

مطالعه تاثیر دنباله‌های تمایلی بر میزان فیبریلاسیون آمیلوئیدی پروتئین‌ها در شرایط *In silico* و برون تنی

In silico and *in vitro* analysis about effects of the affinity tags on the rate of amyloid fibrillation of proteins

جعفر فلاحي^۱، دینا مرشدی^{*۱}

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

Falahi J¹, Morshedi D^{*1}

1. Graduate Student and Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: morshedi@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۹ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۸)

چکیده

امروزه مطالعه تجمع غیر طبیعی پروتئین‌ها مورد توجه محققین حوزه‌های مختلف علوم به ویژه پزشکی و زیست فناوری قرار گرفته است. تجمع فیبریل‌های آمیلوئیدی پروتئین‌ها می‌تواند در بروز بیماری‌های مهمی از جمله آلزایمر، دیابت قندی نوع II و پارکینسون نقش داشته باشد. در زیست فناوری از مشکلات اصلی تولید طیف وسیعی از پروتئین‌ها و پلی‌پپتیدهای نوترکیب تجمع برگشت‌ناپذیر در حین خالص‌سازی می‌باشد. در پروتئین‌های نوترکیب معمولاً دنباله‌هایی در انتهای کربوکسیل یا انتهای آمینی قرار می‌دهند که می‌توانند در ساختار، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین‌ها تاثیر بگذارند. تاکنون مطالعه جامعی بر روی تاثیر این دنباله‌ها در تمایل تجمع‌پذیری پروتئین‌های نوترکیب انجام نگرفته است. در این مطالعه اثر دنباله‌های مختلف در تمایل تجمع‌پذیری پروتئین‌های نوترکیب با الگوریتم بیوانفورماتیکی AGGRESCAN مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌ها نشان داد که دنباله‌ها می‌توانند بر روی تجمع‌پذیری پروتئین‌های نوترکیب اثر بگذارند. برای تعیین صحت نتایج پیش‌گویی، فرآیند تجمع و فیبریلاسیون پروتئین آلفاسینوکلئین به همراه دنباله هیستیدینی و بدون دنباله با روش‌های AFM، CD و فلوریمتری و استانداردهای ویژه فیبریل‌های آمیلوئیدی بررسی شد. آلفا سینوکلئین از پروتئین‌های مهمی است که تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی گسترده‌ای در بیماری‌های نورودجنریتیو می‌دهد. برنامه بیوانفورماتیکی نشان داد که دنباله اضافه شده توانست باعث افزایش تمایل پروتئین برای فیبریلاسیون شود. در مطالعه برون تنی داده‌های حاصل از تجزیه فرآیند فیبریلاسیون نیز موید همین مسئله بود و نشان داد که حضور دنباله موجب افزایش میزان فیبریلاسیون آلفاسینوکلئین شد. در نتیجه پیشنهاد می‌شود، در بسیاری مطالعات، به ویژه مطالعات مربوط به چگونگی بیماری‌زایی یا جستجوی داروهای مهارکننده فیبریلاسیون بهتر است که دنباله‌ها از پروتئین حذف شوند.

واژه‌های کلیدی

آلفاسینوکلئین
پروتئین نوترکیب
پیشگویی تجمع یافتگی
دنباله هیستیدینی
فیبریلاسیون

مقدمه

داشته باشد (Hochuli 1988; Porath et al. 1975). دنباله پلی هیستیدین عموماً دارای ۶ هیستیدین بصورت متوالی و یک محل برای برش پروتئازهای ویژه مثل پروتئاز TEV می‌باشد. در گزارشات نشان داده شده که بیش از ۶۰ درصد از کل ساختارهای کریستالی پروتئین‌های مطالعه شده همراه با دنباله پلی هیستیدین هستند (Raines et al. 2000; Derewenda 2004).

تجمع پروتئین‌ها موضوعی کلیدی در زیست فناوری و علوم پزشکی محسوب می‌شود (Fink 1998; Smith 2003). در بیوتکنولوژی تجمع یافتگی از مشکلات اصلی تولید طیفی از پروتئین‌ها نوترکیب می‌باشد که می‌تواند عمر مفید پروتئین را کاهش داده و ایمنی‌زایی داروهای پلی‌پپتیدی را افزایش دهد (Treuheit et al. 2002; Ventura and Villaverde 2006). در علوم پزشکی تجمع‌یافتگی باعث ایجاد بیماری‌های مهمی در انسان از جمله بیماری آلزایمر، دیابت قندی نوع II و پارکینسون می‌شود (Rochet and Lansbury 2000; Dobson 2002; Cohen 2003; Kelly 2003; Stefani and Dobson 2003). اوروی شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که تمایل پروتئین به تجمع تا حد زیادی به ترکیب و ساختار اولیه پلی‌پپتید وابسته است و تغییرات کوچک می‌تواند تاثیر عظیمی بر روی تمایل پروتئین به تجمع داشته باشد. برخی از نواحی توالی‌های اسید آمینه‌های بسیار کوتاه می‌توانند به عنوان تسهیل‌کننده تجمع و تشکیل فیبریل‌ها عمل کنند (Ivanova et al. 2004; Ventura et al. 2004). این توالی‌ها معمولاً به عنوان "نقاط داغ"^۷ شناخته شده‌اند که اکثراً شامل اسید آمینه‌های آبرگیز و آروماتیک هستند. اهمیت این نواحی در بیشتر پپتیدها و پروتئین‌هایی که در اختلالات آمیلوئیدوزنیک سیستمی و تحلیل برنده عصبی دخالت دارند، ثابت شده است (Conchillo-Solé et al. 2007).

پروتئین‌های مستعد تجمع از ساختار دوم و یا سوم مشابهی تبعیت نمی‌کنند و برخی از آنها پروتئین‌هایی با ساختارهای دوم و سوم پایدار هستند. از جمله پروتئین β_2 -میکروگلوبولین^۸ که در آمیلوئیدوزیز مرتبط با دیالیز^۹ نقش دارد (Otsubo et al. 2009).

مهندسی پروتئین علمی است که با روش‌های مختلف موجب ایجاد ویژگی خاصی در پروتئین هدف می‌شود از جمله تغییر ساختار و عملکرد، همچنین تلفیق بخش‌های مختلف از پروتئین‌های مختلف که می‌تواند منجر به افزودن یک ویژگی خاص در پروتئین هدف شود. یکی از پرکاربردترین تغییرات در مهندسی پروتئین اضافه کردن دنباله‌های تمایلی به پروتئین‌های نوترکیب به منظور تسهیل در خالص‌سازی و افزایش تولید است (Porath et al. 1975; Hochuli 1988). دنباله‌های تمایلی به طور معمول در انتهای کربوکسیل یا انتهای آمینی پروتئین‌های نوترکیب قرار داده شده تا بازیافت و خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب از محتوای سلولی میزبان با سرعت و سهولت بیشتری انجام گیرد. از این دنباله‌ها می‌توان به پروتئین (ProtA)، گلوکاتینون S-ترانسفراز^۱ (GST)، پلی هیستیدین (His-tag^۲ × 6)، پروتئین متصل شونده به مالتوز^۳ (MBP)، تیوردوکسین A (TrxA)، دومین متصل شونده به کیتین^۴ (CBD)، S-پپتید^۵، دنباله‌های اپیتوپ^۵، دنباله Strep II^۶ نام برد. اندازه و خصوصیات فیزیکوشیمیایی دنباله‌های افزوده شده متفاوت می‌باشد. اندازه دنباله پروتئین A حدود ۳۰ کیلو دالتون، گلوکاتینون S-ترانسفراز حدود ۲۶ کیلو دالتون، پروتئین متصل شونده به مالتوز حدود ۴۰ کیلو دالتون، تیوردوکسین A حدود ۱۱/۶ کیلو دالتون، دومین متصل شونده به کیتین حدود ۵/۶ کیلو دالتون، S-پپتید حدود ۱/۶ کیلو دالتون، دنباله Strep II حدود ۸/۸ کیلو دالتون می‌باشد (Waugh 2005; Arnau et al. 2006).

مطالعات اخیر نشان داده که دنباله‌های مذکور می‌توانند موجب تحمیل ویژگی جدید در پروتئین هدف شده و بر روی ساختار (Woostenek et al. 2000; Halliwell 2001) و فعالیت زیستی پروتئین هدف اثر بگذارند (Chant et al. 2005). متداول‌ترین و پرکاربردترین دنباله‌ها دنباله پلی هیستیدینی می‌باشد که جزء کوچکترین دنباله‌ها می‌باشد و انتظار می‌رود اثر کمی بر روی اندازه کلی، ساختار و ایمنی‌زایی پروتئین

¹ Glutathione S-transferases

² Maltose-binding protein

³ Chitin-binding domain

⁴ S-peptide

⁵ Epitope tags

⁶ Strep II tag

⁷ Hot spot

⁸ β_2 -microglobulin

⁹ Dialysis-related amyloidosis

مطالعه شده است (Wurth et al. 2002; De groot 2006; Kim and Hecht 2006; Winkelmann et al. 2010).

الگوریتم AGGRESCAN یکی از بهترین آنها محسوب می‌شود و نتایج آزمایشگاهی و پیش‌گویی حاصل از آن بیشترین تطابق را با یکدیگر داشته است (Belli et al. 2011). اساس کار این الگوریتم مقدار بار الکتریکی و هیدروفوبیسیته محل مورد نظر است (Conchillo-Solé et al. 2007). با الگوریتم AGGRESCAN همچنین می‌توان اثر تغییر توالی روی تجمع پلی‌پپتید را پیش‌بینی کرد و ترکیباتی برای توالی‌های مورد هدف طراحی کرد که در درمان آمیلوئیدوزنیز حائز اهمیت است. در همین راستا انتخاب داروهایی که می‌توانند این میانکنش‌ها را مهار کنند با ابزارهایی مانند داکینگ در نواحی نقاط داغ مهم می‌باشد (Conchillo-Solé et al. 2007).

امروزه یکی از راه‌های درمانی بیماری پارکینسون مهار تشکیل فیبریل‌ها و تجمعاتی است که در اثر اختلالات ژنتیکی یا محیطی در پروتئین آلفاسینوکلئین ایجاد می‌شود که به کارگیری الگوریتم AGGRESCAN در این زمینه می‌تواند مفید باشد.

پروتئین آلفاسینوکلئین در سیستم اعصاب مرکزی بیان می‌شود (Chalabi 2009). انتهای آمینی آن (اسیدآمینه ۶۰-۱) دوگانه دوست بوده (Hashimoto 2001) که سه جهش دخیل در ایجاد بیماری پارکینسون ارثی در این ناحیه رخ می‌دهند. ناحیه میانی (اسیدآمینه ۹۵-۶۱) دارای آمینواسیدهای آگریز بوده (Hashimoto 2002) که آلفاسینوکلئین را قادر به تشکیل فیبریل می‌نماید (Goedert 2001). انتهای کربوکسیلیک آن شامل آمینواسیدهای ۱۴۰-۹۶ می‌باشد (Hsu 2000) که باقیمانده‌هایی با بار منفی در این ناحیه فراوان است. پروتئین آلفاسینوکلئین در حالت بیماری از حالت مونومری خارج شده و موجب تشکیل پرتوفیبریل‌ها و فیبریل‌ها می‌شود (Clark and Jenkins 2005). در حالت فیبریل، ساختار صفحات بتا^۴ تشکیل می‌شود (Bellucci et al. 2012). الیگومرها و پرتوفیبریل‌هایی که در روند تشکیل فیبریل‌های بالغ تشکیل می‌شوند برای سلول سمی هستند بیشترین نقش را در تحلیل رفتن نورون‌ها دارند (Volles 2002; Mosharov et al. 2006).

پروتئین ترانس‌تیرتین^۱ در اثر جهش در بافت‌های مختلفی تجمعات تجمعات آمیلوئیدی را ایجاد می‌کند (Coelho et al. 2012). انسولین که در موضع تزریق در بیماران دیابتی موجب تشکیل اجسام آمیلوئیدی می‌شود (Shikama et al., 2010)، هانتینگتون که در بیماری هانتینگتون دخالت دارد (Wanker 2000)، پرویون که در بیماری جنون گاوی و کروتز فلد جاکوب نقش دارد (Adriano and Anna 2009) و همچنین پروتئین p53 که جدیداً مشاهده شده در اثر جهش تمایل به تجمع شدن و تشکیل گونه‌های شبه آمیلوئیدی می‌کند (Ano Bom et al. 2012). ولی بسیاری از پروتئین‌ها و پپتیدهای دخالت‌کننده در بیماری‌های آمیلوئیدوزین بصورت ذاتی ساختار نامنظمی داشته یا دارای بخش‌های غیر ساختاری هستند از جمله آ-بتا آمیلوئید که عامل اصلی بیماری آلزایمر محسوب می‌شود (Masters et al. 1985)، پروتئین تائو که باعث ایجاد تجمعات آمیلوئیدی درون سلولی در بیماری آلزایمر می‌شود (Margittai and Langen 2004)، آمیلین^۲ که با بیماری دیابت نوع دو مرتبط است (Hayden and Tyagi 2001).

توانایی پیش‌بینی جایگاه‌های مستعد تجمع در پروتئین‌ها می‌تواند در حوزه بیوتکنولوژی و پزشکی بسیار ارزشمند باشد. با توجه به اهمیت تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی شناخت مکانیسم‌هایی که به واسطه آن پروتئین‌ها از حالت محلول خود به فیبریل‌های آمیلوئیدی تبدیل می‌شوند، مهم می‌باشد. در این زمینه، از طریق ابزارهای بیوانفورماتیکی می‌توان جنبه‌های اساسی فرآیند تجمع مثل مناطقی از پروتئین که در تشکیل فیبریل‌ها دخالت دارند و اثر جهش‌ها در این نواحی را پیش‌بینی کرد (Belli et al. 2011).

مطالعات گسترده‌ای برای طراحی الگوریتم‌هایی^۳ به منظور شناسایی نواحی مستعد برای تجمع در پروتئین‌ها صورت پذیرفته است. از الگوریتم‌های مهم معرفی شده برای مطالعه بخش‌های داغ می‌توان به AGGRESCAN (Conchillo-Solé et al. 2007)، PASTA (Trovalo et al. 2007)، FoldAmiloid (Sergiy et al. 2010)، Zyggregator (Gaetano and Michele 2008) اشاره کرد. در صد تطابق ویژگی‌های آمیلوئیدوزنیک در یک پروتئین با پیش‌گویی حاصل از این الگوریتم‌ها توسط گروه‌های مختلفی

¹ Transthyretin amyloidosis

² Amylin

³ Algorithm

CBP:MKRRWKKNFIAVSAANRFKISSSGALSSGVDLGTE
NLYFQ^S**His-tag:** M HHHHHH SSGVDLGTEENLYFQ^S**FLAG:** MDY KDDDDK SSGVDLGTEENLYFQ^S**HA:** M YPYDVPDYA SSGVDLGTEENLYFQ^S**Myc:** MEQKLISEEDL SSGVDLGTEENLYFQ^S**Strep II:** MWSHPQFEK SSGVDLGTEENLYFQ^S**SBP:** MDEKTTGWRGGHVVEGLAG ELEQLRARLEH

HPQGQREPSSGVDLGTEENLYFQ^S

S-peptide:

MKETAAAKFERQHMDSSSGVDLGTEENLYFQ^S

CBD: MTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKC

LQPHTSLAGWEPNSVPALWQLQSSGVDLGTEENLYFQ^S

جایگاه برش آنزیم های برشی دیگر:

Other proteases: Thrombin(LVPR^GS), Factor Xa (I(E/D)GR ^X), PreScission™ (ETLFQ^GP)

توالی پروتئین آلفاسینوکلئین دارای دنباله هیستیدینی و بدون این دنباله بصورت زیر می‌باشد:

His-syn>swissprot| P37840 | SYUA_HUMAN/ Alpha-synucleinMHHHHHHSSGVDLGTEENLYFQSMDFMKGLSKAK
EGVVAEAEKTKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKE
GVVHGVTTVAEKTKEQVTNVGEAVVTGVTAVAQK
TVEGAGSIAAATGFGKDKDQLGKNEEGAPQEGILED
MPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA**Non his -syn**>swissprot| P37840 | SYUA_HUMAN
/Alpha-synuclein;MDVFMKGLSKAKEGVVAEAEKTKQGVAAEAGKT
KEGVLYVGSKTKEGVVHGVTTVAEKTKEQVTNVG
EAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAAT

بیان پروتئین آلفا سینوکلئین حاوی His-tag و پروتئین آلفا سینوکلئین فاقد این توالی

باکتری BL21(DE3) pLysS حاوی پلاسمید pNIC با ژن آلفا سینوکلئین در محیط کشت¹ LB کشت داده شد و پس از اینکه دانسیته نوری آن به ۰/۵-۰/۷ رسید، توسط IPTG با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار القا شد و به مدت ۱۶ الی ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه گرما دهی شد. پس از گرمادهی از هر سه نمونه (باکتری حاوی ژن دارای His-tag، باکتری حاوی ژن اما فاقد این توالی و باکتری بدون القا با IPTG) نمونه‌برداری و بر روی ژل SDS-PAGE برده شد و برای

¹ Luria-Bertani medium

در این مطالعه اثر دنباله‌های مختلف در تجمع پروتئین‌های نوترکیب توسط الگوریتم بیوانفورماتیکی AGGRESCAN پیش‌گویی و مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه نتایج پیش‌گویی و نتایج عملی، فرآیند تجمع و فیبریلایسیون پروتئین آلفاسینوکلئین بررسی شد که نقش اساسی در ایجاد بیماری پارکینسون دارد. پروتئین آلفاسینوکلئین دارای توالی His-tag و پروتئین آلفاسینوکلئین بدون این توالی بصورت نوترکیب تهیه شد. فیبریلایسیون هر دو پروتئین با تست‌های استاندارد تایید شد.

مواد و روش‌ها

تیوفلاوین تی یا ThT (Thioflavin T)، کنگو رد (Congo red)، سدیم آزید، کوکتل مهارکننده پروتئاز، کانامایسین، کلرامفینیکل، IPTG، آنتی بادی مونوکلونال اولیه، آنتی بادی ثانویه نشاندار با پراکسیداز و کیسه دیالیز از شرکت سیگما (St. Louis Mo) و تریس و نمک‌ها از شرکت مرک (Merck-Germany-Darmstadt) تهیه شد.

پیش‌گویی توالی‌های دخیل در فرآیند فیبریلایسیون (*in silico*) برای سهولت امر خالص‌سازی در ابتدا یا انتهای پروتئین‌های نوترکیب دنباله‌های تمایلی قرار می‌دهند که در ادامه این دنباله‌ها جایگاه برشی برای پروتئازهای ویژه وجود دارد. در این مطالعه توالی‌های مربوط به دنباله‌های Z domain، CBP، FLAG، HA، Strep II، Myc، S-peptide، CBD، His-tag، توالی‌های برشی پروتئازها و هم چنین توالی پروتئین آلفاسینوکلئین دارای His-tag و بدون His-tag در فرمت FASTA از داده پایگاه ebi در بخش Swissprot/uniprot گرفته شد و به سرور Aggrescan به آدرس اینترنتی <http://bioinf.uab.es/aggrescan/> داده شد و نتایج مورد ارزیابی قرار گرفت. دنباله‌های ذکر شده به همراه توالی برشی آنزیم TEV پروتئاز می‌باشند که توالی هر کدام در زیر آمده است.

TEV protease: SSGVDLGTEENLYFQ^S**Z domain:**MVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLK
DDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKSSGVDLGTEENLY
FQ^S

کنگورد توانایی اتصال به صفحات بتا را دارد که برای ارزیابی تشکیل یا عدم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی یا شبه آمیلوئیدی از محلول تازه تهیه شده آن استفاده شد. طیف جذب نوری کنگورد در فاصله ۶۰۰-۴۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. افزایش جذب نوری کنگورد و تغییر رنگ از نارنجی به قرمز به عنوان یکی از معیارهای تشکیل فیبریل آمیلوئیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

عکس میکروسکوپ نیروی اتمی AFM^۲

از روش AFM برای اثبات حضور الیگومرها و فیبریل‌ها استفاده شد. این روش دارای قدرت تفکیک بالا (در حد نانومتر) و توانایی گرفتن شکل سه بعدی می‌باشد. در این روش می‌توان اولیگومرها که در زمان‌های اولیه فیبریل‌اسیون تشکیل می‌شوند، نیز مشخص کرد.

نتایج و بحث

برای پیشگویی نواحی مستعد تجمع از برنامه AGGRESCAN استفاده شد. الگوریتم این برنامه بر اساس داده‌های برون تنی و تاثیر جهش‌های مختلف بر روی تمایل پروتئین‌ها و قطعات پپتیدی سنتز شده به تجمع بنا شده است و به این صورت تمایل هر باقی‌مانده برای شرکت در تجمع یک امتیاز خاص خواهد داشت. ورودی AGGRESCAN توالی پلی‌پپتیدی در فرمت FASTA است. توالی هر کدام از دنباله‌ها به همراه جایگاه برشی آنزیم TEV پروتئاز (ENLYFQ^۳S) است که مجموع آنها به AGGRESCAN داده شد. همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود محور X بر اساس ترتیب توالی اسیدآمینهای می‌باشد و محور Y شدت hot spot بودن توالی‌ها یا به عبارتی میزان تمایل برای تجمع‌یافتگی را نشان می‌دهد. نواحی که تمایل به تجمع دارند بصورت پیک‌های مجزا مشخص می‌شود. همه دنباله‌ها به خاطر حضور توالی‌های مربوط به جایگاه برشی تمایل به تجمع‌یافتگی دارند اما دنباله‌های CBD، CBP، SBP و Zdomain بیشترین تمایل به تجمع را دارند زیرا علاوه بر جایگاه برشی توالی‌های دیگری نیز دارند که تمایل به تجمع‌یافتگی را به شدت افزایش می‌دهند.

تایید پروتئین‌ها از لکه گذاری وسترن استفاده شد. در مرحله خالص‌سازی از روش ذکر شده در کارهای پیشین (Morshedi and Aliakbari 2012) استفاده شد.

الفا فیبریل‌اسیون در شرایط برون تنی^۱ آلفاسینوکلئین یکی از پروتئین‌هایی است که در حالت طبیعی مونومر و بدون ساختار ثانویه منظم است اما در شرایط بیماری به فیبریل‌های با ساختار منظم صفحات بتا تبدیل می‌شود که تحت شرایط ویژه‌ای در آزمایشگاه می‌توان این ساختارها را القا کرد. برای الفا فیبریل‌اسیون از هر دو پروتئین دارای His-tag و بدون His-tag به مقدار ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برداشته شد و در بافر مربوطه که شامل تریس ۳۰ میلی‌مولار، pH=۷/۲، EDTA ۰/۴ میلی‌مولار، PMSF دو میلی‌مولار، NaCl ۸۰ میلی‌مولار بود، حل شد و در سیستم القا فیبریل‌اسیون که شامل گرماگذاری در دمای ۳۷°C با چرخش بوده است به مدت ۲۴ ساعت گذارده شد. در تمام مدت با استفاده از آهن ربای میله‌ای ریز تفلونی محلول با سرعت ثابت ۸۰ دور در دقیقه هم زده شد.

نشر فلورسانس تیوفلاوین T

تیوفلاوین تی یا ThT توانایی اتصال به ساختار صفحات بتا را دارد که در صورت انجام فرآیند فیبریل‌اسیون، از طریق نشر نور فلورسانس تایید می‌شود (Nilsson 2004). ThT در بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار pH=۸ رقیق شد. ۱۰ میکرولیتر نمونه فیبریل به ۴۹۰ میکرولیتر ThT رقیق شده اضافه و نشر فلورسانس در بازه ۴۵۰ تا ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. افزایش شدت نشر تیوفلاوین تی بعنوان تشکیل احتمالی فیبرهای آمیلوئیدی یا شبه آمیلوئیدی تفسیر می‌شود.

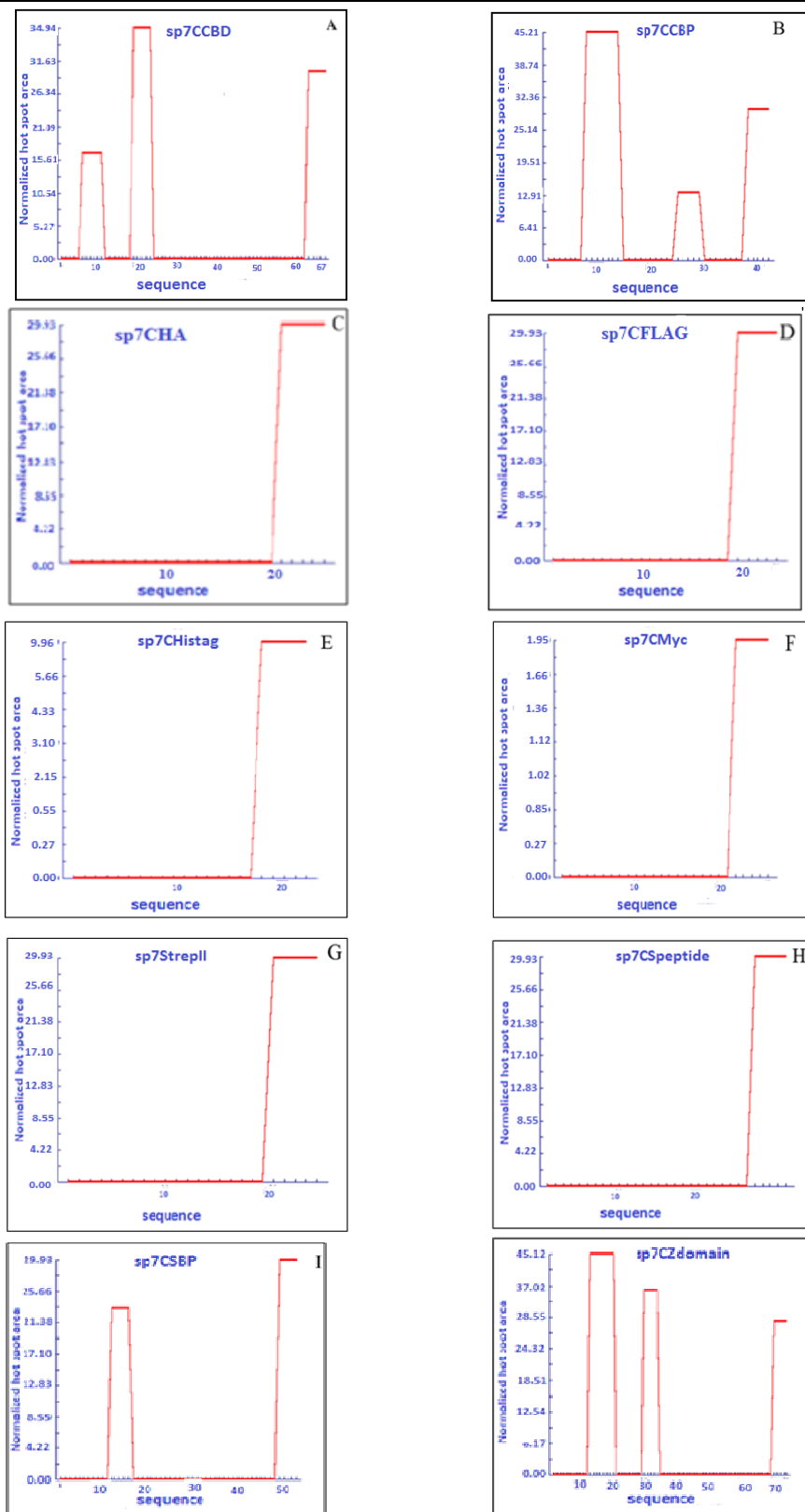
تصویر برداری میکروسکوپ فلورسانس

از این روش برای اثبات وجود فیبریل‌ها استفاده شد. به اندازه ۱۵ میکرولیتر، از نمونه فیبریلی انکوبه شده به ۱۵ میکرولیتر محلول رقیق شده ThT اضافه و به خوبی مخلوط شدند. نمونه روی لام ریخته و روی آن لامل قرار داده شد و با میکروسکوپ فلورسانس بررسی و عکس مورد نظر تهیه شد.

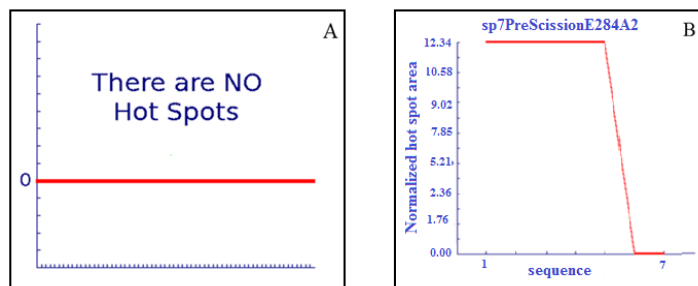
جذب نوری کنگورد

^۲ Atomic force microscopy

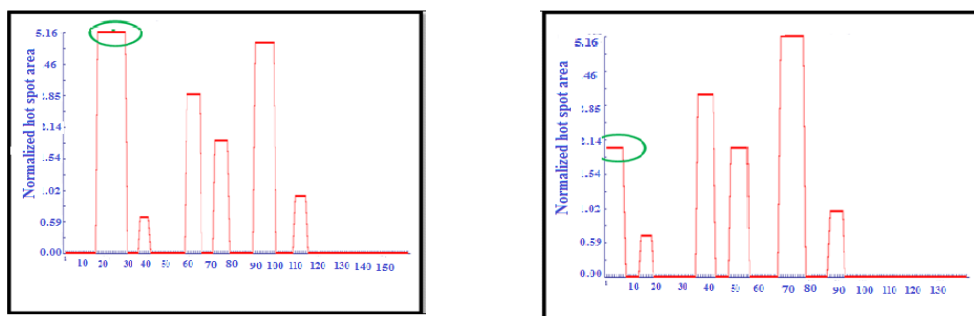
^۱ In vitro



شکل ۱- نمودارهای Aggrecan برای دنباله‌ها. محور X بر اساس ترتیب توالی اسیدآمینه‌ای می‌باشد و محور Y شدت hot spot بودن توالی‌ها را نشان می‌دهد. (A) دنباله CBD؛ (B) دنباله CBP؛ (C) دنباله CHA؛ (D) دنباله FLAG؛ (E) دنباله His-tag؛ (F) دنباله Myc؛ (G) دنباله StrepII؛ (H) دنباله S-peptid؛ (I) دنباله Zdomain؛ (J) و SBP دنباله



شکل ۲- نمودارهای Aggrecan مربوط به سه آنزیم Thrombin، Factor Xa و PreScission™ (A) توالی برشی مربوط به آنزیم‌های Factor و Thrombin و Xa که هیچ نقاط داغی ندارند و در تجمع پروتئین اثری ندارد؛ (B) PreScission™ به شدت تمایل پروتئین به تجمع را زیاد می‌کند.



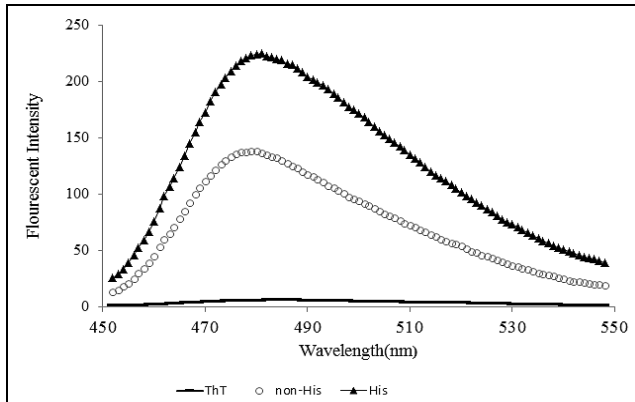
شکل ۳- نمودارهای Aggrecan مربوط به آلفاسینوکلئین. محور X بر اساس ترتیب توالی اسیدآمینه‌ای می‌باشد و محور Y شدت hot spot بودن توالی‌ها را نشان می‌دهد. نمودار سمت چپ مربوط به آلفاسینوکلئین دارای His-tag و نمودار سمت راست مربوط به آلفاسینوکلئین بدون His-tag می‌باشد. میزان تمایل تجمع در بخشی که با حلقه سبز نشان داده شده در نمودار سمت راست ۵/۱۶ و در نمودار سمت چپ ۲/۱۴ می‌باشد.

است که از دنباله‌هایی استفاده شود که کمترین اثر را در تجمع داشته باشد که هم از ایجاد تجمعات در حین خالص‌سازی بکاهد و هم در مطالعات مربوط به فرایندهای آمیولیدی شدن تاثیر نداشته باشد.

برای پیش‌گویی اثر حضور دنباله His-tag در القا تجمع پروتئین آلفاسینوکلئین، توالی مربوط به آلفاسینوکلئین دارای His-tag و بدون His-tag نیز بررسی شد (شکل ۳). در هر دو نمودار، ۶ پیک مشاهده می‌شود که ۵ پیک در آنها مشترک است. تنها اختلاف آنها در پیک شماره یک می‌باشد که در نمودار سمت چپ که مربوط به آلفاسینوکلئین دارای His-tag است، افزایش شدت hot spot بودن به عبارتی میزان تمایل برای تجمع یافتگی به دلیل حضور His-tag به همراه جایگاه برش دهی محسوس است ولی در نمودار سمت راست که مربوط به آلفاسینوکلئین بدون His-tag است، چنین شدتی مشاهده نمی‌شود. بنابراین انتظار می‌رود حضور و عدم حضور توالی His-tag در فرآیند تجمع و فیبریلاسیون موثر باشد.

پیک‌های ایجاد شده برای هر کدام از این دنباله‌ها نشان می‌دهد که توالی‌های خاصی در این دنباله‌ها مستعد تجمع یافتگی هستند. لازم به ذکر است که در ادامه هر کدام از دنباله‌ها توالی برشی برای آنزیم TEV پروتئاز گذاشته شده است که علاوه بر توالی دنباله، این توالی برشی (ENLYFQ^S) نیز باعث القا تجمع می‌شود. اثر حضور این جایگاه برشی در همه دنباله‌ها باعث افزایش تمایل پروتئین به تجمع می‌شود.

برای مقایسه اثر جایگاه برشی آنزیم‌های مختلف با توجه به شکل ۲ توالی‌های برشی آنزیم‌های Thrombin، Factor Xa و PreScission™ نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج حاکی از آن است که توالی‌های برشی Thrombin، Factor Xa در القا تجمع پروتئین اثری ندارند اما توالی برشی PreScission™ و همینطور TEV پروتئاز به شدت تمایل پروتئین را به تجمع افزایش می‌دهد. بنابراین توالی برشی TEV پروتئاز و PreScission™ در القا تجمع موثر می‌باشد اما توالی‌های برشی Thrombin، Factor Xa اثری ندارند. در مهندسی پروتئین بهتر

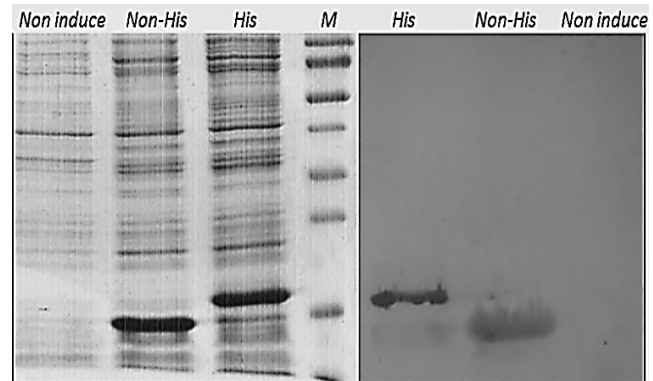


شکل ۵- نشر فلورسانس تیوفلاوین تی فیبریل‌ها (▲) آلفاسینوکلئین دارای His-tag (○) و آلفاسینوکلئین بدون His-tag.

تصاویر میکروسکوپ فلورسانس نشان‌دهنده تشکیل ساختارهای گسترده فیبریلی از پروتئین است که دارای نشر فلورسانس است (شکل ۶). فیبریل‌های آمیلوئیدی به دلیل داشتن ساختارهای منظم در نور مرئی تقریباً شفاف بوده و به سختی مشاهده می‌شود. چنانچه در شکل نشان داده شده نمونه‌ها در نور مرئی کمتر قابل مشاهده است. رنگ سبز حضور فیبریل‌ها زیر نور فلورسانس را ثابت می‌کند که در نور مرئی مشاهده نمی‌شود. مقایسه دو نوع پروتئین با دنباله و بدون دنباله نشان می‌دهد که ساختارهای شبکه شکل در هر دو نوع پروتئین تشکیل شده است و تفاوتی از نظر قالب ساختاری مشاهده نمی‌شود.

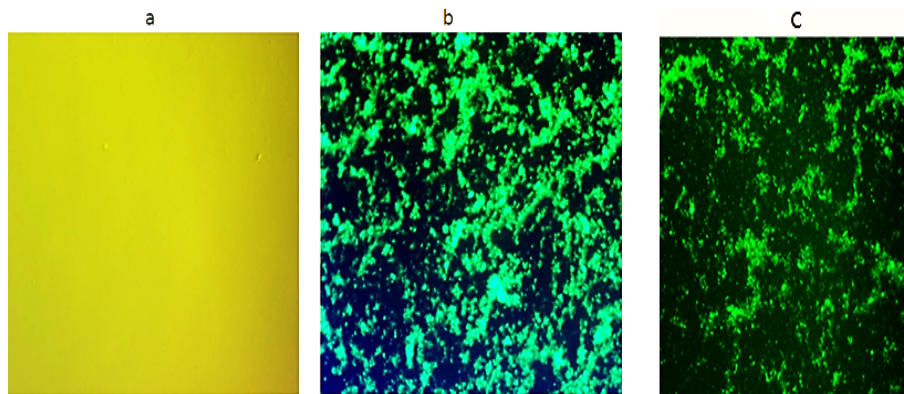
آلفاسینوکلئین در حالت مونومری ساختار منظم ثانویه‌ای ندارد اما در حالت فیبریل ساختار صفحه بتا به خود می‌گیرد. کنگورد توانایی اتصال به ساختار صفحات بتای موجود در فیبریل‌ها را دارد، لذا از کنگورد به عنوان شناساگر حضور فیبریل استفاده می‌شود (شکل ۷). فیبریل باعث تغییر رنگ کنگورد از نارنجی به قرمز می‌شود که برای هر دو پروتئین آلفاسینوکلئین اتفاق افتاد. تغییر طیف جذبی ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر حاصل از انکوباسیون ۲۴ ساعت در شکل ۸ نشان می‌دهد که مقدار جذب آلفاسینوکلئین دارای His-tag از آلفاسینوکلئین بدون His-tag بیشتر می‌باشد که اثر حضور توالی His-tag در روند تجمع و فیبریلاسیون را نشان می‌دهد.

توالی cDNA مربوط به هر کدام از پروتئین‌ها در وکتور بیانی pNIC-28 قرار دارند. پس از کشت باکتری، بیان توسط IPTG القا شد. اندازه آلفا سینوکلئین حاوی His-tag حدود ۱۶ کیلو دالتون و آلفا سینوکلئین بدون His-tag حدود ۱۴ کیلو دالتون است. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود دو پروتئین بیان شده و با آنتی بادی‌های اختصاصی تایید شدند. اختلاف وزن ملکولی در آن دو محسوس است.



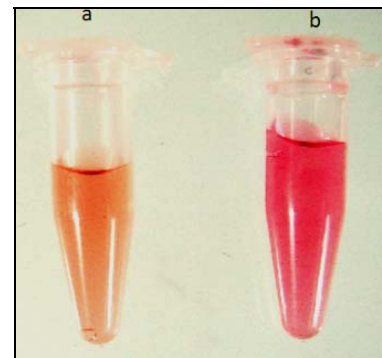
شکل ۴- SDS-PAGE (سمت چپ) و لکه‌گذاری وسترن (سمت راست) مربوط به بیان پروتئین آلفاسینوکلئین همراه و بدون توالی His-tag (M). نشانگر وزن ملکولی؛ Non-His) عصاره باکتری دارای پروتئین بدون توالی پلی‌هیستیدینی؛ His) عصاره باکتری دارای پروتئین حاوی توالی پلی‌هیستیدینی؛ Non induce) باکتری قبل از القا با IPTG.

برای رهگیری فرآیند فیبریلاسیون در نمونه‌های پروتئینی گرمادهی شده از سنجش نشر فلورسانس ThT که بصورت ویژه به فرم‌های فیبریلی متصل می‌شود، استفاده شد. ThT به تنهایی نشری ندارد اما زمانی که فیبریل به آن اضافه شود در محدوده ۴۵۰-۵۵۰ نانومتر دارای نشر می‌شود. نتایج حاکی از شکل‌گیری ساختارهای فیبریلی از نوع صفحات بتا است (شکل ۵). میزان نشر آلفاسینوکلئین دارای His-tag بیشتر از آلفاسینوکلئین بدون His-tag است که نشان می‌دهد دنباله His-tag باعث افزایش معنی‌داری در تجمع و فیبریلاسیون می‌شود که این نتیجه تایید کننده نتایج پیش‌گویی در شکل ۳ می‌باشد که این تفاوت می‌تواند به علت وجود یک ناحیه مستعد تجمع در بخش برشی باشد.

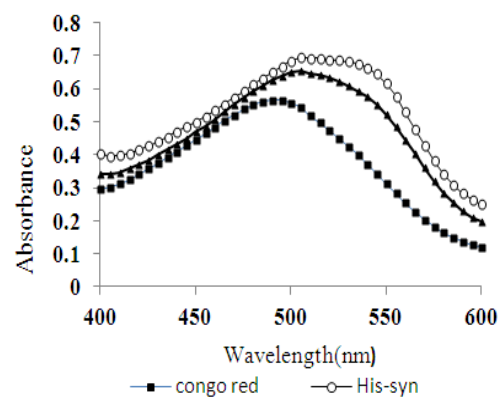


شکل ۶- بررسی فیبریل‌های آلفاسینوکلئین با استفاده از عکس فلورسانس تیوفلاوین تی. نمونه‌های فیبریلی در حضور ThT (a) در نور مرئی؛ (b) در نور فلورسانس پروتئین دارای His-tag (c) در نور فلورسانس پروتئین بدون His-tag.

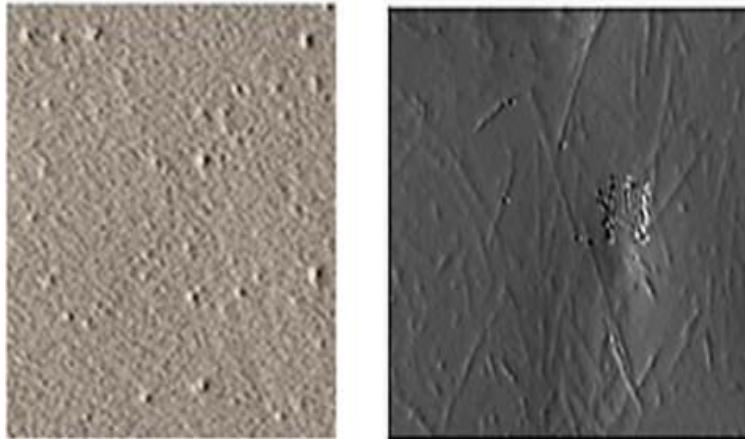
با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی می‌توان جزئیات بیشتری از مدل نانوفیبریل‌های تشکیل شده بدست آورد. روند تشکیل اولیگومرها و فیبریل‌ها (شکل ۹) در مراحل مختلف ساختارهای تجمع‌ی متفاوتی دارند. با گذشت زمان فیبریل‌ها شکل گرفته و از مونومرها کاسته می‌شود و پروتئین آلفاسینوکلئین در اثر انکوباسیون به فیبریل‌ها تبدیل می‌شود. در ساعت‌های اولیه انکوباسیون گونه‌های حد واسط اولیگومری تشکیل می‌شوند. ساختارهای دو پروتئین تفاوتی نشان ندادند که اینجا تنها نمونه‌ای از پروتئین با دنباله نشان داده شده است. در زیست فناوری برای سهولت در تخلیص پروتئین‌های نو ترکیب دنباله‌هایی در انتهای توالی ژن پروتئین مورد نظر قرار می‌دهند که این دنباله‌ها می‌توانند روی ساختار پروتئین و خصوصیت فیزیکوشیمیایی آن اثر بگذارند. یکی از پرکاربردترین این دنباله‌ها، دنباله پلی‌هیستیدینی می‌باشد. در این مطالعه با استفاده از الگوریتم بیوانفورماتیکی AGGRESCAN مربوط به پیش‌گویی نقاط با تمایل بالا برای تجمع مشخص شد که از میان ده دنباله‌ای که به صورت معمول در مهندسی پروتئین استفاده می‌شود دنباله‌هایی مانند CBD، CBP، Zdomain، SBP و آنزیم برش‌دهنده مانند Precission موجب اضافه شدن مناطق به شدت مستعد برای تجمع می‌شوند. برای تعیین میزان صحت داده‌های بیوانفورماتیکی از یک مدل پروتئینی استفاده شد. آلفا سینوکلئین پروتئینی است که در انسان با تشکیل پلاک‌های وسیع آمیلوئیدی موجب بیماری‌های تحلیل برنده



شکل ۷- بررسی فیبریل‌های آلفاسینوکلئین با استفاده از کنگورد. (a) کنگورد به عنوان کنترل نارنجی رنگ می‌باشد؛ (b) کنگورد به همراه فیبریل‌های آمیلوئیدی ناشی از پروتئین آلفاسینوکلئین که قرمز می‌شود.



شکل ۸- طیف جذبی کنگورد. (○) آلفاسینوکلئین دارای His-tag بیشترین جذب را دارا می‌باشد. (▲) آلفاسینوکلئین بدون His-tag و (■) کنگورد به عنوان کنترل.



شکل ۹- عکس AFM از مراحل مختلف تجمعات آلفاسینوکلئین (a) اولیگومرهای ۱۵ ساعته؛ (b) نمونه پروتئین انکوبه شده ۲۴ ساعته که رشته‌های فیبریل بوضوح مشخص می‌باشد.

منابع

- Adriano Aguzzi, Anna Maria Calella (2009) Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases. *The American Physiological Society* 89:1105-52
- Ano Bom AP, Rangel LP, Costa DC, de Oliveira GA, Sanches D, Braga CA, Gava LM, Ramos CH, Cepeda AO, Stumbo AC, De Moura Gallo CV, Cordeiro Y, Silva JL (2012) Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: Implications for cancer. *Journal of Biological Chemistry* 10; 28152-62.
- Arnau J, Lauritzen C, Petersen, G E, Pedersen J (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 48: 1-13.
- Belli M, Ramazzotti M, Fabrizio Chiti (2011) Prediction of amyloid aggregation in vivo. *European Molecular Biology Organization Reports* 12:657 - 663.
- Bellucci A, Zaltieri M, Navarria L, Grigoletto J, Missale C, Spano P (2012) From α -synuclein to synaptic dysfunctions: new insights into the pathophysiology of parkinson's disease. *Brain Research* 2:1476:183-202.
- Chalabi AL (2009) Genetic variants of the alpha-synuclein gene snca are associated with multiple system atrophy. *Plos One* 4: 7114.
- Chant A, Kraemer-Pecore CM, Watkin R, Kneale GG (2005) Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Protein Expression and Purification* 39: 152-159.
- Clark rs bH, Jenkins lw (2005) Posttranslational protein modifications. *Critical Care Medicine* 33: 407-409.
- Coelho T, Maia LF, Martins da Silva A, Waddington Cruz M, Plante-Bordeneuve V, Lozeron P, Suhr OB, Campistol JM, Conceicao IM, Schmidt HH (2012) Tafamidis for transthyretin familial amyloid polyneuropathy: a randomized, controlled trial. *Neurology* 79:785-792

سیستم عصبی به ویژه پارکینسون می‌شود. در این مطالعه نشان داده شد که با پیشگویی توسط الگوریتم AGGREGSCAN وجود دنباله هیستیدینی به همراه جایگاه برشی یک منطقه به شدت مستعد تجمع در پروتئین اضافه می‌شود. همچنین مطالعات آزمایشگاهی بر روند فرآیند فیبریلایسیون بر روی پروتئین آلفاسینوکلئین حاوی His-tag و بدون توالی His-tag بررسی شد. نتایج حاکی از آن بود که این دنباله موجب افزایش سرعت تجمع و فیبریلایسیون پروتئین آلفا سینوکلئین شد که با نتایج پیشگویی مطابقت دارد. با توجه به این مطالعه در تحقیقات برون‌تنی که به منظور روشن شدن بیشتر بیماری‌های آمیلوئیدوزیز و همچنین غربالگری ترکیباتی که پتانسیل مهار فیبریلایسیون دارند، توصیه می‌شود یا از پروتئین‌های بدون دنباله استفاده شود که روند فیبریلایسیون تغییر نکند و یا از دنباله‌هایی استفاده شود که کمترین تاثیر را در فرآیند تجمع و فیبریلایسیون پروتئین دارند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی ۴۵۵ پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام شده است. همچنین نویسندگان از آقای فرهنگ علی‌اکبری برای همکاری در انجام مطالعات برون تنی کمال تشکر را دارند.

- Cohen FE, Kelly JW (2003) Therapeutic approaches to protein-mis-folding diseases. *Nature* 426:905-9909.
- Conchillo-Solé O, Groot N, Avilés F, Vendrell J, Da,ura X, Ventura S (2007) AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics* 8:65.
- de groot nS, aviles FX, Vendrell J, Ventura S (2006) Mutagenesis of the central hydrophobic cluster in a β 42 alzheimer's peptide. Side-chain properties correlate with aggregation propensities. *Federation of European Biochemical Societies journal* 273: 658-668.
- Derewenda ZS (2004) The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. *Methods* 34: 354-363.
- Dobson CM (2002) Protein-misfolding diseases: Getting out of shape. *Nature* 418:729-7730.
- Fink AL (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and Design* 3: 9-23.
- Gian Gaetano Tartaglia, Michele Vendruscolo (2008) The Zyggregator method for predicting protein aggregation propensities. *Royal Society of Chemistry* 37:1395-1401.
- Goedert M (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neuroscience* 2:492-5017.
- Goel A, Colcher D, Koo JS, Booth BJ, Pavlinkova G, Batra SK (2000) Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct. *Biochimica et Biophysica Acta* 1523: 13-20.
- Halliwell CM, Morgan G, Ou CP, Cass AE (2001) Introduction of a (poly) histidine tag in L-lactate dehydrogenase produces a mixture of active and inactive molecules. *Analytical Biochemistry* 295:257-261.
- Hashimoto mEA (2001) Beta-synuclein inhibits alpha-synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor. *Neuron* 32: 213-223.
- Hashimoto mEA (2002) Alpha-synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-jun n-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry* 277:11465-11472.
- Hayden MR, Tyagi SC (2001) "A" is for amylin and amyloid in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Pancreas* 2: 124-39.
- Hochuli E (1988) a Large-scale chromatography of recombinant proteins. *Journal of Chromatography*, 444: 293-302.
- Hsu JEA (2000) Alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *American Journal of Pathology* 157: 401-4108.
- Ivanova MI, Sawaya MR, Gingery M, Attinger A, Eisenberg D (2004) An amyloid-forming segment of 2-microglobulin suggests a molecular model for the fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 10584-10589.
- Kim W, Hecht MH (2006) generic hydrophobic residues are sufficient to promote aggregation of the alzheimer's a β 42 peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103:15824-15829.
- Mj Volles, pTLJ (2002) Vesicle permeabilization by proto fibrillar alpha-synuclein is sensitive to parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* 41: 4595-602
- Margittai M., Langen, R (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101:10278-10283.
- Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neuro-fibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO Journal* 4: 2757-2763 (In Farsi).
- Morshedi D, Aliakbari F (2012) The inhibitory effects of cuminaldehyde on the amyloid fibrillation and cytotoxicity of alpha-synuclein. *Modares Journal of Medical Science* 15:45-60.
- Mosharov EV, Staal RG, Bové J, Prou D, Hananiya A, Markov D, Poulsen N, Larsen KE, Moore CM, Troyer MD, Edwards RH, Przedborski S, Sulzer D (2006) Alpha-synuclein over expression in creases cytosolic catecholamine concentration. *Journal of Neuroscience* 26: 9304-9311
- Nilsson MR (2004) Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 34: 151-60.
- Porath j, carlsson j, olsson i, belfrage g (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258: 598-599.
- Raines RT, McCormick M, Van Oosbree TR, Mierendorf RC (2000) The s.tag fusion system for protein purification. *Methods Enzymology* 326:362-376.
- Rochet JC, Lansbury PT (2000) Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Current Opinion in Structural Biology* 10:60-668.
- Sergiy O, Garbuzynskiy Michail Yu, Lobanov Oxana V, Galzitskaya (2010) FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence. *Bioinformatics* 26: 326-332.
- Shigeru Otsubo, Naoki Kimata, Ichiro Okutsu, Kazunori Oshikawa, Syuitsu Ueda, Hisayuki, Sugimoto, Michihiro Mitobe, Keiko Uchida, Kimiko Otsubo, Kosaku Nitta, Takashi Akiba (2009) Characteristics of dialysis-related amyloidosis in patients on haemodialysis therapy for more than 30 years. *Nephrology Dialysis Transplant* 24:1593-1598
- Shikama Y, Kitazawa J, Yagihashi N, Uehara O, Murata Y, Yajima N, Wada R, Yagihashi S (2010) Localized amyloidosis at the site of repeated insulin injection in a diabetic patient. *International Medicine* 49:397-401.
- Smith A (2003) protein misfolding. *Nature* 426:883-8883.
- Stefani M, Dobson CM (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of Molecular Medicine* 81:678-699.
- Treuheit MJ, Kosky AA, Brems DN (2002) Inverse relationship of protein concentration and aggregation. *Pharmaceutical Research* 19: 511-516.
- Trovato A, Seno F, Tosatto S (2007) The PASTA server for protein aggregation prediction. *Protein Engineering, Design and Selection* 20:521-523.

Ventura S, Villaverde A (2006) Protein quality in bacterial inclusion bodies. Trends Biotechnology 24:179-185.

Ventura S, Zurdo J, Narayanan S, Parreno M, Mangues R, Reif B, Chiti F, Giannoni E, Dobson CM, Aviles FX, Serrano L (2004) Short amino acid stretches can mediate amyloid formation in globular proteins: the Src homology 3 (SH3) case. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101:7258 -77263.

Wanker EE (2000) Protein aggregation and pathogenesis of Huntington's disease: mechanisms and correlations. Chemistry 381:937-42

Waugh DS (2005) Making the most of affinity tags. Trends Biotechnology 23:316-320.

Winkelman J, Calloni G, Campioni S, Mannini B, Taddei N, Chiti F (2010) Low-level expression of a folding-

incompetent protein in *Escherichia coli*: search for the molecular determinants of protein aggregation *in vivo*. Journal of Molecular Biology 398:600-613.

Woestenenk EA, Hammarstrom M, van den Berg S, Hard T, Berglund H (2004) His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: A comparison between four expression vectors. Journal of Structure and Functional Genomics 5: 217-229.

Wurth C, Guimard NK, Hecht MH (2002) Mutations that reduce aggregation of the Alzheimer's β 42 peptide: an unbiased search for the sequence determinants of β amyloidogenesis. Journal of Molecular Biology 319:1279-1290.