

مطالعه آزمایشگاهی و نرم‌افزاری بیان و مجتمع شدن درون سلولی پروتئین هسته‌ای نو ترکیب هپاتیت C در اشرشیا کلی

جعفر همت^{۱*}، باقر یخچالی^۲، علی اصغر کارخانه^۲، مهناز مظاهری اسدی^۱ و سودابه کریمی^۱

^۱ تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست‌فناوری

^۲ تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده زیست‌فناوری صنعت و محیط زیست

تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۳۱

چکیده

در این تحقیق بیان پروتئین هسته‌ای بالغ ویروس هپاتیت C (HCVC173) منطبق با ایزوتیپ a ویروسی موجود در ایران در اشرشیا کلی بررسی گردید. پروتئین مزبور با وزن مولکولی ۲۰ کیلودالتون به مقدار قابل توجه تا ۱۸ درصد پروتئین میزبانی بیان گردید. که به طور عمده به صورت نامحلول (به صورت اینکلوزن بادی) در سیتوزول باکتری مشاهده شد. تمایل به تجمع شدن به هنگام انجام فرآیند بازتآخوردگی پروتئین محلول شده پدیده غالب غیر قابل انتظار بود. ارزیابی نرم‌افزاری پروتئین هسته‌ای دو ناحیه مستعد بی‌نظمی در پروتئین HCVC173 را پیش‌بینی کرد که ممکن است از دلایل مجتمع شدن آن باشد. بنابراین پروتئین هدف دارای ویژگی‌های انواع پروتئین‌های بدون ساختار است. این یافته می‌تواند تمایل قابل توجه این پروتئین را به تجمع حین بازتآخوردگی توجیه کند. به علاوه راهکار ارائه شده در این پژوهش حداقل راه حلی برای غلبه بر محدودیت بیان فرم بالغ این پروتئین است.

واژه‌های کلیدی: هپاتیت C، پروتئین هسته‌ای، مجتمع شدن پروتئین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۵۶۲۷۶۶۳۶، پست الکترونیکی: j.hemmat@gmail.com

مقدمه

از جمله این محدودیت‌هاست. پس از آنکه مسجل شد این پروتئین گلیوزیله نمی‌شود، برخی محققین تلاش کردند از سیستم اشرشیا کلی جهت بیان استفاده کنند. با وجودی که این پروتئین ابتدا به شکل نابالغ -۱۹۱ اسید آمینه ای- بیان می‌شود و سپس به صورت بالغ ۱۷۳ اسید آمینه ای در می‌آید اما اکثر گزارشات به بیان پروتئین در حالت کوتاه شده معطوف گشته است (۱۹، ۲۰، ۲۱ و ۲۲) (جدول ۳). در حالات محدودی نیز که پروتئین کامل، هدف بوده است، عدم بیان و یا بیان ناچیز پدیده غالب بوده است و در مواردی نیز که بیان گزارش شده، عمدتاً پروتئین به صورت متصل به پپتید یا پروتئین دیگری (GST و MBP) بوده است (جدول ۳). همچنین در سیستم بیانی اشرشیا کلی

ویروس هپاتیت C (HCV) به عنوان یکی از شایع‌ترین عفونت‌های مزمن خون و عامل آلودگی ویروسی ۳ درصد جمعیت جهانی است که با بیماری فرصت طلب ایدز همراه شده است. این ویروس باعث آلودگی تمام عمرکبد و بیماری سیروز کبدی، سرطان کبدی (HCC) و نهایتاً مرگ می‌شود (۸، ۱۰ و ۱۵). به دلیل مشکلات تولید پروتئین هسته‌ای بالغ نو ترکیب (HCVC) به عنوان تنها پروتئین با ثبات و تنها پروتئین کاندید واکسن این ویروس، وجود اطلاعات اندک از آن، وجود محدودیت و معضلات فرآیند‌های پایین دستی بیان آن هنوز واکسنی برای این بیماری تهیه نشده است. عدم وجود سیستم بیانی مناسب جهت بیان مورد انتظار فرم بالغ پروتئین هسته‌ای

از محیط کشت LB (Luria-Bertani) در تمامی مراحل کلونینگ و همچنین در مراحل بیانی و به منظور کشت سویه‌های متفاوت باکتری *اشرشیا کلی* استفاده شد. از باکتری *اشرشیا کلی* سویه DH5 α به عنوان میزبان در مراحل کلون‌سازی و نیز جهت تکثیر و نگهداری DNA پلاسمیدی واز سویه‌های بیانی *اشرشیا کلی* BL21(DE3) و BL21(DE3)plyS λ در راستای یافتن میزبان بیانی مناسب جهت تولید میزان مناسبی از پروتئین نوترکیب استفاده شد. وکتورهای pBluescript II KS (+)Apr lacZ و pET-26b(+) به ترتیب به عنوان ناقل‌های کلونینگ و بیانی به کار گرفته شدند. آزمون‌های برشی عمدتاً از شرکت‌های فرمنتاز و یا رش تهیه شدند.

دستورزی ژنتیکی: جهت بررسی بیان پروتئین نوترکیب HCVC173، پس از الگو برداری و تکثیر ژن از روی cDNA (شماره AF512996 بانک ژن)، قطعات ژنی *mtCore* و *pelB-Core* و *His-Core* در حامل کلونینگ pBluescript II KS (+) کلون‌سازی گردید. پس از تأیید صحت همسانه‌سازی، با روش تعیین توالی و برش آنزیمی آنها ژن هدف در پلاسمید بیانی pET26b(+) همسانه‌سازی گردید. نتیجه عمل تهیه سه سازه بیانی واجد DNA هدف در موقعیتهای *HindIII* / *McsI* (سازه‌های بیانی pelBcore) یا *NdeI/HindIII* (سازه‌های بیانی Ntcore & Hiscore) پلاسمید بیانی pET26b(+) بود. روشها و اعمال کنترل‌های لازم طبق روش‌های کتاب مرجع سمبروک انجام شد (۱۷).

بیان پروتئین هسته ویروس هپاتیت C: سویه بیانی واجد سیگنال ترشحی pelB (سازه pelBcore)، سویه واجد دنباله هسیتیدینی در ابتدای توالی پپتیدی (سازه hiscore) و سازه فاقد هرگونه قطعه اضافه (سازه ntcare) ساخته شده در بخش قبل جهت ارزیابی بیان پروتئین هسته ای استفاده شدند. کشت شبانه در محیط LB و در گرمخانه شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با دور همزن rpm ۲۰۰ تهیه

پروتئین بیانی در اغلب موارد حالت غیر محلول بوده است (۲). در سیستم بیانی مخمری یا رده سلولی بیان ناچیز شکل بالغ اما محلول، گزارش شده است (۱۴).

پروتئین HCVC، پروتئین نوکلئوکپسیدی واکنش دهنده با پروتئین‌های پوششی E1 و E2 ویروس همچنین با پروتئین‌های همتای خود در حضور ساختارهای RNA است (۳). در ابتدا این پروتئین به صورت پلی پپتید همراه دیگر پروتئین‌های ویروسی ترجمه می‌شود. سپس تحت اثر پپتیدازهای میزبانی از بقیه پروتئین‌ها در قسمت E1، به صورت پلی پپتید ۱۹۱ اسید آمینه ای جدا می‌شود که از طریق ۲۲ اسید آمینه انتهای کربوکسیلی به غشای اندو-پلاسم رتیلولومی متصل می‌باشد. سپس تحت اثر پپتیداز دیگری سیگنال پپتید خود را از دست می‌دهد و به صورت بالغ ۱۷۳ اسید آمینه ای (HCVC173) درمی‌آید (۱۳). در هر حال پروتئین هسته یک پروتئین هیدروفیل با بار مثبت با حدود ۲۰ درصد لیزین و آرژینین است که از طریق این اسید آمینه‌های مثبت به ژنوم که دارای بار منفی است متصل می‌گردد. برای این پروتئین نقش‌های متفاوت شناخته شده است (۱، ۸ و ۱۸).

در مورد بیان فراتر پروتئین بالغ HCVC گزارشات اندک و اکثر گزارشات موجود در مورد فرم نابالغ و کوتاه شده این پروتئین می‌باشند. که عمدتاً با توجه تمرکز وجود شاخص‌های اپیتوبی این پروتئین در انتهای آمینی آن انجام شده‌اند. اما در واقع به دلیل اینکه بیان فرم بالغ پروتئین ویروس مشکلاتی را فراهم می‌آورد، محققین ترجیح می‌دهند که فرم کوتاه شده این پروتئین را بیان کنند. با توجه به اینکه بیشتر فرم کوتاه شده این پروتئین کلون و بیان گردیده است، در این تحقیق تلاش گردید تا فرم کامل پروتئین ویروس در *E. coli* بیان گردد. با توجه به خصوصیت تجمع شدن آن این ویژگی نیز از بعد مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

100 (0.1%) و توئین ۲۰ (0.5%) استفاده شد و همچنین سوسپانسیون حاصل به مدت 6×30 s با دوره استراحت ۳۰ ثانیه ای اولتراسونیک شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور 15000 rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید (۱۶). روشناور و رسوب حاصل از این سانتریفیوژ به ترتیب به عنوان پروتئین‌های محلول و نامحلول در نظر گرفته شدند. از این دو قسمت نمونه‌هایی برای آنالیز توسط SDS-PAGE تهیه شد.

مطالعات نرم افزاری: موقعیت AUG آغازین در ساختار ثانوی mRNA، مکان اتصال ریبوزوم به mRNA، ثبات ساختار mRNA، توالی ابتدایی سازه‌های ساخته شده توسط نرم افزار MFOLD (<http://mfold.bioinfo.rpl.edu/>) بررسی شد (۲۳). نواحی مورد بررسی توالی ۱۲۶ نوکلئیک اسید بود که کدون آغازین را در بر می‌گرفت. به منظور بررسی برخی عوامل مؤثر بر بیان در سطح ترجمه، پراکندگی توزیع کدون‌های هریک از سازه‌ها در گروه‌های کیفی کدنی، توزیع فرکانس کاربری کدنی و شاخص تطابق کدنی (CAI)، همچنین درصد GC سازه‌ها توسط نرم افزار Genscript (http://www.genscript.com/codon_opt.html) بررسی شد. جهت جستجوی توالی یا توالی‌های احتمالی کاندید مجتمع شدن پروتئین با استفاده از نرم افزار DisEMBL (<http://dis.embl.de>) بررسی شد.

نتایج

براساس مطالعات نرم افزاری و بررسی مقایسه ای میزان وفور کدون‌های نادر، از بین سه سازه بیانی طراحی شده میزان بیان مورد انتظار سازه pelBcore دوبرابر (ntcore) فرکانس بیان ۱۶ درصد در مقابل ۸ درصد) پیش بینی شد. اما طی مشاهدات، دو سازه hiscor و ntcore بیان اندک اما سازه pelBcore بیان فراتر نشان داد. با توجه با تفاوت اندک سه سازه و آن هم در توالی‌های ابتدایی این مشاهدات نشان دهنده دخالت احتمالی عوامل دیگر در افزایش سطح بیان آن بود. لذا شاخص‌های دیگر مؤثر بر بیان، مانند جایگاه

شد. القای بیان پروتئین با افزودن IPTG به غلظت نهایی 0.4 mM به محیط انجام شد. پس از آن در شرایط دمایی و دور همزن مناسب برای بیان (دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور همزن 150 rpm) انکوبه شد. در فواصل زمانی مشخص نمونه گیری صورت گرفته و توسط سانتریفیوژ 8000 rpm به مدت ۵ دقیقه رسوب سلولی تهیه شد. رسوب سلولی حاصل از آنها در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. میزان بیان توسط ژل SDS-PAGE طبق روش قبلاً گزارش شده بررسی گردید (۹).

استخراج پروتئین: سلول‌های plyS BL21(DE3) تراریخت شده با ساختارهای نو ترکیب ساخته شده فوق، در محیط کشت LB کشت داده شد. رسوب سلول‌های بیانی القاء شده، در بافر لیزکننده به صورت سوسپانسیون در آمده و متعاقب آن محلول به دست آمده روی یخ با دستگاه التراسونیک با توان ۷۵ وات و به مدت 9×30 s با دوره استراحت ۳۰ ثانیه ای لیزگردید (۷).

محصول سوسپانسیون سلولی طی مدت ۲۰ دقیقه ۱۸۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل که واجد پروتئین مورد نظر بود با بافر شستشو به مدت ۳۰ دقیقه با همزن برقی هم زده شد. پس از سانتریفیوژ شستشو تکرار گردید سپس شستشو با بافر شستشو فاقد تریتون دو مرتبه تکرار شد. رسوب حاصل جهت مراحل بعدی در فریزر ۲۰- سانتی گراد نگهداری شد.

به منظور تهیه مقادیر بیشتر پروتئین مورد نظر همچنین افزایش بخش محلول پروتئین بیان شده، اثر دماهای مختلف (۲۲/۵، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد) بر بیان پروتئین هسته ای بررسی شد. (۱۵).

محلول سازی پروتئین: جهت بررسی محلولیت پروتئین نو ترکیب رسوب سلول‌هایی که بیان پروتئین نو ترکیب در آنها القاء شده بود در بافر لیز کننده به صورت سوسپانسیون در آورده شدند. برای جهت محلول سازی فرم تجمع یافته پروتئین مورد نظر از دترجنت‌های غیر یونی تریتون X-

کدونهای مناسب در سیگنال بهینه شده در پلاسמיד بیانی pET26 در ابتدای mRNA سازه pelBcore، ممکن است شروع ترجمه بهتر و تسهیل شده تری را برای آن در مقایسه با دو سازه دیگر توجیه کند. همچنین لحاظ شاخص CAI و deltaG کاهش یافته، برپایداری بهتر mRNA سازه pelBcore دلالت کنند.

محل اتصال ریبوزوم و موقعیت AUG آغازین در mRNA بررسی شدند. بدین منظور ساختار ثانویه سه سازه بیانی (۱۲۶ نوکلئوتید اول mRNA) توسط نرم افزار Mfold بررسی شد. همان طور که نتایج (جدول ۱) نشان می‌دهد موقعیت کدون آغازین (قرار گرفتن در لوب بزرگ) سازه pelBcore نسبت به دو سازه دیگر، همچنین وجود

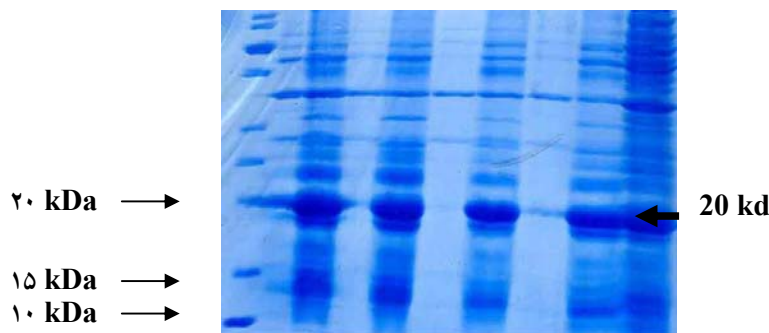
جدول ۱- بررسی مقایسه ای ساختار ثانویه سه سازه بیانی (۱۲۶ نوکلئوتید اول mRNA) توسط نرم افزار Mfold اسید آمینه های اولیه مربوط به پروتئین کر در سه سازه به صورت خط کشی شده نشان داده شده است.

سازه	اسید آمینه های آغازین	موقعیت AUG	موقعیت rbs	ΔG kcal/mol
pelBcore	MKYLLPTAAAGLLLLAAQ	Big loop	Stem	-۲۸/۳۸
Hiscore	MHHHHHHMSTNPKPQRKT	Loop	Stem	-۲۰/۱۹
Ntcore	<u>MSTNPKPQRKTKRNTSRR</u>	loop	Loop-Stem(1+4)	-۱۹/۳۰

القاء بررسی شد (شکل ۱)، و میزان پروتئین مورد نظر تا ۱۸ درصد پروتئین تام میزان افزایش یافت (شکل ۱).

بیان پروتئین: با هدف تأثیر شرایط محیطی بر بیان پروتئین محلول مورد نظر، اثر عوامل مختلف بر بیان از قبیل دمای

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰



شکل ۱- بررسی اینکلوزن بادی تولیدی و پروتئین محلول در دماهای متفاوت. ۴ ستون ۱ تا ۱۰ به ترتیب از چپ به راست: مارکوزن مولکولی، پروتئین محلول و اینکلوزن بادی استحصالی تولیدی در دمای ۳۰ درجه، ۲۵ و ۲۲/۵، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و پروتئین تام اولیه (۳۷ درجه سانتی گراد) همگی در غلظت IPTG ۰/۴ mM.

آن با استفاده از نرم افزار DisEMBL بررسی شود. در این مطالعه توالی پروتئین نو ترکیب PelB::core از نظر وجود توالیهای مستعد بتا مجتمع شدن (تا خوردن غیر معمول پروتئین است که منجر به نامحلول شدن می شود) بررسی شدند و با توالیهای شکل نابالغ HCV (HCVcore191) و

بررسی وجود توالیهای مستعد مجتمع شدن بتا در سه سازه بیانی: با توجه به غالب بودن میزان مجتمع شدن پروتئین مورد نظر بیان شده به صورت اینکلوزن بادی همچنین طی فرآیند تا خوردگی (اطلاعات منتشر نشده)، تلاش شد توالی یا توالیهای احتمالی کاندید مجتمع شدن

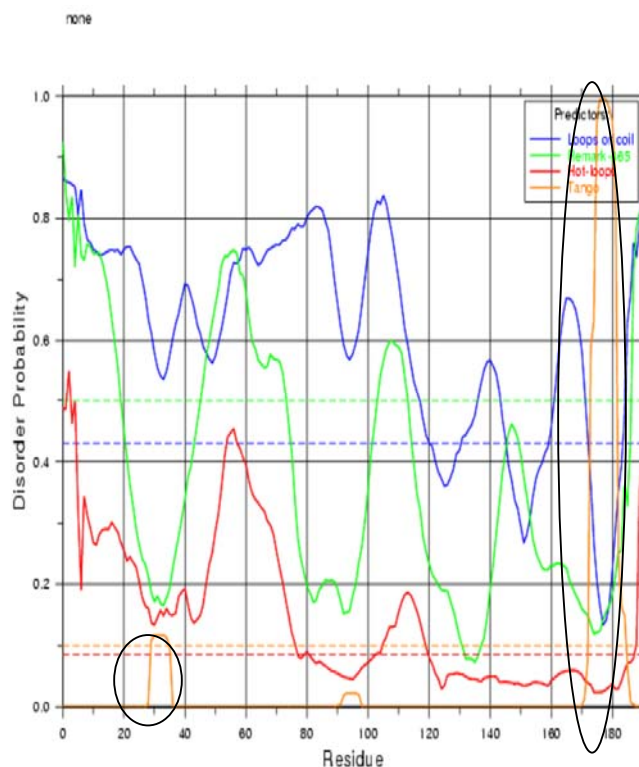
بالغ پروتئین با داشتن دو توالی مستعد مجتمع شدن احتمال مجتمع شدن بیشتری باید داشته باشد. اما در شکل بالغ با حذف این توالی احتمال بی نظمی تا حد ۵۰ درصد کاهش می یابد. در مورد پروتئین هیبرید PelB::core با افزوده شدن توالی اختصاصی مستعد مجتمع شدن مربوط به سیگنال (AGLLLLAA) به توالی مشترک بین سه سازه (IVGGVYL) احتمال بی نظمی و آگریگه شدن تا بیش از ۵۰ درصد افزایش می یابد. (جدول ۲ و شکل ۲).

بالغ آن که با حذف ۱۸ اسید آمینه انتهای آمینی قسمت سیگنالی (HCVcore173) حاصل می شود، مقایسه شد.

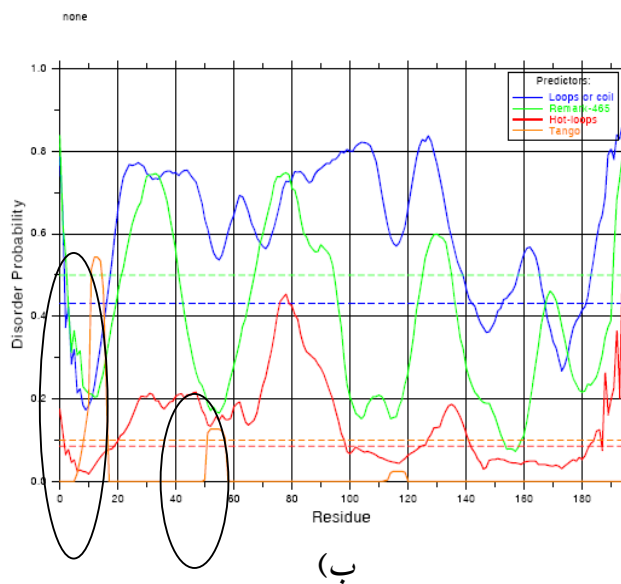
نکته قابل توجه در این بررسی وجود یک توالی شش اسید آمینه ای در توالی 30-35 فرم بالغ است که در شکل پروتئین غیر بالغ نیز موجود و مستعد بتا مجتمع شدن است. علاوه بر این توالی فرم نابالغ HCVcore191 در توالی 174-185 واجد این توالی است که احتمال بی نظمی نزدیک ۱۰۰ درصد نشان می دهد. بنابراین بیان حالت غیر

جدول ۲- مقایسه توالیهای بی نظم و موقعیت آنها در سه توالی متفاوت مربوط به HCVC173، HCVC191 و PelBcore173.

نام سازه	موقعیت	توالی های بی نظم
HCVC173	۳۰-۳۵	IVGGVYL
PelBcore	۱۰-۱۷ و ۵۲-۵۸	AGLLLLAA,IVGGVYL
HCVC191	۳۰-۳۵ و ۱۷۴-۱۸۵	IVGGVYL,FSIFLLALLSCL



الف



(ب)

شکل ۲- بررسی میزان وجود احتمالی توالیهای مستعد بتا مجتمع شدن در دو توالی متفاوت مربوط به HCVcore به وسیله نرم افزار DisEMBL (الف) توالیهای احتمالی مربوط به توالی نابالغ (HCVcore191)، و (ب) توالی بالغ واجد سیگنال (PelBcore173)، احتمال بی‌نظمی و موقعیت توالی مستعد بتا مجتمع شدن با منحنی نارنجی نشان داده شده است که در داخل دایره محیط گشته است.

حالت غیر معمول اینکلوژن بادی تولیدی HCVC173 از

جنبه خلوص مورد انتظار و همراهی غیر منتظره پروتئینهای میزبانی با آن از دو جنبه متفاوت قابل بحث است: یک جنبه نقش محوری این پروتئین در تشکیل ساختار نوکلئوکپسیدی ویروس و از جنبه دیگر ویژگیهای تعریف شده برای پروتئینهای ذاتاً بی‌نظم (IUP) (۵) با توجه به عملکرد محوری و نقش این پروتئین در پایه گذاری ساختار نوکلئوکپسید ویروس، از یکسو به نظر می‌رسد که قابلیت اتصال به واحد‌های مشابه خود را داشته باشد و از سوی می‌بایست توانایی برهمکنش با دیگر پروتئینهای ساختاری از جمله E1, E2 همچنین ژنوم را داشته باشد تا بتواند در مجموع نوکلئوکپسید ویروس را تشکیل دهد. علاوه بر این در گزارشهای متعددی نشان داده شده که HCVC با چندین پروتئین میزبانی ارتباط برقرار می‌کند از آن جمله: پایانه C پروتئین p53، و پروتئین هلیکاز DEAD-box (DBX) (۱۲). علاوه بر این، کریستوفر و همکارانش پروتئین کامل HCVC همچنین فرمهای کوتاه شده آن در پایانه C را چاپرونهای قوی اسید نوکلئیک معرفی کرده اند (۴). براین اساس تمایل شدید برهمکنش

بحث

مقایسه کیفی و کمی بیان پروتئین هسته ویروس هیپاتیت C نشان می‌دهد (جدول ۳) که اکثر پژوهشها به بیان پروتئین در حالت کوتاه شده معطوف گشته است. در حالات محدودی نیز که پروتئین بالغ، هدف بوده، بیان یا ناچیز بوده یا اساساً منفی بوده است. نقطه مشترک اغلب موارد بیان گزارش شده، بیان پروتئین به صورت متصل به پپتید یا پروتئین دیگری (GST و MBP) بوده است. در سیستم بیانی *اشرشیا کلی* حالت غیر محلول بودن پروتئین در موارد بیانی حاکم بوده است (۲). در مواردی که سیستم بیانی مخمری یا رده سلولی بوده گرچه بیان ناچیز بوده اما حالت محلول، گزارش شده است (۱۳) (جدول ۳). در این پژوهش پروتئین هسته ای بالغ ویروس هیپاتیت C ایزوتیپ ایرانی بخشی محلول و بخشی نامحلول اما به صورت قابل ملاحظه در *اشرشیا کلی* بیان گردید. بنابراین راهکار ارائه شده در این پژوهش حداقل راه حلی برای غلبه بر محدودیت بیان فرم کامل این پروتئین است.

هستند. با استفاده از نرم افزار DisEMBL پیش بینی نواحی غیر معمول پروتئینها در خصوص پروتئینهای متعددی از جمله پروتئین هیستونی H1.2، پروتئین ریپوزومی 30S مطالعه شده است (۱۱). در یک مطالعه ساختار ۸۲ اسید آمینه اول HCV (C82) توسط داویگناد بررسی شد. شواهد تجربی بر این مطلب دلالت دارد که C82 در محلول آبی دارای شکل بسیار بی نظم است و دلالت بر متناسب بودن این پروتئین یا نیمه ابتدای N آن به خانواده پروتئینهای بدون ساختار ذاتی است (۵). بنابراین انتظار رفتار مشابه متناسب خصوصیت ذاتی پروتئین HCVC173 در میزبان بیانی نیز اجتناب ناپذیر است گرچه مطلوب تحقیقات نباشد. ولی به واسطه غیر محلول بودن راه حلی برای افزایش پایداری پروتئین در مقابل حساسیت به پروتئاز هاست که می تواند در شرایط درون شیشه ای در مقابل ناپایداری آن از آن بهره برد.

پروتئین HCVC173 با خود و دیگر پروتئینهای پیرامونی و در شرایط آزمایشگاهی قابل توجیه و انتظار است. طی پژوهشی اثبات شده که در رده سلولی پستانداران که HCVC بیان می شود در بیشتر موارد DBX در فرمهای مجتمع شده در غشای شبکه اندوپلاسمی قرار می گیرد (۱۲).

جنبه دوم تأثیرگذار بر ویژگی غیر معمول رفتار پروتئین هسته ای HCVC173، تمایل به تجمع شدن و خصوصیت ذاتی آن در دارا بودن خصوصیات پروتئینهای IUPs است (۵). IUPs خانواده مهمی از پروتئینها هستند که ممکن است تا ۳۰ درصد از پروتئینهای ژنوم انسان را شامل شوند. مشخص شده است که IUPs با مولکولهای مختلف از جمله اسیدهای نوکلئیک، پروتئینهای دیگر و یا غشاهای و یا دامنه وسیعی از لیگاندهای کوچک برهمکنش داده و بی شکلی و انعطاف پذیری از ویژگیهای مهم این پروتئینها

جدول ۳ - مقایسه کیفی و کمی بیان آنتی ژن HCVC در گزارشات قبلی به تفکیک طول قطعه، سیستم بیانی و میزان بیان.

HCVC Form/Amino acid	Exp Vector	Expression form	Expression	Author
163/141	prokaryotic expression	MBP/ GST inclusion body	>1mg/3-4mg/ml	۶
22kD/Truncate	SR alpha promoter/	monkey COS cells	Cytoplas/Nucleus	۲۰
113	tac promoter		IB/440mg/ 3.5L	۱۸
Mature Truncate123	pGEX-3X	GST_fusion	Exp-Exp+	۱۹
HCVC191		GST	low Exp Exp	۲۱
HCV169/124(1b)	pT7-7	His tag	Low expression	۲
120 aa, 176 aa	AOXI	Fused sucrose invertase 2	Low expression	۱۴

یادبود: رحلت دانشمند فقید و استاد فرزانه دکتر فریدون ملکزاده که نقش بارزی در توسعه علوم میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی میکروبی ایران داشتند به جامعه علمی کشور

سپاسگزاری

از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به خاطر پشتیبانی پژوهش سپاسگزاری می گردد.

داریم. روحشان قرین رحمت الهی باشد.

تسلیمت عرض نموده و بدین وسیله یاد ایشان را گرامی می

منابع

- Alberstein, M., Zornitzki, T. Zick, Knobler, Y H, (2012) Hepatitis C core protein impairs insulin downstream signalling and regulatory role of IGFBP-1 expression, *J. Viral Hepatitis*, Volume 19, Issue 1, pages 65–71,
- Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP (2005) Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* 79: 11353-65
- Counihan NA, Rawlinson SM, Lindenbach BD (2011) Trafficking of Hepatitis C Virus Core Protein during Virus Particle Assembly. *PLoS Pathog* 7(10):e1002302. doi:10.1371/journal.ppat.1002302.
- Cristofari G, Ivanyi-Nagy R, Gabus C, Boulant S, Lavergne JP, Penin F, Darlix JL (2004) The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral(+) strand RNA in vitro. *Nucleic Acids Research* 32: 2623-263
- Duvignaud B, Savard C, Fromentin R, Majeau N, Leclerc D, Gagne SM (2009) Structure and dynamics of the N-terminal half of hepatitis C virus core protein: An intrinsically unstructured protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378: 27-31
- Hitomi Y, McDonnell WM, Baker JR, Jr., Askari FK (1995) High efficiency prokaryotic expression and purification of a portion of the hepatitis C core protein and analysis of the immune response to recombinant protein in BALB/c mice. *Vira*
- Hourioux C, Ait-Goughoulte M, Patient R, Fouquenot D, Arcanger-Doudet F, Brand D, Martin A, Roingard P (2007) Core protein domains involved in hepatitis C virus-like particle assembly and budding at the endoplasmic reticulum membrane. *Cell Microbiol* 9: 1014-27.
- Irshad M, Dhar I (2006) Hepatitis C virus core protein: an update on its molecular biology, cellular functions and clinical implications. *Med Princ Pract* 15: 405-16
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Levy M, T, Chen J, J, McGuinness P, H, Koorey D, Sheil A, G & McCaughan G, W (1997) Liver transplantation for hepatitis C-associated cirrhosis in a single Australian centre: referral patterns and transplant outcomes. *Journal of gastroenterology and Hepatology* 12, 453-459.
- Linding R, Jensen LJ, Diella F, Bork P, Gibson TJ, Russell RB (2003) Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure* 11:1453-9.
- Mamiya N, Howard J, Worman H J, (1999) Hepatitis C Virus Core Protein Binds to a DEAD Box RNA Helicase J. *Biol Chemist* 27422, 15751–15756.
- Majeau N, Gagné V, Bolduc M, and Leclerc D , (2005) Signal peptide peptidase promotes the formation of hepatitis C virus non-enveloped particles and is captured on the viral membrane during assembly *J Gen.l Virol* 86, 3055–3064.
- Martinez-Donato G, Acosta-Rivero N, Morales-Grillo J, Musacchio A, Vina A, Alvarez C, Figueroa N, Guerra I, Garcia J, Varas L, Muzio V, Duenas-Carrera S (2006) Expression and processing of hepatitis C virus structural proteins in *Pichia pastoris* yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342: 625-631.
- Park S, Lim J, Lim S, Tiwari I, Jang K, (2011) Hepatitis C virus Core protein stimulates cell growth by down-regulating p16 expression via DNA methylation. *Cancer Lett.* 310: 61-8.
- Rastgar Jazii F, Karkhane A A, Yakhchali B, Fatemi S A, and Deezagi A, (2007) A simplified purification procedure for recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor from periplasmic space of *Escherichia coli*. *J. Chromat B*, 856: 214-221.
- Sambrook J, Fritsch E. F., Maniatis T, (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Vol I, II, III, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Seki M, Honda Y, Kondo J, Fukuda K, Ohta K, Sugimoto J, Yamada E (1995) Effective Production of the Hepatitis-C Virus Core Antigen Having High-Purity in *Escherichia-Coli*. *Journal of Biotechnology* 38: 229-241.
- Songsivilai S, Dharakul T, Kunkitti R, Thepthai C (1996) Molecular cloning and expression of hepatitis C virus core protein and production of monoclonal antibodies to the recombinant protein. *Asian Pac J Allergy Immunol* 14: 31-4.
- Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki T, Mizumoto K, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T, (2005) Molecular determinants for subcellular

- localization of hepatitis C virus core protein. J Virol. 79(2):1271-81.
21. Yang L, Zhu LX, Wang Y, Li GD (1999) Fusion Expression, Immunogenicity and Applications of C-terminally Truncated HCV Core Proteins. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) 31: 61-66
22. Voisset C, Dubuisson J (2004) Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. Biology of the Cell 96: 413-420.
23. Zuker M, (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res. 13:3406-15.

Lab and In silico study of expression and aggregation of recombinant core protein of Hepatitis C virus in *Escherichia coli*

Hemmat J.¹, Yakhchali B.², KarKhane A.A.², Mazaheriasadi M.¹ and Karimi S.¹

¹ Biotechnology Dept., Iranian Research Organization for Science and Technology-IROST, Tehran, I.R. of Iran

² National Institute for Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

In this study, expression of mature Hepatitis C virus core protein (HCVC173), consistent with a viral isotype isolated in Iran, was studied in *E. coli*. The 20 kDa-HCVC173 protein was expressed while it contains 18% of total expressed proteins in which a part was partially soluble but the main part was expressed in insoluble inclusion body. However, the produced inclusion body has not shown the expected purity and HCVC173 has been aggregated with the host proteins. Moreover, during refolding of insoluble HCVC173, notable aggregation of the protein was undesirable phenomena. Intramolecular evaluation of target expressed protein predicted two irregularity area in the HCVC173 which may aggregate the expressed protein. Consequently, HCVC173 has the features of the intrinsically unstructured proteins. This character may justify its aggregation during refolding. Overall, the approach presented in this paper is an alternative solution to overcome the expression limitation of mature form of the HCVC protein.

Key words: Hepatitis C Virus, core protein, Inclusion body, Aggregation