

Effect of Anti-apoptotic Agents in Recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Expressing Iduronate 2-sulphatase

Ok-Seon Jeon¹, Ju-Me Chun², Seon-Ah Kang¹, Sang-Jong Lee², Gie-Taek Chun³,
Yong-Keun Chang⁴, and Yeon-Ho Jeong¹

¹ Division of Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon, Korea

² STR biotech, Chunchon, Korea

³ Division of Life Science, Kangwon National University, Chunchon, Korea

⁴ Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center, KAIST, Taejeon, Korea

Abstract

The suppression of apoptosis during the cell culture might increase recombinant protein production. In the present study, the effects of anti-apoptotic agents on the apoptosis of recombinant Chinese Hamster Ovary cells and the production of Iduronate 2-sulphatase(IDS) were investigated. Cell density slightly increased when 2 μ M of EGCG and 10 μ g/mL of STR-G were added to culture medium after two days. It was observed that the percentage of apoptotic cells was decreased in the culture with STR-G, and Bcl-2 expression level was enhanced in both culture with STR-G and EGCG. These results suggest that G418 and EGCG are effective anti-apoptotic agents for increasing the productivity of IDS with recombinant CHO-DG44.

서 론

헌터 증후군 또는 Mucopolysaccharidosis type II (MPS II)는 glycosaminoglycans 즉, heparan sulfate와 dermatan sulfate의 분해에 필요한 lysosomal enzyme인 Iduronate 2-sulphatase의 결핍으로 인해 야기되는 퇴행성 질환이다.¹⁾ 최근 치료 및 진단 용 단백질 의약품을 제조하기 위해 CHO cell의 산업적 이용이 상당히 증가되고 있으며, 헌터증후군의 경우에도 예외가 아니어서 본 연구에서는 유전자 재조합 CHO cell을 이용하여 헌터증후군 치료제 IDS를 생산하였다. 헌터증후군 치료제 같은 생물약제의 경제적인 생산을 위해서는 동물 세포 배양 기술의 최적화가 반드시 이루어져야 한다. 생물반응기에서 아미노산, 글루코스, 산소, 혈청고갈, 바이러스 감염, 독소 대사

산물에의 노출과 같은 인자들이 apoptotic cell death를 유도하는 작용을 한다. 많은 연구자들이 CHO cell line이 생물반응기를 이용한 배양과정에서 상당히 많은 apoptosis를 겪을 수 있다고 증명했다.^{2,3)} 생물반응기에서 apoptosis를 억제하여 세포 생존을 증가시킴으로서 단백질의 생산성을 증가시키기 위해 시도된 두 가지 전략은 배지 보충을 통해 외부 환경을 조작하는 것과 유전학적 접근을 사용하여 세포내에 생화학적인 변화를 주는 것이다. 이에 따라 본 연구에서는, anti apoptotic agents로 (주)에스티알바이오텍에서 개발한 STR-G와 항산화제로 널리 알려져 있는 EGCG를 배양하는 동안 첨가하여 세포사멸을 억제함으로써 CHO세포 성장과 IDS생산성을 증진시키고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구를 위한 세포주로는 IDS를 생산하도록 하는 재조합된 CHO 세포가 사용되었고, 기본배지로는 IMDM 배지에 10% FBS, streptomycin sulfate (100 μ g/ml), penicillin G (100units/ml), 10mM sodium bicarbonate를 첨가하여 사용하였고, 본 세포주는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건의 humidified CO₂ incubator에서 배양 유지되었다. Anti-apoptotic agent의 영향을 조사하기 위해 배양하는 동안 STR-G(0~50 μ g/mL)와 EGCG(0~5 μ M)를 농도별로 첨가하였고, apoptotic cell percentage와 Bcl-expression level을 flow cytometry를 통해 분석하였다. 이때 IDS생산성은 western blot과 image analyzer를 사용하여 확인하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1과 2는 EGCG와 STR-G를 농도별로 첨가하여 세포 성장에 미치는 영향을 조사한 그림이다. 그 결과, 2 μ M EGCG, 10 μ g/mL의 STR-G 농도에서 세포 밀도가 증가됨을 확인하였다. 효과를 나타낸 각각의 농도로 EGCG와 STR-G를 배양 2일째에 첨가하여 세포 사멸의 억제 효과를 조사하였고 그 결과를 Fig.3에 나타내었다. EGCG를 첨가한 것은 'control'과 별다른 차이를 보이지 않았지만, STR-G를 첨가한 것은 apoptotic cell percentage가 감소되었음이 확인되었다. Fig. 3 실험에서의 배양 4일째 세포를 사용하여 Bcl-2 expression level을 확인해본 결과 Fig. 4에서 보는 것과 같이 control보다 약간은 더 높은 수준으로 발현되는 것을 볼 수 있었다. 한편 Fig.5에서는 western blot 분석으로 얻어진 결과를 image analyzer를 사용하여 IDS의 상대적인 생산성을 비교하였다. 배양 4일째에 STR-G를 첨가한 것은 control 보다 2.2배, EGCG를

첨가한 것은 2배의 생산성을 보여주었다.

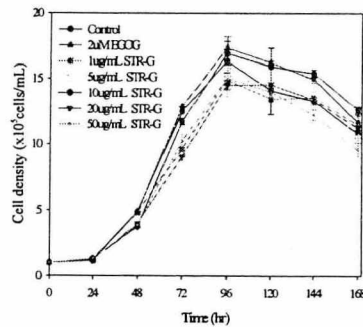
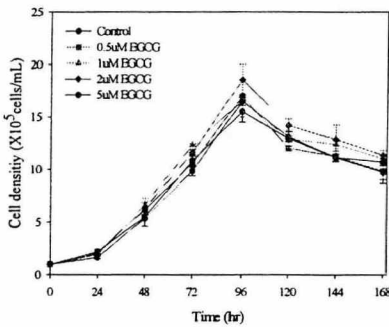


Fig.1. Effect of EGCG during the culture at various concentrations. Fig.2. Effect of STR-G during the culture at various concentrations.

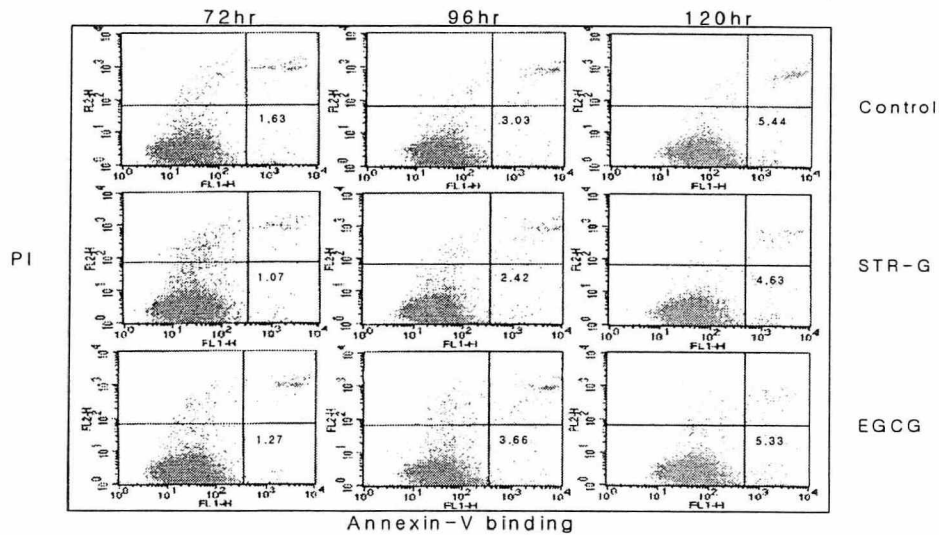


Fig.3. Contour diagram of FITC-Annexin V/PI flow cytometry

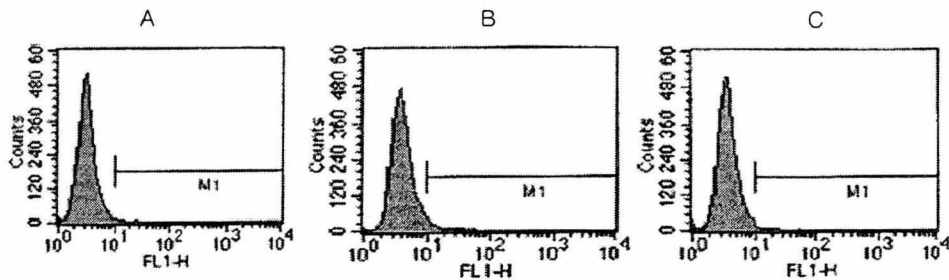


Fig. 4. Flow cytometric analysis of Bcl-2 expression in culture on day 4. Dead cells and debris were removed from the analysis by gating on the viable population in a forward scatter against side-scatter scatter-plot. The x-axes represent the Bcl-2-FITC fluorescence, y-axes represent cell number. A) control B) 10µg/mL STR-G C) 2µM EGCG

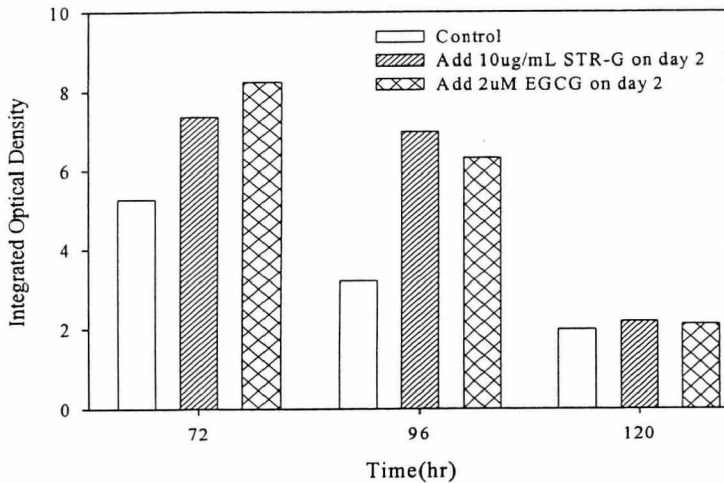


Fig.5. Comparison of Integrated Optical Density unit.

요 약

본 연구에서는 세포 사멸을 억제시켜 재조합 단백질의 생산을 향상시키기 위한 전략을 개발하기 위해, 우선 STR-G와 EGCG를 농도별로 첨가하여 세포 성장, 사멸 그리고 IDS 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. Flow cytometry 분석 결과, STR-G에 의한 apoptotic cell percentage의 감소, STR-G와 EGCG에 의한 bcl-2 expression level의 증가와 IDS 생산성의 증가를 확인하였다.

References

1. Kirsten M. Timms, Marie-Louise Bondeson(1997), Molecular and phenotypic variation in patients with severe Hunter syndrome. *Human Molecular Genetics*, 6:479-486.
2. Moore A, Mercer J, Dutina G, Donahue CJ(1997), Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch culture. *Cytotechnology*, 23:47-54.
3. Simpson NH, Singh RP, Perani A, Goldenzon C, Al-Rubeai M(1998), In hybridoma cultures, deprivation of any single amino acid leads to the induction of apoptosis, which is suppressed by the bcl-2 gene. *Biotechnol. Bioeng.*, 59:90-98.