

بررسی اثر دنباله هیستیدینی بر دینامیک مولکولی پروتئین TGF- β

سپیده سپهری^۱، سیدشهریار عرب^{۲*}، مهرداد بهمنش^۳، رضا حسن ساجدی^{۴*}

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

۴- دانشیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

*تهران، صندوق پستی ۱۷۵-۱۴۱۱۵

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

پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۰

دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۰

چکیده

فاکتور رشد تغییرشکل دهنده بتا (TGF- β) پروتئین‌های دایمر پیام‌رسان هستند. ایزوفرم‌های TGF- β (TGF- β 1 و β 2 و β 3) 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- β ها با استفاده از سلول‌های یوکاریوتی دست‌کاری شده و با 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-TGF β) و کربوکسیلی (C-TGF β) 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 از دست رفتن تاخوردگی مناسب TGF- β شود.

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

۱- مقدمه

بزرگ خانواده $TGF-\beta$ از سیتوکین‌های^۱ چندعملکردی هستند که شامل فاکتور رشد تغییردهنده بتا^۲ ($TGF-\beta$)، پروتئین‌های تغییرشکل‌دهنده استخوان^۳ (BMPs)، فاکتورهای رشد و تمایزی^۴ (GDFs)، اکتیوین^۵‌ها، نودال^۶‌ها، اینهیبین^۷‌ها، هورمون ضدمولرین^۸ (AMH) و دیگر اعضا هستند. سه ایزوفرم $TGF-\beta 1$ و $\beta 2$ و $\beta 3$ 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 $TGF-\beta$ نوع یک ($T\beta RI$) و نوع دو ($T\beta RII$) شناخته می‌شوند منتقل می‌کنند [۳-۶].

گیرنده‌های نوع یک و دو از نظر ساختاری شبیه‌اند و شامل یک دامین خارج سلولی متصل‌شونده به لیگاند (حدوداً ۱۲۰ اسیدآمینه)، یک دامین عرض غشایی (حدوداً ۳۰ اسیدآمینه) و یک دامین سرین/ترئونین کینازی (در حدود ۴۰۰ اسیدآمینه‌ای) داخل سلولی هستند. دایمر $TGF-\beta$ ابتدا به دامین خارج سلولی یک جفت $T\beta RII$ متصل می‌شود و در پی آن یک جفت $T\beta RI$ را به کار می‌گیرد. با شکل‌گیری کمپلکس چهارتایی بین $T\beta RI$ و $T\beta RII$ ، گیرنده نوع دو موجب

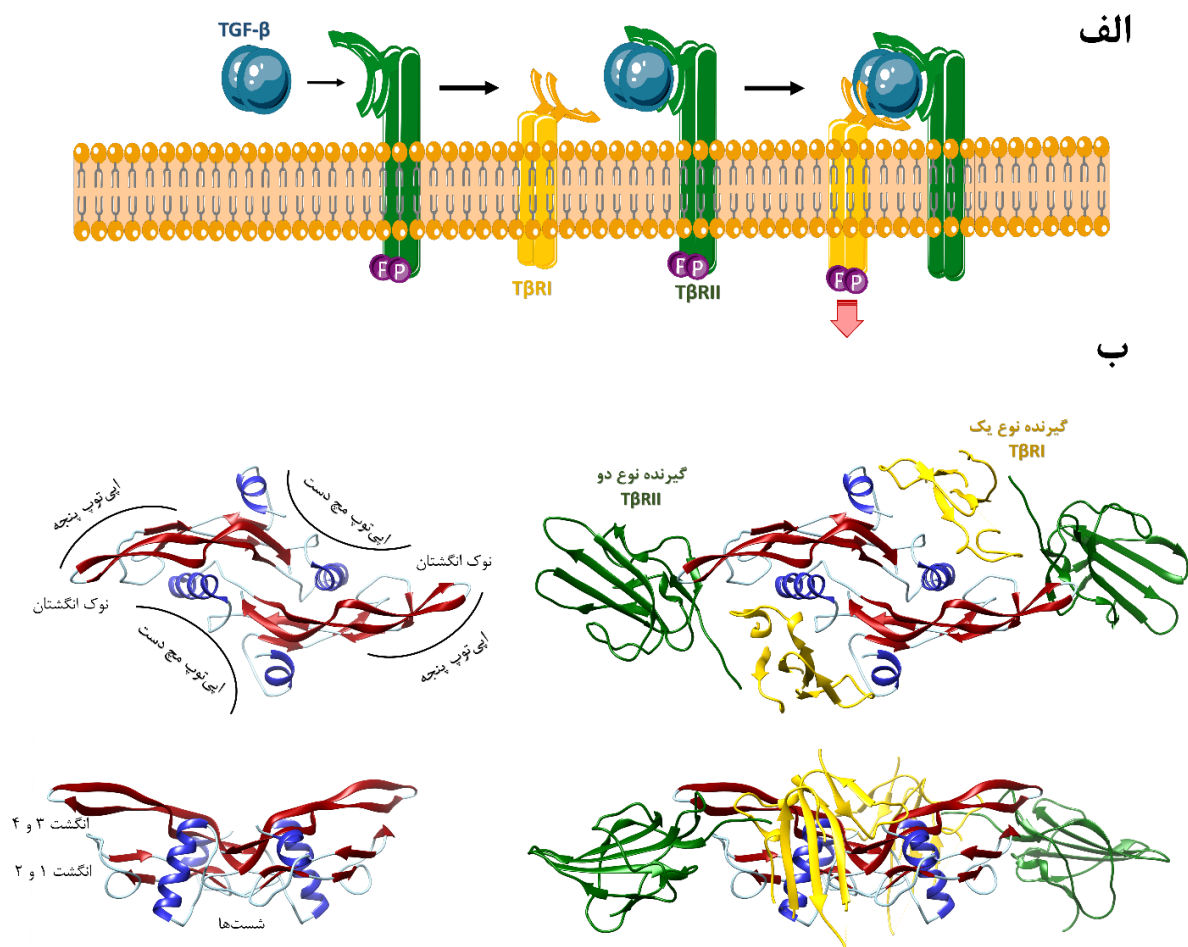
فسفریله شدن گیرنده نوع یک شده و مسیر پیام‌رسانی داخل سلولی به راه می‌افتند (شکل الف) [۱۰-۶]. هر زنجیره $TGF-\beta$ در فرم بالغ با ۱۱۲ اسیدآمینه وزنی در حدود ۱۲/۵ کیلودالتون دارد که وزن همودایمر آن ۲۵ کیلودالتون خواهد شد [۱۱]. $TGF-\beta$ دارای یک موتیف حفاظت شده با ۹ اسیدآمینه سیستمین است که هشت تا از آنها پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای تشکیل می‌دهند و یکی از سیستمین‌ها با پیوند بین زنجیره‌ای موجب دایمرشدن لیگاند می‌شود [۲]. تشکیل دایمر از طریق شکل‌گیری پیوند دی‌سولفیدی بین سیستمین‌های ۷۷ (Cys77) از هر زنجیره صورت می‌گیرد، به نحوی که همودایمر حاصل یک تقارن پروانه‌ای شکل را اخذ می‌کند (شکل اب). هر زنجیره از $TGF-\beta$ را می‌توان به یک دست منحنی شکل تشبیه کرد که با آرایش سر به سر^{۱۰} تشکیل همودایمر داده‌اند. چهار زنجیره بتا به‌سان چهار انگشت این دست هستند و هلیکس آلفا شکل‌دهنده شست دست و کف آن خواهد بود (شکل اب) [۵]؛ [۱۲]؛ [۱۳]. $T\beta RII$ با نوک انگشتان ۱ و ۲ از هر مونومر $TGF-\beta$ میان‌کنش می‌دهد و $T\beta RI$ به منطقه مربوط به مچ دست متصل می‌شود [۱۴].

همان‌گونه که ذکر شد $TGF-\beta$ 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 [۱۷-۱۵]؛ 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 مرسوم هم‌چون کروماتوگرافی 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

یونی، ژل فیلتراسیون، کروماتوگرافی تمایلی و ... استفاده می‌شود. در تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب، کروماتوگرافی تمایلی به دلیل سهولت کار با آن و نیز کارایی بیشتر تخلیص بسیار مورد توجه است [۱۸]. پروتئین‌های نوترکیب می‌توانند دنباله‌های تمایلی همچون بتا-گلاکتوزیداز، دنباله استرپ^{۱۱}، دنباله‌های چند آرژنینی^{۱۲} یا هیستیدینی^{۱۳} و ... داشته باشند [۱۹]. دنباله هیستیدینی (His-tag) شامل چهار تا شش اسید آمینه هیستیدین متوالی است که توانایی اتصال به یون نیکل متصل به بستر ستون کروماتوگرافی تمایلی فلزی^{۱۴} (IMAC) را دارد [۲۰]. چندین وکتور کدکننده مهندسی شده‌اند که قادرند پروتئین‌های نوترکیب به همراه دنباله هیستیدینی در انتهای آمینی^{۱۵} یا کربوکسیلی^{۱۶} را در میزبان‌های پروکاریوتی یا یوکاریوتی بیان کنند [۲۱-۲۳].

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



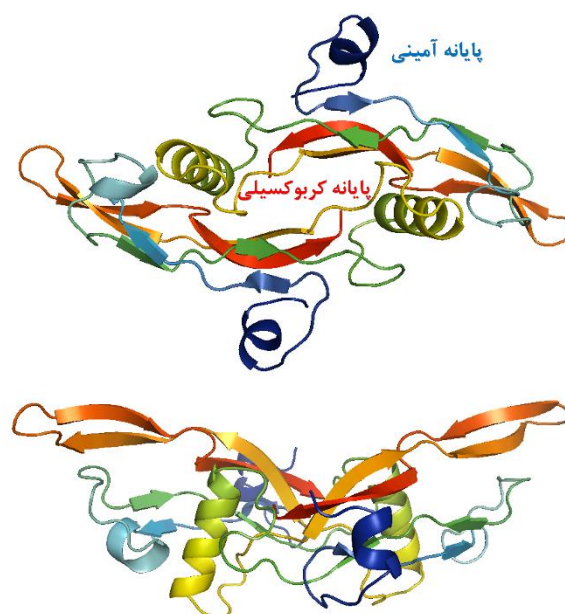
شکل ۱ TGF- β و مسیر پیام‌رسانی آن. الف) شمای شماتیک از مسیر پیام‌رسانی TGF- β . در ابتدا به دمین خارج سلولی گیرنده نوع دو (TBR2) متصل می‌شود و پس از آن گیرنده نوع یک (TBR1) را به کار می‌گیرد. پس از تشکیل کمپلکس چهارتایی بین گیرنده‌ها، گیرنده نوع دو با خاصیت سرین/ترئونین کینازی خود موجب فسفریله و فعال 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 3KFD.pdb). 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 TBR2 و از طریق ایپی توپ مج دست به TBR1 متصل می‌شود. ساختار سه بعدی پروتئین با استفاده از نرم افزار Chimera رسم شده است.

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 انتهایی آمینی و انتهایی کربوکسیلی وجود دارد و تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر گزینه بهینه برای این منظور گزارش نشده است. در این تحقیق

فایل ساختاری موجود در پایگاه داده پروتئین^{۱۷} با کد 3KFD [۶] شامل ساختار سه بعدی قسمت بالغ همودایمر TGF- β 1 انسانی (اسیدآمینه‌های ۲۷۹-۳۹۰) و دمین خارج سلولی TBR1 (اسیدآمینه‌های ۸۵-۹) و TBR2 (اسیدآمینه‌های ۱۲۶-۲۰) است (شکل ۱). در شکل ۲

بررسی اثر دنباله هیستیدینی ... ----- سپهری و همکاران

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



شکل ۲ ساختار سه بعدی TGF- β 1 از نمای بالا و روبرو (کد 3KFD :pdb). پایانه آمینی به رنگ آبی و پایانه کربوکسیلی به رنگ قرمز نمایش داده شده‌اند.

۲- روش‌ها

۲-۱ مدل‌سازی مولکولی^{۱۸}

برای افزودن دنباله هیستیدینی به انتهای آمینی و کربوکسیلی (پایانه N و C) TGF- β ، توالی نوکلئیک اسیدی TGF- β 1 به ترتیب در دو وکتور بیانی pET-28a و pET-21b و بین دو جایگاه برش *Xho* I و *Nde* 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 اسید آمینه‌ای ترجمه شد. پس از هم‌ردیفی توالی‌های حاصل و الگو قرار دادن ساختار سه بعدی دایمر TGF- β 1 (با کد 3KFD :pdb)، ساختار سه بعدی پروتئین‌های N-TGF β و C-TGF β 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 [۲۴]، انتخاب شد.

۲-۲ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی^{۱۹} (MD)

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

شد. در این پژوهش برای شبیه‌سازی از نرم‌افزار GROMACS 5.0.7 استفاده و از میدان نیروی gromos53a6 و الگوریتم ^{۲۰}PME (جهت محاسبه نیروهای الکتروستاتیک) بهره برده شد. این پروتئین‌ها در جعبه مربع شکلی و محیط آبی با مدل SPC^{۲۱} و با ضخامت حلال حداقل ۱۰ آنگستروم (۱ nm) از لبه پروتئین قرار گرفتند. به تعداد بار خالص پروتئین، به صورت تصادفی یون‌های مخالف جایگزین مولکول‌های آب شدند تا بار کلی سیستم خنثا شود (به ترتیب برای سه پروتئین TGF- β ، N-TGF β و C-TGF β ، ۸، ۱۰ و ۶ یون کلر). همچنین برای جلوگیری از خارج شدن مولکول‌ها از جعبه فرضی و عدم تبخیر حلال در زمان شبیه‌سازی و نیز کاهش کشش سطحی، از شرایط مرزی دوره‌ای^{۲۲} استفاده شد. هر یک از سیستم‌ها در ۵۰۰۰ گام به روش تندترین شیب^{۲۳} تحت روند کمینه‌سازی انرژی قرار گرفت. برای اطمینان از صحت انجام این روند نمودار پتانسیل انرژی در طی زمان کمینه‌سازی رسم شد. سپس مرحله به تعادل‌رسانی سیستم‌های شبیه‌سازی انجام شد. شبیه‌سازی برای زمان ۱۰۰ پیکوثانیه (۵۰۰۰۰ گام با فاصله زمانی ۲ fs) در شرایط تعداد اتم، حجم و دما ثبات (NVT) انجام گرفت و دمای سیستم‌ها به ۳۱۳ درجه کلون (۳۷ درجه سانتی‌گراد) رسید. پس از اطمینان از رسیدن سیستم به دمای موردنظر، برای زمان ۱۰۰ پیکوثانیه شبیه‌سازی در شرایط تعداد اتم، فشار و دما ثبات (NPT) ادامه یافت تا سیستم‌ها در شرایط فشار ثابت (۱ اتمسفر) به تعادل برسند. پس از به تعادل‌رسانی سیستم، پروتئین‌ها به مدت ۵۰ نانوثانیه و با گام زمانی ۲ فمتوثانیه شبیه‌سازی شدند. برای بررسی پایداری شبیه‌سازی از پارامترهایی مثل ثابت ماندن دما، چگالی و فشار سیستم در مرحله به تعادل‌رسانی استفاده شد. همچنین از تغییرات

شعاع ژیراسیون و ریشه میانگین مجذور انحرافات^{۲۴} (RMSD) جهت بررسی روند تغییرات ساختاری در طول زمان شبیه‌سازی در مرحله تولید به کار گرفته شدند. ریشه میانگین مجذور نوسانات^{۲۵} (RMSF) و فاکتور-^{۲۶}B فایل مسیر برای هر اسیدآمینه در طی ده نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی مورد بررسی قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ مدل‌سازی دنباله هیستیدینی در TGF- β

پس از افزودن توالی دنباله هیستیدینی به انتهای آمینی و کربوکسیلی TGF- β 1، مدل سه‌بعدی این توالی‌ها ساخته شدند. شکل ۳ نشان‌دهنده توالی هم‌ردیف شده N-TGF β و C-TGF β با TGF- β 1 طبیعی است که برای ساخت مدل سه‌بعدی پروتئین‌ها استفاده شده‌اند. پس از ساخت مدل‌ها و تأیید صحت مدل، بهترین مدل برای شبیه‌سازی 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

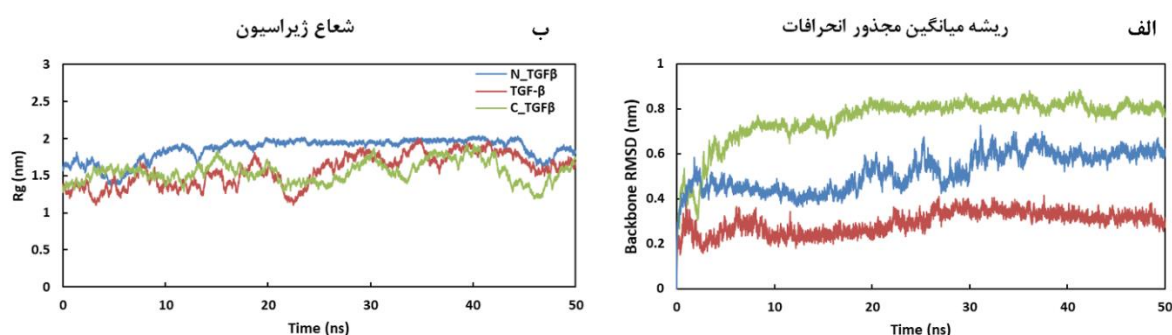
		1	10	20	30	40	50
N-TGFβ	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHM	ALDTNYCFSS	TEKNCCVRQL	YIDFRKDLGW	KWIHEPKGYH	ANFCLGFCPY	
TGF-β	-----	ALDTNYCFSS	TEKNCCVRQL	YIDFRKDLGW	KWIHEPKGYH	ANFCLGFCPY	
C-TGFβ	-----	ALDTNYCFSS	TEKNCCVRQL	YIDFRKDLGW	KWIHEPKGYH	ANFCLGFCPY	
	50	60	70	80	90	100	110
N-TGFβ	IWSLDTQYSK	VLALYNQHNP	GASAAPCCVP	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 سیستمین 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

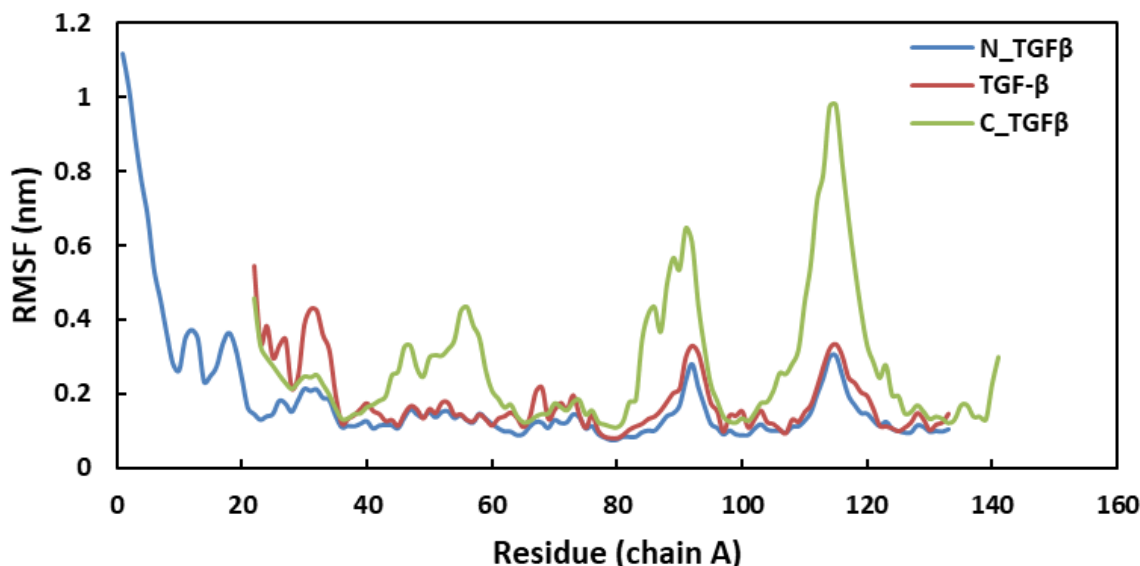
چگالی در طی مراحل به تعادل‌رسانی برای هر سه شبیه‌سازی بررسی شدند (نمودارها نمایش داده نشده‌اند). پس از حصول اطمینان از به تعادل‌رسیدن سیستم‌ها نوبت به شبیه‌سازی اصلی رسید. با بررسی تغییرات ریشه میانگین مجذور انحرافات و شعاع ژیراسیون در طی زمان شبیه‌سازی از پایداری سیستم شبیه‌سازی و به تعادل رسیدن ساختار پروتئین‌ها در طی ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی اطمینان حاصل شد.



شکل ۴ 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^{۲۷} پروتئین‌ها نسبت به ساختار اولیه، در طی زمان شبیه‌سازی برای هر یک از سیستم‌ها رسم شد. همان‌گونه که در شکل ۱۴-الف نیز مشاهده می‌شود، تغییرات ساختاری زمانی که دنباله هیستیدینی در انتهای آمینی قرار می‌گیرد ($N\text{-TGF}\beta$)، کمتر از زمانی است که این دنباله در انتهای کربوکسیلی است ($C\text{-TGF}\beta$). به بیان دیگر زنجیره اصلی پروتئین $C\text{-TGF}\beta$ 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 نانو ثانیه انتهایی شبیه‌سازی به نسبت ثابت است که نشان از به تعادل رسیدن ساختارهاست. از طرفی، تغییر شکل پروتئین به وسیله شعاع ژیراسیون قابل بررسی است. همان‌طور که انتظار می‌رود (شکل ۴-ب) شعاع ژیراسیون $N\text{-TGF}\beta$ (نمودار آبی رنگ) بیشتر از دو نمودار دیگر است که می‌تواند به دلیل بلندتر بودن دنباله هیستیدینی در $N\text{-TGF}\beta$ و آزادتر بودن آن باشد. نمودار شعاع ژیراسیون $C\text{-TGF}\beta$ نیز همچون RMSD آن در طی زمان شبیه‌سازی، نوسان‌های بیشتری نسبت به نمودار مربوط به $N\text{-TGF}\beta$ دارد؛ این نیز می‌تواند نشان از تغییرات ساختاری بیشتر این پروتئین باشد.

ریشه میانگین مجذور نوسانات



شکل ۵ ریشه میانگین مجذور نوساناتهای 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-TGF β ، نمودار آبی رنگ) مشابه است اما زمانی که دنباله هیستیدینی در انتهای کربوکسیلی (C-TGF β ، 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.

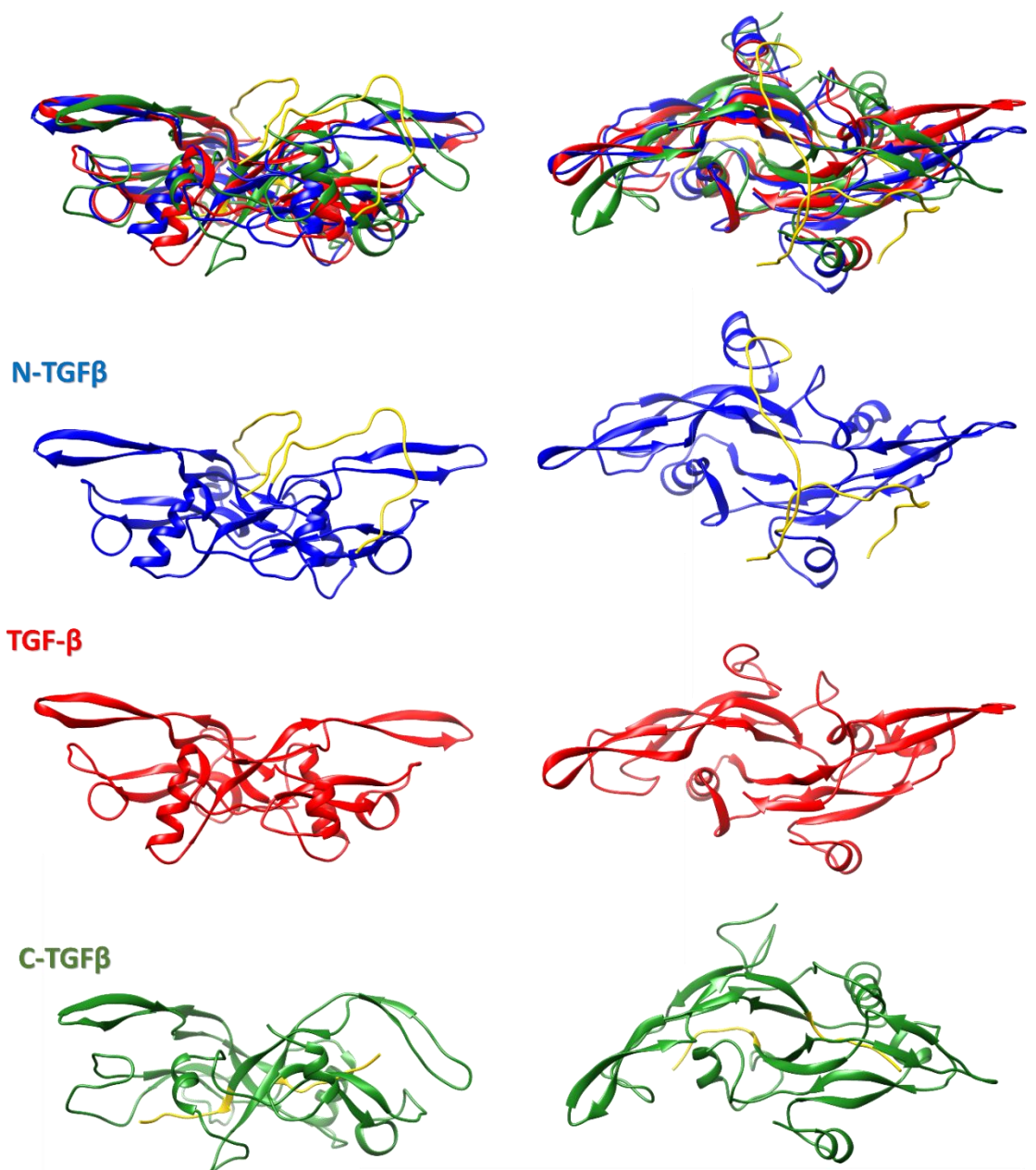
نمودار روی هم منطبق شده‌اند، همان مکان‌های مربوط به سیستئین است که به وسیله پیوند دی‌سولفیدی ثابت شده‌اند (شکل ۳). مناطقی که در آن بیشترین نوسان وجود دارد همان مناطق موسوم به انگشتان است که مسئول برهم‌کنش با گیرنده نوع دو است. بنابراین این احتمال وجود دارد که افزودن دنباله هیستیدینی به انتهای کربوکسیلی حتی موجب از دست رفتن عملکرد پروتئین نیز شود.

برای بررسی‌های بیشتر ساختاری، در گام بعدی فایل pdb خروجی شبیه‌سازی برای هر سه پروتئین استخراج شد (شکل ۶). برهم نهی^{۲۸} ساختارها با استفاده از نرم‌افزار Swiss-PdbViewer 4.0.1 [۲۸] نشان‌دهنده RMSD ۲/۱۴ آنگسترومی بین ساختار TGF- β و N-TGF β است، اما

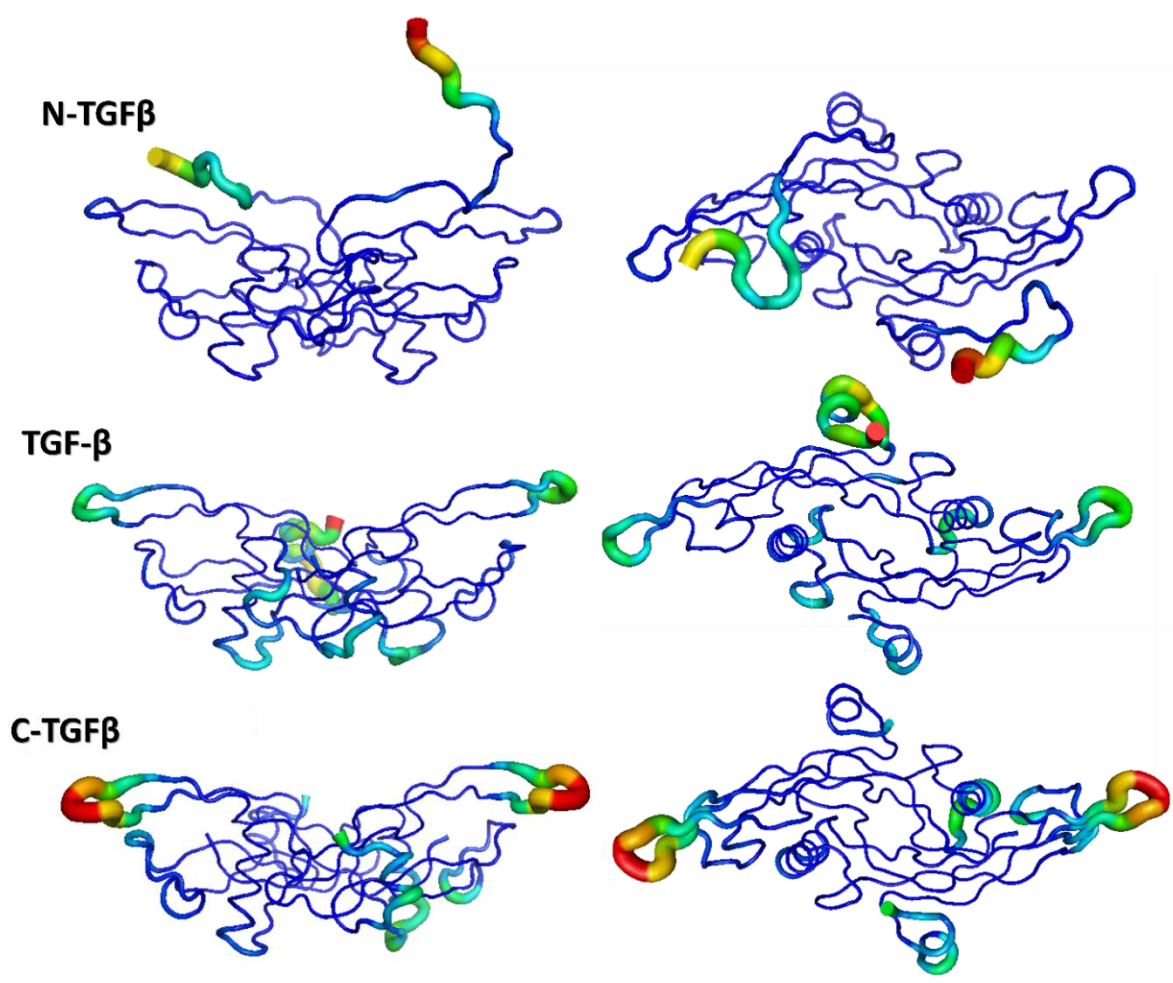
RMSF یا ریشه میانگین مجذور نوسانات معرف میزان جنبش اتم‌ها در طی زمان شبیه‌سازی است. برای دستیابی به میزان نوسان‌های هریک از اسیدآمینه‌های این پروتئین‌ها، RMSF هر اسیدآمینه در طی زمان شبیه‌سازی محاسبه و نمودار برای زنجیره A پروتئین‌های همودایمر رسم گردید. همان طور که در شکل ۵ مشخص است، اسیدآمینه‌های پروتئین N-TGF β جنبشی مشابه فرم طبیعی دارند، این در حالی است که نوسان در اسیدآمینه‌های پروتئین C-TGF β بسیار افزایش یافته است. این افزایش در جنبش هر چه که به سمت انتهای کربوکسیلی که محل قرارگیری دنباله هیستیدینی است پیش می‌رود محسوس‌تر و شدیدتر می‌شود. این در حالی است که ساختار دایمر TGF- β با ۹ پیوند دی‌سولفید پایدار شده است. همان طور که در نمودار نیز مشخص است، مناطقی که سه

به چشم می‌خورد. فاکتور-B موجود در فایل pdb نیز نشان‌دهنده جنبش بیشتر اسیدآمین‌های منطقه انگشتان در C-TGF β است (شکل ۷). مناطق قرمز رنگ نشان‌دهنده جنبش بیشتر اتم‌ها در آن قسمت است.

RMSD بین TGF- β و C-TGF β 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 ۶ نیز مشخص است در C-TGF β تغییرات وسیعی در منطقه موسوم به انگشتان



شکل ۶ فایل‌های pdb حاصل از شبیه‌سازی. فایل ساختاری حاصل از شبیه‌سازی TGF- β زمانی که دنباله هیستیدینی در انتهای کربوکسیلی آن است (C-TGF β) که با رنگ سبز نمایش داده شده تغییرات بیشتری نسبت به TGF- β طبیعی (قرمز) و N-TGF β (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.

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.

۴- نتیجه‌گیری

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

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 آنجایی که 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 $TGF-\beta$ در داخل پروتئین مدفون می‌شود و از دسترس خارج می‌گردد. از آنجایی که

with the X-ray structure of transforming growth factor $\beta 2$, *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- $\beta 3$ and comparison to TGF- $\beta 2$: 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- $\beta 1$ 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., Massagué, J. (1992) TGF β 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 factor- $\beta 2$, *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.

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 $\beta 1$: three-dimensional structure in solution and comparison

- 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.
- [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) TGF β 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, *Trends Biotechnol*. 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

Histidine-tagging effect on TGF- β molecular dynamics

Sepideh Sepehri¹, Seyed Shahriar Arab^{2*}, Mehrdad Behmanesh³, 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 (TGF β 1, β 2 and β 3) are involved in many cellular processes including growth inhibition, extracellular matrix remodeling, tissue development, cell migration, invasion and immune regulation. For research aims, TGF β s 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-TGF β) or N-terminal (N-TGF β) 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-TGF β and C-TGF β 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.