کلونینگ، بیان و تخلیص دمین BRICHOS حاصل از Bri2 و خاصیت ضد تجمعی آن

نسرین کاردانی[۱]، بهاره دبیرمنش*[۲]، خسرو خواجه[۳]

۱-کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس ، تهران، ایران
۲-استادیار، گروه بیوشیمی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس ، تهران، ایران
۳- استاد، گروه بیوشیمی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس ، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۲/۵ تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۲٤
*نویسنده مسئول:dabirmanesh@modares.ac.ir

چکیده

رسوب پروتئین‌ها در اثر فرایند تجمع در درون یا بیرون سلول‌ها باعث ایجاد بسیاری از بیماری‌های عصبی نظیر آلزایمر، تشنج هانتینگتون یا پارکینسون می‌شود. بیماری پارکینسون پس از آلزایمر دومین بیماری شایع عصبی است که در اثر تجمع اجسام لوی و تخریب نورون‌های دوپامین اختلالات حرکتی در این بیماران به‌وجود می‌آید. پروتئین آلفاسینوکلئین حاوی۱٤۰ اسید آمینه، اصلی‌ترین پروتئین شناخته‌شده در تجمعات اجسام لوی است. در فرایند تجمع، مونومرهای پروتئینی آلفاسینوکلئین به‌صورت الیگومر به‌هم متصل می‌شوند و درنهایت به‌صورت رشته‌های آمیلوئیدی درمی‌آیند. تاکنون دارویی برای توقف یا به‌تأخیرانداختن پیشرفت پارکینسون وجود نداشته است، اما مطالعات درباره مکانیسم مولکولی تشکیل آمیلوئیدها و شناسایی مهارکننده‌های آن افزایش پیدا کرده است. در این تحقیق، تأثیر دمین BRICHOS حاصل از BRI2 که می‌تواند وظایف مختلفی چون خاصیت ضد تجمعی داشته باشد، بر فرایند تجمع آلفاسینوکلئین به‌عنوان پروتئین مدل بررسی شد. ژن مورد نظر ابتدا بهینه، سنتز و سپس توسط PCR تکثیر شد. محصول توسط آنزیم‌های Xho I و Nde1 هضم آنزیمی و وارد وکتور بیانی pET28 a شد که به باکتری *E.Coli* ترانسفورم شد. در آخر، پپتید مورد نظر با کروماتوگرافی نیکل سفارز تخلیص و ژن آلفاسینوکلئین نیز به‌صورت مجزا بیان و تخلیص شد. اثر ضد تجمعی دمین BRICHOS بر فیبریلاسیون آلفاسینوکلئین با استفاده از روش فلورسانس تیوفلاوین T و تکنیک TEM بررسی شد.

کلید واژگان: آمیلوئید، بیماری‌های تخریب‌کننده اعصاب، BRICHOS، چاپرون، آلفاسینوکلئین

۱. مقدمه

حالت طبیعی پروتئین به‌عنوان یک ساختار در بین تمام ساختارهای ممکن به‌لحاظ ترمودینامیکی پایدارترین حالت است. پدیده بدتاخوردگی هنگامی رخ می‌دهد که یک پروتئین، ساختاری متفاوت از فرم عملکردی خود (حالت طبیعی) داشته باشد. بدتاخوردگی می‌تواند به حالت جزئی

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.9.1]

تاخورده، کاملاً بازشده، به‌صورت مونومر یا حالت تجمع منجر شود. تجمعات به صورت الیگومر با وزن مولکولی پایین، تجمعات بی‌شکل و فیبریل‌های آمیلوئیدی با ساختار منظم وجود دارند. انتخاب مسیر تجمع به‌وسیله محتوی سکانس اسید آمینه و محیط پروتئین تعیین می‌شود. فیبریل-های آمیلوئیدی و پیش‌سازهای وابسته به آن، عامل بیش از ٤٠ بیماری در انسان هستند که در تمامی آنها پروتئین‌های دخیل ساختار خود را از دست می‌دهند و به تشکیل تجمعاتی به‌نام آمیلوئید منجر می‌شوند که در داخل و خارج سلول رسوب می‌کنند (٤-١).

بیماری پارکینسون یکی از بیماری‌های رایج عصبی است که با ازبین‌رفتن نورون‌ها همراه است. (٥) تخریب نورون‌ها در پارکینسون با کم‌شدن نورون‌های تولیدکننده دوپامین در ناحیه Substantia nigra pars compacta(SNpc) سیستم عصبی مرکزی مرتبط است. کاهش نورون‌ها همراه با حضور تجمعات پروتئینی با عنوان Lewy bodies (LB) همراه است (٧-٥).

آلفاسینوکلئین جزء اصلی تشکیل‌دهنده این تجمعات نورونی است و در بخشی از بیماری‌های عصبی هم حضور این پروتئین در نورون‌ها یا سلول‌های گلیال دیده شده است که درمجموع به‌عنوان بیماری‌های مربوط به آلفاسینوکلئین شناخته شده‌اند. آلفا سینوکلین پروتئینی با ١٤٠ آمینو اسیدی، بی‌شکل و از خانواده پروتئین‌های بدون نظم است که در شرایط فیزیولوژیک بدون ساختار قرار دارد یا ساختاری که نظم اندکی دارد. ایجاد رشته‌های تجمعی آلفاسینوکلئین، نشانه‌ای از بیماری پارکینسون و سایر بیماری‌های وابسته به سینوکلئین است (١١-٩).

در تحقیقات مشخص شده است که جلوگیری یا کاهش فیبریلاسیون آلفاسینوکلئین می‌تواند در کاهش علائم بیماری‌های وابسته به آلفاسینوکئین نقش مهمی داشته باشد. مطالعه درباره فیبریلاسیون این پروتئین نقش بسیار پایه‌ای برای طراحی درمان‌های جدید دارد. برای درمان بیماری‌های آمیلوئیدی تاکنون راه‌های مختلفی بررسی و پیشنهاد شده است که یکی از آنها استفاده از چاپرون‌ها است. چاپرون‌ها، مولکول‌هایی هستند که به پروتئین‌های تانخورده متصل می‌شوند و به آنها کمک می‌کنند تا به‌صورت صحیح تا بخورند و ساختار فعال و عملکردی خود را به‌دست بیاورند. همچنین، این مولکول‌ها کمک می‌کنند که پروتئین‌های بدتاخورده به فرم صحیح تاخوردگی خود دست یابند و با اتصال به نواحی هیدروفوب پروتئین‌های بدتاخورده مانع از چسبیدن پروتئین‌ها به یکدیگر و درنتیجه مانع از ایجاد پدیده تجمع شوند (١٤-١١).

به تازگی برای دمینی به نام BRICHOS که قسمتی از پروتئین BRI2 و دارای حدود ١٠٠آمینواسید است، خاصیت چاپرونی گزارش شده است که از تاخوردن ناقص پروتئین‌ها و تشکیل آمیلوئید در آنها جلوگیری می‌کند (١٧-١٥). با توجه به این موضوع در این پژوهش ابتدا دمین BRICHOS در وکتور بیانی pET28 a کلون شد، سپس برای مطالعه خاصیت ضد تجمعی، این دمین و آلفاسینوکلئین به‌صورت مجزا بیان و تخلیص و اثر دمین BRICHOS روی فیبریلاسیون آلفاسینوکلئین با استفاده از تکنیک‌های فلورسانس تیوفلاوینT و میکروسکپ الکترونی TEM بررسی شد.

٢. مواد و روش‌ها

٢-١. مواد

تریس، SDS، EDTA، ایزوپروپیل بتا-دی گالاکتوپیرانوزید (IPTG)، تیوفلاوینT از شرکت سیگما (St. Louis, MO. USA)، تریپتون و عصاره مخمر از شرکت دیفکو (Difco, detriot, MI, USA) تهیه شد. ستون استفاده‌شده در خالص‌سازی و مواد استفاده‌شده برای تهیه ژل اکریل آمید از شرکت فارماسیا (Uppsala, Sweden)، آنزیم‌های NdeI و XhoI و آنزیم پلی‌مراز از

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.9.1]

شرکت فرمنتاز (Fermentase, USA)، آگارز از شرکت GibcoBRL (Maryland, USA)، متانول، اتانول، n-پروپانول و مواد شیمیایی مورد نیاز دیگر از شرکت مرک (Merk, Darmstadt, Germany) خریداری شد. آنتی‌بیوتیک کانامایسین، ناقل کلونینگ باکتری pET28-a باکتری اشریشیاکلی سویهBL۲۱ وDH5α از شرکت Novagen (Novagen, USA) خریداری شد.

۲-۲. روش‌ها

۲-۲-۱ کلون و بیان دمین BRICHOS

ژن دمین BRICHOS بهینه و توسط شرکت Genecust در وکتور pUC 57 سنتز شد. سپس، با یک جفت پرایمر طراحی‌شده با سایت برش NdeI و XhoI، روی آن واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد.

Forward primer: 5´ AAAAAAACATATGTCCGTTCCTGTACCAG 3´
Nde I cut site : CA'TATG
Reverse primer: 5´ AAAAATACTCGAGTTACAGTTTGTAGGTCT C 3´
Xho I cut site : C'TCGAG

برنامه PCR طبق جدول ۱ انجام و محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ برده شد. پس از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید، باند حاصل با شاخص وزنی مقایسه شد.

جدول ۱. برنامه PCR مورد استفاده به‌منظور تکثیر ژن مورد نظر

نام مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه
Pre-denaturation	۹۵	۳۰۰	۱
Denaturation	۹٤	٦۰	۳۰
Annealing	٦۰-۵۵	٦۰	۳۰
Extention	۷۲	۹۰	۳۰
Final extention	۷۲	۹۰۰	۱

سپس محصول PCR پس از clean up، هضم آنزیمی شد و با وکتور pET28a که با همین دو آنزیم برش داده شده بود، توسط ligase T4 به‌هم متصل و درنهایت به باکتری *Ecoli* سویه BL 21 ترانسفورم شد. شرایط مختلف بیان برای به‌دست‌آوردن بیان بهینه امتحان شد و بهترین شرایط به‌دست‌آمده در محیط LB القا با ۰/۲۵ میلی‌مولار IPTG دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شیک rpm۱۸۰ به مدت ٦ ساعت حاصل شد. سلول‌ها پس از ٦ ساعت انکوباسیون با سانتریفیوژ جمع‌آوری شدند (۳۰۰۰ g ×, g, 4 °C and 20 min). در مرحله بعد رسوب به‌دست‌آمده در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار pH =۸ حاوی 300 میلی‌مولارNaCl ، روی یخ سونیکه شد. در این عمل به مدت ۱۰ دقیقه و در هر دقیقه ۲۰ ثانیه سلول‌ها سونیکه می‌شدند و ٤۰ ثانیه روی یخ می‌ماندند. سلول‌های شکسته‌شده با سانتریفیوژ با دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد ته‌نشین شدند.

ازآنجاکه بیان به‌صورت اجسام تجمعی (Inclusion bodies) بود، محلول رویی دور ریخته و رسوب در اوره ۸ مولار حل و در g ۱۲۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به دلیل اینکه پروتئین نوترکیب بیان‌شده دنبالهٔ هیستیدینی

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.9.1]

در انتهای آمینی خود داشت، برای تخلیص آن از روش کروماتوگرافی تمایلی و استفاده از ستون نیکل آگارز استفاده شد. برای ریفولدکردن نمونه‌های تخلیص‌شده با استفاده از کیسه دیالیز ۲ کیلودالتون در بافر تریس ۵۰ میلی مولار با حجم ۲ لیتر و در ٤°C برای تعویض بافر و حذف‌کردن اوره ۸ مولار از پیرامون پروتئین، دیالیز شد. در انتها از ترمبین حاوی دنباله هیستیدینی استفاده شد که تگ هیستیدینی از انتهای آمینی BRICHOS از طریق هضم آنزیمی توسط ترومبین جدا می‌شود.

۲-۲-۲. بیان سینوکلئین

آلفاسینوکلئین در وکتور بیانی pET 21a و باکتری E.coli سویه BL 21 بیان شد. بیان پروتئین در محیط TB پس از رسیدن به OD_{600}= 1/5-1/8 توسط IPTG (غلظت نهایی یک میلی‌مولار) القا و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤:۳۰ ساعت و با شیک ۲۲۰rpm انکوبه شد. سپس محتویات ارلن خارج‌شده از انکوباتور به مدت ۲۰ دقیقه در ٤۰۰۰g سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. پلت باکتری در بافر لیز توسط سونیکاتور لیز گردید و محلول رویی به‌دست‌آمده جهت تخلیص به روی ستون نیکل آگارز برده و در ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول خارج شد. نمونه‌های تخلیص‌شده با هم مخلوط و با استفاده از کیسه دیالیز ۲ کیلودالتون در تریس ۳۰ میلی‌مولار و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl در ٤ درجه سانتی‌گراد تعویض بافر شد. بافر، طی ۲٤ ساعت، سه بار تعویض شد.

۲-۲-۳. شرایط فیبریلاسیون

پس از انجام‌دادن دیالیز، کیسه دیالیز را تا زمانی که آب پروتئین کشیده شود و به غلظت ۲/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برسد، در ظرف حاوی PEG600 قرار داده شد. سپس، برای بررسی فیبریلاسیون ٤۵۰ میکرولیتر از پروتئین آلفاسینوکلئین حاصل را همراه ۵۰ میکرولیتر بافر تریس و مگنت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای تعیین غلظت پروتئین، جذب پروتئین در ۲۸۰ نانومتر خوانده و با استفاده از ضریب خاموشی پروتئین تعیین غلظت شد. ضریب خاموشی آلفاسینوکلئین در ۲۸۰ نانومتر برابر با $5960\ M^{-1}\ cm^{-1}$ است.

برای بررسی عملکرد دمین BRICHOS بر فیبریلاسیون آلفاسینوکلئین، در چند ویال به‌ترتیب دارای پروتئین آلفاسینوکلئین تنها، BRICHOS تنها و ویال حاوی سینوکلئین، همراه BRICHOS با نسبت مولی ۱:۱۰ و ۱:۲۰ از الفاسینوکلئین و دمین BRICHOS ترکیب شدند. غلظت BRICHOS با برادفورد اندازه‌گیری شد.

۲-۲-٤. فلورسانس تیوفلاوین T

برای ارزیابی تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی از محلول تازه‌تهیه‌شده تیوفلاوینT که با استفاده از سرنگ فیلتر شده بود، استفاده شد. غلظت تیوفلاوینT در این محلول ۲۵ میکرومولار بود. µL ۱۰ از هر نمونه پروتئین انکوبه‌شده را به µL ۱۰۰۰از محلول تازه تیوفلاوینT با غلظت ۲۵ میکرومولار اضافه شد. طول موج برانگیختگی ٤٤۰ نانومتر و محدوده نشری بین ٤۵۰ تا ۵۵۰ نانومتر انتخاب شد.

۲-۲-۵. میکروسکوپ الکترونی

تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری با استفاده از دستگاه Hitachi Hu-12A مشاهده و عکسبرداری شد. ۵ میکرولیتر از آلفاسینوکلئین با غلظت ۱/۱ میلی‌گرم در

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.9.1]

میلی‌لیتر برداشته و روی گریدهای پوشیده‌شده از کربن قرار داده شد. سپس رنگ‌آمیزی با استفاده از اورانیل استات دو درصد و پس از دو تا پنج دقیقه عکسبرداری از نمونه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری انجام شد.

۳. نتایج

۳-۱. کلون ژن دمین BRICHOS

به‌دلیل‌اینکه دمین BRICHOS قسمتی از پروتئین Bri2 است، جهت کلون آن ابتدا اسید آمینه این ناحیه به‌دست آمد و ژن آن جهت بیان در *Ecoli* بهینه‌سازی و توسط شرکت Genecust فرانسه در وکتور pUC57 سنتز شد (شکل ۱).

Amino acid

MSVPVPEFADSDPANIVHDFNKKLTAYLD
LNLDKCYVIPLNTSIVMPPRNLLELLINIKAGT
YLPQSYLIHEHMVITDRIENIDHLGFFIYRLCH
DKETYKL

Optimized sequence

CATATGTCCGTTCCTGTACCAGAATTCG
CAGACTCTGACCCGGCTAACATCGTTCATG
ATTTTAACAAGAAACTGACCGCGTACCTGG
ATCTGAACCTGGACAAATGCTACGTGATCC
CGCTGAACACTTCTATCGTGATGCCGCCGC
GTAACCTGCTGGAACTGCTGATTAACATCA
AAGCCGGTACCTATCTGCCGCAGAGCTATC
TGATTCATGAACACATGGTCATTACGGATC
GTATCGAAAATATCGACCACCTGGGCTTCT
TCATCTACCGCCTGTGTCACGATAAAGAGA
CCTACAAACTGTAA**CTCGAG**

شکل ۱. توالی آمینو اسیدی و نوکلئوتیدی دمین BRICHOS

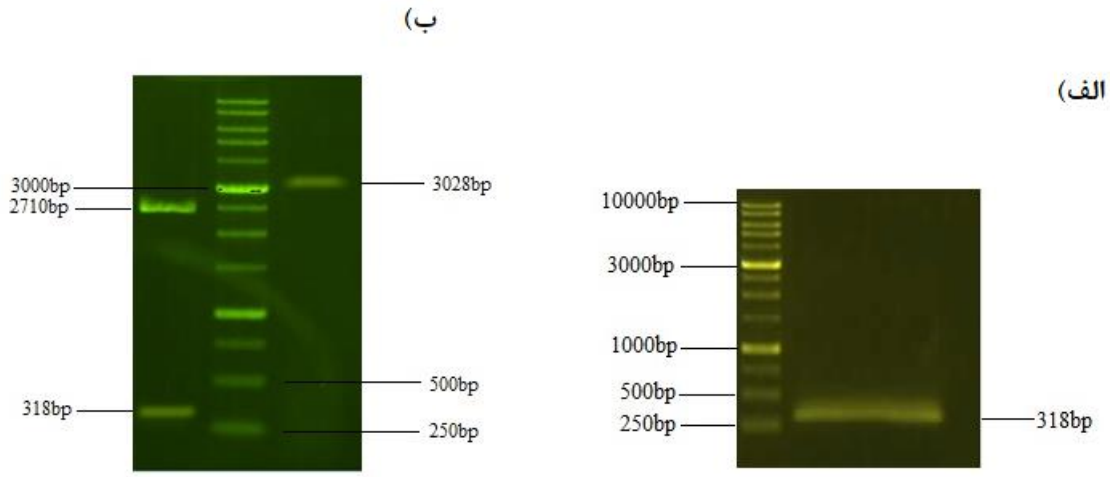
چون وکتور pUC57 یک وکتور کلونینگ بود، ژن مربوط به آن باید به یک وکتور بیان انتقال داده می‌شد. pET28a جهت بیان در *Ecoli* انتخاب شد. بنابراین، یک جفت پرایمر با سایت برش NdeI و XhoI طراحی و پس از انجام PCR ژن مربوط با دو جایگاه برش تکثیر و روی ژل آگارز برده شد. پس از استخراج از ژل و هضم آنزیمی، به وکتور pET28 a که با همین دو آنزیم محدودکننده برش داده شده بود، به نسبت ۳ به ۱ مخلوط و برای واکنش الحاق از آنزیم T4 ligase استفاده شد. سپس به باکتری BL21 ترانسفرم شد. باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب از طریق کشت‌دادن سلول‌ها روی محیط آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین انجام شد و سلول‌هایی که دارای پلاسمید pET28a بودند، در این محیط رشد کردند و کلونی تشکیل دادند.

پلاسمید به‌دست‌آمده برای تأیید حضور ژن مورد نظر، توسط آنزیم‌های محدودکننده NdeI و XhoI مورد هضم دوگانه قرار گرفت. در اثر هضم توسط آنزیم‌های محدودکننده ژن مورد نظر واردشده به پلاسمید از وکتورpET28a جدا شد که در این صورت قطعه ژنی واردشده در محدوده بین ۳۰۰ جفت باز و ۵۰۰ جفت باز قرار گرفت و وکتور خطی‌شده در محدوده ۵۰۰۰ جفت باز قرار گرفت (شکل ۲).

همچنین، برای تأیید نهایی و نبود جهش، توالی آن تعیین شد. صحت توالی به‌دست‌آمده توسط NCBI و نبود جهش نیز با استفاده از www.expasy.org بررسی شد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

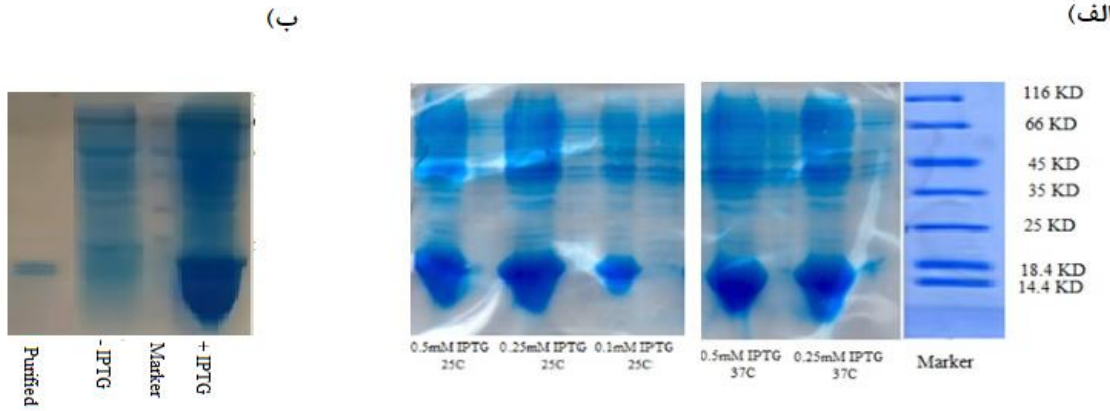
[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.9.1]



شکل ۲).الف- ژل الکتروفورز اگارز (۱٪) محصول PCR **ب**- پلاسمید قبل هضم آنزیمی و بعد هضم آنزیمی وکتور pET28a حاوی ژن

۳-۲. بیان و تخلیص دمین BRICHOS و پروتئین آلفاسینوکلئین

پس از کلون ژن BRICHOS و ترانسفرم آن به داخل میزبان بیانی *Ecoli*، بیان در غلظت‌های مختلف IPTG (۱، ۰,۵ و ۰/۲۵ میلی‌مولار) و دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط LB و TB صورت گرفت که بهترین شرایط در محیط LB با غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار IPTG و دمای ۲۵ سانتی‌گراد به مدت ٦ ساعت در نظر گرفته شد. پس از لیز باکتری پروتئین در تمام شرایط فوق در پلت قرار داشت. بنابراین، پروتئین در ۸ مولار اوره محلول و دناتوره و با توجه به وجود دنباله هسیتیدینی در انتهای آمینی توسط ستون تمایلی نیکل سفارز تخلیص شد (شکل ۳)، سپس توسط دیالیز در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار pH= ۷/۵ به مدت ۲٤ ساعت ریفولد شد.

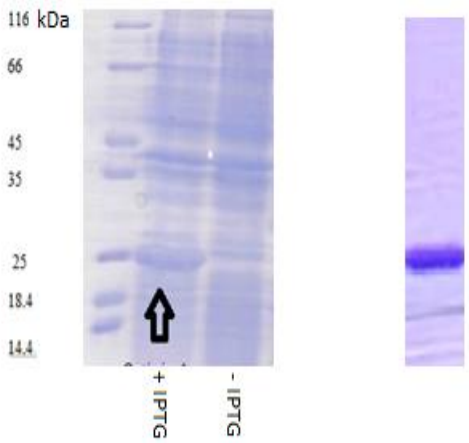


شکل ۳. الف- ژل اکتروفورز SDS مربوط به بیان BRICHOS در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌مولار IPTG در محیط LB **ب**- بیان و تخلیص BRICHOS در شرایط بهینه

شرایط بیان پروتئین آلفاسینوکلئین که در مطالعات قبلی در محیط TB با یک میلی‌مولار IPTG به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گزارش شده بود، انجام و به‌وسیله ستون نیکل آگارز تخلیص شد. (شکل ٤) سپس نمونه خالص شده تعویض بافر و توسط PEG تغلیظ شد تا به غلظت ۲/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برسد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

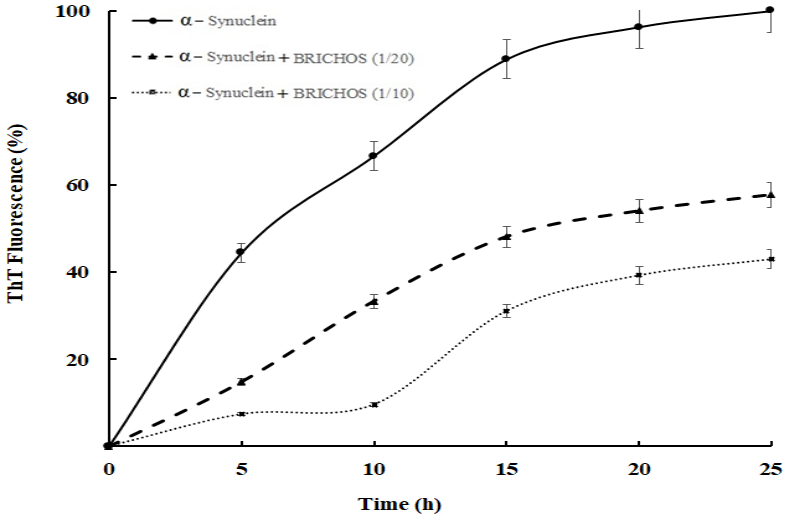
[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.9.1]



شکل ٤. ژل الکتروفورز SDS مربوط به بیان و تخلیص آلفاسینوکلئین

۳-۳. بررسی اثر BRICHOS روی فیبریلاسیون آلفاسینوکلئین

پس از بیان و تخلیص پروتئین آلفا سینوکلئین و دمین BRICHOS ، در مرحله بعد با استفاده از تکنیک فلورسانس تیوفلاوینT که روش استاندارد بررسی تشکیل فیبریل است، اثر ضد تجمعی دمین BRICHOS بر فیبریلاسیون آلفاسینوکلئین مطالعه شد. به‌این‌منظور ویال‌هایی با ترتیب کنترل که فقط دارای پروتئین آلفاسینوکلئین بودند، دیگری BRICHOS به تنهایی و در دو ویال هم آلفاسینوکلئین به همراه BRICHOS با دو نسبت ۱:۱۰ و ۱:۲۰ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و وجود مگنت به مدت ٤٨ ساعت انکوبه شد. با گذشت این مدت، نمونه در زمان‌های مختلفی برداشته و با تیوفلاوینT طبق بخش روش‌ها مخلوط و سپس نشر فلوروسانس آن خوانده شد. همان‌طورکه در شکل ۵ نشان داده می‌شود، دمین BRICHOS باعث کاهش فیبریلاسیون و با افزایش غلظت آن علاوه بر کاهش، به تأخیری در شروع فیبریلاسیون نیز منجر می‌شود (شکل ۵).



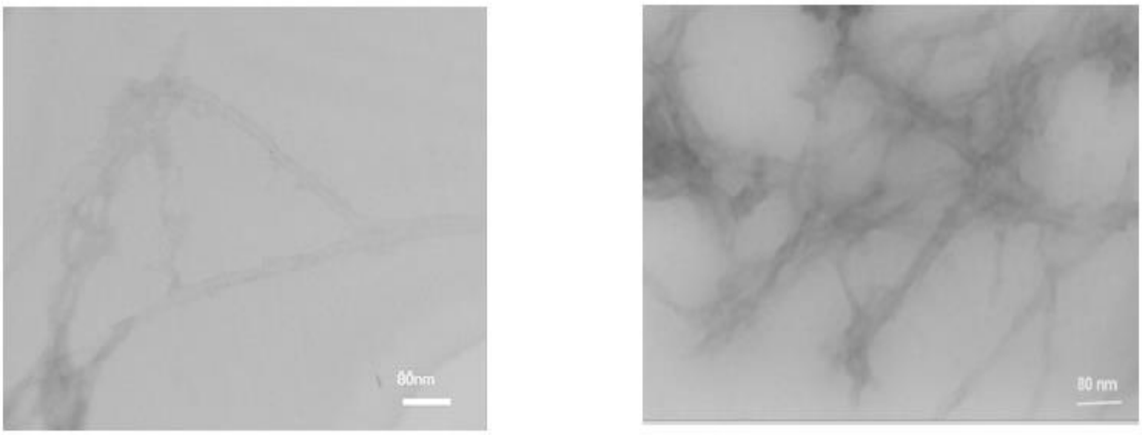
شکل ۵. نمودار بررسی اثر دمین BRICHOS بر فیبریلاسیون آلفاسینوکلئین با تکنیک فلورسانس تیوفلاوینT. فیبریلاسیون آلفاسینوکلئین با غلظت ۲/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در فواصل زمانی متفاوت در عدم حضور و حضور BRICHOS با دو نسبت ۱/۱۰ و ۱/۲۰ بررسی شد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.9.1]

فیبریلاسیون سینوکلئین نیز در حضور و عدم حضور BRICHOS در غلظت 1/10 با استفاده از تکنیک TEM بررسی شد. همان‌طورکه در شکل ٦ مشاهده می‌شود، اضافه‌شدن BRICHOS به مخلوط واکنش باعث می‌شود مقدار فیبریلاسیون آلفاسینوکلئین کاهش یابد که این امر نتایج به‌دست‌آمده از تکنیک تیوفلاوینT را تأیید می‌کند.

الف) ب)



شکل ٦. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از تجمعات تشکیل‌شده آلفاسینوکلئین الف- در عدم حضور و ب- حضور BRICHOS

٤. بحث

تشکیل تجمعات آمیلوئیدی با فرایند پیری و تغییر سبک زندگی، ارتباطی تنگاتنگ دارند که پیامد آن ایجاد اختلالات شدیدی همچون بیمار آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون است. این بیماری‌ها با تجمعات درون‌سلولی و بین‌سلولی مرتبط و عمدتاً به شکل فیبرهای آمیلوئیدی نامحلول با ویژگی‌های ساختاری بتا هستند (۱۸ و۱۹) .

معمولاً حالت آمیلوئیدی یک پروتئین، بدون توجه به توالی آمینواسیدی یا ساختار طبیعی آن به شکل رشته‌های فیبرمانند غنی از ساختار صفحات بتا آشکار می‌شود. آزمایش‌هایی که روی طیفی وسیع از پپتیدها و پروتئین‌ها در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است، نشان می‌دهد، توانایی تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی پدیده نادری نیست که فقط با تعدادی از بیماری‌ها مرتبط باشد، بلکه تقریباً انواع پروتئین‌ها می‌توانند در شرایط خاص حالت آمیلوئیدی را به‌عنوان شکل ساختاری مشخصی به خود بگیرند. همانند حالت‌های طبیعی پروتئین‌های گلبولار، ساختارهای آمیلوئیدی نیز بسیار منظم و نزدیک به هم در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند، اما برخلاف حالت‌های طبیعی، آنها یک معماری مشترک و ژنریک در زنجیره اصلی خود دارند، هرچند که جزئیات خاص و خصوصیات ساختاری آنها با ترکیبات و توالی زنجیره جانبی اجزای آمینواسیدی‌شان متفاوت است. همچنین، شواهد نشان می‌دهد، امکان دارد در شرایط فیزیولوژیک، حالت آمیلوئیدی بسیاری از پروتئین‌ها پایدارتر از حالت‌های عملکردی و طبیعی آنها باشد (۲۲-۲۰).

اگرچه مدت زیادی است که ارتباط بین آسیب‌زایی رسوبات آمیلوئیدی و بیماری‌های مرتبط با ناجور تاخوردگی مشخص شده است، مکانیسم خاصی که آسیب‌زایی را القا می‌کند هنوز جای بحث دارد. بیماری‌های آمیلوئیدی بعد از اختلال در فرایندهای تنظیمی یا کنترل‌کننده‌ای که مانع از تبدیل حالت

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.9.1] [Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

عملکردی و طبیعی مولکول‌های پروتئینی منفرد به حالت ناجور تاخورده می‌شود، آغاز می‌شوند. در نتیجه، در اثر میان‌کنش‌های بین آنها در فرایندهای طبیعی حیات می‌تواند اختلال ایجاد شود. در بیماری‌های ناشی از آمیلوئیدوزیس سیستمی نظیر آنچه در اندام‌های حیاتی مثل کبد و طحال رخ می‌دهد، احتمالاً علت اصلی عملکرد غیر طبیعی آن اندام، میزان زیاد رسوبات فیبریلی است که در برخی از موارد به کیلوگرم نیز می‌رسد. در بیماری‌های تحلیل‌برنده سیستم عصبی میزان آمیلوئیدهای تشکیل‌شده می‌تواند بسیار کم باشد و ارتباط کمی ممکن است بین کمیت رسوبات و شدت علائم بیماری دیده شود. امروزه مطالعات زیادی روی ترکیبات مهارکننده فیبریلاسیون انجام می‌شود که دو جنبه اصلی آن، شناسایی سازوکار عمل آنها و یافتن ترکیبات مهارکننده مؤثرتر و عام‌تر است. یافتن میان‌کنش‌های بین مولکولی در فیبریل‌ها در طراحی ترکیبات مهاری مهم است (۲۳-۲۰).

چاپرون‌های مولکولی نیز پروتئین‌های بدتاخورده را شناسایی می‌کنند و با کمک به تاخوردگی صحیح آنها مانع از گردهمایی و تجمع بعدی آنها می‌شوند (۲۸-۲٤). به تازگی دمینی به نام BRICHOS کشف شده است که مانند چاپرون‌ها عمل و از تاخوردن ناقص پروتئین‌ها و تشکیل آمیلوئید جلوگیری می‌کند. نام این دمین را از حروف ابتدایی سه پروتئینی گرفتند که این دمین را داشتند: BRI2، که با دو بیماری FBD و FDD ارتباط دارد. Chondromodulin با بیماری کوندروسارکوما مرتبط است و Surfactant C با بیماری‌های سندروم زجرتنفسی و شکاف ریوی (۱٦-۱٤) .

به‌دلیل اهمیت امیلوئید در بیماری‌ها و نقش چاپرون‌ها در حذف، کاهش یا تأخیر تشکیل آنها، در این مطالعه پس از کلون، بیان، تخلیص و ریفولد دمین BRICHOS گرفته‌شده از پروتئین BRI2 خاصیت ضد تجمعی آن بر فیبریلاسیون آلفاسینوکلئین بررسی شد. دلیل انتخاب این دمین در این پژوهش این بود که قبلاً خاصیت ضد تجمعی دمین‌های BRICHOS از پروتئین‌های BRI2 و proSP-C، روی Aβ (عامل بیماری آلزایمر) بررسی و تأیید شده و تأثیر این دمین حاصل از پروتئین BRI2 نتیجه بهتری نشان داده بود. بنابراین، به بررسی این خاصیت بر پروتئین فیبریل‌شونده آلفاسینوکلئین که عامل بیماری پارکینسون است، پرداختیم. به امید اینکه فعالیت چاپرونی این دمین راهی را به‌سوی کاهش پیشرفت بیماری‌های تخریب عصبی بگشاید.

به‌این‌منظور، ژن دمین BRICHOS پس از بهینه‌شدن و کلون در وکتور بیانی مناسب به صورت اجسام تجمعی (inclusion body) بیان شد که پس از حل‌شدن در اوره ۸ مولار توسط ستون نیکل آگارز تخلیص و با دیالیز ریفولد شد. سپس با نسبت مولی ۱ به ۱۰ و ۱ به ۲۰، روی آلفاسینوکلئین اثر داده و در شرایط فیبریلاسیون پروتئین آلفاسینوکلئین فعالیت ضد تجمعی آن توسط تیوفلاوین T و خوانش نشر فلورسانس آن در زمان‌های مختلف بررسی شد. تیوفلاوین T دو حلقه بنزیل آمین و بنزاتیول دارد که این دو حلقه آزادانه حول پیوند کربن-کربن می‌چرخند و تابش فلورسانس یکدیگر را طی پدیده quenching (خاموش‌کردن) خنثی می‌کنند. زمانی‌که این حلقه‌ها، بین رزیدوهای آروماتیک موجود در بین فیبریل‌های آمیلوئیدی قرار می‌گیرند، حرکت آزادانه این دو حلقه مختل می‌شود و دیگر نمی‌توانند تابش فلورسانس یکدیگر را خاموش کنند. بنابراین انتظار می‌رود با افزایش میزان فیبریل‌ها، میزان نشر فلورسانس تیوفلاوین نیز افزایش یابد. در این مطالعه نیز کاهش نشر تیوفلاوین T با افزودن هر دو نسبت از BRICHOS به مخلوط آلفاسینوکلئین کم‌شدن تشکیل فیبریل پروتئین آلفاسینوکلئین در حضور دمین BRICHOS را نشان می‌دهد. البته در نسبت مولی ۱:۱۰ از BRICHOS علاوه بر کاهش فیبریلاسیون، تأخیر در

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.9.1]

ایجاد فیبریل نیز مشاهده شد. بررسی فیبریل‌های ایجادشده توسط TEM در حضور و عدم حضور BRICHOS نیز بررسی شد که کاهش تشکیل فیبریل آمیلوئید در حضور BRICHOS را نشان داد. براساس نتایج این تحقیق و همچنین مطالعات قبلی دمین BRICHOS در روند تشکیل فیبریل Aβ تداخل ایجاد می‌کند و روند این فیبریل‌شدن را به تأخیر می‌اندازد. مطالعات روی αβ نشان می‌دهد، هسته هیدروفوب Aβ (HHKLVFFAED) توسط رزیدوهای باردار موجود در دمین BRICHOS احاطه شده است و این می‌تواند سوبسترای هدفی برای اتصال دمین BRICHOS باشد. با توجه به مطالعات گذشته روی ساختار آلفاسینوکلئین نیز ناحیه هیدروفوب وجود دارد که امکان مکانیسم مشابه ارائه‌شده برای سینوکلئین وجود داشته باشد (۱٤-۱٦ و ۲۹).

با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات پیشین، فعالیت دمین BRICHOS می‌تواند محدودکننده یا منع‌کننده بدتاخوردن و تجمع نواحی مستعد پلی‌پپتیدی شود. فعالیت چاپرونی این دمین می‌تواند مسیری برای پیشگیری یا درمان بیماری‌های آمیلوئیدی ایجاد کند که نیازمند فهمیدن جزئیات مولکولی بیشتر و انجام‌دادن آزمایش‌های invivo و بالینی باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که منابع مالی این تحقیق را تأمین کرده است.

منابع

1. Dobson CM (2001) The structural basis of protein folding and its links with human disease. Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci 356:133–145

2. Dobson CM (2003) Protein folding and misfolding. Nature 426:884–890

3. Herczenik E, Gebbink MFBG (2008) Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease. FASEB J 22:2115–2133

4. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, et al (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Aβ1–42 are potent central nervous system neurotoxins. Proc Natl Acad Sci 95:6448–6453

5. Knowles TPJ, Waudby CA, Devlin GL, et al (2009) An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. Science (80-) 326:1533–1537

6. Galvin JE, Lee VM, Schmidt ML, et al (1999) Pathobiology of the Lewy body. Adv Neurol 80:313

7. Lotharius J, Brundin P (2002) Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α-synuclein. Nat Rev Neurosci 3:932–942

8. Hardy J, Cai H, Cookson MR, et al (2006) Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. Ann Neurol 60:389–398

9. Giasson BI, Murray IVJ, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2001) A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α-synuclein is essential for filament assembly. J Biol Chem 276:2380–2386

10. Dettmer U, Newman AJ, Soldner F, et al (2015) Parkinson-causing α-synuclein missense mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation. Nat Commun 6:1–16

11. Breydo L, Wu JW, Uversky VN (2012) α-Synuclein misfolding and Parkinson's disease. Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Basis Dis 1822:261–285

12. Dedmon MM, Christodoulou J, Wilson MR, Dobson CM (2005) Heat shock protein 70 inhibits α-synuclein fibril formation via preferential binding to prefibrillar species. J Biol Chem 280:14733–14740

13. Wilhelmus MMM, Boelens WC, Otte-Höller I, et al (2006) Small heat shock protein HspB8: its distribution in Alzheimer's disease brains and its inhibition of amyloid-β protein aggregation and cerebrovascular amyloid-β toxicity. Acta Neuropathol 111:139–149

14. Willander H, Hermansson E, Johansson J, Presto J (2011) BRICHOS domain associated with lung fibrosis, dementia and cancer–a chaperone that prevents amyloid fibril formation? FEBS J 278:3893–3904

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.9.1]

15. Hedlund J, Johansson J, Persson B (2009) BRICHOS-a superfamily of multidomain proteins with diverse functions. BMC Res Notes 2:180

16. Peng S, Fitzen M, Jörnvall H, Johansson J (2010) The extracellular domain of Bri2 (ITM2B) binds the ABri peptide (1–23) and amyloid β-peptide (Aβ1–40): Implications for Bri2 effects on processing of amyloid precursor protein and Aβ aggregation. Biochem Biophys Res Commun 393:356–361

17. Willander H, Presto J, Askarieh G, et al (2012) BRICHOS domains efficiently delay fibrillation of amyloid β-peptide. J Biol Chem 287:31608–31617

18. Sweeney P, Park H, Baumann M, et al (2017) Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. Transl Neurodegener 6:6

19. Luheshi LM, Crowther DC, Dobson CM (2008) Protein misfolding and disease: from the test tube to the organism. Curr Opin Chem Biol 12:25–31

20. Baldwin AJ, Knowles TPJ, Tartaglia GG, et al (2011) Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. J Am Chem Soc 133:14160–14163

21. Chiti F, Dobson CM (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. Annu Rev Biochem 75:333–366

22. Otzen DE (2013) Amyloid fibrils and prefibrillar aggregates: molecular and biological properties. John Wiley & Sons

23. Cheon M, Chang I, Mohanty S, et al (2007) Structural reorganisation and potential toxicity of oligomeric species formed during the assembly of amyloid fibrils. PLoS Comput Biol 3:

24. Wilson MR, Yerbury JJ, Poon S (2008) Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. Mol Biosyst 4:42–52

25. Broadley SA, Hartl FU (2009) The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. FEBS Lett 583:2647–2653

26. Maiti P, Manna J, Veleri S, Frautschy S (2014) Molecular chaperone dysfunction in neurodegenerative diseases and effects of curcumin. Biomed Res Int 2014:

27. Vashist S, Cushman M, Shorter J (2010) Applying Hsp104 to protein-misfolding disorders. Biochem Cell Biol 88:1–13

28. Zhang H, Xu L-Q, Perrett S (2011) Studying the effects of chaperones on amyloid fibril formation. Methods 53:285–294

29. Willander H, Askarieh G, Landreh M, et al (2012) High-resolution structure of a BRICHOS domain and its implications for anti-amyloid chaperone activity on lung surfactant protein C. Proc Natl Acad Sci 109:2325–2329

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.9.1]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Cloning, expression and purification of the BRICHOS domain from Bri2 and its anti-amyloidogenic effects

Nasrin Kardani[1], Bahareh Dabirmanesh[*2], Khosro Khajeh[3]

1. MSc, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3 Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 2020/4/24 Accepted: 2020/11/14
*Corresponding author: dabirmanesh@modares.ac.ir

Abstract

Protein deposition due to the process of accumulation inside or outside cells causes many neurological diseases such as Alzheimer's, Huntington's or Parkinson's seizures. Parkinson's disease is the second most common neurological disease after Alzheimer's, in which patients develop disorders due to the accumulation of leprosy and the destruction of dopamine neurons. Alpha-synuclein protein contains 140 amino acids, the main protein known in lewy body accumulations. During the aggregation process, alpha-synuclein protein monomers bind together as oligomers and eventually become amyloid filaments. So far, there is no drug to stop or delay the progression of Parkinson's, but studies on the molecular mechanism of amyloid formation and the identification of inhibitors are increasing. For this purpose, in this study, the effect of BRICHOS domain resulting from BRI2, which can have various functions, including antimicrobial properties, on the process of alpha-synuclein accumulation as a model protein was investigated. The gene was first optimized and synthesized and then multiplied by PCR. The product was digested by enzymes Xho I and Nde1 and cloned into the expression vector pET28 a, which was then transformed into *E. coli* bacteria. Finally, the peptide was purified by nickel chromatography. The alpha-synuclein gene was also expressed separately and purified. The anti-cumulative effect of BRICHOS domain on alpha-synuclein fibrillation was investigated using Thioflavin T fluorescence method and TEM technique.

Keywords: Amyloid, neurodegenerative disorders, BRICHOS domain, chaperone

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.9.1]