دانشگاه تهران
پردیس علوم
دانشکده زیست شناسی

ساخت نانوذرات پروتئولیپوزومی از طریق بازگذاری آنزیم لاکتاز- فلوریزین هیدرولاز خالص سازی شده از غشای روده

نگارش:
مهدی امیری

استاد راهنما:
دکتر مهران حبیبی رضایی

پایان نامه برای دریافت درجهٔ کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی
گرایش علوم سلولی و مولکولی

تیرماه ۱۳۸۸

بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تهران
پردیس علوم
دانشکده زیست شناسی

ساخت نانوذرات پروتئولیپوزومی از طریق بازگذاری آنزیم لاکتاز- فلوریزین هیدرولاز خالص سازی شده از غشای روده

نگارش: مهدی امیری

استاد راهنما:دکتر مهران حبیبی رضایی

استاد مشاور: دکتر طیبه تولیت

پایان نامه برای دریافت درجهٔ کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی
گرایش علوم سلولی و مولکولی

تیرماه ۱۳۸۸

الْحَمْدُ لِلّهِ اَلَّذِی لا یَبْلُغُ مِدْحَتَهُ الْقائِلُونَ، وَ لا یُحْصِی نَعْماءَهُ الْعادُّونَ، وَ لا یُودِّی حَقَّهُ الْمُجْتَهِدُونَ، اَلَّذِی لا یُدْرِکُهُ بُعْدُ الْهِمَمِ، وَ لا یَنالُهُ غَوْصُ الْفَطِنِ، اَلَّذِی لَیْسَ لِصِفَتِهِ حَدٌّ مَحْدُوْدٌ، وَ لا نَعْتٌ مَوْجُودٌ، وَ لا وَقْتٌ مَعْدُودٌ وَ لا اَجَلٌ مَمْدُودٌ، فَطَرَ الْخَلائِقَ بِقُدْرَتِهِ، وَ نَشَرَ الرِّیاحَ بِرَحْمَتِهِ، وَ وَتَّدَ بِالصُّخُورِ مَیَدانَ اَرْضِهِ.

حمد باد خداوندی را که سخنوران در ثنایش فرو مانند و شمارندگان از شمارش نعمتهایش عاجز آیند و کوشندگان هر آنچه کوشند، حق نعمتش را آنسان که شایسته اوست ، ادا کردن نتوانند. خداوندی ، که اندیشه های دور پرواز او را درک نکنند و زیرکان تیزهوش ، به عمق جلال و جبروت او نرسند. خداوندی که فراخنای صفاتش را نه حدّی است و نه نهایتی و وصف جلال و جمال او را سخنی درخور نتوان یافت ، که در زمان نگنجد و مدت نپذیرد. آفریدگان را به قدرت خویش بیافرید و بادهای باران زای را بپراکند تا بشارت باران رحمت او دهند و به صخره های کوهساران ، زمینش را از لرزش بازداشت .

[**خطبه اول نهج البلاغه**]

تقدیم به

پیشگاه مقدس حضرت ولی عصر، امام زمان عج الله تعالی فرجه الشریف

چکیده :

در پایان نامه حاضر خالص سازی و بازگذاری آنزیم لاکتاز فلوریزین هیدرولاز(LPH) خالص سازی شده از غشای روده، به عنوان یکی از پروتئین های غشایی مورد بررسی قرار گرفته است. پروتئین های غشایی یک سوم از پروتئین های کد شونده توسط ژنوم انسان را تشکیل می دهند و در حدود دو سوم از پروتئین هایی که هدف دارویی قرار می گیرند به این دسته تعلق دارند. بازگذاری پروتئین های غشایی تکنیکی است که این امکان را برای ما فراهم می کند تا بدون مشکلاتی که در غشاهای طبیعی با آن روبرو هستیم به بررسی ساختار و عملکرد این پروتئین ها بپردازیم. مهمترین دستاورد این پایان نامه، ارائه روشی پیشنهادی برای کنترل جهت گیری پروتئین های غشایی به ویژه اکتوپروتئین ها می باشد. با کوچک کردن اندازه پروتئولیپوزوم ها، از یک سو انحنای غشای آن ها بیشتر می شود و از سوی دیگر فضای آبی میاتی آن ها محدود تر می شود. مبتنی بر راهکار مزبور، روشی را برای بازگذاری اکتو پروتئین های غشایی از جمله آنزیم لاکتاز- فلوریزین هیدرولاز پیشنهاد می دهیم که بر اساس آن کوچک کردن اندازه پروتئولیپوزوم ها تا ابعاد نانو برای اصلاح و یک دست شدن جهت گیری پروتئین های غشایی به کار گرفته می شود. این فرآیند با قرار گیری بخش اصلی و حجیم این پروتئین ها در سطح خارجی لیپوزوم ها و در تماس با محیط اطراف همراه می باشدکه با توجه به این که عموماً جایگاه فعال آنزیمی یا عملکردی این پروتئین ها در این بخش جای گرفته است دسترسی لیگاندهای محلول در محیط به این نواحی افزایش می یابد و محصول واکنش نیز در محیط آزاد می شود. در صورتی که اگر بخش اصلی پروتئین غشایی در درون لیپوزوم محصور باشد، به دلیل ایجاد محدودیت در انتقال آزادانه لیگاند و محصول توسط غشای دولایه، عملاً امکان این فعالیت ها از آن ها سلب می شود.

در زمینه نانوبیوتکنولوژی، تولید نانوذرات لیپوزومی بیشتر در راستای بسته بندی و انتقال مولکول های مختلف اعم از دارویی و غیر دارویی بوده است، و پایان نامه حاضر اولین گزارش در نوع خود می باشد که ساخت نانوذرات پروتئولیپوزومی را، در جهت کنترل نحوه آرایش پروتئین های بازگذاری شده پیشنهاد می دهد.

بر خود لازم می دانم تقدیر و سپاس خود را از مهر و محبت آنان که مرا در انجام این پایان نامه همراهی نمودند ابراز نمایم.

از استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر مهران حبیبی رضایی به خاطر حمایت های بی دریغ و زحمات بیشماری که در راه انجام این پایان نامه متقبل شدند کمال تشکر و سپاس گزاری را دارم. بودن در کنار ایشان برای من بهتر دیدن، بهتر اندیشیدن و بهتر زندگی کردن را به ارمغان داشت.

از استاد مشاور گرانقدرم سرکار خانم طیبه تولیت بسیار سپاس گزارم که با توصیه ها و حمایت های ارزنده خود امکان اجرایی شدن این پروژه را فراهم نمودند.

از استادان گرانقدر سرکار خانم دکتر نسرین معتمد و جناب آقای دکتر محسن نعمت گرگانی که زحمت داوری این پایان نامه را پذیرفتند سپاس گزارم.

صمیمانه از تمامی دوستان و همکاران حاضر و سابق خودم در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پروتئین دانشگاه تهران تشکر می کنم که با مهربانی ها و کمک های ارزشمندشان همواره مرا مورد لطف قرار داده اند.

در پایان سپاس ویژه خود را به همسرم اعظم ابراز می کنم که با عشق و صبوری همواره در کنار و یاورم بوده است؛ همچنین به پدر و مادر بزرگوارم به خاطر مهربانی، لطف و حمایت های همیشگی شان.

فهرست مطالب

۱ مقدمه ۱

۱-۱ غشاهای زیستی ۲

۱-۱-۱ خصوصیات فیزیکی لیپیدها و دمای تغییر فاز ۳

۱-۱-۲ پروتئین های غشایی ۴

۱-۱-۳ نقش فسفولیپیدها در فعالیت پروتئین های غشایی ۸

۱-۱-۴ راهبردها و اصول مطالعه پروتئین های غشایی ۱۰

۱-۲ شوینده ها ۱٤

۱-۲-۱ تأثیر ساختار گروه آب دوست بر روی عملکرد شوینده ۱۶

۱-۲-۲ تأثیر ساختار گروه آب گریز بر روی عملکرد شوینده ۱۸

۱-۲-۳ ویژگی های عمومی شوینده ها ۱۹

۱-۲-۴ حذف شوینده ۲۰

۱-۳ لیپوزوم ها ۲۱

۱-۳-۱ گروه لیپوزوم ۲۱

۱-۳-۱-۱ لیپوزوم ها: ۲۲

۱-۳-۱-۲ ویروزوم ها ۲۲

۱-۳-۱-۴ ترنسفروزوم ها ۲۳

۱-۳-۱-۵ آرکئوزوم ها ۲۳

۱-۳-۱-۶ نیوزوم ها ۲۳

۱-۳-۱-۷ کوکلئات ها ۲۴

۱-۳-۱-۸ پروتئوزوم ها ۲۴

۱-۳-۲ دلایل استفاده از لیپوزوم ها ۲۵

۱-۳-۳ انواع لیپوزوم ها بر اساس ترکیب و کاربرد ۲۷

۱-۳-۳-۱ لیپوزوم های متداول: ۲۷
۱-۳-۳-۲ لیپوزوم های با نیمه عمر بالا در گردش خون ۲۷
۱-۳-۳-۳ ایمونولیپوزوم ها ۲۸
۱-۳-۳-۴ لیپوزوم های کاتیونی ۲۸
۱-۳-۴ روش نام گذاری لیپوزوم ها ۲۹
۱-۳-۵ روش های عملی ساخت لیپوزوم ها ۳۰
۱-۳-۵-۱ تهیه وزیکول های دارای لایه های متعدد(MLV) ۳۱
۱-۳-۵-۲ تهیه وزیکول های کوچک تک لایه به وسیله سونیکاسیون ۳۱
۱-۳-۵-۳ گذراندن سوسپانسیون لیپوزومی از فیلترهایی با منافذ مشخص(VET) ۳۲
۱-۳-۵-۴ روش تبخیر فاز معکوس (REV) ۳۳
۱-۳-۵-۵ روش دیالیز شوینده (DDVs) ۳۳
۱-۳-۵-۶ روش تزریق حلال ۳۴
۱-۳-۵-۷ روش دهیدراسیون- رهیدراسیون (DRV) ۳۴
۱-۳-۶ تعیین ویژگی های لیپوزوم ها ۳۶
۱-۳-۶-۱ نمای ظاهری ۳۶
۱-۳-۶-۲ تعیین توزیع اندازه ذره ای لیپوزوم ها ۳۶
۱-۳-۶-۳ تعیین لاملاریتی ۳۷
۱۳-۶-۴ پایداری لیپوزوم ها ۳۷
۱-۳-۷ لیپوزوم ها و پروتئین ها ۳۹
۱-۳-۷-۱ آنزیم های درون لیپوزوم ۳۹
۱-۳-۷-۲ بازگذاری پروتئین های غشایی درون دولایه لیپیدی لیپوزوم ها ۴۳

۱-٤ غشای حاشیه مسواکی روده کوچک(IBBM) ..... ۴۶ Error! Bookmark not defined.
۱-۴-۱ پروتئین های غشای حاشیه مسواکی روده کوچک ۴۷
۱-۴-۲ اکتوآنزیم ها ۴۷
۱-۴-۳ گلیکوهیدرولازهای غشای حاشیه مسواکی روده کوچک ۴۹
۱-۴-۴ ترکیب فسفولیپیدی غشای حاشیه مسواکی روده کوچک ۴۹

۱-۴-۵ لاکتاز - فلوریزین هیدرولاز ۵۰
۱-۴-۵-۱ ویژگی های ساختمانی لاکتاز- فلوریزین هیدرولاز (LPH) ۵۰
۱-۴-۵-۲ پردازش و بلوغ LPH ۵۳
۱-۴-۵-۳ سوبستراهای LPH ۵۴
۱-۴-۵-۴ جایگاه فعال LPH ۵۷
۱-۴-۵-۵ اهمیت بیولوژیکی LPH در پستانداران ۵۸
۱-۵ بازگذاری آنزیم لاکتاز- فلوریزین هیدرولاز: اهداف و مزایا ۶۰
۲ مواد و روش ها ۶۲
۲-۱ تهیه وزیکول های غشای حاشیه مسواکی روده کوچک ۶۳
۲-۳ سنجش فعالیت لاکتازی LPH ۶۶
۲-٤ جداسازی پروتئین های غشایی با استفاده از Triton X-100 و Triton X-114 ..... ۶۷
۲-۵ تفکیک دو فازی پروتئین های IBBM با کمک Triton X-114 ..... ۶۷
۲-۶ کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از آنتی بادی ۶۹
۲-۶-۱ آنتی بادی مونوکلونال ۶۹
۲-۶-۲ فعال سازی بستر ۷۰
۲-۶-۳ اتصال آنتی بادی به بستر ۷۰
۲-۶-۴ کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون آماده شده ۷۲
۲-۷ تغلیظ نمونه های حاوی پروتئین با استفاده از آمونیوم سولفات ۷۳
۲-۸ دیالیز: ۷۳
۲-۸-۱ آماده سازی غشا های دیالیز ۷۳
۲-۸-۲ دیالیز نمونه های حاوی پروتئین برای حذف نمک اضافی ۷۳

۲-۹ مطالعه فرآورده های غشایی با استفاده از SDS-PAGE ۷٤

۲-۱۰ مطالعه فرآورده های غشایی با استفاده از Blue Native PAGE ۷۵

۲-۱۱ رنگ آمیزی با نیترات نقره ۷۷

۲-۱۲ رنگ آمیزی نقره آبی ۷۸

۲-۱۲-۱ تهیه رنگ ۷۸

۲-۱۲-۲ رنگ آمیزی ۷۸

۲-۱۳ روش تهیه و آنالیز نانوذرات پروتئولیپوزومی ۷۹

۲-۱۳-۱ ساخت لیپوزوم های چند لایه(MLV) ۷۹

۲-۱۳-۲ تعیین فاکتورهای R_{sat} و R_{sol} برای لیپوزوم های تهیه شده ۸۰

۲-۱۳-۳ بازگذاری پروتئین های غشایی ۸۱

۲-۱۳-۴ تولید نانوپروتئولیپوزوم ها با استفاده از سونیکاسیون ۸۲

۲-۱۳-۴-۱ سونیکاسیون با پروب سونیکاتور ۸۲

۲-۱۳-۴-۲ سونیکاسیون با سونیکاتور مخزنی ۸۲

۲-۱٤ مطالعه لیپوزوم ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) ۸۳

۲-۱۵ تعیین اندازه ذره ای لیپوزوم ها با استفاده از تفرق نوری پویا(DLS) ۸۳

۳ نتایج و بحث ۸٤

۳-۱تهیه و توصیف وزیکول های غشای حاشیه مسواکی روده کوچک (IBBM) ۸۵

۳-۲ تعیین پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max} برای آنزیم لاکتاز- فلوریزین هیدرولاز ۸۸

۳-۳ محلول سازی پروتئین های غشای IBBM با استفاده از شوینده و تفکیک دوفازی آن ها ۹۰

۳-۵ مطالعات مربوط به ساخت لیپوزوم ها و بازگذاری پروتئین های غشایی ۹۵

۳-۵-۱ ساخت لیپوزوم های چندلایه و تعیین فاکتور های R_{sat} و R_{sol} برای آن ها ۹۵

۳-۵-۲ روش پیشنهادی برای بازگذاری اکتو پروتئین های غشایی..... ۹۸
۳-۵-۳ بازگذاری پروتئین های غشای IBBM و مطالعه تولید نانوپروتئولیپوزوم ها با استفاده از پروب سونیکاتور ۱۰۴

۳-٦ مشاهده افت فعالیت آنزیم LPH به هنگام انجماد DE و بازیابی مجدد فعالیت از دست رفته با کمک بازگذاری..... ۱۱۰

۳-۷ خالص سازی آنزیم لاکتاز- فلوریزین هیدرولاز با استفاده از آنتی بادی و مطالعات مربوط به بازگذاری آن ۱۱٦
۳-۷-۱ اتصال آنتی بادی به بستر فعال شده و انجام کروماتوگرافی تمایلی ۱۱۶
۳-۷-۲ کینتیک آنزیم تخلیص شده ۱۱۹
۳-۷-۳ بازگذاری آنزیم لاکتاز- فلوریزین هیدرولاز تخلیص شده و تولید نانوپروتئولیپوزوم با استفاده از سونیکاتور مخزنی ۱۲۰

٤ جمع بندی و نتیجه گیری ۱۲٤

منابع و مأخذ: ۱۲۸

فهرست جدول ها

۱-۱: خلاصه ای از روش های بازگذاری مختلف برای پروتئین های غشایی ۱۱

۱-۲: کاربرد انواع شوینده ها در جداسازی پروتئین های غشایی ۱۴

۱-۳: نمونه هایی از استفاده های (ممکن) لیپوزوم های حاوی آنزیم برای مصارف پزشکی و زیست پزشکی ۴۰

۱-۴ :ترکیب فسفولیپیدی غشای حاشیه مسواکی در گونه های مختلف ۵۰

۲-۱: تهیه ژل های تفکیک کننده و توده کننده از الکتروفورز SDS-PAGE ۷۴

۲-۲: تهیه محلول های مربوط به ژل Blue Native PAGE ۷۵

۲-۳: تهیه بافر های مربوط به Blue Native PAGE ۷۶

۳-۱: مقادیر فعالیت ویژه بر حسب سن خرگوش ها ۸۵

۳-۲: میزان فعالیت آنزیم LPH در مدت زمان ۲۰ دقیقه در حضور غلظت های مختلف سوبسترا ۸۸

۳-۳: بررسی مقایسه ای فعالیت ویژه در فرآورده های IBBM ، DE و DPP ۹۱

۳-۴ : مقایسه فاکتور های R_{sat} و R_{sol} برای سوسپانسیون های لیپوزومی سونیکه شده و سونیکه نشده ۹۷

۳-۵: میزان فعالیت بازیافتی پس از انکوباسین یک ساعته در دمای محیط به نسبت افت اولیه آن ها ۱۱۳

۳-۶: میزان فعالیت ویژه آنزیم LPH در DE تازه،DE منجمد شده و پس از بازگذاری ۱۱۳

۳-۷: بررسی مقایسه ای فعالیت آنزیم LPH در طی روند خالص سازی ۱۱۹

فهرست شکل ها

۱-۱: مقایسه دناتوراسیون نواحی خارج غشایی از اکتوپروتئین ها با دناتوراسیون پروتئین های محلول ٦

۱-۲ : نمایش شماتیک شوینده های مرسوم و نمک های اسید صفراوی ۱۵

۱-۳ : ساختار مونومری و آرایش تجمعی شوینده ها و لیپیدها ۱٦

۱-۴ : دسته بندی انواع شوینده ها بر اساس گروه آب دوست آن ها ۱۸

۱-۵: نمایش شماتیک یک سیستم وزیکولی حساس به pH حاوی گلوکز اکسیداز ٤۱

۱-۶ نمایش شماتیک طرح پیشنهادی برای درمان انفارکتوس عضله قلبی با استفاده از وزیکول های لیپیدی حاوی آنزیم ٤۲

۱-۷: نمایش شماتیک اپی تلیوم روده کوچک ٤٦

۱-۸ : فعالیت دوگانه آنزیم LPH : لاکتازی و فلوریزین هیدرولازی ۵۱

۱-۹ : قرار گیری LPH در غشای حاشیه مسواکی روده کوچک ۵۲

۱-۱۰ : شکل شماتیک از بر هم کنش لاکتاز -لاکتوز در جایگاه فعال آنزیم ۵۵

۱-۱۱ : مهمترین گروه های هیدروکسیل برای هیدرولیز لاکتوز توسط لاکتاز ۵٦

۱-۱۲ : همولوژی توالی آمینو اسیدی در اطراف ریشه گلوتامات در آنزیم LPH انسان و خرگوش ۵۷

۲-۱ : کینتیک جذب رنگ برای رنگ آمیزی نقره آبی ۷۸

۲-۲: الگوی کاهش کدورت در سوسپانسیون MLV در اثر افزودن شوینده و تشکیل میسل ۸۰

۳-۱: نمودار رابطه میزان فعالیت ویژه با سن خرگوش ها برای مراحل مختلف استخراج ۸٦

۳-۲: منحنی های میکائیلیس-منتن و لینویوربورک برای آنزیم LPH ۸۹

۳-۳: بررسی مقایسه ای ضریب تخلیص آنزیم LPH در فرآورده های IBBM، DE و DPP ۹۱

۳-۴: مقایسه الگوی SDS-PAGE برای فرآورده های IBBM، DE و DPP ۹۳

۳-۵: الگوی Blue Native PAGE برای غلظت های مختلف از .DE ۹۳

۳-۶: مقایسه پایداری فعالیت آنزیم LPH در فرآورده های IBBM و DE ۹٤
۳-۷: تغییرات ایجاد شده در کدورت سوسپانسیون MLV در اثر افزودن تدریجی Triton X-100 ..... ۹٦
۳-۸: تغییرات ایجاد شده در کدورت سوسپانسیون لیپوزومی سونیکه شده در اثر افزودن تدریجی Triton X-100 ..... ۹٦
۳-۹: بازگذاری پروتئین های غشایی در لیپوزوم های پیش ساخته ۹۸
۳-۱۰: اثر وزن مولکولی پروتئین ها در میزان کارآیی به دام اندازی آن ها در فضای داخلی لیپوزوم های مختلف ۱۰۰
۳-۱۱: مقایسه بازگذاری یک اکتوپروتئین در یک LUV در مقایسه با SUV ۱۰۱
۳-۱۲: امکان اصلاح جهت گیری پروتئین های تراغشایی بازگذاری شده با استفاده از کوچک کردن اندازه لیپوزوم ها ۱۰۲
۳-۱۳: اثر تعداد دفعات سونیکاسیون با پروب سونیکاتور بر روی فعالیت آنزیم LPH بازگذاری شده ۱۰۵
۳-۱۴: اثر تعداد دفعات سونیکاسیون با پروب سونیکاتور بر روی میزان کدورت سوسپانسیون لیپوزومی ۱۰۵
۳-۱۵: تصاویر مربوط به آنالیز سوسپانسیون پروتئولیپوزومی با TEM پس از ۱۰مرحله سونیکاسیون با پروب سونیکاتور هر بار به مدت ۵ ثانیه ۱۰۷
۳-۱۶: نتایج مربوط به آنالیز اندازه ذره ای سوسپانسیون پروتئولیپوزومی با دستگاه Zetasizer پس از ۱۰مرحله سونیکاسیون با پروب سونیکاتور هر بار به مدت ۵ ثانیه ۱۰۸
۳-۱۷: روند افت فعالیت آنزیم LPH در DE های تهیه شده با Triton X-100 و Triton X-114 ..... ۱۱۱
۳-۱۸: فعالیت ویژه آنزیم LPH در DE منجمد شده و پس از بازگذاری در مقایسه با DE تازه ۱۱٤
۳-۱۹: ساختمان مولکولی Triton X-100 و Triton X-114 ..... ۱۱۵
۳-۲۰: سنجش پروتئینی تعدادی از فرکشن های منتخب بر اساس روش مارک ول ۱۱۷
۳-۲۱ الگوی SDS-PAGE تعدادی از فرکشن های خالص سازی شده ۱۱۸
۳-۲۲: مقایسه فعالیت ویژه آنزیم LPH در فرآورده های IBBM، DE ، خالص سازی شده و بازگذاری شده ۱۲۱
۳-۲۳: ضریب خالص سازی آنزیم LPH در فرآورده DE و به صورت بازگذاری شده به نسبت IBBM ۱۲۱
۳-۲۴: نتایج حاصل از آنالیز اندازه ذره ای پروتئولیپوزوم های حاوی LPH با استفاده از Zetasizer پس از ۸۰ دقیقه سونیکاسیون با سونیکاتور مخزنی ۱۲۲

فهرست علائم و اختصارات

4.AAP	4. Aminoantipyrine
BHT	β-hydroxytoluidine
CMC	Critical Micellar Concentration
CMT	Critical Micellar Temperature
CNBr	Cyanogen Bromide
DDVs	Detergent Dialyzed Vesicles
DE	Detergent Extract
DLS	Dynamic Light Scattering
DPP	Detergent Poor Phase
DRP	Detergent Rich Phase
DRV	Dehydration-Rehydration Vesicle
DSC	Differential Scanning Calorimetry
ESR	Electron Spin Resonance
HBA	4.Hydroxybenzoic acid
IBBM	Intestinal Brush Border Membrane
LPH	Lactase- Phlorizin Hydrolase
LUV	Large Unilamellar Vesicles
MLV	Multilamellar Vesicles
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PEG	polyethylene glycol
PMSF	phenylmethylsulphonyl fluoride
PNG	pyridoxine- 5′-β-D-glycoside

۱ مقدمه

۱-۱ غشاهای زیستی

غشاهای زیستی[1] سلول ها و اندامک ها را احاطه کرده اند و با تقسیم کردن درون سلول های یوکاریوتی به کمپارتمان های[2] مجزا، سطوحی را برای استقرار آنزیم های متابولیک، پروتئین های انتقالی، گیرنده ها و سوبستراهای متفاوت ایجاد می کنند.علاوه بر این، غشاها همانند سدهایی با نفوذ پذیری نسبی عمل کرده وبا کنترل انتقال موادی چون آب، یون ها و سایر متابولیت ها محیط داخلی را تنظیم می کنند .

از سال ۱۹۷۲ که سینگر و نیکلسون [۱] مدل موزاییک سیال[3] را برای غشا پیشنهاد دادند تا کنون دانش پایه ما از غشا تغییر چندانی نکرده است.غشاهای بیولوژیک از دولایه های لیپیدی مایعی (کریستال مایع[4]) تشکیل شده اند که پروتئین ها می توانند در آن وارد شده یا به سطح آن متصل شوند [۲] . کربوهیدارت ها نیز به اشکال گلیکولیپید و گلیکوپروتئین ممکن است تا ۱۰ ٪ از وزن برخی از غشا ها را به خود اختصاص دهند. مقادیر نسبی پروتئین، از ٪۲۰ درمیلین تا ۱۰ ٪ در غشا درونی میتوکندری، متغیر است .چگالی غشا با مقدار پروتئین غشا متناسب است [۳] .

انواع مختلف لیپیدهای موجود در غشاهای زیستی بسیار متنوع تر از آن اند که تنها برای کار ساختاری مورد نیاز باشند و این در حالی است که سنتز و انتقال آن ها مستلزم راه اندازی مسیرهای سنتز و انتقال بسیاری است. چنین مطلبی بیانگر نقش های ویژه ترکیبات لیپیدی خاص در غشاست. اصولاً برای درک فاکتورهایی که موجبات اتصال و ورود پروتئین ها و همچنین ایجاد بستری با سیالیت کافی برای فعالیت آن ها درغشا را فراهم می کنند، ابتدا باید نحوه شرکت و اثرگذاری لیپیدهای منفرد در تعیین ویژگی های الکتروستاتیک و هیدروفوبیک غشا را شناسایی نمود[۴] .

[1] biological membranes
[2] compartments
[3] fluid mosaic
[4] liquid crystal

۱-۱-۱ خصوصیات فیزیکی لیپیدها و دمای تغییر فاز[1]

اغلب غشاهای زیستی در دماهای فیزیولوژیک به حالت مایع هستند که این شرایط به آن ها اجازه می دهد تا به درستی بتوانند وظایف خود را انجام دهند. عموماً منظور از حالت سیال غشا، فاز کریستال مایع[2] غشای دولایه است، هر چند در شرایطی که مقادیر بالای کلسترول در غشا وارد شود غشا حالت سیالیت متفاوتی به دست می آورد که به آن فاز سیال منظم[3] گفته می شود. مدل های غشایی که از چند گونه لیپید مشخص تشکیل شده می توانند فازهای مختلفی داشته باشند. در دماهای پایین که برهمکنش های آبگریز بین زنجیره های اسیل به بیشترین مقدار خود می رسند فاز ژل[4] ایجاد می شود. این حالت سبب می شود تا تمام زنجیره ها در کانفورمیشن ترانس قرار گرفته و حرکت های مولکولی به شدت محدود شوند. با افزایش دما به بالای دمای ذوب (Tm) یا دمای تغییر فاز از حالت ژل به فاز کریستال مایع، زنجیره های لیپیدی ذوب شده و حالت سیال کریستال مایع تشکیل می شود. در این حالت، زنجیره ها نظم کمتر و تحرک بالاتری دارند و انتشار جانبی غشا افزایش می یابد[۴] .

با استفاده از ابزارهای مختلفی چون تکنیک های رزونانس مغناطیسی هسته[5] (NMR) ، رزونانس چرخش الکترون[6] (ESR) ، فلورسانس و اسکن افتراقی گرمایی[7] (DSC) می توان این تغییر فاز را مانیتور کرد[۵]. کرد[۵].

محتوای استرولی غشا نقش به سزایی در تنظیم دمای تغییر فاز غشاهای زیستی دارد. کلسترول که مهمترین استرول غشا می باشد مولکولی دوگانه دوست است که واجد یک بدنه حلقوی تخت متشکل از چهار حلقه کربنی متصل به هم می باشد. ساختمان صفحه ای سخت هسته استروئیدی که که در بین زنجیره های جانبی اسیل لیپیدها قرار می گیرد می تواند سیالیت غشا را تنظیم کند. به این نحو که در دماهای پایین تر از دمای تغییر فاز، کلسترول با قرار گرفتن بین زنجیره های اسیل از تراکم بیش از حد آن ها جلوگیری نموده و

[1] phase- transition temperature
[2] liquid crystal
[3] liquid-ordered
[4] gel-state
[5] Nuclear Magnetic Resonance
[6] Electron Spin Resonance
[7] Differential Scanning Calorimetry

سیالیت غشا را افزایش می دهد. همچنین در بالای دمای تغییر فاز سیستم حلقوی سخت کلسترول سبب کاهش آزادی چرخش زنجیره های اسیل مجاور شده و سیالیت غشا راتعدیل می کند. پراکنش کلسترول در غشاهای مختلف سلولی نامتشابه بوده و غشای پلاسمایی بیشترین نسبت کلسترول را دارد [۶] .

در وزیکول های غشایی، اندازه وزیکول نیز می تواند دمای تغییر فاز را جابه جا کند. چنان که مشخص شده است با کاهش قطر و تعداد لایه های وزیکول های غشایی، دمای تغییر فاز آن ها به شدت افت می کند [۷] .

۱-۱-۲ پروتئین های غشایی

مولکول های پروتئینی در ساختمان غشا، به دو گروه اصلی دسته بندی می شوند: گروه اول شامل دسته ای از پروتئین ها است که بخش عمده ساختمان آنها در درون غشا قرار می گیرد؛ به نحوی که حداقل یک بار از آن عبور می کند. این گروه را پروتئین های غشایی درونی[1] یا سرتاسری[2] می نامند. گروه دوم شامل دسته ای از پروتئین ها است که صرفاً در سطح غشا حضور دارند. گروه اخیر پروتئین های غشایی بیرونی[3] یا محیطی[4] نامیده می شوند [۳]. پروتئین های غشایی اغلب از طریق پیوندهای غیرکووالان ، از قبیل پیوندهای آبگریز و پیوندهای یونی ، در غشا مستقر می شوند. با این حال برخی از آنها نیز از طریق پیوندهای کووالان به غشا متصل می شوند [۸]. از نقطه نظر بیوشیمیایی پروتئین ها اجزای فعال غشا محسوب می شوند و در فرایندهایی مانند کاتالیز ، انتقال مولکولی ، گیرندگی پیام مولکولی ، منفذ ، شناسایی مولکولی و غیره ایفای نقش می کنند .به طور عمومی نسبت بخش پروتئینی در معرض محیط آبی ، برای پروتئین های غشایی می تواند کمتر از ۳۰٪ در باکتریورودپسین ، یا متجاوز از ۹۰٪ در پروستاگلاندین H سنتتاز و اکتوپروتئین های غشای حاشیه مسواکی روده کوچک باشد [۹] .

[1] intrinsic
[2] integral
[3] extrinsic
[4] peripheral