

صلى الله عليه وسلم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه
گاوزنگ - زنجان



اثر یون‌های فلزی بر تجمع پروتئین لیزوزیم و پتید آمیلوئید بتا

پایان نامه کارشناسی ارشد

زهرا عباسخانی

استاد راهنما: دکتر سعید عمادی

بهمن ۱۳۹۳

تقدیم ہے

پدر نزر کو ارم

وما در مہربانم

شکر و قدردانی

ماحصل آموخته‌هایم را تقدیم می‌کنم به آنان که مهر آسمانی‌شان آرام بخش آلام زمینی ام است

به استوارترین تکیه‌گاهم، دستان پر مهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم، چشمان سبز مادرم

که هرچه آموختم در کتب عشق شما آموختم و هرچه بگوختم قطره‌ای از دریای بی‌کران مهربانیتان را پاس نتوانم بگویم.
امروز هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ به‌شتم رضای شما. آوردی گران سنگ ترا از این ارزان گذاشتم تا به خاک
پایان نثار کنم، باشد که حاصل تلاشم نسیم کوزه غبار خستگیان را بروداید.

بوسه بردستان پر مهرتان

از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر سعید عادی که طی مراحل تحقیق و تدوین همراه و راهنمای من بودند، بسیار سپاسگزار و
ممنونم.

از اساتید محترم سرکار خانم دکتر عطیه مهدوی، جناب آقای دکتر حمید بادی علیچانوند و جناب آقای دکتر مهرداد پدرام
به خاطر تقبل زحمت داوری این پایان نامه بسیار شکرگرم.

از گروه شیمی تجزیه دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، مرکز تحقیقاتی یوشیمی - یوفیزیک دانشگاه تهران و دانشکده
فیزیک دانشگاه صنعتی شریف به خاطر استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی صمیمانه شکر و قدردانی می‌کنم.

چکیده

تجمع پروتئین‌ها در پژوهش‌های بیوشیمیایی، بیوتکنولوژی و در مطالعه‌ی بیماری‌های انسانی اهمیت زیادی دارد. علی‌رغم بررسی‌های گسترده بر روی نحوه تشکیل تجمع‌های آمیلوئیدی هنوز مکانیسم آن ناشناخته است. شواهد اساسی نشان می‌دهد که یون‌های فلزی مثل آهن، مس، روی و آلومینیوم در بروز بیماری‌های تحلیل برنده عصبی نقش دارند. در این پژوهش، تأثیر غلظت‌های مختلف یون‌های فوق بر تشکیل تجمع‌های آمیلوئیدی تحت شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است. در این مطالعه، از روش طیف‌سنجی فلورسانس با استفاده از تایوفلاوین تی و میکروسکوپ نیروی اتمی برای بررسی اثر یون‌های فلزی مس، آهن، آلومینیوم و روی بر تشکیل تجمع‌های آمیلوئیدی از پپتید آمیلوئید بتا، پس از انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که غلظت‌های مختلف یون‌های فلزی مختلف تأثیر متفاوتی بر تشکیل تجمع‌های آمیلوئیدی دارد. غلظت مولار مساوی و غلظت بالای استوکیومتری یون مس باعث کاهش شدت فلورسانس و بنابراین مانع شکل‌گیری فیبریل می‌شود در حالی که غلظت پایین استوکیومتری باعث افزایش شدت فلورسانس و شکل‌گیری فیبریل می‌شود. اما در مورد یون آهن، غلظت مولار مساوی، غلظت‌های پایین و بالای استوکیومتری باعث افزایش طیف فلورسانس آمیلوئید بتا و افزایش شکل‌گیری تجمع‌های آمیلوئیدی می‌شود. یون روی نیز با افزایش غلظت منجر به کاهش در نشر فلورسانس و کاهش شکل‌گیری فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌شود. یون آلومینیوم نیز با افزایش غلظت منجر به افزایش در نشر فلورسانس و افزایش شکل‌گیری تجمع‌های آمیلوئیدی می‌شود. تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی با نتیجه‌های حاصل از فلورسانس مطابقت دارد.

در مطالعه‌ی سینتیک تشکیل تجمع‌های آمیلوئیدی از پروتئین لیزوزیم استفاده شد. در این مطالعه از دو روش طیف‌سنجی فلورسانس تایوفلاوین تی و طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی استفاده شد و شرایط مورد نیاز برای تشکیل تجمع‌های پروتئینی (۲ pH و دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد) فراهم گردید. نتیجه‌های فلورسانس تایو فلاوین تی نشان داد که افزایش در مدت زمان انکوباسیون نمونه‌های لیزوزیم باعث افزایش در نشر فلورسانس و افزایش شکل‌گیری تجمع‌های آمیلوئیدی می‌شود. نتیجه‌های بدست آمده از طیف CD نیز نشان داد که افزایش مدت زمان انکوباسیون، تشکیل تجمع‌های پروتئینی با ساختار بتا را افزایش می‌دهد. بررسی اثر یون‌های فلزی روی سینتیک شکل‌گیری تجمع‌های آمیلوئیدی نشان داد که هر سه یون فلزی مس، روی و آلومینیوم باعث تسریع شکل‌گیری تجمع‌های آمیلوئیدی می‌شوند. نتایج حاصل نشان داد که یون‌های فلزی بیشتر روی مرحله‌ی تأخیر رشد فیبریل‌های آمیلوئیدی تأثیر دارند و منجر به توقف رشد فیبریل در این مرحله می‌شوند.

کلمات کلیدی: بیماری آلزایمر، پپتید آمیلوئید بتا، پروتئین لیزوزیم، تشکیل تجمع، طیف دورنگ‌نمایی دورانی، طیف فلورسانس، میکروسکوپ نیروی اتمی و یون‌های فلزی.

فهرست

ح	فهرست شکل‌ها
ذ	فهرست طیف‌ها
ر	فهرست جدول‌ها
ز	فهرست نمودارها
شماره صفحه	عنوان

فصل اول: مقدمه

۱	۱.۱ ساختار پروتئین و مکانیسم تاخوردگی پروتئین
	۲.۱ اهمیت بد تاخوردگی پروتئین در تشکیل تجمع‌های پروتئینی و بیماری‌های تحلیل سلول عصبی
۴
۶	۳.۱ مکانیسم تشکیل تجمع‌های پروتئینی
۹	۴.۱ پروتئین لیزوزیم
۹	۱.۴.۱ آمیلوئیدزایی سیستمیک غیر عصبی
۹	۲.۴.۱ ساختار و عملکرد لیزوزیم
۱۱	۳.۴.۱ لیزوزیم به عنوان مدلی برای مطالعه‌ی تشکیل تجمع‌های پروتئینی
	۵.۱ پپتید بتا آمیلوئید (A β)، به عنوان یکی از مهمترین پروتئین‌های مستعد تشکیل تجمع‌های آمیلوئیدی
۱۲
۱۲	۱.۵.۱ بیماری آلزایمر و پپتید آمیلوئید (A β)
۱۵	۲.۵.۱ پروتئین پیش ساز آمیلوئید بتا (APP)
۱۶	۳.۵.۱ فرایند پردازش و پروتئولیز APP
۱۷	۴.۵.۱ آلفا سكرتاز
۱۷	۵.۵.۱ بتا سكرتاز
۱۸	۶.۵.۱ گاما سكرتاز
۱۹	۶.۱ مکانیسم الیگومریزه شدن و شکل‌گیری فیبریل‌های A β ۱-۴۰ و A β ۱-۴۲
۲۳	۷.۱ فرضیه آبخار آمیلوئیدی

۲۴	۸.۱ یون‌های فلزی و بیماری‌های تحلیل برنده عصبی.....
۲۵	۹.۱ یون‌های فلزی و فرایند بد تاخوردگی پروتئین.....
۲۷	۱۰.۱ یون مس و بیماری آلزایمر.....
۲۹	۱۱.۱ یون آهن و بیماری آلزایمر.....
۲۹	۱۲.۱ یون آلومینیوم و بیماری آلزایمر.....
۳۰	۱۳.۱ یون روی و بیماری آلزایمر.....
۳۱	۱۴.۱ روش‌های آشکارسازی فیبریل‌های آمیلوئیدی.....
۳۱	۱.۱۴.۱ طیف سنجی فلورسانس در حضور تایوفلاوین تی (ThT).....
۳۲	۱.۱.۱۴.۱ ساختار و عمل تایوفلاوین تی.....
۳۳	۲.۱۴.۱ طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD).....
۳۴	۳.۱۴.۱ میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) و مطالعه فیبریل‌های آمیلوئیدی.....

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۳۷	۱.۲ مواد.....
۳۸	۲.۲ دستگاه‌ها.....
۳۸	۳.۲ روش تهیهی محلول‌ها.....
۳۸	۱.۳.۲ محلول‌های بافری.....
۳۹	۲.۳.۲ محلول پپتید ۴۲- $A\beta 1$ با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر.....
۳۹	۳.۳.۲ محلول لیزوزیم.....
۴۰	۴.۳.۲ محلول تایوفلاوین تی.....
۴۰	۵.۳.۲ تهیه محلول ۱ میلی‌مولار کلراید مس، کلراید آهن، کلراید آلومینیوم و کلراید روی.....
۴۰	۴.۲ روش‌های مطالعهی تجمع‌های پروتئینی.....
۴۰	۱.۴.۲ تجمع‌های آمیلوئیدی ۴۲- $A\beta 1$
۴۰	۱.۱.۴.۲ بررسی اثر غلظت بر روی تجمع‌های آمیلوئیدی ۴۲- $A\beta 1$
	۲.۱.۴.۲ بررسی تجمع آمیلوئیدی ۴۲- $A\beta 1$ در غلظت‌های مختلف نمک کلراید مس، کلراید آهن، کلراید آلومینیوم و کلراید روی.....
۴۰	۳.۱.۴.۲ بررسی تجمع آمیلوئیدی ۴۲- $A\beta 1$ در حضور مخلوطی از یون‌های فلزی به صورت

هم‌زمان	۴۱
۲.۴.۲ آماده‌سازی لیزوزیم جهت تشکیل تجمع‌های پروتئینی	۴۱
۱.۲.۴.۲ اثر زمان انکوباسیون بر روی تجمع‌های آمیلوئیدی پروتئین لیزوزوزیم	۴۱
۲.۲.۴.۲ اثر زمان انکوباسیون بر روی تجمع‌های آمیلوئیدی پروتئین لیزوزوزیم در حضور	
یون‌های فلزی (مس، آهن، آلومینیوم و روی)	۴۱
۵.۲ روش‌های آشکارسازی تجمع‌های آمیلوئیدی	۴۲
۱.۵.۲ آشکارسازی تجمع‌های آمیلوئیدی با استفاده از روش طیف‌سنجی فلوروسانس در حضور	
ThT	۴۲
۱.۱.۵.۲ آشکارسازی تجمع‌های آمیلوئیدی $A\beta_{1-42}$	۴۲
۲.۱.۵.۲ آشکارسازی تجمع‌های آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم	۴۲
۲.۵.۲ آشکارسازی تجمع‌های آمیلوئیدی پپتید $A\beta_{1-42}$ با استفاده از میکروسکوپ نیروی	
اتمی	۴۳
۳.۵.۲ بررسی ساختار تجمع‌های آمیلوئیدی لیزوزیم با استفاده از روش طیف‌بینی دورنگ‌نمایی	
دورانی	۴۳

فصل سوم: نتیجه‌گیری و بحث

۱.۳ تشکیل تجمع‌های آمیلوئیدی بتا ۴۲ به تنهایی	۴۴
۱.۱.۳ طیف‌سنجی فلوروسانس در حضور ThT	۴۴
۲.۱.۳ روش میکروسکوپ نیروی اتمی	۴۵
۲.۳ تجمع‌های آمیلوئیدی $A\beta_{1-42}$ در حضور یون‌های فلزی مس، آهن روی و آلومینیوم	۴۶
۱.۲.۳ اثر مس	۴۶
۱.۱.۲.۳ طیف‌سنجی فلوروسانس در حضور ThT	۴۶
۲.۱.۲.۳ میکروسکوپ نیروی اتمی	۴۷
۳.۱.۲.۳ نتیجه‌گیری	۴۹
۲.۲.۳ اثر آهن	۵۰
۱.۲.۲.۳ طیف‌سنجی فلوروسانس در حضور ThT	۵۰
۲.۲.۲.۳ میکروسکوپ نیروی اتمی	۵۱

۵۲ نتیجه گیری ۳.۲.۲.۳
۵۳ اثر آلومینیوم ۳.۲.۳
۵۳ طیف سنجی فلورسانس در حضور ThT ۱.۳.۲.۳
۵۵ میکروسکوپ نیروی اتمی ۲.۳.۲.۳
۵۶ نتیجه گیری ۳.۳.۲.۳
۵۶ اثر روی ۴.۲.۳
۵۶ طیف سنجی فلورسانس در حضور ThT ۱.۴.۲.۳
۵۷ میکروسکوپ نیروی اتمی ۲.۴.۲.۳
۵۹ نتیجه گیری ۳.۴.۲.۳
۵۹ تجمع های آمیلوئیدی $A\beta_{1-42}$ در حضور یون های فلزی متعدد به صورت هم زمان ۳.۳
۵۹ طیف سنجی فلورسانس در حضور ThT ۱.۳.۳
۶۰ میکروسکوپ نیروی اتمی AFM ۲.۳.۳
۶۲ نتیجه گیری ۳.۳.۳
۶۳ تشکیل تجمع های پروتئینی توسط لیزوزیم ۴.۳
۶۳ طیف سنجی فلورسانس در حضور ThT ۱.۴.۳
۶۶ نتیجه های طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی ۲.۴.۳
۶۷ نتیجه گیری ۳.۴.۳
 ۵.۳ تجمع های آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم در حضور یون های فلزی مس، آهن، روی و
۶۸ آلومینیوم ۱.۵.۳
۶۸ اثر مس ۱.۵.۳
۶۸ طیف سنجی فلورسانس در حضور ThT ۱.۱.۵.۳
۷۰ نتیجه های طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی ۲.۱.۵.۳
۷۰ نتیجه گیری ۳.۱.۵.۳
۷۱ اثر روی ۲.۵.۳
۷۱ طیف سنجی فلورسانس در حضور ThT ۱.۲.۵.۳
۷۲ نتیجه های طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی ۲.۲.۵.۳
۷۳ نتیجه گیری ۳.۲.۵.۳

۷۳	۳.۵.۳ اثر آلومینیوم
۷۳	۱.۳.۵.۳ طیف‌سنجی فلورسانس در حضور ThT
۷۴	۲.۳.۵.۳ نتیجه‌های طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی
۷۵	۳.۳.۵.۳ نتیجه‌گیری
۷۶	۴.۵.۳ اثر آهن
۷۶	۶.۳ بحث و نتیجه‌گیری نهایی
۷۹	۷.۳ مطالعات آینده
۸۰	مراجع
۸۸	واژنامه فارسی به انگلیسی
۹۴	واژنامه انگلیسی به فارسی

شکل ها

عنوان	شماره صفحه
شکل ۱-۱ شمایی از ساختار پروتئین.....	۲
شکل ۲-۱ شمایی از انرژی تا خوردگی پروتئین.....	۳
شکل ۳-۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی از ریخت شناسی تجمع های پروتئینی.....	۶
شکل ۴-۱ سینتیک شکل گیری فیبریل.....	۸
شکل ۵-۱ نمایش ساختار سه بعدی لیزوزیم سفیده تخم مرغ.....	۱۰
شکل ۶-۱ ساختار اول لیزوزیم.....	۱۱
شکل ۷-۱ نشانه های آسیب شناختی بیماری آلزایمر.....	۱۴
شکل ۸-۱ توالی آمینواسیدی پپتیدهای آمیلوئید بتا.....	۱۵
شکل ۹-۱ تردد درون سلولی APP.....	۱۶
شکل ۱۰-۱ مسیر تولید آمیلوئید بتا.....	۱۹
شکل ۱۱-۱ مکانسیم الیگومریزه شدن و شکل گیری فیبریل برای $A\beta_{1-42}$ و $A\beta_{1-40}$	۲۱
شکل ۱۲-۱ شمایی از مونومر $A\beta_{1-40}$ در فیبریل.....	۲۲
شکل ۱۳-۱ تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از ریخت شناسی فیبریل.....	۲۳
شکل ۱۴-۱ مکانسیم های بالقوه که در آن یون فلزی می تواند در شکل گیری فیبریل اختلال ایجاد کند.....	۲۶
شکل ۱۵-۱ ریشه های اسید آمینه ای که به $A\beta_{1-42}$ را که به یون مس متصل می شود.....	۲۸
شکل ۱۶-۱ کنوردینه شدن یون های فلزی مس، آهن و روی با پپتید آمیلوئید بتا.....	۳۱
شکل ۱۷-۱ ساختار شیمیایی تایوفلاوین تی.....	۳۲
شکل ۱۸-۱ افزایش فلورسانس تایوفلاوین تی پس از اتصال به فیبریل های آمیلوئیدی.....	۳۳
شکل ۱۹-۱ طیف CD پلی لیزین به حالت مارپیچ آلفا، کانفوماسیون بتا و پیچه نامنظم.....	۳۴
شکل ۲۰-۱ شمایی کلی از اجزای AFM.....	۳۵
شکل ۱-۳ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع های پپتید $A\beta_{1-42}$	۴۵

شکل ۳-۲ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور غلظت	
۰/۵ میکرومولار یون مس.....	۴۸
شکل ۳-۳ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور غلظت ۱	
میکرومولار یون مس.....	۴۸
شکل ۳-۴ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور غلظت	
۲ میکرومولار یون مس.....	۴۸
شکل ۳-۵ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور غلظت	
۰/۵ میکرومولار یون آهن.....	۵۱
شکل ۳-۶ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور غلظت	
۱ میکرومولار یون آهن.....	۵۱
شکل ۳-۷ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور غلظت	
۲ میکرومولار یون آهن.....	۵۲
شکل ۳-۸ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور غلظت	
۰/۵ میکرومولار یون آلومینیوم.....	۵۴
شکل ۳-۹ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور غلظت	
۱ میکرومولار یون آلومینیوم.....	۵۵
شکل ۳-۱۰ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور غلظت	
۲ میکرومولار یون آلومینیوم.....	۵۵
شکل ۳-۱۱ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور غلظت	
۰/۵ میکرومولار یون روی.....	۵۸
شکل ۳-۱۲ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور غلظت	
۱ میکرومولار یون روی.....	۵۸
شکل ۳-۱۳ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور غلظت	
۲ میکرومولار یون روی.....	۵۸
شکل ۳-۱۴ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور	
آهن+مس.....	۶۱

شکل ۳-۱۵ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور

آلومنیوم+روی..... ۶۱

شکل ۳-۱۶ تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از تجمع‌های پتید $A\beta_{1-42}$ در حضور

مس+روی..... ۶۲

طیف‌ها

عنوان	شماره صفحه
طیف ۱-۳ تشکیل تجمع آمیلوئیدی ۱-۴۲ $A\beta$ در غلظت ۱ میکرومولار.....	۴۵
طیف ۲-۳ طیف‌های CD مربوط به انکوباسیون محلول لیزوزیم در زمان‌های مختلف.....	۶۶
طیف ۳-۳ طیف‌های CD مربوط به اثر مس بر تشکیل تجمع‌های لیزوزیم.....	۷۰
طیف ۴-۳ طیف‌های CD مربوط به اثر روی بر تشکیل تجمع‌های لیزوزیم.....	۷۳
طیف ۵-۳ طیف‌های CD مربوط به اثر آلومینیوم بر تشکیل تجمع‌های لیزوزیم.....	۷۵

جدول‌ها

عنوان	شماره صفحه
جدول ۱-۲ مشخصات مواد زیستی و شیمیایی مورد استفاده.....	۳۷
جدول ۲-۲ مشخصات دستگاه‌های مورد استفاده.....	۳۸
جدول ۲-۳ نسبت غلظت یون‌های فلزی به $\beta 1-AF1$	۴۱
جدول ۱-۳ ابعاد تجمع‌های بدست آمده از تصویرهای AFM پتید آمیلوئید بتا ۴۲ به	
تنهایی.....	۴۶
جدول ۲-۳ ابعاد تجمع‌های آمیلوئیدی بتا ۴۲ در غلظت‌های مختلف مس.....	۴۹
جدول ۳-۳ ابعاد تجمع‌های آمیلوئیدی بتا ۴۲ در غلظت‌های مختلف آهن.....	۵۲
جدول ۴-۳ ابعاد تجمع‌های آمیلوئیدی بتا ۴۲ در غلظت‌های مختلف آلومینیوم.....	۵۵
جدول ۵-۳ ابعاد تجمع‌های آمیلوئیدی بتا ۴۲ در غلظت‌های مختلف روی.....	۵۹
جدول ۶-۳ ابعاد تجمع‌های آمیلوئیدی بتا ۴۲ در حضور یون‌های آهن+مس، مس+روی و	
آلومینیوم+روی.....	۶۲
جدول ۷-۳ درصد ماریپیچ آلفا در ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر را در نمونه‌های لیزوزیم در زمان‌های	
انکوباسیون مختلف.....	۶۷

نمودارها

عنوان	شماره صفحه
نمودار ۱-۳ اثر غلظت بر تجمع‌های آمیلوئیدی پپتید $A\beta_{1-42}$	۴۴
نمودار ۲-۳ تأثیر غلظت‌های مختلف $Cu(II)$ بر شکل‌گیری تجمع‌های آمیلوئیدی از $A\beta_{1-42}$	۴۷
نمودار ۳-۳ تأثیر غلظت‌های مختلف $Fe(III)$ بر شکل‌گیری تجمع‌های آمیلوئیدی از $A\beta_{1-42}$	۵۰
نمودار ۴-۳ تأثیر غلظت‌های مختلف $Al(III)$ بر شکل‌گیری تجمع‌های آمیلوئیدی از $A\beta_{1-42}$	۵۳
نمودار ۵-۳ تأثیر غلظت‌های مختلف $Zn(II)$ بر شکل‌گیری تجمع‌های آمیلوئیدی از $A\beta_{1-42}$	۵۷
نمودار ۶-۳ اثر آهن + مس، آلومینیوم + روی و مس + آهن بر شکل‌گیری تجمع‌های آمیلوئیدی از $A\beta_{1-42}$	۶۰
نمودار ۷-۳ اثر زمان انکوباسیون بر روی تجمع‌های آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم.....	۶۵
نمودار ۸-۳ نمودار استاندارد ThT فلورسانس برای پروتئین لیزوزیم در زمان‌های انکوباسیون متفاوت.....	۶۵
نمودار ۹-۳ بررسی اثر مس بر تجمع‌های آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم.....	۷۰
نمودار ۱۰-۳ بررسی اثر روی بر تجمع‌های آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم.....	۷۲
نمودار ۱۱-۳ بررسی اثر آلومینیوم بر تجمع‌های آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم.....	۷۴

فصل اول

مقدمه

۱.۱ ساختار پروتئین و مکانیسم تاخوردگی^۱ پروتئین

پروتئین‌ها اجزای اصلی سلول‌های زنده هستند، که نقش مهمی را در حفظ حیات دارند و عملکرد غیر طبیعی آن‌ها می‌تواند شرایط مختلف بیماری‌زایی را به وجود آورد [۱]. پروتئین‌ها در سلول، بر روی ارگانل‌هایی که تحت عنوان ریبوزوم^۲ نام دارند، از روی اطلاعات موجود در RNA سنتز می‌شوند که این فرایند تحت عنوان ترجمه^۳ نامیده می‌شود. انواع مختلفی از پروتئین‌ها در سلول وجود دارد که فرایندهای شیمیایی مختلفی را تحریک و یا کنترل می‌کنند. پروتئین‌هایی که درون یک سلول ساخته می‌شود پروتئوم^۴ آن سلول را تشکیل می‌دهند. این تنوع گسترده در پروتئین‌ها، فقط از ۲۰ آمینواسید مختلف حاصل می‌شود و هر پروتئینی توالی آمینواسیدی خاصی دارد. توالی سنتز شده ساختار اول^۵ پروتئین نام دارد و با تغییرهای ساختاری دیگر، ساختار دوم^۶، ساختار سوم^۷ و در بعضی موارد ساختار چهارم^۸ تشکیل می‌شود [۲].

پیکربندی^۹ طبیعی پروتئین‌ها به طور کلی شامل موتیف‌های^{۱۰} به شدت منظم و تکرارشونده‌ای هستند که ساختارهای دوم نام دارند. تقریباً ۵۰ درصد از ساختار کلی همه‌ی پروتئین‌ها را ساختار دوم آن‌ها تشکیل می‌دهند. ساختار دوم بیشتر شامل مارپیچ آلفا^{۱۱} و صفحات بتا^{۱۲} هستند که توسط الگوی پیوند هیدروژنی بین پروتون آمین^{۱۳} (اتم هیدروژن متصل به نیتروژن پیوند پپتیدی^{۱۴}) و اکسیژن گروه کربونیل^{۱۵} (اتم اکسیژن متصل به اتم کربن صفحه‌ی پیوند پپتیدی) مشخص می‌شوند. برای این‌که پروتئین عملکرد طبیعی خود را داشته باشد، باید تا بخورد و ساختار سوم آن شکل بگیرد که از طریق

¹ Folding

² Ribosome

³ Translation

⁴ Proteome

⁵ Primary structure

⁶ Secondary structure

⁷ Tertiary structure

⁸ Quaternary structure

⁹ Conformation

¹⁰ Motifs

¹¹ α - Helix

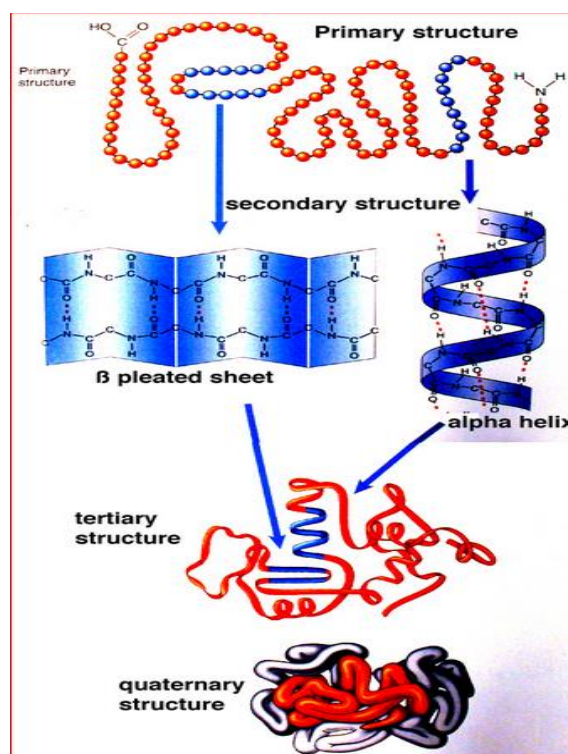
¹² β -sheet

¹³ Amine proton

¹⁴ Peptide bond

¹⁵ Carbonyl group

میان‌کنش‌های غیرکوالان آب‌گریز^۱، پیوندهای هیدروژنی، پیوندهای یونی^۲ و پیوند کوالان دی‌سولفید^۳ این فرم فعال از نظر عملکرد زیستی شکل می‌گیرد. برخی پروتئین‌ها دارای دو یا چند زنجیر پلی‌پپتیدی هستند که ممکن است مشابه و یا متفاوت باشند. آرایش این زنجیرهای پلی‌پپتیدی در کمپلکس‌های سه بعدی، ساختار چهارم را ایجاد می‌کند [۳ و ۲]. (شکل ۱-۱) [۴].

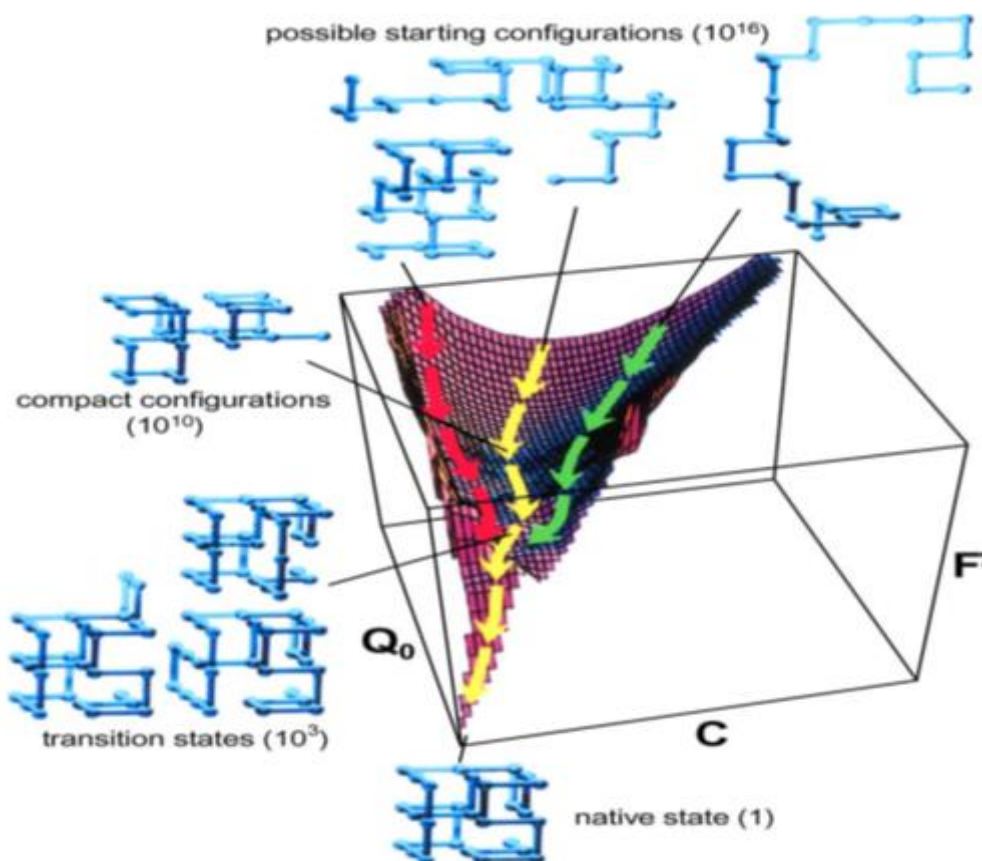


شکل ۱-۱ شمایی از ساختار پروتئین [۴].

آغاز فرایند تاخوردگی و بدست آمدن ساختار سوم همراه با فرایند ترجمه است یعنی قبل از این‌که سنتز پروتئین کامل شود و در حالی که زنجیر پلی‌پپتید متصل به ریبوزوم است آغاز می‌شود. اما بخش عمده‌ای از فرایند تاخوردگی، بعد از سنتز کامل پروتئین و رها شدن آن از ریبوزوم، در سیتوپلاسم و در مناطق خاصی مثل میتوکندری، شبکه‌ی اندوپلاسمی و یا بعد از انتقال از غشا صورت می‌گیرد. پروتئین‌هایی که چپرون‌های مولکولی^۴ نامیده می‌شوند در تاخوردگی صحیح پروتئین نقش دارند و مانع تشکیل پروتئین‌های بدتاخورده^۵ می‌شوند [۵].

¹ Hydrophobic interactions
² Ionics bonds
³ Disulfide bonds
⁴ Molecular chaperones
⁵ Misfolding Proteins

مکانسیم تاخوردگی پروتئین هنوز به طور کامل شناخته نشده است. شواهد زیادی وجود دارد که حالت طبیعی پروتئین مطابق با ساختاری است که در شرایط فیزیولوژیک بسیار پایدار است. شمار پیکربندی‌های ممکن برای یک زنجیر پلی‌پپتید بسیار زیاد است. به هنگام تاخوردگی ریشه‌های آمینواسیدی که دور از هم قرار گرفته‌اند، در تماس با یکدیگر قرار می‌گیرند و چون برهم‌کنش‌های صحیح بین ریشه‌ها پایدارتر از برهم‌کنش‌های غیرصحیح بین آن‌ها است بنابراین با توجه به چنین مکانسمی، زنجیر پلی‌پپتید، ساختاری با کمترین انرژی را طی فرایند آزمون و خطا پیدا می‌کند. این فرایند برای توالی‌های ویژه‌ای که در طی تکامل انتخاب شده‌اند تا به ساختارهای کروی تا بخورند بسیار مؤثر است و در واقع شمار بسیار کمی از کل پیکربندی‌های احتمالی در طی فرایند تاخوردگی جستجو می‌شوند. تشریح این‌گونه از تاخوردگی پروتئین با مفهوم "چشم‌انداز انرژی"^۱ تعریف می‌شود و اشاره دارد که انرژی آزاد زنجیر پلی‌پپتید تابعی از پیکربندی آن است. شکل (۱-۲) [۵].



شکل ۱-۲ شمایی از انرژی برای تاخوردگی پروتئین. شبیه‌سازی رایانه‌ای تاخوردگی پروتئین با ۲۷ آمینواسید. انرژی آزاد سیستم (F)، شمار کل تماس‌ها بین ریشه‌ها (C)، شمار تماس‌هایی که پایدارترین حالت را دارند (Q) [۵].

¹ Energy landscape

۲.۱ اهمیت بدتاخوردگی پروتئین در تشکیل تجمع‌های^۱ پروتئینی و بیماری‌های تحلیل برنده عصبی^۲

متأسفانه عملکرد غیر طبیعی پروتئین‌ها می‌تواند باعث ایجاد بیماری‌های مختلف شود. در واقع طیف گسترده‌ای از بیماری‌های انسان، ناشی از تغییرات پیکربندی و بدتاخوردگی پروتئین هستند که به علت نقص در پروتئین یا پپتیدی که عملکرد طبیعی دارد ایجاد می‌شود. برهم‌کنش‌های نابجا و نادرست با تعدادی از فاکتورها و عوامل درونی مثل چپرون‌ها، بستر درون سلولی^۳ و بستر خارج سلولی^۴، دیگر پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچک باعث افزایش گرایش به بدتاخوردگی پروتئین می‌شود. بدتاخوردگی پروتئین می‌تواند ناشی از جهش نقطه‌ای^۵، در معرض قرار گرفتن ترکیبات سمی، اختلال در تغییرات بعد از ترجمه (مثل فسفریله شدن^۶، گلیکوزیله شدن^۷ و آمیدزدایی کردن^۸ و غیره)، از دست رفتن الگوی اتصال، آسیب اکسیداتیو^۹ و یا در اثر شرایط محیطی مانند دما و pH باشد که این عوامل می‌توانند مستقل از هم یا در ارتباط با یکدیگر عمل نمایند [۱].

بیماری‌های ناشی از بدتاخوردگی پروتئین می‌توانند در یک بافت و یا در چندین بافت خود را نشان دهند. بزرگترین گروه از بیماری‌های ناشی از تاخوردن نادرست پروتئین‌ها مربوط است به تبدیل پپتید یا پروتئین‌های خاص از حالت محلول و فعال به تجمع‌های نامحلول فیبریل مانند بسیار منظم و سازمان یافته. این ساختارها در صورت تجمع در محیط خارج سلولی عموماً تحت عنوان فیبریل‌های آمیلوئیدی یا پلاک توصیف می‌شوند، در حالی که برای تجمع‌های درون سلول اصطلاح اجزای درون سلولی^{۱۰} پیشنهاد شده است [۱ و ۶]. بیماری‌های ناشی از بدتاخوردگی پروتئین شامل اختلال‌های متعدد عصبی (مانند آلزایمر^{۱۱}، پارکینسون^{۱۲}، هانتینگتون^{۱۳} و غیره) و آمیلوئیدی شدن سیستمی ارثی^{۱۴} (مثل آمیلوئیدی شدن لیزوزیم، آمیلوئیدی شدن جلسولین^{۱۵}، آمیلوئیدی شدن ناشی از دیالیز) هستند. بنابراین در هر یک از حالت‌های بیماری‌زایی تغییر در یک پروتئین و یا یک پپتید خاص، باعث

¹ Aggregation

² Neurodegenerative

³ Intracellular matrix

⁴ Extracellular matrix

⁵ Point mutation

⁶ Phosphorylation

⁷ Glycosylation

⁸ Deamidation

⁹ Oxidative damage

¹⁰ Intracellular inclusion bodies

¹¹ Alzheimer

¹² Parkinson

¹³ Huntington

¹⁴ Hereditary systemic amyloidosis

¹⁵ Gelsolin