مقاله اصیل

بررسی انواع سیستم‌های بیان پروتئین نوترکیب، معرفی سلول‌های S2 به‌عنوان یک سیستم بیانی کارآمد

جعفر وطن‌دوست[1]*، شکوفه حسن آبادی[2]

[1] استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم‌سبزواری

[2] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی ومولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری

***نشانی نویسنده مسئول:** سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دکتر جعفر وطن دوست

E-mail: j.vatan@hsu.ac.ir

وصول:۹۴/۶/۱۳، اصلاح:۹۴/۸/۵، پذیرش:۹۴/۹/۳۰

چکیده

امروزه با استفاده از مهندسی ژنتیک، پروتئین‌های نوترکیبی‌توانند در حجم انبوه برای پاسخگویی به خواسته‌های فراوان صنعت تولید شوند. پروتئین‌هاینوترکیبی‌توانند در سیستم‌های بیانی مختلفی بیان شوند و برحسب نوع پروتئین نوترکیب، این سیستم‌های بیانی می‌توانند عاری از سلول، بر پایه سلول پروکاریوتی یا یوکاروتی باشند. برای تولید پروتئین‌های نوترکیبدارویی در اغلب موارد تغییرات پس از ترجمه لازم است و سامانه‌های بیانی پستانداران در این رابطه اولین انتخاب هستند؛ اما با توجه به مشکلات تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب در آن‌ها، سامانه‌های بیانی حشرات می‌تواند جایگزین مناسب‌تری برای دستیابی به بیان بالای بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب و پیچیده موردتوجه قرار گیرند. در سال‌های اخیر رده سلولی S2 از حشره دروزوفیلا به‌عنوان میزبان برای بیان پروتئین‌های نوترکیب انسانی و غیرانسانیاستفاده‌شده است. این سیستم با دارا بودن مزایای چون تراکم سلولی بالا و قابلیت تولید پروتئین نوترکیب تاخورده حامل تغییرات پس از ترجمه، این پتانسیل را جهت کاربرد در حوضه‌ی صنعتی و تجاری فراهم نموده است.

واژه‌های کلیدی: *پروتئین نوترکیب، سیستم‌های بیانی، سلول S2*

مقدمه

امروزه تولید تجاری پروتئین‌ها با تکیه‌بر مهندسی ژنتیک در سیستم‌های بیانی مختلف در حال گسترش است به‌طوری‌که محصولات تولیدشده بخش مهمی از نیازهای جوامع را دربرمی گیرند. یک سیستم بیانی مطلوب تنها در صورتی می‌تواند انتخاب شود که بهره‌وری، زیست فعالی و ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی پروتئین هدف، همراه با هزینه، راحتی و امنیت خود سیستم را در نظر بگیرد(۱). کیفیت پروتئین، عملکرد، سرعت تولید و بازده تولید مهم‌ترین عوامل در هنگام انتخاب سیستم بیان مناسب برای تولید پروتئین نوترکیب هستند(۲). به‌طور قابل توجه ای میزبان‌های جدیدی مثل باکتری‌های گرم منفی، سویه‌های جدید مخمر، قارچ‌های رشته‌ای و سیستم‌هایی بر پایه گیاهان و حشرات در سال‌های اخیر پیشرفت‌های چشمگیری داشته‌اند. حتی سیستم‌های آزمایشگاهی ابداع شده‌اند که عاری از سلول

است و در محیط عاری از سلول در حالت درون آزمایشگاهی قادر به ترجمه پروتئین هدف می باشد(۳). در مجموع دو نوع سیستم بیانی عاری از سلول و بر پایه سلول تعریف شده است که به توضیح این سیستم‌ها پرداخته می‌شود.

سیستم‌های عاری از سلول

سیستم سنتز پروتئین عاری ازسلول (Cell-free protein synthesis/CFPS) زمان زیادی است که به عنوان یک ابزار پژوهش در بیولوژی بنیادی و کاربردی استفاده شده است. این سیستم مشتق شده از عصاره سلول خام در سال۱۹٦۱ نقش اساسی در کشف کدهای ژنتیکی داشت (٤).

سیستم‌هایCFPS برای تولید پروتئین‌های مورد نظر، نیازمند به اجزای کاتالیزوری لازم برای تولید انرژی و سنتز پروتئین از عصاره لیز شده خام سلول می‌باشند. عصاره لیز شده خام حاوی عناصر لازم برای رونویسی،ترجمه تا خوردن پروتئین و متابولیسم انرژی است. پس ازشروع سنتز پروتئین در سیستم عاری از سلول، تولید به طورمعمول تا تمام شدن یکی از سوبستراها (به‌عنوان‌مثال،ATP، سیستئینوغیره) و یا تجمع محصولات جانبی (به‌عنوان‌مثال، فسفات معدنی) ادامه می‌یابد(۵).

شایع‌ترین سیستم‌های ترجمه عاری ازسلول شامل عصاره‌هایی از E.coli(Extracts from E.coli /ECE)، رتیکلوسیت خرگوش (rabbit reticulocytes /RRL)،جوانه گندم (Wheat germ/WGE) وسلول‌های حشرات(insect cells /ICE) می‌باشند. از آنجا که این سلول‌ها بسیار متفاوت از هم رفتار می‌کنند، تصمیم اول برای تولید پروتئین‌های بیولوژیک فعال، انتخاب نوع منبع عصاره CFPS می‌باشد. سیستم CFPS بر پایه اشرشیا کلی از محبوب‌ترین سیستم‌ها است و از نظر تجاری در دسترس است. E. coli به راحتی در مقادیر زیاد با استفاده از محیط کشت کم هزینه قادر به تکثیر است و به آسانی با استفاده از هم زن بافشار بالا از هم گسسته می‌شود. همچنین به طورکلی باعث دستیابی به بالاترین بازده پروتئین، از صدها میکروگرم تا میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بسته به پروتئین مورد نظر گزارش شده است(٦).

سیستم‌هایRRL،WGE وICE به‌طور گسترده در سیستم‌های عاری از سلول یوکاریوتی استفاده می‌شوند و ازنظر تجاری در دسترس هستند. در مقایسه با سیستم E. coli، این روش‌ها برای تولید پروتئین‌های پیچیده کاربرد دارند، چرا که می‌توانند تغییرات پس از ترجمه که در باکتری انجام نمی‌شود را انجام دهند. بااین‌حالآماده‌سازی عصاره آن‌ها پرهزینه‌تر و بازده پروتئین موردنظر کمتر از باکتری می‌باشد. از لحاظ بازده پروتئین، WGE پیشگام است (۷). به طور معمول تولید بین چند صد میکروگرم تا میلی‌گرم پروتئین نوترکیب در هر میلی‌لیتر واکنش می‌باشد (۸). بازده تولید پروتئین‌های متعدد در واکنش RRL تا ده‌ها میکروگرم پروتئین در میلی‌گرم واکنش گزارش شده است (۹). بازده پروتئینی گزارش‌شده از ICE که معمولاً از سلول‌های Spodoptera frugiperda تهیه می‌شود چند ده میکروگرم در هر میلی‌لیتر واکنش می‌باشد (۱۰). سیستم WGE کارآمدترین سیستم عاری از سلول در ساخت پروتئین است اما یک سیستم مناسب برای برخی از پردازش‌های پس از ترجمه مانند گلیکوزیلاسیون نیست (۹). از طرفی ICE و RRL بیش‌ترین تطبیق‌پذیری را نشان داده‌اند و در پردازش‌هایی مثل ایزوپرنیلاسیون (۱۱)، استیلاسیون(۱۲)، فسفوریلاسیون (۱۳)، اتصال به یوبیکویتین(۱٤)، پردازش سیگنال پپتید(۱۵) و ایجاد هسته گلیکوزیلاسیون (core glycosylation) (۹) استفاده شده‌اند. با توجه به گلیکوزیلاسیون، ICE مزیت بیشتری برRRL دارد زیرا ایجاد هسته گلیکوزیلاسیون نیازمند افزودن غشاهای میکروزومال نیست اما در واکنش RRL این غشاها برای تغییرات پس از ترجمه مناسب مورد نیاز هستند. این غشاهای میکروزومال باید به‌طور جداگانه خالص‌سازی

شوند و به واکنش CFPS اضافه شوند که این مرحله پردازش اضافی مطلوب نیست. فراتر از سیستم‌های ذکرشده در بالا، سیستم‌های CFPS یوکاری و تی بر اساس مخمر (۱۶)، سلول‌های سرطانی(۱۷)و هیبریدوما (۱۸) نیز توسعه پیداکرده‌اند.

با وجود بسیاری از جنبه‌های امیدوارکننده از سیستم عاری از سلول، محدودیت‌هایی برای استفاده از آن‌ها به عنوان یک تکنولوژی برای تولید پروتئین وجود دارد. این موانع شامل مدت زمان کوتاه واکنش سنتز فعال پروتئین، میزان کم تولید پروتئین، مشکل تهیه انرژی و سوبستراهای مورد نیاز برای سنتز پروتئین، هزینه‌های معرف گران قیمت، ترجمه و رونویسی هم‌زمان و تخریبDNA توسط نوکلئازهای عصاره سلولی از معایب این سیستم است (۱۹). یکی ازچالش‌های اصلی برای سیستم‌های CFPS، عدم تولید پروتئین انسانی فعال پیچیده به دلیل عدم وجود مسیری برایتا خوردن اکسیداتیو برای شکل‌گیری و ایزومریزاسی و نباندهای دیسولفید است. درحالی‌که موجودات تکامل یافته از قسمت‌های مختلفی برای جدایی مسیر تا خوردن از بیوسنتز پروتئین استفاده می‌کنند، سیستم‌های عاری از سلول هر دو وظیفه را در همان محفظه انجام می‌دهند. با این حال در دهه‌های گذشته به حل این محدودیت‌ها پرداخته شده است و پیشرفت‌های قابل توجه ای برای سنتز پروتئین‌های پیچیده، مانند پروتئین‌های حاوی چندین باند دی سولفید تشدید شده است(۵).

سیستم‌هایی بر پایه سلول

سیستمبیانی پروکاریوتی

Itakura و همکاران در سال ۱۹۷۷ موفق به بیان سوماتوستاتین، یک هورمون پپتیدی پستانداران، در E. Coli شدند و بیان در شرایط آزمایشگاهی از یک ژن خارجی درسلول‌های پروکاریوتی تحقق یافت(۱).E. coli یکی از اولین و گسترده‌ترین میزبان‌های استفاده شده برای تولید پروتئین‌های هترولوگ است(۲۰). این سیستم برای بیان عملکردی پروتئین‌های غیر گلیکوزیله بسیار عالی است. از مزایای این سیستم می‌توان به رشد سریع، تراکم بالا در محیط‌های ساده وارزان‌قیمت، اطلاعات ژنتیکی کاملاًشناخته‌شده، در دسترس بودن تعداد زیادی از ناقل‌های کلونینگ و سویه‌های جهش یافته میزبانی، انتقال ساده، کنترل آسان، امکان تولید انبوه پروتئین نوترکیب اشاره کرد. سیستم‌های باکتریایی مفید دیگر شامل Bacillus megaterium،B.subtilis،B. licheniformisو B.brevisمی‌باشد(۲).

با این حال سیستم پروکاریوتی دارای برخی معایب است. یکی از این معایب، تراکم سلولی بالا به علت تشکیل استات است که منجر به مسمومیت می‌شود. همچنین پروتئین‌هایی که در اجسام انکلوژن تولید می‌شوند اغلب غیر فعال و غیرقابل‌حل هستند و نیاز به تا خوردن مجدد دارند. این سیستم در تولیدپروتئین‌هایی با دی سولفید زیاد، عاجز است. محدودیت‌های دیگر سیستم‌های بیان پروکاریوتی شامل فقدان تغییرات پس از ترجمه به عنوان مثال گلیکوزیلاسیون پروتئین، تغییرات یا جایگزینی اسیدآمینه‌ها به دلیل ترجیح کدونی، آلودگی با اندوتوکسین، تخریب پروتئین خارجی در میزبان، پردازش ناصحیح به دلیل فقدان چاپرون ها، عدم تولید پروتئین فعال، بی‌ثباتی پلاسمیدها، تولیدمقادیر اندک پروتئین‌های عملکردی و تجمع محصول نوترکیب به عنوان انکلوژن بادی و دشوار شدن خالص‌سازی پروتئین است(۲۱). ترشح پروتئین‌های نوترکیب به‌وسیلهE.coli به فضای پری پلاسمی یا درون محیط مزایای زیادی نسبت به تولید درون سلولی در انکلوژن بادی دارد. این روش به فرایندهای پایین‌دستیتا خوردن، پایداری، تولید پروتئین فعال و محلول کمک می‌کند. برای تولید پروتئین‌هایی که نیاز به باند دی سولفید دارند، بیان در فضای پری پلاسمیک بهتر از سیتوپلاسماست. پروتئین‌هایی با باند دی سولفید باید حتماً در پری پلاسم تجمع یابند زیرا سیتوپلاسم به‌شدتاحیاشده است. از طرفی پروتئین‌هایی که

در پری پلاسم قرارگرفته‌اندمی‌توانندبه‌راحتیبه‌واسطه شوک اسمزی و نفوذپذیری دیواره سلولی به درون محیط کشت ترشح شوند و نیاز به لیز سلولی نیست(۲۲).

سیستمبیانی یوکاریوتی

مخمر

مخمرها قارچ‌های یوکاریوتی تک‌سلولی هستند و اغلب برای تولید پروتئین‌های نوترکیبی استفاده می‌شوند که در سیستم پروکاریوتی به علت نیاز به تا خوردن و گلیکوزیلاسیو نشان تولید نمی‌شوند(۲). دوسویه معروف سیستم بیانی مخمر، ساکارومایسز سرویزیه (Saccharomyces cerevisiae) و پیشیا پاستوریس (Pichia pastoris) می‌باشند. این سویه‌ها به خوبی از نظر ژنتیکی شناخته شده‌اند و دست‌کاری ژنتیکی آن‌ها برای تولید انبوه آسان‌تر است(۱). علاوه بر مزایای سادگی محیط کشت، رشد سریع و هزینه کممشابه با سلول‌های باکتریایی، همانند یوکاریوتهای تک‌سلولی مخمر می‌تواند پروتئین‌های نوترکیب محلول را به‌طور تاخورده صحیح تولید و ترشح کنند که دستخوش تغییرات پس از ترجمه مثل گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون، استیلاسیون، آسیلاسیون قرار گیرند(۲۳). همچنین ایمنی این سیستم مثل فقدان اندوتوکسین و انکوژنها تضمین‌شده است.

با این‌حال برخی از معایب استفاده از مخمرها به‌عنوانیک میزبان برای بیان هترولوگ وجود دارد. تعدادی از پروتئین‌ها در این سیستم به چاپرونهای خاصی برای تا خوردن مناسب پروتئین نیاز دارند (۲). یوکاریوتهای پست متفاوت از همتای پستانداران از نظر O و N- گلیکوزیلاسیون هستند (۲٤). در پستانداران O- الیگوساکاریدها با قندهای متنوعی مثل N- استیل گا لاکتوز آمین، گا لاکتوز و اسید سیالیک ترکیب‌شده‌اند. در عوض در یوکاریوتهای پست مثل پیشیا پاستوریس به O- الیگوساکاریدها تنها رزیدوی مانوز اضافه می‌شود. N- گلیکوززیلاسیون در پیشیا پاستوریس متفاوت از یوکاریوتهای عالی‌تراست(۲۵). اضافه کردن بیش‌ازحد مانوزیک ویژگی معمول در مخمر است که مانع از تا خوردن صحیح و درنتیجه کاهش فعالیت پروتئین و مشکلات ایمنی می‌شود. همچنین مخمرها قادر به گاماکربوکسیلاسیون نیستند (۲٦).

قارچ‌هایرشته‌ای

قارچ‌های رشته‌ای سیستم بیانی دیگری برای تولید پروتئین نوترکیب می‌باشند (۲۷) که دارای ظرفیت بالایی برای تولید مقادیر زیادی از پروتئین ترشح شده هستند. قارچ‌های رشته‌ای مانند Aspergillus niger،Aspergillus oryzaو Trichoderma reeseiمیزبان‌های جذابی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب به دلیل توانایی انجام برخی تغییرات پس از ترجمه هستند. مزایای استفاده از قارچ‌های رشته‌ای به عنوان میزبان شامل توانایی‌های طبیعی‌شان برای ترشح انواع پروتئین‌ها، بازده بالا، رشد سریع در محیط‌های کشت تعریف شده و ارزان، ایمن، مقیاس‌پذیر در سطح بیان بالا می‌باشد. همچنین ژن‌های خارجی می‌توانند از طریق پلاسمید به کروموزوم قارچ‌های رشته‌ای وارد شوند (۲۸). از طرفی تنوع ژنتیکی آن‌ها درهای جدیدی برای بهره برداری از آن‌ها به عنوان یک منبع جدید ژن به عنوان میزبان بیانی باز کرده است (۲۹).

باوجود مزایای زیاد و انجام تغییرات پس از ترجمه مثل فسفوریلاسیون، استیلاسیون، آسیلاسیون و... اما بازهم قادر به‌اضافه کردن قندهای انسانی مثل اسید سیالیک نمی‌باشند و درنتیجه پروتئین فعال پیچیده انسانی را نمی‌توانند تولید کنند. ترجیح کدونی قارچ‌ها نیز با انسان‌ها ن متفاوت است (۳۰).

سیستم بیانی لیشمانیا

از سال ۱۹۸٦ نشان داده شد که لیشمانیا به‌عنوان یک تریپانوزوماتید فلاژل دار می‌تواند در بیان ژن‌های خارجی استفاده شود(۳۱). در میان خانواده تریپانوزوماتیدا، Leishmania tarentolae یک پارازیت غیر بیماری‌زا است که از نوعی مارمولک به‌دست‌آمده و

به‌عنوان یک سیستم بیان یوکاریوتی مستعد توسعه‌یافته است. از ویژگی‌هایاین سیستم رشدسریع باز ماند و برابر شدن ٤-٧ ساعت در ٢٦ درجه سانتی‌گراد، کشت در محیط‌های ارزان و عاری از سرم، تراکم سلولی بالا (10^8 سلول در میلی‌لیتر) و غیر بیماری‌زا برای انسان است. زمان کوتاه تهیه کلون پایدار (٢ هفته)، استفاده از وکتور رفت‌وبرگشتی با E.coli، پایداری وکتور اپیزومال و ترشح مناسب پروتئین‌های نوترکیب برخی دیگر از نقاط قوت این سیستم می‌باشد. یکی از مزایای اصلی سیستم بیان یلیشمانیا پتانسیل تغییرات پس از ترجمه پروتئین هدف از نوع پستانداران مانند گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون، پرنیلاسیون و ... است (٣٢).

L.tarentolae برای بیان موفقیت‌آمیز بسیاری از پروتئین‌های پیچیده یوکاریوتی مثل اریتروپویتین(٣٣)، اینترفرون گاما(٣٤, ٣٥)، پرو پروتئین کونورتاز ٤(٣٦)، لامینین-٣٣٢ انسان (٣٧)، یکفعال‌کننده پلاسمینو ژن نوع بافتی (٣٨) و آنتی‌بادی scFv (single chain antibody fragments) خرگوش استفاده شده است. همچنین سلول‌های لیشمانیا میزبانی مناسب برای تولید پروتئین rLPG3(Recombinant lipophosphoglycan) می‌باشند که از آن به‌عنوان کاندیدی برای تهیه واکسن استفاده می‌شود(٣٩).

سلول‌های پستانداران

تولید پروتئین در کمیت و کیفیت مناسب یک نیاز ضروری در هر زماناست و از این نظر یک افزایش تدریجی در استفاده از سلول‌های پستانداران برای تولید پروتئین وجود دارد. سیستم‌های بیان سلول پستانداران مزایای زیادی نسبت به سیستم‌های قبلی دارند. این سیستم‌های بیانی قادر به تا زدن مناسب پروتئین نوترکیب، انجام تغییرات پس از ترجمه ازجمله گلیکوزیلاسیون، پردازش سیگنال پپتید، ترشح پروتئین و عاری از اندوتوکسین می‌باشند. همچنین این سیستم را می‌توان برای بیان گذرایا پایدار استفاده کرد.

با وجود مزایای زیاد این سیستم، اما رده های سلولی پستانداران پایدار تنها بعد از یک دوره زمانی طولانی به دست می‌آیند و از طرفی بعد از ساخت رده سلولی نیاز است تا سلول‌ها به طور مداوم تحت فشار انتخابی حفظ شوند و حتی ممکن است در کشت طولانی مدت ناپایدار شوند (٢٦). آلودگی احتمالی با ویروس‌های حیوانی سامانه بیانی پستانداران، یک محدودیت دیگر در استفاده آن‌ها برای تولید انبوهاست. از طرفی اغلب پرموترهای القایی در این سامانه‌ها، یک سطح فعالیت پایه مداوم را نشان می‌دهند. پروتئین‌های نوترکیب انسانی اغلب در رده‌های سلولی موشی بیان می‌شوند لذا پروتئین نوترکیب الگوی گلیکوزیلاسیون موش را دارد. هرچند این رده‌های سلولی می‌توانندN- گلیکان هایی شبیه به نوع انسانی داشته باشند اما گروه کربوهیدراتی غیر شاخه‌دار–Galα1 3Galبه پروتئین نوترکیب تولیدشده در این رده‌های سلولی اضافه می‌شود که این گروه کربوهیدراتی در پروتئین‌های انسانی یافت نشده است. از طرفی پروتئین‌های انسانی تولیدشده در سلول‌های موشی ترکیب متفاوتی از اسید سیالیک را نشان می‌دهند(٤٠). از دیگر مشکلات سامانه‌های بیانی پستانداران می‌توان به سطح پایین تولید پروتئین نوترکیب، آهستگی رشد و ناپایداری آن‌ها نیز اشاره کرد.

سیستم بیانی حشرات

سامانه‌های بیانی حشرات که به‌طورفزاینده‌ای برای پروتئین‌های مختلف استفاده می‌شود، یک روش سریع و ساده برای تولید پروتئین در سطح میلی‌گرم را فراهم نموده است(٤١). یکی از مزای ایاصلی این سامانه‌ها درمقایسه با سیستم‌های پروکاریوتی،توانایی آن‌ها در تولید مقادیر انبوه پروتئین‌های یوکاریوتی است که نیاز به تغییرات پس از ترجمه دارند. مزیت دیگر این سامانه‌هاتوانایی آن‌ها درتولید پروتئین‌ها د رمقیاس وسیع و در زمانی نسبتاً کوتاه (برخلاف سیستم‌های پستانداران) است (٤٢).

یکی از ویژگی‌های جذاب سیستم‌های بیانی حشرات، قابلیت پردازش پروتئینی و کاریوتی تا خوردن صحیح و ایجاد باند دی سولفید است. علاوه بر این قادر به انجام برخی تغییرات پس از ترجمه مثل N و O- گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون، آسیلاسیون، آمیداسیون، کر بوکسی متیلاسیون، ایزوپرنیلاسیون، انتقال هسته‌ای، برش سیگنال پپتید، برش پروتئولیتیک وپردازش اگزون و اینترون می‌باشد(٤٣). بر این اساس، این سیستم به‌طور گسترده‌ای برای تولید گلیکوپروتئین های نوترکیب در نظر گرفته می‌شود. در مجموع سیستم بیانی حشرات به دو نوع لایتیک و غیر لایتیک تقسیم می‌شود.

سیستم بیانی بر پایه باکلوویروس

سیستم بیانی بر پایه باکلوویروس (BEVS/ Baculovirus Expression Vector Systems) به‌عنوان یک سیستم لایتیک، یکی از قدرتمندترین و تطبیق‌پذیرترین سیستم‌های بیانی یوکاریوت است که در سال ۱۹۸۳ معرفی شد. BEVS یک سیستم ویروسی است که برای بیان ژن‌های هترولوگ از منابع مختلف مثل گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها در حشرات استفاده می‌شود. در این سیستم ژن‌های غیرضروری مثل پلی هیدرین با ژن‌های هترولوگ جایگزین می‌شوند(٤٤). از آنجایی‌که عفونت‌های با کلوویروس به حشرات محدود می‌شود، لذا طیف میزبانی بسیار خاصی دارد و برای انسان و گیاهان بیماری‌زا نمی‌باشند (٤٥). در این سیستم، دو یا چند ژن را می‌توان به‌طورهم‌زمان در طی یک عفونت سلول حشره منفرد بیان کرد. پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در سیستم باکلوویروس معمولاً در همان قسمت‌های سلولی که پروتئین اصلی قرار دارد قرار می‌گیرند. به‌عنوان‌مثال پروتئین هسته‌ای به هسته حشره منتقل می‌شود، پروتئین غشایی به غشای سلول متصل می‌شود و پروتئین ترشحی به‌وسیله سلول حشره آلوده به ویروس ترشح می‌شود. باکلویروسها در محیط‌های کشت سوسپانسیون به‌خوبی رشد می‌کنند و اجازه تولید پروتئین نوترکیب در مقیاس بزرگ را می‌دهند. در بیشتر موارد پروتئین نوترکیب محلول و به‌آسانی قابل بازیافت از سلول عفونی است. با کلوویروسها می‌توانند در میزبان‌های حشرات تولید شوند و پپتید ایجادشده ازنظر تغییرات پس از ترجمه در نوعی شبیه به سلول‌های پستانداران است(١).

اصلی‌ترین عیب این سامانه این است که بیان پروتئین مورد نظرمعمولاً به وسیله پرموترهایژن‌های تأخیری از قبیل پلی هیدرین هدایت می‌شود، بنابراین حداکثر تولید پروتئین در نقطه‌ای است که سلول‌ها به خاطر عفونت ویروسی می‌میرند و در شرایط مرگ سلول میزبان، تغییرات بعد از ترجمه که می‌بایست برروی پروتئین بیان شده اتفاق بیفتد دچار اختلال می‌گردد. از طرفی لیزسلولی در این سامانه باعث آلودگی شدید پروتئین هدف با پروتئین‌های سلولی از قبیل پروتئازها می‌شود لذا از این نظر زمان برداشت محصول در این سامانه خیلی حیاتی است. همچنین چون ژنوم باکلوویروس وارد ژنوم میزبان نمی‌شود، برای سنتز پروتئین نوترکیب در سلول جدید نیاز به عفونت مجدد است و از آنجایی که سلول‌های میزبان سرانجام می‌میرند، ژن هترولوگن می‌تواند به صورت مداوم بیان شود (٤٦). هر دو راز سنتز پروتئین مورد نظرنیاز به عفونت جدید سلول حشره دارد؛ بنابراین این سیستم از نظر ظرفیت آن برای تخمیر مستمر نسبت به سیستم‌های پروکاریوتیو مخمر پایین‌تر است. علاوه بر این، سلول‌های حشرات و سلول‌های پستانداران در الگوهای گلیکوزیلاسیون خود از جمله در طول الیگوساکاریدها و در محتوای مانوز تفاوت دارند. نکته قابل ذکر در مورد سامانه بیان بیاکولوویروس، عدم توانایی آن در انجام گاماکربوکسیلاسیون است (٤٧).

سلول‌های S۲ دروزوفیلایی

در حال حاضر سیستم‌های بیان پروتئین نوترکیب بر اساس استفاده از سلول‌های Drosophila melanogaster به‌طورفزاینده‌ای استفاده می‌شود. تا به

امروز حدود ۱۰۰سلول مشتق شده از D. melanogaster به‌دست‌آمده است که از بین این‌ها ۱۲ مورد را می‌توان به راحتی کشت داد. با این‌حال، تنها رده‌های سلولی استفاده شده برای بیان ژن هترولوگ، اشنایدر ۲ و ۳(S2 و Schneider's 2, 3/S3) می‌باشندکه هر دو از مراحل انتهای جنینی دروزوفیلا ملانوگاستر مشتق شده‌اند(٤٨).

سیستم بیانی سلول‌هایS2 دروزوفیلا در سال ۱۹۷۰توسط اشنایدر توسعه پیداکرده است.اندازه سلول‌های S۲، ۸-۱۰ میکرومتر است و در محیط عاری ازسرم رشد می‌کنند. اینسلول‌ها هم حالت مونولایر دارند، هم به‌صورت سوسپانسیونبه‌صورت منفرد در محیط ساکن رشد می‌کنند. اعتقاد بر این است که منشأ ماکروفاژی رده سلولی S2می‌تواند مزیت رشد به‌صورت سوسپانسیون را توضیح دهد.برخی مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های S2 می‌توانند به تراکم بالای ۷۰ میلیون سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت برسند (٤٩). بررسی‌ها نشان داده‌اند که وکتورهای بیانی این نوع سامانه به صورت چند کپی به داخل کروموزوم سلول‌های S2 در وزوفیلا وارد می‌شوند (٥٠).

و این سلول‌ها توانایی ورود بالغ بر ۱۰۰ کپی از یک کاست بیانی را به ژنوم خود در یک رخداد تراریخت سازی دارند. به این ترتیب برای تثبیت رده سلولی پایدار با سطح بیان بالا نیاز به دوره زمانی طولانی تکثیر پلاسمیدنیست(٥١). از مزایای قابل توجه سامانه بیانی S۲ می‌توان به قدرت بیان بیشتر نسبت به سلول‌های حشرات دیگر از قبیل fS9 (۱۰ تا ۲۰ برابر) (٤١) تغییرات بعد از ترجمه یوکاریوتی از جمله گاماکربوکسیلاسیون (٤٧)، عدم لیزسلول‌ها، عدم تداخل و میان کنش بین پروتئین بیانی با پروتئین‌های رده سلولی، زمان کوتاه تهیه رده سلولی پایدار (حدود ۲-۳ هفته)، ورود چند کپی از ژن مورد نظر در جهت افزایش پایداری، رشد بادانسیته بالا، رشد در دمای اتاق و عدم نیاز به OC۲ اشاره کرد (٤١). از طرفی برخلاف سلول‌های پستانداران، بیان پروتئین نوترکیب در سامانه در وزوفیلا به‌طور بالایی قابل تنظیم است. یکی از پرموترهایی که در این سامانه‌هاکارایی بالایی از خود نشان داده، پروموترمتالوتیونین است که به شدت قابل تنظیم است و قادر به هدایت نسخه برداری در سطح بالا به وسیله القا با سولفات مسیاسولفاتکادمیوم است(٥٢). تحقیقاتی بر اساس داده‌های PubMed بر روی سلول‌های در وزوفیلا S2 نشان داد که استفاده از این سلول‌ها رو به افزایش است. از سال ۱۹۷۰ تا ۲۰۰۰، ۱۸۰ مقاله به این سیستم ارجاع داده‌شدهدرحالی‌که از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۱٤، به ۸۸٤ رسیده است. حتی در ۲ سال اخیر۱۸٤ مقاله ارجاع داده‌شده است (٤٩). این سیستم بیانی یک سیستم غیر لیتیک و بر پایه وکتورهای پلاسمیدی است که برای بیان و آنالیز پروتئین‌های درون‌سلولی، ترشح‌شده و غشایی استفاده‌شده است.

یکی از اولین گزارش‌ها در بکارگیری این سامانه، بیان دوپامین بتاهیدروکسیلاز (DBH) به میزان ١٦ میلی‌گرم بر لیتر (٥٣) و اینترلوکین ٥ انسانی به میزان ۲۲ میلی‌گرم بر لیتر در سلول‌های اشنایدر S2 دروزوفیلا بود (٥٤). فعالیت آنزیم β- سکرتاز انسانی بیان شده در سلول‌هایS2 که در شکل‌گیری غلاف میلیندر سلول‌های عصبی محیطی مهم است، به‌طورقابل‌توجه ای به بالای۲٦۰٪ رسید(٥٥). یکی دیگر از کارهاخیر در بکارگیری این سامانه بیان ژن S از آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس هپاتیت b (gA sbH) به میزان بیان ۷ میکروگرم برای هر لیتر از کشت بود که این مقدار بیش از ۱۰ برابر محصول سلول‌های fS۹ است (٥٠). از دیگر کاربردهای سلول‌هایS2، استفاده برای تولید پروتئین‌های تحقیقاتی،توسعه واکسن‌های نوترکیب و ذرات شبه‌ویروس، تولید VIH-۱PLV،بیان آنتی‌بادی، دوپامینبتا هیدروکسیلاز انسانی (٥٣)، پلاسمینوژن انسانی (٥٦)، رسپتورها و کانال‌های یونی (٥٧)، پروتئین‌های غشایی (٥٨)، گلیکوپروتئین ویروس هاری (٥٩)، بیان ژن‌های هترولوگوس و ... است(٤٩). حتی این سلول‌هابه دلیل

قابلت کربوسیلاسیون برخلاف سایر حشرات، برای تولید پروتئین‌های دارویی انعقادی از جمله فاکتور ۹ استفاده شده است(۶۰, ۶۱).

یکی از مهم‌ترین کاندیدهای بیان پروتئین‌های ویروسی نوترکیب DENV (Dengue virus)، JEV (Japanese Encephalitis virus) و WNV (West Nile virus) برای تهیه واکسن، سلول‌های دروزوفیلا S2است. تولیدDENVدر سلول‌هایS2 بازده بالای ۱۰-۵۰ میلی‌گرم بر لیتر داشته و کنفورماسیونی شبیه فرم اصلی داشته است. تولید JEV به‌عنوان معمول‌ترین عامل آنسفالیت ویروسی در سلول‌هایS2 کارآمدتر و ارزان‌تر است و ذرات ویروسی تولید شده می‌تواند در موش سبب تولید آنتی‌بادی اختصاصی شود (۴۹). یکی از واکسن‌های ویروس WNV حاوی زیر واحدهای پروتئینی می‌باشد که در سلول‌هایS2 تولید می‌شود و بازده تقریباً ۱۰- ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر دارد. این پروتئین ازنظر ساختاری کاملاًتا خوردن صحیح دارد و در میمون سبب ایمنی ۱۰۰ درصد علیه ویروس می‌شود (۶۲). پروتئین اصلی ویروس هاری، گلیکوپروتئین RVGP(Rabies virus glycoprotein) است که تولید آن در سلول‌های در وزوفیلا S2 انجام‌گرفته است. تزریق این پروتئین‌های نوترکیب به موش باعث مقاومت بدن موش در برابر ویروس هاری شد (۶۳).

سلول‌هایS2به‌طورمعمول تراکم سلولی بیش از ۱۰ برابر بیشتر از دیگر رده‌های سلولی حشرات و یا پستانداران در فرآیندهایکشت بسته (batch) رادارند. افزایش غلظت سلول‌های زنده معمولاً به افزایش بازدهتولید ترجمهو درنتیجه بهبود فرآیندهایاقتصادمی‌انجامد. این سلول‌ها حتی در تراکم سلولی بسیار بالا (< ۲۵۰ میلیون سلول / میلی‌لیتر) هم توده (aggregate) تشکیلنمی‌دهند. سلول‌های دیگر، مانند سلول‌های CHO (Chinese hamster ovary)، BHK(Baby Hamster Kidney) و HEK(Human Embryonic Kidney) اغلب در تراکم سلولی بالا تشکیل توده می‌دهند که هر دو فرایند توسعه و ساخت را پیچیده می‌کند. تجمع سلولی ممکن است منجربه تعدادی از مشکلات مرتبط ازجمله عدم کنترل با محیط با توجه به تمایز در شرایط فیزیکی محیط، کاهش سلول‌های زنده و انتشار پروتئازها می‌شود. همچنین ممکن است به‌طورکلیبر بازیافتو همگنی (homogeneity) محصولتأثیربگذارد. سلول‌هایS2 به دلیل اینکه حتی در تراکم سلولی بسیار بالا (< ۲۵۰ میلیون سلول / میلی‌لیتر) تجمع نمی‌یابند بسیار مناسب برای پرفیوژن هستند. حالت پرفیوژن (Perfusion) فناوری مقرون به صرفه‌ای است کهبه‌سرعت در حال تبدیل شدن به یک روش ارجح برای تولید پروتئین است (۶۴).

در مقایسه با کشت سلولی پستانداران موضوع سمیت با آمونیاک در سلول‌هایS2 وجود ندارد و سلول‌هایS2 به اثرات سمی محصولات زائد تخمیر، مانند آمونیاک و لاکتات مقاوم هستند. آمونیاک، یک محصول فرعی کاتابولیکی گلوتامین درمحیط کشت است که معمولاًدر محیط کشت S2 تجمع نمی‌یابد اما مطالعات در بیوتکنولوژی نشان داده‌اند که سلول‌هایS2غلظت‌های بسیار بالا از آمونیاک راتحملمی‌کنند. علاوه بر این، سلول‌های S2 لاکتات را در طول دوره رشد به‌جزتحتشرایط استرس فقدان اکسیژن (anoxic) مانند سلول‌هایCHO و دیگر پستانداران تولیدنمی‌کنند. علاوه بر این، سلول‌هایS2 نسبت به سایر رده‌های سلولی حشرات و سلول‌های پستانداران در برابر تغییرات pH، دما و اکسیژن، اسمولالیته و برش، کشتبلندمدت مقاوم می‌باشند لذا ممکن است سلول S2 برای بیش از یک ماه بدون تغییر محیط، کشتشوند. هیچ سیستم بافری مانند سیستم بافر بی‌کربنات / CO_2 کهاغلب برایسلول‌های پستانداران استفاده می‌شود، نیاز ندارد. همچنین نیاز به CO_2 گران‌قیمت که موردنیاز برای سلول‌های پستانداران است ندارد. سلول‌های حشرات در دمای بهینه ۲۶ تا ۲۸ همانند سایر سلول‌های حیوانات رشد می‌کنند. حتی سلول‌هایS2 را می‌توان در

کابینت یا محیط آزمایشگاه رشد داد (۵۵). اکسیژن اغلب یک جز اولیه در محیط کشت است. بااین‌حال، باوجودمهم بودن برای رشد سلول، می‌تواند در غلظت‌هایب الاسمی باشد لذا باید به‌دقت کنترل شود. هوادهی کشت سلول‌هایS2 را می‌توان با موفقیت از طریق استفاده از غشاهای نفوذپذیر انجام داد که نفوذپذیری بالا به اکسیژن و دی‌اکسید کربن دارند درنتیجه میزان انتقال بالاییبین غشا و محیط کشت سلول در راکتورانجام می‌گیرد. این روش مانع از تشکیل حباب در محیط کشت می‌شود لذا این کار باعث کاهش نیروهای برشی و درنتیجه کاهش آسیب سلولی می‌شود. سلول‌های حشرات به‌طورمعمول دارای میزان تنفس مخصوص (QO2/ specific respiration rate) پایین‌تر از سلول‌های پستانداران هستند که به علت کوچک‌تر بودن آن‌هامی‌باشد به همین دلیل حجم زیستیکوچک‌تر است. سلول S2 از سلول‌هایSf9 و بسیار کمتر از سلول‌های پستانداران اکسیژن مصرف می‌کند (۵۵). سلول‌های S2 می‌توانندبه‌طور گذرا پروتئین‌ها را بیان کنند و بازده کافی برای روش غربالگری در ۳-٤ روز تولید کنند. این کار اجازه غربالگری سریع را می‌دهد در نتیجه انتخاب کاندیدهای پروتئینی را تسریع می‌کند(٤۹).

کشت‌های آزمایشگاهی می‌توانندر فواصل ۷ روزه بین پاساژ نسبت به فاصله معمول ۳-٤ روز برای دیگرردهای سلولی حفظ شوند که باعث کاهش نیروی کارمی‌شود. آلودگی احتمالی با ویروس‌های حیوانی سامانه بیانی پستانداران، یک محدودیت دیگر دراستفاده آن‌ها برای تولید انبوهاست؛ اما ویروس‌های انسانی قادر به رشد در سلول‌های S2 نمی‌باشند. رده‌های سلولیS2 ، به‌مانند بسیاری از سلول‌های حیوانات، گلوکز (GLC) و گلوتامین (GLN) را به ترتیببه‌عنوان منابع اصلی برای کربن و نیتروژن مورداستفاده قرار می‌دهند.سلول‌های پستانداران در محیط کشت مقادیر بالایی لاکتات را در پاسخ به افزایش گلوکز، حتی در شرایط عدم محدودیت اکسیژن تولید می‌کنند که ممکن است در غلظت‌های بالاتر از۳/٦g/L سمی باشد. در سیستم‌های سلولی حشرات، لاکتات یک محصول جانبی از متابولیسم بی‌هوازی گلوکزاست و به‌طور مستقیم به محیط کشت بستگی دارد و رده‌های سلولی S2 الگوهای تخمیر لاکتات متفاوتی دارند. غلظت‌های خیلی کمی از لاکتات مشاهده می‌شود این غلظت‌ها ممکن است تحت شرایط مختلف از ۰/٦g/L تا ۳ برسد. تولید لاکتات در سلول‌های حشرات تنها تحت شرایط محدودیت اکسیژن اتفاق می‌افتد(۵۵).

وکتورهای پلاسمیدی مورد استفاده برای ترا آلایی سلول‌های S2 و تولید جمعیت‌های سلولی بیان‌کننده ژن هترولوگاساساً از پلاسمیدهای مورد استفاده برای تراآلایی سلول‌های پستانداران متفاوت نیستند. وکتور های توسعه یافته برای سیستم بیان دروزوفیلا (DES/ Drosophila Expression System) شامل عناصر ضروری برای تکثیر در باکتری‌ها و برای بیان ژن درسلولS2 می‌باشند. این وکتورها به منظور همانندسازیcDNA هترولوگو بیان توسط ماشین سلولی باید به ژنوم سلول وارد شوند. این سیستم ترکیبی از مزایای استفاده از هر دو سیستم‌های پستانداران و باکلوویروس است (۵۵). پلاس میدها اساساً شامل عناصری مثل ژن منشأ همانندسازی باکتری (pUCori)، پروموتر متالوتونین (pMt) یا اکتین (pAc) مورد استفاده برای بیان ژن هدف، یک ژنکد کننده برای یک پپتید که می‌تواند به عنوان یک نشانگر بیانی تولید شده (V5)، پروموترژن رونویسی کننده در وزوفیلا (pCopia) مورد استفاده برای انتخاب ژن (هایگرومایسین، پروماسین و ...)،ژن آمپی‌سیلین برای انتخاب در باکتری‌ها، سیگنالپلی آدنیلاسیون SV40(SV40pA) وتوالی سیگنال ترشح زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین متصل به پروتئین (BIP) در وزوفیلا هستند(۵۵).

اگر چه مسیرهای تغییرات پس از ترجمه پروتئین توسط سلولS2 ممکن است نسبت به سلول‌های

پستانداران کمی متفاوت باشد، اما فعالیت پروتئین‌های نوترکیب نه‌تنها از بین نمی‌رودبلکه می‌تواند افزایش یابد. بیشترN - گلیکانهادر گلیکوپروتئینهای نوترکیب بیان‌شده توسط سلول‌های S2 از ساختارهای مانوز کم (paucimannosidic) ساده تشکیل‌شده است. غالباً هسته ۳ مانوزی با یا بدون هسته فوکوزی α(1,6) است که حاوی گا لاکتوز یا اسید سیالیک در ساختارش نیست. باوجوداین واقعیت که ساختار و ساختمان N-گلیکانها می‌تواند ترشح پروتئین، نیمه‌عمر و عملکرد بیولوژیکی آن را کنترل کندتا حدودی این مشکل را می‌توان با مهار آنزیم β-N-acetylglucosaminidase در مسیرN- گلیکوزیلاسیون سلول S2 حل کرد (٦٥). در واقع محصولات گلیکوزیلاسیونی در حشرات حاوی مانوز کم یا زیاد انتهایی است. دلیل اصلی این ناتوانی پایین بودن سطح فعالیت تعدادی از آنزیم‌ها شامل β-N-(٢-١) استیل گلوکز آمین ترانسفراز Iو II، β-(١-٤) گالاکتوزیل ترانسفراز، α(٢-٣) و α(٢-٦) سیالیل ترانسفراز است. از طرفی یک هگزوامیدیناز که سبب حذف N-استیل گلوکز آمین از انتهای محصول گلیکانی شده و مانع از اتصال گالاکتوز و اسیدسیالیک به محصولات گلیکانی می‌شود، در حشرات کشف شده است لذا می‌توان حشرات را جهت تولید محصولات گلیکوزیلاسیونی مشابه پستانداران مهندسی کرد و عوامل مهارکننده سنتز محصولات سیالیل دار و گالاکتوزدار را از پیش رو برداشت (٦٦). مهندسی گلیکوزیلاسیون سلول‌های S2 به‌منظور تولید رده‌های سلولی S2 تغییر یافته و واجد گلیکوزیلاسیون، انجام‌گرفته است. مطالعات اولیه افزایش فعالیت بتا سکرتاز (beta-secretas) و گلیکو اکسیژن از یک نوترکیب (Recombinant cyclooxygenase1) را نشان داد که سلول‌های S2 با cDNA های کد کننده 1-4-galactosyltransferase و Galbeta 1,4-GlcNAc α2,6-sialyltransferase ترانسفکت شدند (٤٩).

نتیجه‌گیری و بحث

در میان سیستم‌های بیان پروتئین نوترکیب اگرچه پروکاریوتها ممکن است به‌عنوان یک میزبان مناسب با سطح نسبی بالا مطرح شونداما نداشتن تغییرات پس از ترجمه و نیاز بهتا خوردن مجدد،هنوز به‌عنوان یک مشکل حاد در این میزبان قابل‌بررسی است.به‌طورکلی در باکتری‌ها به دلیل اینکه قادر به ایجاد شاخه‌های گلیکان و باندهای دی سولفیدی نیستند، سیستم بیان پروتئین آن‌هابه‌خوبی و به طرز صحیح انجام نمی‌گیرد. همچنین تلاش‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در مخمر به دلیل ساختار غیرطبیعی پروتئین‌ها، ترشح ضعیف در محیط کشت و گلیکوزیلاسیون زیاد چندان رضایت‌بخش نیست؛ بنابراین وجود یک سیستم بیانی یوکاریوت جایگزین، به منظور حل مشکلات یادشده و تولید پروتئین‌های نوترکیب ضروری می‌نماید.از میان سیستم‌های مختلف تولیدکننده پروتئین‌های نوترکیب، سیستم یوکاریوتی به دلیل تولید پروتئین‌های بزرگ به‌ویژهپروتئین‌های غنی از باند دی سولفید وتغییرات پس از ترجمه بروی آن‌ها نسبت به سیستم پروکاریوتی ترجیح داده می‌شود. این در حالی است که سیستم‌های پروکاریوتی جهت سنتز پروتئین‌های کوچک کاراتر است. برای تولید پروتئین‌های دارویی در اغلب موارد تغییرات پس 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 توجه به مشکلات در تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب در آن‌ها، سامانه‌های بیانی حشرات می‌تواند جایگزین مناسبی برای دستیابی به بیان بالای بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب و پیچیده مورد توجه قرار گیرند. در سال‌های اخیر رده سلولی S2 از حشره دروزوفیلا به‌عنوان میزبان برای بیان پروتئین‌های هترولوگ معرفی‌شده و پروتئین‌های زیادی توسط این سیستم بیان‌شده است. گزارش‌های زیادی از استفاده از

این سیستم جدید برای بیان پروتئین‌های نوترکیب انسانی و غیرانسانی وجود دارد. سلول‌های S2 ابزاری بسیار مفید در تحقیقات و تولیدات می‌باشند و به‌راحتی با تکنیک های جدید سازگار می‌شوند و یک مدل مفید برای انواع مطالعات را فراهم می‌کند. این سیستم سلولی در تعدادی از پروژه‌های واکسن استفاده شده است و نشان داده‌شده است که این سیستم بسیارانعطاف‌پذیر در تولید داروهای زیستی است لذا این سیستم شکاف‌هایی که در تولید داروهای زیستی وجود دارد را پر نموده است. پیشرفت‌هایی در درک گلیکوزیلاسیون و شرایط کشت کمک‌های بسیاری به استفاده از این سیستم در تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی کرده است. دیده‌شده است که هزینه خالص‌سازی، احتمال آلودگی و زمان تولید پروتئین در سیستم‌هایS2 کمتر از پستانداران است. سازگاری بالای این سیستم برای استفاده در تولید واکسن‌ها، گلیکوزیلاسیون و گاما کربوکسیلاسیون پروتئین‌ها آن‌ها رابه یک سیستم بیانی با ارزش تبدیل کرده است.

References

1. Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. J Biotechnol. 2007;127(3):335-47.
2. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv. 2009;27(3):297-306.
3. Sodoyer R. Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. BioDrugs. 2004;18(1):51-62.
4. Nirenberg MW, Matthaei JH. The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. P Natl A Sci India A. 1961;47(10):1588-602.
5. Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, Jewett MC. Cell-free protein synthesis: applications come of age. Biotechnol Adv. 2012;30(5):1185-94.
6. Zawada JF, Yin G, Steiner AR, Yang J, Naresh A, Roy SM, et al. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production—a new approach for shortening protein production development timelines. Biotechnol Bioeng. 2011;108(7):1570-8.
7. Takai K, Sawasaki T, Endo Y. Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. Nat Protoc. 2010;5(2):227-38.
8. Madin K, Sawasaki T, Ogasawara T, Endo Y. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. P Natl A Sci 2000;97(2):559-64.
9. Tarui H, Murata M, Tani I, Imanishi S, Nishikawa S, Hara T. Establishment and characterization of cell-free translation/glycosylation in insect cell (Spodoptera frugiperda 21) extract prepared with high pressure treatment. Appl Microbiol Biot. 2001;55(4):446-53.
10. Ezure T, Suzuki T, Shikata M, Ito M, Ando E. A cell-free protein synthesis system from insect cells.Cell-Free Protein Production: Springer; 2010. p. 31-42.
11. Suzuki T, Ito M, Ezure T, Shikata M, Ando E, Utsumi T, et al. Protein prenylation in an insect cell-free protein synthesis system and identification of products by mass spectrometry. Proteomics. 2007;7(12):1942-50.
12. Suzuki T, Ito M, Ezure T, Shikata M, Ando E, Utsumi T, et al. N-Terminal protein modifications in an insect cell-free protein synthesis system and their identification by mass spectrometry. Proteomics. 2006;6(16):4486-95.
13. Safer B, Jagus R. Control of eIF-2 phosphatase activity in rabbit reticulocyte lysate. P Natl Acad Sci USA. 1979;76(3):1094-8.
14. Suzuki T, Ezure T, Ando E, Nishimura O, Utsumi T, Tsunasawa S. Preparation of ubiquitin-conjugated proteins using an insect cell-free protein synthesis system. J Biotechnol. 2010;145(1):73-8.
15. Shields D, Blobel G. Efficient cleavage and segregation of nascent presecretory proteins in a reticulocyte lysate supplemented with microsomal membranes. J Biol Chem. 1978;253(11):3753-6.
16. Iizuka N, Najita L, Franzusoff A, Sarnow P. Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from Saccharomyces cerevisiae. Method Mol Cell Biol. 1994;14(11):7322-30.
17. Weber L, Feman E, Baglioni C. Cell free system from HeLa cells active in initiation of protein synthesis. Biochemistry. 1975;14(24):5315-21.
18. Mikami S, Kobayashi T, Yokoyama S, Imataka H. A hybridoma-based in vitro translation system that

efficiently synthesizes glycoproteins. J Biotechnol. 2006;127(1):65-78.
19. Swartz J. Developing cell-free biology for industrial applications. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2006;33(7):476-85.
20. Baneyx F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr Opin Biotech. 1999;10(5):411-21.
21. Wong MS, Wu S, Causey TB, Bennett GN, San K-Y. Reduction of acetate accumulation in Escherichia coli cultures for increased recombinant protein production. Metab Eng. 2008;10(2):97-108.
22. Mergulhao F, Summers D, Monteiro G. Recombinant protein secretion in Escherichia coli. Biotechnol Adv. 2005;23(3):177-202.
23. Daly R, Hearn MT. Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. J Mol Recognit. 2005;18(2):119-38.
24. Jung E, Williams KL. Theproduction of recombinant glycoproteins with special reference to simple eukaryotesincluding Dictyostelium discoideum. Biotechnol Appl Bioc. 1997;25(1):3-8.
25. Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in Pichia pastoris. Mol Biotechnol. 2000;16(1):23-52.
26. Rai M, Padh H. Expression systems for production of heterologous proteins. Current Science Bangalore. 2001;80(9):1121-8.
27. Van Hartingsveldt W, Mattern IE, van Zeijl CM, Pouwels PH, van den Hondel CA. Development of a homologous transformation system for Aspergillus niger based on the pyrG gene. Mol Gen Gent. 1987;206(1):71-5.
28. Sharma R, Katoch M, Srivastava P, Qazi G. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. World J Microb Biot. 2009;25(12):2083-94.
29. Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. Trends Biotechnol. 2002;20(5):200-6.
30. Nevalainen KH, Te'o VS, Bergquist PL. Heterologous protein expression in filamentous fungi. Trends Biotechnol. 2005;23(9):468-74.
31. Davoudi N, Attarpour Yazdi MM, Hemmati A, Soltaninejad H. Development of expression constructs for production of human recombinant IFNγ in Leishmania tarentolae. Daneshvar. 2012;19(100):21-8.
32. Breitling R. The LEXSY platform for recombinant protein expression.Farm animal proteomics: Springer; 2013. p. 45-8.
33. Clayton C, Häusler T, Blattner J. Protein trafficking in kinetoplastid protozoa. Microbiol Rev. 1995;59(3):325-44.
34. 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.
35. Tobin JF, Reiner S, Hatam F, Zheng S, Leptak C, Wirth D, et al. Transfected Leishmania expressing biologically active IFN-gamma. J Immunol. 1993;150(11):5059-69.
36. Basak A, Shervani NJ, Mbikay M, Kolajova M. Recombinant proprotein convertase 4 (PC4) from Leishmania tarentolae expression system: purification, biochemical study and inhibitor design. Protein Expres Purif. 2008;60(2):117-26.
37. Phan H-P, Sugino M, Niimi T. The production of recombinant human laminin-332 in a Leishmania tarentolae expression system. Protein Expres Purif. 2009;68(1):79-84.
38. Hemayatkar M, Mahboudi F, Majidzadeh-A K, Davami F, Vaziri B, Barkhordari F, et al. Increased expression of recombinant human tissue plasminogen activator in Leishmania tarentolae. J Biotechnol. 2010;5(11):1198-206.
39. Pirdel L, Hosseini AZ, Kazemi B, Rasouli M, Bandehpour M, Soudi S. Cloning and Expression of Leishmania infantum LPG3 Gene by the Lizard Leishmania Expression System. Avicenna journal of medical biotechnology. 2012;4(4):186.
40. Swiech K, Picanço-Castro V, Covas DT. Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. Protein Expres Purif. 2012;84(1):147-53.
41. Bernard A, Kost T, Overton L, Cavegn C, Young J, Bertrand M, et al. Recombinant protein expression in aDrosophila cell line: comparison with the baculovirus system. Cytotechnology. 1994;15(1-3):139-44.
42. Kim KR, Kim YK, Cha HJ. Recombinant baculovirus-based multiple protein expression platform for Drosophila S2 cell culture. J Biotechnol. 2008;133(1):116-22.
43. King L. The baculovirus expression system: a laboratory guide: Springer Science & Business Media; 2012.
44. Luckow VA, Summers MD. Trends in the development of baculovirus expression vectors. Nat Biotechnol. 1988;6(1):47-55.
45. Summers M, Vail P. Baculoviruses for insect pest control, safety considerations. 1975.
46. Kost TA, Condreay JP. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. Curr Opin Biotech. 1999;10(5):428-33.

47. Li T, Yang C-T, Jin D, Stafford DW. Identification of a Drosophila vitamin K-dependent γ-glutamyl carboxylase. J Biol Chem. 2000;275(24):18291-6.
48. Schneider I. Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster. J Embryol Exp Morph. 1972;27(2):353-65.
49. Adriaan de Jongh W, Salgueiro S, Dyring C. The use of Drosophila S2 cells in R&D and bioprocessing. Pharmaceutical Bioprocessing. 2013;1(2):197-213.
50. Jorge SA, Santos AS, Spina Â, Pereira CA. Expression of the hepatitis B virus surface antigen in Drosophila S2 cells. Cytotechnology. 2008;57(1):51-9.
51. Vatandoost J, Zomorodipour A. Optimization of transfection and stable expression of human factor IX in Drosophila S2 cells. Journal of cellular and molecular research. 2015;27(4):598-610.
52. Olsen MK, Rockenbach SK, Fischer HD, Hoogerheide JG, Tomich C-SC. Stable production of an analog of human tissue plasminogen activator from culturedDrosophila cells. Cytotechnology. 1992;10(2):157-67.
53. Li B, Tsing S, Kosaka A, Nguyen B, Osen E, Bach C, et al. Expression of human dopamine beta-hydroxylase in Drosophila Schneider 2 cells. Biochem J. 1996;313:57-64.
54. Johanson K, Appelbaum E, Doyle M, Hensley P, Zhao B, Abdel-Meguid SS, et al. Binding Interactions of Human Interleukin 5 with Its Receptor α Subunit large scale production, structural, and functional studies of drosophila-expressed recombinant proteins. J biol chem. 1995;270(16):9459-71.
55. Moraes AM, Jorge SA, Astray RM, Suazo CA, Riquelme CEC, Augusto EF, et al. Drosophila melanogaster S2 cells for expression of heterologous genes: from gene cloning to bioprocess development. Biotechnol Adv. 2012;30(3):613-28.
56. Nilsen SL, Castellino FJ. Expression of Human Plasminogen in Drosophila Schneider S2 Cells. Protein Expres Purif. 1999;16(1):136-43.
57. Towers PR, Sattelle DB. A Drosophila melanogaster cell line (S2) facilitates post-genome functional analysis of receptors and ion channels. Bioessays. 2002;24(11):1066-73.
58. Brillet K, Pereira CA, Wagner R. Expression of membrane proteins in Drosophila Melanogaster S2 cells: Production and analysis of a EGFP-fused G protein-coupled receptor as a model.Heterologous Expression of Membrane Proteins: Springer; 2010. p. 119-33.
59. Lemos MAN, dos Santos AS, Astray RM, Pereira CA, Jorge SAC. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells. I: Design of expression/selection vectors, subpopulations selection and influence of sodium butyrate and culture medium on protein expression. J Biotechnol. 2009;143(2):103-10.
60. Vatandoost J, Zomorodipour A, Sadeghizadeh M, Aliyari R, Bos MH, Ataei F. Expression of biologically active human clotting factor IX in Drosophila S2 cells: γ-carboxylation of a human vitamin K-dependent protein by the insect enzyme. Biotechnol Progr. 2012;28(1):45-51.
61. Vatandoost J, Fasihfar M. An introduction of candidate substrates for Drosophila Gamma-carboxylase. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2015;21(6):977-85.
62. Lieberman MM, Nerurkar VR, Luo H, Cropp B, Carrion R, de la Garza M, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant subunit West Nile virus vaccine in rhesus monkeys. Clin Vaccine Immunol. 2009;16(9):1332-7.
63. Swiech K, Rossi N, Astray RM, Suazo CA. Enhanced production of recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) by Drosophila melanogaster S2 cells through control of culture conditions. Cytotechnology. 2008;57(1):67-72.
64. Wang L, Hu H, Yang J, Wang F, Kaisermayer C, Zhou P. High yield of human monoclonal antibody produced by stably transfected Drosophila schneider 2 cells in perfusion culture using wave bioreactor. Mol biotechnol. 2012;52(2):170-9.
65. Kim YK, Kim KR, Kang DG, Jang SY, Kim YH, Cha HJ. Suppression of β-N-acetylglucosaminidase in the N-glycosylation pathway for complex glycoprotein formation in Drosophila S2 cells. Glycobiology. 2009;19(3):301-8.
66. Vatandoost J, Khalili L. Glycosylation Engineering of Human Recombinant Proteins in New S2 System. Journal of Knowledge & Health. 2015;10(3):45-52.

Original Article

Study o of recombinant protein expressionsystems, introduction of S2 cellsas anefficient expression system

Jafar Vatandoost
Assistant professor, Department of Biology, Hakim Sabzevari University, Sabzevar

Shokoofeh Hassanabadi
Msc student, Department of Biology, Hakim Sabzevari University, Sabzevar

Received:04/09/2015**, Revised:**27/10/2015**, Accepted:**21/12/2015

Corresponding author:
Jafar Vatandoost,
Hakim Sabzevari University,
Sabzevar , Iran
E-mail: j.vatan@hsu.ac.ir

Abstract

Nowadays by genetic engineering, recombinant proteins can be produced massively in response to demands of industry. Proteins can be expressed in various expression systems and according to the protein type, the expression system can be cell free system, prokaryotic or eukaryotic-based system. For production of pharmaceutical proteins in most cases post-translational modifications are necessary and mammalian expression systems are the first choice in this regard. However, due to their problems in high production of recombinant proteins, insect expression systems can be an alternative suitable to achieve high expression of many recombinant and complex proteins. In recent year, S2 cell line from Drosophila was used as the host for the expression of human and non-human recombinant proteins. This system has the advantages such as high cell density and ability to produce folded recombinant proteins with accurate post-translational modifications, especially gamma carboxylation, provides the potential for application in industrial and commercial area.

Keywords: *Recombinant proteins, Expression systems, S2.*