

بیان نو ترکیب پپتید آمیلوئید بتای ۱-۴۲ (A β 1-42) در سیستم باکتریایی

Escherichia coli

پوران بدیری^۱، مجید صادقی زاده^{۲*}، بیژن بمبئی^۳، سیده زهرا بطحائی^۴، مهرناز بحرینی^۵، زرین مینوچهر^{۶*}

۱-دکتری، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲-استاد تمام، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳-استادیار، گروه زیست فناوری سامانه ای، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۴-استاد تمام، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵-کارشناس ارشد، گروه زیست فناوری سامانه ای، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۶-دانشیار، گروه زیست فناوری سامانه ای، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۷۵-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

sadeghma@modares.ac.ir, dr.minuchehr@gmail.com

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۰

دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۸

چکیده

پپتید آمیلوئید بتا (A β) علت اصلی تشکیل پلاک های سمی در بیماران آلزایمری می باشد. به همین علت، مطالعه بر روی این پپتید و شناخت مکانیسم های مولکولی و سلولی مرتبط با آن، در تشخیص و درمان بیماری ضروری است. پژوهش حاضر روشی سریع، آسان و ارزان برای تولید و خالص سازی این پپتید ارائه داده است که بر اساس بیان ژن A β در سیستم باکتریایی است. ژن A β سنتز و به وکتور بیانی pET26b انتقال یافت. پس از القا با لاکتوز و انکوباسیون ۲۴ ساعته برای بیان پپتید، رسوب سلولی حاصل به منظور بررسی و تأیید وجود پپتید نو ترکیب توسط SDS-PAGE و وسترن بلات بررسی شد. سپس خالص سازی پپتید نو ترکیب با روش کروماتوگرافی تمایلی ستون Ni-NTA انجام شد. تعیین ویژگی کشندگی سلولی A β خالص، در غلظت های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار با استفاده از آزمون MTT بر روی رده سلولی مدل آلزایمر (SH-SY5Y) انجام شد. نتایج Colony PCR و تعیین توالی تأیید کننده ورود صحیح قطعه بیان کننده A β به داخل وکتور بیانی می باشد. بررسی طول باندها در SDS PAGE و وسترن بلات، نمایانگر بیان موفقیت آمیز پپتید نو ترکیب حاوی دنباله هیستیدینی می باشد. در نهایت نتیجه آزمون MTT نشان داد که پپتید خالص شده در غلظت های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار، به ترتیب دارای

کشدگی ۳۰ و ۵۰ درصدی است. تولید پپتید آمیلوئید بتا در میزبان‌های باکتریایی بسیار مطلوب به نظر می‌رسد. همچنین به دست آوردن پپتید A β خالص به صورت محلول یک مزیت مهم این پژوهش می‌باشد. با توجه به عملکرد کشدگی پپتید خالص شده، می‌توان از آن برای تیمار سلول‌های مدل و انجام مطالعات پیرامون آلزایمر استفاده کرد.

کلید واژگان: آمیلوئید بتا، پپتید، نو ترکیب، Ni-NTA، وسترن بلات

۱-مقدمه

آمیلوئید بتای ۴۲-۱ (A β 1-42) یک پپتید کوچک چهار کیلودالتونی است که در نتیجه تجزیه پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید توسط آنزیم‌های بتا سكرتاز و گاماسكرتاز در غشاهای نورونی مغز تولید می‌شود [۱]. آمیلوئید بتا در واریانت‌های متنوع دارای باقی‌مانده‌های ۳۶ تا ۴۳ آمینواسیدی وجود دارد. اما علت اصلی تشکیل پلاک‌های سمی آمیلوئیدی در مغز بیماران آلزایمری ایزوفرم آمیلوئید بتای ۴۲ آمینواسیدی می‌باشد [۲]. تجمع خارج سلولی آمیلوئید بتای ۴۲ در مغز به مرور زمان منجر به از دست رفتن عملکرد نورونی و مرگ سلول‌ها و در نهایت از دست دادن حافظه و مهارت‌های شناختی می‌شود. [۳]

بر اساس داده‌های منتشر شده توسط کنفرانس بین‌المللی انجمن آلزایمر، تقریباً ۴۷ میلیون فرد در سراسر دنیا در سال ۲۰۱۶ با بیماری آلزایمر دست و پنجه نرم می‌کردند که پیش‌بینی شده است این آمار هر بیست سال دو برابر شود. [۴] با توجه به اهمیت بالای پپتید آمیلوئید بتا در پاتولوژی بیماری آلزایمر، شناخت مکانیسم‌های مولکولی و سلولی مرتبط با این پپتید، یک نیاز ضروری در تشخیص و درمان بیماری می‌باشد.

سنتز شیمیایی واریانت‌های مختلف آمیلوئید بتا هم‌اکنون در دنیا به صورت روتین انجام می‌شود و محققان این عرصه معمولاً از فرم سنتتیک که به طور تجاری در دسترس می‌باشد در آزمایشات خود استفاده می‌کنند که تولید آن به دلیل نیاز به تجهیزات پیشرفته و همچنین هیدروفوبیسیت

بالای این پپتید، بسیار پرهزینه می‌باشد [۵]. همچنین، ثابت شده است که توالی C ترمینال پپتید آمیلوئید بتا، در سنتز شیمیایی به روش فاز جامد مشکل‌ساز و مقاوم بوده و باعث ناکارآمدی پروسه سنتز می‌شود [۶]. از سوی دیگر، وجود ناخالصی‌های به وجود آمده در طی تولید آمیلوئید بتای سنتتیک باعث تجمع مولکولی بیشتر و کاهش نورو توكسیسیتی در مقایسه با فرم نو ترکیب می‌شود [۷]. تولید نو ترکیب پپتید آمیلوئید بتا نه تنها ارزان‌تر و راحت‌تر می‌باشد بلکه تحقیقات ثابت کرده‌اند که فرم نو ترکیب برای مطالعه ویژگی‌های بیوشیمیایی و بیولوژیکی مناسب‌تر می‌باشد [۵]. لازم به ذکر است تولید فرم سنتتیک پپتید به دلیل طولانی بودن توالی و در دسترس نبودن امکانات مقتضی، همواره با چالش‌های فراوانی روبه‌رو بوده است و تحقیقات کنونی با استفاده از نمونه‌های وارداتی گران قیمت انجام می‌شود.

تاکنون راهبردهای مختلفی در سراسر دنیا برای تولید نو ترکیب آمیلوئید بتا به کار گرفته شده است که در نوع واریانت، میزبان بیانی، نوع وکتور، محیط کشت به کار گرفته شده، نحوه القای بیان، نوع پروتئین متصل و روش خالص‌سازی با یکدیگر متفاوت هستند [۸]. در یک مطالعه، بیان و خالص‌سازی پپتید آمیلوئید بتا از باکتری *E. coli* با استفاده از پروتئین‌های ترکیبی با IFABP^۱ انجام شده است. وکتور مورد استفاده در این پژوهش pQE-80L بود و خالص‌سازی توسط ستون Ni-NTA و روش HPLC انجام شده است [۹]. در پژوهشی دیگر، روشی با کارآمدی

^۱ His-tagged intestinal fatty acid binding protein

نسبت سایر مطالعات تولید آمیلوئید بتا خود یک مزیت به حساب می آید.

۲- مواد و روش ها

۲-۱ تهیه سازه بیانی نو ترکیب pET26b-Aβ

سازه ژنی حاوی DNA بیان کننده آمیلوئید بتا به همراه توالی کد کننده دزباله آمینی His-Tag، برای کدون های متناسب *E. coli* بهینه سازی و توسط کمپانی ProteoGenix فرانسه سنتز شد و سپس در داخل وکتور pUC57-Aβ کلون شد. قطعه ۵۰۰ کیلوبازی محتوی ناحیه کد کننده ژن با آنزیم های محدود کننده *NdeI* و *Sall* برش و با کیت استخراج از ژل GeneAII کره از روی ژل آگارز بازآوری شد. این قطعه طی یک واکنش الحاق^{۱۶} ساعته و در دمای ۱۶ درجه سانتی گراد با پلاسمید بیانی pET26b تلفیق شد. سازه بیانی نو ترکیب (pET26b-Aβ) به سلول های مستعد سویه *DH5α* باکتری *E. coli* ترانسفورم شد. سپس، تأیید کلونی های حاوی ژن بتا آمیلوئید با روش Colony PCR توسط پرایمرهای T7 universal انجام شد. همچنین، برای تأیید نهایی ورود قطعه به داخل وکتور بیانی، پلاسمید استخراج شده از سویه *DH5α* در کمپانی Microsynth سوئیس به روش سنگر تعیین توالی شد.

۲-۲ بیان پپتید نو ترکیب آمیلوئید بتا

در مرحله بعد سازه نو ترکیب pET26b-Aβ به شیوه شوک دمایی به سلول های مستعد سویه *BL21(DE3)* باکتری *E. coli* ترانسفورم و سو سپانسیون باکتریایی بر روی محیط LB Agar حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین رشد داده شد. تک کلون نو ترکیب پس از یک پیش کشت ۱۶ ساعته به ۵۰ میلی لیتر محیط LB تازه تلقیح شد و در انکوباتور شیکر دار ۱۸۰ دور بر دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تا رسیدن به OD600 برابر ۰٫۵-۰٫۶، بار دیگر کشت داده شد. القای بیان با لاکتوز با غلظت نهایی ۱۵ میلی مولار انجام شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از القا، محیط حاوی

بالا برای بیان Aβ 1-42 ارائه شده است که بر اساس الحاق DNA کد کننده پپتید به داخل وکتور بیانی pMAL بوده است. همچنین، خالص سازی با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی و سپس، کروماتوگرافی بر اساس سایز (SEC) انجام شده است و در نهایت مقدار ۱۸ میلی گرم پپتید نو ترکیب به ازاء هر لیتر محیط کشت به دست آمده است [۴]. مطالعه دیگری با بیان پپتید آمیلوئید بتای ۴۲ آمینو اسیدی برچسب شده با توالی هیستیدینی در وکتور pET22b و سویه *BL21* باکتری *E. coli* انجام شده است که نشان دهنده سطح بیان تقریباً مناسبی (۲۳ میلی گرم بر لیتر محیط کشت) می باشد [۸]. اگرچه، پیش تر روش های متنوعی برای تولید انواع مختلف آمیلوئید بتای نو ترکیب ارائه شده است، القای بیان با استفاده از لاکتوز در پلاسمید بیانی pET26b برای اولین بار در این پژوهش استفاده شده است. در پژوهش حاضر تلاش شده است یک روش سریع، در دسترس و ارزان برای تولید و خالص سازی پپتید آمیلوئید بتا ارائه شود. چرا که در مطالعات قبلی بیشتر برای خالص سازی در ستون از نمونه رسوب سونیکیت شده پس از بیان پپتید استفاده شده است که با توجه به نیاز به مراحل فراوری بیشتر برای محلول سازی کامل پپتید های موجود در inclusion body ها و نیاز به غنی سازی محلول های خالص سازی با ترکیبات نمکی مانند اوره، پروسه خالص سازی را مستلزم به صرف زمان و مواد بیشتر می کند. همچنین، وجود ترکیبات نمکی مضاعف، از جمله اوره در پروسه محلول سازی پپتید و انجام مراحل خالص سازی، منجر به از بین رفتن بیشتر ساختار مولکولی پایدار پپتید و در نتیجه کاهش عملکرد سیتوتوکسیک آن می شود. لازم به ذکر است با توجه به کمتر بودن مقدار پپتید در سوپ نمونه سونیکیت شده نسبت به رسوب دربردارنده inclusion body ها، به دست آوردن مقادیر مساوی یا بیشتر از پپتید در این مطالعه به

^۱ ligation

پپتید تولید شده، سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی به دست آمده، در ۵ میلی لیتر بافر لیز^۳ (کلرید سدیم ۳۰۰ میلی مولار، مونو سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار، ایمیدازول ۱۰ میلی مولار و $\text{pH}=8$) حل شد و برای لیز سلولی و محلول سازی پروتئین های رسوب یافته ۱۰ دقیقه در دستگاه Ultrasonic Processor Hielscher ساخت کشور آلمان سونیکیت شد.

۳-۲ آنالیز SDS PAGE

محلول پس از سونیکیت به مدت ۴۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار ۱۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و سوپرناتانت و رسوب به طور جداگانه برای بررسی وجود پپتید مورد نظر بررسی شد. به این صورت که، مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه به همراه ۱۰ میکرولیتر سمپل بافر^۴ (برومو فنول بلو، SDS، ۲-مرکاپتواتانول، گلیسرول، بافر تریس ۱ مولار) به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. سپس، بر روی ژل SDS-PAGE با ۱۶ درصد آکریل آمید به مدت دو ساعت و با ولتاژ ۱۵۰ ولت الکتروفورز شد. برای افزایش دقت، ظاهر سازی باندهای پروتئینی جدا شده بر اساس اندازه، به روش رنگ آمیزی نیترا ت نقره انجام شد.

۴-۲ آزمون وسترن بلات

برای تأیید قطعی بیان پپتید نو ترکیب، آزمون وسترن بلات به روش semi-dry با استفاده از آنتی بادی ضد His-tag گرفته شده از سرم خون خرگوش انجام شد.

۵-۲ خالص سازی پپتید نو ترکیب با روش کروماتوگرافی

تمایلی نیکل کلراید

خالص سازی پپتید نو ترکیب، با کمک برجسب هسیتیدینی و با روش کروماتوگرافی تمایلی نیکل کلراید^۵ انجام شد. برای حفظ ساختار اصلی و عملکرد پپتید، از بافرهای خالص سازی فاقد اوره و با ایمیدازول با غلظت های

معین استفاده شد. ستون، پیش از خالص سازی با ۲۰ میلی مولار کلرید نیکل ۱۰۰ میلی مولار و ۲۰ میلی لیتر بافر اتصال^۶ (کلرید سدیم ۳۰۰ میلی مولار، مونو سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار، ایمیدازول ۱۰ میلی مولار و $\text{pH}=8$) شارژ شد و مقدار ۵ میلی لیتر نمونه سوپرناتانت سونیکیت از ستون کروماتوگرافی عبور داده شد. برای حذف پپتیدهای غیراختصاصی، ستون به ترتیب با ۳۰ و ۵۰ میلی لیتر از دو بافر شستشو^۷ با غلظت های بالاتر ایمیدازول (کلرید سدیم ۳۰۰ میلی مولار، مونو سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار، ایمیدازول ۲۰ میلی مولار و $\text{pH}=8$) شستشو داده شد. استخراج پپتید دارای برجسب هسیتیدینی از ستون کروماتوگرافی با مقدار ۱۰ میلی لیتر Elution Buffer (کلرید سدیم ۳۰۰ میلی مولار، مونو سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار، ایمیدازول ۳۰۰ میلی مولار و $\text{pH}=8$) انجام شد. نتیجه خالص سازی بر روی ژل SDS با ۱۶ درصد آکریل آمید مشاهده شد.

۶-۲ تعیین ویژگی کشندگی سلولی با استفاده از آزمون

MTT

پپتید خالص شده برای تغلیظ و حذف نمک ایمیدازول موجود در بافرهای خالص سازی، از فیلتر آمیکون ۳ کیلودالتون عبور داده شد. همچنین، برای حذف آلودگی میکروبی احتمالی، نمونه از فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده شد.

برای بررسی تأثیر کشندگی، از رده سلولی SH-SY5Y استفاده شد که به عنوان مدل سلولی بیماری آلزایمر شناخته می شود. این سلول ها پس از سید شدن در پلیت ۹۶ خانه، به مدت ۱۲ ساعت با پپتید خالص شده در غلظت های ۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار تیمار شد. پس از حذف محیط حاوی تیمار، رنگ تترازولیوم به مدت چهار ساعت با سلول ها مجاور شد. در نهایت کریستال های فرامازون

^۶ Binding Buffer

^۷ Washing Buffer

^۳ Sonication Buffer

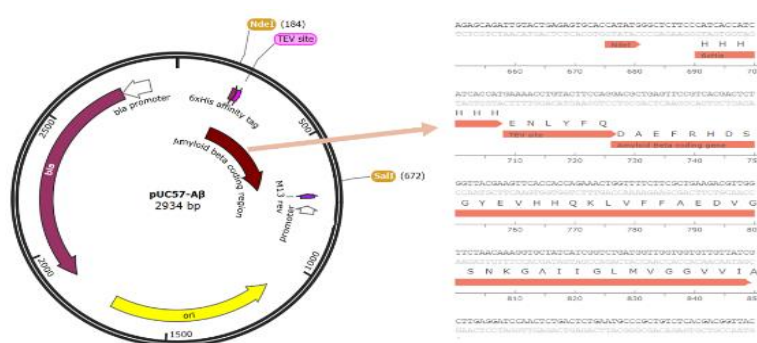
^۴ Sample Buffer

^۵ <https://abtbbeads.com/141-low-pressure-nta-agarose-beads>

چندین بخش اصلی می باشد که جزئیات آن مطابق شکل ۱ می باشد.

٣-نتائج

برای بیان مناسب‌تر، ژن تولید کننده آمیلوئید بتا در قسمت پایین دستی DNA کدکننده دنباله هستیدینی قرار داده شد. همچنین، برای حذف دنباله هستیدینی از پپتید بیان شده در مراحل بعدی، جایگاه برشی آنزیم پروتئاز TEV بین این دو توالی تعبیه شد.

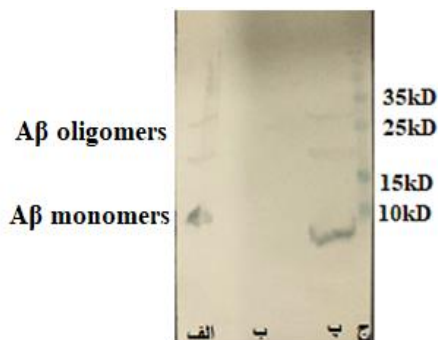


شکل ۱ نقشه شماتیک سازه ژنی طراحی شده حاوی ژن آمیلوئید بتا

آن در شکل ۲ قابل مشاهده است. باند حاوی ناحیه کدکننده آمیلوئید بتا به طول تقریبی ۵۰۰ جفت باز، از روی ژل استخراج شد و به داخل وکتور بیانی pET26 وارد شد که نتایج Colony PCR برای تأیید الحاق صحیح آن در شکل ۳ نشان داده شده است. کلونی کنترل حامل پلاسמיד pET26 غیرنوترکیب، دارای باند حدود ۳۰۰ جفت بازی است که پس از الحاق قطعه حاوی ناحیه کدکننده آمیلوئید بتا، کلونی نوترکیب باند ۷۵۰ جفت بازی را نشان می‌دهند.

همچنین، مشاهده پلاسمید استخراج شده از کلونی‌های وحشی و نو ترکیب بر روی ژل آگارز، تأیید دیگری بر ورود صحیح قطعه مذکور به داخل پلاسمید بیانی می‌باشد. در نهایت با انجام توالی‌یابی سنگر برای پلازمید نو ترکیب و هم‌تاسازی آن با توالی طراحی شده اولیه، تشکیل صحیح سازه بیانی pet26-A β تأیید قطعی شد.

قطعه حاوی His-tag- TEV- A β به روش double digest از بدنه وکتور pUC57-A β جدا شد و محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱ در صد الکتروفورز شد که نتیجه



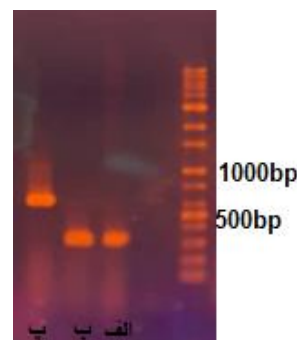
شکل ۵ نتایج آزمون وسترن بلات با آنتی بادی علیه His-tag برای شناسایی پپتید آمیلوئید بتا دارای دنباله هیستیدینی. الف) سوپرناتانت نمونه سونیکیت شده؛ ب) نمونه کنترل منفی فاقد توالی هیستیدینی؛ پ) رسوب نمونه پس از بیان ۲۴ ساعته؛ ج) لدر پروتئینی

۳-۳ آزمون وسترن بلات

نتایج آزمون وسترن بلات برای نمونه بیان پس از ۲۴ ساعت القا با لاکتوز و پس از انجام سونیکیت در شکل ۵ نشان داده شده است. باند کوچکتر مربوط به فرم مونومر و باندهای بالایی احتمالاً مربوط به اشکال الیگومری پپتید آمیلوئید بتای کونژوگه با دنباله هیستیدینی می باشند.

۳-۴ خالص سازی پپتید نو ترکیب با روش کروماتوگرافی تمایلی نیکل کلراید

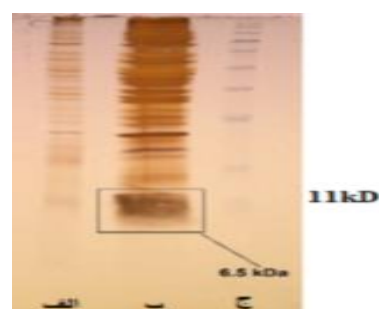
نتایج بار گذاری نمونه پپتید به دست آمده پس از خالص سازی بر روی ژل SDS مطابق شکل ۶ می باشد. پس از انجام مراحل خالص سازی بر روی ژل SDS تنها باند اشکال الیگومری قابل مشاهده است که با نتایج باندهای وسترن بلات متناظر است. پیش تر در مطالعات مشابه، طیف متنوعی از باندها با وزن های مولکولی متفاوت مربوط به فرم های دimer، tetramer، hexamer و بالاتر شناسایی شده است [۱۰-۱۲]. عدم مشاهده باند مونومری پس از خالص سازی می تواند به دلیل پایین بودن غلظت اشکال مونومری باشد. زیرا با گذشت زمان و طی پروسه



شکل ۳ نتیجه colony PCR. الف و ب) باندهای ۳۰۰ جفت بازی مربوط به کلونی های فاقد ژن نو ترکیب؛ پ) باند ۷۵۰ جفت بازی مربوط به کلونی حاوی ژن نو ترکیب آمیلوئید بتا.

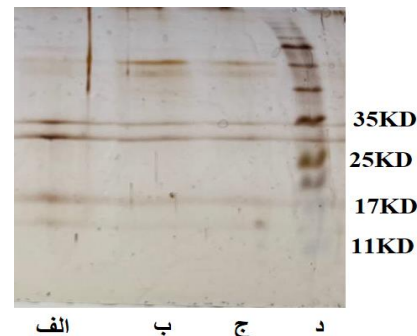
۲-۳ بیان پپتید نو ترکیب آمیلوئید بتا و آنالیز SDS PAGE

وزن مولکولی پیش بینی شده برای پپتید نو ترکیب حاضر با استفاده از ابزارهای *in Silico* از جمله protparam وبسایت Expasy (<https://web.expasy.org/protparam>) ۶,۵ کیلو دالتون می باشد که نتایج برر سی رسوب نمونه ها پس از کشت ۲۴ ساعته و پس از انجام سونیکاسیون، در ژل SDS PAGE نشان دهنده بیان موفق محلول این پپتید می باشد. همانطور که در شکل ۴ دیده می شود، وزن پپتید نو ترکیب در نمونه رسوب بیان پس از ۲۴ ساعت القا با لاکتوز ۶,۵ کیلو دالتون می باشد.



شکل ۴ نتیجه ژل SDS-PAGE بیان پپتید آمیلوئید بتا. الف) نمونه رسوب بیان پیش از القا با لاکتوز؛ ب) نمونه رسوب بیان ۲۴ ساعت پس از القا با لاکتوز؛ ج) لدر پروتئینی.

خالص سازی اشکال مونومری تمایل به اتصال به یکدیگر و تشکیل تجمعات مولکولی بزرگتر دارند.



شکل ۶ نتایج خالص سازی بر روی ژل SDS-PAGE.. الف تا

ج (پپتید خالص شده؛ د) لدر پروتئینی

۳-۵ تعیین ویژگی کشندگی سلولی با استفاده از آزمون

MTT

پس از تیمار سلول های مدل SH-SY5Y با پپتید خالص شده به مدت ۱۲ ساعت، میزان کشندگی در غلظت های ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر در مقایسه با غلظت ۰ میکرومولار پپتید مذکور، به ترتیب ۳۰ و ۵۰ درصد به دست آمد.

۴-بحث

کلونینگ و بیان پپتید نو ترکیب آمیلوئید بتا قبلاً به روش های گوناگون و در میزبان های پروکاریوتی و یوکاریوتی متنوعی انجام شده است [۴، ۵، ۷، ۱۳-۱۶]. بهره گیری از سیستم های پروکاریوتی برای بیان پپتیدها و پروتئین های ساده یوکاریوتی، به دلیل آسان تر و ارزان تر بودن همواره مورد استقبال بوده است. به ویژه، از آنجا که پپتید آمیلوئید بتا نیاز به انجام مودیفیکاسیون های پس از ترجمه، مانند گلیکوزیلاسیون ندارد، تولید این پپتید در میزبان های باکتریایی بسیار مطلوب به نظر می رساند.

در مطالعات مختلف سازه های ژنی به اشکال مختلف بسته به گونه پپتید آمیلوئید بتای نو ترکیب بیان شده، نوع برچسب استفاده شده برای خالص سازی و نحوه جداسازی این دنباله از پپتید اصلی طراحی شده اند. در طراحی سازه ژنی پژوهش حاضر، توالی کدکننده پپتید آمیلوئید بتای ۱-

۴۲ (Aβ 42) انتخاب شده است که در بین تمامی گونه های آمیلوئید بتا، مهم ترین عامل تشکیل تجمعات سمی و دارای بیشترین اثرات کشندگی می باشد. همچنین، توالی کدکننده پپتید از لحاظ درصد GC و استفاده از کدون های اختصاصی مختص باکتری *E. coli*، بررسی و بهینه سازی شده است که بیان پپتید را در سیستم پروکاریوتی کارآمدتر کند.

در مطالعه حاضر، برای اولین بار از وکتور بیانی pET26b برای تولید پپتید آمیلوئید بتا در سویه BL21(DE3) باکتری *E. coli* استفاده شد. پیش تر پلاسמיד های بیانی، مانند، pET28a، pET22b، pGEX، pMAL، pET14b و pET31b و غیره نیز برای بیان انواع مختلف آمیلوئید بتا استفاده شده اند [۱۷-۲۰]. برای القای رونویسی و انجام ترجمه این پپتید در مطالعات پیشین غالباً از القاگر IPTG در غلظت های مختلف برای به راه انداختن اپرون Lac استفاده شده است. اما در مطالعه حاضر القا با لاکتوز و در غلظت ۱۵ میلی مولار انجام شده است که می توان عنوان کرد با میزان آمیلوئید بتای به دست آمده پس از بیان و خالص سازی مرتبط است. همچنین، در گذشته علاوه بر باکتری *E. coli*، میزبان های پروکاریوتی و یوکاریوتی دیگری، مانند *Pichia pastoris* نیز برای تولید پپتید آمیلوئید بتا استفاده شده اند. با این حال به نظر می رسد انتخاب سویه BL21(DE3) باکتری *E. coli* به دلیل ویژگی تخریب پروتئازی کمتر، برای تولید این پپتید کوچک کاملاً مناسب است [۲۱].

در نتایج به دست آمده از وبسایت Expasy که یک ابزار محاسباتی قدرتمند برای محاسبه پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیکی مختلف پروتئین بر اساس توالی آمینواسیدی وارد شده می باشد، وزن مولکولی پیشنهاد شده برای پپتید نو ترکیب همراه با ضمایم برچسب هیستیدینی و جایگاه برشی آنزیم TEV، ۶،۵ کیلودالتون بوده است که این نتایج در بررسی های PAGE SDS و وسترن بلات کاملاً مشهود

است. نتایج آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی اختصاصی ضد His-tag علاوه بر باند ۶,۵ کیلودالتونی مربوط به فرم مونومر چندین باند بزرگتر را نشان داد که احتمالاً مربوط به تجمعات بزرگتر (اشکال الیگومری) پپتید آمیلوئید بتای کونژوگه با دنباله هیستیدینی می باشد. پس از انجام مراحل خالص سازی باند اشکال مونومری بر روی ژل SDS قابل مشاهده نمی باشد و تنها باند مربوط به تجمعات سمی بزرگتر قابل رؤیت است که از لحاظ وزن مولکولی در تطابق با نتایج باندهای وسترن بلات می باشد. در تأیید این موضوع لازم به ذکر است پیش تر نیز در مطالعات مشابه، طیف متنوعی از باندها با وزن های مولکولی متفاوت مربوط به فرم های دیمر، تترامر، هگزامر و بالاتر شناسایی و گزارش شده است [۱۰-۱۲]. به عنوان مثال، یک مطالعه الیگومر های آمیلوئید بتا را در چندین ساینز مختلف، طی بازه های زمانی متفاوت انکوباسیون بر روی ژل SDS-PAGE نشان داده است [۲۲]. در پژوهش دیگری نیز نشان داده شد که آمیلوئید بتای ۴۰ و ۴۲ آمینواسیدی می توانند به اشکال مختلف تحت پروسه الیگومریزاسیون قرار گرفته و بر روی ژل SDS-PAGE باندهایی با طول متفاوت به نمایش بگذارند [۲۳]. همچنین، عدم مشاهده باند مونومری در این مطالعه پس از خالص سازی می تواند به دلیل پایین بودن غلظت اشکال مونومری باشد. از سوی دیگر، با توجه به ماهیت داینامیک این مولکول ها و تغییر بافرها و شرایط انکوباسیون دمایی و نوسانات pH، احتمال تغییر اشکال مونومری و تمایل به اتصال به یکدیگر و تشکیل تجمعات مولکولی بزرگتر با گذشت زمان وجود دارد.

خالص سازی پپتید آمیلوئید بتای نوترکیب به روش های مختلف انجام شده است [۴، ۵، ۸، ۱۳-۱۵]. تفاوت اساسی پژوهش های مختلف بهره گیری از راهبردهای

متفاوت برای خالص سازی آمیلوئید بتای نوترکیب است. از جمله روش های تخلیص می توان به کروماتوگرافی تعویض یونی و نشاندار کردن پپتید با استفاده از رنگ maleimide، کروماتوگرافی میل ترکیبی با برچسب های GST^۱، IMAC^۲ و MBP^۳ [۴]، یا کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالای فاز معکوس^۴ [۱۶] اشاره کرد. روش انتخابی مطالعه حاضر برای خالص سازی، کروماتوگرافی تمایلی ستون Ni-NTA و با برچسب His-tag بوده که روشی در دسترس و آسان می باشد و در تعداد زیادی از موارد تولید و خالص سازی پپتید آمیلوئید بتا به طور موفقیت آمیز به کار گرفته شده است [۹، ۱۳، ۲۴].

پپتید آمیلوئید بتا به دلیل میل ترکیبی شدید به تشکیل تجمعات الیگومری و فیبریلی، معمولاً به صورت inclusion body قابل دستیابی است. علی رغم این، در مطالعه کنونی اشکال الیگومر کوچکتر در فرم محلول به دست آمد که ممکن است به دلیل توالی هیستیدینی اضافه شده به ساختار آن باشد. علاوه بر وجود پپتید در فرم غیرمحلول و در رسوب سونیکیت شده که نیاز به مراحل پیچیده تر خالص سازی دارد، حضور این پپتید در فرم محلول (سوپ سونیکیت) خود مزیتی است که امکان خالص سازی با ترکیبات بدون اوره را فراهم می کند. خالص سازی بدون نیاز به اوره، احتمال تغییر ماهیت و عملکرد پروتئین ها را تا حدود زیادی کاهش می دهد. بدیهی است در هر حال نقش توالی هیستیدینی اضافه شده در تغییر ساختار مولکولی و عملکرد پپتید نوترکیب تولید شده، نیازمند بحث و بررسی بیشتری می باشد. البته تعبیه سایت برشی آنزیم پروتئاز TEV در سازه طراحی شده، امکان حذف توالی شش آمینواسیدی و خالص سازی پپتید فاقد برچسب هیستیدینی را فراهم آورده است که در ادامه

³ Maltose Binding Protein⁴ Reverse phase HPLC¹ Glutathione S-transferase² Immobilized Metal Affinity Chromatography

مطالعات، با استفاده از پروتئاز TEV توالی پپتید آمیلوئید بتا از برجسب آن جدا و نتایج آن منتشر خواهد شد. علاوه بر مطابقت وزن مولکولی پیش‌بینی شده در *in silico* برای پپتید نوترکیب با نتایج انجام SDS-PAGE، بررسی توسط آزمون وسترن بلات نیز موید نتایج قبلی می‌باشد. با وجود این باید در نظر داشت که استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال کاملاً اختصاصی توالی پپتید آمیلوئید بتا برای انجام آزمون وسترن بلات مناسب‌تر بوده است. به دلیل تشکیل تجمعات غیرمحلول پس از بیان در باکتری، خالص‌سازی این پپتید به شکل نوترکیب و در فرم مونومری همواره چالش برانگیز بوده است. [۱۵]. در این پژوهش، به دست آوردن پپتید آمیلوئید بتا در فرم‌های ساده تر ولی به صورت محلول و عاری از inclusion body یک مزیت بسیار مهم می‌باشد که استفاده از آن را برای بررسی های آتی و تیمار سلولی برای اندازه‌گیری میزان توکسیسیته آسان‌تر می‌کند، چرا که بازگرداندن فرم‌های غیرتوکسیک و پیچیده‌تر فیبریلی به اشکال الیگومریک و کوچک‌تر خود نیازمند به انجام پروسه جداگانه و اضافه کردن حلال‌های گران قیمت مانند HFIP (hexafluoroisopropanol) می‌باشد [۲۵، ۲۶]. البته باید درباره میزان تغییر تجمعات الیگومری و فیبریلی و تشکیل کانفورم‌سیون‌های مختلف مولکولی به مرور زمان بررسی و مطالعه جداگانه‌ای انجام شود. احتمالاً یکی از دلایل اینکه پپتید حاضر در این سیستم بیانی در فرم محلول قابل مشاهده می‌باشد، وجود برجسب هیستیدینی متصل شده به ساختار آن است که تا حدود زیادی می‌تواند خاصیت هیدروفوبی این پپتید را کاهش دهد.

بررسی کشندگی سلولی پپتید نوترکیب با استفاده از آزمون MTT در اکثر مطالعات به عنوان مشخصه عملکردی و اصلی آمیلوئید بتا شناخته می‌شود. در یک پژوهش میزان کشندگی بر روی رده سلولی SH-SY5Y، در غلظت ۲,۵ میکرومولار از پپتید نوترکیب در مقایسه با حلال هم ارز

فاقد پپتید به عنوان کنترل منفی، معنی‌دار گزارش شد. این در صورتی بوده است که پپتید سنتتیک مشابه در غلظت های یکسان اثر کشندگی معنی‌داری نداشته است [۲۷]. بررسی سیتوتوکسیسیته آمیلوئید بتای نوترکیب در یک مطالعه دیگر بر روی رده سلولی PC12، نشان داد که این پپتید پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت ۳ میکرومولار کشندگی حدود ۵۰ درصدی داشت [۴]. در پژوهش حاضر نیز، پس از تیمار سلول‌های رده SH-SY5Y با پپتید خالص شده به مدت ۱۲ ساعت، میزان کشندگی در غلظت های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار در مقایسه با غلظت صفر میکرومولار پپتید و با استفاده از حلال پپتید به عنوان کنترل منفی، به ترتیب نتایج معنادار ۳۰ و ۵۰ درصدی را نشان داد. بررسی نتایج MTT در سلول‌های SH-SY5Y تیمار شده با غلظت معین از پپتید آمیلوئید بتا، نشان داد که این پپتید تأثیر کشندگی قابل توجهی در مقایسه با کنترل (حلال بدون پپتید) دارد. همچنین، برای بررسی تأثیر دنباله هیستیدینی اضافه شده بر روی میزان کشندگی پپتید مذکور، از یک دنباله هیستیدینی فاقد توالی پپتید آمیلوئید به عنوان کنترل استفاده شد. خوشبختانه نتایج حاصل نشان داد که عدم حذف دنباله هیستیدینی، تأثیری در عملکرد پپتید و ایجاد خاصیت کشندگی آن نداشته است که ضرورت برش و حذف برجسب هیستیدینی را کم رنگ‌تر می‌کند.

آمیلوئید بتا، با اتصال به رسپتور و به راه انداختن آبشارهای مولکولی زیردستی منجر به بروز تأثیرات سایتوتوکسیک می‌شود. به این صورت که اشکال دایمر و الیگومر آمیلوئید بتای خارج سلولی، می‌تواند چندین مسیر هدایت سیگنال مرتبط با گیرنده‌های آمیلوئید بتا را فعال کند. از مهم‌ترین این گیرنده‌ها می‌توان به TNF، RAGE، nAChRs و p75NTR اشاره کرد. گیرنده p75NTR (nerve growth factor receptor) که با نام NGFR (nerve growth factor receptor) نیز شناخته می‌شود، به شکل

ساختارهای الیگومری و فیبریلی آمیلوئید بتا، بررسی ویژگی‌های بیولوژیکی و بیوشیمیایی پپتید و مکانیسم‌های درگیر در بیماری‌های مرتبط با آن از جمله آلزایمر را برای پژوهشگران بیشتری فراهم خواهد کرد.

۵- منابع

- [1] Hamley, I.W., The amyloid beta peptide: a chemist's perspective. Role in Alzheimer's and fibrillization. Chemical reviews, 2012. 112(10): p. 5147-5192.
- [2] Murphy, M.P. and H. LeVine III, Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide. Journal of Alzheimer's disease, 2010. 19(1): p.311-323.
- [3] Ballard, C., et al., Alzheimer's disease. the Lancet, 2011. 377(9770): p. 1019-1031.
- [4] Jia, L., et al., Highly efficient soluble expression, purification and characterization of recombinant A β 42 from Escherichia coli RSC advances, 2018. 8(33): p. 18434-18441.
- [5] Prakash, P., et al., Rapid, refined, and robust method for expression, purification, and characterization of recombinant human amyloid beta 1-42. Methods and Protocols, 2019. 2(2): p. 48.
- [6] Tickler, A.K., A.B. Clippingdale, and J.D. Wade, Amyloid- β as a "difficult sequence" in solid phase peptide synthesis. Protein and peptide letters, 2004. 11(4): p. 377-384.
- [7] FINDER, V.H., et al., The recombinant amyloid-beta peptide Abeta1-42 aggregates faster and is more neurotoxic than synthetic Abeta1-42. Journal of molecular biology, 2010. p. 9-18.
- [8] Jia, L., et al., Expression and purification of amyloid β -protein, tau, and α -synuclein in Escherichia coli: a review. Critical reviews in biotechnology, 2020. 40: (4) p. 475-489.
- [9] Garai, K., et al., Expression and purification of amyloid-beta peptides from Escherichia coli. Protein Expr Purif, 2009. 66(1): p. 107-12.
- [10] Dahlgren, K.N., et al., Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentially affect neuronal viability. Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(35): p. 32046-32053.
- [11] Ying, Z., et al., Preparation and Characterization of a Monoclonal Antibody with High

اختصاصی باعث شروع فرایند مرگ سلولی می‌شود [۲۸]. اغلب این گیرنده‌ها پس از اتصال به لیگاند خود، منجر به فعال شدن دومین FADD می‌شوند که در کنار Pro-caspase8، کمپلکس DISC^۱ را تشکیل می‌دهد. فعال شدن caspase 8، باعث فعال شدن caspase 3 و شروع فرایند آپوپتوز می‌شود [۲۹].

با توجه به خاصیت کشندگی مطلوب این پپتید در آزمون MTT انجام شده، می‌توان از پپتید خالص شده، برای تیمار سلول‌های مدل موشی و انسانی از جمله رده‌های سلولی PC12 و SH-SY5Y استفاده کرد و مدل سلولی بیماری آلزایمر را ساخت که در مطالعات بعدی سلولی و مولکولی درباره بیماری آلزایمر بسیار کاربردی و ارزشمند می‌باشد.

بر اساس راهبردهای مختلف به کار گرفته شده در پژوهش‌های پیشین، میزان آمیلوئید بتای نوترکیب به دست آمده متفاوت است. در پژوهش‌های تقریباً مشابه، راندمان نهایی گزارش شده از ۳ تا ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر لیتر محیط کشت متغیر بوده است [۲۴، ۳۰، ۳۱]. این تفاوت به دلیل استفاده از میزبان‌های بیانی متفاوت، وکتورهای متنوع، محیط کشت‌های گوناگون، نحوه‌القای بیان و نوع خالص سازی می‌باشد [۸]. مقدار محاسبه شده برای مطالعه حاضر ۵۰ میلی گرم به ازای یک لیتر محیط کشت می‌باشد که نشان دهنده یک سطح بیان مطلوب و خالص سازی بهینه است.

در آخر، باید این نکته را در نظر داشت تکنولوژی سنتز پپتیدهای فاز جامد، به‌ویژه پپتیدهای با طول بالاتر از ده اسیدآمین به روش شیمیایی بسیار مشکل و نیازمند خرید و واردات بسیار هزینه‌بر این پپتیدها از خارج از کشور می‌باشد. بیان و خالص سازی پروتئین‌ها به روش زیستی امکان تولید آسان‌تر و در مقادیر بسیار بالاتر را فراهم می‌کند. تولید نوترکیب این پپتید امکان دسترسی و مطالعه

¹ death-inducing signalling complex

- Escherichia coli. The protein journal, 2013. 32: p. 419-425.
- [22] Vosough, F. and A. Barth, Characterization of homogeneous and heterogeneous amyloid- β 42 oligomer preparations with biochemical methods and infrared spectroscopy reveals a correlation between infrared spectrum and oligomer size. ACS Chemical Neuroscience, 2021. 12(3): p. 473-488.
- [23] Pujol-Pina, R., et al., SDS-PAGE analysis of A β oligomers is disserving research into Alzheimer s disease: appealing for ESI-IM-MS. Scientific reports, 2015. 5(1): p. 14809.
- [24] Kim, E.-K., et al., Large-scale production of soluble recombinant amyloid- β peptide 1–42 using cold-inducible expression system. Protein expression and purification, 2012. 86(1): p. 53-57.
- [25] Hiroaki, H., Molecular mechanisms of amyloid- β peptide fibril and oligomer formation: NMR-based challenges. Biophysics and Physicobiology, 2023. 20.(1)
- [26] Stine, W.B., et al., Preparing synthetic A β in different aggregation states. Methods Mol Biol, 2011. 670: p. 13–32
- [27] Shobo, A., et al., Biophysical characterization as a tool to predict amyloidogenic and toxic prope-rties of amyloid- β 1-42 peptides, FEBS letters, 2022 Jun;596(11):1401-1411.
- [28] Zhang, H., et al., Cellular response to β -amyloid neurotoxicity in Alzheimer's disease and implications in new therapeutics. Animal Model Exp Med, 2023. 6(1): p. 3-9.
- [29] Leong, Y.Q., et al., Mechanisms of action of amyloid-beta and its precursor protein in neuronal cell death. Metab Brain Dis, 2020. 35(1): p. 11-30.
- [30] Kronqvist, N., et al., Efficient protein production inspired by how spiders make silk. Nature communications, 2017. 8(1): p. 15504.
- [31] Satakarni, M. and R. Curtis, Production of recombinant peptides as fusions with SUMO. Protein expression and purification, 2011. 78(2): p. 113-119.
- Affinity for Soluble A β Oligomers. Hybri-doma, 2009. 28(5): p. 349-354.
- [12] Ryan, D.A., et al., An improved method for generating consistent soluble amyloid-beta oligomer preparations for in vitro neurotoxicity studies. Journal of neuroscience meth-ods,2010.190(2): p. 171-179.
- [13] Chhetri, G., et al., An improved method for high-level soluble expression and purification of recombinant amyloid-beta peptide for in vitro studies. Protein Expression and Purification, 2015. 114: p. 71-76.
- [14] Garai, K., et al., Expression and purification of amyloid- β peptides from Escherichia coli .Protein expression and purification, 2009. 66(1): p. 107-112.
- [15] Stephens, A.D., et al., Fast purification of recombinant monomeric amyloid- β from E. coli and amyloid- β -mCherry aggregates from mammalian cells. ACS Chemical Neuroscience,2020. 11(20): p.3213-3204.
- [16] Walsh, D.M., et al., A facile method for expression and purification of the Alzheimer's disease-associated amyloid β -peptide. The FEBS journal, 2009. 276(5): p. 1266-1281.
- [17] Caine, J.M., et al., Oligomerization and toxicity of A β fusion proteins. Biochemical and biophysical research communications, 2011.409(3): p. 477-482.
- [18] Jia, L., et al., Amyloidogenicity and Cytotoxicity of a Recombinant C-Terminal His6-Tagged A β 1-42, ACS Chemical Neuroscience,2018, 10(3):p,1251-1262.
- [19] Liao ,Y.-H. and Y.-R. Chen, A novel method for expression and purification of authentic amyloid- β with and without 15N labels. Protein expression and purification, 2015. 113: p. 63-71.
- [20] Long, F., W. Cho, and Y. Ishii, Expression and purification of 15N-and13 C-isotope labeled 40-residue human Alzheimer's β -amyloid peptide for NMR-based structural analysis. Protein expression and purification,2011. 79(1): p. 16–24.
- [21] Gopal, G.J. and A. Kumar, Strategies for the production of recombinant protein in

Recombinant expression of amyloid beta 1-42 (A β 1-42) in *Escherichia coli* bacterial system

Pouran badiri¹, majid sadeghizadeh^{2*}, Bijan Bambai³, S. Zahra Bathaei⁴, Mehrnaz Bahrainy⁵, Zarrin Minucheher^{6*}

1.PhD, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2.Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3.Assistant Professor, Department of Systems Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

4.Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

5.Master of Sciences, Department of Systems Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

6.Associate Professor, Department of Systems Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

sadeghma@modares.ac.ir, dr.minucheher@gmail.com

Receipt: 2024/05/28

Accepted: 2024/08/05

Abstract

Amyloid beta (A β) is the major constituent of harmful plaques in the Alzheimer's patients. Thus, study of A β and understanding its related molecular and cellular mechanisms is essential for diagnosis and therapeutic interventions. This study introduces a rapid, simple, and cost-effective technique for production and purification of this peptide, utilizing the expression of A β gene within bacterial system. A β gene was synthesized and transferred into the expression vector pET26b. After induction by Lactose and 24 hours of incubation for A β expression the cell sediment was analyzed for presence of recombinant peptide using SDS-PAGE and Western blot. Then the purification of recombinant peptide was carried using nickel chloride affinity chromatography. Characterization of purified A β was performed by evaluating cell cytotoxicity in 25 μ M and 50 μ M concentrations using MTT assay on Alzheimer cell line model SH-SY5Y.

Colony PCR and sequencing results showed the correct insertion of A β coding fragment into the expression vector. Presence of bands with the expected size in the results of SDS PAGE and western blot had confirmed successful expression of his-tagged recombinant peptide. MTT assay results showed the purified peptide has respectively 30 and 50% cytotoxicity for 25 μ M and 50 μ M concentrations. Production of amyloid beta peptide in bacterial hosts seems to be favorable. Obtaining A β peptide in soluble phase is an important advantage of this study. Hence according to toxicity of the purified peptide, it can be utilized for cell line treatments and further researches on Alzheimer disease.

Keywords: amyloid beta, peptide, recombinant, Ni-NTA, western blot