

β 淀粉样蛋白₁₋₄₂质粒的构建及其与钙调蛋白的结合作用

齐爽¹, 孙旋旋¹, 王绮萱¹, 贺意婷¹, 李佳睿¹, 苏敬阳^{1,2}, 郝丽英¹

(中国医科大学药学院 1. 药物毒理学教研室; 2. 临床药理学教研室, 沈阳 110122)

摘要 目的 探讨 β 淀粉样蛋白₁₋₄₂($A\beta_{1-42}$)与钙调蛋白(CaM)的结合作用。方法 采用生物信息学方法获取阿尔茨海默病(AD)异常表达的核心基因,预测AD防治的潜在靶蛋白;通过基因重组的方法构建GST- $A\beta_{1-42}$ 重组质粒并进行DNA测序;琼脂糖凝胶电泳进行重组质粒的酶切鉴定;提取纯化GST- $A\beta_{1-42}$ 融合蛋白,SDS-PAGE凝胶电泳鉴定是否纯化成功;GST pull-down检测质粒表达的GST- $A\beta_{1-42}$ 蛋白与CaM的结合作用。结果 获取连接度排名前20的核心基因,将CaM作为靶蛋白;质粒的DNA测序结果证明重组质粒构建成功,琼脂糖凝胶电泳结果显示,酶切后的片段与 $A\beta_{1-42}$ 片段分子量大小理论值符合,进一步证明重组质粒构建成功;SDS-PAGE凝胶电泳结果显示GST- $A\beta_{1-42}$ 蛋白能够与CaM结合,并具有浓度依赖性。结论 $A\beta_{1-42}$ 重组质粒构建成功,且与CaM具有结合作用。

关键词 β 淀粉样蛋白; 质粒构建; 钙调蛋白; 结合能力; 活性鉴定

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)06-0495-06

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240529.1511.018>

DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2024.06.003

Construction of $A\beta_{1-42}$ plasmid and its binding to calmodulin

QI Shuang¹, SUN Xuanxuan¹, WANG Qixuan¹, HE Yiting¹, LI Jiarui¹, SU Jingyang^{1,2}, HAO Liying¹

(1. Department of Pharmaceutical Toxicology, School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110122, China; 2. Department of Clinical Pharmacology, School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110122, China)

Abstract Objective To investigate the involvement of calmodulin (CaM) in the pathogenesis of Alzheimer disease (AD) and the mechanism by which CaM binds to amyloid- β ($A\beta$). **Methods** The hub genes expressed in AD and predicted to be the target proteins for AD prevention and treatment were obtained using bioinformatics methods. The GST- $A\beta_{1-42}$ recombinant plasmid was constructed through genetic recombination and was then sequenced. The recombinant plasmids were identified using agarose gel electrophoresis, while the extracted and purified GST- $A\beta_{1-42}$ fusion protein was confirmed using SDS-PAGE gel electrophoresis. GST pull-down assay was used to detect the interaction between GST- $A\beta_{1-42}$ protein and CaM, expressed in the plasmid. **Results** The top 20 hub genes in degree ranking were obtained. The DNA sequencing results of the plasmid proved that the recombinant plasmid was successfully constructed. The agarose gel electrophoresis results indicated that the fragment digested by the enzyme was similar to the molecular weight of the $A\beta_{1-42}$ gene segments, further proving the successful construction of the recombinant plasmid. Binding of GST- $A\beta_{1-42}$ protein to CaM in a concentration dependent manner was revealed through the GST pull down experiment. **Conclusion** The GST- $A\beta_{1-42}$ recombinant plasmid is successfully constructed and is shown to bind to CaM.

Keywords amyloid- β ; plasmid construction; calmodulin; binding ability; activity identification

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种多原因导致的神经退行性疾病,临床表现为认知功能下降、行为障碍、记忆力受损等^[1]。目前AD的发病

机制尚不清楚,多数研究认为淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)代谢紊乱和 β 淀粉样蛋白(amyloid- β protein, $A\beta$)沉积是AD最早的分子驱动因素。APP水解主要基于 α 途径,少量APP被 β 分泌酶水解,产生不溶性 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 。与 $A\beta_{40}$ 相比, $A\beta_{42}$ 更先沉积于海马体、大脑皮质等神经元和毛细血管中,产生病理级联反应,导致斑块形成、神经纤维缠结(neuro fibrillary tangle, NFT)形成、tau蛋白异常磷酸化、突触丢失等,最终导致神经元死亡,故 $A\beta_{42}$

基金项目:辽宁省大学生创新训练项目(S202210159031, S20231015944, S202310159018);医学电生理学教育部重点实验室开放基金(KeyME-2019-07)

作者简介:齐爽(2000-),女,硕士研究生。

通信作者:苏敬阳, E-mail: jysu@cmu.edu.cn

收稿日期:2023-08-05

网络出版时间:2024-05-31 11:20:45

被认为与AD的关系更紧密^[2-4]。因此,本研究选择A β ₄₂作为研究对象,探讨其与钙调蛋白(calmodulin, CaM)的结合作用。

CaM是一种具有钙离子结合功能的蛋白,在长时程增强作用(long-term potentiation, LTP)、抑郁、记忆障碍和神经退行性疾病过程中发挥重要作用^[5]。研究^[6]发现,A β ₁₋₄₂与Ca²⁺/CaM存在直接相互作用,CaM与A β ₁₋₄₂结合能减缓A β 原纤维的形成。当AD发生时,神经元细胞内Ca²⁺浓度显著增高^[7]。钙超载状态下CaM与A β ₁₋₄₂之间的结合情况尚未见研究。因此,本研究利用基因表达综合(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库筛选高通量测序数据集,进行功能富集分析并获取核心基因,构建GST-A β ₁₋₄₂重组质粒,表达、提取、纯化GST-A β ₁₋₄₂融合蛋白,进而探讨GST-A β ₁₋₄₂蛋白与CaM的相互作用,以期为AD治疗提供新靶点、新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌BL21(DE3)(北京全式金生物公司); pGEX-6p-1/A β ₁₋₄₂(中国Sangon Biotech公司); 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、氨苄西林、溶菌酶(美国Sigma公司); Protein Molecular Weight Marker(日本TaKaRa公司); 限制性内切酶BamH I、Not I(美国Thermo Scientific公司); 胰蛋白酶、酵母提取物(中国Biosharp公司)。Bradford蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); SanPrep柱式抽提试剂盒(中国Sangon Biotech公司)。凝胶自动成像仪(DNR Bio-Imaging systems, 上海中晶科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学方法筛选核心基因、确定靶蛋白:GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中查询AD数据集,下载GSE173955高通量测序数据集,该数据集包括8例AD患者及10例健康人的样本。用GEO数据库GEO2R工具进行在线分析,筛选出差异常表达基因(differentially expressed gene, DEG)。以 $P < 0.05$ 和 $|\log_{2}FC| > 1$ 作为条件进行筛选,对生成的数据进行统计学分析,得到的基因为最终的DEG。使用DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对P值由小到大排名的前6 000个DEG进行基因本体(gene

ontology, GO)和京都基因和基因组数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析。将P值由小到大排名前200的DEG导入STRING数据库(<https://www.string-db.org/>)生成蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络图,并使用cytoscape得到各个基因的连接度,将连接度排名前20的基因定义为核心基因。

1.2.2 构建GST-A β ₁₋₄₂重组质粒:应用42 °C精确热激法将A β ₁₋₄₂质粒转化至大肠杆菌BL21感受态细胞。在含氨苄西林的LB固体琼脂培养板上均匀涂抹菌液,将培养板置于37 °C培养箱内倒置培养12~16 h。取单克隆菌种接种于含氨苄西林的LB培养液中,震荡培养12~16 h。保留菌种,置于高压灭菌含50 %甘油的EP管中,混匀并保存于-80 °C冰箱备用。取100 μ L菌种加入至含50 μ g/mL 氨苄西林LB培养液的培养基中,振荡12~16 h。当达到对数生长期,即OD_{600 nm}在0.6~1.0范围内时,加入400 μ L IPTG(终浓度为1 mmol/L),振荡4 h,诱导融合蛋白表达。

1.2.3 提取和纯化 GST-A β ₁₋₄₂融合蛋白:离心收集细菌,向菌液中分别加入20 mg/mL溶菌酶和1 mol/L DTT 200 μ L,冰上处理30 min。超声破碎细菌,12 000 r/min离心取上清,加入预先用PBS洗好的beads中,过夜孵育。

1.2.4 pull-down实验检测CaM与GST-A β ₁₋₄₂蛋白间的相互作用:向40 μ L 连接于GS-4B beads的GST-A β ₁₋₄₂融合蛋白中加入3 μ L 0.001 mol/L CaCl₂([Ca²⁺]=10 μ mol/L)和不同浓度的CaM(终浓度分别为0.1、0.3、1.0、3.0、5.0、10.0 μ mol/L),在300 μ L 体系的Tris 缓冲液(pH8.0)中,4 °C孵育4 h,用相应浓度的Ca²⁺缓冲液清洗2次。用考马斯亮蓝对经15% SDS-PAGE电泳的蛋白凝胶染色,脱色2 h,扫描胶图检测CaM与GST-A β ₁₋₄₂蛋白间有无相互作用。

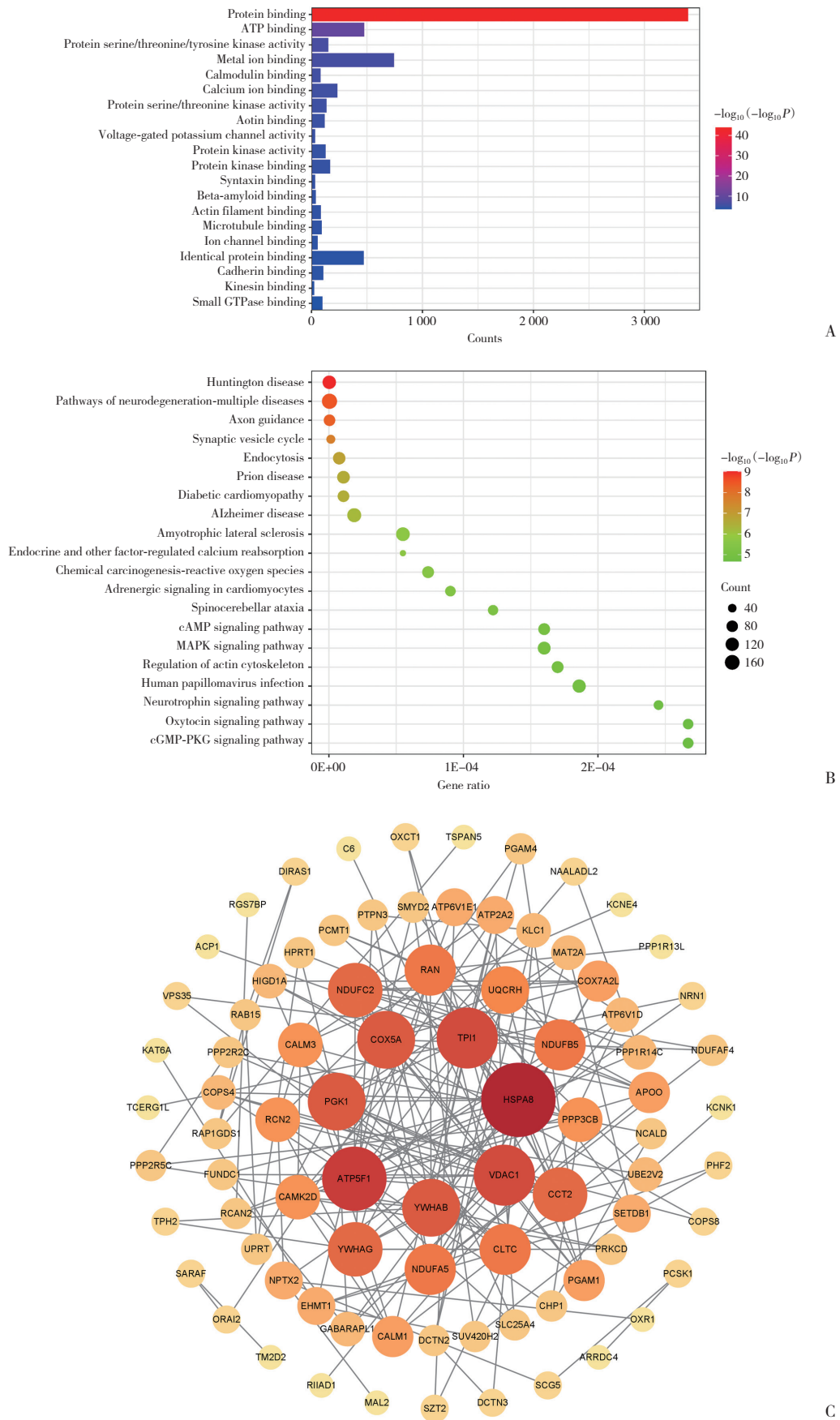
1.3 统计学分析

使用ImageJ软件统计SDS-PAGE电泳条带的灰度值,应用GraphPad Prism 8软件绘制柱形图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选核心基因并确定靶蛋白(图1)

通过GEO2R获得20 731个DEG,进一步筛选



A, the GO enrichment items of DEGs (MF) ; B, the KEGG pathway enrichment results of DEGs; C, PPI network of DEGs.

图1 生物信息学筛选AD核心基因

Fig.1 The hub genes expressed in AD obtained by bioinformatics methods

后按P值由小到大排序选前6 000个基因进行GO和KEGG分析。如图1A所示,GO分析DEG分子功能主要富集在蛋白结合、ATP结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、金属离子结合、钙调蛋白结合、钙离子结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、肌动蛋白结合、电压门控钾通道活性等;如图1B所示,KEGG分析DEG主要富集在亨廷顿病、多种神经退行性疾病通路、轴突导向、突触囊泡循环、细胞内吞作用、朊病毒病、糖尿病性心肌病、AD、肌萎缩侧索硬化症等。将前200个DEG导入STRING数据库生成PPI网络图,用cytoscape将数据可视化,获取连接度排名前20的核心基因,如图1C所示,包括HSPA8(连接度=16)、ATP5F1(连接度=13)、VDAC1(连接度=12)、TPI1(连接度=12)、YWHAB(连接度=11)、PGK1(连接度=11)、COX5A(连接度=11)、CCT2(连接度=10)、YWHAG(连接度=10)、NDUFC2(连接度=

10)、NDUFA5(连接度=9)、CLTC(连接度=9)、RAN(连接度=9)、NDUFB5(连接度=9)、UQCRRH(连接度=8)、CALM3(连接度=7)、RCN2(连接度=7)、CAMK2D(连接度=7)、PPP3CB(连接度=7)、CALM1(连接度=6)。通过分析发现CALM3、CAMK2D、CALM1都参与编码CaM,故将CaM作为靶蛋白进行后续实验验证。

2.2 Aβ₁₋₄₂重组质粒的酶切鉴定

Aβ₁₋₄₂重组质粒的DNA测序结果如图2所示,经Pubmed核酸比对软件进行比对分析,重组质粒的碱基与基因库碱基比对,两者同一性为100%,且插入方向正确,读码方向正确,密码子无突变、缺失,测序结果证明本研究重组质粒构建成功。重组质粒经BamH I /Not I 双酶切后,如图3所示,Aβ₁₋₄₂基因片段分子量大小与理论值符合,进一步说明重组质粒构建成功。

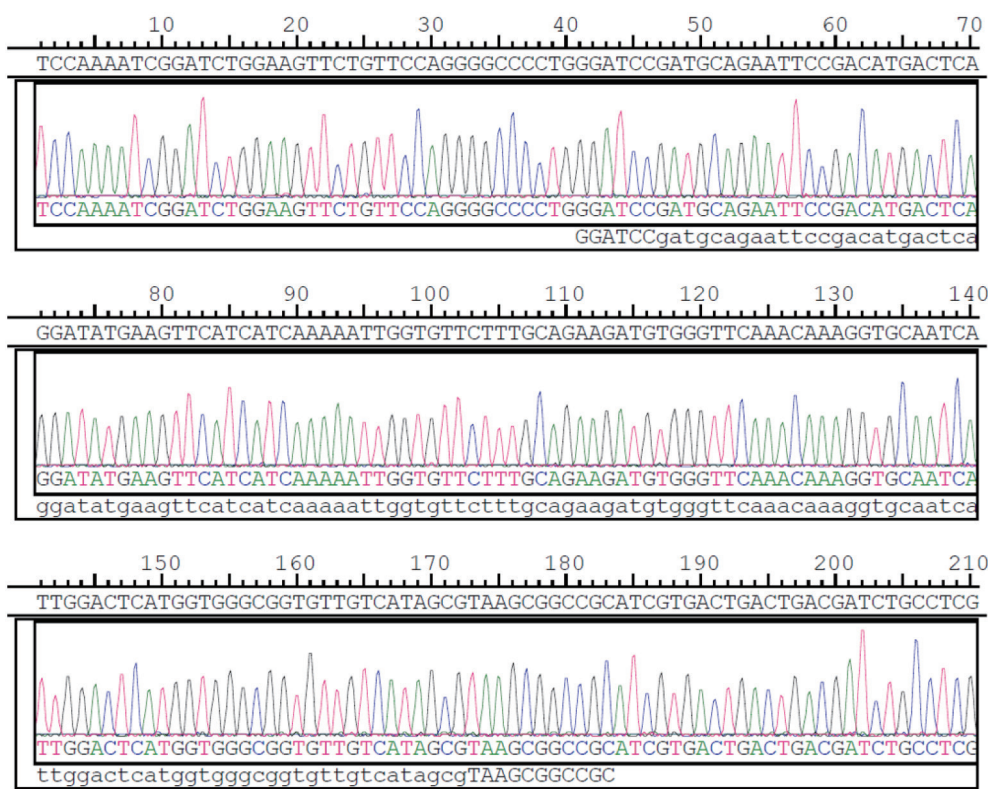


图2 Aβ₁₋₄₂重组质粒测序结果图

Fig.2 Verification of Aβ₁₋₄₂ recombinant plasmid by DNA sequencing

2.3 GST-Aβ与CaM的结合作用

在2 mmol/L Ca²⁺条件下,共同孵育不同浓度CaM蛋白(0.1,0.3,1.0,3.0,5.0,10.0 μmol/L)和纯化

后的GST-Aβ₁₋₄₂融合蛋白,pull-down实验结果如图4所示,CaM蛋白能与GST- Aβ₁₋₄₂蛋白结合,且具有浓度依赖性。

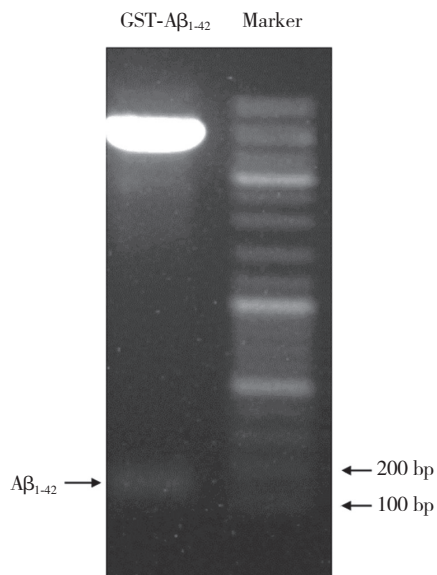


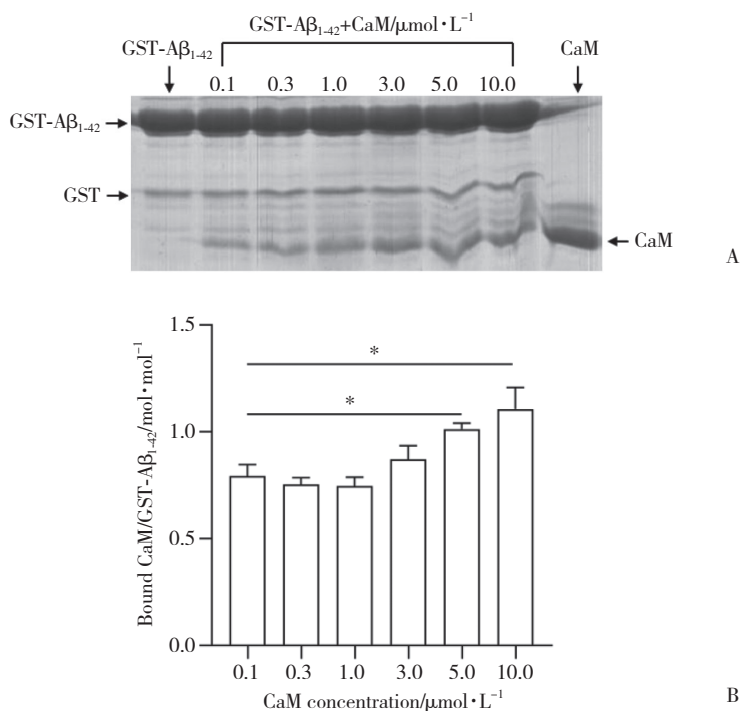
图3 重组Aβ₁₋₄₂质粒酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Validation of Aβ₁₋₄₂ recombinant plasmid construction by agarose gel electrophoresis of restriction enzyme digests

3 讨论

随着全球人口老龄化,AD给社会和家庭带来的问题愈加严重。目前,仍然缺乏治疗AD的特效药物。钙调蛋白假说作为钙假说的延伸,表明了钙调蛋白参与Aβ蛋白形成与发展的过程。与产生Aβ的相关蛋

白均具有特定的钙调蛋白结合域,且能够与CaM结合并受其调节。尽管AD发病机制尚未明确,但一直以来Aβ假说都是解释AD发病机制的一个重要理论基础和研究依据^[8]。Aβ斑块和NFT被广泛认为是AD的2个核心特征。有大量证据表明,CaM在Aβ斑块形成的早期发挥重要作用^[9-10]。研究发现,CaM的干扰可能减少Aβ斑块的产生。BACE1不仅与CaM结合,且其活性通过CaM以剂量依赖性方式显著增加。CaM除能与产生Aβ的酶结合外,还能直接与Aβ₁₋₄₂本身结合^[11]。当Aβ₁₋₄₂与CaM结合时,Aβ不能抑制脑质膜Ca²⁺-ATPase并阻止Ca²⁺进入细胞。以上研究结果表明,在淀粉样蛋白斑块形成途径中,Aβ₁₋₄₂和CaM之间存在明显的联系,Ca²⁺水平的失衡与Aβ产生相互促进,CaM在这种相互作用中起着非常重要的作用^[13]。研究^[12-13]证实,CaM/Ca²⁺与CaMK II结合使其磷酸化才能发挥CaMK II的记忆功能,而AD患者脑内CaM含量明显减少,导致AD患者记忆能力下降。前期研究已证实CaM能够与Aβ相互作用,减缓Aβ纤维原的形成,在此基础上,本研究创新性地证实了在钙超载的条件下CaM与Aβ₁₋₄₂的结合作用,更进一步地证明了两者的结合呈浓度依赖性,其结合量随着CaM浓度的增加而增加。



A, concentration-dependent binding of GST- Aβ₁₋₄₂ to CaM; B, statistical analysis of CaM binding to GST- Aβ₁₋₄₂. *P < 0.01.

图4 GST-Aβ₁₋₄₂与CaM的pull-down实验分析结果

Fig.4 Pull down assay to assess binding of GST- Aβ₁₋₄₂ to CaM

虽然近年来AD患者数量不断增加,但其治疗方法并没有显著进展。Aduhelm(阿杜那单抗)是自2003年以来首个获批用于AD的新型疗法,而在此之前仅有几款药物用于缓解AD,包括多奈哌齐、加兰他敏、卡巴拉汀、美金刚,以及多奈哌齐和美金刚的复方制剂^[14]。2019年由我国自主研发的创新药甘露特钠胶囊获批上市,用于治疗轻度或中度AD。然而,这些药物都是用于改善或预防AD的发生和发展,并不能精准有效地遏制AD的发展。2023年1月美国食品药品监督管理局批准仑卡奈单抗(lecanevab)用于治疗AD,它从根本上解决了AD病因——清除淀粉样斑块,进而改善患者早期的认知障碍^[15-16]。已有文献^[5]报道,CaM与 $A\beta_{1-42}$ 结合可影响LTP,导致学习和记忆障碍,但目前尚未见以CaM为靶点的AD治疗药物。迄今为止,几乎所有的临床试验都是单一治疗试验,鉴于AD的复杂性,未来联合用药可能成为治疗AD的趋势^[14]。

综上所述,本研究发现,GST- $A\beta_{1-42}$ 蛋白能够与CaM结合,且具有浓度依赖性,为AD治疗药物潜在作用靶点的研究提供了新思路。

参考文献:

- [1] GE MQ,ZHANG JH,CHEN SM,et al. Role of calcium homeostasis in Alzheimer's disease [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*,2022,18:487-498. DOI:10.2147/ndt.s350939.
- [2] HEFTER D,LUDEWIG S,DRAGUHN A,et al. Amyloid,APP,and electrical activity of the brain [J]. *Neuroscientist*,2020,26(3):231-251. DOI:10.1177/1073858419882619.
- [3] MONTAGNA E,CRUX S,LUCKNER M,et al. In vivo Ca^{2+} imaging of astrocytic microdomains reveals a critical role of the amyloid precursor protein for mitochondria [J]. *Glia*,2019,67(5):985-998. DOI:10.1002/glia.23584.
- [4] FRISONI GB,ALTOMARE D,THAL DR,et al. The probabilistic model of Alzheimer disease:the amyloid hypothesis revised [J]. *Nat Rev Neurosci*,2022,23(1):53-66. DOI:10.1038/s41583-021-00533-w.
- [5] O'DAY DH. Calmodulin and amyloid beta as coregulators of critical events during the onset and progression of Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*,2023,24(2):1393. DOI:10.3390/ijms24021393.
- [6] VISCONTE C,CANINO J,GUIDETTI GF,et al. Amyloid precursor protein is required for in vitro platelet adhesion to amyloid peptides and potentiation of thrombus formation [J]. *Cell Signal*,2018,52:95-102. DOI:10.1016/j.cellsig.2018.08.017.
- [7] MCDAID J,MUSTALY-KALIMI S,STUTZMANN GE. Ca^{2+} dyshomeostasis disrupts neuronal and synaptic function in Alzheimer's disease [J]. *Cells*,2020,9(12):2655. DOI:10.3390/cells9122655.
- [8] KARRAN E,DE STROOPER B. The amyloid hypothesis in Alzheimer disease:new insights from new therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*,2022,21(4):306-318. DOI:10.1038/s41573-022-00391-w.
- [9] O'DAY DH. Calmodulin and amyloid beta as coregulators of critical events during the onset and progression of Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*,2023,24(2):1393. DOI:10.3390/ijms24021393.
- [10] SALAZAR J,POEJO J,MATA AM,et al. Design and experimental evaluation of a peptide antagonist against amyloid β (1-42) interactions with calmodulin and calbindin-D28k [J]. *Int J Mol Sci*,2022,23(4):2289. DOI:10.3390/ijms23042289.
- [11] FRISONI GB,ALTOMARE D,THAL DR,et al. The probabilistic model of Alzheimer disease:the amyloid hypothesis revised [J]. *Nat Rev Neurosci*,2022,23(1):53-66. DOI:10.1038/s41583-021-00533-w.
- [12] POEJO J,SALAZAR J,MATA AM,et al. The relevance of amyloid β -calmodulin complexation in neurons and brain degeneration in Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*,2021,22(9):4976. DOI:10.3390/ijms22094976.
- [13] ZALCMAN G,FEDERMAN N,ROMANO A. CaMK II isoforms in learning and memory:localization and function [J]. *Front Mol Neurosci*,2018,11:445. DOI:10.3389/fnmol.2018.00445.
- [14] CUMMINGS JL,TONG G,BALLARD C. Treatment combinations for Alzheimer's disease:current and future pharmacotherapy options [J]. *J Alzheimers Dis*,2019,67(3):779-794. DOI:10.3233/jad-180766.
- [15] VAN DYCK CH,SWANSON CJ,AISEN P,et al. Lecanevab in early Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*,2023,388(1):9-21. DOI:10.1056/nejmoa2212948.
- [16] MCDADE E,CUMMINGS JL,DHADDA S,et al. Lecanevab in patients with early Alzheimer's disease:detailed results on biomarker,cognitive,and clinical effects from the randomized and open-label extension of the phase 2 proof-of-concept study [J]. *Alzheimers Res Ther*,2022,14(1):191. DOI:10.1186/s13195-022-01124-2.

(编辑 王又冬)