

## 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 فلاحتی<sup>۱</sup>، دینا مرشدی<sup>\*۱</sup>

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

Falahi J<sup>1</sup>, Morshedi D<sup>\*1</sup>

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 آלצהیر، دیابت قندی نوع II و پارکینسون نقش داشته باشد. در زیست فناوری از مشکلات اصلی تولید طیف وسیعی از پروتئین‌ها و پلی‌پیتیدهای 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 تأثیر بگذارند. تاکنون مطالعه جامعی بر روی تأثیر این دنباله‌ها در تمایل تجمع پذیری پروتئین‌های نوترکیب با الگوریتم بیوانفورماتیکی AGGRESCAN مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌ها نشان داد که دنباله‌ها می‌توانند بر روی تجمع پذیری 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 فلوریومتری و استانداردهای ویژه فیبریل‌های آمیلوئیدی بررسی شد. آلفاسینوکلئین از پروتئین‌های مهمی است که تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی گستردگی در بیماری‌های نورودگنریتیو 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 یافتنگی
- دباله هیستیدینی
- فیبریلاسیون

## مقدمه

داشته باشد (Hochuli 1975; 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 کربستالی 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 یافتنگی از مشکلات اصلی تولید طیفی از پروتئین‌ها نوترکیب می‌باشد که می‌تواند عمر مفید پروتئین را کاهش داده و اینمی‌زایی داروهای پلی‌پیتیدی را افزایش دهد (Treuheit et al. 2002; Ventura and Villaverde 2006). در علوم پزشکی تجمع یافتنگی باعث ایجاد بیماری‌های مهمی در انسان از جمله بیماری آنژایمر، دیابت قندی نوع II و پارکینسون (Rochet and Lansbury 2000; Dobson 2002; Cohen and Kelly 2003; Stefani and Dobson 2003) اطلاعات جمع آوری شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که تمایل پروتئین به تجمع تا حد زیادی به ترکیب و ساختار اولیه پلی‌پیتید 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"<sup>۷</sup> شناخته شده‌اند که اکثراً شامل اسید آمینه‌های آبگریز و آروماتیک هستند. اهمیت این نواحی در بیشتر پیتیدها و پروتئین‌هایی که در اختلالات آمیلوئیدوزیزیک 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  $\beta$ -میکروگلوبولین<sup>۸</sup> که در آمیلوئیدوزیز مرتبه با دیالیز<sup>۹</sup> 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 محتویات سلولی می‌زیان با سرعت و سهولت بیشتری انجام گیرد. از این دنباله‌ها می‌توان به پروتئین ProtA (GST)، گلوتاتیون S-ترانسفراز<sup>۱</sup> (GST)، پلی هیستیدین (TrxA)، دومین متصل شونده به مالتوز<sup>۲</sup> (MBP)، تیوردوکسین A (CBD)، سیستیدین (S-peptide)، دنباله II Strep II<sup>۳</sup> نام کیتین<sup>۴</sup> (S-peptide)، دنباله‌های اپیتوپی<sup>۵</sup>، دنباله II Strep II<sup>۶</sup> نام برد. اندازه و خصوصیات فیزیکوشیمیابی دنباله‌های افزوده شده متفاوت می‌باشد. اندازه دنباله پروتئین A حدود ۳۰ کیلو دالتون، گلوتاتیون 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-پیتید حدود ۱/۶ کیلو دالتون، دنباله II 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 (Woestenenk et al. 2000; Halliwell 2001) (Goal et al. 2000) حلایت (Chant et al. 2004) و فعالیت زیستی پروتئین هدف اثر بگذارند (Chant et al. 2005). متدائل‌ترین و پرکاربردترین دنباله‌ها دنباله پلی هیستیدینی می‌باشد که جزء کوچکترین دنباله‌ها می‌باشد و انتظار می‌رود اثر کمی بر روی اندازه کلی، ساختار و اینمی‌زایی پروتئین

<sup>1</sup> Glutathione S-transferases<sup>2</sup> Maltose-binding protein<sup>3</sup> Chitin-binding domain<sup>4</sup> S-peptide<sup>5</sup> Epitope tags<sup>6</sup> Strep II tag<sup>7</sup> Hot spot<sup>8</sup>  $\beta_2$ -microglobulin<sup>9</sup> Dialysis-related amyloidosis

Wurth et al. 2002; De groot 2006; Kim (and Hecht 2006; Winkelmann et al. 2010). مطالعه شده است (Coelho et al. 2012) در اثر جهش در بافت‌های مختلفی تجمعات 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 AGGRESCAN (Conchillo-Solé et al. 2007) مقدار بار الکترونیکی و هیدروفویسیته محل مورد نظر است همچنین می‌توان اثر تغییر توالی روی تجمع پلی‌پپتید را پیش‌بینی کرد و ترکیباتی برای توالی‌های مورد هدف طراحی کرد که در درمان آمیلوئیدوزنریز حائز اهمیت است. در همین راستا انتخاب داروهایی که می‌توانند این میانکنش‌ها را مهار کنند با ارزارهایی Conchillo-Solé (et al. 2007) مانند داکینگ در نواحی نقاط داغ مهم می‌باشد.

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 آمنی آن (اسیدآمینه ۱-۶۰) دوگانه دوست بوده (Hashimoto 2001) که سه جهش دخیل در ایجاد بیماری پارکینسون ارثی در این ناحیه رخ می‌دهند. ناحیه میانی Hashimoto (اسیدآمینه ۶۱-۹۵) دارای آمینواسیدهای آبگریز بوده (Goedert 2001) که آلفاسینوکلئین را قادر به تشکیل فیبریل می‌نماید (Bell et al. 2011). انتهای کربوکسیلیک آن شامل آمینواسیدهای ۹۶-۱۴۰ می‌باشد (Hsu 2000) که با قیماندهایی با بار منفی در این ناحیه فراوان است. پروتئین آلفاسینوکلئین در حالت بیماری از حالت مونومری خارج شده و موجب تشکیل پروتوفیبریل‌ها و فیبریل‌ها می‌شود (Clark and jenkins 2005). در حالت فیبریل، ساختار صفحات بتا<sup>۴</sup> تشکیل می‌شود (Bellucci et al. 2012). مطالعات گسترده‌ای برای طراحی الگوریتم‌هایی<sup>۱</sup> به منظور شناسایی نواحی مستعد برای تجمع در پروتئین‌ها صورت پذیرفته است. از الگوریتم‌های مهم معرفی شده برای مطالعه بخش‌های داغ می‌توان به (Conchillo-Solé et al. 2007) AGGRESCAN (Trovato et al. 2007) PASTA (Sergiy et al. ) FoldAmloid (Gaetano and Michele 2008) Zyggregator (2010) اشاره کرد. در صد تطابق ویژگی‌های آمیلوئیدوزنریز در یک پروتئین با پیش‌گویی حاصل از این الگوریتم‌ها توسط گروه‌های مختلفی

پروتئین ترانسیتیرین<sup>۲</sup> در اثر جهش در بافت‌های مختلفی تجمعات انسولین که در موضع تزریق در بیماران دیابتی موجب تشکیل اجسام آمیلوئیدی می‌شود (Shikama et al., 2010)، هانتینگتون که در بیماری هانتینگتون دحالت دارد (Wanker 2000)، پریون که در (Adriano and Anna 2009) بیماری جنون گاوی و کروتن فلد جاکوب نقش دارد (Ano Bom et al. 2012). ولی بسیاری از پروتئین‌ها و پپتیدهای دخالت کننده در بیماری‌های آمیلوئیدوزنریز بصورت ذاتی ساختار نامنظمی داشته یا دارای بخش‌های غیر ساختاری هستند از جمله آبتا آمیلوئید که عامل اصلی بیماری آزاریم محسوب می‌شود (Masters et al. 1985)، پروتئین تائو که باعث ایجاد تجمعات آمیلوئیدی درون سلولی در بیماری آزاریم می‌شود (Margittai and Langen 2004)، آمیلین<sup>۳</sup> 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<sup>۴</sup> به منظور شناسایی نواحی مستعد برای تجمع در پروتئین‌ها صورت پذیرفته است. از الگوریتم‌های مهم معرفی شده برای مطالعه بخش‌های داغ می‌توان به (Conchillo-Solé et al. 2007) AGGRESCAN (Trovato et al. 2007) PASTA (Sergiy et al. ) FoldAmloid (Gaetano and Michele 2008) Zyggregator (2010) اشاره کرد. در صد تطابق ویژگی‌های آمیلوئیدوزنریز در یک پروتئین با پیش‌گویی حاصل از این الگوریتم‌ها توسط گروه‌های مختلفی

<sup>1</sup> Transthyretin amyloidosis<sup>2</sup> Amylin<sup>3</sup> Algorithm

CBP:

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALSSGVDLGTE  
NLYFQ^S

His-tag: M HHHHHH SSGVDLGTENLYFQ^S

FLAG: MDY KDDDK SSGVDLGTENLYFQ^S

HA: M YPYDVPDYA SSGVDLGTENLYFQ^S

Myc: MEQKLISEEDL SSGVDLGTENLYFQ^S

Strep II: MWSHPQFEK SSGVDLGTENLYFQ^S

SBP: MDEKTTGWRGGHVVEGLAG ELEQLRARLEH

HPQQREPSGVDLGTENLYFQ^S

S-peptide:

MKETAAAKFERQHMDSSSGVDLGTENLYFQ^S

CBD: MTNPVGSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKC  
LQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQSSGVDLGTENLYF  
Q^S

جایگاه برش آنزیم‌های 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-synuclein**

MHHHHHHSSGVDLGTENLYFQSMDFVMKGLSKAK  
EGVVAEEAKTKQGVAAAGKTKEGVLYVGSKTKE  
GVVHGVTVAEKTKEQVTNVGEAVVTGTVATAVAKQ  
TVEGAGSIAATGFGKKDQLGKNEEGAPQEGLIED  
MPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYPEA

**Non his -syn>swissprot| P37840 | SYUA\_HUMAN /Alpha-synuclein;**

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAAAGKT  
KEGVLYVGSKTKEGVVHGVTVAEKTKEQVTNVG  
EAVVTGTVATAVAKTVEGAGSIAAAT

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

باکتری BL21(DE3) حاوی پلاسمید pNIC با ژن آلفا سینوکلئین در محیط کشت<sup>1</sup> LB کشت داده شد و پس از اینکه دانسیته نوری آن به ۰/۵-۰/۷ رسید، توسط IPTG با غلظت ۰/۵ میلی مolar القا شد و به مدت ۱۶ الی ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 TEV) نمونه برداری و بر روی ژل SDS-PAGE برده شد و برای

در این مطالعه اثر دنباله‌های مختلف در تجمع پروتئین‌های نوترکیب توسط الگوریتم بیانفورماتیکی AGGRESCAN پیش گویی و مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه نتایج پیش گویی و نتایج عملی، فرآیند تجمع و فيبريلاسیون 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. فيبريلاسیون هر دو پروتئین با تست‌های استاندارد تایید شد.

**مواد و روش‌ها**

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

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

**TEV protease: SSGVDLGTENLYFQ^S**

**Z domain:**

MVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQLSK  
DDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKSSGVDLGTENLY  
FQ^S

<sup>1</sup> Luria-Bertani medium

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 ۴۰۰-۶۰۰ 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.

<sup>۲</sup> عکس میکروسکوپ نیروی اتمی AFM

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 پیتیدی 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 پلی‌پیتیدی در فرمت FASTA است. توالی هر کدام از دنباله‌ها به همراه جایگاه برشی آنزیم TEV پروتئاز (ENLYFQ<sup>A</sup>S) است که مجموع آنها به محور X بر اساس ترتیب توالی اسید‌آمینه‌ای می‌باشد و محور Y شدت hot spot بودن توالی‌ها یا به عبارتی میزان تمایل برای تجمع یافتنگی 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 تجمع یافتنگی 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 تجمع یافتنگی 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.

<sup>۱</sup> القا فیبریلاسیون در شرایط برون تنی

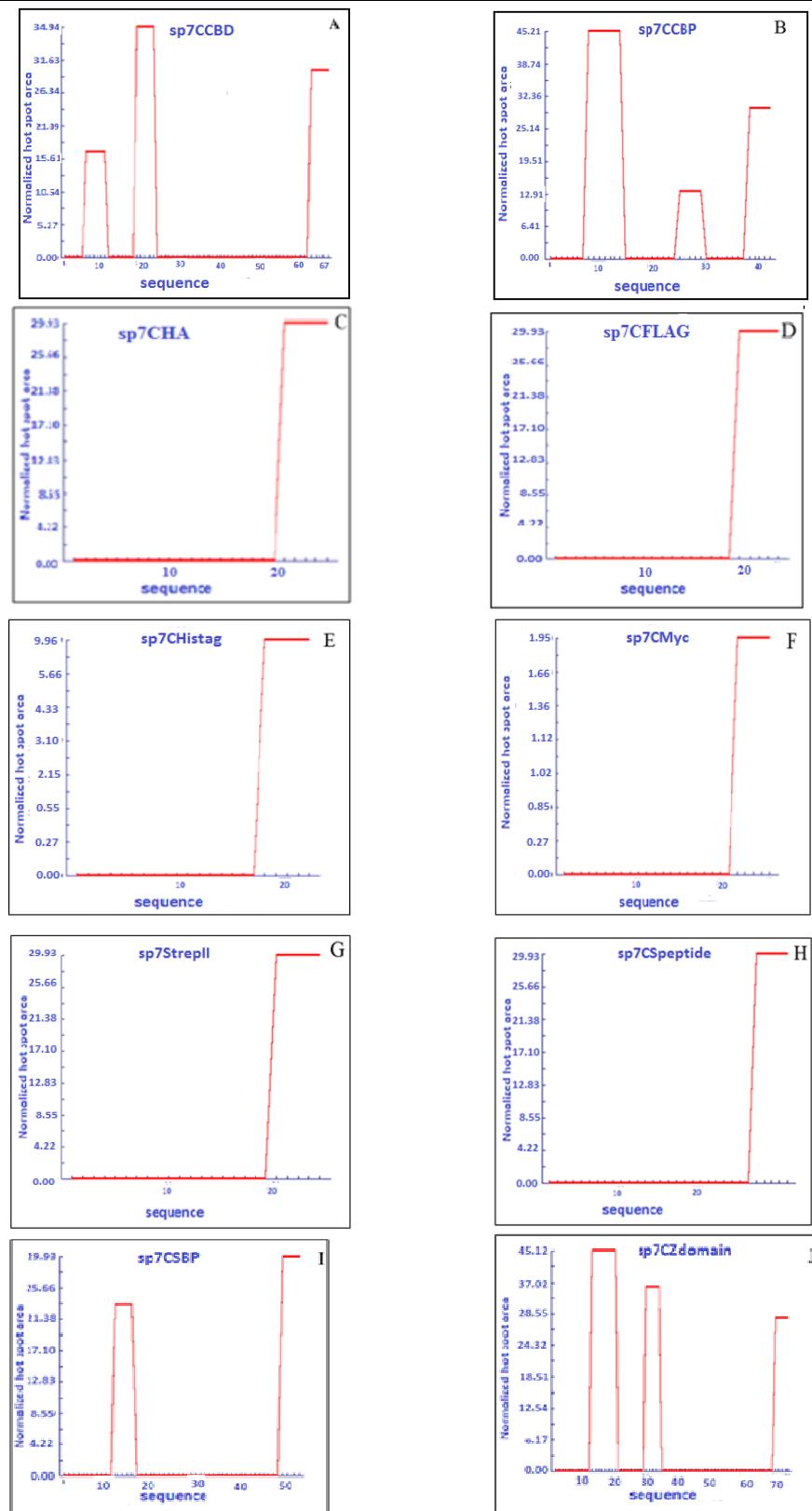
آلفارسینوکلثین یکی از پروتئین‌هایی است که در حالت طبیعی مونومر و بدون ساختار ثانویه منظم است اما در شرایط بیماری به فیبریل‌های با ساختار منظم صفحات بتا تبدیل می‌شود که تحت شرایط ویژه‌ای در آزمایشگاه می‌توان این ساختارها را الفا کرد. برای القا فیبریلاسیون از هر دو پروتئین دارای tag His-tag و بدون His-tag به مقدار ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برداشته شد و در بافر EDTA pH=۷/۲ مربوطه که شامل تریس ۳۰ میلی‌مolar ، میلی‌مolar ۸۰ NaCl میلی‌مolar، PMSF دو میلی‌مolar، تیوفلاوین T ۸۰ دور در دقیقه هم زده شد.

در تمام مدت با استفاده از آهن ریای میله‌ای ریز تفلونی محلول با سرعت ثابت ۳۷°C با چرخش بوده است به مدت ۲۴ ساعت گذارده 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 ). در بافر تریس ۱۰ میلی‌مolar 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.

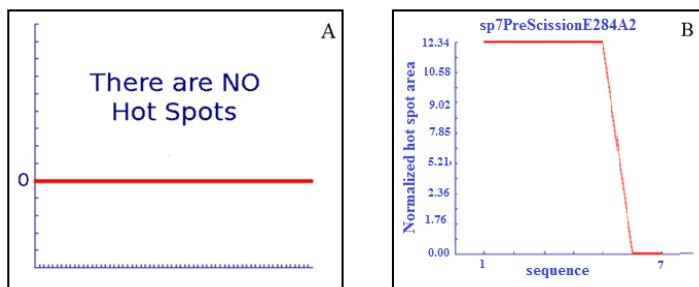
تصویر برداری میکروسکوپ فلورسانس از این روش برای اثبات وجود فیبریل‌ها استفاده شد. به اندازه ۱۵ میکرولیتر، از نمونه فیبریلی انکویه شده به ۱۵ میکرولیتر محلول رقیق شده ThT اضافه و به خوبی مخلوط شدند. نمونه روی لام ریخته و روی آن لامل قرار داده شد و با میکروسکوپ فلورسانس بررسی و عکس مورد نظر تهیه شد. جذب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

<sup>2</sup> Atomic force microscopy

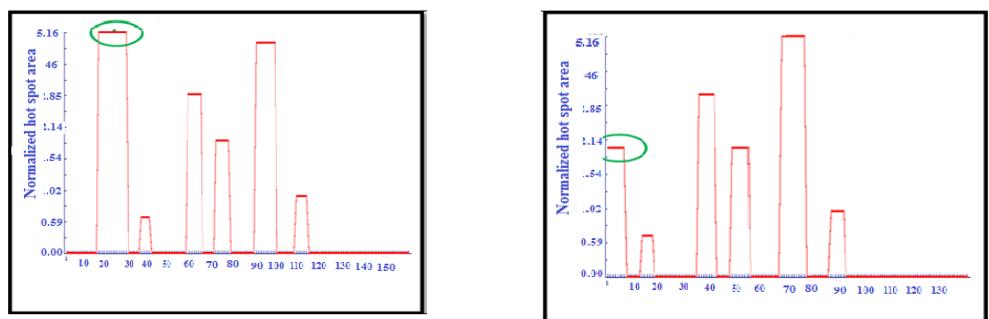
<sup>1</sup> In vitro



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 StrepII; (G) دنباله Myc; (H) دنباله S-peptid; (I) دنباله SSBP; (J) دنباله Zdomain.



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



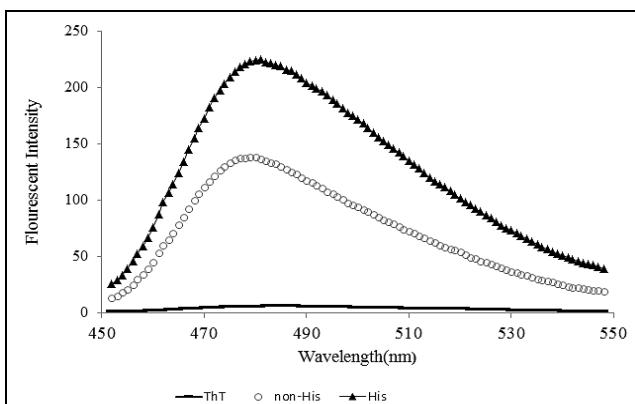
شکل ۳- نمودارهای Aggrescan مربوط به آلفاسینوکلثین. محور X بر اساس ترتیب توالی اسیدآمینه‌ای می‌باشد و محور Y شدت hot spot بودن توالی‌ها را نشان می‌دهد. نمودار سمت چپ مربوط به آلفاسینوکلثین دارای His-tag و نمودار سمت راست مربوط به آلفاسینوکلثین بدون His-tag می‌باشد. میزان تمایل تجمع در بخشی که با حلقه 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 آمیلوبیدی شدن تاثیر نداشته باشد.

برای پیش‌گویی اثر حضور دنباله His-tag در القا تجمع پروتئین آلفاسینوکلثین، توالی مربوط به آلفاسینوکلثین 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 آلفاسینوکلثین دارای His-tag است، افزایش شدت hot spot بودن به عبارتی میزان تمایل برای تجمع یافتنگی به دلیل حضور His-tag به همراه جایگاه برش دهی محسوس است ولی در نمودار سمت راست که مربوط به آلفاسینوکلثین بدون His-tag است، چنین شدتی مشاهده نمی‌شود. بنابراین انتظار می‌رود حضور و عدم حضور توالی His-tag در فرآیند تجمع و فیریلاسیون موثر باشد.

پیک‌های ایجاد شده برای هر کدام از این دنباله‌ها نشان می‌دهد که توالی‌های خاصی در این دنباله‌ها مستعد تجمع یافتنگی 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 Factor Xa ,Thrombin و PreScission™ نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج حاکی از آن است که توالی‌های برشی Factor Xa ,Thrombin 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 Factor Xa ,Thrombin اثری ندارند. در مهندسی پروتئین بهتر

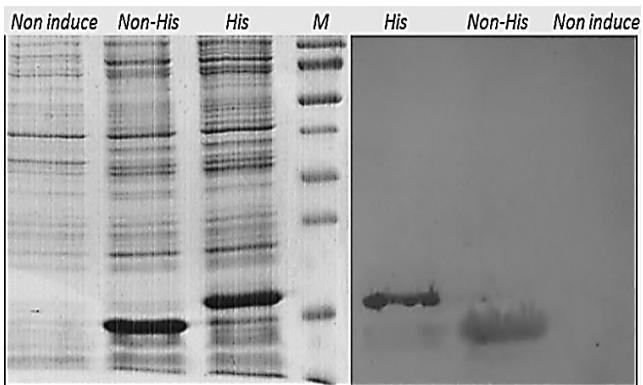


شکل ۵- نشر فلورسانس تیووفلاوین تی فیبریل ها. (▲) آلفاسینوکلئین دارای His-tag و (○) آلفاسینوکلئین بدون His-tag

تصاویر میکروسکوپ فلورسانس نشان‌دهنده تشکیل ساختارهای گستره‌های 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.

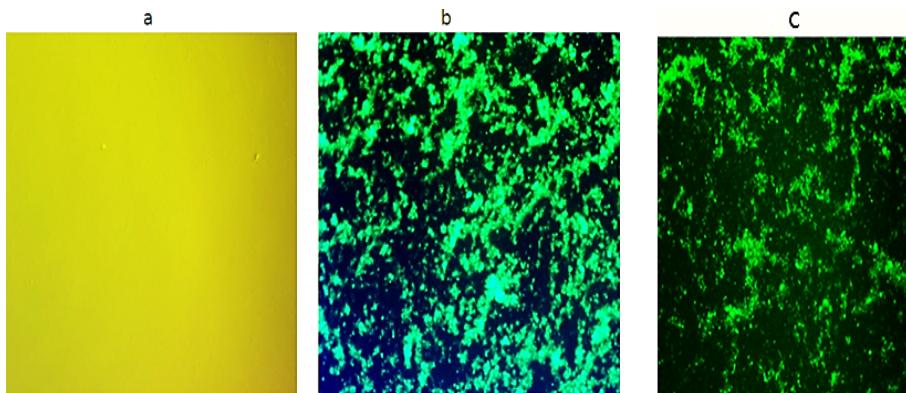
آلفاسینوکلئین در حالت مونومری ساختار منظم ثانویه‌ای ندارد اما در حالت فیبریل ساختار صفحه بتا به خود می‌گیرد. کنگورد توانایی اتصال به ساختار صفحات بتای موجود در فیبریل‌ها را دارد، لذا از کنگورد به عنوان شناساگر حضور فیبریل استفاده می‌شود (شکل ۷). فیبریل باعث تغییر رنگ کنگورد از نارنجی به قرمز می‌شود که 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 فيبريلاسیون را نشان می‌دهد.

توالی cDNA مربوط به هر کدام از پروتئین‌ها در وکتور *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.



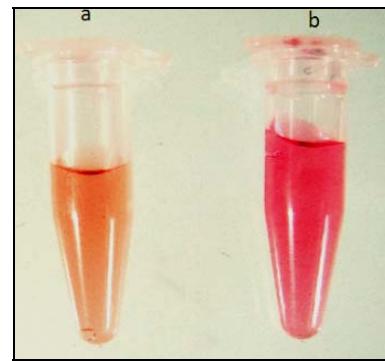
شکل ۴- SDS-PAGE (سمت چپ) و لکه‌گذاری وسترن (سمت راست) مربوط به بیان پروتئین آلفاسینوکلئین هماره و بدون توالی IPTG. (Non-His؛ عصاره باکتری دارای پروتئین بدون توالی پلی‌هیستیدینی؛ His؛ عصاره باکتری دارای پروتئین حاوی توالی پلی‌هیستیدینی؛ Non induce؛ باکتری قبل از القا با IPTG).

برای رهگیری فرآیند فيبريلاسیون در نمونه‌های پروتئینی گرمادهی شده از سنجش نشر فلورسانس ThT که بصورت ویژه به فرم‌های فیبریلی متصل می‌شود، استفاده شد. ThT به تنها 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 فيبريلاسیون 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.

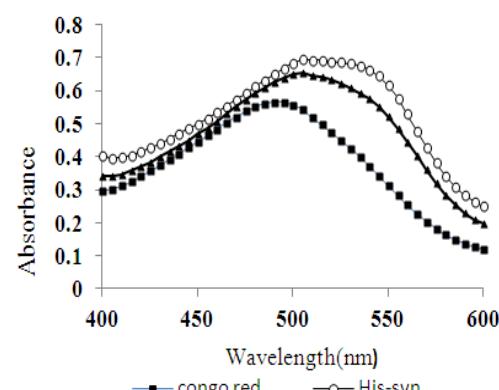


شکل ۶- بررسی فیبریل‌های آلفاسینوکلئین با استفاده از عکس فلورسانس تیوفلاوین تی، نمونه‌های فیبریلی در حضور ThT (a) در نور مژی؛ (b) در نور فلورسانس پروتئین دارای His-tag (c) در نور فلورسانس پروتئین بدون His-tag

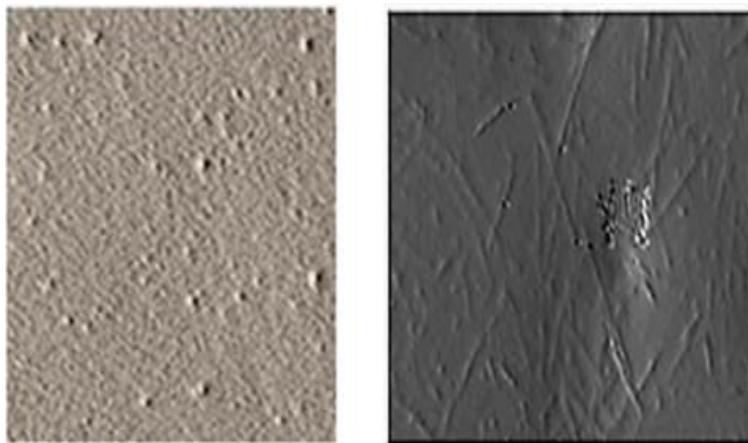
با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی می‌توان جزئیات بیشتری از مدل نانوفیبریل‌های تشکیل شده بدست آورد. روند تشکیل اولیگومرها و فیبریل‌ها (شکل ۹) در مراحل مختلف ساختارهای تجمعی متفاوتی دارند. با گذشت زمان فیبریل‌ها شکل گرفته و از مونومرها کاسته می‌شود و پروتئین آلفاسینوکلئین در اثر انکوباسیون به فیبریل‌ها تبدیل می‌شود. در ساعتها 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 نوترکیب دنباله‌هایی در انتهای توالی ژن پروتئین مورد نظر قرار می‌دهند که این دنباله‌ها می‌توانند روی ساختار پروتئین و خصوصیت فیزیکوشیمیابی 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 CBP، CBD، Zdomain، SBP و آنزیم برش دهنده مانند Prescission 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 دارد 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 رشته های فیبریل بوضوح مشخص می باشد.

#### 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.
- Arnaud J, Lauritzen C, Petersen,G E, Pedersen J (2006) Currentstrategies for the use of affinity tags and tag removal for thepurification 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, Navarría L, Grigoletto J, Missale C, Spano P (2012) From  $\alpha$ -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 proteinof the Aspergillus nidulans gene regulatory proteinAreA causes a conformational change at the DNA-bindingsite. Protein Expression and Purification 39: 152-159.
- Clark rs bH, jenkins lw (2005) Posttranslational protein modications. 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 می شود. در این مطالعه نشان داده شد که با پیشگویی توسط الگوریتم AGGRESCAN وجود دنباله هیستیدینی به همراه جایگاه برشی یک منطقه به شدت مستعد تجمع در پروتئین اضافه می شود. همچنین مطالعات آزمایشگاهی بر روی فرآیند فيبريلاسیون 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 فيبريلاسیون پروتئین آلفا سینوکلئین شد که با نتایج پیشگویی مطابقت دارد. با توجه به این مطالعه در تحقیقات برونتنی که به منظور روشن شدن بیشتر بیماری های آمیلوئیدوزیز و همچنین غربالگری ترکیباتی که پتانسیل مهار فيبريلاسیون دارند، توصیه می شود یا از پروتئین های بدون دنباله استفاده شود که روی فيبريلاسیون تغییر نکند و یا از دنباله هایی استفاده شود که کمترین تاثیر را در فرآیند تجمع و فيبريلاسیون پروتئین دارند.

#### تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی ۴۵۵ پژوهشگاه ملی مهندسی رزنتیک و زیست فناوری انجام شده است. همچنین نویسندهان از آفای فرهنگ علیاکبری برای همکاری در انجام مطالعات بروون 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  $\alpha\beta42$  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 Zygggregator 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  $\alpha\beta42$  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
- MargittaiM., 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 increases 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, McCor mick 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.

Winkelmann 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.

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

Wurth c, guimard nK, Hecht MH (2002) Mutations that reduce aggregation of the alzheimer's  $\alpha\beta42$  peptide: an unbiased search for the sequence determinants of  $\alpha\beta$  amyloidogenesis. Journal of Molecular Biology 319:1279-1290.