ایجاد کرد. واناتابل از مهارکننده ۲- استوآمید- ۱و۲- دی داکسی نوجیرومایسین (ADN-۲) استفاده کرد.

این یافته‌ها با ارزش بودند، چون وقتی سطح کافی از آنزیم‌های گالاکتوزیل ترانسفراز و سیالیل ترانسفراز در رده سلولی حشرات وجود دارد و N- استیل گلوکز آمین به‌عنوان پذیرنده گالاکتوز و متعاقباً سیالیل با مهار آمیدیناز حفظ می‌شود، پس می‌توان با مهار آنزیم β-N- استیل گلوکوزآمیدیناز، محصولات سیالیل‌دار تولید کرد (۱۶). اما از آنجایی که استفاده از مهارکننده فوق از نظر اقتصادی بسیار هزینه‌بر می‌باشد پس دنبال یک راه حل بهتر بودند که گزارش شد در صورت مهار ژن کدکننده آنزیم آمیدیناز، یا استفاده از RNAi جهت سرکوب بیان این ژن، می‌توان مسیر را به سمت تولید محصولات گالاکتوزدار و سیالیل‌دار هدایت کرد (۱۶). طی آزمایش‌های انجام شده توسط واناتابل آشکار شد که به‌دنبال استفاده از RNAi جهت مهار، حدود ۵۰٪ کاهش فعالیتی مشاهده می‌شود. در هر دو روش استفاده از مهارکننده آنزیم آمیدیناز و RNAi جهت سرکوب بیان ژن، نیاز به شناسایی ژن بیانی آنزیم موردنظر، یعنی β- N-استیل گلوکوزآمیدیناز در حشرات می‌باشد (۱۶). همان‌طور که قبلاً اشاره شد در مسیر N- گلیکوزیلاسیونی نیاز به چندین قند و نوکلئوتید انتقال‌دهنده از جمله دهنده نوکلئوتیدی CMP-Neu5Ac می‌باشد. طی سنجش‌های آزمایشگاهی مشخص شد که فعالیت آنزیم‌های CMP-Neu5Ac سنتتاز و CMP- سیالیک اسید سنتتاز در حشرات بسیار ناچیز است (۲۰). بنابراین برای فایق آمدن بر این مشکل، محیط رشد حشرات را با ManNAc تیمار کردند. متناوباً می‌توان سلول‌های حشرات را با وکتور بیانی باکلوویروس که حاوی ژن دو عملکردی CMP-سیالیک اسید سنتتاز/ ManNAc کیناز است تراآلوده کرد تا توانایی سنتز ManNAc را از N-UDP- استیل گلوکز آمین داشته باشد. در اصل سلول‌های تراآلوده شده با CMP - سیالیک اسید سنتتاز/ ManNAc کیناز و وکتور بیانی که شامل ژن اسید سیالیک ۹- فسفات سنتتاز انسانی است، توانایی سنتز ManNAc-6-P را از ManNAc داخل سلولی که سوبسترای آنزیم اسید سیالیک ۹- فسفات سنتتاز است را خواهند داشت. همچنین مشخص شده است که اضافه کردن ۱۰ mM ازN - استیل گلوکز آمین در محیط، توانایی سلول‌های حشرات آلوده شده را برای سنتز Neu5Ac حدود ۱۰ برابر افزایش می‌دهد (۲۰). در نهایت برای تولید پروتئین‌های نوترکیب سیالیل‌دار در حشرات، وجود سه عامل پذیرنده انتهایی گالاکتوز در یک یا چند شاخه، دهنده نوکلئوتیدی اسید سیالیک (CMP-Neu5Ac) و فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز ضروری است (۹).

بحث

هرچند تفاوت‌هایی در الگوی گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها در دو سیستم پستانداران و حشرات وجود دارد ولی گلیکو پروتئین‌های زیادی در سیستم حشره دروزوفیلا بیان شده است. رده سلولی S2 یکی از رده‌های سلولی حشره دروزوفیلا است که مسیر N- گلیکوزیلاسیونی در آن به‌خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است و از این رده سلولی برای بیان پروتئین‌های کارکردی همانند پستانداران استفاده شده است. هر چند گلیکوپروتئین‌های تولید شده در این حشرات متفاوت‌تر از انواع موجود در پستانداران می‌باشد ولی از بسیاری جهات به‌خصوص محصولات نهایی بسیار شبیه انواع موجود در حشرات هستند (۲۲). محصولات N- گلیکوزیلاسیونی در رده سلولی S2 به مانند حشرات از انواع پوکی مانوز (هسته تری مانوزیل دار بدون واحد فوکوز با پیوند α، (۱-۶)) می‌باشند. همچنین مطالعات ساختارهای گلیکوپروتئین‌های دروزوفیلا محصولات بدون انتهای N- استیل گلوکز آمین را آشکار کرد و فعالیتی از آنزیم N- استیل گلوکز آمین ترانسفراز II حتی در انواع بالغین مشاهده نشده است (۳). مراحل گلیکوزیلاسیونی در این رده سلولی S2 تا مراحل اضافه شدن N- استیل گلوکزآمین توسط ترانسفراز در بخش میانی گلژی شبیه انواع موجود در حشرات است (۲۲). آنالیز ترکیب کربوهیدراتی پروتئین اینترلوکین ۵ بیان شده در سلول‌های حشره S2 نشان می‌دهد که شامل مانوز زیاد، گلوکز آمین، فوکوز و فاقد اسید سیالیک است (۲۳). مهندسی در سطح سلولی حشرات S2 این موضوع را آشکار کرده است که اگر بتوان مانند انواع مهندسی شده در حشرات، N- استیل گلوکز آمین آمیدیناز را مهار کرد، خواهیم توانست فعالیت N- استیل گلوکز آمین ترانسفراز II را روی هسته سه مانوزیل دار مشاهده کنیم. یعنی انتقال N- استیل گلوکزآمین بر روی حدواسط دو گلوکز و سه مانوزدار صورت گرفته و متناوباً انتقال گروه‌های گالاکتوز و سیالیل نیز در حضور این N- استیل گلوکزآمین انجام می‌شود. دانشمندان بعد از ارایه این مطالب اظهار داشتند که حضور آنزیم N- استیل گلوکز آمین ترانسفراز II نقطه عطفی برای افزایش بیان گلیکوپروتئین‌ها با انتهای سیالیل‌دار در حشرات دروزوفیلا می‌باشد (۲۴). دلیل استفاده از روش‌های مهندسی با وجود خود آنزیم‌ها در حشرات دروزوفیلا، این است که سطح این آنزیم آنقدر پایین است که در حضور مهارکنندگی N- استیل گلوکز آمین آمیدیناز توانایی بروز فعالیتی از خود را ندارد. پس از روش‌های مهندسی استفاده می‌کنند تا سطح بیانی و فعالیتی این آنزیم‌ها را بالا برده و فعالیت آنزیم آمیدیناز را با استفاده از مهارکننده‌های مناسب کنترل و مهار کنند (۲۴).

مطالعات دیگر در حشرات دروزوفیلا نبود دهنده سیالیل، یعنی CMP- سیالیک اسید را در این حشرات آشکار کرد. مسیر دیگر

مهندسی که در این رده سلولی S2 صورت گرفته است تراآلوده کردن این حشرات با وکتور بیانی باکلوویروس بود که این وکتور بیانی دارای دهنده اسید سیالیک می‌باشد چون طی مطالعات آشکار شد که حشرات دروزوفیلا فاقددهنده اسید سیالیک می‌باشند. لذا از اسید سیالیک خارج سلولی برای سیالیل‌دار کردن انتهای محصولات گلیکوزیلاسیونی استفاده می‌کنند (۲۳). از مطالعات روش‌های آزمایشگاهی در مورد مسیرهای آنزیمی N– گلیکوزیلاسیونی که در حشرات و رده سلولی S2 انجام شد، مشخص شد که آن‌ها نیز مانند پستانداران توانایی سنتز محصولات گلیکوزیلاسیونی سیالیل‌دار شده در انتها را دارند. سطح ناکافی آنزیم‌های ضروری و از طرفی حضور آنزیم تخریبی، یعنی β–N– استیل گلوکوزآمیدیناز و وجود هسته فوکوز دار با پیوند (۱ و ۳) به‌عنوانی موانعی در جهت سنتز محصولات N– گلیکوزیلاسیونی به مانند پستانداران در حشرات هستند (۲۳). هنوز در مورد کارکرد بیولوژیکی محصولات پوکی مانوز در حشرات اطلاعات کافی وجود ندارد، ولی در عمومیت ناتوانی حشرات در تولید محصولات N– گلیکوزیلاسیونی پستانداران مانع از استفاده آنها در تولید پروتئین‌های نوترکیب درمانی بوده است. به عبارتی رده سلولی حشرات توسط روش‌های مهندسی متابولیک آمیخته با سطح کافی مواد غذایی برای تولید محصولات سیالیل‌دار به مانند پستانداران، سازگار شدند تا بتوانند از این حشرات مهندسی شده در راستای سیستم بیولوژی، جهت تولید بسیاری از واکسن‌ها و داروهای درمانی استفاده کرده و خصوصیات و ویژگی‌های موردنظر را به ژن آنها مهندسی کنند و در پیشبرد راهکردهای پزشکی جدید قدم بر دارند.

به‌عنوان یک نتیجه‌گیری کلی باید خاطر نشان کرد که بررسی مسیرهای آنزیمی گلیکوزیلاسیون در پستانداران و حشرات می تواند به مهندسی مسیرهای ممکن گلیکوزیلاسیون در سلول‌های حشره دروزوفیلایی S2 و تولید محصولات گلیکوزیلاسیونی مشابه پستانداران کمک کند تا بتوانیم عوامل مهارکننده سنتز محصولات سیالیل‌دار و گالاکتوزدار را از پیش‌رو برداریم.

Reference

1. Bernard AR, Kost TA, Overton L, Cavegn C, Young J, Bertrand M, et al. Recombinant protein expression in a drosophila cell-line - comparison with the baculovirus system. Cytotechnology 1994;15:139-44.
2. Vatandoost J, ZomorodipourA, Sadeghizadeh M, Aliyari R, Bos M. Expression of biologically active human clotting factor IX in Drosophila S2 cells: gamma-carboxylation of a human vitamin K-dependent protein by the insect enzyme. Biotechnology Progress 2012;28:45-51.
3. Kim KR, Kim YK, Cha HJ. Recombinant baculovirus-based multiple protein expression platform for Drosophila S2 cell culture. J Biotechnol 2008;133:116-22.
4. Vatandoost J. Cloning and study of expression γ-carboxylated human factor IX in Drosophila S2 cells, 2012, Ph.D Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran.
5. Vatandoost J, Zomorodipour A. Optimization of transfection and stable expression of human factor IX in Drosophila S2 cells. Iranian Journal of Biology 2014;26.
6. Arruda VR, Hagstrom JN, Deitch J, Heiman-Patterson T, Camire RM, Chu K, et al. Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. Blood 2001;97:130-8.
7. Tomiya N, Narang S, Lee YC, Betenbaugh MJ. Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. Glycoconjugate Journal 2004;21: 343-60.
8. Jarvis DL, Kawar ZS, Hollister JR. Engineering N-glycosylation pathways inthe baculovirus-insect cell system. Current Opinion in Biotechnology 1998;9:528-33.
9. Viswanathan K, Betenbaugh M, yarema K. Glycosylation in native and engineered insect cells, Handbook of carbohydrate engineering, 2005.p.407-30.
10. Klipp E, Liebermeister W, Wierling C, Kowald A, Lehrach H, Herwig R. Systems biology. 2013: John Wiley & Sons .p. 112-115.
11. Tabish S, Raza A, Nasir A, Zafar S, Bokhari H. Analysis of glycosylation motifs and glycosyltransferases in Bacteria and Archaea. Bioinformation 2011;6:191.
12. Emmanuel T. Kinetics of protein modification reactions. Biochem Biophys Res Commun J 1984; 217:341-51.
13. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. Biochim Biophys Acta 1999;1473:4-8.
14. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. Nature Biotechnology 2003;21:255-61.
15. Beevers L. Post-translationalmodifications, Nucleic Acids and Proteins in Plants I. 1982, Springer. p. 136-168.
16. Rendić D, Wilson IB, Paschinger K. The glycosylation capacity of insect cells. Croatica Chemica Acta 2008;81:7-21.
17. Easton R, Leader T. Glycosylation of proteins–structure, function and analysis. Life Science 2011(48):1-5.
18. Behzad LR, Rezaei zarchi S. Proteins and Nucleic Acids. 2010, Payam Noor. p. 45-52.
19. Seppo A, Tiemeyer M. Function and structure of drosophila glycans. Glycobiology 2000;10:751-60.
20. Chang GD, Chen CJ, Lin CY, Chen HC, Chen H. Improvement of glycosylation in insect cells with mammalian glycosyltransferases. J Biotechnol 2003;102:61-71.
21. Berninsone PM. Carbohydrates and glycosylation, in WormBook: The online review of C. elegans biology 2005, WormBook: Pasadena.
22. Johanson K, Appelbaum E, Doyle M, Hensley P, Zhao B, Abdelmeguid SS, et al. Binding interactions of human interleukin-5 with its receptor-alpha subunit - large-scale production, structural, and functional, studies of drosophila-expressed recombinant proteins. J Biol Chem 1995;270:9459-71.
23. Aumiller JJ, Mabashi-Asazuma H, Hillar A, Shi X, Jarvis DL. A new glycoengineered insect cell line with an inducibly mammalianized protein N-glycosylation pathway. Glycobiology 2012;22:417-28.
24. Kost TA, Patrick Condreay J, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vector for protein expression in insect and mammalian cells. National Center for Biotecnology Information 2005;23:567-75.

Journal of Knowledge & Health 2015; Vol 10, No 3
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.1234/knh.v10i3.714
Systematic review

Glycosylation Engineering of Human Recombinant Proteins in New S2 System

Jafar Vatandoost (Ph.D.)[1*], Leila Khalili (M.Sc.)[1]
1- Dept. of Biology, School of Basic Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.

Received: 27 October 2014**, Accepted:** 27 December 2014

Abstract:

Insect expression systems have been used to achieve high expression of recombinant and complex proteins, but disability of insects in the synthesis of N-Glycan products similar to mammals has been a controversial conflict debate in recent years. Glycosylation products in insects contain high or low end of mannose units. The main reason for this inability is the low level of activity of a number of enzymes including β-N - (1 and 2) acetyl glucosamine transferase I and II, β- (1 and 4) galactosyl transferase, α-(2, 3) and α-(2, 6) sialyl transferase. In addition, a hexoaminidase that remove N-acetyl glucosamine at the end of glycan products and prevents binding of galactose and Sialic acid to glycan products have been discovered in insects. So the insect cells can be engineered to produce glycan products similar with mammalians and remove blocking agents of synthesis of sialyl and galactose products. In this systematic review, the glycosylation pathways in mammals and insects and engineering of possible glycosylation pathways in S2 cells have been investigated.

Keywords: Drosophila S2 cells, Glycozylation, N-acetylglucosaminidase, Hexosaminidase.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** *J. Vatandoost,* **Email:** *j.vatan@hsu.ac.ir*

Citation: Vatandoost J, Khalili L. Glycosylation engineering of human recombinant proteins in new S2 system. Journal of Knowledge & Health 2015;10(3):45-52.