



دانشگاه سیستان و بلوچستان

تحصیلات تکمیلی

پایان نامه کارشناسی ارشد در زیست شناسی - بیوشیمی

عنوان:

تأثیر مولکول چاپرون بروی تجمع پروتئین ها

استاد (اساتید) راهنما:

دکتر آرزو قهقائی

دکتر سیده زهرا بطحائی

استاد مشاور:

دکتر علی شهرکی

تحقیق و نگارش:

فرزاد رحمانی عسگرآباد

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

شهریور ۱۳۸۹

چکیده

تجمع یابی پروتئین‌ها پدیده‌ای است که طی آن پروتئین ساختمان طبیعی خود را از دست داده ضمن اتخاذ ساختار غیر طبیعی تجمع می‌یابند. بتا-کازئین که از جمله فراوانترین اجزاء تشکیل دهنده میسل‌های شیر پستانداران است در شرایط آزمایشگاهی فعالیت شبه‌چپرونی از خود بروز می‌دهند. همچنین چپرون شیمیایی گلیسرول که از جمله ترکیبات پلی‌اول محسوب می‌شود در پایداری پروتئین‌ها نقش دارد. گلیسرول ضمن افزایش کینتیک فرایند فولدینگ از تجمع یابی پروتئین‌ها جلوگیری می‌نماید. خصوصیات مذکور ما را بر آن داشت تا فعالیت چپرونی بتا-کازئین و گلیسرول را با یکدیگر مقایسه کنیم.

در این سری از مطالعات عملکرد چپرونی بتا-کازئین و گلیسرول طی برهمکنش آنها با انواع متفاوتی از پروتئین‌های هدف (نظیر اووترانسفرین ، انسولین و آلفا-لاکتالبومین) در حضور عامل ازدحام ماکرومولکولی (دکستران) مورد بررسی قرار گرفت. برهمکنش بین پروتئین‌ها توسط روش‌های اسپکتروسکوپی جذب نور مرئی ، اسپکتروسکوپی فلورسانس ذاتی ، اتصال ماده فلورسانس ANS و اسپکتروسکوپی دو رنگ نمایی حلقوی (Near UV) مورد مطالعه قرار گرفت. در حضور دکستران میزان و گستردگی تجمع یابی پروتئین‌های هدف افزایش یافته و هر دو نوع چپرون مذکور تاثیر کمتری در جلوگیری از تشکیل تجمعات و رسوبات پروتئینی از خود نشان دادند. این نتایج نشان داد که بتا-کازئین بر میزان تشکیل تجمعات پروتئینی آهسته پروتئین‌ها نسبت به تجمع یابی سریع آنها تاثیر چپرونی بیشتری دارد. نتایج حاصله نشان دهنده آن است که تغییرات ساختاری القا شده توسط دکستران در ساختمان پروتئین‌ها و میزان برهمکنش‌های بین مولکولی با فعالیت چپرونی بتا-کازئین به لحاظ کینتیکی در رقابت هستند. به هر حال طبق مشاهدات ما مشخص شد که گلیسرول نسبت به بتا-کازئین خصوصا در شرایط با ازدحام فعالیت چپرونی بیشتری را از خود بروز می‌دهد. چرا که در حضور گلیسرول برهمکنش بین پروتئین‌ها با محیط محلول افزایش یافته و همچنین گروه‌های پپتیدی و شاخه‌های جانبی آمینواسیدی به مقدار بیشتری در معرض قرار می‌گیرند که در نهایت برهمکنش بین پروتئین‌ها و گلیسرول افزایش خواهد یافت.

کلمات کلیدی: بتا-کازئین ، گلیسرول ، چپرون ، ازدحام مولکولی ، تجمع یابی پروتئین ، اووترانسفرین ، انسولین ، آلفا-لاکتالبومین، کاتالاز

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	فصل اول: مقدمه.....
۲	۱-۱- پروتئین.....
۲	۲-۱- پروتئین ها از مجموعه ای متشکل از ۲۰ آمینواسید ساخته شده اند.....
۳	۳-۱- ساختار اول.....
۴	۴-۱- نمودار رامچاندران.....
۶	۵-۱- ساختار دوم.....
۶	۶-۱- مارپیچ α
۷	۷-۱- صفحات بتا.....
۸	۸-۱- ساختار های فرا ثانویه.....
۹	۹-۱- ساختار سوم.....
۱۰	۱۰-۱- ساختار چهارم.....
۱۰	۱۱-۱- عوامل موثر در مقاومت ساختمان پروتئین ها.....
۱۶	۱۲-۱- فولدینگ (تا خوردن) پروتئین ها.....
۱۸	۱۳-۱- مکانیسم اساسی در فولدینگ پروتئین ها از دیدگاه انرژی.....
۱۹	۱۴-۱- فولدینگ صحیح و ناصحیح پروتئین ها در سلول.....
۲۰	۱۵-۱- روش های جداسازی و تخلیص پروتئین ها.....
۲۱	۱-۱۵-۱- جداسازی توسط نمک.....
۲۱	۲-۱۵-۱- دیالیز.....
۲۱	۳-۱۵-۱- فلیتراسیون ژلی.....

۲۲	۱-۱۵-۴- الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات (SDS)
۲۲	۱-۱۶- تجمع یا Aggregation پروتئین ها
۲۵	۱-۱۷- مراحل تشکیل تجمعات پروتئینی
۲۵	۱-۱۸- مکانیسم های متفاوت در تشکیل تجمعات پروتئینی
۲۷	۱-۱۹- تجمعات Inclusionbody
۲۸	۱-۲۰- ساختار inclusion body ها
۲۹	۱-۲۱- مزایا و معایب شکل گیری inclusion body ها
۳۰	۱-۲۲- تجمعات آمیلوئیدی
۳۱	۱-۲۳- ساختار فیبریل های آمیلوئیدی
۳۲	۱-۲۴- مضرات شکل گیری آمیلوئید ها
۳۳	۱-۲۵- آلفا- لاکتالبومین
۳۶	۱-۲۶- اووترانسفرین
۳۷	۱-۲۷- کاتالاز
۳۸	۱-۲۷-۱- ساختمان هر مونومر کاتالاز گاوی
۳۹	۱-۲۸- انسولین
۴۰	۱-۲۹- عامل ازدحام
۴۴	۱-۲۹-۱- برهمکنش های غیر اختصاصی
۴۴	۱-۲۹-۲- حجم در دسترس و بازداری شده
۴۴	۱-۲۹-۳- تاثیر حجم بازداری بر میزان برهمکنش بین ماکرومولکولها
۴۴	۱-۲۹-۴- تاثیر حجم بازداری در برهمکنش ماکرومولکولی
۴۶	۱-۳۰- چا پرونها
۴۷	۱-۳۰-۱- خانواده های چا پرونی
۴۷	۱-۳۰-۲- چا پرونین ها

۴۸۱-۳۰-۳- اتصال رشته پلی پپتیدی به GroEL
۵۱۱-۳۰-۴- Hsp۷۰
۵۶۱-۳۰-۵- چرخه چاپرونی Hsp۹۰
۵۶۱-۳۰-۶- پروتئین های شوک گرمایی کوچک (Hsps)
۵۸۱-۳۰-۷- چا پرونها و بیماری
۵۹۱-۳۱-۳۱- اسمولیت ها
۶۰۱-۳۱-۱- اسمولیت ها و ایجاد ازدحام مولکولی
۶۳۱-۳۲- پروتئین های کازئین
۶۴۱-۳۳- بتا کازئین
۶۶۱-۳۳-۱- فعالیت چا پرونی بتا کازئین
۶۷۱-۳۴- اهداف پروژه
۶۹ فصل دوم: مواد و روش ها
۷۰۲-۱- مواد شیمیایی و پروتئین ها
۷۰۲-۲- روش ها
۷۰۲-۲-۱- طیف سنجی نور مرئی
۷۰۲-۲-۲- مطالعه دناتوراسیون پروتئینها با استفاده از استرس احیا کننده
۷۰۲-۲-۳- مطالعه دناتوراسیون پروتئین ها با استفاده از استرس دمایی
۷۱۲-۳- بررسی فلورسانس تریپتوفان ذاتی
۷۱۲-۴- بررسی ۱- آنیلینو- ۸- نفتالن- سولفونات (ANS)
۷۱۲-۵- اسپکتروسکوپی دورنگ نمایی حلقوی (CD)
۷۳ فصل سوم: بحث نتیجه گیری
۷۴۳-۱- طیف سنجی مرئی- فرابنفش
۷۵۳-۲- مطالعه اجمالی از عملکرد چاپرونی بتا - کازئین و گلیسرول با استفاده از روش طیف سنجی نور مرئی

۳-۳	بررسی نقش چا پرونی بتا کازئین بر تجمع انسولین در حضور و عدم حضور عامل ازدحام.....	۷۶
۳-۴	بررسی عملکرد چا پرونی گلیسرول بر روی انسولین در حضور و عدم حضور عامل ازدحام	۷۸
۳-۵	بررسی نقش چا پرونی بتا - کازئین بر تجمع آلفا- لاکتالبومین در حضور و عدم حضور عامل ازدحام.....	۸۱
۳-۶	بررسی عملکرد چا پرونی گلیسرول بر روی آلفا-لاکتالبومین در حضور و عدم حضور عامل ازدحام.....	۸۴
۳-۷	بررسی نقش چا پرونی بتا کازئین بر تجمع اووترانسفرین در حضور و عدم حضور عامل ازدحام.....	۸۶
۳-۸	بررسی عملکرد چا پرونی گلیسرول بر روی اووترانسفرین در حضور و عدم حضور عامل ازدحام.....	۸۸
۳-۹	بررسی نقش چا پرونی بتا کازئین بر تجمع کاتالاز در حضور و عدم حضور عامل ازدحام.....	۹۰
۳-۱۰	بررسی عملکرد چا پرونی گلیسرول بر روی کاتالاز در حضور و عدم حضور عامل ازدحام.....	۹۲
۳-۱۱	اسپکتروسکوپی فلورسانس.....	۹۴
۳-۱۲	قواعد تجربی برای تحلیل داده های فلورسنت طیف پروتئین.....	۹۶
۳-۱۳	اسپکتروسکوپی فلورسانس ذاتی انسولین با β -کازئین و گلیسرول در حضور و عدم حضور دکستران.....	۹۷
۳-۱۴	اسپکتروسکوپی فلورسانس ذاتی آلفا- لاکتالبومین با β -کازئین و گلیسرول در حضور و عدم حضور دکستران	۹۹
۳-۱۵	اسپکتروسکوپی فلورسانس ذاتی اووترانسفرین با β -کازئین و گلیسرول در حضور و عدم حضور دکستران	۱۰۲
۳-۱۶	مطالعه آرایش فضایی و جایگاه پیوندی ماکرومولکول در اثر فلورسنت محیطی.....	۱۰۳
۳-۱۷	مطالعه اتصال ANS به پروتئین های هدف به همراه بتا- کازئین و گلیسرول در غیاب دکستران.....	۱۰۶
۳-۱۸	طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی (CD)	۱۱۰
۳-۱۹	کروموفورهای CD و اطلاعات ساختمانی.....	۱۱۱
۳-۲۰	Near-UV اسپکتروسکوپی.....	۱۱۱
	فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری.....	۱۱۳
	مراجع.....	۱۱۷

فهرست شکل ها

صفحه	عنوان شکل
۳	شکل ۱-۱. انواع آرایش فضایی در آمینواسیدها
۳	شکل ۲-۱. قطبیت در زنجیره های پلی پپتیدی
۵	شکل ۳-۱. بخشی از یک زنجیره پلی پپتیدی که درجه چرخش Φ و Ψ را نشان می دهد
۶	شکل ۴-۱. نقشه یا نمودار رامچاندرا که مقادیر مجاز از زوایای Ψ و Φ را نشان می دهد
۷	شکل ۵-۱. نمایش ساختمان مارپیچ آلفا
۸	شکل ۶-۱. نمایش بخشی از صفحات بتا
۹	شکل ۷-۱. ساختمان دو نوع از دور های بتا (β -turn)
۱۰	شکل ۸-۱. آرایش چهار سطح ساختمانی پروتئین ها
۱۳	شکل ۹-۱. نحوه پراکنش آمینواسیدهای باردار در سطح دو آنزیم همکار
۱۵	شکل ۱۰-۱. شکل گیری ساختمانهای متفاوت پپتید $A\beta$
۱۶	شکل ۱۱-۱. ساختمان مارپیچ سه تایی از یک مدل کلاژن و (b) الگو پیوندهای هیدروژنی در بین سه مارپیچ
۲۰	شکل ۱۲-۱. مسیر رشته های پلی پپتیدی تازه سنتز شده
۲۴	شکل ۱۳-۱. مقایسه بین تمایل آمینواسیدهای مختلف برای تجمع و بی نظمی ساختار های پروتئینی
۲۶	شکل ۱۴-۱. مسیرهای دو طرفه فولدینگ و آنفولدینگ پروتئین ها
۲۷	شکل ۱۵-۱. انواع تجمعات پروتئینی شکل گرفته در بیماری های مختلف ناشی از تجمع پروتئین ها

- شکل ۱-۱۶. مراحل تشکیل inclusion body ها ۲۸
- شکل ۱-۱۷. نمونه میکروگراف الکترونی از فیبریل های آمیلوئیدی ۳۱
- شکل ۱-۱۸. فیبریل با چهار پروتوفیلامنت ۳۲
- شکل ۱-۱۹. مکانیسم معمول مرگ سلولهای عصبی وابسته به تجمع پروتئین ها ۳۳
- شکل ۱-۲۰. ساختار شماتیک ساختمان های اول تا چهارم انسولین گاوی ۴۰
- شکل ۱-۲۱. چرخه عملیاتی کمپلکس چاپرونی GroEL\GroES ۵۰
- شکل ۱-۲۲. تغییر در ساختمان چاپرون Hsp70 در اثر اتصال نوکلئوتید ATP ۵۲
- شکل ۱-۲۳. انواع مسیرهای پیش روی پروتئین های تازه سنتز شده ۵۴
- شکل ۱-۲۴. سیستم چاپرونی Hsp90 برای یک رسپتور هورمون استروئیدی ۵۵
- شکل ۱-۲۵. نحوه فعالیت sHsp در اتصال به پروتئین های غیر طبیعی ۵۷
- شکل ۱-۲۶. تاثیر دما و غلظت کلسیم محیط بر تشکیل مسیل از پروتئین های بتا-کازئین ۶۶
- شکل ۳-۱. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی انسولین گاوی در حضور دی تیو تریتول و بتا-کازئین ۷۶
- شکل ۳-۲. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی انسولین گاوی در حضور دی تیو تریتول، دکستران و بتا-کازئین ۷۸
- شکل ۳-۳. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی انسولین گاوی در حضور دی تیو تریتول و گلیسرول ۷۹
- شکل ۳-۴. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی انسولین گاوی در حضور دی تیو تریتول، دکستران و گلیسرول ۸۰
- شکل ۳-۵. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی اووترانسفرین در حضور دی تیو تریتول و بتا-کازئین ۸۲
- شکل ۳-۶. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی اووترانسفرین در حضور دی تیو تریتول، دکستران و بتا-کازئین ۸۳
- شکل ۳-۷. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی اووترانسفرین در حضور دی تیو تریتول و گلیسرول ۸۴
- شکل ۳-۸. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی اووترانسفرین در حضور دی تیو تریتول، دکستران و گلیسرول ۸۵

- شکل ۳-۹. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی آلفا-لاکتالبومین گاوی در حضور دی تیو تریتول و بتا-کازئین ۸۷
- شکل ۳-۱۰. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی آلفا-لاکتالبومین در حضور دی تیو تریتول، دکستران و بتا-کازئین ۸۸
- شکل ۳-۱۱. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی α -لاکتالبومین در حضور دی تیو تریتول و گلیسرول ۸۹
- شکل ۳-۱۲. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی آلفا-لاکتالبومین در حضور دی تیو تریتول، دکستران و گلیسرول ۹۰
- شکل ۳-۱۳. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی کاتالاز در حضور دی تیو تریتول و بتا-کازئین ۹۱
- شکل ۳-۱۴. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی کاتالاز ($10\mu\text{M}$) در حضور دی تیو تریتول، دکستران و بتا-کازئین ۹۲
- شکل ۳-۱۵. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی کاتالاز در حضور دی تیو تریتول و گلیسرول ۹۳
- شکل ۳-۱۶. دناتوراسیون و تشکیل تجمعات پروتئینی کاتالاز در حضور دی تیو تریتول، دکستران و گلیسرول ۹۴
- شکل ۳-۱۷. طیف فلورسانس ذاتی تریپتوفان انسولین گاوی، بتا-کازئین و گلیسرول در حضور و غیاب دکستران ۹۸
- شکل ۳-۱۸. ماکزیمم شدت فلورسانس انسولین گاوی، بتا-کازئین و دکستران ۹۹
- شکل ۳-۱۹. طیف فلورسانس ذاتی تریپتوفان آلفا-لاکتالبومین، بتا-کازئین و گلیسرول در حضور و غیاب دکستران ۱۰۰
- شکل ۳-۲۰. ماکزیمم شدت فلورسانس آلفا-لاکتالبومین گاوی، بتا-کازئین و دکستران ۱۰۱
- شکل ۳-۲۱. طیف فلورسانس ذاتی تریپتوفان اووترانسفرین، بتا-کازئین و گلیسرول در حضور و غیاب دکستران ۱۰۲
- شکل ۳-۲۲. طیف فلورسانس ذاتی تریپتوفان اووترانسفرین، بتا-کازئین و گلیسرول در حضور و غیاب دکستران ۱۰۳
- شکل ۳-۲۳. نمایش ساختمان ANS ۱۰۵
- شکل ۳-۲۴. انواع روش های اتصال ANS به پروتئین هدف ۱۰۶
- شکل ۳-۲۵. میانگین ماکزیمم فلورسانس برای اتصال ANS به انسولین گاوی، بتا-کازئین و گلیسرول در حضور و غیاب DTT ۱۰۸
- و دکستران

شکل ۳-۲۶. میانگین ماکزیمم فلورسانس برای اتصال ANS به آلفا-لاکتالبومین گاوی ، بتا-کازئین و گلیسرول در حضور و

۱۰۸

غیاب DTT و دکستران

شکل ۳-۲۷. میانگین ماکزیمم فلورسانس برای اتصال ANS به اووترانسفرین گاوی ، بتا-کازئین و گلیسرول در حضور و غیاب

۱۰۹

DTT و دکستران

شکل ۳-۲۸. طیف Near-UV CD بتا-کازئین در حالت طبیعی و احیا شده در حضور و غیاب دکستران

۱۱۲

فهرست جدول ها

عنوان جدول	صفحه
جدول ۱-۳. درصد بازداری غلظت های مختلف بتا- کازئین از دناتوراسیون و شکل گیری تجمعات پروتئینی انسولین گاوی در حضور DTT	۷۷
جدول ۲-۳. درصد بازداری غلظت های مختلف بتا- کازئین از دناتوراسیون و شکل گیری تجمعات پروتئینی انسولین گاوی در حضور DTT و دکستران ۱۰٪	۷۸
جدول ۳-۳. درصد بازداری غلظت های مختلف گلیسرول از دناتوراسیون و شکل گیری تجمعات پروتئینی انسولین گاوی در حضور DTT	۷۹
جدول ۴-۳. درصد بازداری غلظت های مختلف گلیسرول از دناتوراسیون و شکل گیری تجمعات پروتئینی انسولین گاوی در حضور DTT و دکستران ۱۰٪	۸۱
جدول ۵-۳. درصد بازداری غلظت های مختلف بتا- کازئین از دناتوراسیون و شکل گیری تجمعات پروتئینی اووترانسفرین در حضور DTT	۸۲
جدول ۶-۳. درصد بازداری غلظت های مختلف بتا- کازئین از شکل گیری دناتوراسیون و تجمعات پروتئینی اووترانسفرین در حضور DTT و دکستران ۱۰٪	۸۳
جدول ۷-۳. درصد بازداری غلظت های مختلف گلیسرول از دناتوراسیون و شکل گیری تجمعات پروتئینی اووترانسفرین در حضور DTT	۸۴
جدول ۸-۳. درصد بازداری غلظت های مختلف گلیسرول از دناتوراسیون و شکل گیری تجمعات پروتئینی اووترانسفرین در حضور DTT و دکستران ۱۰٪	۸۶
جدول ۹-۳. درصد بازداری غلظت های مختلف بتا- کازئین از دناتوراسیون و شکل گیری تجمعات پروتئینی آلفا-لاکتالبومین گاوی در حضور DTT	۸۷

جدول ۳-۱۰. درصد بازداری غلظت های مختلف بتا- کازئین از دنا تورا سیون و شکل گیری تجمعات پروتئینی آلفا لاکتالبومین

۸۸

در حضور DTT و دکستران ۱۰٪

جدول ۳-۱۱. درصد بازداری غلظت های مختلف گلیسرول از دنا تورا سیون و شکل گیری تجمعات پروتئینی آلفا- لاکتالبومین

۸۹

در حضور DTT

جدول ۳-۱۲. درصد بازداری غلظت های مختلف گلیسرول از دنا تورا سیون و شکل گیری تجمعات پروتئینی آلفا- لاکتالبومین

۹۰

در حضور DTT و دکستران

فهرست علائم

نشانه	علامت
میلی لیتر	ml
جرم	m(kg)
میلی گرم	mg
نانومتر	nm
میکرولیتر	μ l
آنگستروم	\AA
اسپکتروسکوپی دو رنگ نمایی حلقوی	CD
کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی مایع با کارایی بالا	HPLC
دی تیوتریتول	DTT
میلی مول	mM

فصل اول

مقدمه

۱-۱- پروتئین

پروتئین ها از جمله مهمترین و متنوع ترین اجزاء همه سلولهای زنده هستند که فعالیت های مهمی را در تمام فرایندهای بیولوژیک به انجام می رسانند. پروتئین ها در واکنش هایی نظیر ذخیره سازی و انتقال مواد، رشد و تمایز، انتقال امواج عصبی، کاتالیز و ... نقش دارند. پروتئین ها پلیمرهای خطی هستند که از واحدهای مونومری بنام آمینواسید تشکیل شده اند. عملکرد یک پروتئین به طور مستقیم به ساختار سه بعدی آن بستگی دارد. لازم به ذکر است که پروتئین ها به طور خود به خود به ساختار سه بعدی که به وسیله ترادف آمینواسیدها در پلیمر پروتئینی تعیین می شود تا می خورند[۱].

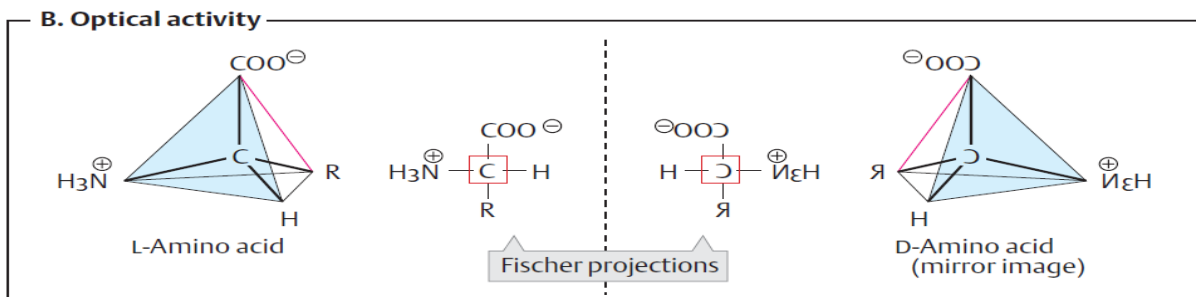
پروتئین ها دارای انواع مختلفی از گروه عاملی هستند این گروه های عاملی شامل الکل ها، تیول ها، تیواترها، اسیدکربوکسیلیک ها، کربوکسامیدها و انواع متنوع گروه های بازی می باشند. آرایش متفاوت گروه های عاملی در ترادف های گوناگون دلیل عملکردهای گسسته ای است که پروتئین ها انجام می دهند. پروتئین ها می توانند برای تشکیل اجتماعات پیچیده با یکدیگر و نیز با دیگر ماکرومولکول های زیستی واکنش دهند. پروتئین های موجود در این اجتماعات می توانند با یکدیگر همکاری کرده و قابلیت هایی را ایجاد نمایند که پروتئین های منفرد قادر به انجام آنها نیستند. این اجتماعات، در پدیده هایی نظیر همانندسازی دقیق DNA، انتقال پیام های بین سلولی و بسیاری از فرآیند های دیگر نقش دارند.

بعضی پروتئین ها انعطاف ناپذیر هستند در حالی که بعضی دیگر انعطاف پذیری محدودی از خود نشان می دهند. واحد های صلب می توانند به عنوان واحدهای ساختاری اسکلت سلولی (چارچوب داخلی در سلول) یا بافت هم بند عمل کنند. قسمت هایی از پروتئین با انعطاف پذیری محدود ممکن است به عنوان یک اهرم عمل نمایند که برای عملکرد پروتئین، اجتماع پروتئین ها با یکدیگر و با دیگر مولکولها، جهت تبدیل به واحدهای پیچیده و نیز انتقال اطلاعات داخل و بین سلول ها ضروری می باشد.

از طرفی عدم تاخوردگی صحیح پروتئین ها یا فولدینگ ناقص آنها با بیماری های کشنده ای نظیر آلزایمر، دیابت نوع ۲، پارکینسون، جنون گاوی و ... در ارتباط است. بعلاوه ثبات و پایداری ساختمان پروتئین ها نیز دارای اهمیت بالینی بسزایی است چرا که جراحات ناشی از سوختگی در نتیجه از بین رفتن نقش زیستی پروتئین ها در اثر دناتوراسیون و یا تجمع پروتئین ها در شرایط شوک یا استرس حرارتی ایجاد می شود. درک فرایند فولدینگ پروتئین ها و تجمع آنها ضمن ایجاد بینشی با اساس مولکولی از جراحات و بیماری ها می تواند باعث رشد و پیشرفت روش های درمانی آنها شود[۱].

۱-۲- پروتئین ها از مجموعه ی ۲۰ آمینواسیدی ساخته شده اند.

آمینو اسیدها واحدهای ساختاری پروتئین ها هستند. هر α - آمینو اسید از یک اتم مرکزی (کربن α) ، یک گروه آمین ، یک گروه کربوکسیلیک ، یک اتم هیدروژن و یک گروه متمایز R که به آن اتصال یافته تشکیل شده است. از گروه R اغلب به عنوان زنجیره جانبی نام برده می شود. همانطور که در شکل ۱-۱ نشان داده شده است ، اگر به اتم کربن α چهار وجهی چهار گروه متفاوت متصل شده باشد آن α - آمینو اسید فعال نوری (کایرال) بوده و دو تصویر آینه ای آن ایزومر L و D نامیده می شوند. آمینو اسید های تشکیل دهنده پروتئین ها فقط از نوع ایزومر L هستند. تقریباً تمام آمینو اسیدها ایزومر L دارای آرایش فضایی مطلق S (در مقابل R) هستند.



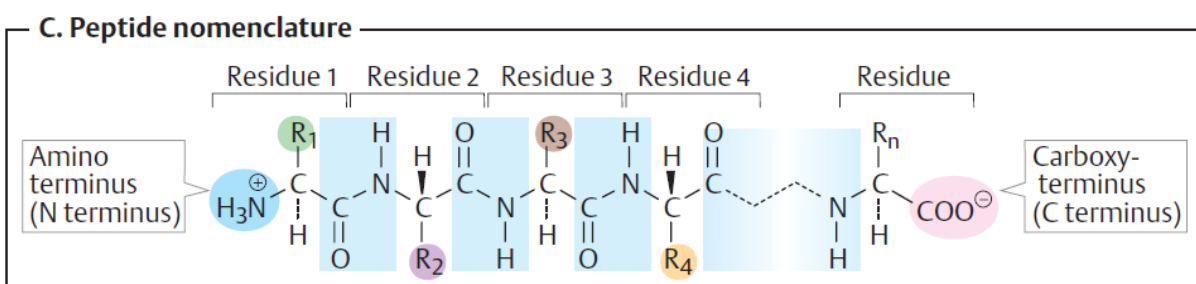
شکل ۱-۱. نمایش انواع آرایش فضایی در آمینواسیدها [۳].

آمینواسیدهای محلول در PH خنثی غالباً به صورت یون های دو قطبی (زویتریون) وجود دارند. معمولاً در پروتئین های موجود در تمامی گونه ها - باکتری ها و یوکاریوت ها ۲۰ نوع زنجیره جانبی وجود دارد که در اندازه، شکل، بار، توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی، ویژگی آب گریزی و واکنش پذیری شیمیایی متفاوتند [۱].

۱-۳- ساختار اول

پروتئین ها پلیمرهای خطی هستند که از اتصال گروه کربوکسیل آلفای یک آمینواسید به گروه آمین آلفای آمینواسید دیگر تشکیل می شوند. این اتصالات پیوند پپتیدی یا آمیدی نامیده می شود.

هر زنجیره پلی پپتیدی دارای قطبیت است؛ زیرا دو انتهای آن به دلیل وجود گروه آمین α در یک انتها و گروه کربوکسیل α در انتهای دیگر با یکدیگر متفاوتند. همانطور که در شکل ۱-۲ نشان داده شده انتهای آمین به عنوان شروع زنجیره پلی پپتیدی است بنابراین ترادف آمینواسیدهای یک زنجیره پلی پپتیدی با نوشتن آمینواسید واجد انتهای آمین شروع می شود.



شکل ۱-۲. قطبیت در زنجیره های پلی پپتیدی را نشان می دهد. بدین ترتیب که همواره در انتهای سمت چپ (نقطه آغاز زنجیره) گروه آمین و در طرف مقابل آن همواره گروه کربونیل قرار می گیرد [۳].

یک زنجیره پلی پپتیدی از یک قسمت تکراری منظم بنام زنجیره اصلی یا اسکلت و یک قسمت تغییر پذیر که شامل زنجیره جانبی متمایز آمینواسیدها می باشد تشکیل شده است. اسکلت پلی پپتیدی دارای توانایی بالایی برای تشکیل پیوندهای هیدروژنی است. هر آمینواسید دارای یک گروه کربونیل می باشد که پذیرنده پیوند هیدروژنی است (به جز پرولین) و یک گروه NH که دهنده مناسب پیوند هیدروژنی می باشد.

بیشتر زنجیره های پلی پپتیدی طبیعی حاوی ۵۰ تا ۲۰۰۰ آمینواسید می باشند که عموماً به آن ها پروتئین اطلاق می شود. پپتیدهایی که از تعداد کمی آمینواسید تشکیل شده اند اولیگوپپتید یا پپتید نامیده می شوند. وزن مولکولی میانگین یک آمینواسید حدود ۱۱۰ دالتون است و بنابراین وزن مولکولی بیشتر پروتئین ها بین ۵۵۰۰ تا ۲۲۰۰۰۰ دالتون می باشد [۱].

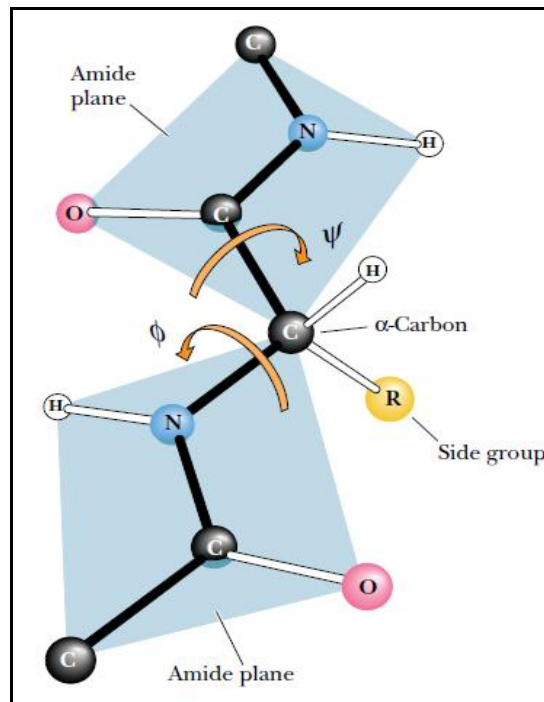
در بعضی پروتئین ها زنجیره های پلی پپتیدی خطی دارای اتصال عرضی می باشند. بیشتر اتصالات عرضی عمدتاً پیوند های دی سولفیدی هستند که با اکسایش یک زوج از آمینواسیدهای سیستئین تشکیل می شوند. واحد بدست آمده از اتصال سیستئین ها، سیستین نامیده می شود. پروتئینهای خارج سلولی اغلب دارای چندین پیوند دی سولفید هستند در حالی که پروتئین های داخل سلول معمولاً فاقد آن می باشند. اتصالات عرضی غیر دی سولفیدی که حاصل زنجیره های جانبی سایر آمینواسیدهاست در برخی پروتئین ها یافت می شوند. برای مثال رشته های کلاژن در بافت همبند و لخته های خونی فیبرین از این دسته اند.

۱-۴- نمودار رامچاندوران

بطور معمول پیوندهای پپتیدی در یک صفحه قرار می گیرند بنابراین در یک جفت آمینواسید که به وسیله پیوند پپتیدی اتصال یافته اند شش اتم در یک صفحه قرار می گیرند: اتم کربن α و گروه CO از آمینواسید اول و گروه NH و اتم کربن α از آمینواسید دوم. پیوند پپتیدی به طور قابل توجهی ویژگی یک پیوند دوگانه را داراست که باعث عدم چرخش حول این پیوند می شود. از آنجا که پیوند پپتیدی باردار نیست تشکیل ساختارهای کروی فشرده برای رشته های آمینواسیدی که از طریق پیوند پپتیدی به یکدیگر اتصال یافته اند، امکان پذیر است.

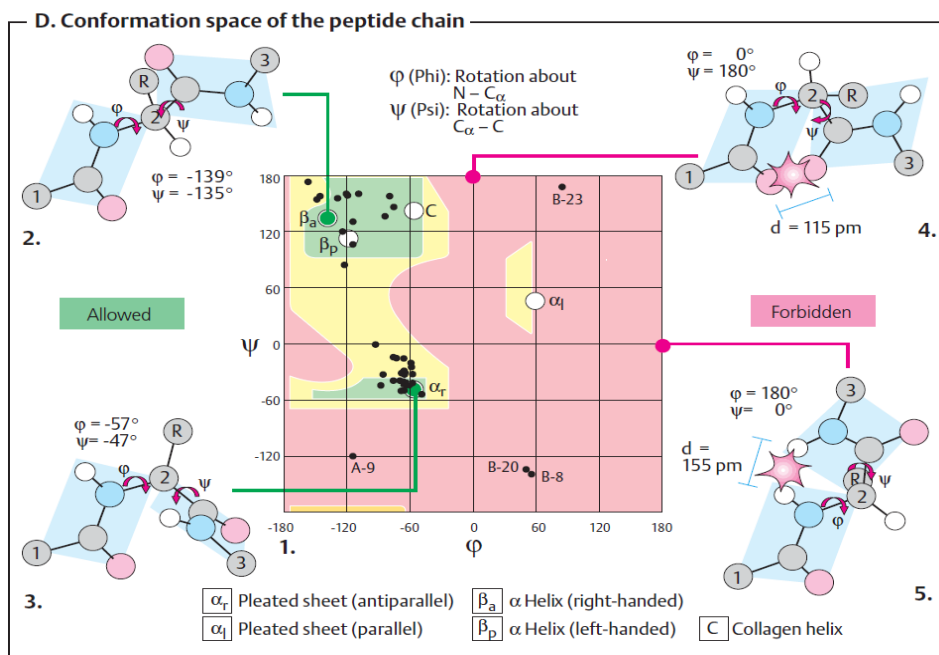
دو آرایش فضایی برای پیوند پپتیدی مسطح وجود دارند که عبارتند از آرایش فضایی ترانس و آرایش فضایی سیس. در آرایش فضایی ترانس دو اتم کربن α در دو سمت مخالف پیوند پپتیدی قرار دارند در حالیکه در آرایش سیس این دو گروه در یک سمت پیوند پپتیدی قرار دارند. تقریباً تمام پیوند های پپتیدی در پروتئین ها به صورت ترانس هستند. ارجحیت ترانس بر سیس را بدین صورت می توان توضیح داد که ممانعت فضایی بین گروه های متصل به کربن α از تشکیل آرایش سیس جلوگیری می نماید.

همانطور که در شکل ۳-۱ نشان داده شده است برخلاف پیوند پپتیدی، پیوند بین گروه آمین و اتم کربن α و همچنین کربن α با گروه کربونیل پیوندهای کاملاً ساده می باشند. دو واحد پپتیدی انعطاف ناپذیر مجاور هم می توانند حول این پیوندها بچرخند و جهت گیری مختلفی به خود بگیرند. آزادی چرخش حول دو پیوند هر آمینواسید، تاخوردن پروتئین ها در جهات مختلف را امکان پذیر می نماید. زاویه چرخش حول پیوند بین نیتروژن و اتم کربن α ، فای (Φ) و زاویه چرخش حول پیوند بین کربن α و کربن گروه کربونیل، سای (Ψ) نامیده می شود.



شکل ۳-۱. نمایش بخشی از یک زنجیره پلی پپتیدی که درجه Ψ و Φ را نشان می دهد [۳].

چرخش در جهت عقربه های ساعت حول هر پیوند که از مقابل گروه پشتی در نظر گرفته می شود، معادل مقدار مثبت است. زوایای Ψ و Φ مسیر زنجیره پلی پپتیدی را تعیین می کنند. از آنجا که مقادیر Ψ و Φ می توانند هر مقدار دلخواهی داشته باشند جی.ان.راماچاندران بسیاری از این مقادیر را به دلیل برخورد های فضایی بین اتم ها، غیر مجاز تشخیص داده و مقادیر مجاز را در یک صفحه دو بعدی ارائه نمود که در شکل ۴-۱ نشان داده شده است. در نمودار راماچاندران سه چهارم مقادیر ممکن (Ψ و Φ) به سادگی و به دلیل ممانعت های فضایی حذف می شوند، انحصار فضایی پدیده ای است که دو اتم نمی توانند در یک زمان، مکان یکسانی را اشغال نمایند [۱].



شکل ۱-۴. نقشه یا نمودار رامچاندرا که مقادیر مجاز از زوایای Ψ و Φ را نشان می دهد [۳].

انعطاف ناپذیری واحد پپتیدی و مجموعه زوایای مجاز Ψ و Φ تعداد ساختارهای احتمالی برای حالت باز شده را به اندازه کافی محدود می کنند که این امر تاخوردن پروتئین را امکان پذیر می سازد.

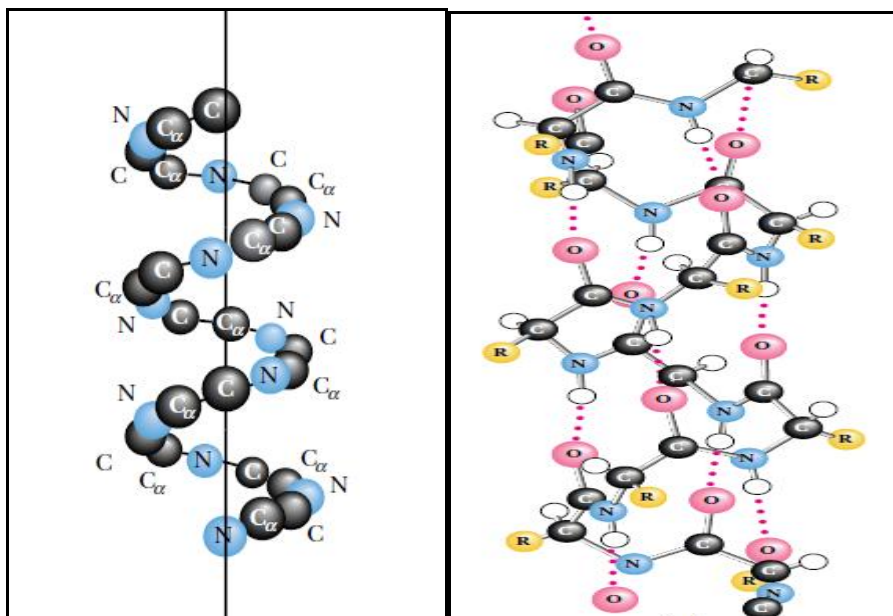
۱-۵- ساختار دوم

لینوس پاولینگ و رابرت کوری در سال ۱۹۵۱ دو ساختار تکراری به نام مارپیچ α و صفحه چین دار β را پیشنهاد دادند. بعدها ساختارهای دیگر نظیر دور β و حلقه امگا شناسایی شدند. اگر چه ساختارهای حلقه و دور غیر تکراری هستند اما به خوبی شناخته شده و به همراه مارپیچ آلفا و صفحات بتا ساختمان نهایی پروتئین را تشکیل می دهند.

۱-۶- مارپیچ α

ساختار مارپیچ α که ساختاری میله ای مانند دارد به وسیله پیوند های هیدروژنی درون زنجیره ای پایدار می شود. اسکلت پیچ خورده قسمت داخلی میله را تشکیل می دهد و زنجیره جانبی در یک آرایش مارپیچی به سمت خارج قرار می گیرد. مارپیچ α به وسیله پیوند های هیدروژنی بین گروه های CO و NH زنجیره اصلی پایدار می شود. به طور اختصاصی گروه CO هر آمینواسید با گروه NH آمینواسیدی که در ترادف چهار واحد جلوتر قرار گرفته است پیوند هیدروژنی تشکیل می دهد. بنابراین به جز آمینواسید های نزدیک به انتهای مارپیچ α تمام گروه های CO و NH زنجیره اصلی درگیر پیوند هیدروژنی هستند. فاصله هر آمینواسید با آمینواسید بعدی در

طول محور مارپیچ $1/5$ آنگستروم و زاویه چرخش حدود 100 درجه است که به این ترتیب در هر دور مارپیچ $3/6$ آمینواسید قرار می گیرد. همانطور که در شکل ۱-۵ نشان داده شده است آمینواسیدهایی که در طول ترادف سه یا چهار واحد از یکدیگر فاصله دارند از نظر فضایی در مارپیچ تقریباً نزدیک یکدیگر قرار گرفته اند در مقابل آمینواسیدهایی که در طول توالی دو واحد یا یکدیگر فاصله دارند در جهات متضاد مارپیچ قرار گرفته اند و بنابراین احتمال تماس خیلی کمی دارند. جهت پیچش یک مارپیچ می تواند راست گرد (جهت عقربه های ساعت) یا چپ گرد (خلاف جهت عقربه های ساعت) باشد. بر اساس نمودار رامچاندرا مشخص می شود که مارپیچ های راست گرد از نظر انرژی مطلوب تر هستند زیرا ممانعت فضایی بین زنجیره های جانبی و اسکلت کمتر است. ضرورتاً تمام مارپیچ های موجود در پروتئین راست گرد هستند [۱].



شکل ۱-۵. نمایش ساختمان مارپیچ آلفا (سمت چپ)؛ نقش پیوندهای هیدروژنی در پایداری ساختمان مارپیچ آلفا (سمت راست) [۳]

میزان مارپیچ α موجود در پروتئین ها در محدوده ی وسیعی تقریباً از صفر تا 100 درصد متغیر است. برای مثال 75% از آمینواسیدهای موجود در فریتین (پروتئینی که به ذخیره آهن کمک می کند) به صورت مارپیچ α هستند. چنین مارپیچ های آلفا پیچ در پیچی در میوزین و تروپومیوزین ماهیچه، در فیبرین لخته های خونی و در کراتین مو دیده می شوند .

۱-۷- صفحات بتا

الگوی ساختاری تکرارپذیر دیگری که توسط پاولینگ و کوری کشف شد صفحات چین دار β نام گرفت چرا که صفحه β دومین ساختاری بود که پس از مارپیچ α توسط آن ها کشف شد. هر زنجیره پلی پپتیدی موجود در صفحه ی β که رشته β نامیده می شود بر خلاف مارپیچ α ، تقریباً به طور کامل گسترده شده است. برخلاف فاصله $1/5$ آنگستروم که در مارپیچ α دیده می شود فاصله بین