بررسی اثر دنباله هیستیدینی بر دینامیک مولکولی پروتئین TGF-β

سپیده سپهری[۱]، سیدشهریار عرب[۲*]، مهرداد بهمنش[۳]، رضا حسن‌ساجدی[٤*]

۱- دانشجوی دکتری بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲- استادیار بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳- استاد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
٤-دانشیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

*تهران، صندوق پستی ۱۷۵-۱٤۱۱۵
sh.arab@modares.ac.ir; sajedi_r@modares.ac.ir

دریافت: ۱۳۹٦/۱۲/۱۰ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۰

چکیده

فاکتور رشد تغییرشکل‌دهنده بتا (TGF-β) پروتئین‌های دایمر پیام‌رسان هستند. ایزوفرم‌های TGF-β (TGF-β1 و β2 و β3) در بسیاری از روندهای سلولی از جمله مهار رشد، بازآرایی بستر خارج سلولی، گسترش بافتی، مهاجرت سلولی، تهاجم و تنظیم ایمنی نقش دارند. برای اهداف پژوهشی، TGF-βها با استفاده از سلول‌های یوکاریوتی دست‌کاری‌شده و یا سیستم‌های بیانی باکتریایی تولید می‌شوند. برای دست‌یابی به تخلیص کارآمد TGF-β با کروماتوگرافی تمایلی فلزی، سازه‌هایی با دنباله هیستیدینی متصل به دو انتهای آمینی (N-TGFβ) و کربوکسیلی (C-TGFβ) این پروتئین مدل‌سازی شد و با کمک ابزارهای محاسباتی اثر His-tag بر ساختار TGF-β بررسی گردید. مدل سه‌بعدی پروتئین‌ها ساخته شد و دینامیک مولکولی پروتئین‌های مدل شده و TGF-β طبیعی در آب شبیه‌سازی شد. شبیه‌سازی دینامیک این پروتئین‌ها نشان داد زمانی که دنباله هیستیدینی به انتهای کربوکسیلی متصل می‌شود موجب افزایش جنبش اسیدآمینه‌های TGF-β می‌گردد و بر ساختار پروتئین نیز تأثیر می‌گذارد. این در حالی است که افزودن His-tag به انتهای آمینی چنین نتایجی را به همراه ندارد. به‌صورت خلاصه افزودن دنباله به انتهای کربوکسیلی ممکن است منجر به بهم‌ریختگی در ساختار، به‌خصوص در انتهای کربوکسیلی و حتی ازدست‌رفتن تاخوردگی مناسب TGF-β شود.

کلیدواژگان: فاکتور رشد تغییرشکل‌دهنده بتا (TGF-β)، دنباله هیستیدینی، انتهای آمینی، انتهای کربوکسیلی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

۱- مقدمه

بزرگ‌خانواده TGF-β از سیتوکین‌های[1] چندعملکردی هستند که شامل فاکتور رشد تغییردهنده بتا[2] (TGF-β)، پروتئین‌های تغییرشکل‌دهنده استخوان[3] (BMPs)، فاکتورهای رشد و تمایزی[4] (GDFs)، اکتیوین[5]ها، نودال[6]ها، اینهیبین[7]ها، هورمون ضدمولریین[8] (AMH) و دیگر اعضا هستند. سه ایزوفرم TGF-β1 و β2 و β3 در بدن پستانداران یافت می‌شوند که نقش‌های حیاتی غیرهمپوشان ایفا می‌کنند. این ایزوفرم‌ها در بسیاری از فرایندهای سلولی از قبیل مهار رشد سلول‌ها، بازسازی ماتریکس خارج سلولی، توسعه بافتی، مهاجرت سلولی، تهاجم و تنظیم ایمنی نقش دارند [۱؛ ۲]. این ایزوفرم‌ها از نظر توالی ۷۱ تا ۷۹ درصد همسانی دارند و از نظر ساختاری نیز بسیار مشابه هستند (RMSD[9] کمتر از ۱/۵ آنگستروم) و پیام را از طریق گیرنده‌های یکسان که به نام گیرنده TGF-β نوع یک (TβRI) و نوع دو (TβRII) شناخته می‌شوند منتقل می‌کنند [۳-۶].

گیرنده‌های نوع یک و دو از نظر ساختاری شبیه‌اند و شامل یک دمین خارج سلولی متصل‌شونده به لیگاند (حدودا ۱۲۰ اسیدآمینه)، یک دمین عرض غشایی (حدود ۳۰ اسیدآمینه) و یک دمین سرین/ترئونین کینازی (در حدود ۴۰۰ اسیدآمینه‌ای) داخل سلولی هستند. دایمر TGF-β ابتدا به دمین خارج سلولی یک جفت TβRII متصل می‌شود و در پی آن یک جفت TβRI را به کار می‌گیرد. با شکل‌گیری کمپلکس چهارتایی بین TβRI و TβRII، گیرنده نوع دو موجب فسفریله شدن گیرنده نوع یک شده و مسیر پیام‌رسانی داخل سلولی به راه می‌افتند (شکل ۱الف)[۶-۱۰].

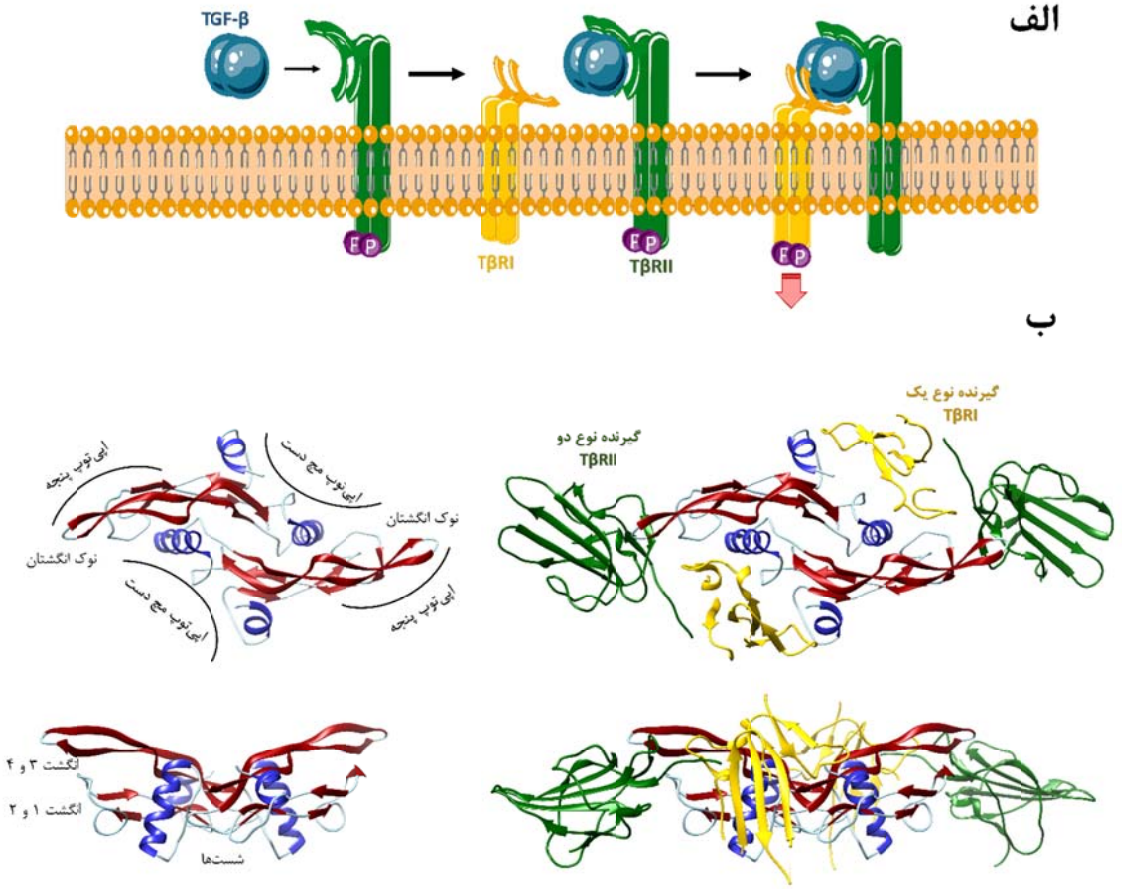
هر زنجیره TGF-β در فرم بالغ با ۱۱۲ اسیدآمینه وزنی در حدود ۱۲/۵ کیلودالتون دارد که وزن هومودایمر آن ۲۵ کیلودالتون خواهد شد [۱۱]. TGF-β دارای یک موتیف حفاظت شده با ۹ اسیدآمینه سیستئین است که هشت تا از آنها پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای تشکیل می‌دهند و یکی از سیستئین‌ها با پیوند بین زنجیره‌ای موجب دایمرشدن لیگاند می‌شود [۲]. تشکیل دایمر از طریق شکل‌گیری پیوند دی‌سولفیدی بین سیستئین‌های ۷۷ (Cys77) از هر زنجیره صورت می‌گیرد، به‌نحوی‌که هومودایمر حاصل یک تقارن پروانه‌ای شکل را اخذ می‌کند (شکل ۱ب). هر زنجیره از TGF-β را می‌توان به یک دست منحنی شکل تشبیه کرد که با آرایش سربه‌سر[10] تشکیل هومودایمر داده‌اند. چهار زنجیره بتا به‌سان چهار انگشت این دست هستند و هلیکس آلفا شکل‌دهنده شست دست و کف آن خواهد بود (شکل ۱ب) [۵؛ ۱۲؛۱۳]. TβRII با نوک انگشتان ۱ و ۲ از هر مونومر TGF-β میان‌کنش می‌دهد و TβRI به منطقه مربوط به مچ دست متصل می‌شود [۱۴].

همان‌گونه که ذکر شد TGF-β یکی از فاکتورهای رشد مهم و حیاتی است که با توجه به اهمیت زیستی که دارد، رد پای آن در بسیاری از بیماری‌های خود ایمنی، انواع سرطان‌ها و فیبروزها مشاهده می‌شود [۱۵-۱۷]؛ بنابراین امروزه با توجه به مطالعات ساختاری و عملکردی روی آن، تولید و تخلیص این فاکتور رشد و گیرنده‌های آن بسیار مورد توجه قرار گرفته است. برای جداسازی پروتئین‌ها از هم از روش‌های مرسومی همچون کروماتوگرفی تعویض

1 Cytokines
2 Transforming growth factor-β
3 Bone morphogenetic proteins
4 Growth and differentiation factors
5 Activin
6 Nodal
7 Inhibin
8 Anti-Müllerian hormone
9 Root mean square deviations
10 Head-to-head manner

یـونی، ژل فیلتراسـیون، کرومـاتوگرافی تمـایلی و ... استفاده می‌شود. در تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب، کروماتوگرافی تمایلی به دلیل سهولت کار با آن و نیـز کارایی بیشتر تخلیص بسیار مـورد توجـه اسـت [۱۸]. پروتئین‌های نوترکیب مـی‌تواننـد دنبالـه‌هـای تمـایلی همچون بتا-گلاکتوزیداز، دنباله استرپ[۱۱]، دنبالـه‌هـای چند آرژنینی[۱۲] یا هیستیدینی[۱۳] و ... داشته باشند [۱۹]. دنبالـه هیسـتیدینی (His-tag) شـامل چهـار تـا شـش اسیدآمینه هیستیدین متوالی است که توانایی اتصال به یون نیکل متصل به بستر ستون کروماتوگرافی تمـایلی فلزی[۱۴](IMAC) را دارد [۲۰]. چندین وکتور کدکننده مهندسی شده‌اند که قادرند پروتئین‌های نوترکیـب بـه همـراه دنبالـه هیسـتیدینی در انتهـای آمینـی[۱۵] یـا کربوکسـیلی[۱۶] را در میزبـان‌هـای پروکـاریوتی یـا یوکاریوتی بیان کنند [۲۱-۲۳].

11 Strep tag
12 Polyarginine tag (Arg-tag)
13 Polyhistdine tag (His-tag)
14 Immobilized metal affinity chromatography
15 N-terminal
16 C-terminal

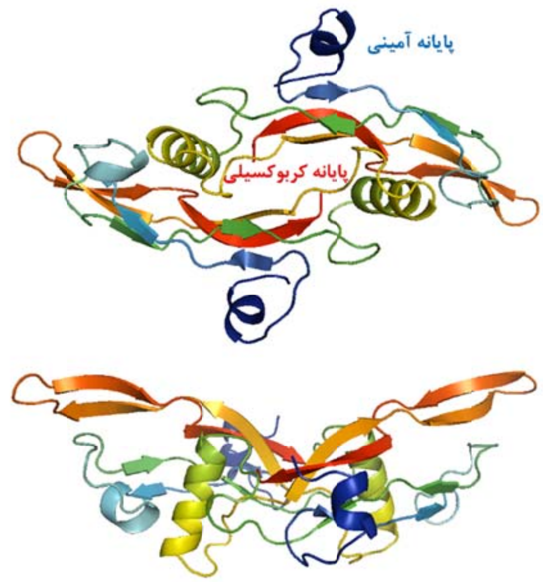


شکل ۱ TGF-β و مسیر پیام‌رسانی آن. الف) شمای شماتیک از مسیر پیام‌رسانی TGF-β. TGF-β در ابتدا به دمین خارج سلولی گیرنده نوع دو (TβRII) متصل می‌شود و پس از آن گیرنده نوع یک (TβRI) را به کار می‌گیرد. پس از تشکیل کمپلکس چهارتایی بین گیرنده‌ها، گیرنده نوع دو با خاصیت سرین/ترئونین کینازی خود موجب فسفریله و فعال شدن گیرنده نوع یک شده و متعاقب آن آبشار فسفریلاسیون در سلول به راه افتاده و موجب انتقال پیام سلولی می‌شود. ب) ساختار دایمر TGF-β و کمپلکس آن با گیرنده‌هایش در دو نمای جانبی و از بالا (کد pdb: 3KFD). هر مونومر ساختاری دست چپ منحنی شکلی را نشان می‌دهند که چهار زنجیره بتا به شکل چهار انگشت و دو هلیکس شکل دهنده انگشت شست و کف این دست هستند. دو مونومر با آرایش سر به سر کنار هم قرار گرفته و به کمک پیوند دی‌سولفیدی بین زنجیره‌ای تشکیل یک همودایمر بالغ با تقارن پروانه‌ای شکل در نمای جانبی را می‌دهند. TGF-β از طریق نوک انگشتان به TβRII و از طریق اپی‌توپ مچ دست به TβRI متصل می‌شود. ساختار سه بعدی پروتئین با استفاد از نرم افزار Chimera رسم شده است.

فایل ساختاری موجود در پایگاه داده پروتئین[17] با کد 3KFD [٦] شامل ساختار سه بعدی قسمت بالغ همودایمر TGF-β1 انسانی (اسیدآمینه‌های ۳۹۰-۲۷۹) و دمین خارج سلولی TβRI (اسیدآمینه‌های ۸۵-۹) و TβRII (اسیدآمینه‌های ۱۲٦-۲۰) است (شکل ۱). در شکل ۲ ساختار سه بعدی دایمر TGF-β بالغ از دو نمای روبرو و بالا قابل مشاهده است. برای افزودن دنباله هیستیدینی به پروتئین TGF-β دو گزینه انتهای آمینی و انتهای کربوکسیلی وجود دارد و تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر گزینه بهینه برای این منظور گزارش نشده است. در این تحقیق

17 Protein Data Bank (PDB)

هدف بررسی اثر دنباله هیستیدینی بر دینامیک و ساختار TGF-β توسط شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی می‌باشد.



شکل ۲ ساختار سه‌بعدی TGF-β1 از نمای بالا و روبرو (کد pdb: 3KFD). پایانه آمینی به رنگ آبی و پایانه کربوکسیلی به رنگ قرمز نمایش داده شده‌اند.

۲- روش‌ها

۲-۱ مدل‌سازی مولکولی[18]

برای افرودن دنباله هیستیدنی به انتهای آمینی و کربوکسیلی (پایانه N و C) TGF-β، توالی نوکلئیک اسیدی TGF-β1 به‌ترتیب در دو وکتور بیانی pET-28a و pET-21b و بین دو جایگاه برش *Nde* I و *Xho* I فرض شد. سپس توالی نوکلئیک اسیدی حاصل با استفاده از ابزار ترجمه‌گر موجود در وب‌سرور EMBL-EBI (با نام Nucleotide Sequence Translation) به توالی اسیدآمینه‌ای ترجمه شد. پس از هم‌ردیفی توالی‌های حاصل و الگو قرار دادن ساختار سه بعدی دایمر TGF-β1 (با کد pdb: 3KFD)، ساختار سه بعدی پروتئین‌های N-TGFβ و C-TGFβ با استفاده از نرم‌افزار MODELLER9.17 ساخته شد [۲۴]. در هر زنجیره از TGF-β چهار پیوند دی‌سولفیدی وجود دارد و نیز دو زنجیره از طریق یک پیوند دی‌سولفیدی بین زنجیره‌ای تشکیل دایمر می‌دهند که در مدل‌سازی باید لحاظ شوند. در هر زنجیره Cys7-Cys16، Cys15-Cys78، Cys44-Cys109 و Cys48-Cys111 با یکدیگر پیوند برقرار می‌کنند و زنجیره‌ها از طریق Cys77 با یکدیگر پیوند داده و تشکیل دایمر می‌دهند. در نهایت پنجاه مدل برای هر حالت ساخته شد. از بین این مدل‌ها بهترین مدل براساس فاکتورهای Errat [۲۵]، ProCheck [۲۶] و Verify 3D [۲۷] و نیز OBJECTIVE FUNCTION (معیاری است از انرژی) که خود نرم‌افزار MODELLER می‌دهد [۲٤]، انتخاب شد.

۲-۲- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی[19] (MD)

پس از انتخاب بهترین مدل، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای سه پروتئین TGF-β، N-TGFβ و C-TGFβ انجام

18 Molecular modeling

19 Molecular dynamics simulation (MD)

شـد. در ایـن پـژوهش بـرای شـبیه‌سـازی از نـرم‌افـزار GROMACS 5.0.7 اسـتفاده و از میـدان نیـروی gromos53a6 و الگـوریتم PME[20] (جهـت محاسـبه نیروهای الکتروستاتیک) بهره برده شد. این پروتئین‌هـا در جعبه مربـع شـکلی و محـیط آبـی بـا مـدل SPC[21] و بـا ضـخامت حـلال حـداقل ۱۰ آنگسـتروم (۱ nm) از لبـه پـروتئین قـرار گرفتنـد. بـه تعـداد بـار خـالص پـروتئین، به‌صورت تصادفی یون‌های مخالف جایگزین مولکول‌های آب شدند تا بار کلی سیستم خنثا شود (به‌ترتیب برای سه پروتئین TGF-β، N-TGFβ و C-TGFβ، ۸، ۱۰ و ٦ یـون کلر). همچنین برای جلوگیری از خارج شدن مولکـول‌هـا از جعبه فرضی و عدم تبخیر حلال در زمان شبیه‌سـازی و نیز کـاهش کشـش سـطحی، از شـرایط مـرزی دوره‌ای[22] استفاده شد. هر یک از سیستم‌هـا در ۵۰۰۰ گـام بـه روش تندترین شیب[23] تحـت رونـد کمینـه‌سـازی انـرژی قـرار گرفت. برای اطمینان از صحت انجـام ایـن رونـد نمـودار پتانسیل انرژی در طی زمان کمینه‌سازی رسم شـد. سـپس مرحله به تعادل‌رسانی سیستم‌های شبیه‌سازی انجـام شـد. شبیه‌سازی برای زمان ۱۰۰ پیکوثانیه (۵۰۰۰۰ گام با فاصله زمـانی ۲ fs) در شـرایط تعـداد اتـم، حجـم و دمـا ثبـات (NVT) انجام گرفت و دمـای سیسـتم‌هـا بـه ۳۱۳ درجـه کلوین (۳۷ درجه سانتی‌گراد) رسـید. پـس از اطمینـان از رسـیدن سیسـتم بـه دمـای مـوردنظـر، بـرای زمـان ۱۰۰ پیکوثانیه شبیه‌سازی در شرایط تعداد اتم، فشار و دما ثبات (NPT) ادامه یافت تا سیستم‌ها در شرایط فشـار ثابـت (۱ اتمسفر) به تعادل برسند. پس از به تعادل‌رسـانی سیسـتم، پروتئین‌ها به مدت ۵۰ نانوثانیه و با گام زمانی ۲ فمتوثانیه شبیه‌سازی شدند. بـرای بررسـی پایـداری شـبیه‌سـازی از پارامترهایی مثل ثابت‌ماندن دما، چگالی و فشار سیستم در مرحله به تعادل‌رسانی استفاده شـد. همچنـین از تغییـرات شـعاع ژیراسـیون و ریشـه میـانگین مجـذور انحرافـات[24] (RMSD) جهت بررسی روند تغییرات ساختاری در طول زمان شبیه‌سازی در مرحله تولید به کار گرفته شدند. ریشه میانگین مجذور نوسانات[25] (RMSF) و فاکتور-B[26] فایـل مسـیر بـرای هـر اسـیدآمینه در طـی ده نانوثانیـه پایـانی شبیه‌سازی مورد بررسی قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ مدل‌سازی دنباله هیستیدینی در TGF-β

پس از افزودن توالی دنباله هیستیدینی به انتهـای آمینـی و کربوکسیلی TGF-β1، مدل سه‌بعدی این توالی‌هـا سـاخته شدند. شکل ۳ نشان‌دهنده توالی هم‌ردیف شده N-TGFβ و C-TGFβ با TGF-β1 طبیعی اسـت کـه بـرای سـاخت مدل سه‌بعدی پروتئین‌ها استفاده شده‌اند. پـس از سـاخت مدل‌ها و تأیید صحت مدل، بهترین مدل برای شبیه‌سـازی دینامیک مولکولی استفاده شد.

20 Particle Mesh Ewald
21 Simple Point Charge (SPC) model
22 Periodic boundary condition
23 Steepest decent

24 Root Mean Square Deviation
25 Root Mean Square Fluctuation
26 B-factor

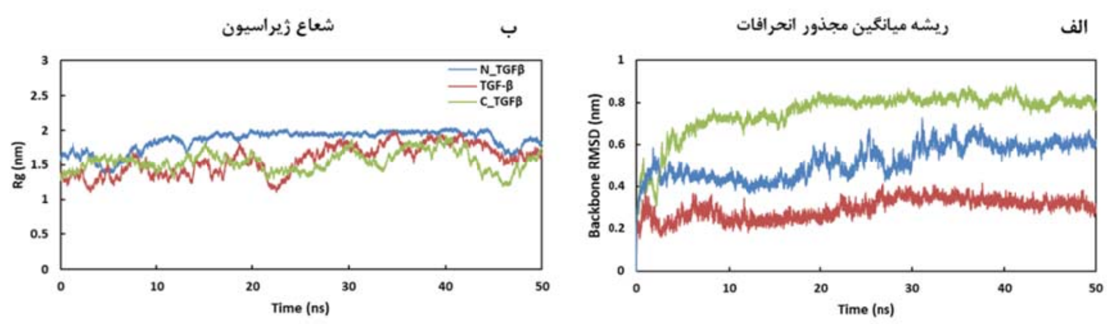
```
                                 1         10        20        30        40        50
N-TGFβ  MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM ALDTNYCFSS TEKNCCVRQL YIDFRKDLGW KWIHEPKGYH ANFCLGPCPY
TGF-β   --------------------- ALDTNYCFSS TEKNCCVRQL YIDFRKDLGW KWIHEPKGYH ANFCLGPCPY
C-TGFβ  --------------------- ALDTNYCFSS TEKNCCVRQL YIDFRKDLGW KWIHEPKGYH ANFCLGPCPY

       50         60        70        80        90        100       110
N-TGFβ  IWSLDTQYSK VLALYNQHNP GASAAPCCVP QALEPLPIVY YVGRKPKVEQ LSNMIVRSCK CS--------
TGF-β   IWSLDTQYSK VLALYNQHNP GASAAPCCVP QALEPLPIVY YVGRKPKVEQ LSNMIVRSCK CS--------
C-TGFβ  IWSLDTQYSK VLALYNQHNP GASAAPCCVP QALEPLPIVY YVGRKPKVEQ LSNMIVRSCK CSLEHHHHHH
```

شکل ۳ توالی هم‌ردیف شده TGF-β1 با توالی این پروتئین همراه با دنباله هیستیدینی در انتهای آمینی (توالی آبی رنگ) و کربوکسیلی (توالی سبز رنگ). اسیدآمینه‌های سیستئین که پیوند دی‌سولفیدی دارند در شکل به رنگ قرمز نمایش داده شده‌اند.

۳-۲ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

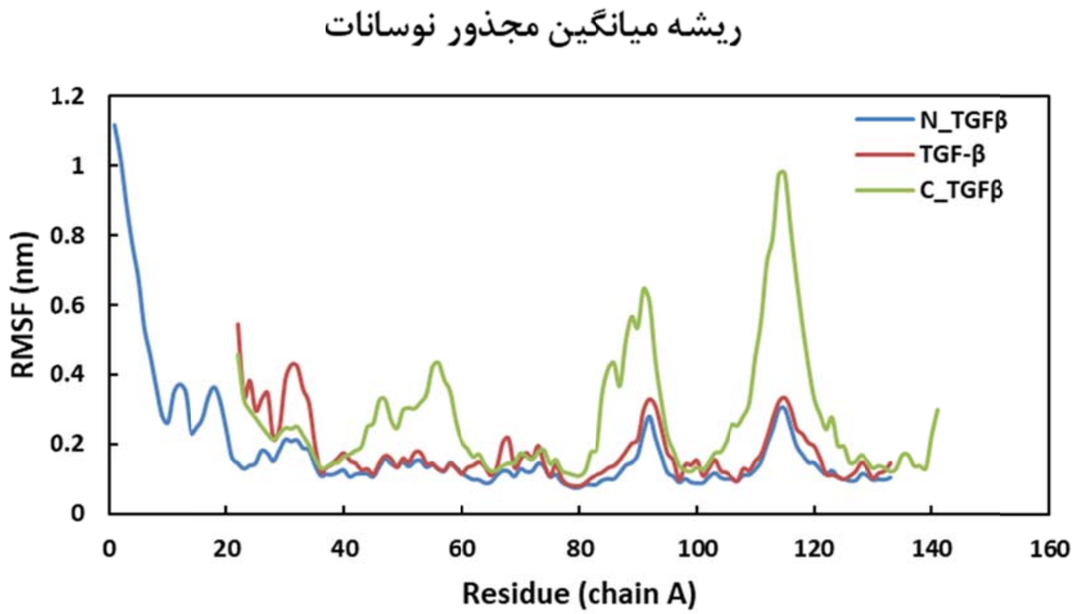
بهترین فایل‌های ساختاری حاصل از مدل‌سازی به عنوان ورودی شبیه‌سازی انتخاب شدند. آماده‌سازی فایل‌های ورودی نرم‌افزار GROMACS انجام شد و پس از انجام مراحل بهینه‌سازی انرژی و تعادل‌رسانی، مرحله اصلی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای TGF-β1 طبیعی، N-TGFβ و C-TGFβ اجرا شد. برای اطمینان از پایداری شبیه‌سازی انجام‌شده، تغییرات انرژی پتانسیل در طی مرحله کمینه‌سازی انرژی و نیز تغییرات دما، فشار و چگالی در طی مراحل به تعادل‌رسانی برای هر سه شبیه‌سازی بررسی شدند (نمودارها نمایش داده نشده‌اند). پس از حصول اطمینان از به تعادل‌رسیدن سیستم‌ها نوبت به شبیه‌سازی اصلی رسید. با بررسی تغییرات ریشه میانگین مجذور انحرافات و شعاع ژیراسیون در طی زمان شبیه‌سازی از پایداری سیستم شبیه‌سازی و به تعادل رسیدن ساختار پروتئین‌ها در طی ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی اطمینان حاصل شد.



شکل ٤ ریشه میانگین مجذور انحرافات (الف) و شعاع ژیراسیون پروتئین‌ها (ب) در طی زمان شبیه‌سازی. منحنی نشان داده شده با رنگ قرمز مربوط به TGF-β، آبی و سبز به ترتیب مربوط به افزودن دنباله هیستیدینی به انتهای آمینی (N-TGFβ) و کربوکسیلی (C-TGFβ) است. افزودن دنباله هیستیدینی به انتهای کربوکسیلی باعث تغییرات بیشتری در ساختار پروتئین شده است.

ریشه میانگین مجذور انحرافات یا RMSD بین ساختارهای ایجاد شده در شبیه‌سازی در بعد زمان معیاری مناسب و رایج جهت اطمینان از پایداری شبیه‌سازی دینامیک ملکولی است. بنابراین نمودار تغییرات RMSD مربوط به زنجیره اصلی[27] پروتئین‌ها نسبت به ساختار اولیه، در طی زمان شبیه‌سازی برای هر یک از سیستم‌ها رسم شد. همان‌گونه که در شکل ٤-الف نیز مشاهده می‌شود، تغییرات ساختاری زمانی که دنباله هیستیدینی در انتهای آمینی قرار می‌گیرد (N-TGFβ)، کمتر از زمانی است که این دنباله در انتهای کربوکسیلی است (C-TGFβ). به بیان دیگر زنجیره اصلی پروتئین C-TGFβ در طی زمان شبیه‌سازی نسبت به ساختار اولیه انحرافات بیشتری داشته و پروتئین برای رسیدن به تعادل تغییرات ساختاری شدیدتری را متحمل شده است. RMSD در طی ده نانوثانیه انتهایی شبیه‌سازی به‌نسبت ثابت است که نشان از به‌تعادل‌رسیدن ساختارهاست. از طرفی، تغییر شکل پروتئین به‌وسیله شعاع ژیراسیون قابل بررسی است. همان‌طور که انتظار می‌رود (شکل ٤- ب) شعاع ژیراسیون N-TGFβ (نمودار آبی رنگ) بیشتر از دو نمودار دیگر است که می‌تواند به دلیل بلندتربودن دنباله هیستیدینی در N-TGFβ و آزادتربودن آن باشد. نمودار شعاع ژیراسیون C-TGFβ نیز همچون RMSD آن در طی زمان شبیه‌سازی، نوسان‌های بیشتری نسبت به نمودار مربوط به N-TGFβ دارد؛ این نیز می‌تواند نشان از تغییرات ساختاری بیشتر این پروتئین باشد.

27 Backbone



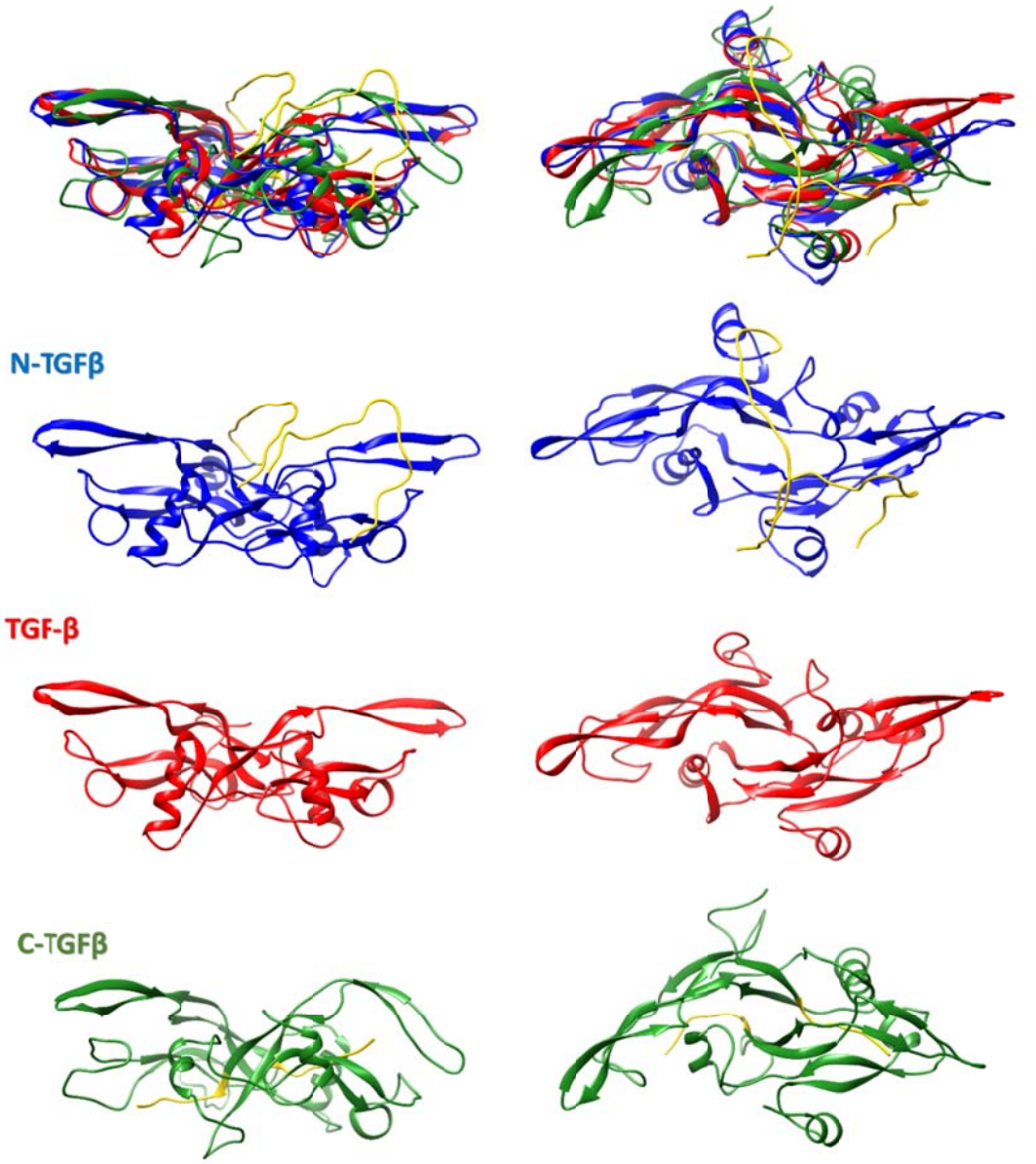
شکل ۵ ریشه میانگین مجذور نوسان‌های هریک از اسیدآمینه‌های زنجیره A پروتئین TGF-β طبیعی و دارای دنباله هیستیدینی. الگوی نوسان اسیدآمینه‌های TGF-β طبیعی (نمودار قرمز رنگ) و زمانی که دنباله هیستیدینی در انتهای آمینی قرار دارد (N-TGFβ، نمودار آبی رنگ) مشابه است اما زمانی که دنباله هیستیدنی در انتهای کربوکسیلی (C-TGFβ، نمودار سبز رنگ) قرار می‌گیرد، نوسان اسیدآمینه‌ها بیشتر شده و هرچه به سمت انتهای کربوکسیلی نزدیک‌تر می‌شود، نوسان‌ها شدیدتر هستند. در مناطقی که پیوندهای دی‌سولفیدی وجود دارند ساختار ثابت‌تر است و حداقل نوسان‌ها در اسیدآمینه‌های سیستئین هر سه پروتئین قابل مشاهده است.

RMSF یـــا ریشه میانگین مجذور نوسانات معـــرف میزان جنبش اتم‌ها در طی زمان شبیه‌سـازی اسـت. بـرای دست‌یابی به میزان نوسان‌های هریک از اسیدآمینه‌های این پروتئین‌ها، RMSF هر اسیدآمینه در طی زمان شبیه‌سـازی محاسبه و نمودار برای زنجیره A پروتئین‌هـای همـودایمر رسم گردید. همان طور کـه در شـکل ۵ مشـخص اسـت، اسیدآمینه‌های پروتئین N-TGFβ جنبشی مشابه فرم طبیعی دارند، این در حالی اسـت کـه نوسـان در اسـیدآمینه‌هـای پروتئین C-TGFβ بسیار افزایش یافته است. ایـن افـزایش در جنبش هر چه که به سمت انتهای کربوکسیلی که محل قرارگیری دنباله هیستیدنی است پیش می‌رود محسوس‌تـر و شدیدتر می‌شود. این در حالی است که سـاختار دایمـر TGF-β با ۹ پیوند دی‌سولفید پایـدار شـده اسـت. همـان طور که در نمودار نیز مشـخص اسـت، منـاطقی کـه سـه نمودار روی هم منطبق شده‌اند، همان مکان‌های مربوط به سیستئین است که به وسیله پیوند دی‌سولفیدی ثابت شده‌اند (شکل ۳). مناطقی که در آن بیشـترین نوسـان وجـود دارد همان مناطق موسوم بـه انگشـتان اسـت کـه مسـئول برهم‌کنش با گیرنده نوع دو اسـت. بنـابراین ایـن احتمـال وجـود دارد کـه افـزودن دنبالـه هیسـتیدینی بـه انتهـای کربوکسیلی حتی موجب از دست رفتن عملکرد پـروتئین نیز شود.

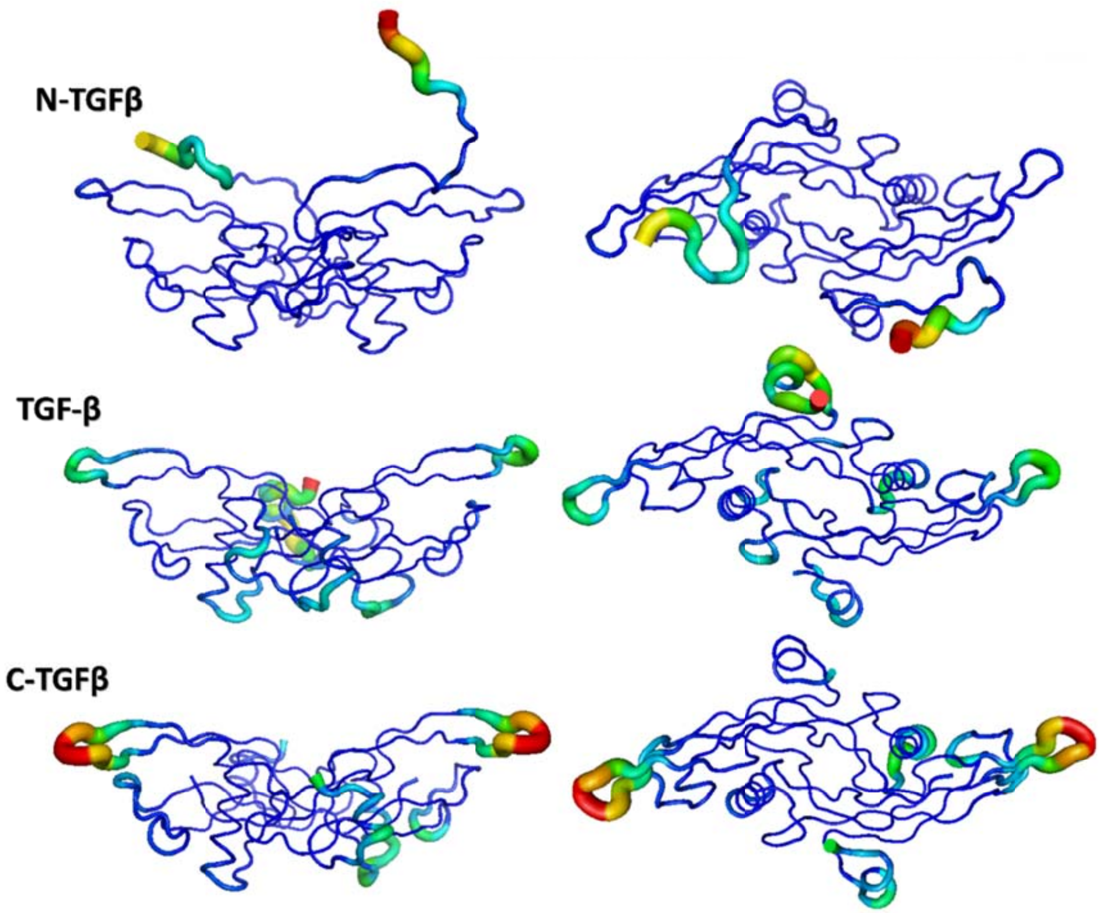
برای بررسی‌های بیشتر ساختاری، در گام بعدی فایـل pdb خروجی شبیه‌سازی برای هر سه پـروتئین اسـتخراج شد (شکل ٦). برهم نهی[۲۸] ساختارها با استفاده از نرم‌افزار Swiss-PdbViewer 4.0.1 [۲۸] نشان‌دهنده RMSD ۲/۱٤ آنگسترومی بین سـاختار TGF-β و N-TGFβ اسـت، امـا

28 Structural superposition

RMSD بین TGF-β و C-TGFβ معادل ۵/۹۸ آنگستروم است که دوباره نشان‌دهنده تغییرات ساختاری فاحش در ساختار TGF-β با دنباله هیستیدینی در انتهای کربوکسیلی خود است. همان گونه که در شکل ٦ نیز مشخص است در C-TGFβ تغییرات وسیعی در منطقه موسوم به انگشتان به چشم می‌خورد. فاکتور-B موجود در فایل pdb نیز نشان‌دهنده جنبش بیشتر اسیدآمینه‌های منطقه انگشتان در C-TGFβ است (شکل ۷). مناطق قرمز رنگ نشان‌دهنده جنبش بیشتر اتم‌ها در آن قسمت است.



شکل ٦ فایل‌های pdb حاصل از شبیه‌سازی. فایل ساختاری حاصل از شبیه‌سازی TGF-β زمانی که دنباله هیستیدینی در انتهای کربوکسیلی آن است (C-TGFβ که با رنگ سبز نمایش داده شده) تغییرات بیشتری نسبت به TGF-β طبیعی (قرمز) و N-TGFβ (آبی) داشته است. دنباله هیستیدینی در شکل‌ها با رنگ زرد نشان داده شده است.



شکل ۷ فایل pdb حاصل از شبیه‌سازی و نمایش فاکتور-B. مناطق آبی‌رنگ معرف جنبش کمتر اتم‌های آن منطقه است. هرچه به سمت قرمز پیش می‌رود، جنبش اتم‌ها افزایش پیدا می‌کند. شکل با استفاده از نرم‌افزار PyMol رسم شده است.

نتایج حاصل از شبیه‌سازی‌ها نشان می‌دهد که انتهای کربوکسیلی این پروتئین ساختاری منظم داشته، پس امکان اثرپذیری و ازدست‌دادن این نظم در حضور دنباله تخلیصی وجود دارد. همچنین، از آن‌جایی‌که نخست ساختار سوم پروتئین‌ها شکل می‌گیرد و پس از آن پیوندهای دی‌سولفیدی تشکیل می‌شوند، ممکن است افزودن دنباله هیستیدینی به این انتها منجر به از دست رفتن ساختار پروتئین بالغ شود. از طرفی در زمان دایمر شدن، انتهای کربوکسیلی TGF-β در داخل پروتئین مدفون می‌شود و از دسترس خارج می‌گردد. از آنجایی که در هنگام تخلیص نیاز به برهم‌کنش این دنباله با یون‌های نیکل تثبیت شده بر بستر ستون کروماتوگرافی تمایلی است، بنابراین از این جهت نیز انتهای کربوکسیلی منطقه مناسبی برای افزودن دنباله هیستیدینی نخواهد بود.

٤- نتیجه‌گیری

با توجه به نقش‌های کلیدی TGF-β در تنظیم چرخه سلولی، تولید و خالص‌سازی این فاکتور رشد بسیار اهمیت دارد. با توجه به کارایی بالای دنباله‌های تخلیصی همچون دنباله هیستیدنی در تخلیص پروتئین‌های

نوترکیب، در این تحقیق اثر افزودن این دنباله بر انتهای آمینی و کربوکسیلی TGF-β مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نشان داد زمانی که دنباله هیستیدینی به انتهای کربوکسیلی این فاکتور رشد افزوده می‌شود، نوسان‌های اسیدآمینه‌های داخلی در پروتئین بسیار افزایش می‌یابد. حضور دنباله هیستیدینی در انتهای کربوکسیلی ممکن است موجب از دست رفتن ساختار پروتئین گردد. از طرفی مدفون بودن انتهای کربوکسیلی در داخل پروتئین دایمر برای میان‌کنش دنباله هیستیدینی متصل به آن با ستون‌های تخلیصی مناسب نیست. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که انتهای آمینی مکانی مناسب‌تر برای افزودن دنباله‌های تخلیصی در TGF-β و حتی سایر پروتئین‌های این خانواده است. اما از آنجایی که این منطقه در نزدیکی مکان برهم‌کنش با گیرنده نوع یک این فاکتور رشد است، ممکن است افزودن این دنباله به انتهای آمینی منجر به اختلال در عملکرد پیام‌رسانی پروتئین شود. راه کار برای حل این مشکل افزودن جایگاه‌های برش پروتئازی بین دنباله‌های تخلیصی و این فاکتور رشد و حذف دنباله پس از فرایند تخلیص است.

۱۰- منابع

[1] Massagué, J. (1998) TGF-β signal transduction, Annual Review of Biochemistry, USA, pp 753-791.

[2] Derynck, R., Zhang, Y. E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature. 425. 577-584.

[3] Daopin, S., Piez, K. A., Ogawa, Y., Davies ,D. R. (1992) Crystal structure of transforming growth factor-b2: an unusual fold for the superfamily, Science. 257. 369-373.

[4] Hinck, A. P., Archer, S. J., Qian, S. W., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Weatherbee, J. A., Tsang, M. L. S., Lucas, R., Zhang, B. L., Wenker, J. (1996) Transforming growth factor β1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor β2, Biochemistry. 35, 8517-8534.

[5] Mittl, P. R., Priestle, J. P., Cox, D. A., Mcmaster, G., Cerletti, N., Grütter, M. G. (1996) The crystal structure of TGF-β3 and comparison to TGF-β2: implications for receptor binding, Protein Sci. 5, 1261-1271.

[6] Radaev, S., Zou, Z., Huang, T., Lafer, E. M., Hinck, A. P., Sun, P. D. (2010) Ternary complex of transforming growth factor-β1 reveals isoform-specific ligand recognition and receptor recruitment in the superfamily, J Biol. Chem. 285, 14806-14814.

[7] Wrana, J. L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M ,.Wang, X.-F., Massague, J. (1992) TGFβ signals through a heteromeric protein kinase receptor complex, Cell. 71, 1003-1014.

[8] Groppe, J., Hinck, C. S., Samavarchi-Tehrani, P., Zubieta, C., Schuermann, J. P., Taylor, A. B., Schwarz, P. M., Wrana, J. L., Hinck, A. P. (2008) Cooperative assembly of TGF-β superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding, Mol. cell. 29, 157-168.

[9] Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., Massagué, J. (1994) Mechanism of activation of the TGF-β receptor, Nature. 370, 341-347.

[10] Moustakas, A., Lin, H., Henis, Y. I., Plamondon, J. e., O'Connor-McCourt, M. & Lodish, H. (1993) The transforming growth factor beta receptors types I, II, and III form hetero-oligomeric complexes in the presence of ligand, J Biol. Chem. 268, 22215-22218.

[11] Clark, D. A., Flanders, K. C., Hirte, H., Dasch, J. R., Coker, R., McAnulty, R. J., Laurent, G. J. (1995) Characterization of murine pregnancy decidua transforming growth factor beta. I. Transforming growth factor beta 2-like molecules of unusual molecular size released in bioactive form, Biol. Reprod. 52, 1380-1388.

[12] Schlunegger, M. P., Grütter, M. G. (1992) An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth fact or-β2, Nature. 358, 430-434.

[13] Sun, P. D., Davies, D. R. (1995) The cystine-knot growth-factor superfamily, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 24, 269-292.

[14] Mueller, T. D., Nickel, J. (2012) Promiscuity and specificity in BMP receptor activation, FEBS lett. 586, 1846-1859.

[15] Loeys, B., Mortier, G., Dietz, H. (2013) Bone lessons from Marfan syndrome and related disorders: fibrillin, TGF-B and BMP at the balance of too long and too short, Pediatr Endocrinol Rev. 10, 417-423.

[16] Massagué, J. (2008) TGFβ in cancer, Cell. 134, 215-230.

[17] Gressner, A. M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K., Dooley, S. (2002) Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis, Front Biosci. 7, 793-807.

[18] Narayanan, S. R. (1994) Preparative affinity chromatography of proteins, J. Chromatog. A. 658, 237-258.

[19] Sassenfeld, H. M. (1990) Engineering proteins for purification, TrendsBiotechnol. 8, 88-93.

[20] Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, Nature. 258, 598.

[21] Sheibani, N. (1999) Prokaryotic gene fusion expression systems and their use in structural and functional studies of proteins. Prep. Biochem. Biotechnol. 29, 77-90.

[22] Janknecht, R., Nordheim, A. (1992) Affinity purification of histidine-tagged proteins transiently produced in HeLa cells, Gene. 121, 321-324.

[23] Matthey, B., Engert, A., Klimka, A., Diehl, V., Barth, S. (1999) A new series of pET-derived vectors for high efficiency expression of Pseudomonas exotoxin-based fusion proteins, Gene. 229, 145-153.

[24] Webb, B., Sali, A. (2014) Protein structure modeling with MODELLER, Protein Structure Prediction, 1-15.

[25] Colovos, C. Yeates, T. O. (1993) Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions, Protein science. 2, 1511-1519.

[26] Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR, Journal of biomolecular NMR. 8, 477-486.

[27] Eisenberg, D., Lüthy, R. & Bowie, J. U. (1997) [20] VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles in Methods in enzymology pp. 396-404, Elsevier.

[28] Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, Bioinformatics. 22, 195-201.

Histidine-tagging effect on TGF-β molecular dynamics

Sepideh Sepehri[1], Seyed Shahriar Arab[2*], Mehrdad Behmanesh[3], Reza Hasan Sajed[4*]

1. PhD. Candidate of Biophysics, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares, University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor of Biophysics, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Professor in Human Genetics, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4. Associate Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

sh.arab@modares.ac.ir; sajedi_r@modares.ac.ir

Receipt: 1397/12/10 Accepted:2019/03/01

Abstract:
Transforming growth factor beta (TGF-β), is a small homodimeric signaling protein. The TGF-β isoforms (TGFβ1, β2 and β3) are involved in many cellular processes including growth inhibition, extracellular matrix remodeling, tissue development, cell migration, invasion and immune regulation. For research aims, TGFβs are overexpressed using recombinant eukaryotic cell or bacterial expression systems. For achieving an efficient purification of TGF-β by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC), a histidine tag was placed either at the C-terminal (C-TGFβ) or N-terminal (N-TGFβ) region of the sequence and the effect of His-tag on TGF-β structure has been studied by computational tools. Proteins 3D structures were modeled and molecular dynamics simulation of native TGF-β and modelled proteins, N-TGFβ and C-TGFβ were studied in water. Protein dynamics modeling indicated that the His-tag attached at the C-terminus but not at the N-terminus of the TGF-β can affect the fluctuations of amino acids and protein structure. It is concluded that the C-terminal tagging may cause distortion and misfolding in the structure.

Keywords: TGF-β, His-tag, N-terminus, C-terminus, Molecular dynamics simulation.