بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه سیستان و بلوچستان

تحصیلات تکمیلی

پایان نامه کارشناسی ارشد در (زیست شناسی- بیوشیمی)

عنوان:

بررسی اثر مولکول های کوچک بر روی تجمع منظم و نامنظم پروتئین ها

استاد راهنما:

دکترآرزو قهقائی

استاد مشاور:

دکتر علی شهرکی

تحقیق و نگارش:

اکرم کارفرما

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

مهر ۱۳۹۱

بسمه تعالی

این پایان نامه با عنوان بررسی اثر مولکول های کوچک بر روی تجمع منظم و نامنظم پروتئین ها قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد بیوشیمی توسط دانشجو اکرم کارفرما تحت راهنمایی استاد پایان نامه دکتر آرزو قهقایی واستاد مشاور دکتر علی شهرکی 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.

نام و امضاء دانشجو

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:			
استاد راهنما:			
استاد مشاور:			
داور ۱:			
داور ۲:			

نماینده تحصیلات تکمیلی:

اینجانب اکرم کارفرما تأیید می کنم که مطالب مندرج در این پایان نامه حاصل کار پژوهشی 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 یا بالاتر ارائه نشده است.

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

نام و نام خانوادگی دانشجو: اکرم کارفرما

امضاء

تقدیم به:

پدر و مادر مهربانم، که در همه ی زندگی یار و پشتیبانم بوده اند.

سپاسگزاری

سزاوار است، از استاد بزرگوارم سرکار خانم دکتر آرزو قهقایی که راهنمایی‌های صبورانه ایشان مرا در جهت پیشبرد این تحقیق یاری داد تشکر و قدردانی نمایم و همچنین از استاد مشاورم دکتر علی شهرکی کمال تشکر را دارم.

در اینجا لازم می‌دانم از اساتید محترم گروه زیست شناسی دانشگاه سیستان و بلوچستان جناب آقای دکتر جعفر ولیزاده، دکتر محمد حسین سنگتراش، دکتر دمحمد کردی، دکتر آدم ترکمن زهی، که در طول مدت تحصیل از راهنمایی‌های صمیمانه این بزرگواران برخوردار شدم، تشکر و قدردانی نمایم.

همچنین از اساتید محترم آقایان دکتر محمد هاشمی و دکتر حسن منصوری که زحمت داوری پایان نامه اینجانب را قبول کرده اند کمال تشکر را دارم.

هرچند سپاسگزاری از تمام کسانی که در طول مدت تحصیل و نگارش پایان نامه همگام و همراه من بوده اند امکان پذیر نیست، اما شایسته است از دوستان عزیزم خانم المیرا بهرامی نژاد، نسیم فریدی، هدی خیر خواه، منور نیستانی، مهدیه حسینیان، نسرین آژیده، مهسا قدرت، سمیه خاتمی، زهره داوودی، لیلا پرنده وزینب لطفی پور صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم.

در نهایت از خداوند مهربان برای همه عزیزان، سلامتی و توفیق روزافزون در تمام مراحل زندگی آرزومندم.

چکیده:

تجمع پروتئین از طریق دو مکانیسم منظم (فیبریل های آمیلوئیدی) و نامنظم (آمورف) توسعه می-یابد. تحت شرایط استرس دمایی ، pH و ... پروتئین ها کنفورماسیون غیر طبیعی پیدا می کنندکه منجر به تجمع یا aggregation می شود.

چاپرون ها خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که باعث تا خوردن و یا فولدینگ مجدد می‌گردند. بتاکازئین عضوی از خانواده کازئین‌ها می‌باشد که دارای فعالیت چاپرونی است. مولکول‌های کوچک ترکیباتی با وزن مولکولی کم هستند که به پلیمر تبدیل نمی‌شود و به وسیله‌ی تضعیف کردن اندرکنش‌های درون مولکولی هیدرو فوبیک بین حدواسطهای آنفلد شده و یا ناقص فولد شده که مسئول روند تجمع هستند مانع از تجمع می گردند.

در این مطالعه ما کینتیک تشکیل تجمعات پروتئین های مختلف را در حضور و عدم حضور چاپرون بتا کازئین و مولکول‌های کوچک آرژنین وگلایسین توسط روش‌های اسپکتروسکوپی جذب نور مرئی واسپکتروسکوپی فلئورسانس ذاتی و محیطی واسپکتروسکوپی CD مورد بررسی و مقایسه قرار دادیم.

در همه پروتئین‌های هدف ، بتا کازئین در غیاب مولکولهای کوچک از تجمع جلوگیری می‌کند. آرژنین وگلایسین تاثیر متفاوتی در جلوگیری از تجمع دارند به طوری که آرژنین در همه پروتئین های هدف سرعت تجمع را کاهش ولی گلایسین در انسولین و آلفالاکتالبومین تسریع کننده تجمع و در مورد اووترانسفرین کاهنده تجمع است. همه آزمایشات نشان داد که عملکرد چاپرونی بتاکازئین در حضور آرژنین وگلایسین کاهش می‌یابد. اثرات افزاینده ها وابسته به پروتئین هدف متفاوت می باشد. نتایج نشان داد که آرژنین وگلایسین از طریق تغییرات ساختاری بتاکازئین عملکرد چاپرونی این پروتئین را کاهش می دهند.

به طور کلی همه نتایج حاکی از آن است که سرعت تجمع پروتئین هدف و تغییرات ساختاری بتاکازئین در حضور آرژنین وگلایسین نقش اساسی درکاهش فعالیت چاپرونی بتاکازئین دارد.

کلمات کلیدی: تجمع پروتئین ، آمورف ، آرژنین ،گلایسین

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱- فصل اول ۱

۱-۱- مقدمه ای بر پروتئین و اهمیت آن ۲

۱-۲- اسیدهای آمینه ۲

۱-۳- ساختار اول ۲

۱-۴- ساختار دوم ۴

۱-۴-۱- مارپیچ آلفا ۴

۱-۴-۲- صفحات بتا ۵

۱-۵- ساختارهای فرا ثانویه ۷

۱-۶- ساختار سوم ۷

۱-۷- ساختار چهارم ۱۰

۱-۸- روش‌های تعیین ساختار پروتئین ۱۱

۱-۹- خالص سازی پروتئین‌ها ۱۲

۱-۱۰- نحوه ی تا شدن یا فولدینگ پروتئین ۱۳

۱-۱۱- مشخصات مولتن گلبول ۱۴

۱-۱۲- پایداری یا ثبات پروتئین ۱۶

۱-۱۲-۱- پایداری ترمودینامیکی: ۱۶

۱-۱۲-۲- پایداری سینتیکی ۱۶

۱-۱۳- تجمع(aggregation) ۱۷

۱-۱۳-۱- ترموشیمی تجمع ۱۸

۱-۱۳-۲- مشکلات در نتیجه تجمع..... ۱۸

۱-۱۳-۳- مکانیسم های تجمع..... ۱۹

۱-۱۳-۴- فاکتور ها ی کمک کنند ه به تجمع..... ۱۹

۱-۱۳-۴-۱- آمیلوئید..... ۲۰

۱-۱۳-۴-۲- انکوژن بادی ها..... ۲۱

۱-۱۴- چاپرون و انواع آن..... ۲۲

۱-۱۴-۱-مکانیسم عمل DNAK..... ۲۳

۱-۱۴-۲-HSP60..... ۲۴

۱-۱۴-۳-نحوه عملکرد چپرون های GroELو GroES..... ۲۵

۱-۱۴-۴- -چپرونهای شوک حرارتی کوچکSHSPS..... ۲۵

۱-۱۵- پروتئین های کازئینی..... ۲۶

۱-۱۶- بتاکازئین وعملکرد چاپرونی..... ۲۶

۱-۱۷- آلفا لاکتالبومینAlpha-lactalbumin..... ۲۸

۱-۱۷-۱- خصوصیات فیزیولوژیکی..... ۲۸.

۱-۱۸- انسولین..... ۳۰

۱-۱۸-۱- ساختمان شیمیایی انسولین..... ۳۱

۱-۱۹- کونالبومین(conalbumin)..... ۳۳

۱-۲۰- مولکول های کوچک(small molecules)..... ۳۵

۱-۲۰-۱- تأثیر small molecule ها بر روی تجمع پروتئین..... ۳۵

۱-۲۱- اهداف پایان نامه..... ۳۷

۲- فصل دوم..... ۳۸

۲-۱- مواد شیمیایی و پروتئینها..... ۳۹

۲-۲- روش ها..... ۳۹

۲-۲-۱- طیف سنجی نور مرئی..... ۳۹

۲-۲-۲- بررسی فلورسانس تریپتوفان ذاتی..... ۳۹

۲-۲-۳- بررسی ۱-آنیلینو-۸-نفتالن-سولفونات (ANS):..... ۴۰

۲-۲-۴- اسپکتروسکوپی دورنگ تمایی حلقوی (CD):..... ۴۰

۳- فصل سوم: نتایج ۴۱

۳-۱- طیف سنجی مرئی – فرابنفش:..... ۴۲

۳-۱-۱- اسپکتروفتومتری..... ۴۲

۳-۱-۲- کروموفر..... ۴۳

۳-۱-۳- کاربرد های مهم طیف سنجی مرئی – فرابنفش..... ۴۳

۳-۱-۴- قواعد تجربی برای تفسیر طیف های ماکرومولکولهای بیولوژیکی:..... ۴۴

۳-۱-۵- بررسی عملکرد چپرونی بتا کازئین وتاثیر مولکول های کوچک آرژنین و گلایسین با استفاده از روش طیف سنجی نور مرئی..... ۴۵

۳-۱-۵-۱-مطالعه دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی انسولین در حضور وعدم حضور بتا کازئین و مولکول های کوچک آرژنین و گلایسین..... ۴۵

۳-۱-۵-۲- مطالعه دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی آلفا لاکتالبومین درحضور وعدم حضور بتا کازئین و مولکول های کوچک آرژنین و گلایسین..... ۴۶

۳-۱-۵-۳- مطالعه دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی اووترانسفرین درحضور وعدم حضور بتا کازئین و مولکول های کوچک آرژنین و گلایسین..... ۴۷

۳-۲- فلوریمتری..... ۴۹

۳-۲-۱- خاصیت فلورسانس وانواع آن..... ۴۹

۳-۲-۲- اسپکتروسکوپی فلورساس ذاتی انسولین در حضور وعدم حضور بتاکازئین و مولکول های کوچک آرژنین و گلایسین.....۵۱

۳-۲-۳-اسپکتروسکوپی فلورساس ذاتی آلفا-لاکتالبومین در حضور وعدم حضور بتاکازئین و مولکول های کوچک آرژنین و گلایسین.....۵۳

۳-۲-۴-اسپکتروسکوپی فلورساس ذاتی اووترانسفرین در حضور وعدم حضور بتاکازئین و مولکول های کوچک آرژنین و گلایسین.....۵۵

۳-۲-۵- ۱-آنیلینو-۸- نفتالن سولفونات (ANS).....۵۷

۳-۲-۵-۱ - بررسی اتصال ۱-آنیلینو-۸- نفتالن سولفونات به انسولین در حضور و عدم حضور بتا کازئین و مولکول های کوچک آرژنین و گلایسین.....۵۸

۳-۲-۵-۲-بررسی اتصال ۱-آنیلینو-۸- نفتالن سولفونات به آلفا-لاکتالبومین در حضور و عدم حضور بتا کازئین و مولکول های کوچک آرژنین و گلایسین.....۵۹

۳-۲-۵-۳-بررسی اتصال ۱-آنیلینو-۸- نفتالن سولفونات اووترانسفرین در حضور و عدم حضور بتا کازئین و مولکول های کوچک آرژنین و گلایسین.....۵۹

۳-۳- طیف سنجی دو رنگ نمایی حلقوی(Circular dichroism).....۶۰

۳-۳-۱- دستگاه CD.....۶۱

۳-۳-۲- اطلاعات بدست آمده از طیف CD.....۶۲

۳-۳-۳- نکات مهم در تفسیر طیف های CD.....۶۲

۳-۳-۴- Near-uv اسپکتروسکوپی.....۶۳

۳-۳- ۵-Far-uv اسپکتروسکوپی.....۶۴

۴- فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری.....۶۶

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱.آرایش فضایی پیوند پپتیدی..... ۳

شکل۱- ۲.جهت گیری اتم های یک پپتید در ساختار مارپیچ آلفا..... ۵

شکل۱- ۳. فضا و زاویه پیوندهای هیدروژنی صفحات تکراری بتا..... ۶

شکل۱- ۴. چهار سطح ساختمانی پروتئین..... ۱۱

شکل۱- ۵. تشکیل تجمعات پروتئینی..... ۲۰

شکل۱- ۶.فرآیند تشکیل فیبریل..... ۲۱

شکل۱- ۷. مکانیسم عملکرد چاپرون DNA..... ۲۴

شکل۱- ۸. *نحوه عملکرد چپرو نهای* GroEL و GroES..... ۲۵

شکل۱- ۹. جایگاه اتصال کلسیم در آلفالاکتالبومین انسانی..... ۳۰

شکل۱- ۱۰. سنتز انسولین از پیش ساز پروانسولین ۳۱

شکل۱- ۱۱. *ساختار دیمر و هگزامری انسولین*..... ۳۱

شکل۱- ۱۲. ساختار پروتئین اووترانسفرین..... ۳۴

شکل۱- ۱۳. مکانیسم اثر آرژنین در جلوگیری از تجمعات..... ۳۷

شکل۳-۱. اثرات آرژنین و گلایسین درجلوگیری از تجمع انسولین در حضور وعدم حضور بتاکازئین..... ۴۶

شکل۳-۲. اثرات‌آرژنین‌وگلایسین درجلوگیری از تجمع آلفالاکتالبومین‌درحضوروعدم حضور بتاکازئین ۴۷

شکل۳-۳. اثرات‌آرژنین‌وگلایسین‌درجلوگیری از تجمع اووترانسفرین‌درحضور وعدم حضور بتاکازئین.... ۴۸

شکل۳-۴. طیف فلوئورسانس‌ذاتی‌تریپتوفان‌انسولین‌درحضوروعدم‌حضوربتاکازئین‌آرژنین وگلایسین..... ۵۱

شکل۳-۵. ماکزیمم شدت فلوئورسانس انسولین درحضوروعدم‌حضوربتاکازئین‌آرژنین وگلایسین..... ۵۲

شکل۳-۶.طیف‌فلوئورسانس‌ذاتی‌تریپتوفان‌آلفالاکتالبومین‌درحضوروعدم‌حضوربتاکازئین‌آرژنین‌وگلایسین ۵۳

شکل۳-۷. ماکزیمم شدت فلوئورسانس آلفالاکتالبومین در حضور و عدم حضور بتاکازئین آرژنین و گلایسین...۵۴
شکل۳-۸ .طیف فلوئورسانس ذاتی تریپتوفان اووترانسفرین در حضور و عدم حضور بتاکازئین آرژنین گلایسین.۵۵
شکل۳-۹. ماکزیمم شدت فلوئورسانس اووترانسفرین در حضور و عدم حضور بتاکازئین آرژنین و گلایسین.....۵۶
شکل۳-۱۰. میانگین ماکزیمم فلئورسانس برای اتصال نشا نگر هیدروفوبیک ANS برای انسولین ،
آلفالاکتالبومین و اووترانسفرین.....۶۰
شکل۳-۱۱. طیف Near-uv CD بتا-کازئین در حضور و عدم حضور آرژنین و گلایسین.....۶۳
شکل۳-۱۲. طیف Far -uv CD بتا-کازئین در حضور و عدم حضور آرژنین و گلایسین.....۶۴

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول۳- ۴. درصدحفاظتی بتاکازئین در حضور و عدم حضور آرژنین وگلایسین.....۴۸

جدول۳- ۵. محاسبه ساختار دوم از طیف Far-CD برای بتاکازئین در حضور و غیاب آرژنین و گلایسین با استفاده از برنامهJasco . دور ۳۲.۴.....۶۵

فهرست علائم

علامت	نشانه
DNA	اسید نوکلئیک
RNA	ریبو نوکلئیک اسید
KDa	کیلو دالتون
C_α	کربن آلفا
R	ریشه اسید آمینه
M	مول
µM	میکرومول
PI	نقطه ایزوالکتریک
Asp	آسپارتات
Lys	لیزین
Thr	ترئونین
Gln	گلوتامین
Leu	لوسین
Å	انگستروم
Mn	منگنز
Mg	منیزیم
Fe	آهن
K	پتاسیم
Na	سدیم
Nm	نانومتر
Mg/mL	میلی گرم/ میلی لیتر
g/L	گرم/ لیتر
ATP	آدنوزین تری فسفات
HMW	وزن مولکولی بالا
Cm	سانتی متر
Min	دقیقه
w/v	وزنی/حجمی
λ_{max}	ماکزیمم طول موج
Ins	انسولین

α-Lac	آلفا لاکتالبومین
Ovo	اووترانسفرین
B-CN	بتاکازئین
DTT	دی تیوتریتول
ANS	۱-آنیلینو-۸-نفتالن-سولفونات
CD	اسپکتروسکوپی دورنگ نمایی حلقوی

فصل اول

مقدمه

۱-۱ - مقدمه ای بر پروتئین و اهمیت آن

پروتئین‌ها از مولکولهای اساسی سلولها هستند کـه بـیش از نیمـی از وزن خشـک آنهـا را مـی‌سـازند. در ساختار همه اندامکها و اجزای فعال سلولها یافت می‌شوند و در ساخت و کار آنهـا نقـش بنیـادی دارنـد. بخـش مهمـی از سـاختار غشـای سـلول و انـدامکها، اسـکلت سـلولی، اتصـالهای سـلولی از پـروتئین‌هـای سـاختاری (ساختمانی) متنوعی تشکیل شده اسـت. پـروتئین‌هـای آنزیمـی ابـزار کـار سـلول‌انـد و در انجـام واکنشـهای بیوشیمیایی سلولها به عنوان کاتالیزور ضرورت دارند. برخی پروتئین‌ها عمل دفاعی دارند (پادتن‌ها) و برخـی در اعمال مهم زیستی دیگری نقش دارند. برای مثال، هموگلوبین و هموسیانین انتقـال گازهـای تنفسـی را انجـام می‌دهند و یا سیتوکرومها انتقـال الکترونهـا و پدیـده‌هـایی از اکسـایش و کـاهش را عهـده‌دار هسـتند. برخـی هورمونها، مثل انسولین و بسیاری از مولکولهایی که به عنوان نشانه در برقراری ارتباط‌های درون سلولی و بـین سلولی عمل می‌کنند، ساختار پروتئینی دارند. پروتئین‌ها مواد اصلی لازم برای رشد و ترمیم سـلولها هسـتند و در موارد لزوم برای تامین انرژی مورد نیاز سلولها نیز مصرف می‌شوند .

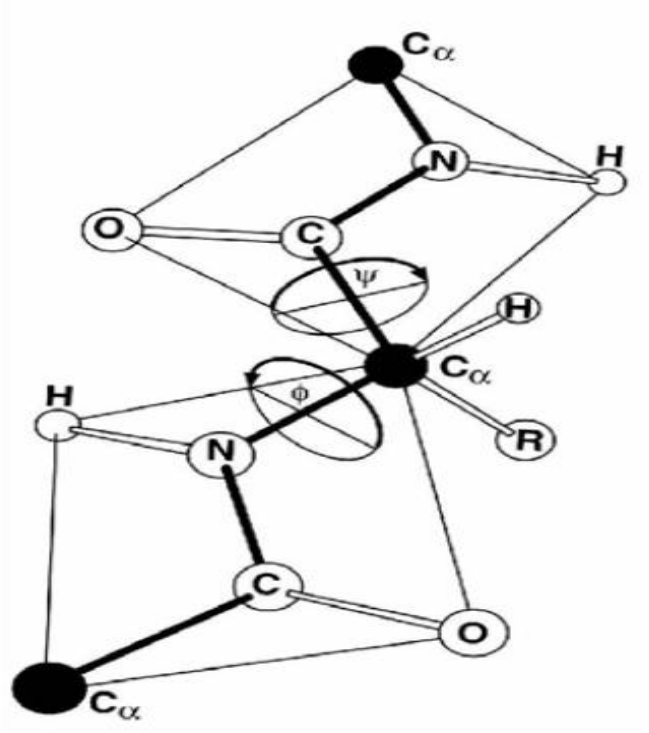
۱-۲-اسیدهای آمینه

پروتئین ها از اسیدهای آمینه ساخته شده اند. برای تمام ارگانیسم های زنده بیست اسید آمینه شـناخته شده است که تمام این اسیدهای آمینه از نوع α آمینو اسید می‌باشند به این معنی که گروه‌های کربوکسـیلیک اسید و آمینو توسط یک کربن α از هم جدا شده‌اند. همه اسیدهای آمینه شناخته شده به جز گلایسین کایرال بوده و ساختار L دارند. اسیدهای آمینه به وسیله‌ی شیمی زنجیره‌های جانبی که به کربن α متصل شده اسـت از هم متمایز می‌شوند. در حالت عادی گروه کربوکسیل یک پروتون به گروه آمین می‌دهد ، به طوری کـه یـک اسید آمینه (در غیاب سایر اسیدها و بازها) هم بار مثبـت و هـم بـار منفـی دارد وکـل مولکـول از لحـاظ بـار الکتریکی خنثی است(زویترون) [۱] .

۱ -۳- ساختار اول

توالی اسید آمینه در یک زنجیر پلی پپتیدی به منزله ساختار اول معرفی می شود. ساختار اولیه بـا اسـید آمینه انتهای آمین شروع و به اسید آمینه انتهای کربوکسیل ختم می‌شود. پیوند پپتیدی در ساختار پروتیئن‌ها

از ترکیب عامل کربوکسیل یک اسید آمینه و عامل آمین اسید آمینه دیگر بـا از دسـت دادن یـک مولکـول آب بوجود می‌آید. در یک جفت اسید آمینه که به وسیله‌ی پیوند پپتیدی اتصال یافته‌اند ۶ اتم کربن در یک صفحه (اتم کربن آ لفا وگروه CO از اسید آمینه اول و اتم کربن آلفاو گروه NH از اسید آمینه دوم) قرار مـی‌گیرنـد. لذا در پروتئین پیوندهای قابل چرخش به صورت متناوب با پیوندهای مسطح غیر قابل چرخش قرار گرفته‌انـد، این نوع سازماندهی به میزان قابل توجهی تعداد کنفورماسیون‌هایی را که زنجیره پلی پپتیدی مـی‌توانـد اتخـاذ کند محدود می‌نماید. پایداری پیوند پپتیدی به دلیل رزونانس(نا مستقر بودن الکترون ها در چندین اتم) می-باشد و در نتیجه رزونانس پیوند پپتیدی به صورت نسبی خصوصیات پیوند دوگانه را دارد. طول پیوند پپتیـدی حدود ۱.۳۲ آنگسترم است که بین مقدار مورد انتظار پیونـد سـاده C-N و پیونـد دوگانـه C=N مـی باشـد. رزونانس قطبیت پیوند پپتیدی را افزایش می‌دهد که این قطبیت در فرآیند فولـدینگ پـروتئین نقـش اساسـی دارد. سه پیوند سبب جدایی کربن‌های آلفا متوالی متصل به یکدیگر می‌گردد. همان طور که در شکل ۱-۱ می بینیم پیوندهای $N\text{-}C_\alpha$ و $C_\alpha\text{-}C$ می توانند با زوایـایی بچرخنـد کـه بـه ترتیـب بـا φ و Ψ نمـایش داده مـی شوند[۱] .



شکل۱- ۱.آرایش فضایی پیوند پپتیدی[۱]