

بررسی اثر عوامل محیطی بر فرایند تجمع و فیبریل زایی پروتئین کاپا-کازئین

علی صالح زاده^{1*}، امیر آراسته²

1- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

2- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

* رشت، بلوار لاکان، دانشگاه آزاد اسلامی

salehzadeh@iaurasht.ac.ir, salehzadehmb@yahoo.com

(دریافت مقاله: 94/12/3 پذیرش مقاله: 95/2/26)

چکیده- رشته‌های آمیلوئیدی، تجمعاتی رشته مانند هستند که از انواع مختلف پپتیدها و پروتئین‌ها بوجود می‌آیند و با توجه به شکل ظاهری‌شان در تصویر میکروسکوپ الکترونی و همچنین طی روش‌هایی مثل اتصال رنگ¹ و حضور ساختارهای رشته‌ای مبتنی بر صفحات بتای ارتقا یافته و در تعامل با هم² از سایر رشته‌های پروتئینی قابل تمیز می‌باشند. رشته‌های آمیلوئیدی در ایجاد بیماری‌هایی با نام عمومی Amyloidosis دخیل می‌باشند. بیماری‌هایی مثل آلزایمر، پارکینسون و دیابت تیپ 2 که در هر کدام نوع خاصی از پروتئین به صورت رشته‌های آمیلوئیدی³ یا شبه آمیلوئیدی⁴ در می‌آیند. بسیاری از پروتئین‌هایی را که در محیط *in vivo* آمیلوئیدی نشده‌اند را می‌توان در آزمایشگاه تحت شرایط خاصی به فرم آمیلوئیدی تبدیل نمود. برای سنجش تشکیل فیبریل‌ها از روش‌های جذب سنجی کنگورد، نشر فلورسانس ThT، داده‌های CD و تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره استفاده شد. نتایج نشان داد که حداکثر میزان تولید فیبریل‌های آمیلوئیدی در غلظت 5 میلی گرم بر میلی لیتر، دمای 50 درجه سانتی گراد و pH برابر 7/4 تشکیل می‌شود. بنابراین می‌توان رشته‌های آمیلوئیدی حاصل از کاپا کازئین را به عنوان نانو مواد جدید معرفی کرده و از این رو نتایج حاصله، با توجه به کاربردهای متنوع نانو مواد، فرایند بهینه سازی تولید این رشته‌ها از پروتئین ارزان و در دسترس موجود در شیر را توجیه می‌نماید.

کلیدواژگان: کاپا کازئین، تجمع پروتئین، فیبریل زایی، آمیلوئید.

¹ Dye binding

² Cross beta

³ Amyloid fibers

⁴ Amyloid-like fibers

1- مقدمه

تجمع پروتئین¹ فرایندی است که طی آن مولکول‌هایی که در حالت طبیعی به شکل منومری یا الیگومرهای کوچک در محلول وجود دارند، به یکدیگر متصل شده و ذرات پروتئینی درشت‌تری را تشکیل می‌دهند [1]. غیرطبیعی شدن ساختار فضایی پروتئین‌ها یکی از ویژگی‌های اساسی فرایند تجمع پروتئین است. بدین ترتیب فرض بر آن است که شکل طبیعی پروتئین تمایلی به تجمع ندارد و برای آن که چنین فرایندی آغاز شود، باید ابتدا تغییر ساختار فضایی پروتئین صورت گیرد [2]. تجمعات عموماً به دو دسته منظم و بی‌شکل دسته‌بندی می‌شوند [3] و تصور می‌شود، تجمع پروتئین یک فرایند برگشت‌ناپذیر و حاصل ارتباط خودبخودی چندین ملکول پروتئین مشابه از طریق تماس‌های درون ملکولی باشد. ساختار فضایی طبیعی پروتئین‌های تجمع‌کننده ممکن است به هر یک از گروه‌های طبقه‌بندی ساختار پروتئین‌ها (SCOP)² متعلق باشند [4]. عوامل مؤثر بر روی تجمع پروتئین‌ها به دو دسته درونی و برونی تقسیم می‌شوند. از عوامل درونی می‌توان به بار الکتریکی، خاصیت آبگریزی، الگوی قرارگیری آمینواسیدها و استعداد تشکیل موتیف‌های ثانویه و از عوامل برونی به دما، pH، قدرت یونی، یون‌های فلزی، غلظت پروتئین، منبع پروتئین، مواد افزودنی، سطوح تماسی، نور و پرتودهی و حلال‌های آلی اشاره نمود [5].

مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده ساختار پیچ خورده فیبری و بدون انشعاب است که قطر آن‌ها معمولاً در حدود 7-12 نانومتر می‌باشد [6]. فیبریل‌های آمیلوئیدی از سرم بیماران جدا شده‌اند. این فیبریل‌ها حدود 75-80 آنگستروم قطر دارند و از پنج پروتوفیبریل به قطر تقریبی 25-35 آنگستروم تشکیل شده‌اند. این پروتوفیبریل‌ها به صورت موازی در طول محور فیبریل و

به صورت مارپیچ در کنار یکدیگر آرایش یافته‌اند. هر پروتوفیبریل از دو یا سه رشته تشکیل شده است که عرض هر کدام 10-15 آنگستروم می‌باشد که به صورت مارپیچ قرار گرفته‌اند. این رشته‌ها را پروتوفیلامنت می‌نامند. فیبریل آمیلوئیدی بدست آمده از پروتئین‌های مختلف، ویژگی‌های کم و بیش متفاوتی دارند که ویژگی‌های برخی از آن‌ها در جدول 1 آورده شده است.

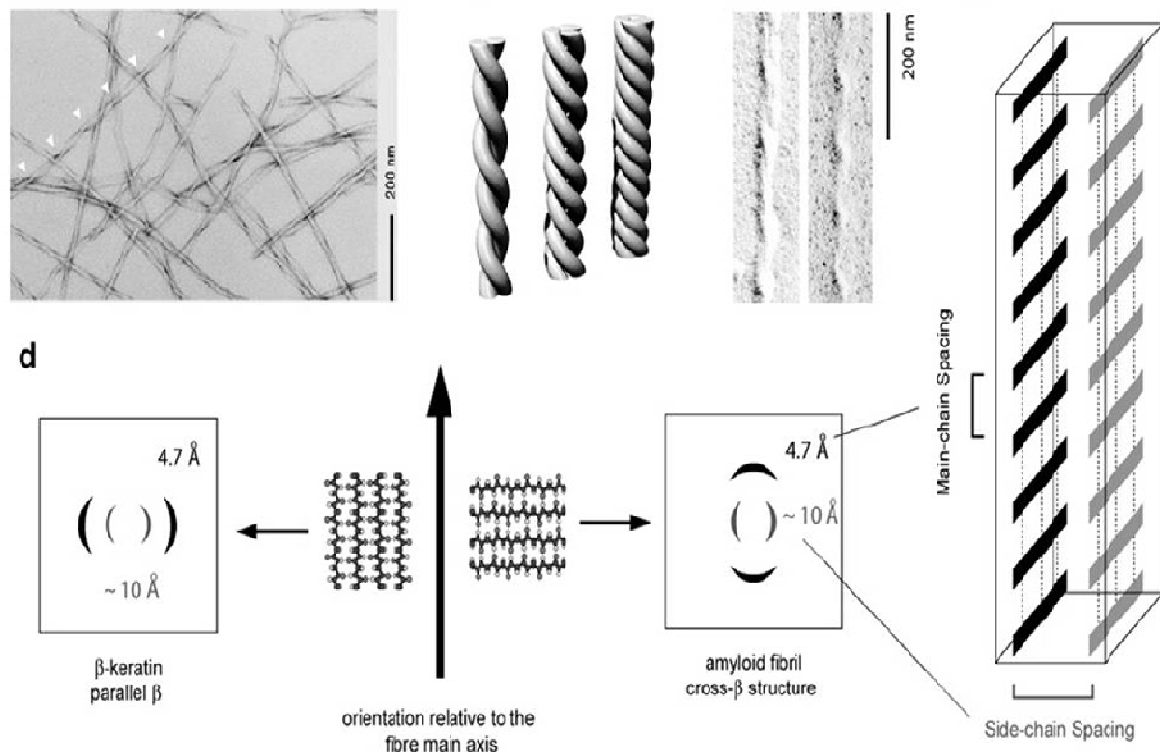
نتایج حاصل از بررسی ساختاری فیبریل‌های آمیلوئیدی توسط کریستالوگرافی برخی پروتئین‌ها نشان می‌دهد که در جهت محور فیبریل هر 4/7 آنگستروم یک ساختار مشخص تکرار می‌شود و همچنین در جهت عمود بر محور فیبریل نیز هر 9/8 آنگستروم یک ساختار مشخص تکراری وجود دارد (شکل 1). این وضعیت از جمله خصوصیات ساختاری صفحات بتای متقاطع است و زمانی امکان تشکیل آن وجود دارد که دو یا چند صفحه بتا در فیبریل‌ها موجود باشد. در چنین ساختارهایی رشته‌های بتا در خلاف محور فیبریل قرار گرفته‌اند. فاصله 4/7 آنگستروم در مطالعات پراش اشعه X که در بالا گفته شد، فاصله زنجیرهای بتای اصلی مجاور هم است. فاصله 9/8 آنگستروم فاصله زنجیرهای جانبی نامیده می‌شود و بیانگر فاصله بین دو صفحه بتای مجاور هم است که می‌تواند متغیر باشد. گستره این فاصله در موارد مختلف به 5-12 آنگستروم می‌رسد [7]. تجمع پروتئین وقتی اتفاق می‌افتد که نظم نیروهای پایدار کننده پروتئین طبیعی به هم خورده باشد. این امر به سبب به هم پیوستن غیر اختصاصی، از طریق گروه‌های آب گریز پروتئین که در معرض حلال قرار گرفته‌اند، انجام می‌گیرد.

رشته‌های آمیلوئیدی به‌عنوان یک عامل مزاحم و بیماری‌زا برای سیستم‌های زنده مطرح هستند، اما با توجه به ماهیت زیستی آن‌ها و ابعاد نانو که دارند، می‌توانند به‌عنوان یکی از مواد زیستی (نانو مواد) جدید در این عرصه معرفی شوند.

¹ Protein aggregation² Structural classification of protein

جدول 1 ترکیب ساختاری متفاوت در انواع فیبریل‌های آمیلوئیدی [7]

Amyloid Protein	Fibril Dimension	Substructure
Serum Amyloid A	75-80 Å	Five 25-35 Å protofilaments in pentagonal array
Transthyretin	130 Å	Four 50-60 Å protofilaments in square section array
Aβ peptide	90 Å	Five or six 25-30 Å protofilaments in pentagonal or hexagonal array
Calcitonin	50-60 Å	?
Prion	60-200 Å	Flat assembly of ? protofilaments



شکل 1 تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از فیبریل‌های آمیلوئیدی و الگوی شماتیک پراش اشعه ایکس [7]

تشکیل آن‌ها، فرایند فیبریل زایی در کاپا کازئین با روش فیزیکی (توسط دما و pH) مورد بررسی قرار گیرد و شرایط بهینه تشکیل آن با استفاده از روش ساده اتصال کنگورد مورد بررسی قرار گیرد. پروتئین کازئین به‌عنوان یک پروتئین ذخیره‌ای در شیر با وزن مولکولی بالا و ساختار کروی که دارد و با توجه به در دسترس بودن آن برای فیبریلزایی انتخاب شده است.

کازئین شیر حدود 75 تا 85 درصد پروتئین شیر را تشکیل می‌دهد. پروتئین‌های اصلی شیر شامل آلفا، بتا و کاپا کازئین می‌باشند که بصورت خالص در شیر موجود نبوده

از این مواد با توجه به ابعادشان می‌توان استفاده‌های گوناگون نمود. یکی از این کاربردها می‌تواند استفاده از آن‌ها در فرایند تثبیت آنزیم‌ها باشد. پروتئین کازئین به‌عنوان یکی از پروتئین‌های موجود در شیر می‌تواند توانایی بلقوه‌ای در سازگاری‌های نسجی برای بدن داشته باشد و از اینرو بکارگیری آن‌ها از این منظر می‌تواند نانومواد جدیدی را در عرصه نانو تکنولوژی به ما معرفی نماید. در این تحقیق سعی شده است به‌دلیل اهمیت ساختارهای آمیلوئیدی به‌عنوان ساختارهای نانو به منظور شناخت هرچه بیشتر خصوصیات آمیلوئیدها و نحوه

و در ابتدا به صورت کازئینات کلسیم و سپس با جذب فسفات کلسیم فسفو کازئینات به کلسیم تبدیل می‌شوند که شبیه دانه‌های تمشک می‌باشند [8]. در پروتئین کازئین حدود 20 اسید آمینه شرکت دارند. اندازه پروتئین کازئین حدود 10-20 نانومتر است و حرارت‌های پایین اصولاً تأثیری روی کازئین ندارد [9]. حرارت بالاتر از 130 درجه بر روی کازئین اثر می‌گذارد و ممکن است تغییراتی در ساختار پروتئینی کازئین به وجود آورد. جدول 2 ترکیبات پروتئینی شیر را همراه با درصد آن‌ها نشان می‌دهد.

جدول 2 پروتئین‌های موجود در شیر

پروتئین	محتوا (درصد)
کازئین‌ها	
α_{S1} -کازئین	32
α_{S2} -کازئین	8
β -کازئین	32
κ -کازئین	8
سایر پروتئین‌ها	
β -لاکتو گلوبولین	12
β -لاکتالبومین	4
ایمونو گلوبولین‌ها	3
آلبومین سرم انسانی	1

کازئین در شیر مسئول انتقال فسفات کلسیم است که برای رشد استخوان‌ها بسیار مهم و ضروری است. این پروتئین در شیر میسل‌هایی با قطر در حدود 150 تا 300 نانومتر تشکیل می‌دهد که چهار نوع کازئین را در خود جای داده‌اند [10]. اشکال مختلف پروتئین کازئین شامل آلفا1، آلفا2، بتا و کاپا بوده که با نسبت‌های متفاوتی در شیر وجود دارند. کاپا کازئین را فاکتور پایدار کننده¹ گویند زیرا موجب می‌شود میسل‌ها در شیر به صورت معلق در

آمده و رسوب نکنند [10].

تجمعات حاصل از پروتئین کازئین بیشتر ناشی از واکنش آن با سایر ترکیبات موجود در اطراف آن مثل قندها و چربی‌ها می‌باشد که بطور طبیعی در شیر وجود دارند. وجود این ترکیبات مانع مهمی در مسیر فیبریلزایی کازئین می‌باشد [11]. برای ایجاد تجمعات آمیلوئیدی بایستی منبع خالص پروتئین در دسترس باشد تا صرفاً اثر عوامل فیزیکی مثل دما و pH بر روی رشته‌ای شدن پروتئین کازئین بررسی شود [12].

تلاش‌های محدودی در زمینه بررسی وضعیت فیبریلایسیون پروتئین کازئین در pHهای پائین نیز صورت گرفته است و برخی منابع به اثر ممانعت کنندگی کازئین برای فیبریلزایی سایر پروتئین‌ها پرداخته است [13,14]. شکل 2 مسیر پیشنهادی برای فیبریلایسیون کازئین را ارائه می‌نماید.

اکروید و همکارانش بهترین فرم کازئین مورد استفاده برای تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی را فرم کازئین کاپا معرفی کرده‌اند که پس از جداسازی از سایر انواع کازئین موجود در شیر مورد فیبریلزایی قرار گرفته است [12]. هدف کلی این مطالعه، سنجش توانایی پروتئین کاپا کازئین برای تشکیل ساختارهای رشته‌ای غنی از صفحات β در شرایط مختلف و بهینه‌سازی آن بوده است.

2- مواد و روش‌ها

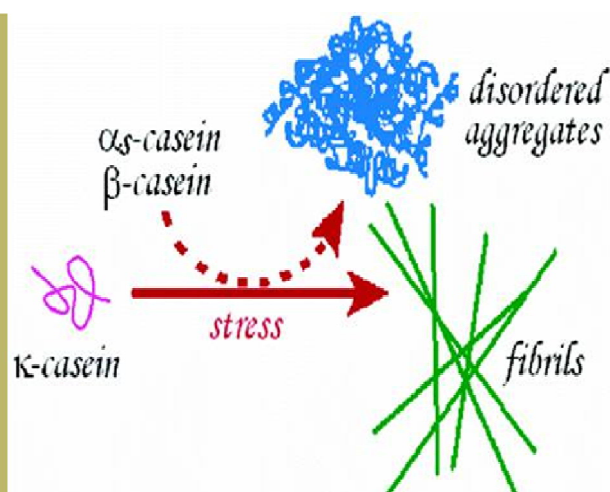
2-1- مواد

کاپا کازئین، تیوفلاوین T، کنگورد و سدیم آزید از شرکت سیگما²، رنگ کوماسی بریلیانت بلو، گلايسين و سایر نمک‌ها و مواد شیمیایی نیز از محصولات شرکت مرک³ استفاده گردید. فیلترهای با منافذ 0/22 و 0/45 میکرومتر از Milipore تهیه شد.

² St Louis, MO, USA

³ Merck-Germany-Darmstadt

¹ Stabilizing Factor



شکل 2 مسیر پیشنهادی برای فیبریلاسیون کازئین [13] (سمت راست)، مدل فضایی پروتئین کاپا کازئین

pHهای مختلف دارای 0/05% وزن بر حجم سدیم آزید برای جلوگیری از آلودگی میکروبی و قارچی است حل شده و سپس غلظت پروتئین بوسیله روش سنجش کمی برادفورد اندازه‌گیری شد. در این مطالعه پروتئین‌ها در غلظت‌های یک تا پنج میلی گرم بر میلی لیتر و در pHهای 3 تا 7 تهیه و استفاده شدند. سپس 500 میکرولیتر از محلول پروتئینی در ویال‌های 2 میلی لیتری ریخته شده و در حمام آب با دمای 30، 40، 50، 60 و 70 درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و بکمک یک مگنت کوچک بر روی استایر با دور 100 rpm، برای مدت 0، 12، 24، 36 و 48 ساعت به هم زده شد.

3-2-2- جذب سنجی کنگورد

برای این منظور در یک میکروتیوپ 0/5 میلی لیتری، 475 میکرولیتر از محلول بافر کنگورد با 25 میکرولیتر از نمونه تجمعات حاصله مخلوط شده و برای 10 دقیقه تا تثبیت رنگ در شرایط آزمایشگاه قرار می‌گیرد. سپس توسط دستگاه طیف‌سنج مرئی² یک اسکن طول موج از 400 تا 600 نانومتر در مقابل بافر کنگورد به عنوان بلانک گرفته می‌شود. در این محدوده مولکول کنگورد به تنهایی، حداکثر جذب را در طول موج 485 نانومتر دارد و در

2-2- روش‌ها

1-2-2- تهیه محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز

(الف) بافر میکس سیترات-فسفات: با تهیه یک استوک 0/1 مولار از اسید سیتریک و 0/2 مولار از فسفات سدیم دی بازیک در آب دوبار تقطیر و ترکیب نمودن آن‌ها با نسبت‌های مشخص، می‌توان بافرهایی با pHهای مختلف از 3 تا 7 تهیه نمود و نهایتاً توسط pH متر و HCl، pH آن‌ها را بطور جداگانه تنظیم نمود [15]. برای جلوگیری از آلودگی احتمالی، به میزان 0/05% سدیم آزید اضافه شده و پس از عبور از فیلترهای میلی پور در شیشه‌های تیره مخصوص در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. (ب) بافر کنگورد: میزان مورد نظر از کنگورد در بافر¹ PBS شامل 140 میلی مولار NaCl و 2/5 میلی مولار KCl و 10 میلی مولار Na_2HPO_4 و 2 میلی مولار KH_2PO_4 حل شده، بطوری که غلظت نهایی کنگورد به 20 میکرومولار برسد و نهایتاً pH را بر روی 7/4 تنظیم شد. پس از عبور دادن بافر از فیلترهای میلی پور در ظروف تیره در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

2-2-2- القای تجمع آمیلوئیدی در کاپا کازئین

پروتئین کاپا کازئین در بافر میکس سیترات-فسفات با

² Shimadzu UV-1800 Spectrophotometer

¹ Phosphate buffer saline

صورت تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی، این میزان تا بیش از 500 نانومتر افزایش پیدا می‌کند.

4-2-2- دورنگ نمایی دورانی (CD)

دورنگ نمایی دورانی (CD) در واقع جذب متفاوت دو نور پلاریزه حلقوی چپ‌گرد و راست‌گرد توسط یک نمونه فعال نوری است. تقریباً بیشتر مولکول‌های سنتز شده توسط موجودات زنده از لحاظ نوری فعال هستند. این پدیده اساس مطالعه بیوماکرومولکول‌ها توسط دستگاه‌های طیف سنج دورنگ نمایی دورانی است. در این مطالعه، برای بدست آوردن طیف‌های دورنگ نمایی دورانی پروتئین تغییر یافته از ابزار اسپکتروپلاریمتر Jasco J-810 spectropolarimeter استفاده گردید. برای اندازه‌گیری طیف دورنگ نمایی دورانی در محدوده فرابنفش دور، از غلظت 0/2 میلی گرم بر میلی‌لیتر کاپا کازئین و سل با ضخامت 0/1 سانتی‌متر در مقابل بافر تریس با pH= 7/4 به عنوان بلانک استفاده گردید.

5-2-2- فلوریمتری

به منظور بررسی تشکیل فیبریل‌ها در محلول انکوباسیون معمولاً از نشر فلورسانس ThT و اسپکتروفلوئورومتر کری اکلپس واریان¹ استفاده شد. تیوفلاوین T با قرار گرفتن در بین زنجیره‌های بتا در صفحات باعث افزایش نشر می‌گردد. پروتئین کاپا کازئین به نسبت 1 به 20 از پروتئین نسبت به بافر تهیه شد و سپس طیف نشری فلورسانس آن در طول موج 482 نانومتر قرائت گردید. طول موج تحریک 450 نانومتر و طیف نشری در محدوده 450 تا 600 نانومتر اندازه‌گیری شد. با این روش غلظت نهایی پروتئین 1 میکرومولار و غلظت نهایی ThT در حدود 20 میکرومولار است.

6-2-2- میکروسکوپ الکترونی گذاره²

نمونه‌های کاپا کازئین با غلظت نهایی 1 میلی‌گرم بر

میلی‌لیتر، برای مدت 45 ثانیه بر روی گریدهای مسی پوشیده شده با لایه‌ای از پلیمر فرموار³ قرار گرفتند و مقادیر اضافه با کاغذ صافی برداشته شد. سپس نمونه‌ها توسط محلول 3 درصد وزنی اورانیل استات به مدت یک دقیقه شست‌وشو شده و باز مقادیر اضافه با کاغذ صافی برداشته شد. پس از خشک شدن به مدت دو ساعت در دمای آزمایشگاه، گریدهای آماده توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره مدل Philips EM 208(S) در ولتاژ 75 کیلو ولت تصویر برداری گردید. از مقادیر بزرگ نمایی 18 تا 77 هزار برابر استفاده گردید.

3- نتایج

با استفاده از روش جذب سنجی کنگورد، میزان تغییرات λ_{max} در محدوده 400 تا 600 نانومتر بدست آمد. در هر مورد مطالعات مربوط به اثر غلظت پروتئین، دما و pH، بطور مجزا آزمایش شده و نتایج حاصله آورده شده است. مطالعات CD و فلورسانس نیز به ترتیب تعیین کننده میزان درصد ساختار دوم پروتئین و میزان شدت فلورسانس حاصل از پروتئین می‌باشند.

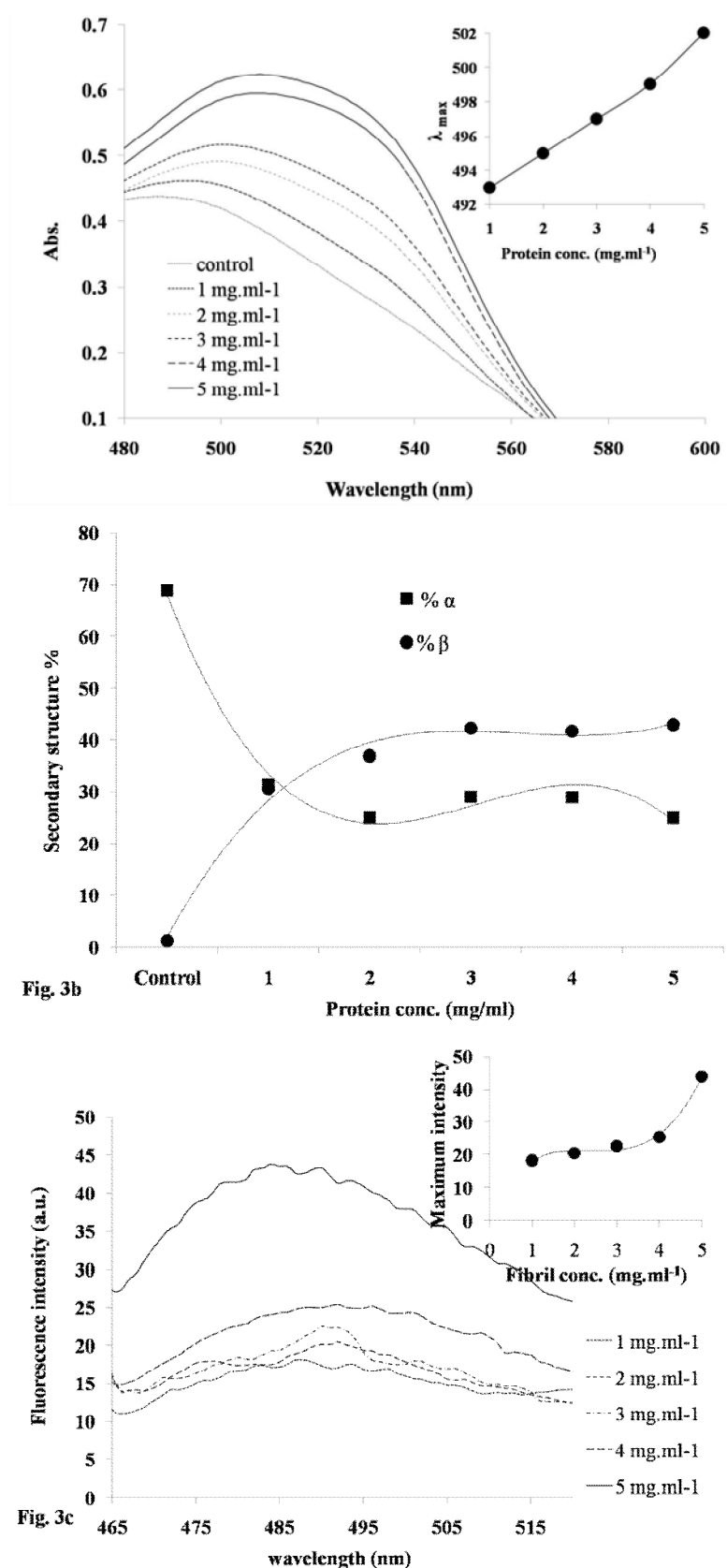
1-3- روند فیبریلزایی با تغییرات غلظت پروتئین، دما و pH

در این مطالعه، اثر تغییرات غلظت بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی روند فیبریلزایی در دمای 50 درجه سانتی‌گراد و pH= 7/4 مورد بررسی قرار گرفته است. در آزمایش طیف سنجی کنگورد، با افزایش میزان غلظت، میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی نیز افزایش می‌یابد. نتایج آزمایش‌های CD و فلورسانس نیز بیشترین میزان تولید آمیلوئید را در غلظت 5 میلی گرم بر میلی‌لیتر تأیید می‌کند. حداکثر میزان ساختار ثانویه بتا که مبین تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی است و حداکثر شدت فلورسانس نیز در غلظت 5 میلی گرم بر میلی‌لیتر ایجاد شده است (شکل 3).

¹ Cary Eclipse VARIAN

² Transmission electron microscopy

³ Formvar



شکل 3 طیف‌های کنگورد (الف)، سی دی (ب) و فلورسانس (ج) کاپا کازئین در غلظت‌های مختلف در شرایط بهینه فیبریل زایی

نمی‌باشند، اما از آنجا که تمامی آن‌ها از مکانیسم‌ها و میان‌کنش‌های بین ملکولی یکسانی در روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی استفاده می‌کنند، می‌توان الگوی کلی تشکیل این ساختارها را بدست آورد. امروزه رشته‌های آمیلوئیدی با توجه به کاربردهای گوناگون از جمله تولید نانو ساختارهای پروتئینی جدید، اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند [16-20].

ساختارهای بتا در رشته‌های آمیلوئیدی می‌توانند از چند پیش‌رشته تشکیل شده باشند که از دور هم تنیده شدن رشته‌های اولیه بوجود آمده‌اند. ساختارهای آمیلوئیدی عمدتاً از تأثیر عوامل محیطی بر پروتئین‌ها ایجاد شده و به نظر اکثر دانشمندان، فاکتورهای ژنتیکی نقش کمی در بیماری‌های آمیلوئیدی دارند. این امر بررسی مکانیزم تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی را تحت تأثیر عوامل محیطی اجتناب ناپذیر نموده است [21، 22]. تحقیقات انجام شده بر روی تجمعات آمیلوئیدی معطوف به حوزه‌های متفاوتی است، شناسایی خصوصیات ساختاری و همچنین عملکرد و رفتار گونه‌های متفاوت آمیلوئیدی اعم از فیبریل‌ها و اولیگومرها [23]. بررسی بر روی جزئیات فرایند تجمع و کشف مکانیسم مسیرهای متفاوت دخیل در آن [24]. ارزیابی اثرات پروتئین‌های آمیلوئیدی بر روی سلول‌های مختلف برای شناسایی خصوصیات سمی و پاتولوژیکی [25، 26]. مطالعات *in vivo* بر روی دروزوفیلا و مدل‌های موشی، بررسی اثرات داروهای متفاوت به عنوان محصولات طبیعی در گیاهان و یا داروهای سنتزی در مهار تشکیل تجمعات و یا جلوگیری از میزان آسیب‌رسانی آن به سلول‌ها و همچنین مطالعه تأثیرات این داروها در محیط *in vitro* و ارائه مکانیسم‌های مهار دارو [27-28]. از جمله‌ی موارد مورد مطالعه بر روی انواع ساختارهای آمیلوئیدی می‌باشد. پژوهش صورت گرفته به منظور شناخت هرچه بیشتر خصوصیات آمیلوئیدها و همچنین بررسی شرایط بهینه برای فیبریلزایی از پروتئین کاپا کازئین پرداخته است.

اثر تغییرات دما بر حسب درجه سانتی‌گراد بر روی روند فیبریلزایی در غلظت 5 میلی گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین و $pH=7/4$ تعیین شده است که طیف مربوط به هر دما پس از 48 ساعت آورده شده است. در آزمایش طیف سنجی کنگورد، حداکثر تولید رشته‌های آمیلوئیدی در دمای 50 درجه سانتی‌گراد دیده می‌شود. آزمایش‌های CD و فلورسانس نیز که در محدوده 40 تا 80 درجه سانتی‌گراد انجام شده است، بیشترین میزان تولید آمیلوئید را در دمای 65 درجه سانتی‌گراد تأیید می‌کند که به ترتیب با حداکثر میزان ساختار ثانویه بتا و حداکثر شدت فلورسانس مشخص شده است (شکل 4).

اثر تغییرات pH بر روی روند فیبریلزایی در غلظت 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین و دمای 50 درجه سانتی‌گراد تعیین شده است. در آزمایش طیف سنجی کنگورد، حداکثر تولید رشته‌های آمیلوئیدی در pH برابر 7/4 دیده می‌شود. آزمایش‌های CD و فلورسانس نیز که در محدوده 2 تا 7/4 انجام شده است، بیشترین میزان تولید آمیلوئید را در pH برابر 7/4 تأیید می‌کند که به ترتیب با حداکثر میزان ساختار ثانویه بتا و حداکثر شدت فلورسانس مشخص شده است (شکل 5).

3-2- تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی گذاره

این روش یکی از مطمئن ترین ابزارهای مورد استفاده در جهت اثبات وجود تجمعات آمیلوئیدی می‌باشد. تصویر بدست آمده (سمت راست) در مقایسه با نمونه کنترل که در شرایط فیبریلزایی قرار نگرفته است (سمت چپ) ساختارهای فیبریلی را به طور واضح نشان می‌دهد (شکل 6).

4- بحث

بررسی فرایند فیبریلزاسیون بر روی پروتئین‌های متنوعی انجام شده است. اگرچه همه‌ی این پروتئین‌ها بیماری‌زا

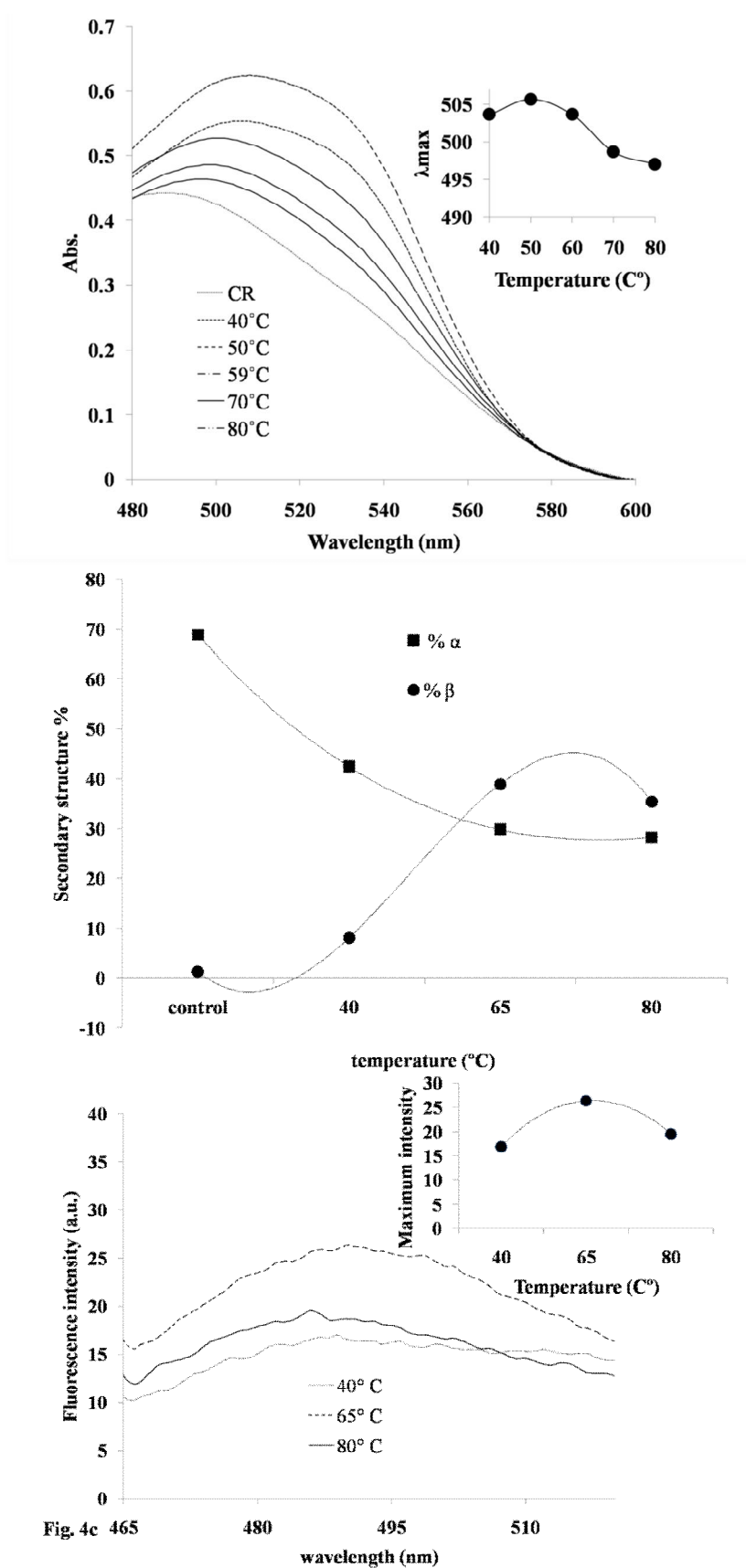


Fig. 4c

شکل 4 طیف‌های کنگورد (الف)، سی دی (ب) و فلورسانس (ج) کاپا کازئین در دماهای مختلف در شرایط بهینه فیبریل‌زایی

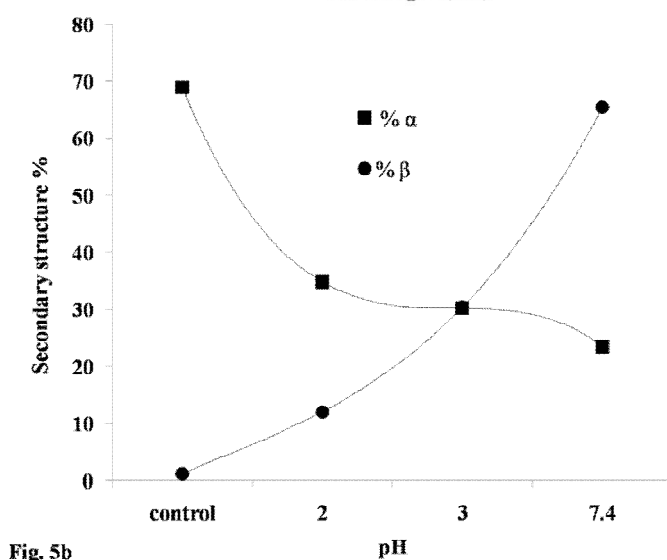
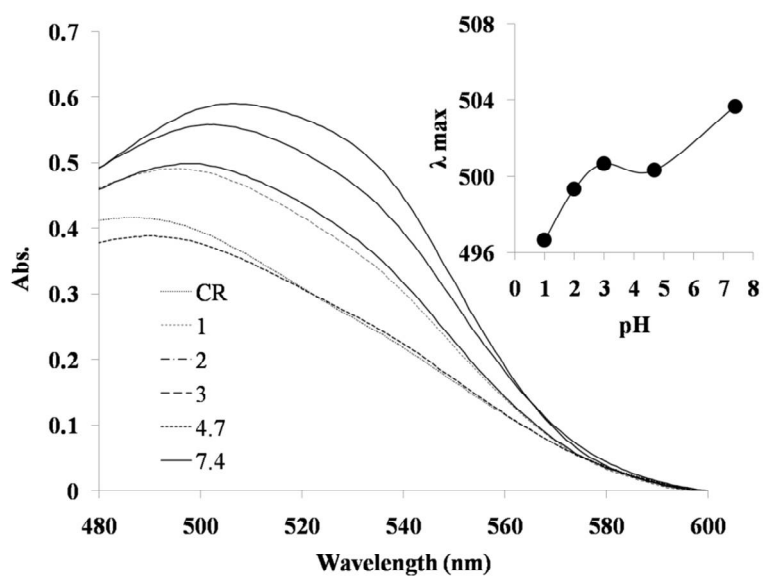


Fig. 5b

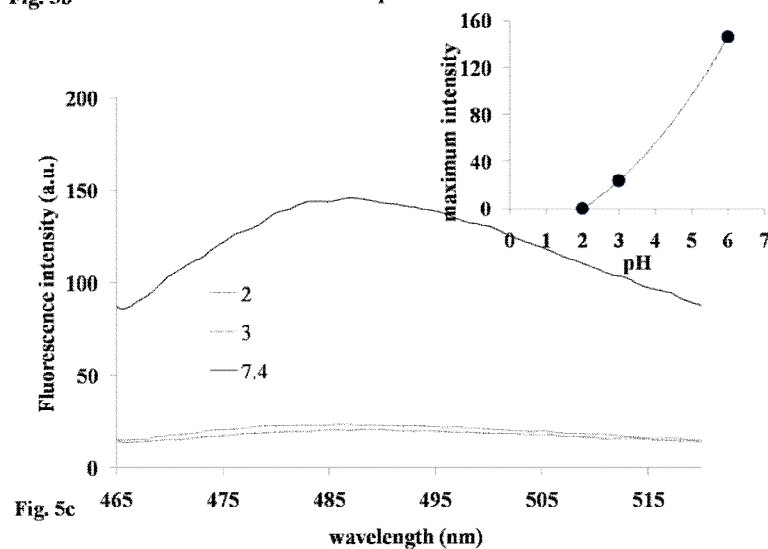
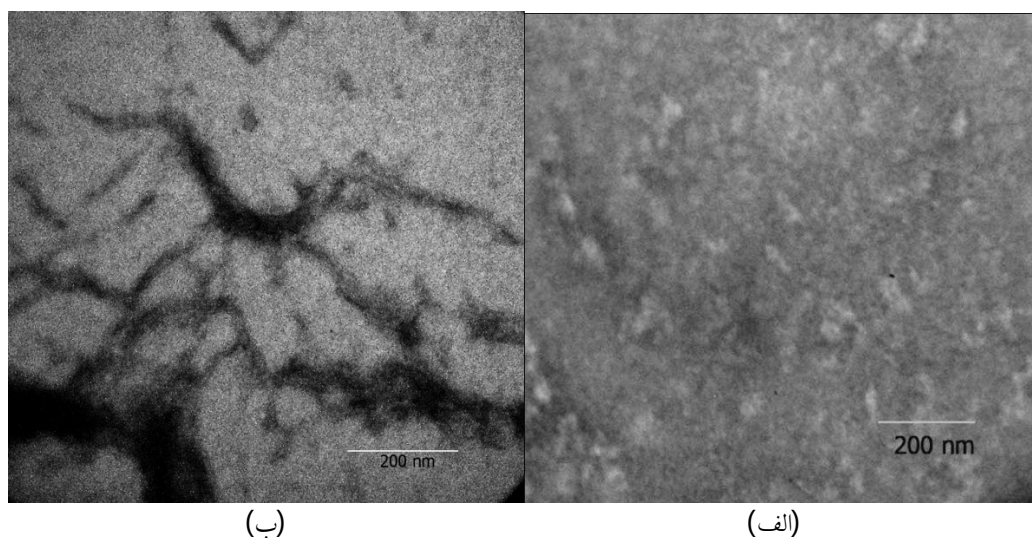


Fig. 5c

شکل 5 طیف‌های کنگورد (الف)، سی دی (ب) و فلورسانس (ج) کاپا کازئین در pHهای مختلف در شرایط بهینه فیبریل‌زایی



شکل 6 تصاویر میکروسکوپ الکترونی از فیبریل‌های بدست آمده از الف- شرایط اپتیمم فیبریل‌زایی در مقایسه با ب- نمونه کنترل

آمیلولییدی را بالا ببرند [31]. البته دماهای بالا می‌توانند موجب ایجاد تغییرات شیمیایی در اسیدهای آمینه شوند که رفتار تجمعی را تحت تأثیر خود دارد [32].

5- نتیجه‌گیری

پژوهش صورت گرفته به منظور شناخت هرچه بیشتر خصوصیات آمیلولیدها و همچنین بررسی شرایط بهینه برای فیبریل‌زایی از پروتئین کاپا کازئین انجام شده است. هدف کلی این تحقیق، سنجش توانایی پروتئین کاپا کازئین برای تشکیل ساختارهای رشته ای غنی از صفحات β در شرایط مختلف و بهینه سازی آن بوده است.

در این مطالعه به منظور تشکیل تجمعات آمیلولییدی تحت شرایط مختلفی از غلظت پروتئین، دما، pH استفاده شد تا تأثیر هر یک بطور جداگانه مورد بررسی قرار گیرد. در بررسی روند فیبریل‌زایی می‌توان با ثابت در نظر گرفتن هم‌زمان دو فاکتور دیگر، تغییرات یکی از آن‌ها را مورد بررسی دقیق و منطقی قرار داد. دلیل این کار حذف هر گونه عامل تغییر دیگر از شرایط موجود در سیستم مطالعه و بررسی متغیر مورد نظر، بطور ویژه می‌باشد. برای

اولین فاکتور مورد مطالعه، غلظت است. در غلظت‌های بالای پروتئین، تراکم مولکول‌ها در واحد حجم بالا رفته و بنابراین احتمال تصادم مولکول‌های پروتئینی را بالا می‌برد [29]. شبیه‌سازی تجمع پروتئینی در *in vitro* مبین این مطلب است که افزایش غلظت پروتئین، همانطور که در مورد بتا لاکتالبومین و بسیاری از دیگر پروتئین‌ها دیده شده است از این نظر که اندازه تجمعات را بالا می‌برد، احتمال برخورد بین مولکولی را بالا برده و در بیشتر موارد منجر به تشکیل تجمعات آمیلولییدی می‌گردد [30].

با توجه به این که دما یکی از مهم ترین فاکتورهای محیطی مؤثر بر تشکیل رشته‌های آمیلولییدی است، هرگونه تغییر در میزان دمای محیط می‌تواند تغییرات کنفورماسیونی قابل توجهی در ساختار پروتئین به وجود آورد. فاکتور دما با مکانیزم‌های مختلفی این تغییرات را اعمال می‌کند. معمولاً دمای خیلی بالا موجب غیرطبیعی شدن پروتئین‌ها و در معرض قرارگیری باقیمانده‌های آبگریز می‌شود که به تشکیل رشته‌های آمیلولییدی منجر می‌شود. همچنین دماهای بالا مانند آنچه در مورد غلظت پروتئین مطرح شد، می‌توانند میزان تحرک سینتیکی مولکول‌های پروتئین را بالا برده و احتمال تولید رشته‌های

- [6] Ohnishi, S., and Takano, K. (2004) Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding. *Cell Mol Life Sci* 61, 511-524.
- [7] Fändrich, M. (2007) On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell Mol. Life Sci.* 64, 2066-2078.
- [8] Kunz, C., Lönnerdal, B. (1990) Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. *Am. J. Clin. Nutr.* 51, 37-46.
- [9] Holt, C., Carver, J.A., Ecroyd, H., and Thorn, D.C. (2013) Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *J. Dairy Sci.* 96, 6127-6146.
- [10] Nagy, K., Váró, G., and Szalontai, B. (2012) κ -Casein terminates casein micelle build-up by its "soft" secondary structure. *Eur. Biophys. J.* 41, 959-968.
- [11] Sokolovski, M., Sheynis, T., Kolusheva, S., and Jelinek, R. (2008) Membrane interactions and lipid binding of casein oligomers and early aggregates. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778, 2341-2349.
- [12] Ecroyd, H., Thorn, D., Liu, Y., and Carver, J. (2010) The dissociated form of kappa-casein is the precursor to its amyloid fibril formation. *Biochem. J.* 429, 251-260.
- [13] Thorn, D.C., Meehan, S., Sunde, M., Rekas, A., Gras, S.L., MacPhee, C.E., Dobson, C.M., Wilson, M.R., and Carver, J.A. (2005) Amyloid Fibril Formation by Bovine Milk κ -Casein and Its Inhibition by the Molecular Chaperones α S- and β -Casein. *Biochem.* 44, 17027-17036.
- [14] Carrotta, R., Canale, C., Diaspro, A., Trapani, A., San Biagio, P., and Bulone, D. (2012) Inhibiting effect of α s1-casein on A β 1-40 fibrillogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1820, 124-132.
- [15] Stoll, V.S., and Blanchard, J.S. (1990) Buffers: Principles and practice. *Meth. Enzymol.* 182, 24-38.
- [16] Chiti, F., and Dobson, C.M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annul. Rev. Biochem.* 75, 333-366.
- [17] Jeyashekar, N.S., Sadana, A., and Vo-Dinh, T. (2005) Protein amyloidose misfolding: mechanisms, detection, and pathological

سنجش تشکیل فیبریل‌ها از روش‌های جذب سنجی کنگورد، نشر فلورسانس ThT و داده‌های CD استفاده شد و برای تأیید نهایی فیبریل‌های تهیه شده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره نیز کمک گرفته شد. نتایج نشان داد که حداکثر میزان تولید فیبریل‌های آمیلوئیدی در غلظت 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، دمای 50 درجه سانتی‌گراد و pH برابر 7/4 تشکیل می‌شود. با رویکردی نوین، رشته‌های آمیلوئیدی را می‌توان به‌عنوان نانو مواد جدید معرفی کرده و از این‌رو نتایج حاصل می‌تواند با توجه به کاربردهای متنوع نانو مواد، بهینه‌سازی تولید این رشته‌ها از پروتئین ارزان و در دسترس موجود در شیر را توجیه نماید.

6- سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت بخاطر تأمین مالی این طرح تشکر می‌نمایند.

7- منابع

- [1] Stefani, M., Dobson, C. M. (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. of Mol. Med.* 81, 678-699.
- [2] Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T.W., and Carpenter, J., F. (2003) Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm. Res.* 20, 1325-1336.
- [3] Fink, A. (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and design.* 3, 9-23.
- [4] Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T., and Chothia, C. (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 247, 536-540.
- [5] Wang, W., Nema, S., and Teagarden, D. (2010) Protein aggregation Pathways and influencing factors. *Int. j. of pharm.* 390, 89-99.

- neural stem cells from subventricular zone. *J. Neurochem*, 102, 493-500.
- [26] Resende, R., Ferreiro, E., Pereira, C., and De Oliveira, C.R. (2008) Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: Involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience* 155, 725-737.
- [27] Shaykhalishahi, H., Taghizadeh, M., Yazdanparast, R., and Chang, Y.T. (2010) Anti-amyloidogenic effect of AA3E2 attenuates beta-amyloid induced toxicity in SK-N-MC cells. *Chem. Biol. Interact.* 186, 16-23.
- [28] Masuda, M., Suzuki, N., Taniguchi, S., Oikawa, T., Nonaka, T., Goedert, M., Hasegawa, M. (2006) Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. *Biochem.* 45, 6085-6094.
- [29] Finke, J.M., Roy, M., Zimm, B.H., and Jennings, P.A. (2000) Aggregation events occur prior to stable intermediate formation during refolding of interleukin 1. *Biochem.* 39, 575-583.
- [30] Gupta, P., Hall, C.K., Voegler A.C. (1998) Effect of denaturant and protein concentrations upon protein refolding and aggregation: A simple lattice model. *Protein Sci.* 7, 2642-2652.
- [31] Speed, M.A., King, J., Wang, D.C. (1997) Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation. *Biotechnol. Bioeng.* 54, 333-343.
- [32] Vermeer, A.P., and Norde, W. (2000) The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys. J.* 78, 394-404.
- implications. *Meth. Mol. Biol.* 300, 417-435.
- [18] Dobson, C. (2006) Protein aggregation and its consequences for human disease. *Protein Pept. Lett.* 13, 219-227.
- [19] Scheibel, T., Parthasarathy, R., Sawicki, G., Lin, X.M., Jaeger, H., and Lindquist, S.L. (2003) Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4527-4532.
- [20] Hamada, D., Yanagihara, I., and Tsumoto, K. (2004) Engineering amyloidogenicity towards the development of nanofibrillar materials. *Trends Biotechnol.* 22, 93-97.
- [21] Collins, S.R., Douglass, A., Vale, R.D., and Weissman, J.S. (2004) Mechanism of prion propagation: amyloid growth occurs by monomer addition. *PLoS Biol.* 2, e321.
- [22] Li, J., Uversky, V.N., and Fink, A.L. (2001) Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochem.* 40, 11604-11613.
- [23] Baxa, U. (2008) Structural basis of infectious and non-infectious amyloids, *Curr Alzheimer Res.* 5, 308-318.
- [24] Chiti, F., and Dobson, C.M. (2009) Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat. Chem. Biol.* 5, 15-22.
- [25] Heo, C., Chang, K.A., Choi, H.S., Kim, H.S., Kim, S., Liew, H., Kim, J.A., Yu, E., and Suh, Y.H. (2007) Effects of the monomeric, oligomeric, and fibrillar Abeta42 peptides on the proliferation and differentiation of adult