دانشگاه سیستان و بلوچستان
تحصیلات تکمیلی

پایان نامه کارشناسی ارشد در زیست شناسی-بیوشیمی

عنوان:

بررسی مکانیسم اثر کروسین برروی تشکیل، تجمع و رسوب نانوفیبریل AB1-40 دخیل در بیماری آلزایمر

استاد راهنما:

دکتر آرزو قهقائی

استاد مشاور:

دکتر سیده زهرا بطحائی

تحقیق و نگارش:

المیرا بهرامی نژاد

(این پایان نامه از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه سیستان و بلوچستان بهره مند شده است)

بهمن ماه 1390

بسمه تعالی

این پایان نامه با عنوان **بررسی مکانیسم اثر کروسین برروی تشکیل، تجمع و رسوب نانوفیبریل AB1-40 دخیل در بیماری آلزایمر** قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد **بیوشیمی** توسط دانشجو **المیرا بهرامی نژاد** با راهنمایی استاد پایان نامه **آرزو قهقائی** تهیه شده است. استفاده از مطالب آن به منظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه سیستان و بلوچستان مجاز می باشد.

المیرا بهرامی نژاد

این پایان نامه ..... واحد درسی شناخته می شود و در تاریخ ..... توسط هیئت داوران بررسی و درجه ..... به آن تعلق گرفت.

	نام و نام خانوادگی	**امضاء**	**تاریخ**
استاد راهنما:	دکتر آرزو قهقائی		
استاد راهنما:			
استاد مشاور:	دکتر سیده زهرا بطحائی		
داور 1:	دکتر علی شهرکی		
داور 2:	دکتر محمد هاشمی		
نماینده تحصیلات تکمیلی:	دکتر جعفر ولیزاده		

دانشگاه سیستان و بلوچستان

تعهدنامه اصالت اثر

اینجانب المیرا بهرامی نژاد تعهد می کنم که مطالب مندرج در این پایان نامه حاصل کـار پژوهشـی اینجانب است و به دستاوردهای پژوهشی دیگران که در این نوشته از آن استفاده شده است مطابق مقررات ارجاع گردیده است. این پایان نامه پیش از این برای احراز هیچ مدرک هم سطح یـا بـالاتر ارائه نشده است.

کلیه حقوق مادی و معنوی این اثر متعلق به دانشگاه سیستان و بلوچستان می باشد.

نام و نام خانوادگی دانشجو: المیرا بهرامی نژاد

امضاء

تقدیم به:

پدرم، به پاس کرانه فداکاری و عشق بی‌کرانش که همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر،

که از نگاهش صلابت، از رفتارش محبت، و از صبرش ایستادگی را آموختم

برادرانم و خواهرم امضاء

و به تمام آزادمردانی که نیک می‌دانند وجدان و منطق را پیشه خود نموده و جز رضای الهی و

پیشرفت و سعادت جامعه، هدفی ندارند.

سپاسگزاری

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت. خداوند مهربان را شاکرم که مرا نیرو بخشید تا نگارش پایان نامه پیش رو را به اتمام برسانم. بر خود لازم می دانم کمال تقدیر و تشکر خود را نثار کسانی کنم که در این مسیر پر فراز و نشیب لحظه ای از راهنمایی، پشتیبانی و تشویق من دریغ نکردند. از استاد بردبارم، سرکار خانم دکتر آرزو قهقائی، که تمام روزهایی که تحت نظارت ایشان مشغول به کار بودم سرشار از آموختن توامان علم و اخلاق بود، نهایت تشکر را دارم. در پرتو روحیه پر از امید ایشان بود که تمام دلسردی ها رنگ می باخت و در سایه وجود خستگی ناپذیرشان، پرسش های گاه و بی گاهم پاسخ می یافت، کسی که به من اندیشیدن را آموخت نه اندیشه ها را. از سرکارخانم دکتر سیده زهرا بطحائی که مشاوره این پایانامه را برعهده داشتند نیز کمال تشکر را دارم. آموختن نحوه انجام یک کار تحقیقاتی در کنار لذت بردن از کار گروهی بدون شناخت این دو عزیز امکان پذیر نبود و بی شک این آموخته ها در زندگی نیز بسیار به کارم خواهد آمد. از خانواده عزیزم که از کودکی، شور دانستن و لذت کشف و جستجو را در من بیدار کردند، استقامت در تلاش را به من آموختند و در تمام این سال ها با فراهم کردن آرامش فکری و آسایش روحی، بسیاری دشواری ها را بر من آسان نمودند، با تمام وجود قدردانم. از استاد ارجمند جناب آقای دکتر علی شهرکی به خاطر در اختیار گذاشتن کتابشان که در نگارش این پایانامه بسیار به من کمک کرد، کمال تشکر را دارم. از استادان ارجمند آقایان دکتر ترکمن زهی، سنگتراش، ولیزاده و سایر اساتید گروه زیست شناسی دانشگاه سیستان و بلوچستان بسیار سپاسگزارم. در پایان لازم می دانم از دوستانی که در تدوین این پایان نامه همکاری نمودند و در مدت تحصیل من در این مقطع همواره پشتیبان و یاور من بودند تشکر و قدردانی نمایم، خانم ها نجمه مزدوری، شیوا زارع، مهسا ابراهیمیان، مهرناز جامی، مهسا ذاکری، فاطمه گنجعلی، فریبا فتحی، الناز بیرجندیان، نسیم فریدی، نوشین شریفی، صغری خسروانی، آمنه نصیری، نعیمه ستاره شناس، بهاره نعمتی مود، عطیه اصلاحی، نیرالسادات فاطمی، مونا خسروی، و آقایان سینا صابر، امیرحسین میرحسینی، میر محمد خلیلی، فرزاد رحمانی، محمد ملکی، عباس محبی، محمود صالحی. بی شک بدون تلاش این عزیزان انجام این پروژه تحقیقاتی ممکن نبود.

چکیده:

بیماری آلزایمر، یکی از مهمترین مشکلات بهداشتی-درمانی در جهان می باشد. دو نشانه پاتولوژیکی این بیماری عبارتند از پلاک های بتا آمیلوئیدی خارج سلولی و نوروفیبریلاری تانگلهای درون سلولی. $A\beta_{1-40}$ در حدود90 % از آمیلوئید های بتا حاصل از پردازش APP را تشکیل می دهد که به صورت محلول می باشد. کروسین یکی از ترکیبات رنگی موجود در زعفران و جزو کارتنوئید های غیر معمول محلول در آب، به واسطه گلیکوزیلاسیون بالایش می باشد. مطالعات گوناگونی اثرات آنتی اکسیدانتی و ضد سرطانی و ضد آپاپتوزی عصاره زعفران و کروسین را نشان داده اند ولیکن مکانیسم اثر آن بر تجمع فیبریل های آمیلوئیدی هنوز ناشناخته است. در این مطالعه به بررسی اثر کروسین برروی تشکیل، تجمع و رسوب یکی از بتا آمیلوئید های دخیل در بیماری آلزایمر ($A\beta_{1-40}$) پرداخته شده است. تشکیل فیبریل $A\beta_{1-40}$ و تاثیر کروسین بر مهار تشکیل آن با استفاده از روش باند شدن تایو فلاوین و تکنیک باند شدن ای ان اس و تغییرات ساختاری با تکنیک دو رنگ نمایی حلقوی (CD) و شکل فیبریل ها با TEM مورد بررسی قرار گرفت. داده های حاصل از تیوفلاوین نشان دهنده این مطلب است که فیبریل های آمیلوئیدی در دمای $37^{\circ}c$ و در مدت 15 روز تشکیل شده و کروسین در حدود 25% مهار کنندگی از این تشکیل را دارد. بر اساس نتایج حاصل از ANS مشخص شد که کروسین میزان هیدروفوبیسیته در معرض را از طریق کاهش تشکیل فیبریل پروتئینی کاهش می دهد. در بررسی ساختار دوم این پروتئین به وسیله تکنیک CD نیز اثر کروسین مشهود بوده و در مطالعه میکروسکوپی نیز تفاوت فاحشی میان دو نمونه بدون کروسین و با کروسین دیده شد. در مجموع کروسین برروی تشکیل و رسوب فیبریل $A\beta_{1-40}$ تاثیر گذاشته و تاثیر مهاری برروی تجمع و رسوب و تشکیل آن دارد.

واژگان کلیدی: بیماری آلزایمر، کروسین، بتا آمیلوئید40 -1، تجمع، رسوب نانو فیبریل

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه 1

1-1- تجمع و Aggregation پروتئین ها..... 2

1-2- مراحل تشکیل تجمعات پروتئینی..... 4

1-3- مکانیسم های متفاوت در تشکیل تجمعات پروتئینی..... 4

1-4- تجمعات آمیلوئیدی..... 6

1-5- ساختار فیبریل های آمیلوئیدی..... 8

1-6- مضرات شکل گیری آمیلوئید ها..... 9

1-7- سلول های مغز..... 10

1-8- بیماری آلزایمر..... 11

1-9- آلزایمر کیست؟..... 13

1-10- چه عواملی بیماری آلزایمر را ایجاد می کنند؟..... 14

1-11- پروتئین پیش ساز آمیلوئید..... 15

1-12- ساختار پروتئین پیش ساز آمیلوئید..... 16

1-13- پروتئین بتا آمیلوئید..... 16

1-14- فرضیه های آبشار آمیلوئیدی..... 20

1-15- فاکتورهای ژنتیکی بیماری آلزایمر..... 22

1-16- پروتئین Tau و نوروفیبریلاری تانگل ها..... 24

1-17- چه بخشهایی از مغز در آلزایمر آسیب می بینند؟..... 25

1-18- حافظه و یادگیری 26
1-19- داروهایی که بیماری آلزایمر را درمان می کنند 27
1-19-1-مهار کننده های استیل کولین 28
۱-۱۹-۲- داروهای ضد کولین استراز جدیدتر 29
1-19-3- آگونیست های گیرنده استیل کولین 29
۱-۱۹-٤- نیکوتین 31
1-19-5- افزایش دهنده های متابولیک 31
1-19-6- داروهایی که روی گیرنده های 5HT اثر می کنند 32
1-19-7- آگونیست های گیرنده های گلوتامات 32
1-19-8- آنتاگونیست های گیرنده های گلوتامات 33
1-19-9-مهارکننده های کلسیم 33
1-19-10- آنتی اکسیدان ها 33
1-19-11- ترکیبات و داروهای ضد التهابی 33
1-19-12- فاکتورهای رشد 34
1-19-13- مهارکننده های آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین (ACE) 34
1-19-14-استروئید ها 35
1-19-15- داروهایی که روی بتا آمیلوئید موثر هستند 35
۱-۲۰- زعفران 36
۱-۲۱- شیمی عفران 36
1-21-1- ترکیبات شیمیایی زعفران 36
1-22- اهداف پروژه 41

فصل دوم: مواد و روش ها 42

2-1- مواد شیمیایی و پروتئین ها 43
2-2- آماده سازی پروتئین بتا آمیلوئید 1-40 ($A\beta_{1-40}$) 43

2-3- آماده سازی پروتئین بتا آمیلوئید 40-1 ($A\beta_{1-40}$) 43

2-4- محاسبه درصد مهارکنندگی 44

2-5- بررسی تیوفلاوین تی (ThT)..... 44

2-6- بررسی 1- آنیلینو-8-نفتالن-سولفونات (ANS) 44

2-7- اسپکتروسکوپی دورنگ تمایی حلقوی (CD) 44

2-8- میکروسکوپ الکترونی 45

فصل سوم: نتایج 46

3-1- بررسی اثر کروسین بر تشکیل نانوفیبریل آمیلوئید 40-1 به وسیله اتصال تیوفلاوین تی (T).... 47

3-2- مطالعه اتصال 8- آنیلینو-1-نفتالن سولفونات به پپتید بتا آمیلوئید 40-1 در حضور و غیاب کروسین..... 51

3-3- طیف سنجی دو رنگ نمایی حلقوی[1] (CD) بتا آمیلوئید 40-1..... 54

3-4- بررسی نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی 57

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری 60

منابع 63

۱- Circular Dichroism

فهرست جدول ها

عنوان جدول **صفحه**

جدول 1-1- موقعیت، پروتئین و ژن دخیل در بیماری آلزایمر 23

جدول 1-2- داروهای مورد استفاده در بیماری آلزایمر 28

جدول 1-3- داروهای در حال توسعه برای بیماری آلزایمر 30

جدول 3-1: خلاصه ای از ثابت های سرعت بتا آمیلوئید در حضور و غیاب کروسین..... 51

جدول 3-2- طیف مربوط به ساختار های دوم در حضور و غیاب کروسین 57

فهرست شکل ها

عنوان شکل **صفحه**

شکل 1-1- تصویر مسیرهای دو طرفه فولدینگ و آنفولدینگ پروتئین ها 5

شکل 1-2- نمایش انواع تجمعات پروتئینی شکل گرفته در بیماری های مختلف ناشی از تجمع پروتئین ها. 6

شکل1-3- میکروگراف الکترونی از فیبریل های آمیلوئیدی دارای ساختار خطی، بدون شاخه و انعطاف پذیر. 8

شکل 1-4- نمایش یک فیبریل متشکل از چهار عدد پروتوفیلامنت 9

شکل1-5- مقایسه برش مغزی فرد مبتلا به بیماری آلزایمر و فرد سالم 12

شکل1-6. حضور تعداد زیادی از پلاک های آمیلوئیدی و نوروفیبریلاری تانگل ها در داخل سلولهای عصبی..... 15

شکل 1-7- ساختار پروتئین پیش ساز آمیلوئید 16

شکل1-8- تشکیل پپتیدهای متفاوت بر اثر عملکردآنزیم های سکرتاز آلفا، بتا و گاما 17

شکل 1-9.- پلاک های عروق مغزی حاصل از تجمع فیبریل های$A\beta_{1-40}$..... 19

شکل 1-10- فعالیت سکرتازها 22

شکل 1-11- نحوه تشکیل نوروفیبریلاری تانگل ها 25

شکل 1-12.- بخش های درگیر در بیماری آلزایمر 26

شکل 1-13- ساختار شیمیایی کروسین، کروستین، پیکروکروسین و زعفرانال 37

شکل3-1- ساختار و فرمول باز تیوفلاوین تی 48

شکل3-2. تشکیل فیبریل آمیلوئید بتا 40-1 در حضور و غیاب کروسین 50

شکل3-3- نتایج نشر فلورسانس برای اتصال نشانگر هیدروفوبیک ANS به پروتئین بتا آمیلوئید 40-1، در حضور وغیاب کروسین 54

شکل3-4. طیف Far UV CD 56

شکل 3-5- تصاویر مربوط به تشکیل فیبریل های آمیلوئیدی بتا 40-1..... 59

فصل اول

مقدمه

1-1- تجمع و Aggregation پروتئین ها

تجمع پدیده ای است که طی آن پروتئین ساختمان اصلی خود را از دست داده و ضمن اتخاذ کونفورماسیون غیر طبیعی و اتصال یافتن با سایر پروتئین های با وضعیت مشابه، رسوب می نماید [1]. تشکیل تجمعات پروتئینی با رسوب آنها تفاوت بسیاری دارد چرا که ضمن تجمع پروتئین ها، ساختمان طبیعی بطور جزئی یا بطور کامل از بین می رود در حالیکه در رسوب پروتئین ها ساختمان طبیعی بدون تغییر باقی می ماند [2]. ساختارهای حد واسط فرآیند فولدینگ در مقایسه با انواع فولد نشده پروتئینی استعداد بیشتری را برای تشکیل تجمعات پروتئینی دارند [1و 3]. بنا بر نظر محققین، دناتوراسیون پروتئین ها پیش شرط لازم برای شکل گیری تجمعات پروتئینی است. ضمن دناتوره شدن پروتئین ها سطوح هیدروفوب آنها در سطح قرار گرفته که این پدیده باعث شکل گیری واکنش های پروتئین-پروتئین در محیط آبی می شود و در نتیجه تجمع پروتئین ها و رسوب آنها رخ می دهد. پروتئین های طبیعی تحت تاثیر عوامل دناتوره کننده نظیر گوانیدین هیدروکلراید، اوره، دی تریتول و دمای بالا دناتوره شده و بصورت تا نخورده در می آیند. در معرض قرار گرفتن نامتناسب توالی آمینواسیدی هیدروفوب پروتئین های تا نخورده، باعث شکل گیری ساختمان های غیرطبیعی می شود که قادرند با سایر تجمعات پروتئینی موجود برهمکنش نمایند.

بطور کلی عوامل موثر در تشکیل تجمعات پروتئینی عبارتند از : 1- توالی آمینواسیدی پروتئین (بعنوان عامل اصلی) 2- شرایط محیطی سلول 3- کینتیک فولدینگ پروتئین ها [1 و4]

توالی آمینواسیدی پروتئین ها به نوبه خود خصوصیاتی نظیر هیدروفوبیسیته، بار خالص زنجیره و ساختمان دوم مولکول های پروتئینی را تعیین می کنند. شرایط محیطی سلول نیز عواملی نظیر غلظت پروتئین، دما، pH محیط، قدرت یونی محیط، قرار گرفتن در معرض هوا و واکنش با سطوح فلزی را در بر می گیرد. علاوه بر عوامل مذکور در تعدادی از پلی پپتید ها توالی آمینواسیدی انتهای آمین یا انتهای کربوکسیل نسبت به سایر نواحی پروتئینی مهمترین عامل تعیین کننده در تشکیل تجمعات آمورف [5 و 6] یا منظم [7 و 8] هستند. مطالعات اخیر درباره نقش توالی آمینواسیدی در تعیین احتمال تجمع پروتئین ها نشان داده است که آمینواسیدهای هیدروفوب تمایل بالایی برای گسترش تجمع دارند در حالیکه آمینواسید های باردار میل به تجمع پروتئین ها را کاهش می دهند. طبق مطالعات انجام شده توسط تمپا و همکارانش تقسیم بندی زیر برای اسید آمینه های مستعد تشکیل تجمعات آمورف و منظم نشان داده شده است [9 و 10]:

آمینواسید های محرک تشکیل تجمعات آمورف (نظیر Inclusion body ها):

Ser, Ala, Arg, Gln, Glu, Gly, Lys, Pro

آمینو اسید های محرک تشکیل تجمعات سازمان یافته و منظم (نظیر آمیلوئید ها):

Asn, Cys, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Val

از جمله مهمترین عوامل وابسته به شرایط محیطی سلول که در شکل گیری تجمعات پروتئینی موثرند عامل pH است. بطور خاص، ماهیت فرایند تجمع به مقدار زیادی تحت تاثیر pH محیط قرار می گیرد، چرا که عامل pH تعیین کننده ساختمان ابتدایی پروتئین، بار خالص رشته های پلی پپتیدی در ساختمان پروتئین و نوع برهمکنش هایی است که بوقوع خواهند پیوست [11].

گستردگی نسبی دو مسیر تجمع توسط مقدار pH مشخص می شود بدین ترتیب که:

الف- در مقادیر pH بالا، تجمعات سازمان یافته (آمیلوئید) تشکیل می شوند.

ب- در مقادیر pH پائین و نزدیک به نقطه ایزوالکترونیک پروتئین، تجمعات آمورف تشکیل می شوند [11].

برخلاف تجمعات آمورف، شکل گیری فیبریل های آمیلوئیدی در نتیجه وقوع تغییرات مشخص در ساختمان اولیه و ثانویه پروتئین ها رخ می دهد. بنابراین برخلاف مسیر تشکیل تجمعات آمورف، شکل گیری آمیلوئید ها از طریق تشکیل ساختار های حد واسط نیمه فولد شده بوقوع خواهد پیوست. از جمله عوامل موثر دیگر در تشکیل تجمعات پروتئینی، کینتیک فولدینگ هر مولکول پروتئینی است، بدین ترتیب که در صورت وقوع فولدینگ طولانی مدت برای ساختاری حد واسط، احتمال تجمع آن تشدید خواهد یافت [12]. برای مثال در سیستم چاپرونی GroEL-GroES (ضمن در بر گرفتن رشته های پلی پپتیدی تازه سنتز شده، از فولدینگ نادرست آنها جلوگیری می کنند) بطور معمول فرآیند فولدینگ پروتئین ها طی مدت 10 ثانیه در دمای 37°C با مصرف ATP به اتمام رسیده و پروتئین فولد شده به فضای سیتوپلاسم وارد می شود. در صورتیکه فولدینگ رشته پلی پپتیدی بیشتر از این مدت بطول بیانجامد زنجیره تازه سنتز شده مذکور قبل از اتمام فولدینگ و بصورت ناقص به فضای با ازدحام سیتوپلاسم وارد می شود که در این صورت از طریق بخش های غیرقطبی ساختار خود که در معرض قرار گرفته اند با سایر پروتئین های آنفولد شده (دناتوره شده) بر همکنش نموده و تجمعات پروتئینی را تشکیل خواهد داد [13و 14و 15]. معمولا تجمع برگشت پذیر پروتئین ها در نتیجه برهمکنش های غیر کوالان ضعیف صورت می پذیرد. در اغلب موارد برگشت پذیری واکنش ها نشان

دهنده وجود تعادل بین مونومر و ساختارهای با نظم بیشتر است. ممکن است این تعادل در نتیجه تغییر در شرایط محیط نظیر تغییر در غلظت پروتئین ها یا تغییر در pH، دما و قدرت یونی محیط برهم بخورد. همچنین ممکن است شرایط استرس زای دیگری برای پروتئین ها نظیر انجماد، قرار گرفتن در معرض هوا، واکنش با سطوح فلزی و در نهایت فشار مکانیکی، سطوح پروتئینی را دناتوره نموده و موجب شکل گیری تجمعات پروتئینی شود. البته بطور معمول هر یک از این عوامل محیطی ضمن فرآیند های زیستی کنترل می شوند.

1-2- مراحل تشکیل تجمعات پروتئینی

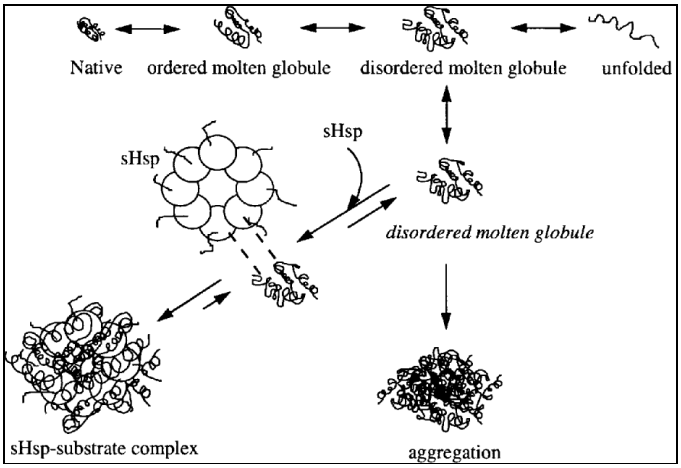
تشکیل تجمعات پروتئینی در سه مرحله به وقوع می پیوندد بدین ترتیب که در مرحله اول پروتئین های طبیعی به مولکول های مستعد تجمع تبدیل می شوند که بطور ناقص فولد شده اند (ساختارهای حد واسط فولدینگ) [16]. در مرحله دوم که به فاز هسته سازی[2] موسوم است ساختارهای حد واسط نیمه فولد شده به طریق خاصی با یکدیگر مجتمع شده و ساختارهای الیگومری گسسته یا همان هسته تجمعات پروتئینی را بوجود می آورند. شکل گیری هسته در تجمعات پروتئینی مرحله تعیین کننده سرعت[3] در فرآیند تجمع پروتئین هاست [17]. به اعتقاد محققین ساختار الیگومرها به پروتئین اولیه و شرایط محیطی آن بستگی دارد [18و 19]. در مرحله سوم که به فاز پلیمریزاسیون معروف است الیگومر های تولید شده در مرحله قبلی با یکدیگر مجتمع شده و فیبریل های آمیلوئیدی یا ساختار های موسوم به Inclusion body را تشکیل می دهند.

1-3- مکانیسم های متفاوت در تشکیل تجمعات پروتئینی

همانطور که در شکل 1-1 نشان داده شده، فرآیند فولدینگ پروتئین ها بطور سریع و برگشت پذیر رخ می دهد. در شرایطی نظیر شرایط استرس زای سلولی و شکل گیری موتاسیون، پروتئین های تا خورده به اشکال حد واسط مسیر فولدینگ خود تبدیل می شوند. در چنین وضعیتی بین نواحی هیدروفوب در معرض حد واسط های مذکور (که در حالت طبیعی در هسته ساختمان پروتئینی قرار دارند) با یکدیگر پیوند های آبگریز شکل

1- Nucleation
2- Rate limiting Step

می گیرد و بسته به اینکه تجمع حد واسط ها از طریق مکانیسم منظم یا نامنظم صورت پذیرد به ترتیب فیبریل های آمیلوئیدی و یا رسوب های بدون شکل[4] تشکیل خواهند شد. لازم به یادآوری است که تجمعات آمورف و سایر تجمعاتی که طی فرآیند فولدینگ تشکیل می شوند از طریق برهمکنش های هیدروفوبیک در بین حالات آنفولد یا دناتوره شکل می گیرند در حالیکه تجمعات سازمان یافته نظیر آمیلوئید ها اغلب از طریق برهمکنش های هیدروفوبیک در بین ساختمان های ظاهرا طبیعی ایجاد می شوند [20].



شکل 1-1- تصویر مسیرهای دو طرفه فولدینگ و آنفولدینگ پروتئین ها

علیرغم وجود نقاط کنترلی در مسیر تاخوردن پروتئین ها که ضامن شکل گیری فولدینگ صحیح در آنهاست، در صورت شکل گیری پیوند های نادرست، در این مسیر مشکلاتی ایجاد خواهد شد (گفتنی است که علت اصلی در این مورد حضور حالات حد واسط پروتئینی در مسیر فولدینگ پروتئین ها می باشد که تحت شرایط استرس زا و وقوع موتاسیون افزایش می یابند). در صورت وقوع پدیده تجمع یا رسوب، مولکول پروتئینی مسیر فولدینگ را ترک نموده و وارد مسیر دیگری بنام فولدینگ خاموش[5] می شود که نسبتا به کندی طی شده (بطول چند ثانیه) و ریشه در برقراری پیوندهای آبگریز بین حالات حد واسط دارد. مسیر فولدینگ خاموش از دو راه متفاوت (شکل گیری تجمعات منظم یا نامنظم) طی می شود. اغلب تعیین اینکه کدامیک از راهها در مسیر مذکور غالب می باشد توسط عواملی نظیر سرعت وقوع آنفولدینگ پروتئین و شکل گیری تجمع پروتئینی، توالی آمینواسیدی پروتئین مورد نظر و ماهیت حد واسط های شکل گرفته قابل پیش بینی است

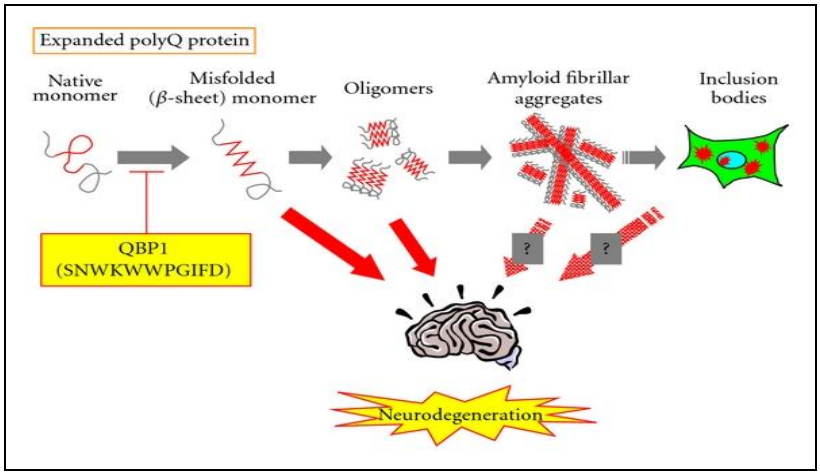
1- Disordered
2- Off- Folding

[21]. طبق شکل 1-2 بر اساس محل شکل گیری، تجمع پروتئین ها را به دو گروه تقسیم بندی می کنند که عبارتند از:

1-تجمع خارج سلولی: باعث شکل گیری فیبریل های آمیلوئیدی شده که بیماری های آلزایمر و دیابت نوع دو و انسفالوپاتی پریونی و.. را باعث می شوند [22 و23و 24].

2-تجمع داخل سلولی: منجر به شکل گیری inclusion body شده و بیماری هانتیگتون و... را ایجاد می کنند [25].

هر چند که غالبا فیبریل های آمیلوئیدی در فضای خارج سلولی تشکیل می شوند اما انواعی از آنها در سلول نیز تشکیل می شوند [26و 27].



شکل 1-2- نمایش انواع تجمعات پروتئینی شکل گرفته در بیماری های مختلف ناشی از تجمع پروتئین ها

1-4- تجمعات آمیلوئیدی

فیبریل های آمیلوئیدی توسط مکانیسم منظم تجمع شکل می گیرند [21]. در مقایسه با تشکیل تجمعات آمورف[6] پروتئینی، مکانیسم منظم[7] با کندی بیشتری صورت می پذیرد. بدین ترتیب که در این مسیر ابتدا اشکال نیمه فولد شده پروتئینی با یکدیگر برهمکنش نموده و طی مرحله محدود کننده سرعت، که سرعت کل مسیر را تعیین می کند، هسته پایداری را تشکیل می دهند. این هسته سپس بعنوان الگویی برای سایر مولکول

1- Amorphous
2- Ordered

های حد واسط و افزوده شدن آنها به پروتوفیبریل در حال رشد عمل می نماید، نهایتا افزوده شدن متوالی حد واسط های نیمه فولد شده به دو انتهای زنجیره (پروتوفیبریلی) باعث شکل گیری یک ساختمان کاملا نامنظم و نامحلول بنام فیبریل آمیلوئیدی می شود [21]، شکل فیبریل آمیلوئیدی توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داده شده است (شکل 1-3)، روش مورد استفاده برای توصیف سینتیک شکل گیری فیبریل آمیلوئیدی، استفاده از ترکیبات رنگی نظیر تیوفلاوین تی[8] و قرمز کنگو[9] است که با ساختمان آمیلوئید اتصال برقرار می کنند، هر دو کمیت مدت زمان مرحله محدود کننده و سرعت مرحله پلیمریزاسیون زنجیره (جهت تشکیل فیبریل آمیلوئیدی) به غلظت پروتئین و یا غلظت حد واسط های نیمه فولد شده حاضر در هر زمان (مورد نظر) بستگی دارد [28]، اغلب شکل گیری فیبریل های آمیلوئیدی با ابتلا به بیماری ها در ارتباط است و به عقیده محققین این پدیده با شروع یا پیشرفت بیماری مرتبط می باشد [29]، بنابراین پروتئین های مرتبط با بیماری در شرایط بیولوژیک بصورت تجمعات فیبریلی یافت می شوند که دارای توالی آمینواسیدی خاص یا ساختمان مشخصی در حالت طبیعی نیستند، امروزه تنها اندکی از پروتئین هایی که در شرایط فیزیولوژیک فیبریل های آمیلوئیدی را تشکیل می دهند مورد شناسایی قرار گرفته اند [30]، این در حالیست که تعداد بسیار زیادی از پروتئین ها تحت شرایط فیزیولوژیک اقدام به تشکیل inclusion body ها می نماید، به هر حال اغلب پروتئین ها برای ایجاد فیبریل های آمیلوئیدی در شرایط آزمایشگاهی بایستی تحت شرایط غیر پایدار کننده قرار گیرند، بدین معنی که تشکیل آمیلوئید ها خصوصیت ذاتی همه پروتئین هاست [31و 32و 33].

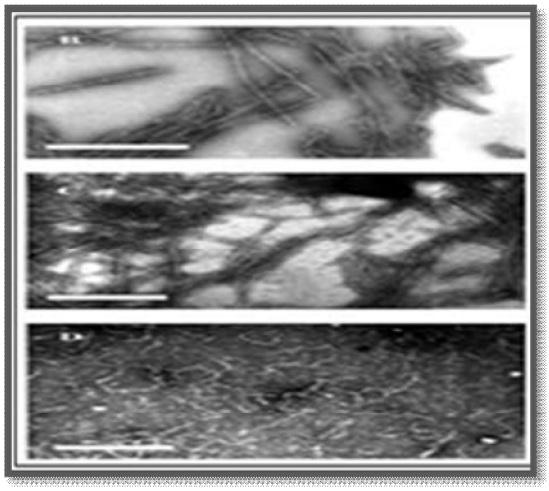
خصوصیات پروتئین هایی که تمایل بالایی برای تشکیل فیبریل های آمیلوئیدی دارند عبارتند از:

1-واجد توالی آمینواسیدی غنی از انواع محرک ایجاد تجمعات سازمان یافته با تمایل بالا برای تشکیل صفحات بتا هستند.

2-نسبت به دماهای بالا مقاومت کمی دارند (Low thermostability)

3-در شرایط طبیعی نیمه عمر بالایی دارند (Half time) [34]

1- Thioflavin T
2- Congo red



شکل1-3- نمونه میکروگراف الکترونی از فیبریل های آمیلوئیدی که دارای ساختار خطی، بدون شاخه و انعطاف پذیر هستند.

1-5- ساختار فیبریل های آمیلوئیدی

همه فیبریل ها واجد آرایش خاصی از صفحات بتای متقاطع هستند چنانچه گفته می شود هر فیبریل منفرد از صفحات بتای که بصورت عمودی نسبت به محور هسته فیبریل قرار گرفته (و به هم متصل می شوند تا یک فیلامنت را ایجاد نمایند) تشکیل شده است. همانطور که در شکل 1-4 نشان داده شده است، فیبریل های کامل از دو تا شش پروتوفیلامنت که همانند ریسمان به دور یکدیگر پیچیده اند تشکیل می شوند. این پروتوفیلامنت ها قطری در حدود 2 تا 5 نانومتر داشته که ضمن تابیدن به دور یکدیگر فیبریل های با قطر 4 تا 13 نانومتر [16] و طول حداکثر تا چند میکرون را تشکیل می دهند [21]. معمولا فیبریل ها بصورت بدون شاخه شکل می گیرند، ساختارهایی پایدار بوده و در برابر تخریب و تجزیه توسط پروتئازها و عوامل دناتوره کننده مقاوم هستند. این ویژگی ها باعث می شود که سلول ها در نابود سازی فیبریل های شکل گرفته به سختی تلاش نمایند. عامل اصلی در پایداری ساختمان فیبریل ها شکل گیری پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی در بین اتم های گروه های آمید و کربونیل در زنجیر اصلی رشته های پلی پپتیدی است.