فصل اول : کلیات

۱-۱ بخش اول: میکروتوبول و توبولین

۱-۱-۱) مقدمه ای بر میکروتوبول

میکروتوبول ها پلیمرهای غیرکوالانتی از پروتئین توبولین هستند که در کلیه سلول های تقسیم شونده یوکاریوتی و اغلب انواع سلول های تمایزیافته وجود دارند. در طول تقسیم سلولی مجموعه منظم دینامیکی بلندی از میکروتوبول ها به نام دوک میتوزی وارد عمل شده و باعث تفکیک فیزیکی کروموزوم ها و تقسیم سلولی می شوند. در سلول های غیر تقسیم شونده میکروتوبول ها سیتوپلاسم را شکل می دهند و موقعیت هسته و اندامک های درون سلولی را سر و سامان می دهند و حتی در ساختار تاژک و مژک عنصر اصلی در شکل گیری ساختار آن هستند. میکروتوبول ها پلیمرهای محکمی هستند که نسبت به خم شدن و یا فشرده شدن مقاومند. خواص مکانیکی مجموعه میکروتوبول ها و فیلامان های اکتینی و حد واسط باعث شکل و استحکام سیتوپلاسم شده و واژه اسکلت سلولی را برای آنها توجیه میکند. هر چند این واژه به اشتباه تصور یک ساختار استاتیک و ثابت را در ذهن تلقی میکند، اما پلیمرهای شبکه اسکلتی در واقع همگی دارای دینامیک بوده و متحرکند و قابلیت پلیمرشدن و دپلیمر شدن و حرکت در سیتوپلاسم در طول زمان و ثانیه تا دقیقه را دارا هستند. خواص دینامیکی میکروتوبول ها با تصور سیتولوژیست های اولیه، دوک تقسیم میتوز ترکیبی از عناصر میله ای است که در واحد زمان در کنار هم قرار می گیرند، کاملا متفاوت است. اولین دلیلی که دوک میتوزی شامل عناصر خطی میله ای و دینامیک است، اولین بار با اختراع میکروسکوپ پلاریزان به وجود آمد که اجازه مشاهده میکروتوبول های سلول های زنده را بوجود آورد. این روش همچنین جهت نشان دادن اهمیت دینامیک میکروتوبول ها در طی پلیمریزاسیون آنها نیز مورد استفاده قرار گرفت.

زیر واحدهای میکروتوبول که شامل هتردایمر آلفا و بتا هستند اولین بار با استفاده از تمایل آنها به کلشی سین که یکی از داروهای ضد سرطان با منشا طبیعی برای هدف قرار دادن میتوز است خالص و جداسازی شد. مطالعات بعدی بیوشیمی دانان باعث کشف این نکته شد که در طول پلیمریزاسیون GTP زیرواحد بتا هیدرولیز

می شود و انرژی ورودی ناشی از هیدرولیز GTP اجازه انجام فعالیت های غیرتعادلی پلیمریزاسیون مثل دینامیک غیرتعادلی را می دهد. دینامیک غیرتعادلی اجازه آرایش یافتن میکروتوبول ها در کنار هم برای انجام بسیاری از رفتارهای آنها را در سلولهای زنده می دهند. با وجود اهمیت دینامیک غیرتعادلی همچنان بسیاری از جنبه های آن ناشناخته است.

در اغلب سطوح عملی دینامیک پلیمریزاسیون به شبکه اسکلتی سلول اجازه می دهد که به سرعت شکل بگیرد، به محض اینکه پلیمرهای شبکه اسکلتی در کنار هم تجمع پیدا میکنند و به یک تعادل دینامیکی مناسب در invivo می رسند تغییر آرایش فضایی آنها بسیار مشکل و آهسته خواهد بود. دومین ویژگی خاص میکروتوبول ها و فیلامان های اکتینی که ناشی از حفظ شدن مستقیم دینامیک پلیمریزاسیون با هیدرولیز GTP است توانایی پلیمر و دپلیمر شدن برای انجام اعمال مکانیکی سلول است. هر چند مکانیزم دقیق عمل هنوز به طور کامل مشخص نیست اما شواهد خوبی در دسترس است که نشان می دهد که پلیمریزاسیون اکتین مانع ایجاد فشار به سلول می شود و میکروتوبول ها درگیر ایجاد نیروی فشاری توسط پلیمریزاسیون و نیروی کششی توسط دپلیمریزاسیون هستند.(هووارد و هیمان[1]،2003; سیوالک و آک گوز[2]،2010)

از برخی از عملکردهای میکروتوبول ها می توان به موارد زیر اشاره کرد:

الف) انتقال پیام های درون سلولی

ب) شرکت در ساختار اسکلت سلولی، شکل و قطبیت سلولی

ج) شرکت در انتقالات اکسونی به کمک موتور پروتئین ها

د) تشکیل دوک تقسیم در فرایند میوز و میتوز(نوگالس، ولف و داوینگ[3]، 1998)

---

1 .Howard, Hyman; [2] .Civalek, Akgoz;[3] .Nogales, Wolf, Dowing

۱-۱-۲) ساختار میکروتوبول

مونومرهای آلفا و بتا توبولین که تشکیل زیر واحدهای هترودایمری میکروتوبول را می دهند، دارای حدود۵۰ ٪ شباهت اسید آمینه ای هستند و هر مونومر توبولینی دارای حدود ٤٥٠ اسید آمینه است و هر مونومر دارای هسته ای متشکل از بتا شیت است که با آلفا هلیکس ها پوشیده شده است و هر کدام از این مونومرها دارای وزن مولکولی حدود ۵۰۰۰۰ دالتون هستند. هترودایمرهای توبولینی دارای یک یا دو مولکول نوکلئوتید گوانین (GTP) به ازاء هر مول دایمر آلفا بتا هستند. در طول پلیمریزاسیون GTP متصل به زیرواحد بتا توبولین در E-SITE هیدرولیز می شود اما GDP ایجاد شده در E-SITE دچار تغییر شده و جایگزین GTP می گردد و سیکل دیگری از پلیمریزاسیون آغاز می شود. زیر واحد آلفا-توبولین نیز به GTP متصل می شود، اما این GTP قابل جایگزینی با GDP نیست(در N-SITE) و در طول پلیمریزاسیون هیدرولیز نمی شود.

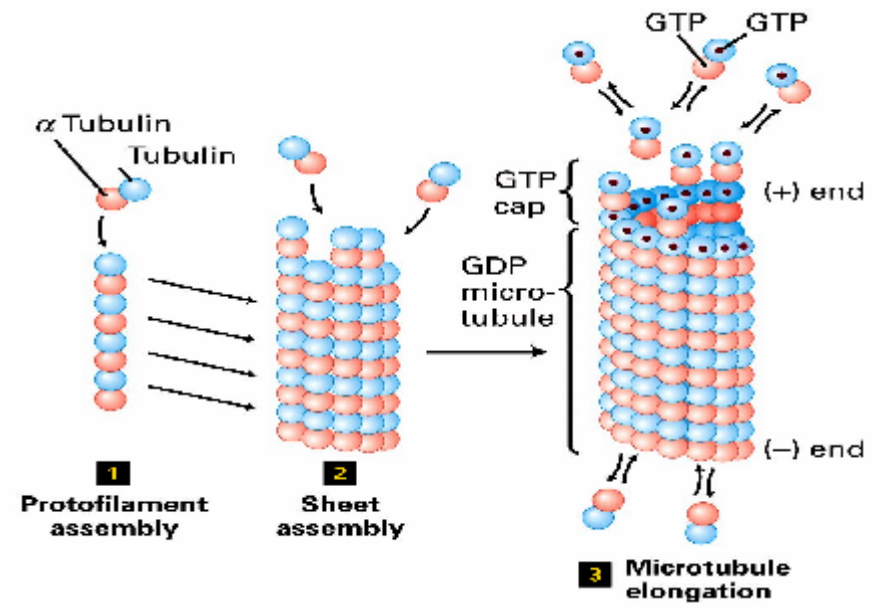
در in vitro تجمع توبولینها به صورت میکروتوبول درسه فاز صورت می گیرد: هسته زایی، طویل شدن و تعادل. در طی پلیمریزاسیون میکروتوبول هترودایمرهای توبولینی به صورت پروتوفیلامان های خطی روی هم سوار می شوند و به صورت جانبی در کنار هم قرار گرفته و ایجاد یک استوانه لوله ای عریض ۲۵ نانومتری می کند (شکل1-1). در in vitro تعداد پروتوفیلامان هایی که در کنار هم قرار می گیرند بین ۱۰ تا ۱۵ عدد است و اغلب دارای ١٤عدد هستند. هر چند در این میان استثناهایی بین میکروتوبول در in vivo و in vitro وجود دارد. مطالعات ژنتیکی پیشنهاد می کند که تعداد این پروتوفیلامان ها با کنترل هسته زایی ایزومرهای مختلف بتا توبولین قابل کنترل است.(وید، کریتن و جاب[1]،۱۹۹۰)

میکروتوبول ها ساختارهای قطبی هستند که در نتیجه اتصال سر به دم هترو دایمر آلفا بتا توبولین سنتز می شوند. سرعت مختلف پلیمریزاسیون در دو انتهای میکروتوبول با این قطبیت در ارتباط است، به طوری که انتهای با رشد سریعتر را انتهای مثبت و انتهای با رشد کندتر را انتهای منفی می نامند.

[1].Wade, Creiten, Job

قطبیت شبکه میکروتوبولی برای عملکرد موتور پروتئین های خانواده کاینزین و دایئین که به کمک انرژی حاصل از هیدرولیز ATP در طول میکروتوبول ها حرکت می کنند، نقش حیاتی دارند.(وید، کریتن و جاب[1]،۱۹۹۰; لوئی، لی، دوونینگ و نوگالس[2]،۲۰۰۱; ین،گی، پاتچرو کلولاند[3]،۱۹۹۸)

شکل 1-1) ساختمان میکروتوبول همراه با زیرواحدهای آن

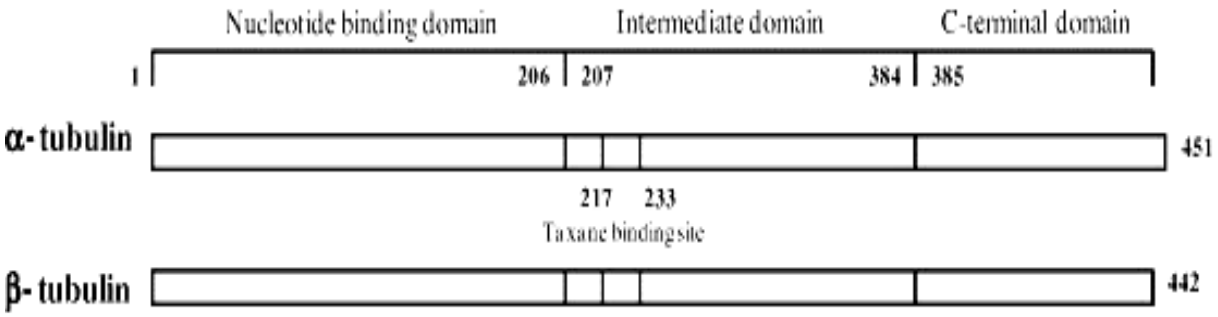


۱-۱-۳) توبولین ها

پروتوفیلامنت ها خود از اتصال سر به دم هترودایمرهای توبولین تشکیل می شوند. این هترودایمرها از توبولین های β و α تشکیل می شوند که در واقع زیرواحدهای اصلی میکروتوبول ها هستند. آلفا و بتا توبولین، پروتئین های کروی هستند. توالی اسید آمینه ای آنها تقریبا ٤٠ ٪ مشابه است و هر کدام از آنها حدود ٥٠ کیلو-دالتون وزن دارند. سکانس اسید آمینه ای آنها در بین گونه های مختلف بسیار حفظ شده است.(ویل و تویوشیما[4]،1982)

[1].Wade, Creiten, Job; [2].Lowe, Li, Downing, Nogales; [3].Yen, Gay, Patcher, Cleveland;[4] .Vale, Toyoshima

شکل 1-2) ساختار β و α توبولین



β-Tubulin isotypes

Class	Isotype	C-terminal amino acid sequence	Expression
I	M40	EEEDFGEEAEEEA	All tissues
II	hb9	DEQGEFEEEGEEDEA	Many tissues
III	hb4	EEEGEMYEDDEEESESQGPK	Neuronal
IVa	hb5	EEGEFEEEAEEEVA	Neuronal
IVb	hb2	EEGEFEEEAEEEVA	Many tissues
V		NDGEEEAFEDDEEEINE	All except neurons
VI	hb1	EEDEEVTEEAEMEPEDKGH	Hematopoietic

هر کدام از مونومرهای α و β توبولین دارای ابعاد Å ٤٦×٤٠×٦٥ بوده و الگوی فولد شدن آنها بسیار مشابه است. هر مونومر می تواند به سه دمین اصلی تقسیم شود:

ناحیه N ترمینال، ناحیه C ترمینال و ناحیه مرکزی

الف) دمین N ترمینال: ساختار این دمین پیچش ریسمان را تشکیل می دهد و از ریشه های آمینواسیدی متیونین و آسپارتات 205-1 تشکیل شده است که شامل رشته های β موازی و هلیکس ها می باشد..در این ساختار رشته های موازی بتا، به صورت یک در میان با هلیکس های آلفا قرار گرفته اند. در این دمین N ترمینال،

هلیکس های آلفا به ترتیب H_1 تا H_5 به صورت یک در میان با صفحات بتا به ترتیب B_1 تا B_6 قرار گرفته اند. این ناحیه شامل منطقه اتصال به نوکلئوتید است

ب) دمین میانی(مرکزی): آغاز دمین میانی زنجیره H_6 می باشد و ساختار کلی آن تشکیل شده از صفحات بتایی که توسط پنج هلیکس آلفا احاطه شده است. این ناحیه منطقه اتصال جانبی مابین آلفا و بتا توبولین می باشد. B_7 موجود در این ناحیه یک زنجیره بتای طولانی است که با انتهای N از طریق صفحه بتای موجود در این ناحیه یعنی N ارتباط برقرار می کند. ناحیه مرکزی در میان کنش با تاکسول دخالت دارد.

ج) دمین C ترمینال: هر یک از توبولین های شبکه میکروتوبول دارای یک C ترمینال کوتاهی بوده که به دم توبولین مشهور است و طولی حدود4–5 nm دارند. ناحیه C ترمینال از دو هلیکس موازی ناهمسو تشکیل شده است که با یک U-turn به هم متصلند. آنها در سطح خارجی میکروتوبول قرار دارند و با پروتئین های کمکی (MAP_S) میانکنش می دهند.آنها از دو هلیکس آلفای انتهایی یعنی H_{11} و H_{12} تشکیل شده اند. این دو هلیکس، دمین انتهایی N و دمین میانی را در بر می گیرد و در سطح مولکول و در نتیجه در سطح پلیمر میکروتوبول قرار می گیرند. در آلفا توبولین رزیدوهای آمینواسیدی423–418 هلیکسH_{12} در C ترمینال و آمینواسیدهای 451–433 شامل دم آلفا توبولین هستند. در منطقه C ترمینال دمینی وجود داردکه برای اتصال پروتئین های کمکی میکروتوبول و موتور پروتئین های کاینزینی به سطح میکروتوبول ضروری می باشد. همینطور حلقه ای کهH_{11} و H_{12} را بهم متصل می نماید، نقش عمده ای در اتصال دایمرهای توبولینی در طول پروتوفیلامان بر عهده دارد. یک GTP به بخش غیر قابل تعویض در ناحیه N درβ توبولین متصل می شود و در ناحیه بینابینی دو مونومر در هتروداِیمر قرار می گیرد. این GTP وقتی که α وβ توبولین به میکروتوبول پلیمریزه می شوند، هیدرولیز نمی شود.(وردیر پینارد، وانگ، مارتلو،بورد،اور وهورویتز[1]،2003 ;شیوانا، مجیلانو، ویلیامز و هایمس[2]، 1993)

[1].Verdier-Pinard, Wang, Martello, Burd, Orr & Horwitz;[2].Shivanna,Mejilalano, Williams,Himes

۱-۱-٤) سنتز توبولین

سنتز توبولین به صورت خودتنظیمی است و پایداری توبولین بستگی به غلظت توبولین داخل سلولی دارد. توبولین می تواند توسط اتصال با کمپلکس β توبولین –Ile، Glu، Met،Arg چهار پپتید انتهای آمینوβ توبولین پلی زوم شناسائی شوند. افزایش غلظت β توبولین غیر تجمع یافته می تواند منجر به تجزیه mRNA شود. به صورت مشابه α توبولین می تواند سنتز خود را کنترل کند.(بانرجی و مودنا[1]،1992)

۱-۱-٥) تغییرات پس از ترجمه توبولین

در بیشتر یوکاریوتها پروتئین های توبولین تغییرات پس از ترجمه حفظ شده زیادی را شامل دتایروزیناسیون، استیلاسیون، فسفریلاسیون، پالمیتاسیون، پلی گلوتاماتاسیون و پلی گلیسینایسون متحمل می شوند.(لوئی و آموس[2] ،1998)

مطالعات نشان می دهند که سه نوع تغییرات پس از ترجمه توبولین در سلولها شامل پلی گلوتاماتاسیون، پلی گلیسیناسیون و دتایروزیناسیون می تواند در سلولها در بدن موجود زنده نقشی اساسی بازی کند. مثلا در بدن تتراهایمنا پلی گلیسیناسیون نقشی اساسی در حرکت دارد.(نوگالس، دوونینگ، آموس و لوئی[3]،1998)

۱-۱-٦) ایزوتایپ های توبولین

هر دو توبولین α و β شامل چندین ایزوتایپ هستند، اگر چه اهمیت بیولوژیک آنها شناخته شده نیست. هر کدام از اینها محصول یک ژن متفاوت است. ۷ ایزوتایپ β توبولین و ٦ ایزوتایپ α توبولین در سلول های پستانداران شناخته شده است. هر کدام از این ایزوتایپ ها در بافت خاصی پراکندگی دارند. توالی متفاوت بین این ایزوتایپ ها در ناحیه C ترمینال توبولین قرار دارد.

---

[1].Banerjee, Ludena;[2] .Lowe, Amos.[3] .Nogales, Dowing, Amos, Lowe

این موضوع می تواند در پایداری میکروتوبول ها و میانکنش آنها با عوامل واکنش دهنده با میکروتوبول تاثیر داشته باشد. بیشترین تفاوتی که در توالی این ایزوتایپ ها وجود دارد، مربوط به 15 آمینواسید موجود در انتهای C ترمینال هر مونومر توبولین می باشد. تفاوت در سکانس اولیه منجر به تفاوت در تغییرات پس از ترجمه و در نتیجه تفاوت در توانایی اتصال به پروتئین های کمکی می شود. این موضوع می تواند در پایداری میکروتوبول ها و میانکنش آنها با عوامل واکنش دهنده با میکروتوبول تاثیر داشته باشد. با توجه به این نواحی که بیشترین توالی متفاوت بین ایزوتایپ ها را دارند، از ریشه های اسیدی با بار منفی تشکیل شده اند و در ناحیه سطحی میکروتوبول ها قرار می گیرند، خصلت های متفاوتی بر اساس نیازهای فیزیولوژیک سلول به آن می دهند. بیشتر این تغییرات، در ارتباط با تغییر بار پروتئین و در نتیجه اختصاصی شدن ارتباط با پروتئین های دیگر از جمله موتور پروتئین های داینئینی- کاینزینی و کینه توکور می باشد. نشان داده شده که سلول هایی که به تیمار شدن با تاکسول مقاومند، توانایی بیان متفاوتی از ایزوتایپ های توبولین را دارند. در حقیقت ایزوتایپ های دینامیک تر به تاکسول مقاوم ترند. تفاوت در تاثیر داروهای ضد سرطان به ایزوتایپ های مختلف در مورد داروهای دیگر هم وجود دارد. .(آموس[1]،2004 ; ژنگ، ونگ، آلبرتس و میتچیسون[2]، 1995; مورفی، اوربانی و استیرنس[3]، 1998)

1-1-7) گاما توبولین

یکی دیگر از اعضای خانواده توبولین ها، گاما توبولین می باشد که از جمله وظایفی که دارد می توان به هسته زایی و جهت گیری قطبی میکروتوبول ها اشاره کرد. این توبولین بیشتر در مناطق هسته زایی میکروتوبول مانند سانتروزوم و دوک های اجسام قطبی مشاهده می شود. در این ارگانل ها چندین گاماتوبولین و مولکول های پروتئینی دیگر، کمپلکس حلقه گاما توبولین را تشکیل می دهند که از نظر شیمیایی ساختاری شبیه به انتهای مثبت میکروتوبول را از خود نشان می دهند.

[1] .Amos; [2]. Zheng, Wong, Alberts, Mitchison; [3]. Murphy, Urbani, Stearns

1-1-8) توبولین های اپسیلون و دلتا

این نوع توبولین نسبت به دیگر اعضای خانواده توبولین ها مثل آلفا و بتا توبولین کمتر شناخته شده اند. توبولین های اپسیلون و دلتا بیشتر در سانتریول ها دیده می شوند و به نظر می رسد که در شکل گیری دوک میتوزی در طی تقسیم میتوز نقش داشته باشند.

1-1-9) همولوژی با پروتئین FtsZ باکتریایی

FtsZ یک پروتئین جهانی موجود در یوباکتریا و آرکی باکتری ها می باشد که در تقسیم سلولی نقش مهمی را ایفا می کند و برای سیتوکینز ضروری می باشد. این پروتئین در شرایط in vitro می تواند به GTP متصل شده و طی این اتصال می تواندGTP را هیدرولیز کرده و به GDP تبدیل کند.

از دیگر توانایی های این پروتئین این است که می تواند فیلامنت هایی را بوجود آورد که شبیه به پروتوفیلامنت های موجود در میکروتوبول ها می باشند. اگر چه شباهت و ترادف این پروتئین با میکروتوبول حدود 10 درصد است، ولی حتی قطعه غنی از گلایسین که تصور می رود موتیف امضاء توبولین باشد(یعنی منحصر به توبولین) را نیز دارد(GGGTGS/TG). زمانی که ساختار هر دو پروتئین بدست آمد، این پیشنهاد مطرح شد که FtsZ و توبولین می توانند از لحاظ ساختمانی مشابه باشند و مدت زمانی بعد با جزئیات بیشتری این دو پروتئین با هم مقایسه شدند. این پروتئین ساختاری شبیه به توبولین دارد و شامل N ترمینال متصل شونده به ناحیه هلیکس مرکزی و چندین صفحه بتا و هلیکس است. (نوگالس، ولف و داوینگ[1]، 1998; نوگالس، دوونینگ، آموس و لوئی[2]،1998)

[1] .Nogales, Wolf, Dowing;[2]. Nogales, Dowing, Amos, Lowe

۱-۱-10) پروتوفیلامنت ها

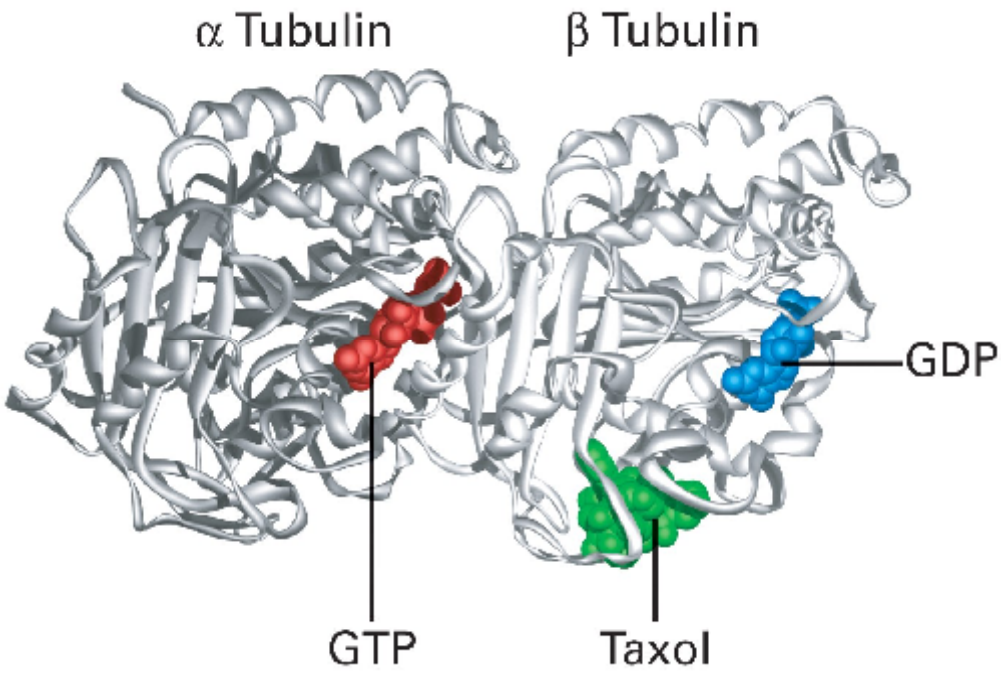
میکروتوبول ها سیلندرهای توخالی غیر منشعب با قطر خارجی تقریبی ۲۵ نانومتر و قطر داخلی 17 نانومتر می باشند. این سیلندرها در واقع خود از اجزایی با ضخامت ۵ نانومتر تشکیل شده اند که پروتوفیلامنت نامیده می شوند. تعداد پروتوفیلامنت ها بستگی به شرایط پلیمریزاسیون میکروتوبول ها دارد و می تواند از ۹ تا ۱۸ متغیر باشد. در محیط بدن موجود زنده میکروتوبول ها معمولا ۱۳ پروتوفیلامنت دارند. پروتوفیلامنت ها موازی محور میکروتوبول هستند. در میکروتوبول هایی با ١٤ یا ۱۵ پروتوفیلامنت، پروتوفیلامنت ها نسبت به محور کج هستند.(مورفی، اوربانی و استیرنس[1]، 1998)

۱-۱-11) میانکنش ها و اتصالات در ساختار میکروتوبول

در مدت کمی پس از تشخیص ساختار مونومرها، ساختار سه بعدی میکروتوبول در ۸ نانومتر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی کرایو بدست آمد. هر مونومر در میکروتوبول دارای تماسهای طولی و عرضی با مونومرهای دیگر است. میان کنش های طولی شامل میان کنش های بین دو مونومر در یک هترودایمر بیشتر و قوی تر از میان کنش بین دو هترودیمر است و این به این علت است که در حالت طبیعی مونومرهای توبولینی به هم اتصال می یابند. (دسائی و میتچیسون[2]، 1997)(شکل 1-3).

[1]. Murphy, Urbani, Stearns;[2].Desai, Mitchison

شکل 1-3) دیاگرام روبانی شکل هترودایمر آلفا و بتا توبولین



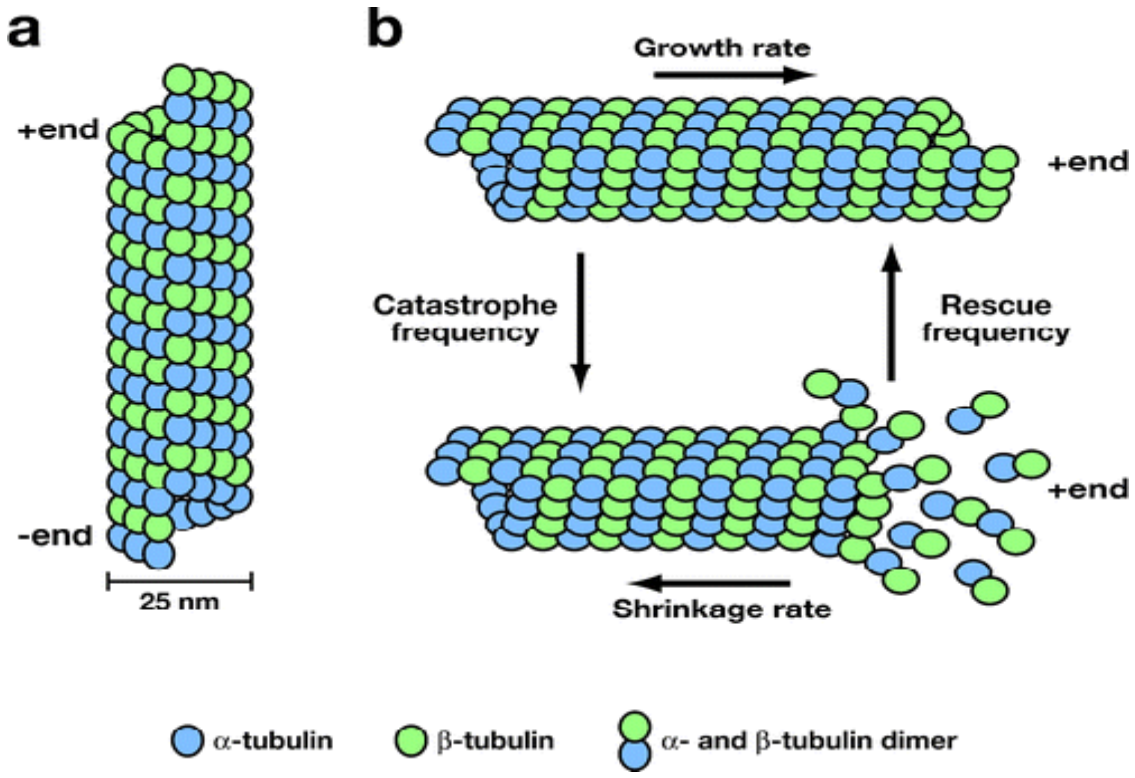
دما عامل دیگری برای پلیمریزاسیون میکروتوبول هاست. وقتی که دما از ٤°C به ۳۷° C می رسد، پروتوفیلامنت های انحنادار به میکروتوبولهای صاف تبدیل می شوند. مدل سه بعدی میکروتوبول به ما اطلاعات جزئی در مورد ساختار میکروتوبول می دهد و در فهم پلیمریزاسیون میکروتوبول و دینامیک آن به ما کمک می کند.

۱-۱-12) دینامیک میکروتوبولها

میکروتوبول ها دارای یک ساختار استاتیک نیستند بلکه مولکول هایی کاملا متحرک بوده و دارای دینامیک هستند. دینامیک میکروتوبول ها در واقع همان پلیمریزاسیون آنهاست. پلیمریزاسیون میکروتوبول ها با مکانیسم هسته زایی- طویل شدن انجام می گیرد که ابتدا یک شکل گیری آهسته میکروتوبول کوتاه، شکل گیری هسته و به دنبال آن طویل شدن سریع میکروتوبول ها در انتهاهای آن به همراه اضافه شدن برگشت پذیر و غیر کوالان

دایمرهای توبولین می باشد. طی فرایند هسته زایی میکروتوبول ها که در سلول در مراکز سازماندهی میکروتوبول ها رخ می دهد، میکروتوبول ها از سر منفی خود به این محل ها می چسبند. این رفتار برای فعالیت میکروتوبول ها و دینامیک آنها حیاتی است. یک نقش حیاتی در این فرایند توسط گاما توبولین، که همولوژی زیادی با آلفا و بتا توبولین دارد و در مراکز سازماندهی میکروتوبول قرار می گیرد، ایفا می شود. مطالعات ایمنوالکترون میکروسکوپی نشان داده اند که گاما توبولین ساختار حلقه ای شکلی را بوجود می آورد که می تواند برای رشد میکروتوبول ها به عنوان الگو مورد استفاده قرار گیرد. نقش مستقیم گاما توبولین در فرایند هسته گزینی با مطالعات و با استفاده از گاما توبولین خالص شده که به صورت کمپلکس حلقه ای شکل(با حداقل ۷ پروتئین مختلف) اضافه شده است، نشان داده شد.(والایرون، کاودرون و جاب[1]، 2001 ;واندکاندلاری، برونه، وب، مارتین و بایلی[2]، 1999; والاس و فیشمن[3]، 1979)

شکل 1-4) پلیمریزاسیون میکروتوبولها



[1].Valiron, Caudron, Job;[2] .Vandecandelaere, Brune, Webb, Martin, Bayley; [3].Wallace, Fishman

۱-۱-13) قرارگیری میکروتوبول ها در سلول

در سلولها میکروتوبول ها به صورتی سازمان می یابند که سر منفی آنها (α توبولین) در نزدیک مرکز سازمان دهنده میکروتوبول در نزدیکی هسته قرار می گیرد و انتهای مثبت آنها در قسمت های محیطی سلول قرار می گیرد. میکروتوبول ها دارای طول های متفاوتی مستند و در هر دو انتهای مثبت و منفی در آنها پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون صورت می گیرد. (والاس و فیشمن[1]،1979)

1-1-14) پلیمریزاسیون میکروتوبول

پلیمریزه شدن میکروتوبول در سه مرحله هسته زایی، طویل شدن و وضعیت یکنواخت است، مرحله هسته زایی آهسته است و در طی این فاز هسته های میکروتوبول شکل میگیرد که برای ایجاد میکروتوبول نیاز به غلظت خاصی از توبولین های آزاد است.(والایرون، کاودرون و جاب[2]،2001). در مرحله دوم این مرحله سریع اتفاق می افتد و در این فاز دایمرهای توبولینی به انتهای میکروتوبول اضافه می شوند. در مرحله وضعیت یکنواخت تعداد مشخصی از توبولین به میکروتوبول اضافه می شود و پایداری این حالت وابسته به هیدرولیز GTP و در نتیجه مصرف انرژی می دهد . در پلیمریزاسیون توبولین سه فاکتور نقش کلیدی دارند که شامل:

1- دمای مناسب که بین ^{o}c 37-30 است و در دمای پایین پلیمریزاسیون اتفاق نمی افتد. 2- حضورGTP
3- غلظت بحرانی توبولین

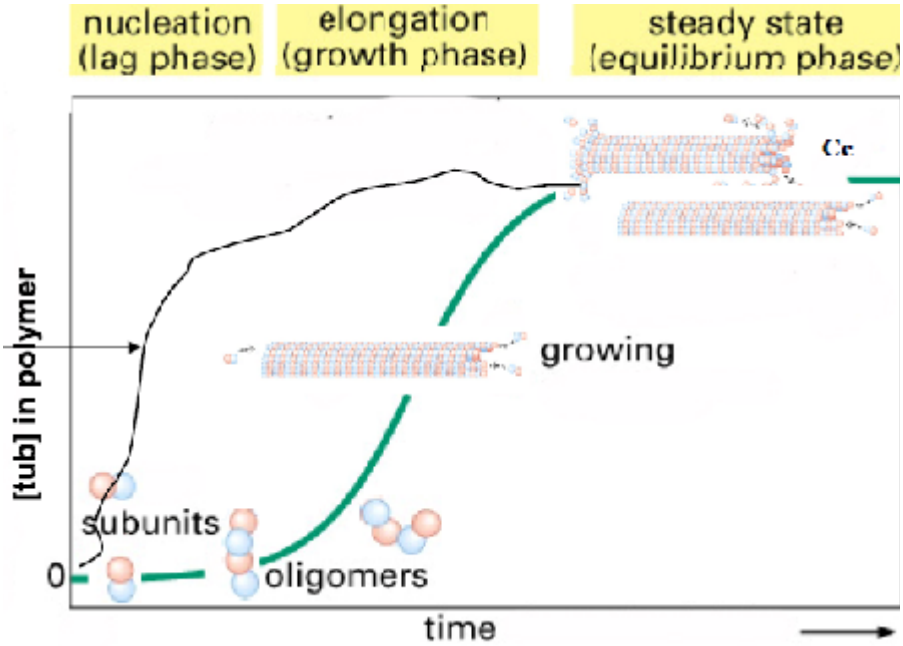
نقش اصلی را در پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون میکروتوبول آن انتهایی بازی می کند که منتهی به بتا توبولین (انتهای مثبت) باشد.(لوئی، لی، دوونینگ و نوگالس[3]،۲۰۰۱)

غلظت بحرانی، غلظتی است که سرعت اضافه شدن دایمرهای توبولین به میکروتوبول با سرعت جدا شدن آن برابر می باشد. و در غلظت پایین تر از حد بحرانی پلیمریزاسیون اتفاق نمی افتد. این غلظت، برای رشد از ناحیه منفی تا حدی بالاتر از غلظت مورد نیاز برای رشد از ناحیه مثبت است. بنابراین هنگامی که افزایش طول میکروتوبول اتفاق می افتد، انتهای منفی که دارای آلفا توبولین می باشد زودتر از رشد می ایستد.

---

[1].Wallace, Fishman; [2]. Valiron, Caudron, Job; [3]. Lowe, Li, Downing, Nogales

شکل 1-5) مراحل پلیمریزاسیون میکروتوبول ها



در طی بررسی های گسترده مشاهده شد که پلیمریزاسیون میکروتوبول یک واکنش بیومولکولار وابسته به غلظت توبولین آزاد می باشد. در صورتی که دپلیمریزاسیون میکروتوبول یک واکنش غیر مولکولی غیر وابسته به غلظت توبولین آزاد می باشد، به این ترتیب افزایش غلظت توبولین باعث افزایش پلیمریزاسیون و کاهش فرکانس کاتاستروف می شود.

هسته زایی در میکروتوبول :

پدیده هسته زایی میکروتوبول در مراکز سازماندهی میکروتوبول MTOC انجام می گیرد.این پدیده در حقیقت به معنی نقطه شروع ساخت و بوجود آمدن شبکه میکروتوبول و ایجاد ساختمان لوله ای شکل میکروتوبول می باشد.گاما تویولین نقش بسیار در پلیمریزاسیون میکروتوبول به عهده دارد و به نظر میرسد از طریق زیر واحد آلفا با میکروتوبول واکنش می دهد. دو مدل برای الگو شدن زیر واحد گاما برای هسته گزینی وجود دارد که شامل:

1) بر اساس شکل و اندازه این کمپلکس که این کمپلکس اولین پیچ از مارپیچ میکروتوبول در حال رشد را شکل می دهد و برای میانکش طولی با دایمرهای آلفا و بتا بصورت الگویی مورد استفاده قرار می گیرد.

2) مدل دیگری که وجود دارد براساس ساختار حلقوی شکل گاما است که بدلیل میانکش با خودشان ساختار یک پروتوفیلامنت را می سازد که به صورت یک الگو برای میانکش جانبی با پروتوفیلامانت های آلفا و بتا مورد استفاده قرار می گیرد.

۱-۱-15) نا پایداری فعال و کار یکنواخت

میکروتوبول ها می توانند بسیار پایدار باشند مثل تاژکها و مژکها و یا بسیار دینامیک باشند مثل دوک میتوزی. عمل زیستی میکروتوبولها در همه سلولها در بیشتر قسمت ها بوسیله دینامیک پلیمریزاسیرن آنها تنظیم و تعیین می شود. در سلول میکروتوبول های منفرد به صورت دوره ای به سمت های پیرامونی رشد می کنند و بعد ناگهان به سمت سانتروزوم عقب کشیده می شوند. این رشد و تخریب در سر منفی میکروتوبول هم با سرعت بسیار کمتر اتفاق می افتد. تغییر حالت پلیمریزاسیون به دپلیمریزاسیون کاتاستروف نامیده می شود، در صورتیکه تغییر از حالت دپلیمریزاسیون به رشد رسکیو نامیده می شود. این تغییر حالت ناپایداری دینامیک نامیده می شود و برای فعالیت نرمال میکروتوبول ضروری است. (بوردن، کاسیمریس و اوده[1]، 2005)

سرعت، فرکانس، طول و زمان صرف شده در هر کدام از اینها قابل اندازه گیری است. رفتار دینامیک دیگر کار یکنواخت است، که در واقع رشد خالص در یک طرف و کوتاه شدن خالص در طرف دیگر است، بدون اینکه تغییری در طول کل میکروتوبول روی دهد. در سلول ها ناپایداری دینامیک میکروتوبول توسط تزریق توبولین فلورسانس و استفاده از میکروسکوپ برای دیدن اتصال و جدا شدن توبولین از میکروتوبول بررسی شده است. هیدرولیز GTP در β توبولین انرژی لازم برای این رفتار دینامیک را فراهم می سازد. توبولین های α و β همراه در جهت طولی در کنار هم پروتوفیلامنت ها را می سازند.

تعداد مشخصی از پروتوفیلامنت ها ممکن است در کنار هم قرار بگیرند و یک صفحه انحنادار را بسازند که در دو طرف آن، هترودایمرهای توبولین در حال تعویض سریع هستند. این صفحه ممکن است به دو طرف پیچ بخورد و بسته شود و میکروتوبول را بوجود آورد.

---

[1]. Burden, Cassimeris, Odde

GTP موجود در توبولین ممکن است بعد از قرار گیری در پروتوفیلامنت به GDP هیدرولیز شود، هر چند زمان دقیق هیدرولیز کاملا مشخص نیست. وقتی که GTP در انتهای مثبت میکروتوبول به صورت هیدرولیز نشده باقی می ماند، به عنوان کلاهک پایدار کننده در انتهای میکروتوبول برای حفظ پایداری ساختاری میکروتوبول عمل می کند. اگر GTP در انتهای میکروتوبول به GDP هیدرولیز شود، میکروتوبول به سرعت دپلیمریزه می شود. میکروتوبول مستقیم ممکن است انحنادار شود و به پروتوفیلامنت های منفرد تبدیل شود. شبکه میکروتوبول به دایمرهای توبولین که β توبولین در آنها به GDP متصل است، تبدیل می شود. بعد از تبدیل GDP به GTP دایمر توبولین آماده سیکل جدید پلیمریزاسیون می شود. کلاهک پایدار کننده در انتهای میکروتوبول داراری یک ردیف دایمر متصل به GTP است.(کادرون، والایرون، اوسون و والایرون[1]، 2000 ; شا و فلناگان[2]، 2001)

۱-۱-16) ضرورت دینامیک میکروتوبول ها برای میتوز

میکروتوبول ها در دوک میتوز دینامیک سریع انحصاری دارند که برای میتوز موفقیت آمیز ضروری است. در طول اینترفاز توبولین های موجود در میکروتوبول ها با توبولین های محلول موجود درسلول به صورت خیلی آهسته گردش دارند. در آغاز میتوز شبکه های میکروتوبولی اینترفاز بهم می ریزد و با جمعیت جدیدی از میکروتوبول های میتوزی جایگزین می شود که دینامیک آنها ۱۰۰-٤ برابر میکروتوبول ها در سیتواسکلتون است. میکروتوبول های میتوزی ذخیره توبولین خود را با ذخیره داخل سلولی به سرعت عوض می کنند.

میتوز در بیشتر سلولها سریع است. میکروتوبول ها با دینامیک بالا در دوک برای همه مراحل میتوز مورد نیازند. مثلا برای اتصال درست و به موقع کروموزوم ها در کینه توکورهای آنها به دوک در طول پروفاز مورد نیاز می باشند.

---

[1]. Caudron, Valiron, Usson, Valiron; [2]. Shea, Flanagan

در طول پروفاز میکروتوبول ها از هر یک از دو قطب سرچشمه می گیرند و سیتوپلاسم را جستجو می کنند تا زمانی که کینه توکور کروموزوم ها را پیدا کند به آنها بچسبد. چنین میکروتوبول هایی باید قادر به رشد در فاصله طولانی باشند. سپس دوباره کوتاه می شوند و مجدداً رشد می کنند تا متصل شوند.(والاس و فیشمن[1]،1979)

حضور یک کروموزوم منفرد که قادر نیست به دوک اتصال پیدا کند، از انتقال سلول به متافاز جلوگیری می کند و در نهایت سلول دچار آپوپتوز می شود. مکانیسم عمل گروهی از داروهای ضد سرطان به صورت مهار دینامیک میکروتوبول ها و در نتیجه مهار میتوز و کشتن سلول هاست. دلیل حساسیت سلولهای سرطانی به این داروها تقسیم سریعتر آنها نسبت به سلولهای نرمال است.(ژنگ، ونگ، آلبرتس و میتچیسون[1]، 1995; والاس و فیشمن[2]،1979)

۱-۱-17) میکروتوبول ها هدفی برای داروهای ضد سرطانی

با توجه به اهمیت میکروتوبول ها در تقسیم میتوزی و نقش آنها در جدا کردن کروموزوم های تقسیم شده و انتقال آنها به دو سلول دختری، بررسی آنها در سرطان نیز بسیار با اهمیت است و میکروتوبول ها را به عنوان هدفی برای داروی ضد سرطان مطرح کرده است. میکروتوبول ها و دینامیک آنها در واقع هدف عمده ای برای گروه وسیعی از داروهای ضد میتوزی (با جایگاه های اتصال مختلف روی توبولین) در درمان سرطان است. اکثر این ترکیبات عناصر ضد میتوزی بوده و تقسیم سلول را با دخالت در دینامیک پلیمریزاسیون میکروتوبول ها که برای تقسیم دوک میتوزی حیاتی است، عمل کرده و تقسیم سلول را مهار می کند. داروهای ضد سرطانی با هدف میکروتوبول ها در دو دسته عمده تقسیم بندی می شوند : گروه اول که بعنوان گروه ناپایدارکننده شناخته شده اند، باعث مهار پلیمریزاسیون میکروتوبول ها در غلظت بالا می شوند و شامل گروه دارویی وسیعی به نام vinca alkaloids ها که شامل وینبلاستین، وینفالوین و کلشی سین هستند.

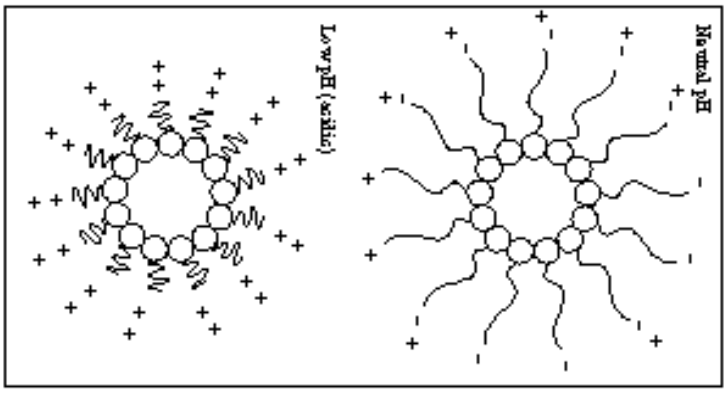
[1].Zheng, Wong, Alberts, Mitchison; [2]. Wallace, Fishman

گروه دوم شامل(vinblastin), (vincristine), (colchicines) گروه مواد شیمیایی هستند که باعث پایدار شدن میکروتوبول ها می شوند و شامل تاکسول(taxol)، دوسه تاکسول(docetaxol) و گروهی از استروئیدها هستند. به نظر می رسد از مهمترین وظایف این گروه دارویی مهار دینامیک میکروتوبول های دوک تقسیم است که باعث کاهش و یا بلوکه کردن تقسیم میتوز در مرحله عبور از آنافاز به متافاز و القاء آپوپتوز و مرگ سلولی می شوند. از مهمترین این داروها تاکسول و کلشی سین هستند. (شا و فلناگان[1]، 2001; والسزاک، ورنوس، میتچیسون، کارسنتی و هیالد[2]،1998; والی و گی[3]، 1998; گی، هوسر و والی[4]،1997)

۱-۱-18) خواص الکترواستاتیکی توبولین و میکروتوبول

مطالعات انجام شده روی میکروتوبول ها نشان داده است که توبولین ها در PH فیزیولوژیکی دارای بار منفی هستند و بیشتر این بار منفی روی قسمت c-ترمینال آن متمرکز است(حدود ٤٠٪ از کل بار منفی موجود روی توبولین)

شکل 1-6) نقشه توزیع بار الکتریکی روی سطح دایمر توبولین در حضور دم انتهایc (c-ترمینال)



در PH خنثی بار منفی روی انتهای کربوکسی باعث دور شدن آن از دم انتهایی می گردد. تحت شرایط اسیدی بار منفی ناحیه انتهای کربوکسی توسط یون های هیدروژن همراهش کاهش می یابد. (شکل 1- 6)

[1]. Shea, Flanagan; [2].Walczak, Vernos, Mitchison, Karsenti, Heald; [3].Vallee, Gee; [4].Gee, Heuser, Vallee.

ممان دو قطبی توبولین و میکروتوبول ها: وقتی که توبولین در یک محلول یونی قرار می گیرد، دارای ممان

دو قطبی می گردد . در حالتی که دو دایمر آلفا و بتا به صورت متصل به هم در ساختار پروتو فیلامنت در کنار هم قرار دارند بارهای مثبت و منفی انتهای آن ها ایجاد یک ممان دوقطبی دو لایه ای در محور پروتوفیلامنت می نماید. مجموعه این بارهای دایمری در ساختار میکروتوبول نیز ایجاد یک ممان دو قطبی را می نمایند و حضور یک ساختار آنتی-الکتریک جالب توجه را با خاصیت ممان دو قطبی دائمی در سطح میکروتوبول لوله ای پیشنهاد می کند که در کل به علت خاصیت لوله ای و تقارن موجود در ساختار این ممان دو قطبی خاصیت الکترواستاتیکی خنثی می شود.

در واقع به همین خاصیت الکترواستاتیکی میکروتوبول پیشنهاد می شود که حتی در داخل ساختار لوله ای آن هیچ ماده ای حتی آب نیز یافت نمی شود.(توسزینسکی، براون و کارپنتر[1]،2002)

۱-۲) بخش دوم: میدان الکترومغناطیسی

۱-۲-۱ میدان مغناطیسی

میدان مغناطیسی مانند میدان الکتریکی توسط بار الکتریکی ایجاد می گردد که این نوع میدان به سایر بارهای الکتریکی در حال حرکت نیرو وارد می کند. مقدار نیروی F که بر بار الکتریکی q که با سرعت v عمود بر جهت میدان مغناطیسی B حرکت می کند از رابطه زیر محاسبه می شود:

$$F=qV\times B \qquad (1\text{-}1)$$

البته ما دارای میدان های ناشی از مغناطیس های ثابت چون فلزات آهن نیز هستیم. از جمله مواد مغناطیسی دایم آهنرباهای میله ای و سوزنهای قطب نما را می توان نام برد. میدان مغناطیسی فقط جهت بار را می تواند تغییر دهد و بر سرعت بار بی تاثیر است.

[1] .Tuszynski, Brown, Carpenter

واحد اندازه گیری میدان مغناطیسی تسلا(T) بوده و یک تسلا برابر یک نیوتن بر آمپرمتر می باشد.

میدان مغناطیسی ثابت بر اساس شدت خود به سه دسته ضعیف(ImT>)، متوسط(IT-ImT>) و قوی(IT <) تقسیم می شوند. (یو، اسچیوی و باس[1]، 1995)

منابع مولد میدان مغناطیسی به دسته های زیر تقسیم می شوند:

1) میدان مغناطیسی طبیعی: شامل دو میدان است، یکی در داخل زمین که زمین را به صورت یک مغناطیس دایمی در می آورد و دیگری میدان مغناطیسی خارج از زمین است. عواملی مانند رعد و برق و فعالیت خورشیدی سبب ایجاد جریانهای تلوریک می شوند.

2) منابع مصنوعی: تقریبا در تمامی محیط ها بوده و در گستره بسیار وسیعی از فرکانس و شدت میدان قرار دارد. در یک بررسی میدانهای مغناطیسی اطراف وسایل برقی خانگی اندازه گیری شد. میدان در فاصله ۳۰ cm از آنها ۳ uT و در فاصله ۱۵۰ cm از وسایلی با میدان قویتر حدود ۵ uT بود. (دینی و آبرو[2]، 2005)

[1].Yu, Schwi, Baas; [2].Dini L, Abbro