

تأثیر بیان هم زمان چپرون های سیتوپلاسمی بر بیان فاکتور رشد عصبی نوترکیب در میزبان بیانی *E. coli*

سیده مهدیه سادات¹، زهرا حاجی حسن^{2*}، محمد برشان تشنیزی³

1- کارشناس ارشد، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

2- استادیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

3- استادیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: hajihasan@ut.ac.ir

پذیرش: 1400/01/14

دریافت: 1399/1/19

چکیده:

فاکتور رشد عصبی (NGF) فاکتور نوروتروفیک عصبی می باشد که در حفظ، بقا و تمایز سلول های عصبی مرکزی و محیطی فعالیت دارد. این پروتئین سه زیرواحدی بوده که زیرواحد بتای آن دارای فعالیت اصلی است. براساس تحقیقات، به نظر می رسد که می توان از این فاکتور در درمان بسیاری از بیماری ها از جمله نوروپاتی های محیطی در ارتباط با دیابت، آلزایمر، پارکینسون، بیماری های پوستی و غیره استفاده کرد. به دلیل فضای اکسیداتیو پری پلاسم، بیان پروتئین نوترکیب NGF در میزبان پروکاریوتی باید در پری پلاسم صورت گیرد. شایان ذکر است که بیان هم زمان چپرون های سیتوپلاسمی، می تواند ترشح پروتئین های نوترکیب به فضای پری پلاسمی را آسان کرده و سبب افزایش حلالیت آنها شود.

در این تحقیق تأثیر چپرون های سیتوپلاسمی GroEL/GroES، DnaK/DnaJ، GrpE، Trigger Factor (TF) بر میزان تولید پری پلاسمی پروتئین نوترکیب NGF مطالعه شد. به این منظور زیرواحد-β NGF در وکتور بیانی pET39b(+) به صورت هم زمان با پلاسمیدهای چپرونی pTf16، pG-Tf2، pGro7، pKJE7 و pG-KJE8 در باکتری *E. coli* سویه DE3 بیان شد.

نتایج بدست آمده نشان دادند که در حضور چپرون TF (پلاسمید چپرونی pTf16) تولید کل محتوای پروتئینی و پروتئین های پری پلاسمی افزایش داشته است. همچنین مجموع چپرون های DnaK/DnaJ و GroEL/GroES (پلاسمید چپرونی pG-KJE8) نیز تا حدودی سبب افزایش تولید شده اند، در حالی که بیان هر یک از چپرون های GroEL/GroES (پلاسمید چپرونی pGro7) و یا DnaK/DnaJ (پلاسمید چپرونی pKJE7) تأثیری بر بیان پروتئین نداشته اند. نتایج کشت سلول نیز نشان دهنده فعال بودن پروتئین تولیدی بوده و تمایز سلول ها به سلول های عصبی را نشان می دهد.

کلیدواژگان: فاکتور رشد عصبی نوترکیب، چپرون های سیتوپلاسمی، سلول های PC12

1- مقدمه

فاکتور رشد عصبی¹، بیش از 50 سال قبل برای اولین بار توسط ریتا مونتالسینی و همکاران از غدد بزاقی موش نر جداسازی شد (1). این فاکتور از خانواده نوروتروفین‌ها² بوده که در بقا، رشد و تمایز سلول‌های سیستم عصبی مرکزی و محیطی نقش دارد (2 و 3). NGF از سه زیرواحد α ، β و γ ، با سه پیوند دی‌سولفیدی و وزن تقریبی 140 کیلو-دالتون تشکیل شده است که فعالیت بیولوژیکی آن بر عهده زیرواحد β می‌باشد (4).

پروتئین NGF در درمان التهابات ناشی از بیماری‌های خود ایمنی مغزی نظیر مالتیپل اسکلروزیس³ (MS)، از طریق بازسازی غلاف میلین و یا تمایز سلول‌های بنیادی نورونی و درمان بیماری تحلیل اعصاب مانند آلزایمر مورد استفاده قرار می‌گیرد. این پروتئین علاوه بر تأثیرات مثبتی که بر سلول‌های عصبی می‌گذارد، در درمان زخم‌های پوستی، بیماری‌های چشم و نوروپاتی دیابتی هم کاربرد دارد (5-9).

با توجه به اهمیت بالینی این پروتئین و همچنین مشکلاتی چون ایمنی‌زایی، گرانی استخراج و تخلیص آن از منابع طبیعی (غدد بزاقی موش نر)، توجه دانشمندان به تولید آن به صورت نوترکیب در سیستم‌های بیانی مختلف مثل سلول‌های پستانداران، CHO و باکتری *E. coli* جلب شده است (10-12).

سرعت بالای رشد، بیان افزایش یافته پروتئین با جایگزینی پروموتورهای قوی، هزینه‌های پایین تولید و امکان شکل‌گیری پیوندهای دی‌سولفیدی در پری پلاسم، باعث شده باکتری *E. coli* در تولید پروتئین‌های نوترکیب زیادی مورد استفاده قرار گیرد (13). به دلیل وجود فضای اکسیداتیو در پری‌پلاسم و اهمیت آن در تشکیل پیوندهای دی-سولفیدی، بهترین راه تولید پروتئین نوترکیب دارای پیوند دی‌سولفیدی در *E. coli*، انتقال آن به فضای پری‌پلاسمی است. به همین دلیل از یک پپتید نشانه جهت صدور پروتئین به پری‌پلاسم استفاده می‌شود (14 و 13). به علاوه باتوجه

به مشکلاتی نظیر تجمع پروتئین‌های دارای پیوند دی‌سولفیدی به صورت اینکلوزن بادی⁴ در سیتوپلاسم، بیان هم‌زمان چپرون‌ها⁵ می‌تواند راه‌کار مناسبی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب محلول باشد (16-18).

چپرون‌ها پروتئین‌های حفاظت‌شده‌ای هستند که در اثر شوک حرارتی بیان شده و سبب تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها می‌شوند. بیان هم‌زمان آنها موجب شکل‌گیری صحیح ساختار سوم پروتئین نوترکیب، به حداقل رساندن تجمعات نامحلول پروتئینی و افزایش حلالیت پروتئین می‌شود (21-19). در همین راستا و به منظور افزایش بازده در تولید پروتئین نوترکیب در تحقیقات مختلف از بیان هم‌زمان آنها استفاده شده است. برای مثال اثرات مفید بیان چپرون‌هایی مانند TF^6 ، GroEL و DnaK در تولید پروتئین‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است (22)، یا به طور مثال بیان بیش از حد DnaK/J و TF برای افزایش حلالیت پروتئین‌هایی که در مرحله اول پیچش هستند، مناسب می‌باشد (23).

باتوجه به توضیحات ذکر شده درباره اهمیت تولید پروتئین NGF در درمان، در این تحقیق جهت افزایش بیان و تولید پری پلاسمی پروتئین نوترکیب NGF از چپرون‌های سیتوپلاسمی با میزبانی *E. coli* استفاده شد.

2- مواد و روش‌ها**2-1 مواد استفاده شده**

سویه *E. coli* BL21 (DE3) دارای ژن RNA پلیمراز T7 قابل القاء با IPTG به عنوان میزبان باکتریایی و وکتور pET39b (+) که دارای پروموتور قوی T7، His tag، پپتید نشانه و ژن DsbA جهت شکل‌گیری صحیح پیوندهای دی-سولفیدی در پری‌پلاسم می‌باشد، از شرکت نواژن⁷ آمریکا خریداری شدند. پلاسمیدهای چپرون‌های سیتوپلاسمی-pG-Tf2، pGro7، pKJE7 و pG-KJE8 از شرکت تاکارا⁸

4. Inclusion body
5. Chaperone
6. Trigger factor
7. Novagene
8. TaKaRa

1. Nerve Growth Factor
2. Neurotrophin
3. Multiple Sclerosis

ژاپن خریداری شد (جدول 1). تمام مواد و حلال‌ها نیز از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

جدول 1 - پلاسمیدهای چپرونی.

پلاسمید	چپرون (ژن)	پروموتور	القا کننده
pG-KJE8	dnaK/dnaJ -grpE - groES/groEL	araB/ Pzt-1	L-Arabinose /Tetracycline
pGro7	groES/groEL	AraB	L-Arabinose
pKJE7	dnaK/dnaJ -grpE	araB	L-Arabinose
pG-Tf2	groES/groEL- tig	Pzt-1	Tetracycline
pTf16	tig	araB	L-Arabinose

پروتئینی نمونه ها با دور 11000 rpm به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی حاوی پروتئین در فریزر -20 درجه سانتی گراد برای آنالیزهای بعدی نگهداری شد.

4-2 بیان هم زمان hβNGF با چپرون های سیتوپلاسمی

از 5 چپرون ذکر شده به صورت جداگانه هم زمان با hβNGF بیان گرفته شد. از تک کلنی ها، کشت شبانه در محیط LB تهیه شد. در ابتدا القاکننده های چپرونی برحسب نوع چپرون اضافه شد. 5 ng/ml تتراسایکلین برای نمونه های دارای پلاسمید چپرونی pG- و pG-KJE8 و pG-Tf2، 0/5 mg/ml ال-آرابینوز برای نمونه های دارای پلاسمیدهای چپرونی pG-KJE8، pKJE7، pGro7 و pTf16 اضافه شد. محیط ها تا رسیدن به $OD_{600nm} = 0/7$ در 37 درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس میزان یک درصد IPTG با غلظت نهایی 1 mM به کشت ها اضافه و به مدت 4 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از اتمام مدت زمان بیان، محیط ها با دور rpm 5000 به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب ها جهت استخراج محتوی پری پلاسمی با روش شوک اسمزی (25) و استخراج کل محتوی پروتئینی با اوره M 8 جداسازی شدند.

2-2 انتقال پلاسمیدهای چپرونی به سویه میزبان

5 پلاسمید چپرونی با روش شوک حرارتی به صورت جداگانه به میزبان بیانی *E. coli* انتقال داده شدند (24). سپس وکتور pET39 حاوی ژن hβNGF نیز به همان روش انتقال یافت. صحت انتقال با جداسازی کلنی های رشد کرده بر روی محیط LB agar حاوی 70 mg/ml کانامایسین و 20 mg/ml کلرامفنیکل صورت گرفت.

3-2 بیان hβNGF در میزبان بیانی *E. coli* BL21 (DE3)

میزان یک درصد از کشت شبانه BL21 حاوی وکتور pET39 b(+):βNGF در محیط کشت LB مایع دارای کانامایسین کشت داده شد و در 37 درجه سانتی گراد تا رسیدن به $OD_{600nm} = 0/5-0/7$ انکوبه شد. سپس میزان یک درصد IPTG با غلظت نهایی 1 mM به کشت اضافه و به مدت 4 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از اتمام مدت زمان بیان، سلول ها با دور rpm 5000 به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب جهت استخراج کل محتوی پروتئینی در اوره M 8 حل شد. سپس با حمام التراسونیک دیواره سلولی شکسته و سوسپانسیون حاصل به مدت 12 ساعت در 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد. در نهایت برای جداسازی کل محتوی

5-2 تست‌های بررسی بیان پروتئین hβNGF

جهت بررسی بیان و اثر چپرون‌های سیتوپلاسمی بر بیان پروتئین hβNGF، SDS-PAGE و دات بلات¹ انجام شد.

SDS-PAGE 1-5-2

برای الکتروفورز نمونه‌های پروتئینی تولیدشده در شرایط دناتوره کننده (در حضور SDS)، از روش لاملی ژل 12% SDS-PAGE استفاده شد (26). نمونه‌های پروتئینی با مقدار معینی بافر نمونه مخلوط و 2-5 دقیقه در آب جوش قرار داده شدند و سپس درون چاهک‌ها به آرامی ریخته شدند. الکتروفورز با ولتاژ ثابت 100 ولت و شدت جریان متغیر انجام شد. در نهایت ژل توسط رنگ کوماسی بلو R-250 رنگ آمیزی شد.

2-5-2 دات بلات

ابتدا میزان 5 میکرولیتر از پروتئین‌های استخراج شده و 5 میکرولیتر از پروتئین تجاری NGF به عنوان کنترل مثبت، بر روی کاغذ نیتروسلولز لکه گذاری شدند. جهت حذف نقاط غیراختصاصی از بافر بلاک کننده TBS-T (Tween 20 و NaCl، Tris-HCl) حاوی 3% ژلاتین استفاده شد. بعد از سه مرحله شستشو با بافر، آنتی بادی منوکلونال ضد دنباله هیستیدینی با نسبت 1:1000 مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت کاغذ در حضور سوبسترای آنزیم، DAB و آب اکسیژنه در تاریکی تا ظهور لکه انکوبه شد (27).

3-5-2 تعیین غلظت پروتئین با روش برادفورد²

جهت تعیین غلظت کل محتوی پروتئینی تولید شده با استفاده از روش برادفورد (28)، ابتدا رقت‌های 0/2، 0/1،

0/4، 0/6، 0/8 و 1 میلی گرم بر میلی لیتر از پروتئین BSA همراه 0/5 میلی لیتر معرف برادفورد جهت رسم نمودار استاندارد، تهیه شد. جذب نمونه‌ها در 595 نانومتر قرائت شد. سپس به 10 میکرولیتر از هریک از نمونه های پروتئینی، 0/5 میلی لیتر معرف اضافه شد و در ناحیه 595 نانومتر جذب آنها قرائت گردید.

6-2 تخلیص

بعد از بررسی اثر چپرون‌ها بر تولید پروتئین hβNGF، بهترین چپرون انتخاب و نمونه پروتئینی حاصل از بیان آن با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni²⁺-NTA تخلیص شد (29 و 30). به منظور حذف ایمیدازول از پروتئین‌های تخلیص شده، دیالیز علیه بافر تریس اسیدی 10 میلی مولار انجام شد.

7-2 کشت سلول

نمونه پروتئین خالص شده جهت بررسی میزان عملکرد و اثر بخشی بر سلول PC12 مورد آزمایش قرار گرفت. در همین راستا سلول‌های PC12 در محیط DMEM غنی شده با 10% سرم گاو کشت داده شدند و در انکوباتور کشت سلول با 5% گاز CO₂ و در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از رسیدن حجم سلول‌ها به حدود 70 درصد حجم فلاسک (بعد از دو روز)، سلول‌ها به محیط جدید حاوی 50 نانوگرم بر میلی لیتر پروتئین خالص شده NGF منتقل شده و محیط هر دو روز یک بار تعویض شد. در نهایت بعد از یک هفته سلول‌ها از لحاظ مورفولوژیکی توسط میکروسکوپ معکوس مجهز به سیستم فازکنتراست مورد بررسی قرار گرفتند (29-31).

1. Dot Blot
2. Bradford assay

3- نتایج

3-1 انتقال پلاسمیدهای چپرونی به میزبان بیانی

برای آماده سازی میزبان بیانی، ابتدا پلاسمیدهای چپرونی pG-Tf2، pGro7، pKJE7 و pG-KJE8 و سپس وکتور حاوی ژن hβNGF با روش شوک حرارتی به میزبان بیانی DE3 انتقال یافتند. برای تأیید انتقال، از هر یک از نمونه های ترانسفورم شده روی محیط LB آگار حاوی کلرامفنیکل و کانامایسین کشت داده شد. سویه هایی که هر دو پلاسمید را دریافت کرده بودند، بر روی پلیت رشد کرده و از این کلنی ها برای بیان استفاده شدند.

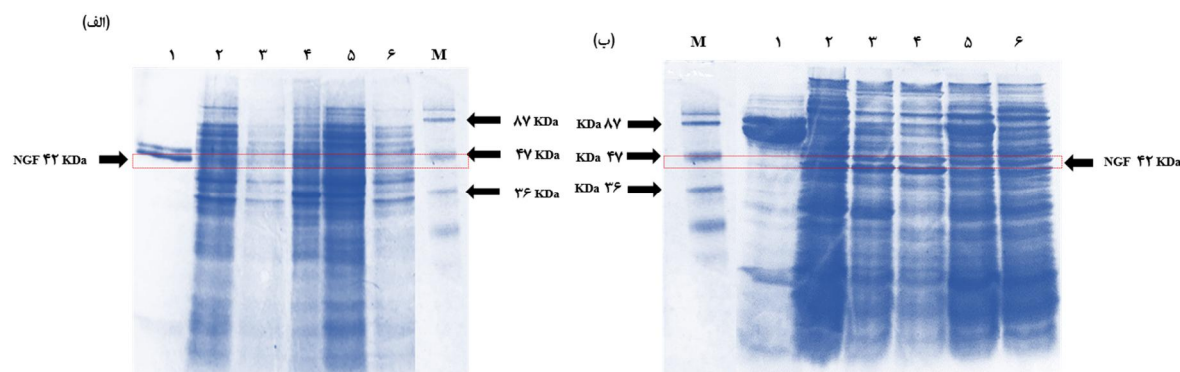
3-2 بیان هم زمان پلاسمید های چپرونی به همراه

hβNGF نو ترکیب انسانی در میزبان باکتریایی

BL21(DE3)

از سویه های حاوی پلاسمید چپرون ها و NGF در محیط LB مایع دارای آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل و کانامایسین کشت گذاشته شد و پس از بیان، پروتئین ها آماده سازی شدند. شکل 1 به ترتیب طرح های الکتروفورزی پروتئین های پری پلاسمی و کل محتوی پروتئینی استخراج شده را نشان می دهد. همان طور که در شکل 1 مشخص است، در ناحیه 42 کیلو دالتونی باند مربوط به پروتئین NGF قابل مشاهده است. ستون شماره 1 حاوی پلاسمید چپرونی pG-Tf2 می باشد که دارای چپرون های GroEL/GroES و TF است و نشان دهنده تأثیر اندک بیان هم زمان این چپرون ها بر بیان پروتئین NGF نسبت به سایر چپرون هاست. بیان هم زمان چپرون های GroEL/ES و DnaK/J (پلاسمید چپرونی pG-KJE8) با یگدیگر و TF (پلاسمید چپرونی pTf16) بیان کل محتوی پروتئینی را نسبت به سایر چپرون ها افزایش داده است، این در حالی است که بیان هم زمان پلاسمیدهای چپرونی pG-، pGro7

Tf2 و pKJE7-NGF سبب کاهش بیان کل محتوی پروتئینی شده اند. درصد میزان بیان هم زمان پروتئین NGF با چپرون ها با استفاده از نرم افزار ایمج جی¹ از روی ژل محاسبه و در جدول 2 نشان داده شده است. نتایج حاصل از بررسی کمی تأثیر بیان هم زمان چپرون های سیتوپلاسمی بر تولید NGF نیز نشان می دهد که چپرون های GroEL/ES و DnaK/J (پلاسمید چپرونی pG-KJE8) بیشترین تأثیر (26 درصد) و چپرون های GroEL/ES و TF (پلاسمید چپرونی pG-Tf2) (2 درصد) کمترین اثر را بر تولید کل محتوی پروتئینی داشته اند. بیشترین تأثیر بیان هم زمان چپرون ها بر تولید پری پلاسمی پروتئین NGF هم به ترتیب توسط TF (پلاسمید چپرونی pTf16) با 38 درصد و GroEL/ES و DnaK/J (پلاسمید چپرونی pG-KJE8) با 19 درصد می باشد.



شکل 1 الف- طرح الکتروفورزی پروتئین‌های پری پلاسمی و ب- طرح الکتروفورزی کل محتوی پروتئینی استخراج شده روی ژل SDS-PAGE 12 درصد رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو. شماره (1) **pG-Tf2-NGF**، شماره (2) **pTf16-NGF**، شماره (3) **pGro7-NGF**، شماره (4) **pKJE7-NGF**، شماره (5) نمونه **pG-KJE8-NGF**، شماره (6) **NGF** بدون چپرون و **M** مارکر وزن مولکولی.

جدول 2- بررسی میزان بیان پروتئین NGF توسط پلاسمیدهای چپرونی با استفاده از نرم افزار ایمج جی.

پلاسمید چپرونی	بیان کل محتوی پروتئین (%)	بیان پری پلاسمی (%)
pG-Tf2-NGF	2	1
pTf16-NGF	23	38
pGro7-NGF	16	11
pKJE7-NGF	13	17
pG-KJE8-NGF	26	19
NGF	20	14

که در شکل مشخص می‌باشد شماره 3 که دارای چپرون TF (پلاسمید چپرونی pTf16) و شماره 6 که دارای مجموع چپرون‌های GroEL/ES و DnaK/J (پلاسمید چپرونی pG-KJE8) هستند، بیشترین میزان تأثیر را بر بیان پروتئین NGF داشته‌اند. در حالی که نمونه شماره 2 که حاوی چپرون‌های TF و GroEL/ES (پلاسمید چپرونی pG-Tf2) است، کمترین میزان تأثیر را بر روی بیان داشته‌است. شماره‌های 4 و 5 نیز که تنها به ترتیب چپرون GroEL/ES و DnaK/J را دارند، بیان کاهش یافته پروتئین NGF را نشان می‌دهند. در شکل 2 (ب) که دات بلات پروتئین‌های پری پلاسمی می‌باشد، بیشترین میزان تولید پروتئین‌های پری پلاسمی مربوط به نمونه شماره 3

3-3 بررسی بیان هم‌زمان پلاسمیدهای چپرونی با

پروتئین hβNGF با روش دات بلات

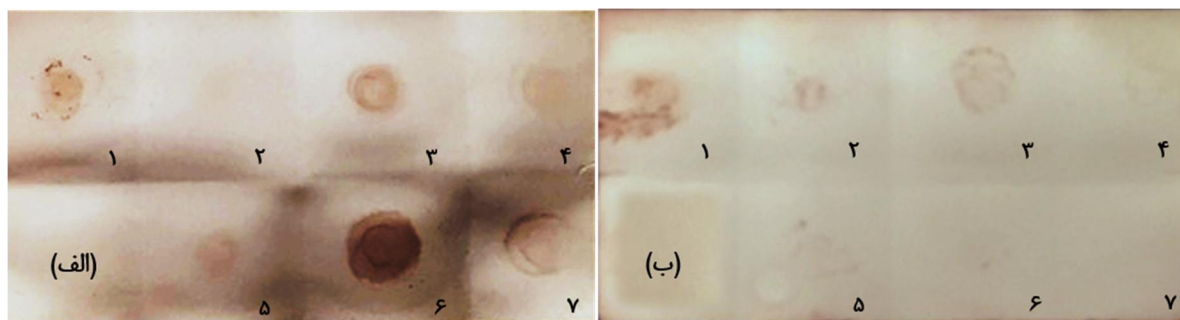
کل محتوی پروتئینی بیان شده در میزبان باکتریایی *E. coli* BL21(DE3) همراه با پلاسمیدهای چپرونی استخراج شدند و به منظور بررسی اختصاصی وجود پروتئین نو ترکیب و تأیید بیان بر روی کاغذ نیتروسلولز لکه‌گذاری شدند. همچنین پروتئین‌های پری پلاسمی استخراج شده با روش شوک اسمزی نیز به منظور تأیید بیان لکه‌گذاری شدند.

با توجه به شکل 2 (الف) پلاسمیدهای چپرونی pG-KJE8 و pTf16 بیشترین میزان تأثیر را بر بیان کل، نسبت به نمونه فاقد پلاسمید چپرونی داشته‌اند. همان‌طور

تأثیر بیان هم زمان چپرون های ... _____ سادات و همکاران

پروتئینی برای بیان هم زمان با پلاسمید چپرونی حاوی چپرون های GroEL/ES و DnaK/J به میزان 52 درصد و بیان پری پلاسمی مربوط به بیان هم زمان با پلاسمید چپرونی حاوی TF به میزان 50 درصد می باشد.

می باشد که در آن از بیان هم زمان پلاسمید چپرونی pTf16 حاوی چپرون TF استفاده شده است. با استفاده از نرم افزار ایمج جی تصاویر دات بلات آنالیز و میزان بیان به صورت کمی در جدول 3 شرح داده شده است. همان-طور که مشاهده می شود بیشترین میزان بیان کل محتوی



شکل 2 الف- طرح دات بلات کل محتوی پروتئینی و ب- پروتئین های پری پلاسمی استخراج شده با استفاده از آنتی بادی ضد His-tag. شماره های 1 الی 7 به ترتیب NGF تجاری کنترل مثبت، و pG-Tf2-NGF، pTf16-NGF، pGro7-NGF، pKJE7-NGF، pG-KJE8-NGF و NGF بدون بیان با چپرون می باشد.

جدول 3- درصد های بیان پروتئین NGF با استفاده از آنالیز داده های دات بلات.

بیان پری پلاسمی (%)	بیان کل محتوی پروتئینی (%)	پلاسمید چپرونی و NGF
12	1	pG-Tf2-NGF
50	20	pTf16-NGF
8	4	pGro7-NGF
3	4	pKJE7-NGF
3	52	pG-KJE8-NGF
2	12	NGF بدون چپرون
22	7	NGF تجاری

غلظت پروتئین کل محاسبه شده به ترتیب $0/073 \pm$ و $1/843$ و $1/620 \pm 0/081$ میلی گرم بر میلی لیتر است. نتایج حاصل با مقادیر به دست آمده از تحلیل کمی ژل-SDS-PAGE و کاغذ دات بلات مطابقت دارد که نشان دهنده تأثیر بیشتر پلاسمید چپرونی pG-KJE8 بر بیان کل محتوی پروتئینی است.

4-3 تعیین غلظت کل محتوی پروتئینی با روش

برادفورد

غلظت کل محتوی پروتئینی در هر یک از حالت های بیان با چپرون با استفاده از روش برادفورد اندازه گیری و محاسبه شد. بیشترین غلظت پروتئین NGF تولید شده مربوط به حالتی است که از بیان هم زمان چپرون های GroEL/ES و DnaK/J (پلاسمید چپرونی pG-KJE8) و TF (پلاسمید چپرونی pTf16) استفاده شده است. میزان

3-5 کشت سلول‌های PC12 جهت بررسی عملکرد

پروتئین نوترکیب hβNGF تخلیص شده

زمانی که سلول‌های رده PC12 در معرض NGF قرار می‌گیرند، در عرض یک هفته تمایز پیدا کرده و به نورون‌ها (سلول‌های عصبی) تبدیل می‌شوند. در بررسی‌های صورت گرفته در تحقیقات قبلی نیز نشان داده شده است که طی تمایز، علاوه بر تغییر در بیان ژن‌ها، مورفولوژی سلول‌ها نیز تغییر خواهد کرد (29 و 31).

به منظور بررسی عملکرد hβNGF نوترکیب انسانی تخلیص شده، کشت سلول‌های PC12 انجام گرفت و میزان 50 نانوگرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت، NGF نوترکیب به سلول‌ها افزوده شد. پس از طی چهار روز از

افزوده شدن پروتئین نوترکیب به محیط کشت، مورفولوژی سلول‌ها شروع به تغییر کرد و پس از گذشت یک هفته سلول‌های شاخص عصبی در زیر میکروسکوپ مشاهده گردیدند. به عنوان کنترل از NGF تجاری خریداری شده از شرکت سیگما نیز استفاده شد. شکل 3 (الف) تصویر سلول‌های PC12 را قبل از تیمار با پروتئین نوترکیب نشان می‌دهد و شکل‌های 3 (ب) و 3 (ج)، عکس سلول‌های PC12 را پس از تیمار با NGF تجاری و بیان شده با چپرون TF نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌شود، پس از گذشت یک هفته، سلول‌های تیمار شده با NGF تجاری و NGF بیان شده همراه با چپرون TF به سلول‌های عصبی تمایز پیدا کرده‌اند (30 و 29).



شکل 3 الف- سلول‌های PC12 قبل از تیمار با پروتئین نوترکیب NGF، ب- پس از یک هفته انکوبه شدن در محیط کشت حاوی NGF تجاری و ج- پس از یک هفته انکوبه شدن در محیط کشت حاوی NGF بیان شده همراه با چپرون TF.

4- بحث

عمده‌ترین مشکل سیستم *E. coli* در بیان سیتوپلاسمی پروتئین‌های نوترکیب، تشکیل اینکلوژن بادی می‌باشد که اگرچه جداسازی پروتئین را با درصد خلوص بالایی امکان‌پذیر می‌سازد، اما به دلیل نامحلول و غیرفعال بودن پروتئین باید آن را دوباره بازیابی کرد و به فرم صحیح درآورد که این عمل علاوه بر صرف هزینه، کاری بسیار پیچیده می‌باشد. همچنین به دلیل گرم منفی بودن و فضای احیایی سیتوپلاسم *E. coli* می‌توان پروتئین‌های تولیدی را به پری پلاسم ترشح کرد که برخلاف سیتوپلاسم، پروتئین

های موجود در این فضا تنها 4 درصد کل پروتئین‌های سلول را شامل می‌شوند. ترشح پروتئین‌ها به پری پلاسم با توجه به فضای اکسیداتیو موجود، باعث شکل‌گیری صحیح پیوندهای دی‌سولفیدی با کمک پروتئین‌های کمک کننده به این عمل مانند DsbA و DsbC می‌شود. از مزایای دیگر فضای پری پلاسمی آسان‌تر شدن جداسازی و خالص‌سازی پروتئین تولیدشده و نیز کاهش میزان پروتئازهای مختلف می‌باشد (32).

در ساختار پروتئین NGF سه پیوند دی‌سولفیدی وجود دارد که شکل‌گیری صحیح آنها در عملکرد

پروتئین نقش اساسی دارد. از آنجایی که امکان شکل گیری پیوندهای دی سولفیدی در فضای سیتوپلاسمی به دلیل پتانسیل اکسایشی منفی، کم است لازم است که پروتئین ها به فضای پری پلاسمی انتقال پیدا کند. فضای اکسیداتیو و امکان شکل گیری پیوندهای دی سولفیدی در پری پلاسم، این فضا را مکانی مناسب برای تولید پروتئین های نوترکیب دارای پیوندهای دی سولفیدی در میزبان *E. coli* کرده است. با توجه به مزیت های باکتری *E. coli* از جمله سرعت رشد بالا، بیان بالای پروتئین هدف با پروموتورهای قوی، هزینه های به نسبت کم تولید و توانایی تشکیل پیوندهای دی سولفیدی در پری پلاسم، آن را تبدیل به میزبانی مناسب برای تولید پروتئین های نوترکیب زیادی کرده است (13، 15 و 33).

در همین راستا در این تحقیق به منظور بیان و تولید پروتئین نوترکیب NGF انسانی از میزبان بیانی *E. coli* با وکتور pET39b(+) دارای پروموتور قوی T7، توالی پپتید نشانه و ژن DsbA جهت صدور، افزایش حلالیت و پیچش صحیح پروتئین نوترکیب در فضای پری پلاسمی استفاده شد. به علاوه تأثیر بیان هم زمان چپرون های سیتوپلاسمی بر تولید hβNGF در پری پلاسم برای اولین بار در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج بررسی حاضر نشان می دهد که بیان هم زمان گروه چپرونی GroEL/ES و DnaK/J (پلاسمید چپرونی pG-KJE8) و چپرون TF (پلاسمید چپرونی pTf16) سبب افزایش بیان کل محتوی پروتئینی نسبت به سایر پلاسمیدهای چپرونی شده اند. همچنین تولید پری پلاسمی پروتئین NGF نیز افزایش یافته است که می تواند به دلیل نقش چپرون های TF و DnaK در برخورد با زنجیره پروتئینی در حال ساخت و انتقال هم زمان با ترجمه به پری پلاسم باشد. با توجه به یافته های اخیر در مورد چپرون TF و همچنین دانستن این موضوع که پروتئین NGF از طریق انتقال وابسته به SRP به پری پلاسم منتقل می شود،

این نتایج دور از انتظار نمی باشد. TF به زنجیره پروتئینی در حال ساخت متصل شده، همچنین با حضور بیش از سه برابری آن نسبت به ریبوزوم و 300 برابری نسبت به SRP و دارا بودن جایگاه اتصال مشترک با SRP شانس بیشتری برای اتصال به پروتئین دارد. این رقابتی بین SRP و TF برای اتصال به زنجیره پروتئینی ایجاد کرده در نتیجه بعد از اتصال هر دو به نواحی آب گریز پروتئین و اتصال به گیرنده غشایی FtsY دفع TF را به دنبال داشته و پروتئین به پری پلاسم رفته و این عمل مجدداً تکرار می شود (34).

بیش از 70 درصد پروتئین ها توسط TF به فرم صحیح خود تبدیل می شوند که به دلیل حضور این چپرون همراه ریبوزوم و مقدار زیاد آن می باشد. در این نوع انتقال، TF به عنوان نگه دارنده¹ عمل کرده و سبب انتقال به مقدار زیاد به فضای پری پلاسمی می شود. در مطالعه ای که اثر چپرون های مختلف را بر بیان ScFv بررسی و مشاهده شده است که چپرون TF باعث افزایش تولید پری پلاسمی این پروتئین شده است اما تولید خارج سلولی آن کاهش یافته است (21). در تحقیقی دیگر در سال 2014 اثر مثبت چپرون TF بر روی تولید پروتئین کلاژن شبه انسانی نشان داده شده است (35). همچنین افزایش نسبی در تولید پری پلاسمی توسط پلاسمید چپرونی pG-KJE8 به دلیل فعالیت Holdase چپرون DnaK/J بوده که سبب خروج برخی از پروتئین های در حال تولید به پری پلاسم شده است و GroEL/ES نقشی در این انتقال ندارد، به دلیل اینکه چپرون به طور معمول در انتقال وابسته به Sec دخالت دارد. در سال 2016 افزایش قابل توجه در تولید سارکوزین اکسیداز در بیان هم زمان با پلاسمید چپرونی pG-KJE8 نیز گزارش شده است (36). با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی غلظت پروتئین تولید شده به صورت هم زمان با چپرون TF و گروه چپرونی

6. Zhou, H., Gong, Y., Liu, Y., Huang, A., Zhu, X., Liu, J., Liu, J. (2020). Intelligently thermoresponsive flower-like hollow nano-ruthenium system for sustained release of nerve growth factor to inhibit hyperphosphorylation of tau and neuronal damage for the treatment of Alzheimer's disease. *Biomaterials*. **237**, 119822.

7. Kawamoto, K., Matsuda, H. (2004) Nerve growth factor and wound healing. *Prog Brain Res*. **146**, 369-384.

8. Lambiase, A., Sacchetti, M., and Bonini, B. (2012) Nerve growth factor therapy for corneal disease. *Curr Opin Ophthalmol*. **23**, 296-302.

9. Paoletti, F., Malerba, F., Ercole, B. B., Lamba, D., and Cattaneo, A (2015) A comparative analysis of the structural, functional and biological differences between Mouse and Human Nerve Growth Factor. *Biochim. Biophys. Acta*. **1854**, 187-197.

10. Hajihassan, Z., Tilko, P. G., Sadat, S. M. (2018). Improved Production of Recombinant Human β -NGF in *Escherichia coli*-a Bioreactor Scale Study. *Pol j of microbiol*. **67**(3), 355.

11. Edwards, R. H., Selby, M. J., Mobley, W. C., Weinrich, S. L., Hruby, D. E., Rutter, W. J. (1988). Processing and secretion of nerve growth factor: expression in mammalian cells with a vaccinia virus vector. *Mol cell biol*. **8**(6), 2456-2464.

12. Dong, W., Li, C., Yang, Y., Wang, T. Wang, F. (2019). Increasing transgenic expression in recombinant Chinese hamster ovary cells using introns in different directions. *Chin j biotechnol*. **35**(6), 1071-1078.

13. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., D'Ari, R. (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. bacteriol. Res*. **189**, 8746-8749.

14. Burgess, R. R. (2009) Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods in enzymology*. **463**, 259-282.

15. Maksum, I. P., Lestari, A., Fauzia, R. P., Rachman, S. D., Soedjanaatmadja, U. M. (2019) *Escherichia coli* BL21 (DE3) expression system using TorA signal peptide for Recombinant Human Albumin (rHA) secretion. *Int. J. Res*. **10**(4), 3319-3324.

16. Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia*

DnaK/J و GroEL/ES، می توان نتیجه گرفت که این چپرون ها دارای عملکردی بهتر نسبت به سایر چپرون ها بوده و تأثیر بیشتری بر تولید پروتئین NGF داشته اند. بیان هم زمان پلاسمید چپرونی pG-KJE8 حاوی چپرون های GroEL/ES و DnaK/J دارای عملکرد کلی تری بوده است و تأثیر بیشتری بر بیان کل محتوی پروتئینی و تولید پروتئین NGF داشته است، این در حالی است که بیان هم زمان پلاسمید چپرونی pTf16 حاوی چپرون TF اختصاصی تر عمل کرده و میزان NGF بیشتری را به پری پلاسم منتقل کرده است. در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده می توان گفت چپرون TF تأثیر بیشتری در تولید پری پلاسمی پروتئین NGF داشته و نسبت به گروه چپرونی DnaK/J و GroEL/ES در انتقال NGF به پری پلاسم اختصاصی تر عمل کرده است.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان از دانشگاه تهران به دلیل حمایت مالی با شماره گرنت 28850/06/04 تشکر و قدردانی می کنند.

منابع:

1. Levi-Montalcini, R. (1987) the nerve growth factor: 35 years later (Nobel lecture). *Angewandte Chemie*. **26** (8), 707-716.

2. Alzheimer, C. (2012) (Ed.). *Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS*. Springer Science & Business Media.

3. Snider, W. D. (1994) Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us. *Cell*. **77** (5), 627.

4. Wang, W., Chen, J., Guo., X. (2014) The role of nerve growth factor and its receptors in tumorigenesis and cancer pain. *Biosci Trends*. **8**, 68-74.

5. Althaus, H. H. (2004) Remyelination in multiple sclerosis: a new role for neurotrophins?. *Prog Brain Res*. **146**, 415-432.

Protein Blotting. A Practical Approach, ed: IRL Press New York. 11-32.

28. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

29. Sadat, S. M., Z. Hajihassan, Z., Barshantashnizi, M., Abdi. M. (2018) Co-expression of recombinant human nerve growth factor with trigger factor chaperone in *E. coli*. *Nova Biol. Reperta.* **5**, 221-228.

30. Hajihassan, Z., Abdi, M., Roshani Yasaghi, E., Rabbani-Chadegani, A. (2017) Optimization of recombinant beta-NGF purification using immobilized metal affinity chromatography. *Minerva Biotechnol.* **29**, 126-132.

31. McGuire, J. C., Greene, L. A. (1979) Rapid stimulation by nerve growth factor of amino acid uptake by clonal PC12 pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* **254**, 3362-3367.

32. Derman, A. I., Prinz, W. A., Belin, D., Beckwith, J. (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science.* **262**, 1744-1747.

33. Huang, C. J., Lin, H., Yang, X. (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **39**, 383-399.

34. Puertas, J. M., Nannenga, B. L., Dornfeld, K. T., Betton, J. M., Baneyx, F. (2010) Enhancing the secretory yields of leech carboxypeptidase inhibitor in *Escherichia coli*: influence of trigger factor and signal recognition particle. *Protein Expr Purif.* **74**, 122-128.

35. Jia, Q., Fan, D., Ma, P., Ma, X., Xue, W. (2014) The different roles of chaperone teams on over-expression of human-like collagen in recombinant *Escherichia coli*. *J Taiwan Inst Chem Eng.* **45**, 2843-2850.

36. Tong, Y., Feng, S., Xin, Y., Yang, H., Zhang, L., Wang, W. (2016) Enhancement of soluble expression of codon-optimized Thermomicrobium roseum sarcosine oxidase in *Escherichia coli* via chaperone co-expression. *J. Biotechnol.* **218**, 75-84.

coli: advances and challenges. *Front Microbiol.* **5**, 172.

17. De Marco, A., De Marco, V. (2004) Bacteria co-transformed with recombinant proteins and chaperones cloned in independent plasmids are suitable for expression tuning. *J. Biotechnol.* **109**, 45-52.

18. Hartl, F. U., Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* **295**, 1852-1858.

19. Vabulas, R. M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M., X Hartl, R. M. (2010) Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Csh Perspect Biol.* **2**, a004390.

20. Hartl, F. U., Martin, J. (1995) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Curr Opin Struct Biol.* **5**, 92-102.

21. Sonoda, H., Kumada, H., Katsuda, T., Yamaji, H. (2011) Effects of cytoplasmic and periplasmic chaperones on secretory production of single-chain Fv antibody in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng.* **111**, 465-470.

22. Baneyx, F., Palumbo, J. L. (2003) *Improving heterologous protein folding via molecular chaperone and foldase co-expression in E. coli.* *Gene Expression Protocols*, ed: Springer. 171-197.

23. Saibil, H. (2013) Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature reviews Molecular cell biology.* **14**, 630-642.

24. Sambrook, J., Russelt, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Fourth edition. New York: Cold spring harbor laboratory press.

25. Libby, R. T., Braedt, G., Kronheim, S. R., March, C. J., Urdal, D. L., Chiaverotti, T. A. (1987) Expression and purification of native human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from an *Escherichia coli* secretion vector. *DNA.* **6**, 221.

26. U. K. Laemmli, (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.

27. De Maio, A. (1994) *Protein blotting and immunoblotting using nitrocellulose membranes*, in

The effect of cytoplasmic chaperones co-expression with recombinant human nerve growth factor in *E. coli*

Seyede Mahdie Sadat¹, Zahra Hajihassan^{1*}, Mohammad Barshan-tashnizi¹

1- Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

*Corresponding Author :hajihasan@ut.ac.ir

Postal code: 1439957131
Phone: +98 (21) 86093294
Fax: +98 (21) 88497324

Received: 2020/4/7

Accepted: 2021/4/3

Abstract:

Nerve growth factor (NGF) is a neurotrophic factor that is functional in survival, maintenance and differentiation of peripheral and central nervous system cells. This protein has three subunits that its beta subunit has main activity. According to scientific studies, it can be used as a therapeutic agent in treatment of many diseases such as peripheral neuropathy associated with diabetes, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, skin disease and so on. Prokaryotic expression of recombinant NGF should be done in the periplasmic space because of its oxidative environment. It is worth noting that co-expression of cytoplasmic molecular chaperones can facilitate the secretion of the recombinant proteins to the periplasmic space and also enhance the protein solubility.

In this study, the effect of cytoplasmic chaperones of GroEL / GroES, DnaK / DnaJ, GrpE, Trigger Factor (TF) on the periplasmic production of recombinant NGF protein was studied. For this purpose, β -NGF subunit was expressed in pET39b(+) expression vector simultaneously with chaperone plasmids pG-Tf2, pTf16, pGro7, pKJE7 and pG-KJE8 in *E. coli* DE3 strain. The results showed that in the presence of TF chaperone (pTf16 plasmid), the total protein and periplasmic production increased. Also, the DnaK/DnaJ and GroEL/GroES chaperones (pG-KJE8 plasmid) have also increased the production to some extent.; while the expression of GroEL/ GroES (pGro7) or DnaK / DnaJ (pKJE7) had no effect on protein expression. Also treatment of PC12 cell line with recombinant β -NGF showed differentiation to nerve cells which indicates that the produced protein is fully functional.

Keywords: cytoplasmic chaperones, recombinant nerve growth factor, PC12 cell line