

نقش شرایط مختلف تجمع آنزیم هگزوکیناز نوع B مخمر در ساختار و سمیت آن روی سلول‌ها

حسن رامشینی

استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

نشانی نویسنده مسؤول: دانشگاه پیام نور، گروه علمی زیست‌شناسی، تهران، ص. پ ۶۶۹۷-۱۹۳۹۵ - ج. آ. ایران، دکتر حسن رامشینی

E-mail: hramshini@ibb.ut.ac.ir

وصول: ۸۹/۱۰/۲۲، اصلاح: ۸۹/۱۲/۸، پذیرش: ۹۰/۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: تشکیل رسوبات پروتئینی آمیلوئیدی از ویژگی‌های مشترک گروهی از بیماری‌های وابسته به آمیلوئید از جمله آلزایمر، پارکینسون، دیابت نوع II و پرین می‌باشد. نوع تجمعات تشکیل شده در شرایط مختلف و مکانیزم تخریب عملکرد سلولی توسط این تجمعات، هنوز کاملاً مشخص نیست. در مطالعه حاضر توانایی هگزوکیناز نوع B مخمر (YHKB) برای تشکیل تجمعات منظم آمیلوئیدی و یا بی‌شکل در شرایط گوناگون و سمیت این تجمعات روی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی برای القای آمیلوئید از سه روش مرسوم ایجاد آمیلوئید استفاده شد. این روش‌ها شامل قرار دادن (۱) YHKB در pH اسیدی، دمای ۵۵ درجه ولی با هم زدن مداوم، (۲) در pH اسیدی در حضور نمک و در دمای آزمایشگاه بدون هم زدن مداوم و (۳) در حضور تری فلئور و اتانول (TFE) بودند. نوع تجمعات تشکیل یافته در شرایط فوق به وسیله توانایی‌شان برای اتصال با رنگ تیوفلاوین T (شاخص آمیلوئید) و شکل تجمعات با عکس‌برداری به وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی بررسی شد. همچنین سمیت تجمعات تشکیل یافته در شرایط ذکر شده، به وسیله اثر دادن آن‌ها روی سلول‌های نوروبلاستوما انسانی SH-SY5Y و از طریق روش احیای MTT مقایسه شد.

یافته‌ها: تجمعات ایجاد شده در هر سه شرایط، توانایی اتصال به تیوفلاوین T (ThT) را داشتند ولی میزان اتصالشان متفاوت بود. عکس‌های میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) و الکترونی عبوری (TEM) نیز نشان داد که ساختارهای ایجاد شده از نظر ظاهری کاملاً با هم متفاوتند. تجمعات بی‌شکل و نامنظم این آنزیم هم برای مقایسه با تجمعات منظم به دست آمد. سنجش سمیت به وسیله روش احیای MTT نشان داد که تجمعات بی‌شکل در مقایسه با کنترل سمیتی برای سلول‌های نوروبلاستوما نداشتند ولی تجمعات حاصله در هر سه روش مذکور باعث تخریب سلول‌ها با شدت‌های متفاوت شدند.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این پژوهش، اختلاف در سمیت مشاهده شده تجمعات را می‌توان به اختلاف در مورفولوژی تجمعات تولیدی در شرایط مختلف و مکانیزم عمل متفاوت آن‌ها روی سلول‌ها نسبت داد. (مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۸/شماره ۲/صص ۸۱-۷۱).

واژه‌های کلیدی: هگزوکیناز نوع B مخمر؛ تجمع آمیلوئیدی؛ سنجش کاهش MTT سمیت سلولی.

مقدمه

تجمع پروتئین پدیده‌ای است که در آن، مولکول‌های پروتئین ساختار طبیعی خود را که معمولاً به صورت محلول هستند از دست داده و تبدیل به بنای فضایی غیرطبیعی می‌شوند. در این حالت، این مولکول‌های غیر طبیعی به تدریج به یکدیگر اتصال می‌یابند. تجمعات پروتئینی را عموماً بر اساس شکل میکروسکوپی آن‌ها به دو گروه تجمعات منظم (آمیلوئید) و یا نامنظم (بی‌شکل) دسته‌بندی می‌نمایند (۱-۳). امروزه مطالعه تجمع پروتئین‌ها به دلایل گوناگون مورد توجه محققین قرار گرفته است. تعداد زیادی از فرآورده‌های پروتئینی به‌عنوان دارو به بازار عرضه می‌شوند، این داروها به دلیل فقدان پایداری کافی خیلی مستعد تخریب فیزیکی و شیمیایی بوده و باعث تجمع و غیرفعال شدن آن‌ها می‌شوند (۴-۶).

در حوزه بیوتکنولوژی، تولید مصنوعی و بسیار زیاد پروتئین‌ها در میزبان‌های باکتریایی باعث ایجاد اجسام انکلوزیومی نامحلول می‌شوند که بازکردن و محلول سازی این اجسام منجر به تجمع آن‌ها می‌گردد (۷،۸). امکان استفاده از تجمعات منظم پروتئین‌ها در حوزه فن آوری نانو و بحث کاربرد آن‌ها در مهندسی بافت، بهبود سیستم‌های انتقال دارو و آنتی بیوتیک‌ها از مسائل داغ این حوزه است (۹،۱۰). در زمینه پزشکی، مطالعات تجمع پروتئین عمده‌تاً در رابطه با بیماری‌های گوناگونی است که در آن پروتئین‌های غلط تا خورده تبدیل به تجمعات بی‌شکل یا فیبریلار خیلی منظم و غیر محلول (آمیلوئید) می‌گردند. از جمله این بیماری‌ها، بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی (آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون)، دیابت نوع ۲ و کاتاراکت را می‌توان نام برد (۱۱). با توجه به اهمیت و نقش تجمع پروتئین‌ها در حوزه‌های مختلف پزشکی، داروسازی، بیوتکنولوژی، نانوتکنولوژی و صنایع دارویی مطالعه این پدیده از اهمیت زیادی برخوردار است. از ویژگی‌های تجمعات پروتئینی منظم (آمیلوئید)،

توانایی اتصال آن‌ها به دو رنگ مارکر (شاخص) تیوفلاوین T (ThT) و قرمز کنگو (Congo red) است؛ در *in vitro* فیبریل‌های آمیلوئیدی به وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) یا میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) قابل مشاهده هستند. به کمک این تکنیک‌ها نشان داده شده است که آن‌ها طویل، مستقیم و غیرشاخه‌دار هستند و معمولاً شامل ۶-۲ پروتوفیلامنت هستند که هر کدام ۵-۲ nm قطر دارند (۱۲).

امروزه پروتئین‌هایی یافت شده‌اند که هیچ‌گونه ارتباطی با بیماری‌ها ندارند اما قادر به ایجاد تجمعات آمیلوئیدی در *in vitro* هستند. با تبدیل پروتئین‌های غیر وابسته به بیماری به فیبرهای آمیلوئیدی، این عقیده که تمام پروتئین‌ها قابلیت تبدیل شدن به این ساختارها را دارند، را تقویت نموده است (۱۳،۱۴). در هر کدام از این پروتئین‌ها تغییر شرایط محیطی از جمله pH پایین، فقدان لیگاند‌های ویژه، دمای بالا، غلظت‌های ملایم نمک‌ها یا حضور کمک حلال‌هایی مثل تری فلئورواتانول (TFE) عاملی برای ایجاد ساختارهای آمیلوئیدی بودند. مطالعات گسترده‌ای که اخیراً در مورد نمونه‌هایی که سمیت خیلی زیادی برای سلول دارند، نشان داد که نمونه‌های پیش فیبری نابالغ نسبت به فیبرهای بالغ اثرات سمی بیشتری دارند (۱۵،۱۶). تجمعات پیش فیبریلار محتوی زنجیره پلی پپتید غلط تاخوردده هستند و بخش‌های بزرگی از گروه‌های اسید آمینه‌ای که در حالت طبیعی در بطن پروتئین هستند در معرض قرار می‌گیرند. بنابراین احتمال این‌که بعضی از این بخش‌های در معرض قرار گرفته شده، سطح بعضی از پروتئین‌های طبیعی را تقلید نمایند، وجود دارد. چنین تجمعاتی احتمالاً قادرند به‌طور نامناسبی با محل‌های اتصال یاگیرنده‌های پروتئین‌های طبیعی دیگر اتصال حاصل نمایند و اثر این پروتئین‌ها را به‌صورت غیرطبیعی و کنترل نشده تقلید نمایند. در مطالعه حاضر، آنزیم هگزوکیناز نوع B مخمر (YHKB) که فعالیتش در بیماری‌هایی مثل آلزایمر و پارکینسون تغییر

دقیقه با تعقیب جذب ظاهری آن در طول موج ۳۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شد. ابزار به کار گرفته شده اسپکتروفوتومتری کری ۱۰۰- بیواریان بود. در این ابزار، برای ثابت نگه داشتن دما از کنترل‌کننده‌ای استفاده شد که قادر است دما را در محدوده ۰/۱ درجه ثابت نگه دارد. در اثر حرارت دادن به محلول، نمونه پروتئینی ایجاد تجمع نامنظم کرده، محیط آن کدر می‌شود و طول موج تابیده شده به محلول را پراکنده می‌کند. دستگاه با مقایسه طول موج خروجی از این محیط کدر با شاهد (بلانک) میزان تجمع پروتئین را نشان می‌دهد (۱۹).

پراکنش نور پویا یا نیمه کشسان: برای اندازه‌گیری شعاع هیدرودینامیک متوسط ذرات پروتئین و توزیع اندازه ذرات از روش پراکنش نور پویا استفاده شد. اندازه‌گیری‌ها در دمای 25°C و با استفاده از دستگاه zeta sizer S شرکت مالورن که به یک کنترل‌کننده دما تجهیز شده بود، انجام گرفت. این دستگاه قادر است از روی میزان پراکنش طول موج تأیید شده به نمونه، شعاع هیدرودینامیک آن را محاسبه نماید. پس از کالیبره کردن دستگاه، یک میلی‌لیتر از پروتئین‌های تجمع‌یافته در شرایط مختلف با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در سل دستگاه قرار گرفت. برای اندازه‌گیری شعاع هیدرودینامیک متوسط، هر آزمایش ۵ بار تکرار شد و نتیجه نهایی به صورت میانگین گزارش گردید (۲۰).

فلورسانس ذاتی: آزمایشات فلورسانس با استفاده از ابزار اسپکتروفوتومتری کری اکلیپس واریان انجام شد. طول موج تحریکی ۲۸۰ نانومتر و طول موج نشر آن در محدوده ۲۸۵ تا ۴۵۰ نانومتر اسکن شد. برای ثابت نگه‌داشتن دما از کنترل‌کننده کری استفاده شد که قادر بود دما را در محدوده ۰/۱ درجه نگه دارد. برای اندازه‌گیری نشر فلورسانس ذاتی پروتئین از غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هگزوکیناز نوع B مخمر استفاده شد (۲۱).

مطالعات سنجش ThT: مطالعات القاء تجمع آمیلوئیدی در سه روش متفاوت انجام گرفت. در روش یک غلظت

می‌کند (۱۷)، برای مطالعه انتخاب شد و هدف از این پروژه القای تجمعات آمیلوئیدی در این پروتئین در شرایط مختلف و مقایسه سمیت این تجمعات روی سلول‌های نوروبلاستوما می‌انسانی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد که در یک پروتئین مشخص (YHKB) در شرایط مختلف القای تجمع می‌شود و نوع تجمع از طریق میزان اتصال آن به رنگ‌های شاخص آمیلوئید و همچنین مورفولوژی آن به وسیله میکروسکوپ الکترونی بررسی می‌گردد. هر آزمایش بیش از سه بار تکرار شده و نتیجه به صورت میانگین گزارش می‌شود. مواد استفاده شده در این پژوهش عبارت بودند از الکل ۲ و ۲- تری فلوئورو اتانول (TFE) و تری فلوئورواستیک اسید (TFA)، تیوفلاوین T (ThT)؛ و بافرهای استفاده شده در این پژوهش از شرکت سیگما (ST.Louis MO) خریداری شد. هگزوکیناز نوع B مخمر (با کد H ۶۳۸۰) نیز از شرکت سیگما خریداری شد و چون این آنزیم با میزان زیادی سولفات آمونیوم به صورت جامد در آمده بود، در بافر مناسب حل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 4°C در سانتی‌گراد دیالیز شد.

تعیین غلظت پروتئین: سنجش غلظت پروتئین به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل کری ۱۰۰- بیواریان ساخت کشور آمریکا بر اساس جذب ۲۸۰ نانومتر محلول حاوی پروتئین در مقایسه با شاهد (بلانک) انجام می‌شد. میزان جذب استاندارد هگزوکیناز نوع B مخمر ۹/۴۷ برای یک گرم در ۱۰۰ سی‌سی بافر در مسیر یک سانتی‌متری در نظر گرفته شد (۱۸).

کدورت‌سنجی: برای پیگیری تشکیل تجمعات پروتئینی نامنظم از روش کدورت‌سنجی استفاده شد. YHKB با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار pH=۷ تهیه و کدورت آن در دماهای مختلف به مدت ۳۰

شد و به سل دستگاه فلورسانس کری اکلپس واریان منتقل گردید. طول موج برانگیختگی ۴۴۰ نانومتر و پهنای اسلیت برانگیختگی و نشر به ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر بود. افزایش شدت نشر تیوفلاوین T به عنوان تشکیل احتمالی فیبرهای آمیلوئیدی تفسیر می‌شد (۲۲).

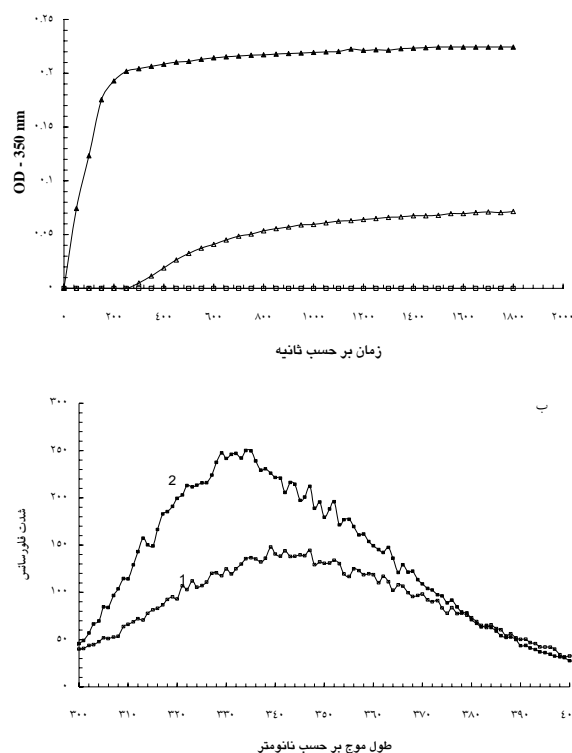
تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی انتقالی: مقدار ۵-۱۰ میکرو لیتر از نمونه پروتئینی که شامل تجمعات نامنظم بود، برداشته شده و بر روی گریدهای پوشیده از کربن قرار داده شد. پس از دو دقیقه، گریدها با آب دو بار تقطیر شسته شده و سپس رنگ آمیزی با اورانیل استات دو درصد انجام شد؛ پس از گذشت ۵-۲ دقیقه دیگر، آنالیز نمونه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انتقالی انجام شد. بزرگ‌نمایی استفاده شده ۷۵۰۰۰-۳۰۰۰۰ بود.

تصویربرداری میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM): در این تکنیک، ابتدا محلول پروتئینی با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر استات، pH=۵/۵ و در حضور ۳۰ (v/v) درصد TFE یا ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هگزوکیناز مخمر، ۲۰ میلی‌مولار، pH=۱/۷ و NaCl ۳۶۰ میلی‌مولار تهیه و پس از یک ساعت از شروع واکنش تجمع مقداری از آن‌ها برداشته و حدود پنج بار با آب دوبار تقطیر رقیق شد. حدود ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده روی میکا قرار داده و در خلاء خشک شد. تصاویر TM-AFM با میکروسکوپی (Digital Instruments-Veeco, Santa Barbara, CA) که به یک بخش اسکن‌کننده (ماکزیمم سایز اسکن ۱۰۰ μm) و یک کنترل‌کننده Nanoscope IIIa مجهز بود، به دست آمد. فرکانس استفاده شده بین ۳۴۲ و ۳۴۱ کیلو هرتز و سرعت اسکن نیز بین ۰/۶ تا ۱ هرتز بود.

بررسی سمیت تجمعات با آزمایش 3-(4, 5-

dimethylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyltetrazolium] MTT

در این آزمایش سلول‌های نوروبلاستوما انسانی SH-SY5Y (Manassas, VA) و A.T.C.C در محیط کشت اختصاصی کشت داده شد. سلول‌ها در شرایط ۵) CO₂



نمودار ۱: (الف) تغییرات کدورت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر YHKB در دماهای مختلف از ۴۵ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد. (ب) طیف نشر ذاتی YHKB متعاقب برانگیختگی در ۲۸۰ nm در دمای ۲۵ °C (۱) و در دمای ۵۵ °C (۲).

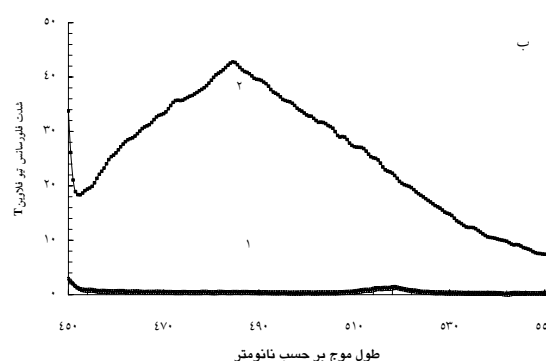
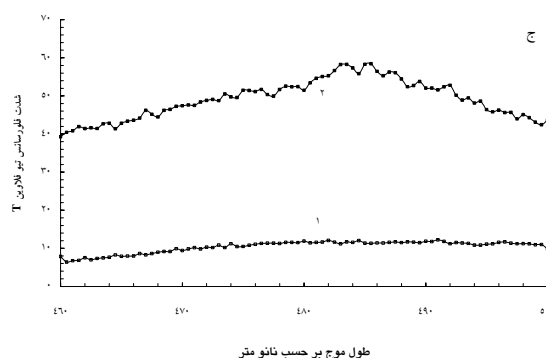
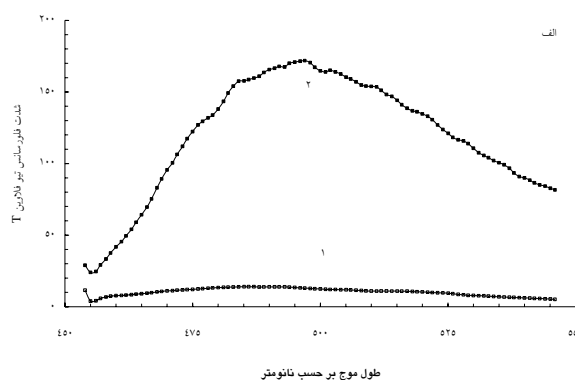
پروتئین ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر گلايسين ۵۰ میلی‌مولار، pH=۲/۵ تهیه شده بود؛ این محلول با NaCl با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه انکوبه گردید. در روش دو، غلظت پروتئین ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در TFA، pH=۱/۷ و در حضور NaCl ۳۶۰ میلی‌مولار در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. در روش سه، غلظت پروتئین ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر استات ۵۰ میلی‌مولار، pH=۵/۵، در حضور TFE ۳۰ (v/v) درصد در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. برای ارزیابی تشکیل یا عدم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی از محلول تازه تهیه شده تیوفلاوین T که با استفاده از سرنگ فیلتر شده بود، استفاده گردید. در زمان‌های مشخص، ۶۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۴۴۰ میکرولیتر از محلول محتوی ۲۵ میکرو مولار ThT، ۲۵ میلی‌مولار بافر فسفات سدیم، pH=۶ برای ارزیابی تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی مخلوط

سلول‌های سمی هستند، خشک شدند. سپس همه آن‌ها در محلول DMEM که فاقد فنول رد می‌باشد حل شدند و بلافاصله به محیط کشت سلول‌ها SH-SY5Y در غلظت نهایی $2 \mu\text{M}$ و به مدت ۲۴ ساعت اضافه شدند. سمیت نمونه‌ها برای سلول در یک ظرف ۹۶ چاهکی well (۹۶-plates) به وسیله MTT سنجش شد (۲۳).

یافته‌ها

القای تجمع غیر منظم در YHKB در دمای بالا: یکی از روش‌های القای تجمع نامنظم، قرارگیری پروتئین‌ها در دماهای بالاست. مطالعات کدورت‌سنجی در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار در دماهای متفاوتی انجام گرفت و نشان داده شد که بهترین دما برای مطالعه کدورت‌سنجی این آنزیم دمای 55°C است (نمودار ۱-الف). این شکل روند معمول یک واکنش تجمع را نشان می‌دهد که پس از یک فاز تأخیری بسیار کوتاه که در آن کدورت محلول پروتئین ناچیز است، کدورت به نحو سریع افزایش می‌یابد و در نهایت به بیشترین میزان خود می‌رسد. مطالعه طیف نشری ذاتی هگزوکیناز نوع B مخمر در دمای 55°C در بافر فسفات نشان داد که هم طول موج بیشینه شدت نشر با انتقال به قرمز تغییر کرده و هم شدت بیشینه نشر کاهش می‌یابد و پهنای پیک نیز افزایش می‌یابد (نمودار ۱-ب). با در نظر گرفتن این یافته، می‌توان نتیجه گرفت که در دمای 55°C ، گروه‌های فلئوفور پروتئین که آروماتیک و آب‌گریز هستند، تا حدود زیادی به سطح پروتئین منتقل شده‌اند و در نتیجه، سطح پروتئین در دمای بالا احتمالاً هیدروفوب تر از پروتئین در دمای اتاق است؛ به همین دلیل در این شرایط پروتئین‌ها نسبت به هم چسبندگی داشته و باعث تجمع آن‌ها می‌گردد.

القای تجمع آمیلوئیدی YHKB در شرایط متفاوت: القای تجمع آمیلوئیدی در pH اسیدی، دمای بالا و همراه با هم‌زدن مداوم؛ یکی از روش‌هایی است که برای القای تجمع آمیلوئید در پروتئین‌ها استفاده می‌شود. قرار دادن

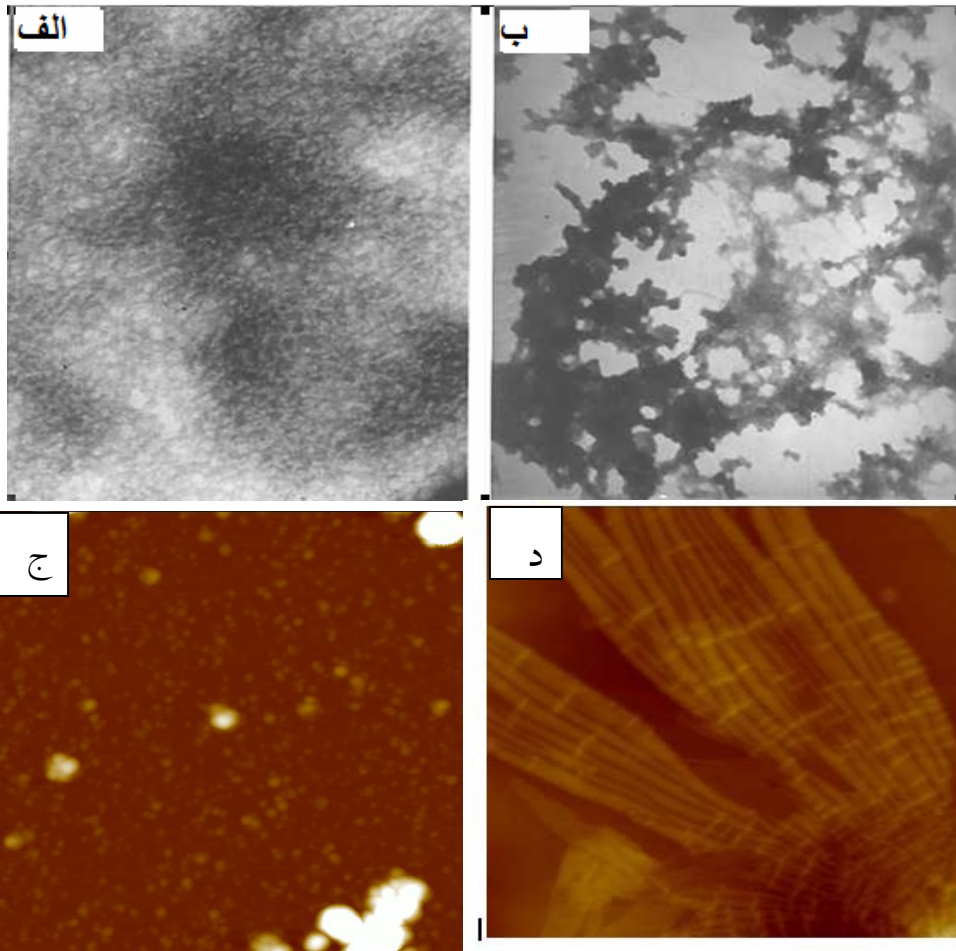


نمودار ۲: طیف نشر فلئوئورسانس تیوفلاوین، پیش (۱) و پس (۲) از اضافه کردن YHKB $1/5$ میلی گرم بر میلی لیتر انکوبه شده در حضور مولار NaCl و در دمای 50°C درجه سانتی گراد همراه با هم زدن به مدت ۲۴ ساعت (الف). پیش (۱) و پس از (۲) از اضافه نمودن محلول پروتئینی انکوبه شده در TFA 20 میلی مولار، $\text{pH}=1/7$ در حضور NaCl 260 میلی مولار به مدت ۶۰ دقیقه (ب). پیش (۱) و پس از (۲) اضافه نمودن محلول پروتئینی انکوبه شده در بافر استات 50 میلی مولار و $\text{pH}=5/5$ در حضور TFE 20% (V/V)، بعد از مدت ۶۰ دقیقه (ج)

درصد) و در دمای 37°C رشد داده شدند. همه نمونه‌ها تجمع‌یافته در فواصل زمانی مشخص سانتریفوژ شده و پس از دور ریختن محلول رویی، بخش رسوبی به وسیله هوای نیتروژن برای حذف TFE و TFA باقیمانده که برای

جدول ۱. مقایسه شعاع هیدرودینامیکی تجمعات YHKB در شرایط متفاوت

نحوه تجمع	دمای ۵۵ درجه، pH= ۷ (تجمعات نامنظم دمایی)	دمای ۵۰ درجه، pH= ۲/۵ هم زدن مداوم (روش ۱)	دمای ۲۵ درجه، pH= ۱/۷ در حضور نمک (روش ۲)	دمای ۲۵ درجه، pH= ۵/۵ حضور TFE، ۳۰٪ (V/V) (روش ۳)
شعاع هیدرودینامیکی تجمعات (nm)	۱۳۵ ± ۱/۵	۲۴۰ ± ۲/۰۲	۵۹۵۰ ± ۵۰/۵	۴۴۹۰ ± ۴۰/۹



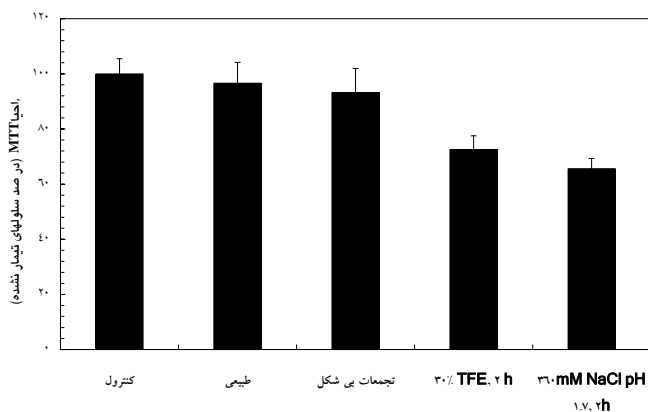
شکل ۱: (الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) نمونه YHKB انکوبه شده مطابق روش ۱، بزرگنمایی تصویر ۵۰۰۰۰ است. YHKB انکوبه شده در دمای ۵۵ درجه در pH=۷ به مدت ۲۰ دقیقه، بزرگنمایی تصویر ۲۵۰۰۰ (ب)، تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) تجمعات YHKB به دست آمده مطابق روش ۲ (ج). تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) تجمعات YHKB به دست آمده مطابق روش ۳ (د).

آمیلوئیدی (یا شبه آمیلوئیدی) مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نشر فلئوئورسانسی تیوفلاوین T (ThT): شکل ۲- الف طیف نشر محلول ۶۵ میکرو مولار تیوفلاوین T را پیش و پس از اضافه کردن پروتئین طبیعی یا انکوبه شده در شرایط فوق به مدت ۲۴ ساعت نشان می‌دهد. پس از برانگیختگی در طول موج ۴۴۰ نانومتر، تیوفلاوین T به تنهایی نشر ضعیفی را نشان می‌دهد. اضافه کردن

محلول پروتئین در pH اسیدی و دمای بالا برای ناپایدار کردن پروتئین و همچنین هم زدن مداوم محلول پروتئینی است (۲۴). از این روش برای بررسی احتمال تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی در آنزیم هگزوکیناز استفاده شد. در این آزمایش، ۵۰۰ میکرولیتر محلول YHKB مطابق روش اول تولید آمیلوئید تهیه گردید. پس از ۲۴ ساعت با استفاده از روش‌های زیر احتمال تشکیل تجمعات

امکان وجود داشت که شعاع هیدرودینامیکی ظاهری پروتئین یا اولیگومرهای پروتئینی در شرایط فوق اندازه‌گیری شود (۲۰). قطر هیدرودینامیکی ظاهری YHKB قبل از اضافه نمودن نمک $7/9 \pm 0/6$ نانومتر محاسبه شد. افزایش این قطر در خلال انکوباسیون پروتئین تهیه شده با روش فوق افزایش معناداری پیدا کرد (جدول ۱). اندازه قطر هیدرودینامیکی ظاهری بعد از یک ساعت انکوباسیون حضور تجمعات بزرگ را نشان می‌داد و تغییرات طیفی مشاهده شده به وسیله ThT را تأیید می‌نماید و همچنین تأیید می‌کند که این تغییرات مشاهده شده ناشی از تجمع گونه‌های مونومری است که در این شرایط دچار تغییر کنفورماسیون گردیده‌اند. شکل نمونه‌های YHKB ایجاد شده در این روش به وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی آنالیز شد. همچنان‌که شکل ۳-ج نشان می‌دهد. شکل ظاهری تجمعات تشکیل یافته در این شرایط نظم خاصی را نشان نمی‌دهد. بعد از گذشت یک ساعت انکوباسیون، ساختارهای کوچکی با ارتفاع‌های بین ۳ و ۵ نانومتر به صورت متنوعی کنار هم قرار گرفته و ساختارهایی با ارتفاع بین ۱۰ تا ۵۰ نانومتر به وجود می‌آید که در هر صورت، شکل مشخصی ندارند ولی مشخصاً با حالت قبلی متفاوت است.

الف) تجمعات آمیلوئیدی در غلظت‌های ملایم کمک



نمودار ۳: سمیت حاصل از تجمعات YHKB. زیست‌تایی سلول به وسیله آزمایش احیایی MTT در سلول‌های SH-SY5Y که در معرض ۲ میکرو مولار YHKB طبیعی و تجمع یافته در شرایط متفاوت، نشان داده شده است.

پروتئین طبیعی نیز تغییر قابل ملاحظه‌ای را در شدت یا الگوی طیف نشری تیوفلاوین T موجب نمی‌شود، ولی پس از اضافه کردن پروتئین (تهیه شده با روش اول) افزایش شدت نشر مشاهده می‌شود.

تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری: شکل ۳-الف تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نمونه YHKB انکوبه شده به مدت ۲۴ ساعت (تهیه شده با روش اول) را نشان می‌دهد. بزرگنمایی ۵۰/۰۰۰ است. تجمعات تشکیل شده در این شرایط مانند تجمعات آمیلوئیدی با رنگ مارکر آمیلوئید (ThT) اتصال می‌یابد (نمودار ۲-الف) ولی ساختار ایجاد شده با ساختارهای آمیلوئیدی حقیقی تفاوت دارد. با این حال، چیزی که کاملاً واضح است این است که ساختاری که در این شرایط تشکیل شده علی‌رغم این که شباهتی به ساختارهای آمیلوئیدی ندارد، با ساختارهای تشکیل شده در شرایط تجمعات بی-شکل نیز کاملاً متفاوت است (شکل ۱-ب). همچنین تجمعات بی‌شکل هرگز قادر به اتصال به رنگ شاخص آمیلوئیدی یعنی ThT نبودند.

الف) تجمعات آمیلوئیدی در شرایط pH اسیدی، در حضور نمک‌ها و در دمای آزمایشگاه (روش ۲): بر اساس مطالعاتی که در گذشته انجام شده است اضافه کردن نمک‌ها به پروتئین‌هایی که در شرایط اسیدی دناتوره شده‌اند، باعث تسریع سرعت تجمع آن‌ها می‌گردد (۲۵، ۲۶). از این رو برای نشان دادن این که آیا حالت دناتوراسیون اسیدی YHKB آمیلوئیدوزنیک است یا خیر، نمونه پروتئینی مطابق روش دوم تولید آمیلوئید تهیه گردید و اتصال به رنگ ThT آن بررسی شد. اتصال به ThT به عنوان شاخص تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی در *in vitro* محسوب می‌گردد (۲۲). طیف نشری فلورسانس ThT بعد از اضافه کردن YHKB (تهیه شده مطابق روش دوم) افزایش قابل ملاحظه‌ای را در مقایسه با طیف ThT به تنهایی یا ThT در حضور پروتئین طبیعی نشان می‌داد (نمودار ۲-ب). به کمک تکنیک پراکنش نور پویا این

حلال TFE و pH نسبتاً خنثی (روش سه): به منظور بررسی احتمال ایجاد تجمع آمیلوئیدی در YHKB، این پروتئین مطابق روش سه انکوبه شد و در فاصله زمانی مشخص برای ارزیابی اتصال به ThT مشابه شرایط اسیدی، برداشته شد. نتایج نشان داد که در شدت فلورسانس ThT بعد از گذشت ۶۰ دقیقه انکوباسیون افزایش معناداری مشاهده می‌شود (نمودار ۲-ج). نتایج حاصل از تکنیک پراکنش نور پویا (DLS) در این حالت نیز وجود تجمعات بزرگ را بعد از یک ساعت انکوباسیون تأیید نمود (جدول ۱). در مجموع، تشکیل سریع‌تر تجمعات بزرگ در این روش در مقایسه با آزمایشات انجام شده در روش دو، نشان داده شد ولی سائز تجمع در روش دو بزرگ‌تر بود (جدول ۱). تجمعات تشکیل یافته به وسیله YHKB در حضور TFE اشکال متفاوتی نسبت به فیبرهای آمیلوئیدی معمول را نشان می‌دهند. YHKB انکوبه شده در روش سه برای مشاهده مورفولوژی آن‌ها به وسیله AFM آنالیز شد. بعد از یک ساعت انکوباسیون، تجمعات شامل فیبرهایی با ظاهر لوله‌ای با ارتفاع $7/0 \pm 0/2$ نانومتر می‌باشد (شکل ۱-د). با این حال، این لوله‌ها پهنای نامنظم داشته و در تعدادی از نقاط به دو لوله مجزا منشعب شده‌اند و همچنین پیچش منظمی که در فیبرهای آمیلوئیدی معمولاً وجود دارد، در این جا مشاهده نمی‌شود.

تجمعات تشکیل شده به وسیله YHKB در هر سه روش باعث تخریب عملکرد سلول‌ها می‌گردند ولی تجمعات نامنظم روی عملکرد سلول‌ها تأثیری ندارند. تجمعات تشکیل شده در هر سه روش به یک محلول فیزیولوژیک (DMEM بدون فنول رد) انتقال داده شدند و سپس به محیط کشت سلول‌های نوروبلاستوما انسانی (SH - SY5Y) در غلظت نهایی ۲ میکرومولار اضافه شدند و توانایی این تجمعات برای تخریب عملکرد سلول‌ها با ارزیابی احیاء MTT انجام شد.

گونه طبیعی کاهش قابل ملاحظه‌ای را در احیاء

MTT در مقایسه با سلول‌های شاهد (که در مجاورت هیچ نوع تجمعی قرار نگرفته‌اند) نشان نمی‌دهد (نمودار ۳). برعکس، تجمعات تشکیل شده در روش دو و سه باعث کاهش در احیاء MTT در همه نمونه‌ها می‌شود. از طرف دیگر، توانایی تجمعات بی‌شکل حاصل از تجمع حرارتی YHKB که در دمای 55°C به مدت ۳۰ دقیقه تشکیل شده بود، نیز برای ارزیابی سمیت آن‌ها روی سلول‌های نوروبلاستوما (SH - SY5Y) اثر داده شد و مشخص گردید که این تجمعات مانند گونه‌های طبیعی سمیتی برای این سلول‌ها ندارند.

بحث

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که پروتئین‌های کروی در حالتی که به‌طور جزئی واسرشته شده‌اند، تمایل زیادی به تجمع دارند. معمولاً پروتئین‌ها در شرایطی مثل دمای بالا، فشار زیاد، pH پایین و یا در حضور غلظت‌های ملایمی از حلال‌های آلی به صورت جزئی واسرشته می‌شوند. تمام این شرایط باعث ناپایداری پروتئین می‌گردد. بنابراین، ناپایداری شدن ساختار پروتئین مکانیزم اولیه‌ای است که باعث تجمع پروتئین‌ها می‌شود. در تجمعات تنوع کنفورماسیونی گسترده‌ای وجود دارد؛ بنابراین، ایجاد محصول نهایی تجمع یعنی فیبرهای آمیلوئیدی که در پروسه تجمع به وجود می‌آیند، دارای تنوع ساختاری و مورفولوژیکی گسترده است (۱۱). مطالعات نشان می‌دهد که تجمعات آمیلوئیدی غیر بالغ (پیش فیبریلی) حاصل از پروتئین‌های غیر وابسته به بیماری‌ها اثرات سمی مشابه با آمیلوئیدهای غیر بالغ مربوط به پروتئین‌های بیماری‌زا دارند (۲۷). این مطالعات نشان داد که اثر سمی تجمعات پروتئینی روی سلول‌ها به تدراف اسید آمینه‌ای پروتئین‌ها بستگی ندارد بلکه به نوع تجمعات (منظم، بی‌شکل، بالغ و غیر بالغ بودن آن‌ها) و شرایط منتج به تجمع آن‌ها دارد (۲۷). بنابراین، یک پروتئین واحد قادر است گونه‌های تجمع یافته متفاوت با

سمیت سلولی متنوع ایجاد نماید. بر همین اساس، مکانیزم عمل تجمعات گوناگون یک پروتئین که در شرایط متفاوت حاصل شده است نیز متفاوت خواهد بود.

در مطالعه حاضر، برای اثبات این فرضیه در چهار شرایط کاملاً متفاوت (سه روش برای ایجاد آمیلوئید و یک روش برای ایجاد تجمع نامنظم) در آنزیم هگزوکیناز مخمر نوع B القای تجمع نموده و پارامترهای مختلفی از جمله اتصال به رنگ ThT، سایز تجمع حاصل و سمیت آن‌ها را با هم مقایسه نمودیم. در این مطالعه برای اندازه‌گیری اندازه شعاع هیدرودینامیک تجمعات از یکی از بهترین تکنیک‌های متداول یعنی پراکنش نور پویا یا نیمه کشسان استفاده گردید. مشخص شد که سایز تجمعات در شرایط مختلف کاملاً متنوع است (جدول ۱). از طرفی، تجمعات بی‌شکل قابلیت اتصال به رنگ ThT را نداشتند و در سایر شرایط آن‌ها قادر به اتصال به ThT هستند (شکل ۲) اما شدت اتصال در روش یک القای آمیلوئید نسبت به دو روش دیگر بیشتر است. اشکال تجمعات حاصله از شرایط گوناگون به وضوح تفاوت ساختاری این تجمعات را نشان می‌دهد. تجمعات نامنظم دمایی، توده‌های تجمع یافته فاقد شکل مشخص بوده و کاملاً غیر سازمان یافته گسترش یافته‌اند (شکل ۳). در روش یک ایجاد آمیلوئید نیز تجمعات منظم کلاسیک مشاهده نمی‌شود ولی نسبت به حالت قبل (تجمع نامنظم) منظم‌تر به نظر می‌آیند (۳ الف).

در زمانی که پروتئین در روش دو انکوبه شد، شکل تجمعات تغییر کرد و علیرغم ایجاد تجمعات سازمان یافته‌تر بعد از گذشت یک ساعت انکوباسیون ساختارهای کوچکی با ارتفاع‌های متنوعی به وجود آمد (شکل ۳ ج). بعد از یک ساعت انکوباسیون YHKB در روش سه فیبریل‌هایی با ظاهر لوله‌ای با ارتفاع $7/0 \pm 0/2$ نانومتر تولید شد با این حال، این لوله‌ها پهنای نامنظم داشته و در تعدادی از نقاط دو لوله مجزا منشعب شده‌اند و هم‌چنین پیچش منظمی که در فیبریل‌های آمیلوئیدی

کلاسیک معمولاً وجود دارد، این‌جا مشاهده نمی‌شود. به هر حال، در این حالت فیبرهای لوله ماندنی حاصل شدند که از لحاظ ساختاری نسبت به سایر شرایط بسیار سازمان یافته‌تر بودند ولی نسبت به آمیلوئیدهای معمولی تفاوت‌هایی را نشان می‌دادند. به همین دلیل، این اشکال فیبرهای غیر آمیلوئیدی نامگذاری گردید (شکل ۳-د).

تجمعات تشکیل یافته در شرایط ذکر شده در بالا به یک محلول فیزیولوژیک (DMEM بدون فنول رد) انتقال داده شدند و سپس به محیط کشت سلول‌های نوروبلاستوما انسانی (SH - SY5Y) در غلظت نهایی ۲ میکرومولار اضافه شدند و توانایی این تجمعات برای تخریب عملکرد سلول‌ها با ارزیابی احیاء MTT انجام شد (۲۳).

گونه طبیعی و تجمعات نامنظم ایجاد شده در دمای ۵۵ درجه اثری روی سلول‌های نوروبلاستوما نداشتند (شکل ۴) ولی تجمعات حاصل از سایر شرایط باعث تخریب عملکرد سلول‌ها شد. بنابراین علی‌رغم این که یک پروتئین یکسان به صورت تجمع در آمد اما در شرایط متنوع ایجاد ساختارهای متنوع از لحاظ مورفولوژی و اتصال به رنگ و سمیت نمود و این نتایج بر این مسأله دلالت دارد که سمیت از مشخصات مشترک ماورای ساختار مولکولی تجمعات ناشی می‌شود و به توالی اسیدهای آمینه بستگی ندارد و ویژگی سمیت تجمعات پروتئینی برخلاف فرم طبیعی پروتئین‌هاست که ساختار و عملکرد آن‌ها توسط توالی اسیدهای آمینه آن‌ها تعیین می‌شود و یک پروتئین واحد در شرایط مختلف، ممکن است اشکال مختلف به وجود آورد و مکانیزم سمیت آن متفاوت شود.

از مجموع مطالب گفته شده می‌توان نتیجه گرفت که هم تشکیل فرم‌های آمیلوئیدی پروتئین‌ها و هم سمیت ناشی از تشکیل این نوع تجمعات جزء ویژگی‌های ذاتی همه پروتئین‌هاست (۲۸). از طرف دیگر، چون معمولاً در مطالعات آسیب‌شناسی بیماری‌های وابسته به تجمع

سلول‌ها سمی و خطرناک است و لذا پیدا کردن روش‌هایی که این ساختارهای سمی را بتوان مورد ارزیابی قرار داد، از اهمیت زیادی برخوردار است.

پروتئین‌ها احتمال تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی در بافت‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. بر اساس نتایج تحقیق حاضر پیشنهاد می‌شود که تجمعات غیر آمیلوئیدی نیز برای

References

1. Uversky VN, Fink AL. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta*. 2004 ;1698(2):131-53.
2. Fink A L. Protein aggregation : folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des*.1998; 3(1): 9-23.
3. Ventura S. Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility. *Microb Cell Fact*.2005; 4(1): 11-5.
4. Manning M C, Ptel K, Borchardt R T. Stability of protein pharmaceuticals. *Phram Res*.1989; 6(11): 903-18.
5. Goolcharran C, Khossravi M, Borchardt R T. Chemichal pathways of peptide and protein degradation. In: Frokjaer S , Hovgaards L, editors. pharmaceutical Formation and development of peptides and proteins. London: Taylor and Francis; 2000. pp.70-88.
6. Brange J. Physical stability of proteins.In: Frokjaer S , Hovgaards L, editors. pharmaceutical Formation and development of peptides and proteins. London: Taylor and Francis; 2000. pp.89-112.
7. Khurana R, Gillespie J R, Talapatra A, Minert L J, Ionescu-Zanetti C, Millett I A. et al. Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry*.2001; 40(12): 3525-35.
8. Dobson C M. Protein aggregation and its consequences for human disease. *Protein Pept Lett*.2006; 13(3): 219-27.
9. Valery C, Pouget E, Pandit A, Verbavatz, J M, Bordes L, Boide I, et al. Molecular origin of the self-assembly of lanreotide into nanotubes: a mutational approach. *Biophys J*. 2008; 94(5): 1782-95.
10. Gazit E. Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization. *Chem Soc Rev*.2007; 36(8): 1263-9.
11. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*.2006; 75: 333-66 .
12. Westermark P, Benson M D, Buxbaum J N, Cohen A S, Frangione B, Ikeda S. et al. Amyloid: toward terminology clarification. Report from the nomenclature committee of the international society of amyloidosis. *Amyloid*. 2005; 12(1): 1-4.
13. Chiti F, Webster P, Taddei N, Clark A, Stefani M, Ramponi G. et al. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(7): 3590-94.
14. Chiti F, Bucciantini, M, Capanni C, Taddei, N, Dobson, C M, Stefani M. Solution conditions can promote formation of either amyloid protofilaments or mature fibrils from the HypF N-terminal domain. *Protein Sci*.2001; 10(12): 2541-7.
15. Sousa M M, Cardoso I, Fernandes R, Guimaraes A, Saraiva M J. Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy. *Am J Pathol*. 2001; 159(6): 1993-2000
16. Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT Jr. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. 18;97(2):571-6.
17. Wing DA, Tran S, Paul RH. Factors affecting the likelihood of successful induction after intravaginal misoprostol application for cervical ripening and labor induction. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;186(6):1237-40
18. Arulkumaran S, Gibb DM, TambyRaja RL, Heng SH, Ratnam SS. Failed induction of labour. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1985;25(3):190-3.
19. Seyb ST, Berka RJ, Socol ML, Dooley SL. Risk of cesarean delivery with elective induction of labor at term

- in nulliparous women. *Obstet Gynecol.* 1999;94(4):600-7.
20. Luthy DA, Malmgren JA, Zingheim RW. Cesarean delivery after elective induction in nulliparous women: the physician effect. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(5):1511-5.
21. Bueno B, San-Frutos L, Pérez-Medina T, Barbancho C, Troyano J, Bajo J. The labor induction: integrated clinical and sonographic variables that predict the outcome. *J Perinatol.* 2007;27(1):4-8.
22. Beiswenger T, Haywood L. Brown and Adam K. Hiatt, the role of cervical condition and indication of induction on induction success and cesarian delivery rate. *Obstet Gynecol.* 2002;99(suppl 1):S54
23. Watson WJ, Stevens D, Welter S, Day D. Factors predicting successful labor induction. *Obstet Gynecol.* 1996;88(6):990-2.
24. Walling AD. cervical scor as a predictor of successful labor induction. *Am Fam Physician.* 1998; 57(9):2240- 5
25. Fuentes A, Williams M. Cervical assessment. *Clin Obstet Gynecol.* 1995;38(2):224-31
26. Tan PC, Suguna S, Vallikkannu N, Hassan J. Ultrasound and clinical predictors for Caesarean delivery after labour induction at term. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006;46(6):505-9.
27. Grobman WA, Simon C. Factors associated with the length of the latent phase during labor induction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007;132(2):163-6.