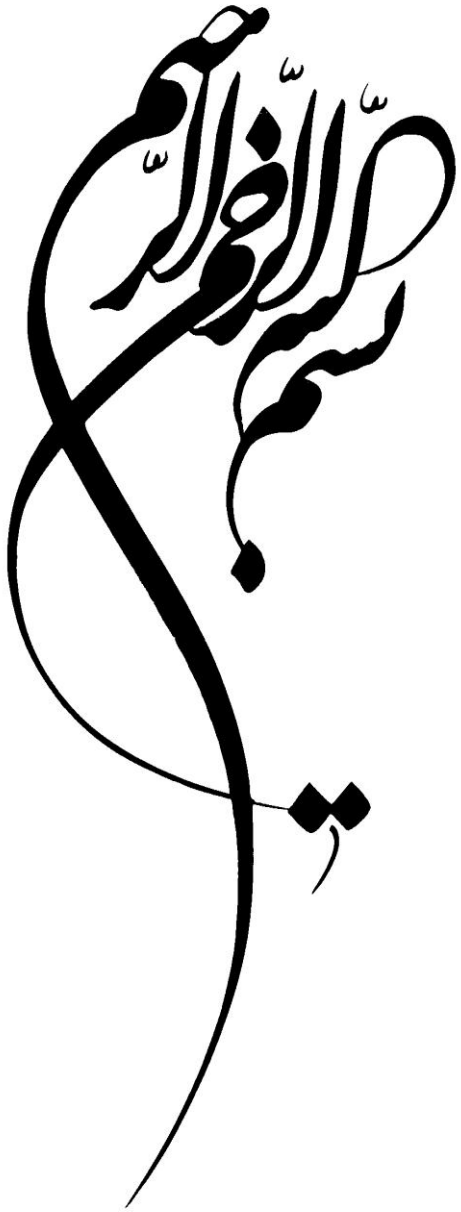

بسم الله الرحمن الرحیم

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

بررسی اثر دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول بر تشکیل تجمع‌های لیزوزیمی

پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد

سمانه تسلیمی

استاد راهنما: دکتر سعید عمادی

فروردین ۱۳۹۳

تقدیم به

پدر و مادر دلسوزم

خواهران نازنینم

برادر عزیزم

و

همسر فداکارم

تشکر و قدردانی

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق رارفیق راهم ساخت تا این پایان نامه را به پایان برسانم.

از استاد فاضل و اندیشمندم جناب آقای دکتر سعید عادی بسیار سپاسگذارم چرا که بدون راهنماییهای ایشان تامین این پایان نامه بسیار مشکل مینمود.

از اساتید محترم سرکار خانم ها دکتر لیلا حسنی و دکتر عطیه مهدوی وجناب آقای دکتر خسرو خلیفه به خاطر تقبل زحمت داوری این پایان نامه بسیار متشکرم.

از گروه شیمی تجزیه دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران ودانشکده فیزیک دانشگاه صنعتی شریف به خاطر استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم.

در پایان از تمامی دوستانم و اعضاء محترم دانشکده علوم زیستی دانشگاه تحصیلات تکمیلی زنجان به خاطر همکاری بیدریغ آنها جهت پیشبرد این پایان نامه سپاسگذارم.

چکیده

امروزه مطالعه‌ی تشکیل تجمع‌های پروتئینی در مجامع علمی به موضوع پراهمیتی تبدیل شده است. حداقل ۲۵ پروتئین انسانی می‌توانند رسوب‌های بیماری‌زا را که در بیماری‌های تخریب کننده سیستم عصبی دیده می‌شوند، ایجاد کنند. علی‌رغم مطالعات گسترده روی فیبریلاسیون آمیلوئیدی، جزئیات مکانیزم مولکولی آن ناشناخته است. لیزوزیم انسانی یک پروتئین مستعد تشکیل آمیلوئید است که سویه‌های جهش یافته آن در بیماری آمیلوئیدوزیس سیستمی وراثتی نقش مهمی دارند. از آنجا که لیزوزیم انسانی و سفیده تخم مرغ از نظر ساختار و توالی شباهت زیادی دارند، در این مطالعه از لیزوزیم سفیده تخم مرغ به عنوان مدل پروتئینی استفاده شد. در این پروژه به بررسی اثر عوامل احیا کننده‌ای از قبیل دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول بر تجمع لیزوزیم با استفاده از سه روش طیف‌سنجی فلورسانس تایوفلاوین‌تی، دورنگ‌نمایی دورانی و میکروسکوپ نیروی اتمی پرداخته شد. ابتدا شرایط لازم برای تشکیل تجمع‌های پروتئینی لیزوزیم تأمین شد: دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد، ۲ pH و ۲۴ ساعت انکوباسیون همراه با تکان دادن (۱۵۰ دور در دقیقه). در مرحله دوم اثر دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول بر تجمع‌های لیزوزیمی تشکیل شده در شرایط استاندارد طی زمان‌های ۴،۲،۱ و ۸ ساعت پس از انکوباسیون بررسی شد. در بررسی اثر دی‌تیوتریتول مشخص شد که با اضافه کردن آن به تجمع‌های لیزوزیمی، نشر فلورسانس کاهش می‌یابد که نشان دهنده کاهش تجمع‌های پروتئینی است و مقدار این کاهش در زمان ۸ ساعت بیشترین بود. اضافه کردن بتامرکاپتواتانول طی زمان‌های ۲،۱ و ۴ ساعت سبب کاهش نشر فلورسانس شد ولی در زمان ۸ ساعت پس از انکوباسیون نشر فلورسانس افزایش یافت. در مرحله سوم با بررسی اثر دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول بر تجمع‌های لیزوزیمی تشکیل شده در حضور گوانیدین تیوسیانات مشخص شد که هر دو، سبب کاهش در نشر فلورسانس و در نتیجه کاهش در تجمع لیزوزیم شدند. در مرحله آخر، انکوباسیون همزمان دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول و سپس تشکیل تجمع پروتئینی نیز سبب کاهش نشر فلورسانس شدند. در این مطالعه مشخص شد که ترکیبات احیا کننده پیوند دی سولفید می‌توانند تحت شرایطی اثر کاهش دهنده بر تشکیل تجمع‌های پروتئینی داشته باشند و از این رو پیشنهاد می‌شود که این گونه ترکیب‌ها نیز در مطالعه‌های مربوط به طراحی دارو بر علیه بیماری‌های ناشی از تجمع‌های پپتیدی و پروتئینی در نظر گرفته شوند.

کلمات کلیدی: لیزوزیم، تجمع‌های پروتئینی، عوامل احیا کننده، دی‌تیوتریتول، بتامرکاپتواتانول

فهرست

عنوان **شماره صفحه**

فهرست شکل‌ها..... ح

فهرست نمودارها..... د

فهرست طیف‌ها..... ذ

فهرست جدول‌ها..... ذ

فصل اول: مقدمه..... ۱

۱.۱ ساختار و عملکرد پروتئین..... ۱

۲.۱ تاخوردگی پروتئین..... ۳

۱.۲.۱ تاریخچه تاخوردگی پروتئین..... ۴

۲.۲.۱ اصول تاخوردگی پروتئین..... ۷

۳.۲.۱ مکانیسم تاخوردگی پروتئین..... ۷

۳.۱ بدتاخوردگی و تجمع پروتئین..... ۸

۱.۳.۱ مکانیسم تشکیل تجمع‌های پروتئین..... ۱۱

۱.۱.۳.۱ ساختار فیبریل‌های آمیلوئیدی..... ۱۳

۲.۱.۳.۱ تشکیل آمیلوئید از طریق مکانیزم رشد هسته‌ای..... ۱۴

۲.۳.۱ تاخوردگی پروتئین و تشکیل تجمع‌های پروتئینی فرآیندهای رقابتی هستند..... ۱۶

۴.۱ تجمع‌های آمیلوئیدی..... ۱۷

۵.۱ بیماری‌های ناشی از نقص در پیکربندی پروتئین‌ها..... ۱۷

۱.۵.۱ آمیلوئیدی شدن سیستمی ارثی..... ۱۹

۶.۱ بیماری‌های تخریب کننده‌ی سیستم عصبی..... ۲۰

۱.۶.۱ بیماری آلزایمر ۲۰
۲.۶.۱ بیماری هانتینگتون ۲۲
۳.۶.۱ بیماری پارکینسون ۲۳
۴.۶.۱ بیماری اسکلروز آمیوتروفیک جانبی ۲۳
۷.۱ رهیافت سلول برای تنظیم کیفیت پروتئین ۲۳
۸.۱ پروتئین لیزوزیم ۲۵
۱.۸.۱ ساختار و عملکرد لیزوزیم سفیده تخم مرغ ۲۶
۲.۸.۱ فیبریل‌های آمیلوئیدی لیزوزیم در محیط خارج سلولی ۲۸
۳.۸.۱ نواحی بسیار مستعد تشکیل آمیلوئید در لیزوزیم سفیده تخم مرغ ۲۹
۹.۱ عوامل محیطی مؤثر بر روند تجمع پروتئین ۳۱
۱.۹.۱ اثر دما ۳۲
۲.۹.۱ اثر pH ۳۳
۳.۹.۱ اثر قدرت یونی ۳۳
۴.۹.۱ اثر تکان دادن ۳۴
۵.۹.۱ اثر دناتوره کننده‌ها ۳۴
۱.۵.۹.۱ اوره ۳۴
۲.۵.۹.۱ گوانیدین تیوسیانات ۳۵
۱۰.۱ نقش پیوندهای دی سولفیدی در تاخوردگی و پایداری پروتئین ۳۶
۱.۱۰.۱ اثر عوامل احیا کننده بر تجمع پروتئین ۳۸
۱.۱.۱۰.۱ دی‌تیوتریتول ۳۸
۲.۱.۱۰.۱ بتامرکاپتواتانول ۴۰
۱۱.۱ روش‌های مطالعه تشکیل تجمع‌های پروتئینی ۴۱
۱.۱۱.۱ طیف سنجی فلورسانس با استفاده از تایوفلاوین تی (ThT) ۴۱
۲.۱۱.۱ طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD) ۴۴
۱.۲.۱۱.۱ طیف ماورای بنفش دور دورنگ نمایی دورانی(Far UV-CD) ۴۵

۲.۲.۱۱.۱ طیف ماورای بنفش نزدیک دورنگ نمایی دورانی (Near UV-CD) ۴۶
۳.۱.۱۱ میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) ۴۶
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۴۸
۱.۲ مواد ۴۸
۲.۲ دستگاه‌ها ۴۹
۳.۲ روش‌های تهیه محلول‌ها ۵۰
۱.۳.۲ محلول‌های بافری ۵۰
۲.۳.۲ محلول لیزوزیم ۵۰
۳.۳.۲ محلول تایو فلاوین تی ۵۱
۴.۳.۲ محلول لیزوزیم- گوانیدین تیوسیانات ۵۱
۵.۳.۲ محلول لیزوزیم- دی‌تیوتریتول ۵۱
۶.۳.۲ محلول لیزوزیم- بتامرکاپتواتانول ۵۱
۷.۳.۲ دیالیز ۵۱
۴.۲ روش‌های مطالعه‌ی تجمع‌های پروتئینی ۵۲
۱.۴.۲ آماده‌سازی لیزوزیم جهت تشکیل تجمع‌های پروتئینی ۵۲
۲.۴.۲ بررسی اثر دی‌تیوتریتول بر تجمع لیزوزیم ۵۲
۳.۴.۲ بررسی اثر بتامرکاپتواتانول بر تجمع لیزوزیم ۵۳
۴.۴.۲ بررسی اثر دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول بر تجمع لیزوزیم تشکیل‌شده توسط گوانیدین تیوسیانات ۵۳
۵.۲ روش‌های آشکارسازی تجمع‌های آمیلوئیدی ۵۴
۱.۵.۲ آماده‌سازی نمونه‌ها برای طیف سنجی فلورسانس ۵۴
۲.۵.۲ آماده‌سازی نمونه‌ها برای طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی ۵۴
۳.۵.۲ آماده‌سازی نمونه‌ها برای تهیه‌ی عکس میکروسکوپ نیروی اتمی ۵۵
فصل سوم: نتیجه گیری و بحث ۵۶
۱.۳ تشکیل تجمع‌های پروتئینی توسط لیزوزیم در شرایط استاندارد ۵۶
۱.۱.۳ بررسی نتایج به‌دست آمده از طیف سنجی فلورسانس درحضور تایوفلاوین تی ۵۷

۲.۱.۳ نتایج به‌دست آمده از طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی..... ۵۸
۳.۱.۳ نتیجه‌های میکروسکوپ نیروی اتمی..... ۶۰
۴.۱.۳ نتیجه‌گیری..... ۶۳
۲.۳ بررسی اثر دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول بر تجمع‌های لیزوزیمی تشکیل شده در شرایط استاندارد ۶۳
۱.۲.۳ دی‌تیوتریتول..... ۶۳
۱.۱.۲.۳ نتیجه‌های طیف سنجی فلورسانس در حضور تایوفلاوین تی..... ۶۳
۲.۱.۲.۳ نتیجه‌های طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی..... ۶۵
۳.۱.۲.۳ نتیجه‌های میکروسکوپ نیروی اتمی..... ۶۶
۴.۱.۲.۳ نتیجه گیری..... ۶۸
۲.۲.۳ بتامرکاپتواتانول..... ۶۹
۱.۲.۲.۳ نتیجه‌های طیف سنجی فلورسانس در حضور تایوفلاوین تی..... ۶۹
۲.۲.۲.۳ نتیجه‌های طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی..... ۷۱
۳.۲.۲.۳ نتیجه‌های میکروسکوپ نیروی اتمی..... ۷۲
۴.۲.۲.۳ نتیجه گیری..... ۷۵
۳.۳ بررسی اثر دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول بر تجمع‌های لیزوزیمی تشکیل شده در حضور گوانیدین تیوسیانات..... ۷۶
۱.۳.۳ گوانیدین تیوسیانات..... ۷۶
۱.۱.۳.۳ نتیجه‌های طیف سنجی فلورسانس در حضور تایوفلاوین تی..... ۷۶
۲.۳.۳ اثر دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول..... ۷۸
۱.۲.۳.۳ نتیجه‌های طیف سنجی فلورسانس در حضور تایوفلاوین تی..... ۷۸
۲.۲.۳.۳ نتیجه‌های طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی..... ۸۰
۳.۲.۳.۳ نتیجه‌های میکروسکوپ نیروی اتمی..... ۸۰
۴.۲.۳.۳ نتیجه گیری..... ۸۳
۴.۳ انکوباسیون لیزوزیم با دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول و سپس تشکیل تجمع‌های پروتئینی در شرایط استاندارد. ۸۴
۱.۴.۳ نتیجه‌های طیف سنجی فلورسانس در حضور تایوفلاوین تی..... ۸۴
۲.۴.۳ نتیجه‌های طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی..... ۸۶

۳.۴.۳ نتیجه‌های میکروسکوپ نیروی اتمی..... ۸۷
۴.۳.۴.۳ نتیجه گیری..... ۸۸
۵.۳ نتیجه گیری نهایی..... ۸۹
۶.۳ مطالعات آینده ۹۰
مراجع..... ۹۱
واژه‌نامه فارسی به انگلیسی..... ۱۰۱
واژه‌نامه انگلیسی به فارسی..... ۱۰۸

شکل‌ها

عنوان **شماره صفحه**

شکل۱-۱ نقش چاپرون‌های مولکولی در تاخوردگی پروتئین..... ۳
شکل ۱-۲ دوباره تاخوردگی ریبونوکلئاز طبیعی گاوی..... ۵
شکل ۱-۳ ساختارهای فیبریلی، مدل و اجزای آن‌ها..... ۱۰
شکل ۱-۴ مراحل مختلف فرآیند تجمع پروتئین..... ۱۲
شکل ۱-۵ سینتیک پلی مریزاسیون هسته و الگوی تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی از طریق هسته‌ای شدن ۱۵
شکل ۱-۶ یک مدل ساده از تبدیل پیکربندی در پروتئین‌هایی که منجر به تشکیل گونه‌های بیماری‌زا می-شوند..... ۱۹
شکل ۱-۷ راه‌کارهای سلول در هموستازی پروتئین..... ۲۴
شکل ۱-۸ قسمتی از پپتیدوگلیکان دیواره سلولی سلول‌های باکتریایی و محل اثر آنزیم لیزوزیم..... ۲۵
شکل ۱-۹ نمایش ساختار سه بعدی لیزوزیم سفیده تخم مرغ..... ۲۷
شکل ۱-۱۰ ساختار دوم لیزوزیم..... ۲۷
شکل ۱-۱۱ ارتباط بین دما و پایداری ترمودینامیکی پروتئین..... ۳۲
شکل ۱-۱۲ ساختار اوره..... ۳۵
شکل ۱-۱۳ ساختار گوانیدین تیوسیانات..... ۳۵
شکل ۱-۱۴ ساختار لیزوزیم سفیده تخم مرغ که در آن موقعیت چهار پیوند دی سولفیدی نشان داده شده است..... ۳۷

شکل ۱-۱۵ ساختار دی‌تیوتریتول ۳۹
شکل ۱-۱۶ مکانیزم کلی واکنش کاهش پیوند دی سولفیدی توسط دی‌تیوتریتول ۳۹
شکل ۱-۱۷ ساختار بتامرکاپتواتانول ۴۰
شکل ۱-۱۸ مکانیزم عمل بتامرکاپتواتانول برای شکستن پیوند دی سولفیدی ۴۰
شکل ۱-۱۹ روش‌های متداول آزمایشگاهی با استفاده از تایوفلاوین تی ۴۳
شکل ۱-۲۰ اجزا دایره‌ای راست گرد (R) و چپ گرد (L) نور قطبی شده صفحه‌ای ۴۴
شکل ۱-۲۱ طیف ماورای بنفش دور CD همراه با انواع مختلف ساختار دوم در پروتئین‌ها ۴۵
شکل ۱-۲۲ اساس میکروسکوپ نیروی اتمی و اجزا مختلف آن ۴۷
شکل ۳-۱ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در شرایط ۵۴° C و pH ۲ ..... ۶۰
شکل ۳-۲ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در شرایط ۵۴° C و pH ۲ ..... ۶۱
شکل ۳-۳ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در شرایط ۵۴° C و pH ۲ ..... ۶۱
شکل ۳-۴ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم در شرایط ۵۴° C و pH ۷ ..... ۶۲
شکل ۳-۵ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (ابتدا ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط ۵۴° C و pH ۲) پس از ۱ ساعت انکوباسیون با دی‌تیوتریتول با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار ۶۷
شکل ۳-۶ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (ابتدا ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط ۵۴° C و pH ۲) پس از ۲ ساعت انکوباسیون با دی‌تیوتریتول با غلظت ۰/۱ میلی-مولار ۶۷
شکل ۳-۷ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (ابتدا ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط ۵۴° C و pH ۲) پس از ۸ ساعت انکوباسیون با دی‌تیوتریتول با غلظت ۰/۱ میلی-مولار ۶۷
شکل ۳-۸ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم پس از ۲۴ انکوباسیون با بتامرکاپتواتانول با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در شرایط ۵۴ ° C و pH ۲ ..... ۷۲
شکل ۳-۹ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم (ابتدا ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط ۵۴° C و pH ۲) پس از ۱ ساعت انکوباسیون با بتامرکاپتواتانول با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار ۷۲

شکل ۳-۱۰ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم (ابتدا ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط ۵۴° C و ۲ pH) پس از ۲ ساعت انکوباسیون با بتا مر کاپتو اتانول با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار..... ۷۲
شکل ۳-۱۱ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم (ابتدا ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط ۵۴° C و ۲ pH) پس از ۸ ساعت انکوباسیون با بتامرکاپتواتانولبا غلظت ۰/۱ میلی‌مولار..... ۷۳
شکل ۳-۱۲ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون حاوی گوانیدین تیوسیانات ۲ مولار..... ۸۱
شکل ۳-۱۳ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم (ابتدا ۲۴ ساعت انکوباسیون با گوانیدین تیوسیانات) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون حاوی دی‌تیوتریتول با غلظت ۰/۱ میلی مولار در دمای ۲۵°C..... ۸۱
شکل ۳-۱۴ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم (ابتدا ۲۴ ساعت انکوباسیون با گوانیدین تیوسیانات) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون حاوی بتامرکاپتواتانول با غلظت ۰/۱ میلی مولار در دمای ۲۵°C..... ۸۲
شکل ۳-۱۵ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم که ابتدا ۲۴ ساعت در شرایط ۲۵°C و ۷ pH و سپس ۲۴ ساعت دیگر در شرایط ۵۴°C و ۲ pH انکوبه شدند..... ۸۷
شکل ۳-۱۶ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم حاوی دی‌تیوتریتول که ابتدا ۲۴ ساعت در شرایط ۲۵°C و ۷ pH و سپس ۲۴ ساعت دیگر در شرایط ۵۴°C و ۲ pH انکوبه شدند..... ۸۷
شکل ۳-۱۷ تصویرهای AFM نمونه لیزوزیم حاوی بتامرکاپتواتانول که ابتدا ۲۴ ساعت در شرایط ۲۵°C و ۷ pH و سپس ۲۴ ساعت دیگر در شرایط ۵۴°C و ۲ pH انکوبه شدند..... ۸۸

نمودارها

عنوان **شماره صفحه**

نمودار ۳-۱ افزایش چشمگیر نشر فلورسانس در نمونه لیزوزیم انکوبه شده در شرایط مورد نیاز برای تشکیل تجمع‌های پروتئینی در مقایسه با نمونه‌های شاهد لیزوزیم..... ۵۸
نمودار ۳-۲ اثر زمان‌های مختلف انکوباسیون با دی‌تیوتریتول بر تجمع لیزوزیم..... ۶۴
نمودار ۳-۳ اثر زمان‌های مختلف انکوباسیون با بتامرکاپتواتانول بر تجمع لیزوزیم..... ۷۰
نمودار ۳-۴ اثرگوانیدین تیوسیانات بر تجمع‌پذیری لیزوزیم..... ۷۸
نمودار ۳-۵ اثر دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول بر تجمع‌های تشکیل شده توسط گوانیدین تیوسیانات..... ۷۹
نمودار ۳-۶ ۲۴ ساعت انکوباسیون دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول با لیزوزیم و سپس تشکیل تجمع‌های

لیزوزیمی و بررسی اثر دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول روی این تجمع‌ها..... ۸۴

طیف‌ها

عنوان **شماره صفحه**

طیف ۳-۱ افزایش نشر فلورسانس در نمونه لیزوزیم انکوبه شده در شرایط مورد نیاز برای تشکیل تجمع-های پروتئینی در مقایسه با نمونه‌های شاهد..... ۵۷
طیف ۳-۲ طیف‌های CD مربوط به نمونه‌های شاهد لیزوزیم در pH ۷ و pH ۲ و نمونه لیزوزیم انکوبه شده در شرایط مورد نیاز برای تشکیل تجمع‌های پروتئینی..... ۵۹
طیف ۳-۳ طیف‌های CD مربوط به اثر دی‌تیوتریتول در زمان‌های مختلف بر تشکیل تجمع‌های پروتئینی لیزوزیم..... ۶۶
طیف ۳-۴ طیف‌های CD مربوط به اثر بتامرکاپتواتانول در زمان‌های مختلف بر تشکیل تجمع‌های پروتئینی لیزوزیم..... ۷۱
طیف ۳-۵ طیف‌های CD مربوط به اثر دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول بر تجمع‌های تشکیل شده توسط گوانیدین تیوسیانات..... ۸۰
طیف (۳-۶) طیف‌های CD مربوط به اثر دی‌تیوتریتول و بتامرکاپتواتانول در شرایط ۲۴ ساعت انکوباسیون همراه با لیزوزیم و سپس رساندن به شرایط استاندارد تشکیل تجمع (۵۴° C و pH ۲) و ۲۴ ساعت انکوباسیون مجدد..... ۸۶

جدول‌ها

عنوان **شماره صفحه**

جدول ۱-۱ انواع آمیلوئیدی‌شدن سیستمی..... ۲۱
جدول ۲-۱ مواد زیستی و شیمیایی مورد استفاده..... ۴۸

جدول ۲-۲ مشخصات دستگاه‌ها..... ۴۹
جدول ۳-۱ درصد مارپیچ آلفا در ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر در نمونه‌های شاهد لیزوزیم در pH ۷ و pH ۲..... ۶۰
جدول ۳-۲ ابعاد تجمع‌های لیزوزیم در شرایط مختلف در غیاب عوامل احیا کننده..... ۶۲
جدول ۳-۳ درصد کاهش نشر فلورسانس در نمونه‌های انکوبه شده با دی‌تیوتریتول..... ۶۵
جدول ۳-۴ ابعاد تجمع‌های پروتئینی در نمونه‌های انکوبه شده با دی‌تیوتریتول..... ۶۸
جدول ۳-۵ درصد تغییرات نشر فلورسانس در نمونه‌های انکوبه شده با بتامرکاپتواتانول..... ۷۱
جدول ۳-۶ ابعاد تجمع‌های پروتئینی در نمونه‌های انکوبه شده با بتامرکاپتواتانول..... ۷۵
جدول ۳-۷ درصد کاهش نشر فلورسانس در تجمع‌های پروتئینی تشکیل شده در حضور گوانیدین تیوسیانات و سپس انکوباسیون با دی‌تیوتریتول و یا بتامرکاپتواتانول..... ۷۹
جدول ۳-۸ ابعاد تجمع‌های پروتئینی تشکیل شده در حضور گوانیدین تیوسیانات و سپس انکوباسیون با دی‌تیوتریتول و یا بتامرکاپتواتانول..... ۸۲
جدول ۳-۹ درصد کاهش نشر فلورسانس در نمونه‌های دارای دی‌تیوتریتول و یا بتامرکاپتواتانول..... ۸۵
جدول ۳-۱۰ ابعاد تجمع‌های پروتئینی در نمونه‌های دارای دی‌تیوتریتول و یا بتامرکاپتواتانول..... ۸۶

فصل اول

مقدمه

۱.۱ ساختار و عملکرد پروتئین

پروتئین‌ها ساختارهای پلیمری از اسیدهای آمینه هستند و سه سطح ساختاری اول[۱]، دوم[۲] و سوم[۳] در آن‌ها قابل تشخیص است. برخی از پروتئین‌ها که حداقل باید از دو زنجیر پلی پپتیدی تشکیل شده باشند دارای یک سطح ساختاری چهارم نیز هستند که نحوه قرار گرفتن زیرواحدهای پلی پپتیدی را در پروتئین مزبور نشان می دهد.

پیش بینی ساختار دوم پروتئین‌ها گام مهمی برای پیش‌بینی ساختار سوم آنها است [۱-۳]. پائولینگ[۴] و همکاران [۴] اولین کسانی بودند که با مطالعه‌های بلور سنجی وجود ساختارهای دوم را در پروتئین-ها نشان دادند [۳].

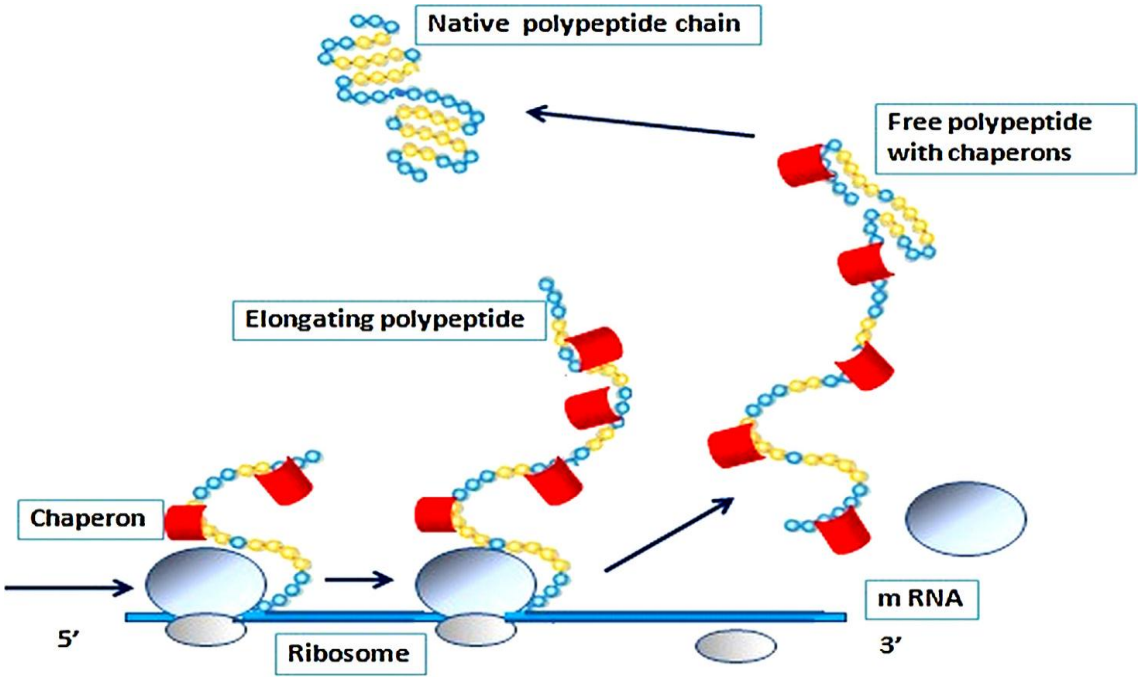
ساختار سوم پروتئین‌ها به تاخوردگی سوم یک پروتئین اشاره دارد. پایداری ساختار سوم شامل میان کنش بین اسید آمینه‌هایی می‌باشد که در توالی اولیه به صورت کاملاً جدا قرار گرفته‌اند. این میان کنش‌ها شامل موارد ذیل می‌باشند: میان کنش‌های ضعیف مانند پیوندهای هیدروژنی[۵] و همچنین میان کنش‌های واندروالس[۶]، پیوندهای یونی[۷] شامل گروه‌های زنجیره جانبی اسید آمینه‌های باردار مثبت و منفی و همچنین پیوندهای دی سولفیدی[۸] که پیوندهای کووالانی[۹] هستند که از طریق اکسید شدن

[1] Primary structure
[2] Secondary structure
[3] Tertiary structure
[4] Linus Pauling
[5] Hydrogen bonds
[6] Van der Waals interactions
[7] Ionic bonds
[8] Disulfide bonds
[9] Covalent bonds

گروه‌های تیول[1] دو باقی‌مانده سیستئین[2] تشکیل می‌شوند. میان کنش با حلال آبی به عنوان اثر آب - گریز[3] نامیده می‌شود که منجر به مدفون شدن باقی‌مانده‌هایی با زنجیره‌های جانبی غیرقطبی در بخش درونی پروتئین می‌شود. برعکس، زنجیره‌های جانبی اسید آمینه‌های قطبی تمایل به قرار گرفتن در سطح پروتئین دارند که در دسترس محیط آبی باشند.

پروتئین‌ها و پپتیدها ترکیب‌های اصلی سلول هستند که به ارگانیسم‌ها اجازه می‌دهند اعمال حیاتی، از طریق میان کنش در شبکه‌های مولکولی پیچیده اجرا شوند [۵]. پروتئین‌هایی که درون یک سلول ساخته می‌شوند پروتئوم[4] آن را تشکیل می‌دهند. این مولکول‌های پروتئینی تقریبا مسئول تمام اعمال زیستی سلول هستند. اینکه چگونه پروتئین‌ها تکامل یافته‌اند همواره یکی از مسائل شگفت انگیز در علم زیست شناسی بوده است [۶]. فرآیند تاخوردگی در داخل سلول[5] و یا در درون لوله آزمایش[6]، به پروتئین‌های دیگری نیز نیاز دارد که چاپرون‌های مولکولی[7] نام دارند. چاپرون‌ها پروتئین‌های اختصاصی هستند که پروتئین‌های تاخورده را از پروتئین‌های بدتاخورده[8] و تجمع یافته، در محیط بسیار شلوغ سلولی محافظت می‌کنند [۷]. چاپرون مولکولی، پروتئینی است که با پروتئین غیرطبیعی[9] میان کنش و به پایداری آن کمک می‌کند تا پیکربندی طبیعی خود را به دست آورد شکل (۱-۱). پروتئین تازه تولید شده، زمان خروج از ریبوزوم به چاپرون متصل می‌شود و این سبب تاخوردگی مناسب پروتئین می‌شود. بعد از تاخوردگی، چاپرون‌ها از پلی پپتیدی که حال دارای ساختار طبیعی است جدا می‌شوند. از جمله‌ی چاپرون‌ها می‌توان به پروتئین شوک حرارتی[10] و چاپرونین[11] اشاره کرد. با وجود همه این مکانیزم‌ها پروتئین‌ها همیشه به‌طور صحیح تا نمی‌خورند [۸].

[1] Thiol group
[2] Cysteine residue
[3] Hydrophobic effect
[4] Proteome
[5] *In vivo*
[6] *In vitro*
[7] Molecular chaperones
[8] Misfolded
[9] Non-native
[10] Heat-shock protein
[11] Chaperonin



شکل (۱-۱) نقش چاپرون‌های مولکولی در تاخوردگی پروتئین. پروتئین تازه تولید شده هنگامی که از ریبوزوم خارج می‌شود به چاپرون متصل می‌شود و این کار به تاخوردگی مناسب پروتئین کمک می‌کند. بعد از تاخوردگی، چاپرون‌ها از پلی‌پپتیدی که دارای ساختار طبیعی است جدا می‌شوند [۸].

۲.۱ تاخوردگی پروتئین[۱]

تاخوردگی پروتئین تحت شرایط فیزیولوژیکی مناسب، فرآیندی خودبه‌خودی[۲] است و غالباً توسط توالی اسید آمینه پروتئین تعیین می‌شود. تاخوردن پروتئین به حالت طبیعی، نقش حیاتی در بیان اطلاعات ژنتیکی دارد. تاخوردگی پروتئین‌ها که منجر به شکل سه‌بعدی خاص آن‌ها می‌شود، یکی از اساسی‌ترین و عمومی‌ترین مثال‌های خود تجمعی[۳] است.

مشخص کردن فرآیندی که از طریق آن تاخوردگی پروتئین اتفاق می‌افتد، یکی از چالش‌های بزرگ در بیوشیمی و علوم سلولی مولکولی است. بنا بر آن چه اشاره شد، در سلول فرآیند شکل گیری ساختار طبیعی و فعال پروتئین‌ها تحت بررسی هستند و اگر فرآیند تاخوردگی دچار نقص شود سلول یا از تشکیل محصول های بدتاخورده، قبل از اینکه باعث هرگونه ضرری شوند، جلوگیری می‌کند و یا پس از تشکیل آن‌ها را تخریب می‌کند. در مواقعی که این مکانیزم‌ها کارآیی کافی نداشته باشند،

[1] Protein folding
[2] Spontaneous process
[3] Self-assembly

پروتئین‌ها مستعد به تشکیل تجمع خواهند بود و تشکیل تجمع‌های پروتئینی و پپتیدی می‌تواند با مکانیسم‌های مختلف به سلول‌ها صدمه زده یا باعث کشته شدن آن‌ها شود.

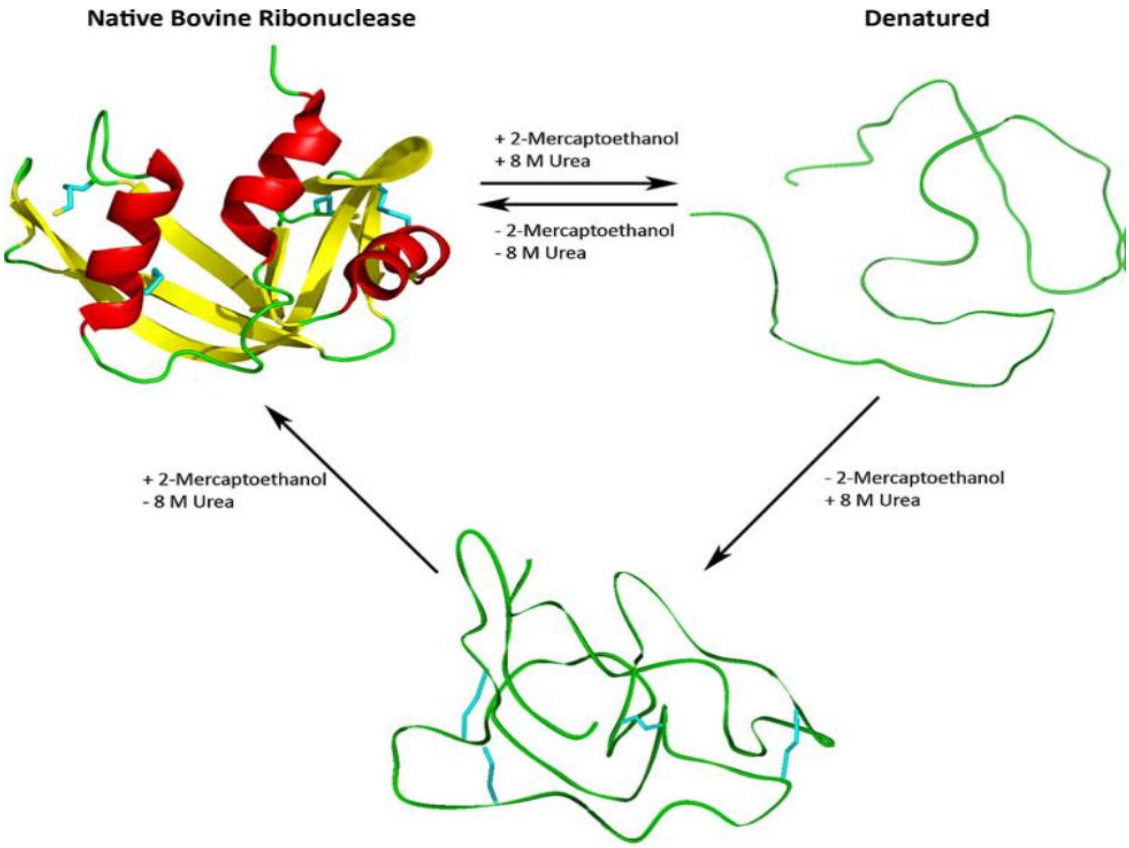
۱.۲.۱ تاریخچه تاخوردگی پروتئین

مطالعه در باب تاخوردگی پروتئین به بیش از نیم قرن پیش و به کارهای آنسون[۱] و میرسکی[۲] بر می‌گردد [۹]. آن‌ها مشاهده کردند که غیرطبیعی شدن (دناتوره) پروتئین[۳] فرآیندی برگشت پذیر[۴] است. سپس میرسکی و پائولینگ دریافتند که پروتئین طبیعی ساختار مشخص و ویژه‌ای دارد و تحت شرایط غیرطبیعی شدن از دست می‌رود [۱۰]. این مشاهدات سرانجام به کارهای تجربی بسیار روشنگر انفینسن[۵] و همکارانش بر روی ریبونوکلئاز آ[۶] ختم شد [۱۱].

آن‌ها مشاهده کردند که ریبونوکلئاز غیرطبیعی شده که تحت شرایط کاهش[۷] قرار داشت، به طور خود به خود و با تجدید کامل فعالیت آنزیمی دوباره طبیعی[۸] و چهار پیوند دی سولفیدی آن به شکل طبیعی تشکیل می‌شد.

آزمایش انفینسن و همکاران در شکل (۱-۲) نشان داده شده است. ابتدا ریبونوکلئاز گاوی طبیعی[۹] توسط اوره[۱۰] ۸ مولار و تحت شرایط کاهش (با استفاده از ۲- مرکاپتواتانول[۱۱]) دناتوره شد. پس از خروج عوامل دناتوره کننده از محیط، آن‌ها مشاهده کردند که ریبونوکلئاز پس از مدت زمانی پیکربندی طبیعی خود را دوباره بازیافت. آن‌ها همچنین دریافتند در حضور اوره و در نبود مرکاپتواتانول مخلوط درهمی[۱۲] از ایزومرهای[۱۳] دی سولفید بدتاخورده می‌شود. متعاقباً با حذف کردن

[1] Anson
[2] Mirsky
[3] Protein denaturation
[4] Reversible
[5] Anfinsen
[6] Ribonuclease A
[7] Reduction
[8] Renature
[9] Native Bovine Ribonuclease
[10] Urea
[11] 2-Mercaptoethanol
[12] Scrambled mixture
[13] Isomer



شکل (۱-۲) دوباره تاخوردگی ریبونوکلئاز طبیعی گاوی. ریبونوکلئاز طبیعی گاوی که توسط اوره ۸ مولار و ۲- مرکاپتواتانول دناتوره شده است، هنگامی‌که عوامل دناتوره کننده برداشته شوند، به طور خود به خودی دوباره به پیکربندی طبیعی تا می‌خورد. اکسیداسیون پلی پپتیدی که به طور کامل دناتوره شده است در حضور اوره ۸ مولار و در نبود ۲- مرکاپتواتانول منجر به تولید مخلوط درهمی از ایزومرهای دی‌سولفید بدتاخورده می‌شود. با حذف اوره و اضافه کردن ۲- مرکاپتواتانول بازآرایی دی سولفیدی پروتئین بد تاخورده به پیکربندی طبیعی آن برمی‌گردد و فعالیت کامل آنزیمی حاصل می‌شود [۸].

اوره و در حضور ۲- مرکاپتواتانول بازآرایی دی سولفیدی پروتئین بدتاخورده اتفاق افتاد و پیکربندی طبیعی ریبونوکلئاز و بازگشت فعالیت کامل آنزیمی حاصل شد.

انفینسن نشان داد که یک پروتئین کروی[1] قادر به تاخوردگی خود به خودی در لوله آزمایش می‌باشد که این امر به طور کامل بستگی به توالی اسید آمینه آن در محیط مفروض دارد. تاخوردگی پروتئین

[1] Globular protein

در لوله آزمایش، بارزترین نمونه از خودسازماندهی[1] است. جالب آن‌که در این مثال کلاسیک هیچ مولکول زیستی دیگری برای تاخوردن طبیعی زنجیره پلی پپتیدی لازم نیست [۸].

تاخوردگی پروتئین هنوز یکی از اساسی‌ترین و پررمزترین مسئله‌های زیست شناسی ساختاری است. علی رغم پیشرفت‌های چند دهه اخیر، هنوز معمای تاخوردگی پروتئین یکی از مهم ترین و بلکه مهم ترین چالش بیوشیمیایی است. سؤال اساسی این است که نیروهایی که یک زنجیره پلی پپتیدی را به سمت ساختارهای خاصی، از میان بی‌نهایت ساختارهای ممکن، هدایت می‌کنند کدام‌اند و چگونه عمل می‌کنند؟ در مورد چگونگی تحقق تاخوردگی پروتئین دو نظریه مشهور وجود دارد : نظریه انفینسن و همکارانش که متعاقب تحقیق بر روی تاخوردگی ریبونوکلئاز آ ارائه شد و دیگری تناقض لوینتال[2] که توسط سایپراس لوینتال[3] مطرح شد [۱۲].

همان‌طور که گفته شد، انفینسن و همکارانش نشان دادند که ریبونوکلئاز آ می‌تواند به صورت خود به خود و تحت شرایط خارج سلولی، یعنی در لوله آزمایش، ساختار طبیعی خود را باز یابد. این مشاهده‌ها منجر به طرح سوال بعدی شد: آیا این ساختار طبیعی بنا بر ضرورت با جستجوی تصادفی ساختارهای بسیار متنوعی که به طور بالقوه می تواند تحقق یابد به دست می‌آید؟

در سال ۱۹۶۹ لوینتال این گونه بیان کرد که در صورت قبول نقشی برای تصادف، این جستجو مدت زمانی بسیار طولانی طول خواهد کشید. به عنوان مثال پروتئینی با صد باقی‌مانده، در صورتی که رسیدن به هر ساختار و عدم مطلوبیت آن از نظر حداقل انرژی فقط $۱۰^{-۱۱}$ ثانیه طول بکشد، $۱۰^{۵۲}$ سال برای رسیدن به ساختاری با بیشترین پایداری و حداقل انرژی نیاز خواهد داشت!

این به شدت در تضاد است با مقیاس زمانی میلی ثانیه‌ای که یک پروتئین به طور معمول در طی آن به ساختار طبیعی خود تا می‌خورد. او نتیجه گرفت که جستجوهای تصادفی روش مؤثری برای یافتن حالت تاخورده صحیح پروتئین نیستند. این نظریه بعدها به عنوان " تناقض لوینتال" شناخته شد.

بنابراین مشخص است که حدواسط‌های تاخوردگی یا مسیرهایی وجود دارند که از طریق آن‌ها پروتئین‌های در حال شکل‌گیری سریع‌تر به ساختار طبیعی می‌رسند. از آن زمان تا کنون پیشرفت‌های

[1] Self-organization
[2] Levinthal Paradox
[3] Cyprus Levinthal