

بررسی اثر دنباله سومو بر بیان، حلالیت و فیبریلایسیون آلفاسینوکلئین

صابره صارمی^۱، بهاره دبیرمنش^۲، مهدی عیاری^۳، خسرو خواجه^{۴*}

۱ دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲ دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳ استادیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴ *استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

khajeh@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۴

دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۳

چکیده

پروتئین آلفا سینوکلئین اصلی‌ترین عامل شناخته شده در بیماری پارکینسون است. بیان این پروتئین به دلیل خاصیت تجمعی که دارد با چالش همراه است. یکی از این چالش‌ها وجود پروتئین در ر سوب باکتری است. مطالعات نشان داده که بیان پروتئین‌ها با برج‌سب‌هایی نظیر SUMO باعث افزایش بیان در فاز محلول می‌شود؛ از این رو بیان آلفاسینوکلئین با این دنباله جهت افزایش پروتئین در فاز محلول بررسی شد. همچنین در این مطالعه سعی بر آن شد که تأثیر دنباله سومو بر فیبریلایسیون آلفاسینوکلئین بررسی شود. در این تحقیق ژن آلفا سینوکلئین با دنباله سومو کلون شد. بیان پروتئین به فرم محلول صورت گرفت. پروتئین توسط ستون نیکل سفاروز تخلیص شد و دیالیز انجام شد. سپس، بررسی فیبریلایسیون توسط نشر فلورسانس تیوفلاوین تی به مدت ۷۲ ساعت صورت گرفت. مشاهده شد که پروتئین به همراه دنباله سومو میزان بیان بالاتری دارد و ۹۵ درصد از پروتئین در فاز محلول است از طرفی نشان داده شد که دنباله سومو خاصیت مهاری بر روند تشکیل فیبریل آمیلوئید در مقایسه با آلفاسینوکلئین بدون دنباله سومو دارد. نتایج به دست آمده از مطالعات پیشین نشان می‌داد که اتصال دنباله سومو باعث افزایش بیان و میزان حلالیت پروتئین‌های نو ترکیب می‌شود. این مطالعه نشان داد که حضور این دنباله به میزان بیان پروتئین و همچنین حضور پروتئین در فاز محلول کمک کرد. از طرفی مشاهدات آزمایشگاهی نشان داده که این دنباله خاصیت ضد فیبریلایسویی برای پروتئین‌هایی با خاصیت آمیلوئیدی دارد و در این مطالعه مشاهده شد که اضافه کردن دنباله سومو به پروتئین آلفاسینوکلئین مانع خاصیت تجمعی آن می‌شود.

کلید واژگان: پارکینسون، آلفاسینوکلئین، فیبریل‌های آمیلوئیدی، دنباله سومو

۱. مقدمه

هنگامی که عدم موفقیت سیستم کنترل سلولی به دلیل استرس و پیری منجر به تشکیل گونه‌هایی بد تاخورد و تجمع‌ها می‌شود کاستی‌هایی حادث شده که سبب پیدایش عوارضی در سلول می‌گردد [۱]. فیبریل‌های آمیلوئیدی که از نمونه‌های بارز بد تاخوردگی در سلول است، ساختار دوم مشترک صفحات بتا^۱ دارند [۲]. این ساختار متشکل از رشته‌های بتا موازی می‌باشد که عمود بر محور مارپیچ قرار دارند [۳]. علاوه بر آن فیبریل‌های آمیلوئیدی ویژگی‌های نوری ویژه‌ای مانند اتصال به رنگ‌های قرمز کنگو (CR) و تیوفلاوین تی (ThT) را دارند [۴]. محققان زیادی نشان داده‌اند که تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی از مدل پلیمریزاسیون وابسته به هسته‌زایی تبعیت می‌کند. به‌طور معمول کینتیک تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی شامل سه مرحله است. مرحله اولیه، مرحله وابسته به هسته‌زایی است که مرحله حساس و محدود کننده سرعت در فرایند تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی بوده و از نظر ترمودینامیکی نامناسب است [۵]. فیبریل‌های آمیلوئیدی و پیش‌سازهای وابسته به آن، عامل بیش از ۴۰ بیماری در انسان می‌باشد که در تمامی آن‌ها پروتئین ساختار ویژه خود را از دست داده و در داخل و خارج سلول رسوب می‌کنند [۶].

بیماری پارکینسون^۲ (PD) یکی از رایج‌ترین بیماری‌های عصبی آمیلوئیدی است. به عنوان یک بیماری حرکتی همراه با از بین رفتن نورون‌ها در سیستم Nigrostriatal به ویژه در ناحیه Substantia Nigra pars compacta (SNpc) شناخته شده است [۷]. بیماری پارکینسون در اکثر موارد به صورت غیر ژنتیکی و با دلایل ناشناخته رخ می‌دهد. تخریب نورون‌ها در پارکینسون با کم شدن نورون‌های تولید کننده دوپامین در ناحیه SNpc سیستم عصبی مرکزی توصیف شده است. کاهش نورون‌ها همراه

با حضور تجمع‌ها پروتئینی تحت عنوان LBs (Lewy bodies) و LNs (Lewy neurites) همراه است. LBs و LNs از نشانه‌های آسیب‌شناسی پارکینسون است. آلفاسینوکلئین جزء اصلی تشکیل دهنده این تجمع‌ها نوروئی است و در هر دو نوع فامیلی و ناشناخته وجود دارد [۸]. آلفاسینوکلئین متعلق به خانواده پروتئینی به نام سینوکلئین است که شامل دو پروتئین دیگر به نام‌های بتا سینوکلئین و گاما سینوکلئین نیز هست. چندین مطالعه اسپکترو سکویی و ساختاری مانند NMR، نشان داده که آلفا سینوکلئین پروتئینی بی شکل است و تعلق به خانواده پروتئین‌های فاقد نظم دارد که تحت شرایط فیزیولوژیک یا اصلا ساختار ندارند و یا ساختارشان کم است. تخمین زده شده که آلفاسینوکلئین حدود ۱۰ درصد کل پروتئین‌های محلول سیتوسل مغز را شامل می‌شود [۹]. عملکرد این پروتئین، بسیار کم شناخته شده است و مطالعات نشان داده که رشته‌های تجمعی آلفا سینوکلئین، نشانه‌ای از پارکینسون و سایر بیماری‌های وابسته به سینوکلئین است.

بیان محلول این پروتئین به دلیل خاصیت تجمعی که دارد با چالش همراه است. به‌طور کلی، بیان پروتئین نوترکیب کارآمد یک گلوگاه اصلی برای مطالعات بیوشیمیایی است. بیان پروتئین محلول اغلب برای بسیاری از محققان مرحله محدود کننده است. میزبان ارجح برای بیان پروتئین نوترکیب از لحاظ تاریخی اشریشیاکلی (*E. coli*) به دلیل سادگی و هزینه‌های کم مرتبط با استفاده از این میزبان بوده است. در حالی که *E. coli* میزبان موفقی برای بیان بسیاری از پروتئین‌هایی که خاصیت تجمعی دارد، نیست. گزارش‌ها نشان می‌دهد که از ۶۳۸۶ پروتئینی که در *E. coli* بیان شده، تنها ۲۲٫۷ درصد (۱۴۵۲) محلول بوده‌اند (همان‌طور که در صفحه وب SECSG در ۲۰۰۵/۰۴/۰۳ منتشر شده است). پیشرفت‌های زیادی در جهت بهبود

^۲ Parkinson's disease^۱ β -Sheets

Chain Reaction) قطعه ژنی تکثیر گردید و هضم آنزیمی بر روی وکتور و ژن انجام شد. سپس، آلفاسینوکلئین با وکتور pET21a دارای دنباله سومو با نسبت ۱ به ۳ توسط آنزیم T4 ligase به مدت ۲۴ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. وکتور حاوی ژن به باکتری بیانی BL21(DE3) جهت بیان منتقل شد. تعدادی از پلاسمیدهای تأیید شده برای تعیین توالی با پرایمر T7 promoter و T7 terminator، ارسال شدند.

جدول ۱ توالی پرایمرهای Forward و Reverse

پرایمر Forward	5' G GGATCC ATG GAC GTC TTC ATG AAA GGT CTG 3'	GC%=59/3	Tm=62/3
پرایمر Reverse	5' A CTCGAG TTA CGC TTC TGG TTC ATA GTC 3'	GC%=54/8	Tm=51/4

۲-۲ بیان آلفاسینوکلئین

ابتدا تک کلنی از باکتری حاوی وکتور نوترکیب موردنظر، در حجم ۱۰ میلی لیتر محیط کشت LB مایع حاوی آمپی سیلین - ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. سپس، به نسبت ۱:۱۰۰ در ۱۰۰ mL محیط کشت جدید تلقیح شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۲۰۰ RPM قرار داده شد و بعد از رسیدن به OD برابر ۰/۵ غلظت ۱ میلی مولار IPTG و دما ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۴ ساعت بیان شد. سپس، سلولها پس از ۴ ساعت انکوباسیون با سانتریفیوژ جمع آوری شدند (۲۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ g). در مرحله بعد رسوب به دست آمده در بافر Tris ۳۰ میلی مولار، ۲ مولار

بیان پروتئین نوترکیب در *E. coli* انجام شده است، از جمله ایجاد پروموتورهای قوی، بیان مشترک با چاپرون و از طریق استفاده از همجوشی پروتئین. هیچ فناوری دیگری به اندازه سیستم های همجوشی در بهبود حلالیت پروتئین های نوترکیب مؤثر نبوده است، به ویژه برای پروتئین هایی که بیان آنها دشوار است. ساختارهای مختلفی به عنوان همجوش استفاده شده است. این پروتئین های همجوشی اغلب برای افزایش بیان پروتئین و تسهیل خالص سازی استفاده می شوند [۱۱]. از مهم ترین پروتئین های همجوش می توان به دنباله سومو اشاره کرد. سومو یک پروتئین شبه یوویکوئیتین است (جانسون و هوچستر اسر ۱۹۹۷) تقریباً ۱۱ کیلودالتون که اغلب برای بهبود حلالیت و پایداری پروتئین هدف استفاده می شود [۱۲]. در این مطالعه برای افزایش بیان و حلالیت پروتئین آلفا سینوکلئین از همجوشی این پروتئین با دنباله سومو استفاده شد و میزان بیان پروتئین در حضور و عدم حضور این دنباله و همچنین اثر ضد فیبریلا سیونی آن بر فرایند فیبریلاسیون پروتئین با استفاده از تیوفلاوین تی (ThT) بررسی شد.

۲. مواد و روشها

آنزیم polymerase، آنزیم های محدودگر BamH1 و Xho1 و سایر آنزیم ها از شرکت فرمتاز (Fermentase) خریداری شد. SDS، EDTA و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت Biobasic خریداری شد. مواد مورد استفاده در تهیه ژل اکریل آمید و سایر مواد مورد استفاده از شرکت سیگما در این پژوهش از باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) به عنوان میزبان اختصاصی برای بیان ژن کلون شده استفاده شد.

۲-۱ کلون آلفاسینوکلئین در وکتور حاوی دنباله سومو

طراحی پرایمر برای ژن آلفاسینوکلئین با دنباله سومو در بین دو سایت برش BamH1 و Xho1 در وکتور pET21a انجام شد (جدول ۱). پس از انجام PCR (Polymerase

تعویض بافر شد. پس از ۲۴ ساعت غلظت پروتئین با استفاده از ضریب خاموشی پروتئین [۱۴] $M^{-1} cm^{-1}$ ۵۹۶۰ تعیین شد.

۲-۴ فیبریلایسیون پروتئین

شرایط برای فیبریلایسیون بر اساس این شرایط انجام شد: پروتئین با غلظت مناسب یعنی مقداری برابر با ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد سپس، برای انجام فیبریلایسیون، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از این پروتئین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد به گونه‌ای که با آهن‌ربای میله‌ای ریز تفلونی مدام هم‌زده شد و بررسی فیبریلایسیون با نشر فلورسانس به مدت ۷۲ ساعت صورت گرفت.

۲-۵ نشر فلورسانس ThT

برای ارزیابی تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی از محلول تازه تهیه شده تیوفلاوین تی استفاده شد. این آزمایش برای پروتئین با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار $pH 7/8$ انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه پروتئین انکوبه شده به ۹۹۰ میکرولیتر از محلول تازه ThT با غلظت ۲۵ میکرومولار اضافه شد. طول موج بر انگیزندگی ۴۴۰ نانومتر و محدوده نشری بین ۴۵۰ تا ۶۶۰ نانومتر انتخاب شد.

۳. نتایج

۳-۱ کلونینگ، بیان و تخلیص

کلونینگ ژن آلفاسینوکلئین در وکتور حاوی دنباله سومو در وکتور pET21a بین دو سایت برش BamH1 و Xho1 انجام شد و به سویه بیانی BL21 منتقل شد و از بین کلونی‌ها، یک کلونی انتخاب شده و جهت تعیین توالی ارسال شد (شکل ۱). بیان پروتئین با دنباله سومو و بدون دنباله سومو با غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG به مدت ۴ ساعت در دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت

NaCl ۵ میلی‌مولار ایمیدازول بر روی یخ سونیکیت^۳ شد. و با ساتریفیوژ با دور $12000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ته نشین شدند.

سپس، همه نمونه‌ها به همراه بافر نمونه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شدند، گرمادهی برای از بین بردن ناخالصی‌ها انجام شد. برای آنالیز بیان پروتئین نو ترکیب نمونه بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE بارگذاری شد و توسط بریلیانت بلو G-250 رنگ‌آمیزی شد.

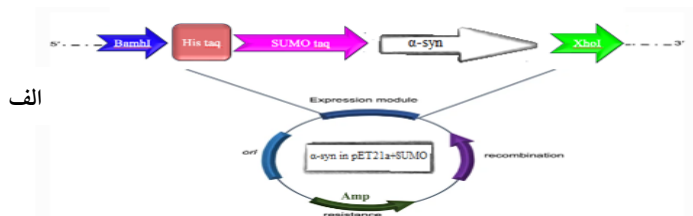
۲-۳ خالص‌سازی

برای تخلیص پروتئین، از روش کروماتوگرافی تمایلی و از ستون نیکل سفاروزا استفاده شد. پروتئین نو ترکیب بیان شده دارای دنباله‌ی هیستیدینی (His₆-tag) در انتهای آمینی خود می‌باشد. این دنباله هیستیدینی دارای تمایل زیادی به نیکل بوده و میان‌کنش محکمی با آن برقرار می‌کند. برای این کار، ابتدا ستون توسط بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار دارای ۵ میلی‌مولار ایمیدازول و ۲ مولار NaCl به تعادل رسید. سپس، عصاره‌ی سلولی به ستون منتقل و به آرامی از روی ستون عبور داده شد و به دنبال آن حذف پروتئین‌های متصل نشده به ستون به وسیله بافر شست‌وشو (Washing Buffer) انجام شد و در آخر برای جدا سازی پروتئین‌های متصل به ستون از بافر جدا کننده (Elution Buffer) استفاده شد. بافر جدا کننده حاوی تریس ۵۰ میلی‌مولار به همراه ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار و ۲ مولار NaCl با $pH 7/8$ می‌باشد. رقابت ایمیدازول موجود در این بافر با هیستیدین برای اتصال به نیکل سبب خروج پروتئین از ستون می‌شود. خلوص و تعیین وزن مولکولی نمونه تخلیص شده بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE کنترل شد. نمونه‌های تخلیص شده با استفاده از کیسه دیالیز ۱۰ کیلوالتون در بافر حاوی ۵۰ میلی‌مولار تریس و ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl در ۴ درجه سانتی‌گراد

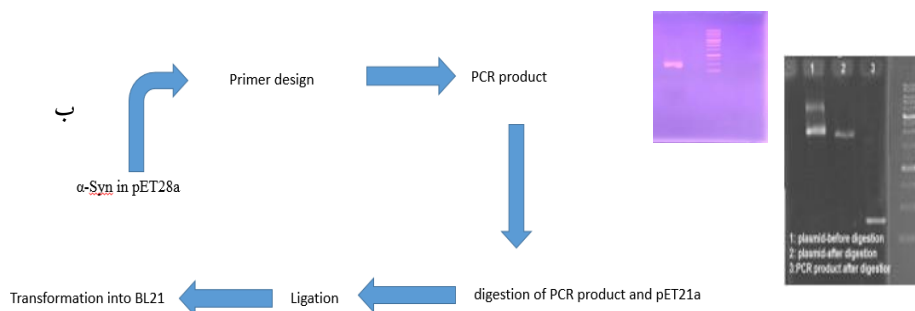
^۳ sonicate

بررسی اثر دنباله سومو ... صارمی و همکاران

محلول LB انجام شد. میزان بیان با استفاده از نرم افزار imageJ بررسی شد و نشان داد که میزان پروتئین به همراه دنباله سومو به میزان بیش تری پروتئین در فاز محلول دارد. جدول ۲ مقایسه میزان بیان پروتئین آلفاسینوکلئین با و بدون دنباله سومو و شکل ۲ میزان بیان پروتئین با دنباله سومو و بدون دنباله را نشان می دهد.



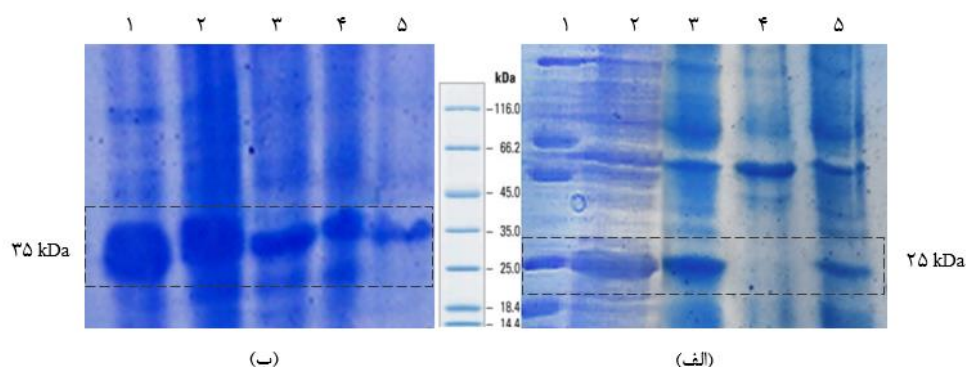
GAACCTCATCATCATCATCATTAAACAGCTGGTTGAATCTGGTGGTGGCCTGGTTCCATGGACGT
 CTTCATGAAAGGTCTGAGCAAAGCTAAAGAGGGTGTCTGTGGCTGCCGCCGAGAAAACCAACAG
 GGTGTGGCAGAGGCAGCAGGTAAACTAAGGAGGGTGTCTGTACGTGGTTCTAAAACAAA
 GAAGGCGTGGTACAGGGTGTGCAACTGTTGCTGAAAAGACCAAAGAACAGGTTACCAACGTTG
 CGGGCGCAGTTGTTACGGGTGTTACCGCGGTAGCTCAGAAAACCGTAGAAGGGCGGGTTCTAT
 CGGGCGGCTACTGGTTTTGTTAAAAGGACCAACTGGGCAAAAACGAAGAAGGCGCGCCACA
 GGAAAGGCATTCTGGAAGATATGCCTGTAGATCCGGATAATGAAGCCTACGAAATGCCGTCCGAA
 GAAGGCTACCAGGACTATGAACCGGAAGCGTAACTCCAG



شکل ۱ (الف) نقشه وکتور pET21a+SUMO که ژن آلفاسینوکلئین در بین دو جایگاه برش BamH1 و Xho1 قرار گرفته است. (ب) مراحل کلون ژن آلفاسینوکلئین در وکتور حاوی دنباله سومو

جدول ۲ مقایسه میزان بیان پروتئین

پروتئین رسوب	پروتئین محلول	میزان کل پروتئین	
%۴۰	%۶۰	%۳۵	پروتئین آلفاسینوکلئین
%۵	%۹۵	%۴۵	پروتئین آلفاسینوکلئین به همراه دنباله سومو

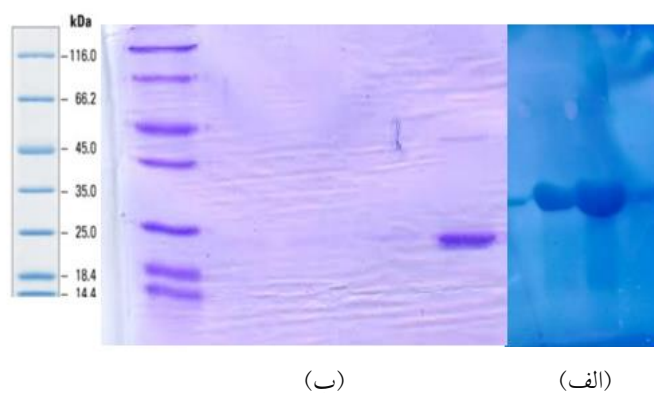


شکل ۲ (الف) بیان پروتئین آلفاسینوکلئین بدون دنباله سومو. ۱، مارکر ۲، بیان کل پروتئین ۳، پروتئین موجود در پلت باکتری ۴، کنترل منفی ۵، پروتئین محلول. (ب) بیان پروتئین به همراه دنباله سومو. ۱، بیان کل پروتئین ۲، پروتئین محلول، ۳، کنترل مثبت ۵، پروتئین موجود در پلت باکتری

بود که در وکتور pET21a کلون شده بود. از آنجایی که این وکتور در انتهای خود دارای دنباله هیستیدین است و به دلیل تمایل هیستیدین به نیکل، تخلیص پروتئین با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی (استفاده از ستون تمایلی نیکل سفاروز) انجام شد. تخلیص در بافرتریس و با گرادیان ایمیدازول از ۵ میلی مولار تا ۲۵۰ میلی مولار با pH ۷/۸ انجام شد که در غلظت ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول باند پروتئین عاری از هر گونه ناخالصی به دست آمد (شکل ۳).

توالی دنباله سومو حدود ۱۰ کیلودالتون است و اضافه شدن این توالی به ساختار آلفاسینوکلئین که ۲۵ کیلودالتون است مجموعاً ۳۵ کیلودالتون را نشان می دهد و این اختلاف وزن در پروتئین به همراه دنباله سومو و بدون دنباله به این دلیل است.

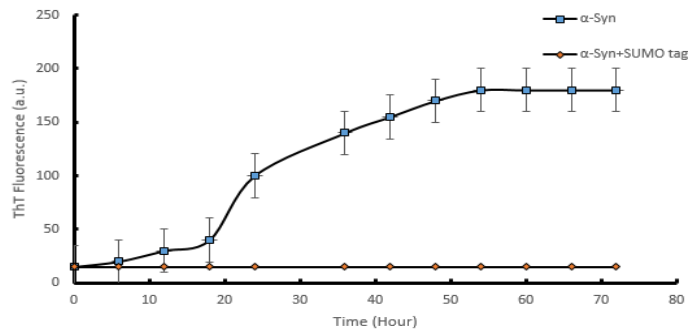
از آنجایی که ناخالصی ها اثر مهمی در روند مختل شدن آمیلوئید دارند؛ بنابراین برای مطالعات آمیلوئیدی، پروتئین بایستی از خلوص بسیار بالا برخوردار باشد پس این مرحله از اهمیت زیادی داراست. منبع پروتئینی استفاده شده برای این پژوهش، آلفاسینوکلئین نو ترکیب



شکل ۳ ژل مربوط به تخلیص پروتئین. (الف) دارای دنباله سومو. (ب) بدون دنباله سومو.

۳-۲ فیبریلایسیون پروتئین

پس از خالص سازی پروتئین شرایط فیبریلایسیون برای پروتئین انجام شد. برای این کار، ۵۰۰ میکرولیتر از پروتئین حاوی دنباله سومو (۳ میلی گرم بر میلی لیتر) و بدون دنباله (۲ میلی گرم بر میلی لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و ۱۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین انکوبه شده به ۹۹۰ میکرولیتر از محلول تازه ThT اضافه شد و نشر در ۴۸۰ نانومتر خوانش شد. نتایج به دست آمده نشان داد که پروتئین با دنباله سومو در مقایسه با پروتئین بدون دنباله سومو توانایی تشکیل فیبریل را ندارد (شکل ۴).



شکل ۴ نمودار نشر فلورسانس به مدت ۷۲ ساعت که برای پروتئین آلفاسینوکلئین با و بدون دنباله سومو بررسی شد و نشان داد که پروتئین با دنباله سومو توانایی تشکیل فیبریل را ندارد.

۴-بحث و نتیجه گیری

بیان پروتئین یک فرایند پیچیده است که به ثبات mRNA و تنظیم ترجمه و همچنین تنظیم رونویسی وابسته است. بیان پروتئین نوترکیب تقویت شده نتیجه تعداد کپی mRNA بالا، شروع ترجمه کارآمد و افزایش طول،

پایداری mRNA و تقویت کننده های ترجمه است. دنباله سومو بیان پروتئین، حلالیت و خالص سازی را در پروکاریوت ها افزایش می دهد. مطالعات نشان داده سومو به انتهای N چندین پروتئین، از جمله متالوپروتئاز ماتریکس (MMP13) و چند پروتئین دیگر ادغام شده و به عنوان یک سیستم بیان نوترکیب استفاده شده است. هم جوشی سومو منجر به افزایش بیان و حلالیت می شود. به عنوان مثال، هنگامی که MMP13 بدون همجوشی سومو در *E. coli* بیان می شود، در رسوب باکتری حضور دارد. با این حال، هنگامی که MMP13 به عنوان یک هم جوشی با SUMO بیان می شود، MMP13 در بخش محلول مشاهده شد. تأثیر سومو در افزایش حلالیت پروتئین تا حدی توسط ساختار سومو توضیح داده شده است [۱۳]. در مطالعه دیگر نشان داده شد که بیان سطح بالا و خالص سازی فاکتور رشد فیروبل است نوترکیب در *E. coli* دشوار است؛ زیرا به صورت تجمعات در باکتری بیان می شود و خالص سازی و به دست آوردن غلظت های بالای آن دشوار است. در ادامه این پروتئین را با اضافه کردن دنباله سومو بیان و تخلیص انجام دادند و مشاهده کردند که غلظت آن به ۳۰ درصد کل پروتئین رسید و از ۹۵ درصد کل پروتئین های محلول فراتر رفت [۱۴]. سومو یک سطح آب دوست خارجی و هسته آب گریز درونی دارد که ممکن است اثری شبیه شوینده بر روی پروتئین های نامحلول داشته باشد. نشان داده شده است که ساختار هم جوشی هگزا هیستیدین سومو باعث افزایش بیان و تسهیل خالص سازی با کروماتوگرافی Ni-NTA می شود. از آنجا که پروتئین آلفاسینوکلئین دارای خاصیت تجمعی است و مقداری از بیان این پروتئین در رسوب باکتری حضور دارد در جهت بهینه سازی بیان این پروتئین از سومو استفاده شد و همان گونه که نتایج نشان داد افزودن سومو باعث افزایش

دنباله سومومی تواند به عنوان بازدارنده فیبریلاسیون در نظر گرفته شود و مانع تشکیل فیبریل های آمیلویدی در پروتئین های مستعد فیبریلاسیون شود و آزمایش های بیش تر برای بررسی اثر ضد فیبریلاسیونی این دنباله انجام شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله کمال تشکر را از دانشگاه تربیت مدرس که با همکاری صمیمانه خود ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند ابراز می دارند.

۵-منابع

- [1] Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of molecular medicine*. 2003;81(11):678-99.
- [2] Bouchard M, Zurdo J, Nettleton EJ, Dobson CM, Robinson CV. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Science*. 2000;9(10):1960-7.
- [3] Sunde M, Blake CC. From the globular to the fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Quarterly reviews of biophysics*. 1998;31(01):1-39.
- [4] LeVine 3rd H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein science: a publication of the Protein Society*. 1993;2(3):404.
- [5] Collins SR, Douglass A, Vale RD, Weissman JS. Mechanism of prion propagation: amyloid growth occurs by monomer addition. *PLoS biology*. 2004;2:1582-90.
- [6] Bellotti V, Chiti F. Amyloidogenesis in its biological environment: challenging a fundamental issue in protein misfolding diseases. *Current opinion in structural biology*. 2008;18(6):771-9.
- [7] Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1996;55(3):259-72.
- [8] Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. α -Synuclein in

بیان این پروتئین در فاز محلول در مقایسه با آلفاسینوکلئین بدون سومو گردید و در ادامه میزان خلوص بالایی را نیز نشان داد.

سومو (اصلاح کننده کوچک یوبیکوئیتین) خانواده ای از پروتئین ها است که به طور کووالانسی به رزیدوهای لیزین در یک موتیف از پروتئین های هدف کونژوگه می شود، SUMOylation رویدادهای سلولی درون هسته ای از جمله تقسیم سلولی، رونویسی، ترمیم DNA و انتقال هسته ای را تنظیم می کند. در سطح پروتئین، SUMOylation می تواند بر ساختار، ثبات و برهم کنش پروتئین - پروتئین تأثیر بگذارد.

در آزمایش های پیشین نشان داده شد که اتصال سومو به لیزین ۹۶ و ۱۰۲ در توالی آلفاسینوکلئین می تواند اثر مهار بر روی فیبریلاسیون این پروتئین داشته باشد [۱۵ و ۱۶]. همچنین، اثر SUMOylation بر روی پروتئین $A\beta$ نیز بررسی شده و مطالعات نشان دادند که افزایش بیان سومو سطوح تجمع $A\beta$ را در سلول های بیان کننده کاهش می دهد و نشان می دهد که رویکردهای SUMOylation به عنوان استراتژی های درمانی جدید علیه بیماری آلزایمر پتانسیل دارند [۱۷].

از آنجایی که سومو یکی از محلول ترین پروتئین هایی است که اتصال آن به عنوان یک برچسب هم جوشی مصنوعی به مانع فیبریلاسیون پروتئین های آمیلویدی می شود، ما بررسی کردیم که آیا حضور دنباله سومو در وکتور حاوی ژن آلفاسینوکلئین اثر مهار بر روی فیبریلاسیون این پروتئین دارد یا خیر.

در این مطالعه مشاهده شد که در طی مدت زمان فیبریلاسیون میزان نشر فلور سانس پروتئین حاوی دنباله سومو با نمونه پروتئینی بدون دنباله سومو متفاوت بود و نتایج نشان داد که پروتئین حاوی دنباله سومو توانایی تشکیل فیبریل را ندارد؛ از این رو می توان گفت حضور سومو می تواند مانع فیبریلاسیون شود. بنابراین استفاده از

filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(11):6469-73.

[9] Iwai A, Yoshimoto M, Masliah E, Saitoh T. Non-A. beta. Component of Alzheimer's Disease Amyloid (NAC) is Amyloidogenic. *Biochemistry*. 1995;34(32):10139-45.

[10] Justine R, Maria-Grazia M. Considerations for the Use of Polyphenols as Therapies in Neurodegenerative Diseases. *Considerations for the Use of Polyphenols as Therapies in Neurodegenerative Diseases*. 2019, 20, 1883:10.3390

[11] Mészáros A, Muwonge K, Janvier S, Ahmed J, Tompa P. A Novel Tandem-Tag Purification Strategy for Challenging Disordered Proteins. *Biomolecules*. 2022 Oct 26;12(11):1566.

[12] Xiao-Feng Z, Guo-Qiang T, Wu W. A simple and rapid protein purification method based on cell-surface display of SUMO-fused recombinant protein and Ulp1 protease.

[13] auseef R. B, Suzanne C. E, John P. H, Michael R. M. SUMO fusion technology for diYcult-to-express proteins. 10.1016/j.pep.2005.03.016

[14] Huiyan W, Yechen X, Lianjun F, Hongxin Z, Yaofang Z, Xiaoshan W, Yuxia Q, Yadong H, Hongchang G, Xiaokun L. High-level expression and purification of soluble recombinant FGF21 protein by SUMO fusion in *Escherichia coli*. 2010, 10:14/1472-6750/10/14

[15] Petranka K, Erik M, Manuel G, Marilyn T, He-Hsuan H, Guillaume B, Henning U, Markus Z, Sebastian K, Frauke M, Mathias B, Jochen H. W. Sumoylation inhibits α -synuclein aggregation and toxicity. 201010117:10.1083

[16] Savyon M, Engelender S. SUMOylation in α -synuclein homeostasis and pathology. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2020 Jun 25;12:167.

[17] Yu-Qian Z, Kevin D. S. Sumoylation of amyloid precursor protein negatively regulates A β aggregate levels. 2008, 3; 374(4): 673-678

Investigating the effect of SUMO sequence on the expression, solubility and fibrillation of alpha-synuclein

Sabereh Saremi ¹, Bahareh Dabirmanesh ², Mahdi Ayyari ³, Khosro Khajeh ^{4*}

1- Ph.D student, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

khajeh@modares.ac.ir

Receipt: 2023/12/24

Accepted: 2024/06/24

Abstract

Alpha-synuclein protein (α -syn) is the main factor known in Parkinson's disease. The expression of this protein has challenges. One of these challenges is the presence of protein in bacterial pellet. Studies have shown that the expression of proteins with tags such as small ubiquitin-like modifier (SUMO) increases the expression in the soluble phase, therefore the expression of α -syn with this sequence was investigated to increase the protein in the soluble phase. It has also been shown in studies that SUMOylation has an inhibitory effect on fibrillation, also in this study the effect of the SUMO on alpha-synuclein fibrillation was investigated. The α -syn gene was cloned with SUMO-tag. Nickel sepharose column was used to purify the protein, and dialysis was performed and fibrillation was checked by fluorescence emission of Thioflavin for 72 hours. Results showed that the protein with SUMO sequence has a higher expression level and 95% of the protein is in the soluble phase. It was shown that the SUMO sequence has an inhibitory effect on the process of amyloid fibril formation. The results obtained from previous studies showed that the binding of the SUMO sequence increases the expression and solubility of recombinant proteins. This study revealed that the presence of this sequence contributed to the protein expression level and the protein's presence in the solution phase. Observations indicated that this sequence has anti-fibrillation properties for proteins with amyloid characteristics, and this study demonstrated that SUMO prevents α -syn aggregation.

Keywords: Parkinson's disease, Alpha synuclein, Amyloid fibrils, SUMO tag