زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

# بررسی اثر دنباله سومو بر بیان، حلالیت و فیبریلاسیون آلفاسینوکلئین

صابره صارمی[۱]، ، بهاره دبیرمنش[۲]، مهدی عیاری[۳] ، خسرو خواجه*[٤]

۱ دانشجو 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
٤ * استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۱۱-۱٤۱۱۵، تهران، ایران
khajeh@modares.ac.ir

دریافت:۱٤۰۲/۱۰/۰۳ پذیرش: ۱٤۰۳/۰٤/۰٤

چکیده

پروتئین آلفا سینوکلئین ا صلی‌ترین عامل شناخته شده در بیماری پارکین سون ا ست. بیان این پروتئین به‌دلیل خا صیت تجمعی که دارد با چالش همراه ا ست. یکی از این چالش‌ها وجود پروتئین در ر سوب باکتری ا ست. مطالعات ن شان داده که بیان پروتئین‌ها با برچ سب‌هایی نظیر SUMO باعث افزایش بیان در فاز محلول می‌شـــود؛ ازاین‌رو بیان آلفاســـینوکلیئن با این دنباله جهت افزایش پروتئین در فاز محلول بررسی شد. همچنین در این مطالعه سعی بر آن شد که تأثیر دنباله سومو بر فیبریلاسیون آلفاسینوکلئین برر سی شود. در این تحقیق ژن آلفا سینوکلئین با دنباله سومو کلون شد. بیان پروتئین به فرم محلول صورت گرفت. پروتئین تو سط ستون نیکل سفاروز تخلیص شد و دیالیز انجام شد. سپس، برر سی فیبریلاسیون تو سط نشر فلورسانس تیوفلاوین تی به مدت ۷۲ ساعت صورت گرفت. مشاهده شد که پروتئین به همراه دنباله ســومو میزان بیان بالاتری دارد و ۹۵ درصــد از پروتئین در فاز محلول اســت از طرفی نشـان داده شـد که دنباله ســومو خاصـیت مهاری بر روند تشـکیل فیبریل آمیلوییدی در مقایسـه با آلفاسینوکلئین بدون دنباله سومو دارد. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات پیشین نشان می‌داد که اتصال دنباله ســـومو باعث افزایش بیان و میزان حلالیت پروتئین‌های نوترکیب می‌شـــود. این مطالعه نشـــان داد که حضـور این دنباله به میزان بیان پروتئین و همچنین حضـور پروتئین در فاز محلول کمک کرد. از طرفی مشاهدات آزمایشگاهی نشان داده که این دنباله خاصیت ضد فیبریلاسیونی برای پروتئین‌هایی باخاصیت آمیلوییدی دارد و در این مطالعه مشاهده شد که اضافه‌کردن دنباله سومو به پروتئین آلفاسینوکلئین مانع خاصیت تجمعی آن می‌شود.

**کلید واژگان:** پارکینسون، آلفاسینوکلئین، فیبریل‌های آمیلوییدی، دنباله سومو



[ Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-05 ]

**۱. مقدمه**

هنگامی که عدم موفقیت سیستم کنترل سلولی به‌دلیل استرس و پیری منجر به تشکیل گونه‌هایی بد تاخورده و تجمعات می‌شود کاستی‌هایی حادث شده که سبب پیدایش عوارضی در سلول می‌گردد[۱]. فیبریل های آمیلوئیدی که از نمونه‌های بارز بدتاخوردگی 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 فیبریل های آمیلوئیدی ویژگی های نوری ویژه‌ای مانند اتصال به رنگ های قرمز کنگو (CR) و تیوفلاوین تی ( ThT) را دارند[٤]. 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[٥]. فیبریل‌های آمیلوئیدی و پیش سازهای وابسته به آن، عامل بیش از ٤٠ بیماری در انسان می‌باشد که در تمامی آن‌ها پروتئین ساختار ویژه خود را از دست داده و در داخل و خارج سلول رسوب می‌کنند[٦].

بیماری پارکینسون (PD)[۲] یکی از رایج ترین بیماری‌های عصبی آمیلوییدی 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[٧]. بیماری پارکینسون در اکثر موارد به‌صورت غیر ژنتیکی و با دلایل ناشناخته رخ می دهد. تخریب نورون ها در پارکینسون با کم شدن نورون‌های تولید کننده دوپامین در ناحیه SNpc سیستم عصبی مرکزی توصیف شده است. کاهش نورون‌ها همراه با حضور تجمعات 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 تجمعات نورونی 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 وگاما سینوکلئین نیز هست. چندین مطالعه اسپکتروسکوپی 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 یااصلا 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 به‌دلیل خاصیت تجمعی که دارد با چالش همراه است. به‌طورکلی، بیان پروتئین نوترکیب کارآمد یک گلوگاه اصلی برای مطالعات بیوشیمیایی است. بیان پروتئین محلول اغلب برای بسیاری از محققان مرحله محدودکننده است. میزبان ارجح برای بیان پروتئین نوترکیب از لحاظ تاریخی اشریشیاکلی (*E. coli*) به‌دلیل سادگی و هزینه‌های کم مرتبط با استفاده از این میزبان بوده است. درحالی‌که *E. coli* میزبان موفقی برای بیان بسیاری از پروتئین‌هایی که خاصیت تجمعی دارد، نیست. گزارش‌ها نشان می‌دهد که از ٦٣٨٦ پروتئینی که در *E. coli* بیان شده، تنها ۲۲٫۷ درصد (١٤٥٢) محلول بوده‌اند (همان‌طور که در صفحه وب SECSG در ۲۰۰۵/۰٤/۰۳ منتشر شده است). پیشرفت‌های زیادی در جهت بهبود

[۱] β-Sheets

[۲] Parkinson`s disease



[ Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-05 ]

بیان پروتئین نوترکیب در *E. coli* انجام شده است، از جمله ایجاد پروموترهای قوی، بیان مشترک با چاپرون و از طریق استفاده از هم‌جوشی پروتئین. هیچ فناوری دیگری به‌اندازه سیستم‌های هم‌جو شی در بهبود حلالیت پروتئین های نوترکیب مؤثر نبوده است، به‌ویژه برای پروتئین‌هایی که بیان آن‌ها دشوار است. ساختارهای مختلفی به‌عنوان هم‌جوش استفاده شده است. این پروتئین‌های هم‌جو شی اغلب برای افزایش بیان پروتئین و تسهیل خالص سازی استفاده می شوند[۱۱]. از مهم‌ترین پروتئین‌های همجوش می‌توان به دنباله سومو اشاره کرد. سومو یک پروتئین شبه یوبیکوئیتین است (جانسون و هوچستراسر 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 هم‌جو شی 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 ، آنزیم‌های محدودگر BamH1 و Xho1 و سایر آنزیم‌ها از شرکت فرمنتاز (Fermentase) خریداری شد. EDTA، SDS و سایر مواد شیمیایی موردنیاز از شرکت Biobasic خریداری شد. مواد مورد استفاده در تهیه ژل اکریل‌آمید و سایر مواد مورداستفاده از شرکت سیگما در این پژوهش از باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) به‌عنوان 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 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 ۲٤ ساعت در یخچال در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد 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 promotor 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 میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی آمپی‌سیلین - ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۱٦ ساعت کشت داده شد. سپس، به نسبت ۱:۱۰۰ در mL ۱۰۰ محیط‌کشت جدید تلقیح شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با RPM ۲۰۰ قرار داده شد و بعد از رسیدن به OD برابر ۰/۵ غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG و دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٤ ساعت بیان شد. سپس، سلول‌ها پس از ٤ ساعت انکوباسیون با سانتریفیوژ جمع‌آوری شدند (۲۰ دقیقه، g ۱۲۰۰۰). در مرحله بعد رسوب به‌دست آمده در بافر Tris ۳۰ میلی مولار، ۲ مولار



[ Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-05 ]

NaCl و ۵ میلی‌مولار ایمیدازول بر روی یخ سونیکیت[۳] شد. و با سانتریفیوژ با دور g ×۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد ته نشین شدند.

ســـپس، همه نمونه‌ها به همراه بافر نمونه در دمای ۱۰۰ درجه ســـانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شـــدند، گرمادهی برای از بین بردن ناخالصـــی‌ها انجام شـــد. برای آنالیز بیان پروتئین نوترکیب نمونه بر روی ژل ۱۲ درصـــد SDS-PAGE بارگذاری شد و توسط بریلیانت بلو۲۵۰-G رنگ‌آمیزی شد.

### ۲ -۳ خالص‌سازی

برای تخلیص پروتئین، از روش کروماتوگرافی تمایلی و از ستون نیکل سفاروز استفاده شد. پروتئین نوترکیب بیان شده دارای دنباله‌ی هیستیدینی ($His_6$–tag) درانتهای آمینی خود می‌باشد. این دنباله هیستیدینی دارای تمایل زیادی به نیکل بوده و میان‌کنش محکمی با آن برقرار می‌کند. برای این کار، ابتدا ســـتون توســـط بافر تریس ۵۰ میلی مولار دارای ۵ میلی‌مولار ایمیدازول و۲ مولار NaCl به تعادل رسید. سپس، عصاره‌ی سلولی به ستون منتقل و به آرامی از روی ســـتون عبور داده شـــد و به دنبال آن حذف پروتئین‌های متصـــل نشـــده به ســـتون به وســـیله بافر شست‌وشو ( Washing Buffer) انجام شد و در آخر برای جدا سازی پروتئین‌های متصل به ستون از بافر جدا کننده (Elution Buffer) اســـتفاده شـــد. بافر جدا کننده حاوی تریس۵۰ میلی‌مولار به همراه ایمیدازول ۲۵۰میلی‌مولار و ۲ مولار NaCl با pH ۷/۸ می‌باشـــد. رقابت ایمیدازول موجود در این بافر با هیستیدین برای اتصال به نیکل سبب خروج پروتئین از ســـتون می‌شـــود. خلوص و تعیین وزن مولکولی نمونه تخلیص شده بر روی ژل ۱۲درصد SDS-PAGE کنترل شد. نمونه‌های تخلیص شده با استفاده از کیســـه دیالیز ۱۰ کیلودالتون در بافر حاوی ۵۰ میلی‌مولار تریس و ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl در ٤ درجه ســـانتی‌گراد تعویض بافر شـــد. پس از ٢٤ ســـاعت غلظت پروتئین با اســـتفاده از ضـــریب خاموشـــی پروتئین [۱٤] $M^{-1} cm^{-1}$ ۵۹٦۰ تعیین شد.

### ۲ -٤ فیبریلاسیون پروتئین

شرایط برای فیبریلاسیون بر اساس این شرایط انجام شد: پروتئین با غلظت مناسب یعنی مقداری برابر با ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دســت آمد سـپس، برای انجام فیبریلاسـیون، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از این پروتئین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد به‌گونه‌ای که با آهن‌ربای میله‌ای ریز تفلونی مدام هم‌زده شد و بررسی فیبریلاسیون با نشر فلورسانس به‌مدت ۷۲ ساعت صورت گرفت.

### ۲ -۵ نشر فلورسانس ThT

برای ارزیابی تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی از محلول تازه تهیه شـــده تیوفلاوین‌تی اســـتفاده شـــد. این آزمایش برای پروتئین با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر فســـفات ۲۵میلی‌مولار pH ۷/۸ انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه پروتئین انکوبه شده به ۹۹۰ میکرولیتر از محلول تازه ThT با غلظت ۲۵ میکرومولار اضـــافه شـــد. طول‌موج بر انگیختگی ٤٤۰ نانومتر و محدوده نشـری بین ٤۵۰ تا ٦٦۰ نانومتر انتخاب شد.

## ۳. نتایج

### ۳ -۱ کلونینگ، بیان و تخلیص

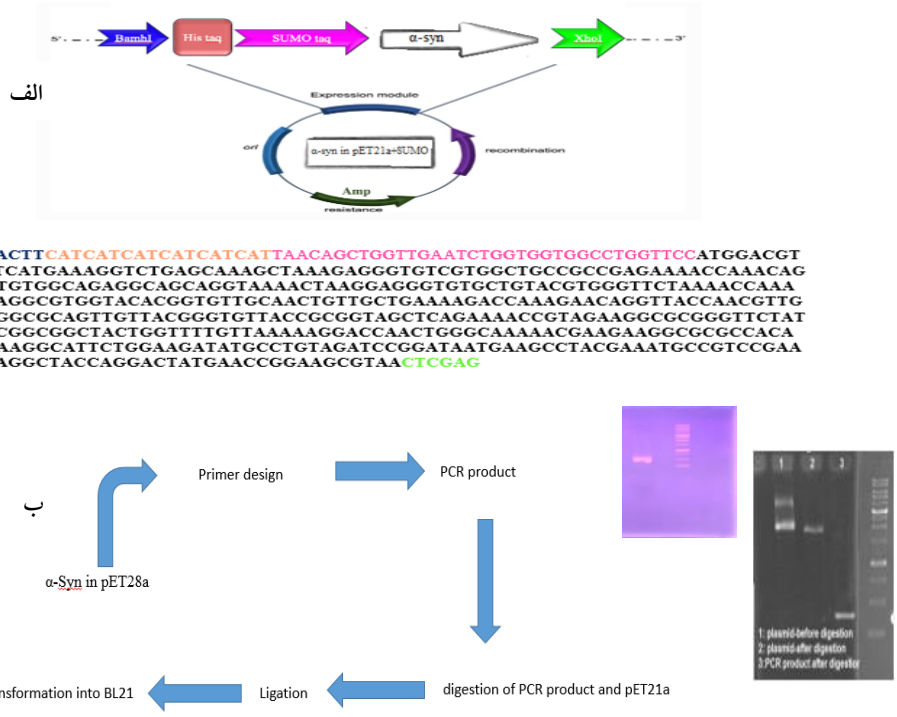
کلونینگ ژن آلفاســینوکلئین در وکتور حاوی دنباله ســومو در وکتور pET21a بین دو سایت برش BamH1 و Xho1 انجام شـــد و به ســـویه بیانی BL21 منتقل شـــد و از بین کلونی‌ها، یک کلونی انتخاب شـــده و جهت تعیین توالی ارسال شد (شکل ۱). بیان پروتئین با دنباله سومو و بدون دنباله ســـومو با غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG به مدت ٤ ســـاعت در دما ۳۷ درجه ســـانتی‌گراد در محیط کشـــت

[۳] sonicate



[ Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-05 ]

محلول LB انجام شـــد. میزان بیان با اســـتفاده از نرم‌افزار imageJ بررسی شد و نشان داد که میزان پروتئین به همراه دنباله سومو به میزان بیش‌تری پروتئین در فاز محلول دارد. جدول ۲ مقایســـه میزان بیان پروتئین آلفاســـینوکلئین با و بدون دنباله ســـومو و شـــکل ۲ میزان بیان پروتئین با دنباله سومو و بدون دنباله را نشان می‌دهد.



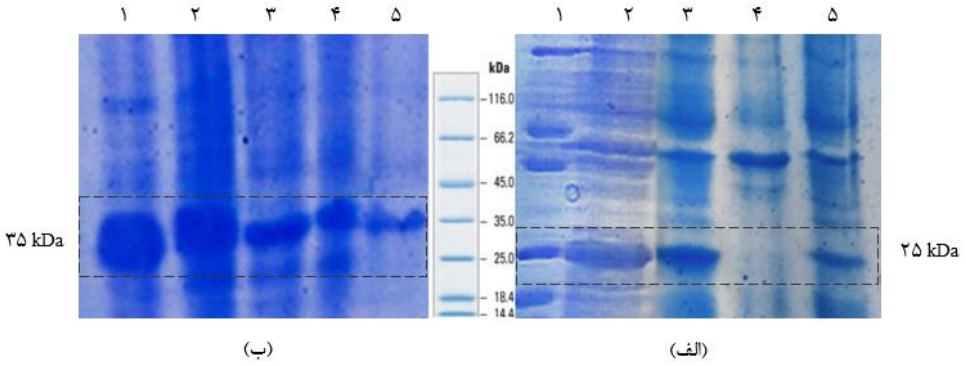

شکل ۱ (الف) نقشه وکتور pET21a+SUMO که ژن آلفاسینوکلئین در بین دو جایگاه برش BamH1 و Xho1 قرار گرفته است. (ب) مراحل کلون ژن آلفاسینوکلئین در وکتور حاوی دنباله سومو

جدول ۲ مقایسه میزان بیان پروتئین

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



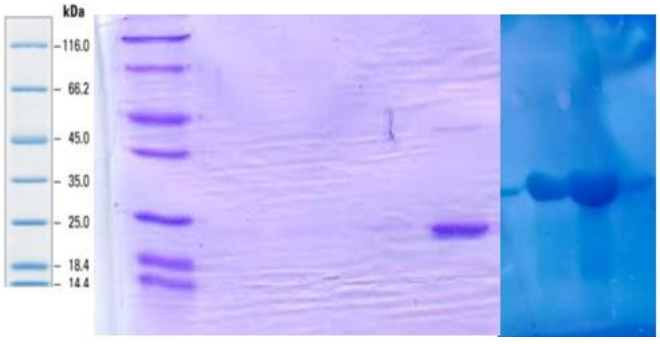
[ Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-05 ]




شکل۲ (الف) بیان پروتئین آلفاسینوکلئین بدون دنباله سومو. ۱، مارکر ۲، بیان کل پروتئین ۳، پروتئین موجود در پلت باکتری ٤، کنترل منفی ۵، پروتئین محلول. (ب) بیان پروتئین به همراه دنباله سومو. ۱، بیان کل پروتئین ۲، پروتئین محلول ،٤،۳ کنترل مثبت ۵، پروتئین موجود در پلت باکتری

توالی دنباله سومو حدود ۱۰ کیلودالتون است و اضافه شدن این توالی به ساختار آلفا سیوکلئین که ۲۵ کیلودالتون است مجموعا ۳۵ کیلودالتون را نشان می‌دهد و این اختلاف وزن در پروتیئن به همراه دنباله سومو و بدون دنباله به این دلیل است.

ازآنجایی‌که ناخالصی‌ها اثر مهمی در روند مختل‌شدن 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 نوترکیب بود که در وکتور pET21a کلون شده بود. ازآنجایی‌که این وکتور در انتهای خود دارای دنباله هیستیدین است و به‌دلیل 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 میلی‌مولار تا ۲۵۰ میلی‌مولار و با pH ۷/۸ انجام شد که در غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول باند پروتئین عاری از هر گونه ناخالصی به‌دست آمد (شکل ۳).



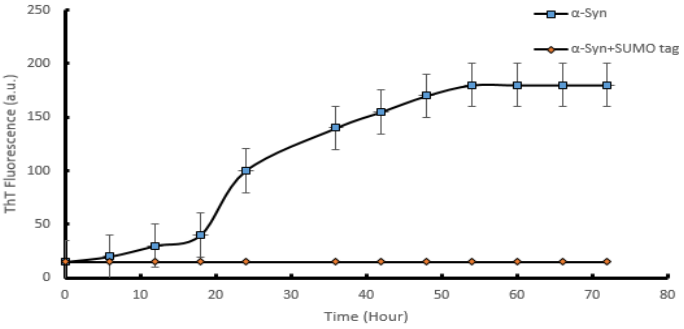

شکل ۳ ژل مربوط به تخلیص پروتئین. (الف) دارای دنباله سومو. (ب) بدون دنباله سومو.



[ Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-05 ]

### ۳ -۲ فیبریلاسیون پروتئین

پس از خالص‌سازی پروتئین شرایط فیبریلاسیون برای پروتئین انجام شد. برای این‌کار، ۵۰۰ میکرولیتر از پروتئین حاوی دنباله سومو ( ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و بدون دنباله (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و ۱۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین انکوبه شده به ۹۹۰ میکرولیتر از محلول تازه ThT اضافه شد و نشر در ٤٨٠ نانومتر خوانش شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که پروتئین با دنباله سومو در مقایسه با پروتئین بدون دنباله سومو توانایی تشکیل فیبریل را ندارد (شکل ٤).




شکل ٤ 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.

### ٤-بحث و نتیجه‌گیری

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 تقویت‌کننده‌های ترجمه است. دنباله سومو بیان پروتئین، حلالیت و خالص‌سازی را در پروکاریوت‌ها افزایش می‌دهد. مطالعات نشان داده سومو به انتهای N چندین پروتئین، از جمله متالوپروتئاز ماتریکس (MMP13) و چند پروتئین دیگر ادغام شده و به‌عنوان یک سیستم بیان نوترکیب استفاده شده است. هم جوشی سومو منجر به افزایش بیان و حلالیت می‌شود. به‌عنوان‌مثال، هنگامی که MMP13 بدون همجوشی سومو در *E. coli* بیان می‌شود، در رسوب باکتری حضور دارد. با این‌حال، هنگامی که MMP13 به‌عنوان یک هم‌جوشی 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 فیبروبلاست نوترکیب در *E. coli* دشوار است؛ زیرا به‌صورت تجمعات در باکتری بیان می شود و خالص‌سازی و به‌دست‌آوردن غلظت‌های بالای آن دشوار است. در ادامه این پروتئین را با اضافه‌کردن دنباله سومو بیان و تخلیص انجام دادند و مشاهده کردند که غلظت آن به ۳۰ درصد کل پروتئین رسید و از ۹۵ درصد کل پروتئین‌های محلول فراتر رفت[١٤]. سومو یک سطح آب‌دوست خارجی و هسته آب‌گریز درونی دارد که ممکن است اثری شبیه شوینده بر روی پروتئین‌های نامحلول داشته باشد. نشان‌داده شده است که ساختار هم جوشی هگزا هیستیدین سومو باعث افزایش بیان و تسهیل خالص‌سازی با کروماتوگرافی Ni-NTA می‌شود. ازآنجاکه پروتئین آلفاسینوکلئین دارای خاصیت تجمعی است و مقداری از بیان این پروتئین در رسوب باکتری حضور دارد در جهت بهینه‌سازی بیان این پروتئین از سومو استفاده شد و همان‌گونه که نتایج نشان داد افزودن سومو باعث افزایش



[ Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-05 ]

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

سومو (اصلاح‌کننده کوچک یوبیکوئیتین) خانواده‌ای از پروتئین‌ها است که به‌طور کووالانسی به رزیدوهای لیزین در یک موتیف از پروتئین‌های هدف کونژوگه می‌شود، SUMOylation رویدادهای سلولی درون‌هسته‌ای از جمله تقسیم سلولی، رونویسی، ترمیم DNA و انتقال هسته‌ای را تنظیم می‌کند. در سطح پروتئین، SUMOylation می‌تواند بر ساختار، ثبات و برهم‌کنش پروتئین - پروتئین تأثیر بگذارد.

در آزمایش‌های پیشین نشان داده شد که اتصال سومو به لیزین ۹۶ و ۱۰۲ در توالی آلفاسینوکلئین می‌تواند اثر مهاری بر روی فیبریلاسیون این پروتئین داشته باشد[۱۶و۱۵]. همچنین، اثر SUMOylation بر روی پروتئین Aβ نیز بررسی شده و مطالعات نشان دادند که افزایش بیان سومو سطوح تجمعات Aβ را در سلول‌های بیان‌کننده کاهش می‌دهد و نشان می‌دهد که رویکردهای SUMOylation به‌عنوان استراتژی‌های درمانی جدید علیه بیماری آلزایمر پتانسیل دارند[۱۷].

ازآنجایی‌که سومو یکی از محلول‌ترین پروتئین‌هایی است که اتصال آن به‌عنوان یک برچسب هم‌جوشی مصنوعی به مانع فیبریلاسیون پروتئین‌های آمیلوییدی می‌شود، ما بررسی کردیم که آیا حضور دنباله سومو در وکتور حاوی ژن آلفاسینوکلئین اثر مهاری بر روی فیبریلاسیون این پروتئین دارد یا خیر.

در این مطالعه مشاهده شد که در طی مدت‌زمان فیبریلاسیون میزان نشر فلورسانس 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؛ ازاین‌رو می‌توان گفت حضور سومو می‌تواند مانع فیبریلاسیون شود. بنابراین استفاده از دنباله سومومی‌تواند به‌عنوان بازدارنده فیبریلاسیون در نظر گرفته شود و مانع تشکیل فیبریل‌های آمیلوییدی در پروتئین‌های مستعد فیبریلاسیون شود و آزمایش‌های بیش‌تر برای بررسی اثر ضد فیبریلاسیونی این دنباله انجام شود.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله کمال تشکر را از دانشگاه تربیت‌مدرس که با همکاری صمیمانه خود ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند ابراز می‌دارند.

## 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



[ Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-05 ]

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 Aβ aggregate levels. 2008 , 3; 374(4): 673–678

[ Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-05 ]

# 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



[ Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-05 ]