

信号肽对肝细胞生长因子HGF在 CHO中表达及分泌的影响

徐栋生 陈 蕴 金 坚*

(江南大学药学院, 药物设计及药理实验室, 无锡 214122)

摘要 该研究旨在筛选不同的分泌型信号肽以提高肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)在中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell, CHO)中的表达。通过PCR方法将5种不同的分泌型信号肽代替HGF自身信号肽, 分别构建了表达质粒并转化哺乳动物细胞CHO, 挑选高表达克隆。采用qPCR方法检测表达过程中HGF转录水平差异, Western blot检测CHO培养基中HGF的累积差异, 犬肾细胞(Madin-Daby canine kidney cells, MDCK cells)离散实验初步验证HGF的活性。研究结果表明, 不同的分泌型信号肽对CHO表达HGF过程中的转录水平没有影响, 但明显改变HGF在培养基中的累积, 对分泌的HGF活性没有影响。综上所述, 合适的分泌型信号肽促进CHO分泌外源蛋白质。

关键词 信号肽; 肝细胞生长因子; 转录; 基因表达; 蛋白质分泌

Effect of Signal Peptide on the Expression and Secretion of Hepatocyte Growth Factor in CHO

Xu Dongsheng, Chen Yun, Jin Jian*

(Laboratory of Drug Design and Molecular Pharmacology, School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the improvement of hepatocyte growth factor (HGF) expression by screening secretory signal peptides in Chinese hamster ovary cell (CHO). In the experiments, the signal peptide of HGF itself were replaced by 5 different secreted signal peptides respectively by PCR method, then five plasmids containing different signal peptides were constructed and transformed into mammalian cell CHO, and HGF expressing CHO cells were identified. During the expression process, the mRNA levels of HGF were detected by qPCR and the cumulative HGF proteins in medium were evaluated by Western blot. Besides, Madin-Daby canine kidney (MDCK) cells scattering experiment was used to verify the biological activity of HGF. The results showed that during the expression process, secretory signal peptides had little effect on HGF transcriptional level and biological activity of HGF, but had changed the accumulation of HGF significantly in culture medium. In summary, the suitable secretory signal peptide promotes the secretion of foreign protein in CHO.

Keywords signal peptide; hepatocyte growth factor; transcription; gene expression; protein secretion

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF), 是一种具有抗纤维化潜力的细胞因子, 最初

从肝切除大鼠血液中分离得来, 是刺激肝细胞分裂的最强细胞因子^[1]。作为一种多功能生长因子,

收稿日期: 2016-07-19

接受日期: 2016-10-28

国家高技术研究发展计划(863计划)(批准号: 2014AA021003)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0510-85918219, E-mail: jinjian31@163.com

Received: July 19, 2016

Accepted: October 28, 2016

This work was supported by the National High Technology Research and Development Programs (863 Program) (Grant No.2014AA021003)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85918219, E-mail: jinjian31@163.com

网络出版时间: 2016-12-20 16:08:37

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161220.1608.010.html>

HGF主要由肝脏的非实质细胞生成,它不仅能够刺激肝细胞DNA合成,还参与多种细胞的增殖、迁移和形态发生,对多种成熟的器官/组织有修复作用^[2]。HGF作用于酪氨酸蛋白激酶受体c-Met,与c-Met结合后,催化c-Met发生自身磷酸化,磷酸化后其酪氨酸激酶活性增强,导致多种底物蛋白如PLC- γ (phospholipase C- γ)、PI3-K(phosphatidylinositol 3-kinase)、Grb2(growth factor receptor-bound protein 2)、Gab1(Grb2 associated binding protein 1)、STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)和SHP2(SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 2)等的酪氨酸残基磷酸化。这些底物蛋白质经不同的信号通路发挥多种生物学活性,如细胞增殖、血管生成、细胞迁移和细胞凋亡等^[3]。

中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell, CHO)表达系统是目前最常用、工业化生产最成功的哺乳动物细胞表达系统,是表达药用生物活性大分子的首选。CHO的最大优点是表达的外源蛋白质经过一系列的加工修饰,与天然的蛋白质分子非常接近。目前,CHO中有些外源蛋白质(如抗体)的表达水平可以达到g/L的级别,但很多蛋白质(细胞因子类)表达量相对较低。提高外源蛋白质的表达水平是减少生产成本的一个重要手段,分泌表达是CHO细胞表达基因工程重组蛋白的主要表达途径,在外源基因转录水平达到瓶颈时,提高细胞分泌能力明显有助于重组蛋白表达量的提升^[4]。

CHO细胞表达外源蛋白质过程中,mRNA翻译形成的蛋白质前体N-端的信号肽与信号肽识别因子(signal recognition particle, SRP)结合,在信号肽识别因子的帮助下进入内质网进行下一步的修饰,不能进入内质网的前体蛋白在胞质区非正确折叠后被降解^[5]。合适的信号肽有助于重组蛋白表达量的提高。本研究在已报道的基础上,选取5种在CHO中高

效表达的信号肽^[6-8],分别介导外源蛋白HGF的高效表达。通过高通量筛选法分别获得HGF表达量较高的5种工程细胞株,并对工程细胞株进行悬浮驯化培养。在此基础上,通过比较5种工程细胞株在悬浮培养条件下的生长代谢差异、培养过程中的转录水平差异、培养基中HGF累积水平差异,验证5种信号肽促进CHO细胞分泌表达外源蛋白质的功能,并为其其他外源蛋白质表达提供可行的新方向。

1 材料与方法

1.1 材料

pMH3载体及CHO细胞来自杭州安瑞普生物制品有限公司;限制性核酸内切酶、T4 DNA连接酶等购自Fermentas公司;质粒提取试剂盒和PCR产物纯化试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司,引物也在生工合成;DMEM/F12培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、DMEM培养基购自Gibco公司;人HGF抗体(ab24865)购自Abcam公司;人HGF捕获抗体(MAB694)与检测抗体(BAF294)购自R&D公司;HGF拮抗性抗体由曹博良工程师(Boint Biotech公司)赠送;Trizol、逆转录试剂盒、定量PCR试剂购自TaKaRa公司;无血清培养基B001与补料培养基F001来自杭州安瑞普生物制品有限公司。

1.2 pMH3-HGF 真核表达载体的构建

pMH3表达载体具有GC-rich高效表达核心技术(WO2008/091276),外源基因两端的高GC含量区使目的基因一直处于转录活跃状态,不受整合位置影响,持续高效转录,有助于大幅提高目的蛋白质的表达量。表1是从已报道文献中选取高效表达外源蛋白质的5种分泌型信号肽序列。采用PCR的方法将5种不同的分泌型信号肽代替HGF本身的信号肽(引物序列见表2),在上下游引物的5'端分别插入EcoR I和Not I限制性核酸内切酶位点,用T4连接酶

表1 信号肽的氨基酸序列及来源

Table 1 The amino acid sequence of signal peptide and its organism

信号肽来源 Origin of signal peptide	信号肽序列 Amino acid sequence	信号肽所属物种 Organism
Gaussia luciferase	MGVKVLFALICIAVAEA	Gaussia
Human trypsinogen-2	MNLLLILTFVAAAVA	Homo sapiens
Oikosin 1 mutant	MLLSALLLGLAFGYS	Oikopleura dioica
Azurocidin preproprotein	MTRLTVLALLAGLLASSRA	Homo sapiens
Ig kappa	METDTLLLWVLLWVPGSTG	Mus musculus

表2 带信号肽的PCR引物
Table 2 PCR primer with signal peptide

引物 Primers	引物序列(5'→3') Sequences (5'→3')
Gaussia luciferase-F	GCG AAT TCC ACC ATG GGT GTT AAA GTT CTG TTC GCA CTG ATA TGT ATA GCA GTG GCA GAA GCA CAA AGG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAT GAA TTC AA
Human trypsinogen-2-F	GCG AAT TCC ACC ATG AAT CTG CTG CTC ATA CTG ACT TTC GTA GCT GCT GCA GTA GCA CAA AGG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAT GAA TTC AA
Oikosin 1 mutant-F	GCG AAT TCC ACC ATG CTG CTG CTC TCA GCT CTG CTG CTC GGA CTG GCT TTC GGT TAT AGC CAA AGG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAT GAA TTC AA
Azurocidin preproprotein-F	GCG AAT TCC ACC ATG ACA AGA CTG ACA GTA CTA GCT CTG CTC GCT GGT CTG CTC GCT TCC TCC AGA GCT CAA AGG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAT GAA TTC AA
Ig kappa-F	GCG AAT TCC ACC ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT CAA AGG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAT GAA TTC AA
Reverse	AGC GGC CGC CTA TGA CTG TGG TAC CTT ATA TGT TAA AAT AA

将PCR酶切产物与pMH3酶切载体连接, 转化大肠杆菌DH5 α , 经氨苄青霉素抗性筛选出的阳性克隆, 送上海生工测序。提取5种测序正确的重组质粒, 用作后续电转实验。

1.3 重组质粒转染CHO细胞

采用电穿孔法将5种含不同信号肽的重组质粒转染CHO细胞。电转染条件: 3×10^6 细胞, 20 μg 重组质粒, 5 μg 鲑鱼精DNA, 200 μL 体积; 400 V 40 μs , 电击3次, 间隔1 min, 电击前后及间隔时间内细胞处于冰浴环境中。

1.4 稳定高表达克隆株筛选

电转染后细胞加入10 mL含10% FBS的DMEM/F12培养基, 培养9 cm细胞培养皿中, 24 h后换液, 添加G418至终浓度300 mg/L。G418压力筛选3~4 d, 换新鲜培养基。3~5 d后将长出的单克隆用10 μL 的移液器轻轻划动吸出, 转入96孔板中培养。培养7 d后, 每孔换100 μL 无血清培养基表达24~48 h。上清液以ELISA和Western blot筛选出高表达HGF的CHO细胞克隆, 转入24孔细胞培养板内进行亚克隆, 重复一轮筛选, 进一步确定最终获得稳定高表达HGF的CHO细胞株。

1.4 CHO细胞的悬浮驯化及流加培养

本研究采用的CHO细胞株适应无血清悬浮培养, 将含10% FBS的DMEM/F12培养基中贴壁培养的CHO细胞进行胰酶消化, 制成单细胞悬液后接种于三角瓶中进行悬浮培养。接种密度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$, 培养基为基础悬浮培养基B001, 补加次黄嘌呤(H)、胸腺嘧啶脱氧核苷(T)及胰岛素样生长因子(IGF)。37 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min悬浮培养3~5 d, 扩增至3 L(工作体积0.5~1 L)玻璃锥底摇瓶中流加培养; 接种密度为

$2 \times 10^6/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$, 100 r/min培养2 d, 培养温度降到34 $^{\circ}\text{C}$, 每天补加适量培养基F001控制培养基中的葡萄糖浓度处于2.0~3.0 mg/L。台盼蓝染色检测细胞活性, 6~8 d后收集培养基上清。

1.5 96孔板培养上清液HGF鉴定

1.5.1 ELISA鉴定 以人HGF捕获抗体(MAB694)包被ELISA板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; PBST洗3次, 10 min/次, 5% BSA封闭, 37 $^{\circ}\text{C}$, 2 h; PBST洗3次, 10 min/次, 每孔各加入50 μL 96孔板中培养的细胞克隆表达液上清, 37 $^{\circ}\text{C}$, 孵育2 h; PBST洗3次, 10 min/次, 加入人HGF检测抗体(BAF294)37 $^{\circ}\text{C}$, 孵育2 h; PBST洗3次, 10 min/次, 加入100 μL TMB显色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色10 min, 加入50 μL 10%浓硫酸终止反应, 在酶标仪上以450 nm波长检测结果。

1.5.2 Western blot鉴定 挑选ELISA吸收值较高的表达克隆, 进一步进行Western blot鉴定。15 μL 表达上清液经SDS-PAGE电转移于PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 加入人HGF抗体(ab24865), 室温孵育2 h; TBST洗3次, 10 min/次, 加入HRP标记的山羊抗兔二抗, 室温孵育1 h; TBST洗3次, 10 min/次, 膜上滴加适量ECL显色液显色。

1.6 mRNA水平与蛋白质表达水平差异检测

5种带不同信号肽细胞株流加表达过程中, 分别取1、3、5 d的细胞(数量约为 8×10^6), 以Trizol法提取总RNA, 通过cDNA合成试剂盒以总RNA为模板获得cDNA。人HGF基因的mRNA水平通过qPCR的方法来分析(SYBR green, TaKaRa公司), 培养基中累积的HGF蛋白质以Western blot(实验方法类似1.5.2)来分析。

1.7 HGF蛋白质活性检测

HGF的活性通过犬肾细胞(MDCK cells)的离散实验进行鉴定^[9]。简言之,通过含10% FBS的DMEM培养基以 1×10^5 /mL的密度铺MDCK细胞于24孔板,37 °C培养2 h,吸取上清。每孔添加300 μ L含10% FBS的DMEM与10 μ L HGF表达培养基,37 °C过夜培养,显微镜下观察细胞的离散状态。测活实验以空白培养基为阴性对照组,购自R&D公司的HGF为阳性对照组,不同信号肽介导表达的HGF为实验组。

1.8 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异采用*t*检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CHO细胞的转染、稳定表达细胞株的筛选

CHO细胞经电击法转染重组质粒,300 mg/L G418抗性筛选4 d,没有G418抗性的细胞大量死亡,换新鲜无抗培养基,5 d后形成克隆细胞团。将抗性克隆细胞团移入96孔板内,待细胞大致长满后收集表达上清,上清液中检测HGF蛋白质分泌量。分别挑选6株ELISA检测吸收值最高克隆,结果如图1A显示,96孔板内Gaussia luciferase与Human trypsinogen-2

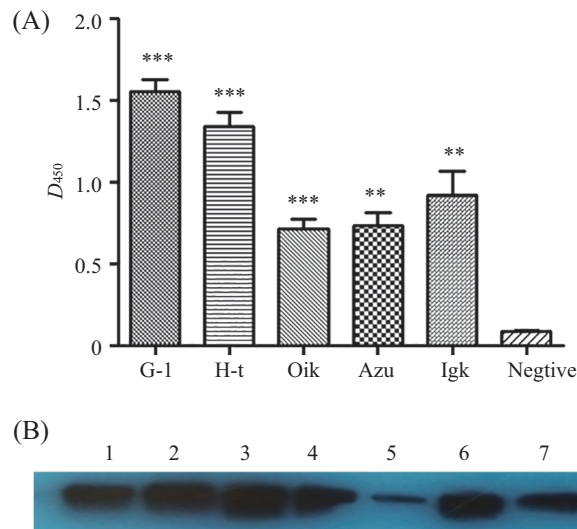
信号肽介导的HGF表达量明显高于其他3种信号肽的表达,具显著性差异。将挑选出的克隆表达上清进一步进行Western blot检测,图1B显示的是6株Gaussia luciferase信号肽表达上清的检测结果。剔除Western blot检测表达量最低的1~3株克隆,如图1B显示的5号、7号克隆,其余细胞株(1、2、4、6号)通过极限稀释法单克隆化,单细胞来源的克隆经过再一轮的筛选后挑选3~5株悬浮驯化并冻存,选1株生长状态良好的工程细胞株扩大培养。其他4种信号肽单细胞来源的克隆筛选类似Gaussia luciferase信号肽。

2.2 CHO细胞的补料分批培养

挑选出的5种带不同信号肽的工程细胞株,扩大培养后接种于3 L锥底摇瓶。细胞密度经过24 h培养后倍增,在第3 d达到峰值,维持在 8×10^6 /mL,细胞活率始终保持在95%以上(图2)。在CHO细胞补料分批培养过程中,携带不同信号肽CHO细胞株的生长状态与细胞活率没有统计学差异。

2.3 CHO细胞补料分批表达过程中转录水平差异

为了探究流加表达过程中各工程细胞株之间人HGF基因转录水平上的差异,我们分别提取了补料分批表达过程中1、3、5、7 d细胞的总RNA,荧



A: 96孔板表达液中ELISA检测吸收值最高的6~8个结果; G-1: Gaussia luciferase信号肽; H-t: human trypsinogen-2信号肽; Oik: oikosin 1 mutant信号肽; Azu: azurocidin preproprotein信号肽; Igk: Ig kappa信号肽. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, 与阴性对照组相比较。B: gaussia luciferase信号肽表达HGF的Western blot检测, 挑选1、2、4、6号高表达克隆。

A: the high 6~8 absorption value samples of expression HGF by ELISA detection; G-1: Gaussia luciferase signal peptide; H-t: human trypsinogen-2 signal peptide; Oik: oikosin 1 mutant signal peptide; Azu: azurocidin preproprotein signal peptide; Igk: Ig kappa signal peptide. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ compared with negtive group. B: Western blot detection of HGF expression of Gaussia luciferase signal peptid, selected of high expression clones of number 1, 2, 4 and 6.

图1 稳定高表达HGF的细胞株筛选

Fig.1 Selection of cell clones expressing stable HGF with high yields

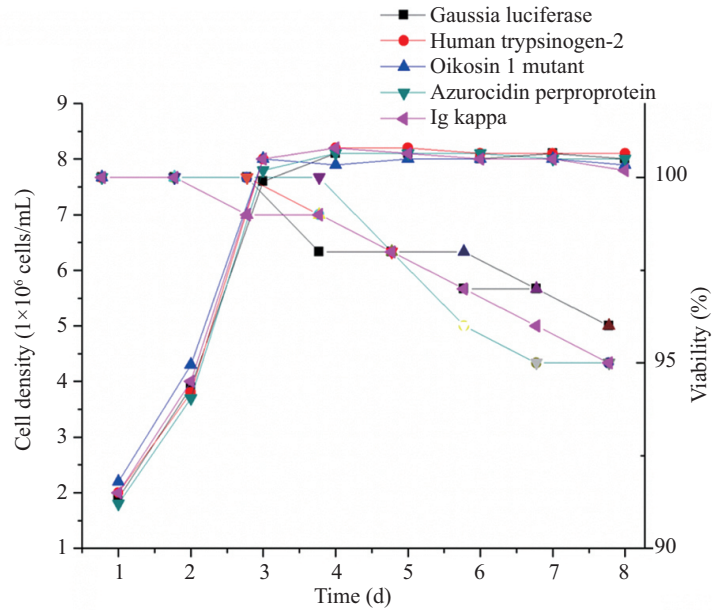


图2 补料分批培养过程中细胞生长曲线

Fig.2 Cell growth in serum-free suspension fed-batch culture

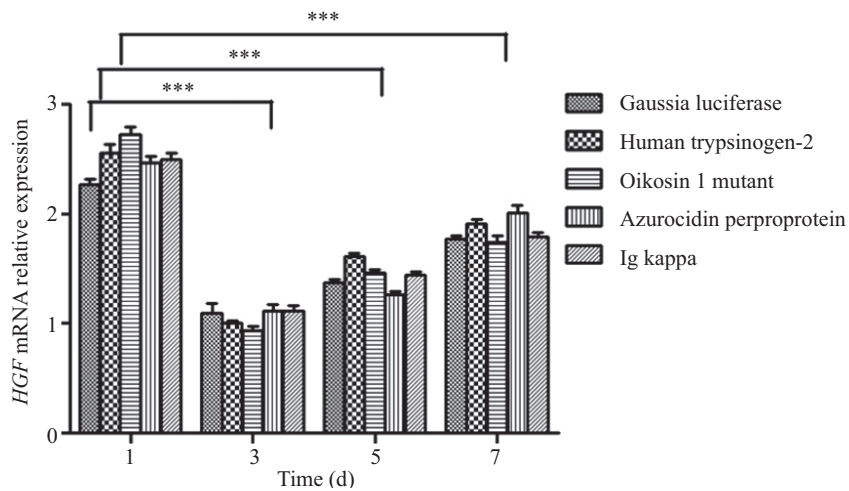
*** $P < 0.001$.

图3 qPCR检测补料分批培养过程中HGF基因转录水平差异

Fig.3 The difference of HGF gene transcriptional level in fed batch culture by qPCR

光定量PCR检测结果显示: *HGF*基因的mRNA含量在整个表达过程中先降低再增加, 差异极显著; 在同一时间点, 携带不同信号肽的*HGF*基因之间转录水平没有显著差异(图3)。

2.4 不同信号肽介导的HGF蛋白质水平差异

表达过程结束后, 取培养基上清, Western blot检测不同培养基之间HGF蛋白质水平差异。Gaussia luciferase信号肽介导的HGF蛋白质水平明显高于其他4种(图4), 图中2条带分别是HGF蛋白质(75 kDa)与HGF- α 片段(60 kDa)。在转录水平没有明显差异的情况下, 说明Gaussia luciferase信号肽在CHO表达后有很强的外源蛋白质分泌能力。

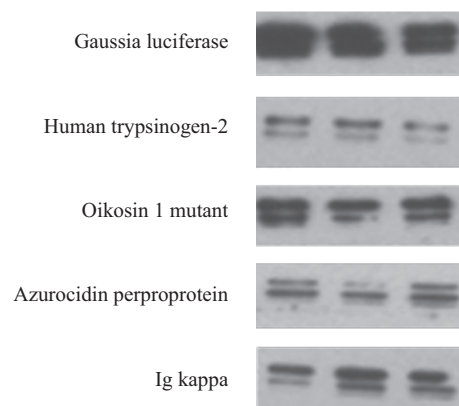
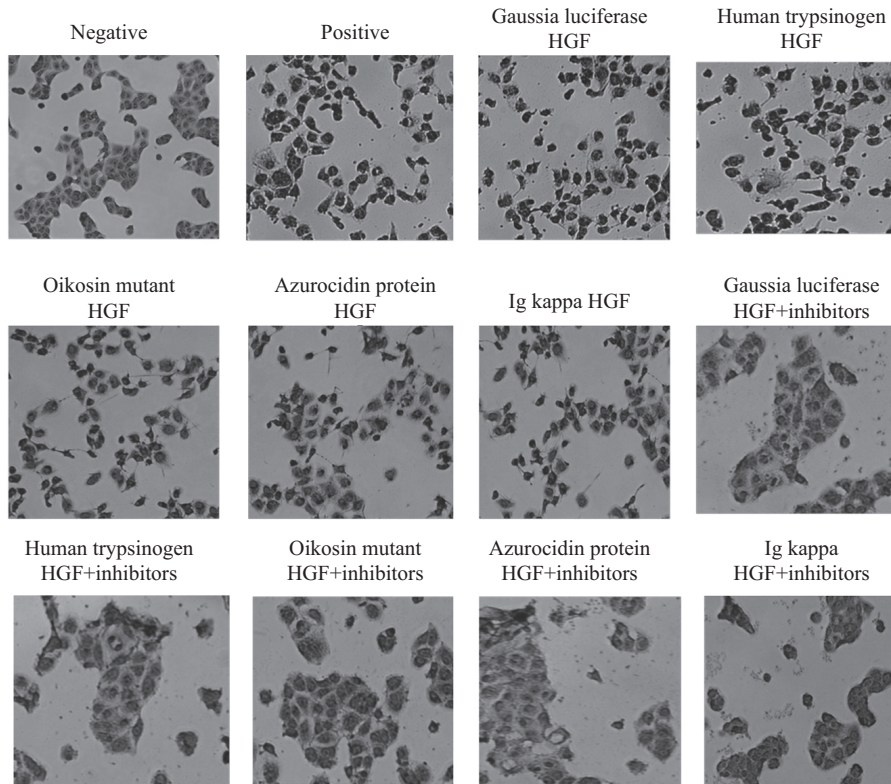


图4 Western blot检测不同信号肽介导HGF蛋白质水平差异
Fig.4 Western blot analysis for differences of HGF protein levels mediated by different signal peptide



Negative: 空培养基; Positive: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HGF (R&D); Inhibitors: HGF特异性拮抗性抗体。

Negative: culture medium B001; Positive: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HGF from R&D; Inhibitors: HGF specific antagonist antibodies.

图5 不同来源HGF蛋白质活性检测(400 \times)

Fig.5 Biological activity assay of HGF protein from different medium (400 \times)

2.5 CHO表达HGF活性检测

HGF可以诱导MDCK细胞之间的黏连蛋白减少, 促进成簇状生长的MDCK细胞分散。我们以MDCK细胞的离散实验验证HGF的生物学活性。如图5所示, 5种信号肽介导表达的HGF均可以刺激MDCK细胞分散, 并且生物学活性可以被HGF特异性拮抗性抗体抑制, 说明信号肽对外源蛋白质的生物学活性没有影响。

3 讨论

CHO细胞表达系统是目前最常用、工业化生产最成功的哺乳动物细胞表达系统, 是表达药用生物活性大分子的首选^[10]。CHO细胞与其他表达系统相比具有如下优点: (1)类似于其他哺乳动物细胞, 具有准确的转录后修饰功能, 表达的蛋白质最接近于天然蛋白质分子; (2)可以大规模发酵培养, 利于工业化生产; (3)CHO细胞传递人源病毒的概率很低; (4)外源基因在CHO基因组上整合稳定, 利于外源基因高效扩增和表达; (5)筛选工业生产的细胞株较容易。美国食品药品监督管理局(Food and Drug

Administration, FDA)于2010年批准CHO表达蛋白质可以直接入药, 近年来, CHO高效表达外源蛋白质及工业化生产越来越受到重视。

CHO中有些外源蛋白质(如抗体)的表达水平可以达到g/L的级别, 但很多蛋白质(细胞因子类等)表达量相对较低。分泌表达是真核细胞表达基因工程重组蛋白的主要表达途径, 在外源基因转录水平达到瓶颈时, 提高外源蛋白质的分泌能力有助于重组蛋白质表达量的提升。信号肽序列通常位于分泌蛋白质的N-端, 引导新生多肽链穿过内质网膜进入内质网腔内, 然后信号肽序列被内质网腔内的信号肽酶水解切除, 同时启动新生多肽链的后续折叠与修饰, 最终形成分泌至胞外的功能性蛋白质。尽管信号肽与不同蛋白质间存在着一定的适配性问题^[11], 信号肽序列在不同蛋白质之间可以通用, 筛选具有相对实用性广和高效率引导蛋白质分泌表达的信号肽序列是CHO细胞外源表达优化的关键策略之一。据已有报道, 选择不同的信号肽可以明显改善CHO中蛋白质的分泌^[12]。Zhang等^[13]观察到, 通过增加IL-2信号肽的碱度和疏水性可以提高碱性磷酸酶和内皮抑素的表

达量至3.5倍。CHO表达外源蛋白质过程中分泌型信号肽的选择明显有助于重组蛋白表达量的提升。

信号肽是位于蛋白N-端的一小段氨基酸序列,通常20~50个氨基酸,这一小段序列包含大量的信息包括靶向途径的选择、蛋白质易位出膜效率、信号肽降解的时间点以及对后续折叠加工的影响^[14]。因此,信号肽序列在调节蛋白质的生物合成的过程中有重要作用。信号肽序列影响外源蛋白质在CHO中表达主要概括有以下几点:(1)高效率信号肽容易与信号肽识别因子结合,进而进入内质网完成后续的加工修饰,而低效率信号肽导致一部分蛋白质无法进入内质网,在胞质内被聚集降解^[5];(2)信号肽影响外源蛋白质易位出膜效率,低效率的信号肽影响成熟蛋白质易位出细胞膜,导致一部分蛋白质成跨膜或胞质蛋白质,降低蛋白质分泌效率^[15];(3)信号肽序列影响蛋白质的后续加工修饰如糖基化进而降低蛋白质合成效率^[16];(4)信号肽剪切降解效率,不合理的信号肽序列一旦延迟剪切,无疑影响蛋白质后续加工及分泌表达^[17]。

根据已报道的文献,本研究挑选了5种CHO表达过程中具高效分泌能力的信号肽,其中Ig kappa信号肽是CHO表达常用信号肽^[18]。信号肽序列辅助翻译的前体蛋白质进入内质网,蛋白质进入内质网中信号肽被切割,蛋白质分子进行加工修饰,成熟的蛋白质中不包含信号肽序列。信号肽对CHO细胞的生长状态、生长活率与外源基因的转录几乎没有影响,却明显改变了外源蛋白质在培养基中的分泌表达。文献的报道结果中,Gaussia luciferase信号肽具有很强的分泌外源蛋白能力^[8]。本研究结果与文献类似,Gaussia luciferase信号肽介导HGF的表达效果最好,为其他外源基因在CHO表达过程中信号肽选择提供了良好的借鉴。

参考文献 (References)

- 1 Sakata H, Takayama H, Sharp R, Rubin JS, Merlino G, LaRochelle WJ. Hepatocyte growth factor scatter factor overexpression induces growth, abnormal development, and tumor formation in transgenic mouse livers. *Cell Growth Differ* 1996; 7(11): 1513-23.
- 2 Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 1: 188-202.
- 3 Petrini I. Biology of MET: A double life between normal tissue

- repair and tumor progression. *Ann Transl Med* 2015; 3(6): 82-9.
- 4 刘毅华, 童梅, 刘金毅, 徐晨. 基于SM蛋白的CHO细胞分泌工程化改造和抗体表达的研究. *中国医药生物技术(Liu Yihua, Tong Mei, Liu Jinyi, Xu Chen. High expression of antibody in secretion engineered CHO cells based on SM protein. Chin Med Biotechnol)* 2014; 9(4): 260-7.
- 5 Fourn VL, Girod PA, Buceta M, Regamey A, Mermod N. CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion. *Metab Eng* 2014; 21: 91-102.
- 6 Kober L, Zehe C, Bode J. Optimized signal peptides for the development of high expressing CHO cell lines. *Biotechnol Bioeng* 2013; 110(4): 1164-73.
- 7 Stern B, Optun A, Liesenfeld M, Gey C, Gräfe M, Pryme LF. Enhanced protein synthesis and secretion using a rational signal-peptide library approach as a tailored tool. *BMC Proc* 2011; 5(8): 1-3.
- 8 Stern B, Olsen LC, Tröbe T, Ravneberg H, Pryme LF. Improving mammalian cell factories: the selection of signal peptide has a major impact on recombinant protein synthesis and secretion in mammalian cells. *Trends Cell Mol Biol* 2007; 2: 1-17.
- 9 Park JS, Kim H, Park J, Yu S, Kim D, Lee J, *et al.* Overproduction of recombinant human hepatocyte growth factor in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif* 2010; 70(2): 231-5.
- 10 Cacciatore JJ, Chasin LA, Leonard EF. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. *Biotechnol Adv* 2010; 28(6): 673-81.
- 11 Brockmeier U, Caspers M, Freudl R, Jockwer A, Noll T, Eggert T. Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: A powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in gram-positive bacteria. *J Mol Biol* 2006; 362(3): 393-402.
- 12 Knappskog S, Ravneberg H, Gjerdrum C, Trosse C, Stern B, Pryme IF. The level of synthesis and secretion of Gaussia princeps luciferase in transfected CHO cells is heavily dependent on the choice of signal peptide. *J Biotechnol* 2007; 128(4): 705-15.
- 13 Zhang L, Leng Q, Mixson AJ. Alteration in the IL-2 signal peptide affects secretion of proteins *in vitro* and *in vivo*. *J Gene Med* 2005; 7(3): 354-65.
- 14 Hegde RS, Bernstein HD. The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(10): 563-71.
- 15 Ma J, Wollmann R, Lindquist S. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 2002; 298(5599): 1781-5.
- 16 Rutkowski DT, Ott CM, Polansky JR, Lingappa VR. Signal sequences initiate the pathway of maturation in the endoplasmic reticulum lumen. *J Biol Chem* 2003; 278(32): 30365-72.
- 17 Rane NS, Yonkovich JL, Hegde RS. Protection from cytosolic prion protein toxicity by modulation of protein translocation. *EMBO J* 2004; 23(23): 4550-9.
- 18 Horynová M, Takahashi K, Hall S, Renfrow MB, Novak J, Raška M. Production of N-acetylgalactosaminyl-transferase 2 (GalNAc-T2) fused with secretory signal Ig kappa in insect cells. *Protein Expr Purif* 2012; 81(2): 175-80.