

Effect of Sodium Butyrate on the Production of IDS by CHO-DG44 Cell

Ok-Seon Jeon, Seon-Ah Kang, Myoung-Hwa Kim, Yeon-Ho Jeong

Division of Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701

Abstract

Mammalian cell culture in the presence of sodium butyrate has been shown to enhance protein biosynthesis. In the present study, the effect of sodium butyrate on growth of recombinant Chinese Hamster Ovary cells and on the production of Iduronate 2-sulphatase were investigated in serum-containing and serum-free media. The culture with addition of 0-5mM sodium butyrate showed enhancement of both intracellular and extracellular IDS production. But, Cell death was observed in a dose-dependent manner. The optimal sodium butyrate concentration was observed to be 5mM. Also, The relative productivity of IDS was significantly increased when sodium butyrate was added to medium at 48 hour, the rapid growth phase. These results suggest that sodium butyrate are efficient agent for increasing the productivity of IDS with recombinant CHO cells.

서 론

헌터 증후군 또는 Mucopolysaccharidosis type II (MPS II)는 glycosaminoglycans 즉, heparan sulfate와 dermatan sulfate의 분해에 필요한 lysosomal enzyme인 Iduronate 2-sulphatase(IDS)의 결핍으로 인해 야기되는 선천성 퇴행성 질환이다.¹⁾ 유전적으로 결핍된 IDS를 헌터증후군 환자에게 공급하기 위해 본 연구에서는 유전자 재조합 CHO cell을 이용하여 헌터증후군 치료제 IDS를 생산하였다. CHO cell 배양에서 재조합 단백질의 생산성을 향상시키기 위한 여러 가지 방법이 개발되고 있으며, 그 중의 하나는 sodium butyrate를 배양에 첨가하는 것이다. Sodium butyrate는 histone의 hyperacetylation과 dephosphorylation을 유도하여 단백질의 발현을 증가시킨다고 알려져 있으며, 그 결과 동물세포배양에서의 단백질 생산성을 향상시켰다고 보고되었다.^{2,3)} 본 연구에서는 혈청이 첨가되거나 첨가되지 않은 배지에서 재조합 Chinese Hamster Ovary(CHO) cell의 성장과 Iduronate 2-sulphatase 생산성에 sodium

butyrate의 첨가가 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

본 연구를 위한 세포주로 IDS의 유전자가 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 유지되었다. 무혈청 배지는 DMEM 배지에 r-insuline, soy hydrolysate, yeastolate, ferric citrate, sodium selenite, ethanolamine을 첨가하여 배양하였다. Sodium butyrate는 1M stock을 만든 후 배양 배지에 0-5mM 농도가 되도록 첨가하였다. 세포의 생존률은 trypan blue exclusion method를 이용하여 hemocytometer로 측정하였다. 배양중의 세포 생산성은 western blot과 image analyzer를 이용하여 분석하였다.

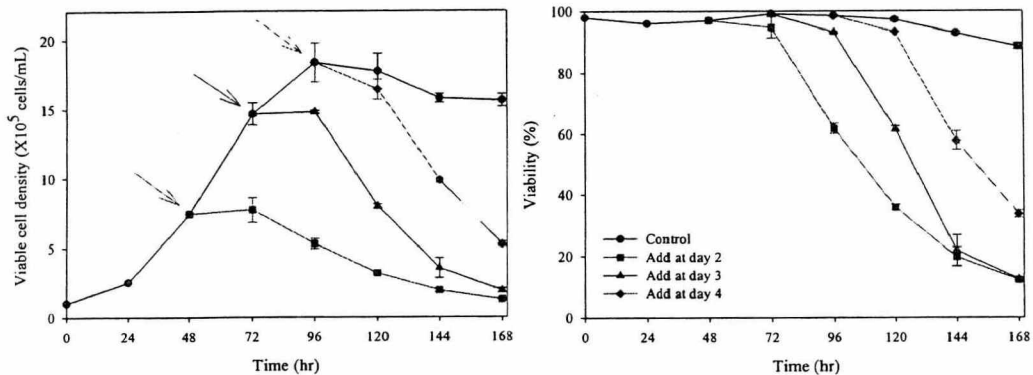


Fig.1. Effect of sodium butyrate on cell growth and viability.

결과 및 고찰

Fig. 1은 혈청이 첨가된 배지에 sodium butyrate(NaBu)를 5mM 농도로 배양 2, 3 그리고 4일째에 첨가하여 배양한 결과이다. NaBu를 첨가한 지 24시간이 지난 후에 세포 농도와 생존률이 감소됨을 확인할 수 있었다. Fig. 2는 Fig.1의 실험 결과에서 얻어진 세포와 배지 상등액을 취하여 western blot을 통해 생산성을 확인해 본 것이다. 그 결과, 비록 세포 농도와 생존률이 일반 배양에 비해 많이 감소하였지만, 배양 2일째에 NaBu를 첨가했을 때 세포와 배양 배지에서 높은 생산성을 나타냄을 확인하였다. Fig.3과 4는 실험실에서 개발한 무혈청 배지에서 NaBu를 농도별, 시간

별로 첨가하여 배양한 결과이다. 배양 2일째에 첨가했을 때 농도 의존적으로 세포 농도와 생존률이 감소되었지만 혈청이 첨가된 배지에서와 마찬가지로 5mM 농도로 첨가했을 때 생산성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 배양 3일째에 NaBu를 첨가하였을 때에는 세포 농도와 생존률에 커다란 영향을 미치지 않는 않지만 western blot 분석 결과 생산성은 증가되는 것을 확인하였다.

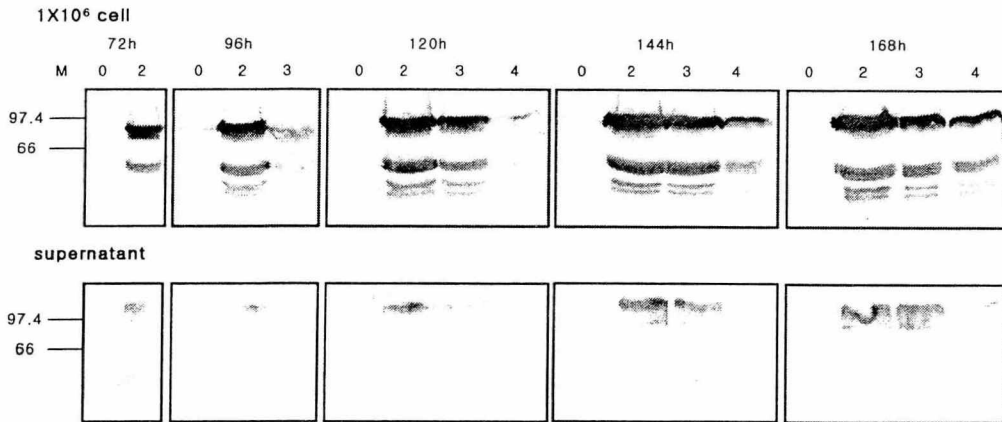


Fig.2. Comparison of IDS expression levels determined by western blotting.

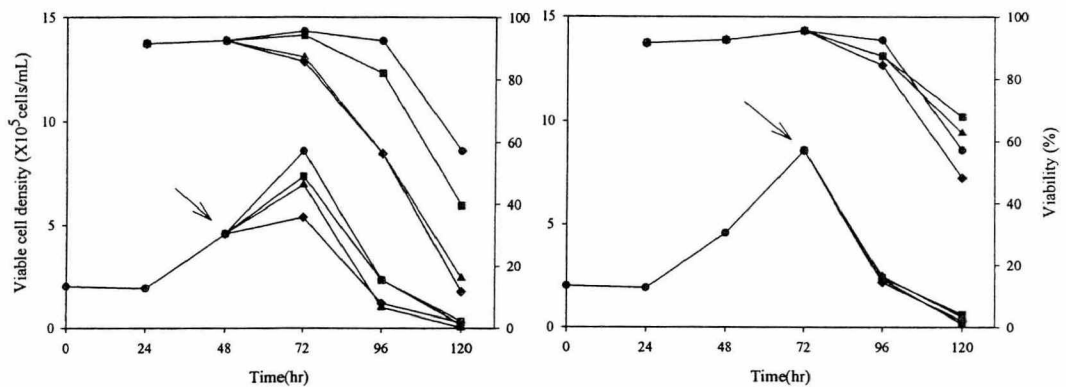


Fig.3. Effect of sodium butyrate on cell growth and viability. Symbol: ●, 0mM NaBu; ■, 1mM NaBu; ▲, 2mM NaBu; ◆, 5mM NaBu

요 약

본 연구에서는 재조합 단백질 IDS의 생산성을 향상시키기 위한 방법으로 혈청이 첨가되거나 첨가되지 않은 배지에서 세포를 배양하는 동안 sodium butyrate를 첨가하였다. 두 배양 배지에서 모두 비록 세포 농도나 생존률이 감소되긴 했지만 생산성에서 상당히 높은 효과를 보였다.

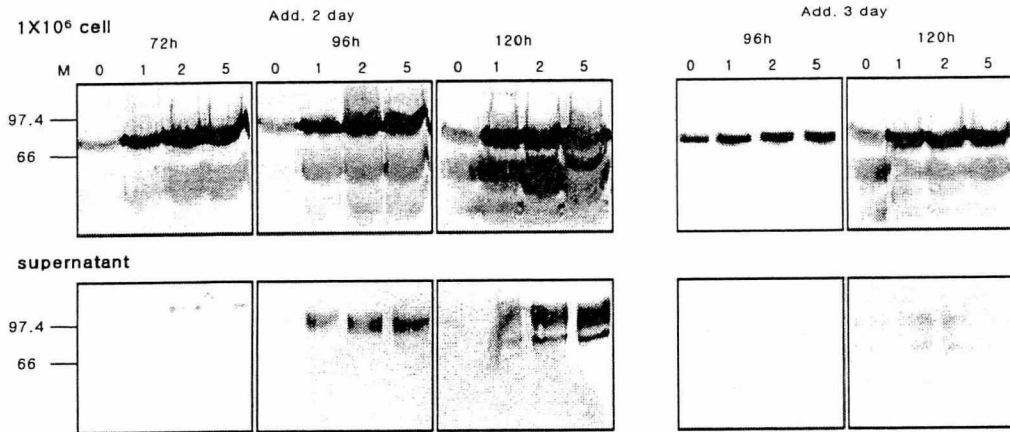


Fig.4. Comparison of IDS expression levels determined by western blotting.

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. J. Werenne, V. Hendrick, P. Winnepenninckx(2001) Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator(t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis. *Cytotechnology*. 36:71-83.
3. Yusuke Mimura, John Lund(2001) Butyrate increases production of human chimeric IgG in CHO-K1 cells whilst maintaining function and glycoform profile. *Journal of Immunological Methods*. 247:205-216.