١١٨٥٩

بسم الله الرحمن الرحيم

١١٢٤٢٥ — ٢٠٠١٩٤٦

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پایه

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بیوشیمی

عنوان:

بررسی اثر مواد شیمیایی و طبیعی مختلف بر روی تجمع پروتئینی تشکیل شده در لیزوزیم در شرایط آزمایشگاهی

نگارش:

مصطفی کمیزی

استاد راهنما:

دکتر حمیدرضا کلهر

۱۳۸۸/۶/۱۶

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تاریخ ثبت مدارک

اسفند ۱۳۸۷

۱۱۶۴۲۵

بسمه تعالی

دانشکده علوم پایه

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد

عضای هیئت داوران نسخهٔ نهایی پایان‌نامه آقای مصطفی کمیزی رشته زیست‌شناسی (بیوشیمی) تحت عنوان:«بررسی اثر مواد شیمیایی و طبیعی بر روی تجمع پروتئینی تشکیل‌شده در لیزوزیم در شرایط آزمایشگاهی» از نظر فرم و محتوا بررسی نموده و آنرا برای اخذ درجهٔ کارشناسی‌ارشد مورد تائید قرار دادند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر حمیدرضا کلهر	استادیار	
۲- استاد ناظر داخلی	دکتر سامان حسینخانی	دانشیار	
۳- استاد ناظر داخلی	دکتر مجید عرفانی‌مقدم	استادیار	
٤- استاد ناظر خارجی	دکتر ابوالفضل گلستانی	استاد	
٥- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر خسرو خواجه	دانشیار	

بسمه‌تعالی

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادّهٔ ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

مادّهٔ ۲ در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ ..... است که در سال ..... در دانشکدهٔ ..... دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر ..... ، مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر ..... و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر ..... از آن دفاع شده است.»

مادّهٔ ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهداکند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّهٔ ۴ در صورت عدم رعایت مادّهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس، تأدیه کند.

مادّهٔ ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّهٔ ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّهٔ ۶ اینجانب مصطفی کبیری دانشجوی رشته مهندسی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام‌خانوادگی: مصطفی کبیری

تاریخ و امضا: ۱۴/۴/۸۸

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه:

با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت وکرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت‌علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان‌نامه/رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می‌باشد ولی حقوق معنوی پدیدآورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه / رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان‌نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می‌باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم‌افزار و یا آثار ویژه حاصل از نتایج پایان‌نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت‌رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

تقدیم به

پدر و مادر بزرگوارم

به پاس راهی که فرا رویم نهادند و با فداکاری ها و راهنمایی های

ارزنده خود، پیمودن این مسیر را میسر نمودند.

و

تقدیم به برادر و خواهران گرامیم

که وجودشان مایه عزت و سرافرازیم می باشد.

تشکر و قدردانی

حمد وسپاس بی کران پروردگار یکتا را که بر این بنده حقیر منت نهاد تا دوره ای دیگر از دوران تحصیل علم و کمال را با نتیجه مطلوب و رضایت بخش به سر انجام برسانم.

در اینجا بر خود واجب می دانم که مراتب قدردانی خود را نسبت به اساتید ارجمندی که افتخار دانشجویی شان و دوستان عزیزی که افتخار آشنایی شان را داشته ام، ابراز دارم.

از جناب آقای دکتر حمیدرضا کلهر که راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشتند و از محضر ایشان بهره های فراوان بردم و هم چنین مرا از پشتوانه علمی خویش بهره مند ساختند کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر حسینخانی که قبول زحمت فرمودند و داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر عرفانی مقدم که زحمت مطالعه وقضاوت این پایان نامه را بر عهده داشتند کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر گلستانی که داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند تشکر می کنم.

از مسئول محترم آزمایشگاه بیوشیمی سرکار خانم زرندی به خاطر همکاری های صمیمانه ایشان در انجام کارهای آزمایشگاهی تشکر می کنم.

هم چنین از کلیه دوستان گرامی که در طول این دوره از کمک هایشان بهره بردم، صمیمانه سپاس گذارم.

فهرست

۱- فصل اول (مقدمه) ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- آمیلوئید ۲

۱-۲-۱- تاریخچه ۲

۱-۲-۲- ساختار آمیلوئید ۳

۱-۲-۳- تشکیل فیبریل آمیلوئیدی ۸

۱-۲-۳-۱- مکانیسم های مولکولی تشکیل فیبریل آمیلوئیدی ۱۱

۱-۲-۳-۲- تشکیل فیبریل آمیلوئیدی در لیزوزیم ۱۶

۱-۲-۳-۳- سینتیک تشکیل فیبریل آمیلوئیدی ۲۲

۱-۲-۴- بیماری های آمیلوئیدی ۲۴

۱-۳- لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEWL) ۲۶

۱-۳-۱- ساختار سوم لیزوزیم سفیده تخم مرغ ۲۷

۱-۳-۲- عمل لیزوزیم ۲۸

۱-۴- هتروپلی اسیدها ۳۰

۱-۵- یون مایع ها ۳۲

۱-۶- عصاره های گیاهی ۳۳

۲- فصل دوم (مواد و روش ها) ۳۷

۲-۱- مواد مورد استفاده ۳۸
۲-۲- دستگاه های مورد استفاده ۳۹
۲-۳- روش تهیه فیبریل در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) ۴۰
۲-۳-۱- تهیه فیبریل از لیزوزیم سفیده تخم مرغ ۴۰
۲-۳-۲- تهیه فیبریل از آلبومین (BSA) ۴۰
۲-۴- تهیه عصاره های گیاهی ۴۱
۲-۵- الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE) ۴۱
۲-۵-۱- تهیه بافرهای مورد نیاز ۴۱
۲-۵-۲- انجام آزمایش ۴۳
۲-۵-۳- روش های رنگ آمیزی ۴۶
۲-۶- الکتروفورز پروتئین به روش طبیعی (Native-PAGE) ۴۹
۲-۷- الکتروفورز روی ژل آگارز (denaturing native gel agarose) ۵۰
۲-۸- آزمایش اتصال کنگورد ۵۱
۲-۸-۱- تهیه بافر فسفات پتاسیم ۵۱
۲-۸-۲- تهیه استوک کنگورد ۵۱
۲-۸-۳- روش انجام آزمایش اتصال کنگورد ۵۲
۲-۹- آزمایش اتصال تیوفلاوین T ۵۲
۲-۹-۱- تهیه بافر فسفات سدیم ۵۳
۲-۹-۲- تهیه استوک تیوفلاوین T ۵۳
۲-۹-۳- روش انجام آزمایش اتصال تیوفلاوین T ۵۴

چکیده

یکی از موضوعات مورد بحث در زمینه مطالعه پروتئین ها، تشکیل تجمع و آمیلوئید می باشد که در چند سال اخیر بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است ولی هنوز در چگونگی بوجود آمدن آمیلوئید و اثر مخرب آن ابهامات بسیاری وجود دارد. تشکیل فیبریل های آمیلوئیدی باعث بیماری های خطرناکی مانند آلزایمر و پارکینسون در انسان می شود. پی بردن به مکانیسم تشکیل فیبریل می تواند در راه یافتن درمان برای این بیماری ها بسیار مفید باشد. در این تحقیق تاثیر تعدادی مواد شیمیایی (هترو پلی اسید و یون مایع ها) و طبیعی (عصاره گیاهی) بر تشکیل فیبریل آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEWL) در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعات می تواند در فهمیدن مکانیسم تشکیل فیبریل ها کمک کننده باشد. در طی این مطالعات مشخص شد که هترو پلی اسید با پروتئین تولید تجمعات آمورف می کند. برای تولید فیبریل، لیزوزیم با غلظت ۲ mg/ml در شرایط pH=۲/۵ و دمای ۵۷°C در غیاب و در حضور مواد مورد نظر قرار داده شد. سپس مقدار فیبریل تشکیل شده در نمونه ها به وسیله آزمایش های مختلف شامل آزمایش اتصال تیوفلاوین T، اتصال کنگورد، میکروسکوپ الکترونی (TEM) اندازه گرفته شد. این آزمایش ها نشان داد که یون مایع تترامتیل گوانیدینیوم استات(یون مایع ۱) بر تشکیل فیبریل اثر مهارکنندگی دارد. برای بررسی بیشتر اثر یون مایع ۱ دو رنگ نمایی دورانی (CD) و اتصالANS انجام شد. این آزمایش ها نیز اثر مهارکنندگی یون مایع ۱ را تائید کردند.

مطالعات سینتیکی برای بررسی اثر عصاره گیاهان مصطکی، سیاهدانه، کندر و پوست گردو انجام شد. مشخص شد این عصاره ها به جز سیاهدانه تاثیر مهارکنندگی چندانی بر تشکیل فیبریل ندارند.

کلیدواژه ها: فیبریل آمیلوئیدی، لیزوزیم، اثر مهاری، یون مایع.

۲-۹-۴- محاسبه زمان شروع برای تشکیل فیبریل ۵۴
۲-۱۰- آزمایش فلورسنت ANS ۵۶
۲-۱۱- آزمایش دو رنگ نمایی دورانی ۵۶
۲-۱۲- مطالعات فلورسنت ذاتی ۵۷
۲-۱۳- مطالعات میکروسکوپ الکترونی ۵۸

۳- فصل سوم (نتایج) ۵۹
۳-۱- تهیه فیبریل آمیلوئیدی ۶۰
۳-۲- بررسی اثر هتروپلی اسید ۶۱
۳-۳- بررسی اثر یون مایع ها ۶۳
۳-۴- بررسی سینتیکی تشکیل فیبریل آمیلوئیدی توسط آزمایش تیوفلاوینT ۶۵
۳-۴-۱- بررسی سینتیکی اثر مواد شیمیایی (یون مایع ها) بر تشکیل فیبریل ۶۵
۳-۴-۲- محاسبه زمان ناحیه شروع در تشکیل فیبریل ۷۰
۳-۴-۳- بررسی سینتیکی اثر مواد طبیعی (عصاره های گیاهی) بر تشکیل فیبریل ۷۱
۳-۵- بررسی مقدار فیبریل توسط آزمایش کنگورد ۷۷
۳-۶- بررسی ساختار دوم پروتئین توسط دو رنگ نمایی دورانی (CD) ۸۰
۳-۷- مطالعات فلوئورسانس ذاتی ۸۳
۳-۸- مطالعات طیف فلوئورسانس ANS ۸۴
۳-۹- مطالعات سینتیکی تشکیل فیبریل آمیلوئیدی در آلبومین (BSA) ۸۵

۳-۹-۱- تهیه فیبریل آمیلوئیدی از پروتئین آلبومین ۸۵
۳-۹-۲- انجام آزمایش تیوفلاوین T برای بررسی تاثیر یون مایع ها بر تشکیل فیبریل آلبومین ۸۵
۳-۱۰- مطالعه میکروسکوپ الکترونی ۸۷
۳-۱۱- مطالعه تاثیر یون مایع ۱ بر تشکیل فیبریل با الکتروفورز طبیعی (Native-PAGE) ۸۹
۳-۱۲- مطالعه تاثیر یون مایع ۱ بر تشکیل فیبریل توسط ژل آگارز (Native gel agarose) ۹۰

۴- فصل چهارم (بحث) ۹۲
۴-۱- بررسی اثر هتروپلی اسیدها ۹۳
۴-۲- مطالعه اثر یون مایع ها بر تشکیل فیبریل ۹۴
۴-۲-۱- مطالعه اثر یون مایع ها بر تشکیل فیبریل با روش ترکیبی (combinatorial) ۹۴
۴-۲-۲- مطالعات سینتیکی اثر یون مایع ها بر تشکیل فیبریل ۹۵
۴-۲-۳- مطالعه ساختار فیبریل ها ۹۶
۴-۲-۴- بررسی اثر یون مایع ۱ بر مورفولوژی فیبریل ها و حدواسط ها ۹۸
۴-۲-۵- بررسی مکانیسم تاثیر یون مایع ۱ بر تشکیل فیبریل ۹۸
۴-۳- مطالعه اثر عصاره های گیاهی بر تشکیل فیبریل ۱۰۲
۴-۴- پیشنهادها ۱۰۶

۵- فصل پنجم (منابع) ۱۰۷

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

یکی از موضوعات مورد بحث در زمینه مطالعه پروتئین ها، تشکیل تجمع و آمیلوئید می‌باشد که در چند سال اخیر بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است ولی هنوز در چگونگی بوجود آمدن آمیلوئید و اثر مخرب آن ابهامات بسیاری وجود دارد.

تشکیل تجمع پروتئینی منشاء خانواده مهمی از بیماری ها از قبیل آلزایمر، پارکینسون، آنسفالوپاتی اسفنجی، دیابت نوع دوم می‌باشد که هنوز درمان قطعی برای آنها یافت نشده است. با توجه به اهمیت این گروه از بیماری‌ها، ضرورت تحقیق درباره مکانیسم مولکولی تشکیل آمیلوئید بیشتر شده است(۱،۲).

۱-۲- آمیلوئید

۱-۲-۱- تاریخچه

کلمه آمیلوئید[1] اولین بارتوسط رودولف ویرکو[2] در سال ۱۸۵۴ بکار رفت. او بخشی از مغز را که ظاهری غیرمعمول داشت را با ید رنگ آمیزی کرد، با مشاهده رنگ آبی کم رنگ در اثر این رنگ آمیزی و پدیدار شدن رنگ بنفش در اثر افزودن اسید سولفوریک به این نتیجه رسید ماده رنگ گرفته در مغز که ظاهری غیرمعمول را ایجاد کرده، سلولز است و آنرا آمیلوئید نامید. کلمه آمیلوئید برگرفته از واژه لاتین amylum و واژه یونانی amylon است.(در آن زمان هنوز به این نکته پی برده نشده بود که نشاسته و سلولز فقط در گیاهان وجود دارند)(۳).

[1] amyloid
[2] Rudolph Virchow

در سال ۱۸۵۹ فردریک[1] و ککوله[2] پی بردند که در ساختار آمیلوئید پروتئین وجود دارد و این ساختار در نتیجه تغییر کنفورماسیون پروتئین به وجود می آید(۳).

در طی قرن نوزدهم و اوایل قرن بیستم با تحقیقاتی که بر روی طبیعت و ماهیت آمیلوئید انجام شد، آن را نشانه یک سری از بیماری ها تشخیص دادند(۳).

۱-۲-۲- ساختار آمیلوئید

بعد از مشخص شدن ماهیت آمیلوئید تحقیقات زیادی برای تشخیص ساختار آن آغاز شد.

مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشاندهنده ساختار پیچ خورده فیبری شکل و بدون انشعاب است که قطر آنها معمولا در حدود ۱۲- ۷ نانومتر می باشد(۴).

کوهن و کالکینز[3] اولین بار آمیلوئید را با میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار دادند و سعی کردند به ویژگی های آن پی ببرند. خصوصیات اساسی فیبریل آمیلوئیدی را Shirahama و Cohen به طور جامع توضیح دادند. آنها فیبریل آمیلوئیدی را از سرم بیماران جدا کردند(فیبریل های تشکیل شده از پروتئین SAA یا زنجیره سبک ایمونوگلوبولین) و با میکروسکوپ الکترونی آن را مورد بررسی قرار دادند. آنها متوجه شدند که این فیبریل ها حدود ۷۵-۸۰A° قطر دارند و از پنج پروتوفیلامنت، که هر کدام ۲۵-۳۵A° قطر دارند، تشکیل شده اند. این پروتوفیلامنت ها به صورت موازی، در طول محور فیبریل و غیرمستقیم(حالت مارپیچ) در کنار یکدیگر آرایش یافته اند. هر پروتوفیلامنت از دو یا سه رشته تشکیل شده است که عرض هر کدام ۱۰-۱۵ A° می باشد که به صورت مارپیچ قرار گرفته اند. این رشته ها را زیرپروتوفیلامنت[4] می نامند. مطالعات میکروسکوپ الکترونی برای بررسی جنبه های مختلف ساختار فیبریل آمیلوئیدی بر روی پروتئین های دیگر انجام شد. یکی از این پروتئین ها که مورد بررسی قرار گرفت، ترانستیرتین(TTR) Val30Met است که از پروتئین های تولید کننده فیبریل آمیلوئیدی بیماریزای فامیلی[5] می باشد و از مایع زجاجیه چشم استخراج شده است. فیبریل های حاصل از این

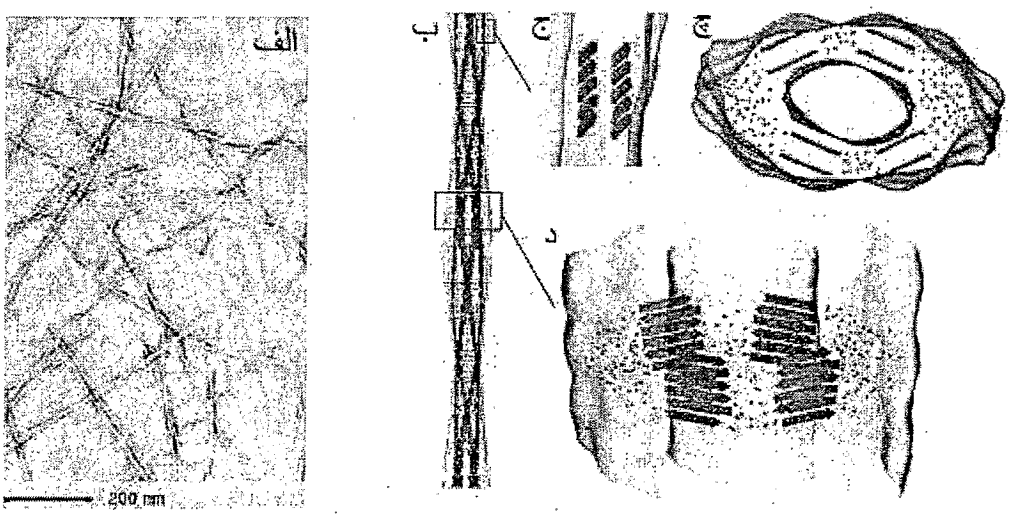
---

[1] Friedreich
[2] Kekule
[3] Cohen & Calkins
[4] sub-protofilament
[5] Familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)

پروتئین در برش عرضی مورد بررسی قرار گرفتند و مشاهده شد که قطر آن ها $120A^{\circ}$ است که از چهار پروتوفیلامنت با قطر $60A^{\circ}$ تشکیل شده است. این پروتوفیلامنت ها کم و بیش به صورت مستقیم(بدون آرایش مارپیچ گونه) و موازی با محور فیبریل آرایش یافته اند(۵).

بعد از این مطالعه، بر روی پروتئین های مختلف از خانواده FAP مطالعاتی انجام شد که نتایج آنها در جدول ۱ آورده شده است. همان طور که مشاهده می شود فیبریل های حاصل از پروتئین های مختلف می توانند ویژگی های کم و بیش متفاوتی داشته باشند(تفاوت در تعداد پروتوفیلامنت های فیبریل و نحوه آرایش آنها و قطر پروتوفیلامنت ها و فیبریل ها)(۵).

بررسی ساختاری آمیلوئیدها با پراش اشعه x نشان می دهد که در جهت محور فیبریل هر $4/7\ A^{\circ}$ یک ساختار تکرار می شود و در جهت عمود بر محور فیبریل هر $9/8\ A^{\circ}$ یک ساختار تکرار می شود که این از خصوصیات ساختار صفحات بتای متقاطع[1] است و زمانی امکان تشکیل این ساختار وجود دارد که دو یا چند صفحه بتا در فیبریل ها موجود باشد. مطالعات دقیق تر در این زمینه توسط سوند[2] و همکارانش بر روی شش نوع فیبریل متفاوت انجام شد و مشخص شد همه آنها از زیرساختارهایی تشکیل شده اند که



شکل ۱-۱) الف-تصویر میکروسکوپ الکترونی از فیبریل آمیلوئیدی. ب-ساختار یک فیبریل که از چند پروتوفیلامنت تشکیل شده است. ج-قرارگیری صفحات بتا در یک پروتوفیلامنت. چ-برش عرضی از یک فیبریل. د- نمای سه بعدی بخشی از یک فیبریل(۶).

[1] cross-β sheet structure
[2] Sunde

جدول۱-۱) ساختار چند فیبریل آمیلوئیدی(۵).

Amyloid protein	Fibril dimensions	Substructure
Serum amyloid A or Ig light chain	75–80 Å diameter	five 25–35 Å protofilaments in pentagonal array
Transthyretin (FAP)	130 Å diameter	four 50–60 Å protofilaments in square section array
Ab peptide	90 Å diameter	five or six 25–30 Å protofilaments in pentagonal or hexagonal array
Calcitonin	50–60 Å diameter	?
Prion	60–200 Å ribbons	flat assembly of ? protofilaments

پروتوفیلامنت[1] نامیده می شوند و این زیرساختارها متشکل از صفحات بتای متقاطع هستند(۴).

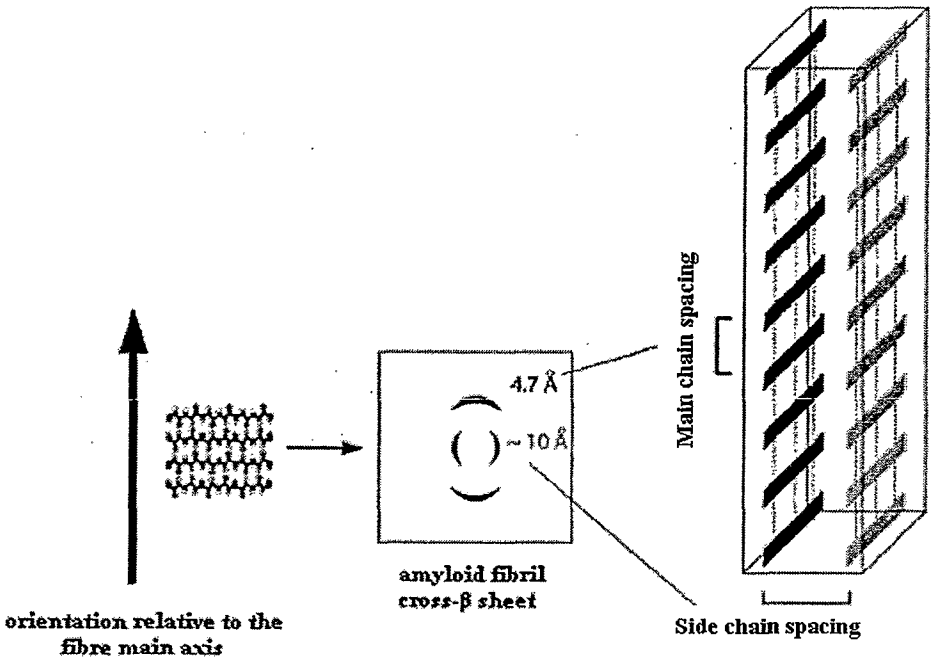
ویژگی این ساختار این است که در آن رشته های β در خلاف محور فیبریل(و جهت پیوندهای هیدروژنی به موازات محور فیبریل) قرار گرفته اند.

فاصله A° ۴/۷ در مطالعات پراش اشعه x که در بالا گفته شد، فاصله زنجیره های اصلی[2] نامیده می شود شود و معرف فاصله زنجیره های اصلی مجاور هم است، این فاصله در آمیلوئید های مختلف زیاد تغییر نمی کند، زیرا به موقعیت هندسی زنجیره های اصلی پپتید وابسته است، دامنه این تغییرات A° ۴/۸-۴/۶ می باشد. فاصله A° ۹/۸ در مطالعات پراش اشعه x که در بالا گفته شد، فاصله زنجیره های جانبی[3] نامیده می شود و بیانگر فاصله بین دو صفحه بتای مجاور هم است. از آن جایی که زنجیره های جانبی اسیدهای آمینه در صفحات بتا عمود بر این صفحات به سمت بیرون قرار می گیرند، این فاصله خیلی متغیر است و گستره آن A° ۱۲-۵ می باشد، به عبارت دیگر این فاصله به مقدار وان دروالس متوسط ریشه های اسید آمینه و توالی اسید آمینه ای در پلی پپتید بستگی دارد(۷).

از طرف دیگر طیف FTIR این ساختار با طیف حاصل از صفحات بتای پروتئین طبیعی متفاوت است. طیف FTIR در صفحات بتای پروتئین طبیعی در cm^{-1} ۱۶۳۰ یک باند آمید I'[4] پهن را نشان می دهد

[1] protofilament
[2] main chain spacing
[3] side-chain spacing
[4] amide I'

و در فیبریل های آمیلوئیدی یک باند آمید I' کم عرض تر در $1615\ cm^{-1}$ و یک پیک با شدت کمتر در $1684\ cm^{-1}$ نشان می دهد(این داده ها از مطالعه پروتئین transthyretin در حالت طبیعی و فیبریل



شکل۱-۲) نمایش شماتیک الگوهای پراش اشعهX در ساختار صفحات بتای متقاطع و نمایش ساختار پروتوفیلامنت بر اساس پراش اشعهX (صفحات بتا به صورت نوارهای سیاه و خاکستری و پیوندهای هیدروژنی به صورت خطوط نقطه چین نشان داده شده است)(۷).

شده به دست آمده است). از مطالعه بر روی صفحات بتا و فیبریل های آمیلوئیدی پروتئین های مختلف به این نتیجه رسیده اند که در فیبریل های آمیلوئیدی یک پیک آمید I' در گستره $1611cm^{-1}$ تا $1630cm^{-1}$ دیده می شود و در صفحات بتای پروتئین های طبیعی یک پیک آمید I' بین cm^{-1} ۱۶۳۰ و $1643cm^{-1}$ وجود دارد. هنوز تفاوت مولکولی بین صفحات بتای پروتئین های طبیعی و آمیلوئیدها که باعث تفاوت در طیف FTIR آنها میگردد، روشن نیست ولی چیزی که تاکنون معلوم شده این است که این صفحات در آمیلوئید میزان پیچش[1] نسبت به صفحات بتای پروتئین های طبیعی کمتر است(۷).

[1] twist

همچنین نتایج حاصل از مطالعات اشعهx و NMR بیانگر این نکته هستند که صفحات بتا در بیشتر آمیلوئیدها به طور موازی[1] قرار گرفته اند(۷).

۱-۲-۳- تشکیل فیبریل آمیلوئیدی

یکی از ویژگی های عمومی پروتئین ها تشکیل تجمع پروتئینی[2] است. تجمع پروتئینی می تواند به دو صورت باشد، تجمعات آمورف[3] و فیبریل آمیلوئیدی.

تجمع پروتئینی می تواند هم در بدن[4] و هم در شرایط آزمایشگاهی[5] تحت شرایط خاصی بوجود بیاید(۴).

مکانیسم روشنی برای چگونگی تشکیل جسم حجیم[6] گزارش نشده است. فینک[7] و همکارانش از طریق اسپکتروسکوپی FTIR پی بردند که در تشکیل جسم حجیم مولکول های پروتئین ساختار دوم شبیه حالت طبیعی دارند با این تفاوت که مقدار صفحات بتای آن افزایش یافته است(حدود ٪۲۵-۲۰) و از طریق صفحات بتا با هم تجمع پروتئینی(جسم حجیم) را تشکیل می دهند که در نهایت منجر به تشکیل تجمعات آمورف می شود. با وجود اینکه مکانیسم تشکیل تجمعات آمورف و فیبریل آمیلوئیدی متفاوت از هم هستند ولی در هر دو وجود یک حدواسط کونفورماسیونی که تا حدی آنفولد شده باشد، ضروری است. با آزمایش هایی که بر روی زنجیره سبک ایمونوگلوبولین[8] انجام شد، دو حدواسط که از لحاظ فولدینگ با هم متفاوت بودند شناخته شدند. این پروتئین را با اسید دناتوره کردند؛ در pH پایین تر از ۳ یک حدواسط کونفورماسیونی شکل گرفت که در نهایت منجر به تشکیل فیبریل آمیلوئیدی شد، در pH حدود ۶-۴ یک حدواسط کونفورماسیونی متفاوت از قبلی بوجود آمد که در نهایت منجر به تشکیل تجمعات آمورف شد. بر طبق این مشاهدات به این نتیجه رسیدند که در تشکیل جسم حجیم یک آنفولد شدن

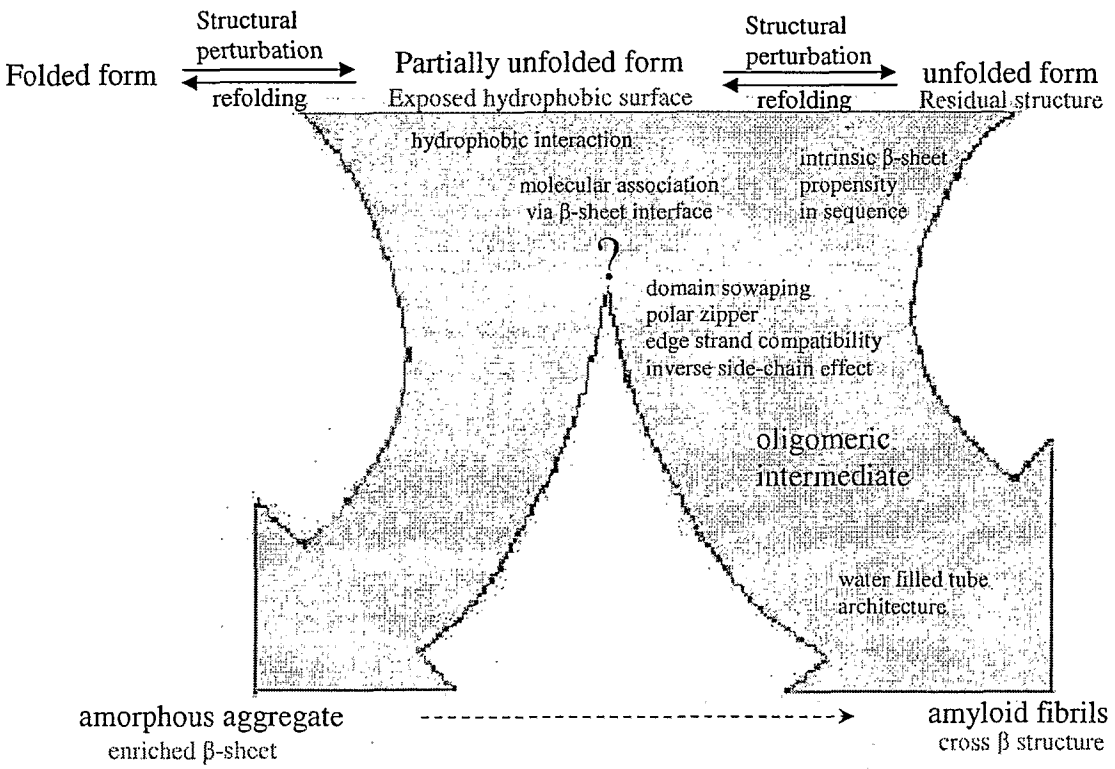
---

[1] parallel
[2] aggregation
[3] amorphous aggregation
[4] in vivo
[5] in vitro
[6] inclusion budy
[7] Fink
[8] V_L domain

ملایم(خفیف) روی می دهد اما در تشکیل فیبریل آمیلوئیدی آنفولدینگ شدیدتر است. این نتایج تائید می کنند که مکانیسم تشکیل فیبریل آمیلوئیدی و تجمعات آمورف متفاوت هستند(۴).

در تشکیل آمیلوئید ابتدا مولکول های پروتئین ناپایدار می شوند و سپس این مولکول های ناپایدار شده از طریق برهم کنش های هیدروفوب نواحی هیدروفوب که در سطح قرار گرفته اند و هم چنین برهم کنش سطوح صفحات بتا با هم تجمع کرده و تحت شرایط خاصی تشکیل ساختار صفحات بتای متقاطع می دهند ولی در تشکیل تجمعات آمورف مولکول های آنفولد شده جزئی(خفیف) که در آنها صفحات بتا افزایش یافته است، نقش دارند(۴).

گاهی تبدیل تجمعات آمورف به فیبریل آمیلوئیدی گزارش شده است که بیانگر این است که رشته های بتا در این تجمعات می توانند تغییر آرایش داده و طوری آرایش مجدد پیدا می کنند که سبب تشکیل فیبریل آمیلوئیدی شوند(۴).



شکل۱-۳) دیاگرام شماتیک تشکیل فیبریل آمیلوئیدی و تجمع آمورف در فرآیند سرشته شدن یک پروتئین(۴).