

تأثیر اولیگومرهای آمیلوئید بتا بر هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین ترانستیرین انسانی

سیدابوالقاسم قدمی*

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۹۹۳۸۹۳۹۷۳، تهران، ایران

a.ghadami@alzahra.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۳۰

دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۱۴

چکیده

ترانستیرین یک پروتئین هموترامر ۵۵ کیلو دالتونی بسیار محافظت شده است که در چندین گونه مهره داران از جمله انسان وجود دارد و در باکتری ها، نماتدها و گیاهان نیز مشاهده می شود. مطالعات قبلی صورت گرفته، نشان می دهد که تعامل مستقیم بین ترانستیرین و آمیلوئید بتا (عامل بیماری آلزایمر) وجود دارد که منجر به مهار تجمع آمیلوئید بتا، تخریب فیبریلی یا هر دو می شود، در سال های گذشته، شواهد نشان می دهد که گونه های اولیگومری آمیلوئید بتا که در اثر فرایند تجمع تشکیل شده اند، سمی تر از فیبریل های بالغ هستند. مطالعات نشان داده است که چنین واسطه الیگومری نیز توسط میانکنش با پروتئین های ترانستیرین تعدیل می شود، هرچند هنوز مکانیسم دقیق اتصال آمیلوئید بتا به پروتئین ترانستیرین مشخص نشده است. در این مطالعه پس از تخلیص پروتئین ترانستیرین انسانی، اثرات مهار پروتئین ترانستیرین برای تشکیل آمیلوئید بتا به روش های مختلف نشان داده شد و در نهایت به کمک مطالعات سنجش هیدروفوبیسیته سطحی نقش این میانکنش ها در فعالیت چاپرونی ترانستیرین بررسی شد. ر سم نمودار اسکاچارد برای بیان کمی میزان آبگریزی سطحی پروتئین (PSH) حاکی از افزایش میزان هیدروفوبیسیته ترانستیرین پس از اتصال به فرم های اولیگومری آمیلوئید بتا را دارند. نتایج ارائه شده در این تحقیق بینشی در مورد طبیعت و میانکنش های درگیر در مراحل اولیه تشکیل فیبریل در پروتئین آمیلوئید بتا و نحوه میانکنش آن با ترانستیرین فراهم می کند. نتایج نشان داد که احتمالاً میانکنش های هیدروفوبیسیته در اتصال مورد مطالعه نقش دارد. با توجه به شباهت سیستم های تشکیل آمیلوئید، یافته های توصیف شده می تواند درک عمیق تری از آسیب شناسی بیماری های آمیلوئیدی ایجاد کند.

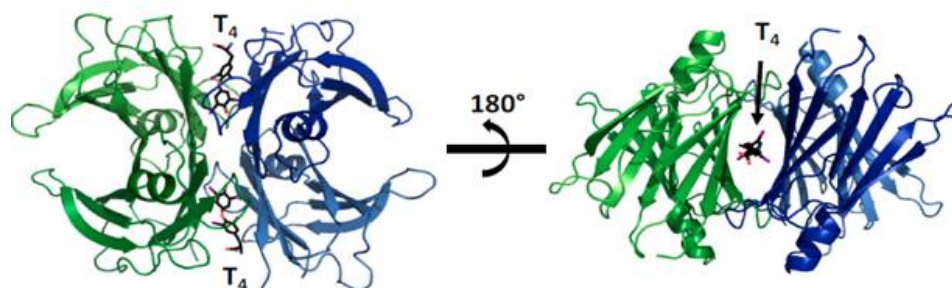
کلید واژگان: بیماری های تخریب عصبی، ترانستیرین، فیبریل های آمیلوئیدی، آمیلوئید بتا

۱- مقدمه

باعث ایجاد دیمرهایی می شود که به صورت تترامر تولید می شوند و یک کانال آبگریز مرکزی را می سازند که توسط اسید آمینه هایی از هر دو دimer تشکیل شده است. این کانال دارای دو محل اتصال مشابه برای هورمون های تیروئیدی (T4) است. این مکان های اتصال می توانند ترکیبات کوچک دیگری را که در پلازما وجود دارد مانند مشتقات متابولیسم، اجزای رژیم غذایی یا حتی مولکول های کوچک تجویز شده به عنوان دارو را نیز در خود جای دهند (شکل ۱) [۲].

شواهد متعدد آزمایشگاهی نشان داده است که ترانستیرتین به عنوان چاپرون نقش حفاظتی را در سلول های عصبی در بیماری آلزایمر ایفا می کند. تجزیه و تحلیل مقایسه ای ترانستیرتین، کاهش قابل توجهی در غلظت این پروتئین در سرم خونی- مغزی و پلاسمای بیماران مبتلا به آلزایمر در مقایسه با افراد سالم نشان داده است. علاوه بر این، سطح ترانستیرتین در سرم خونی-مغزی با شدت بیماری و فراوانی پلاک های آمیلوئیدی رابطه منفی دارد و سطح ترانستیرتین در پلازما با مرحله بیماری نیز ارتباط منفی دارد [۳]. با توجه به خصوصیات اتصال ترانستیرتین و آمیلوئید بتا (A β)، کاستا و همکاران نشان دادند که ترانستیرتین قادر است با مونومرهای محلول A β ، و همچنین الیگومرها و فیبریل های آمیلوئید بتا تعامل داشته باشد و باعث خنثی کردن سمیت A β می شود. ترانستیرتین مانع از الیگومریزاسیون می شود و تخریب فیبریل ها را افزایش می دهد.

ترانستیرتین (TTR^۱) یک پروتئین پلازما است که به طور عمده توسط کبد و شبکه کورویید در خون ترشح می شود. در ابتدا "پرالومین" نامگذاری شد، زیرا در ژل های الکتروفورز جلوی بانده آلومین قرار می گیرد. بعداً مشخص شد که ترانستیرتین می تواند به هورمون های تیروئید و پروتئین اتصال دهنده رتینول متصل شود، بنابراین بیوشیمیست ها نام ترانستیرتین را برای آن به کار بردند تا نقش آن را به عنوان یک انتقال دهنده هورمون های تیروئید و رتینول (ویتامین A) توصیف کند [۱]. ترانستیرتین یک پروتئین هموتترامر ۵۵ کیلو دالتونی است و ساختار بلوری اشعه ایکس این پروتئین نشان می دهد که این پروتئین دارای شکل کروی است و از چهار زیر واحد غنی از صفحه بتا یکسان و ۱۲۷-آمینو اسید تشکیل شده است. چهار مونومر موجود در تترامر از طریق پیوندهای غیر کووالانسی با یکدیگر تعامل دارند. هر مونومر از یک مارپیچ کوچک آلفا و هشت رشته بتا غیر موازی^۲ تشکیل شده است که در دو صفحه بتا (رشته های DAGH و CBEF) به شکل یک بشکه آلفا-بتا تشکیل شده اند. مقدار pH پایین باعث تجزیه تترامر ترانستیرتین به مونومرها می شود. یک فعل و انفعال قوی بین دو مونومر



شکل ۱ ساختار کمپلکس ترانستیرتین (PDB code: 2rox) با هورمون تیروکسین (T4) است. با تشکیل یک کمپلکس تترامری، ترانستیرتین دو حفره اتصال آبگریز را تشکیل می دهد که توسط دو مولکول T4 در این مدل اشغال می شود.

^۲ beta anti parallel

^۱ Transthyretin

ترانستیرتین مشخص نشده است. در این مطالعه برای بررسی نحوه اتصال آمیلوئید بتا به پروتئین ترانستیرتین، میزان هیدروفوبیسیته پروتئین ترانستیرتین در حضور و عدم حضور آمیلوئید بتا بررسی شد. برای این کار پس از ایجاد اولیگومرهای آمیلوئید بتا تاثیر آن بر میزان هیدروفوبیسیته سطحی ترانستیرتین بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تخلیص پروتئین ترانستیرتین

برای تخلیص از ژن ترانستیرتین انسانی نوترکیب در باکتری اشرشیاکلی استفاده شد. به این منظور پس از کشت باکتری به کمک ستون های کروماتوگرافی پروتئین مورد نظر تخلیص شد [۶]. برای تعیین درصد خلوص و کیفیت آن از ژل الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد. پروتئین آمیلوئید بتا از سیگماآلد ریچ خریداری شد.

۲-۲- بررسی کدورت سنجی

تجمع حرارتی آمیلوئید بتا در حضور و عدم حضور پروتئین ترانستیرتین انسانی با دستگاه اسپکتروفوتومتری مرئی-فرابنفش مورد مطالعه قرار گرفت. به علت تجمع پروتئین، جذب ظاهری آن بالا می‌رود که ناشی از انکسار نور است. در این مطالعه از طول موج ۴۰۰ نانومتر برای تعقیب تجمع استفاده شده است. در دستگاه اسپکتروفوتومتر مد سینتیک، طول موج ۴۰۰ نانومتر، پهنای شکاف تهیج ۴ نانومتر، دمای مورد نظر، فاصله زمانی داده‌ها و زمان لازم برای تجمع پروتئین تنظیم شد. برای تهیه محلول‌های ذخیره از بافر فسفات ۵۰ mM، pH=۷/۴ استفاده شد، برای تهیه نمونه مورد مطالعه از نمونه که مدنظر بود در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار که pH آن به ترتیب با افزودن HCl تنظیم شد، استفاده شد.

۲-۳- بررسی تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی به کمک

میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

نمونه‌های پروتئینی بمنظور بررسی تشکیل فیبریل توسط دستگاه SEM با مشخصات (TESCAN VEGA3) تصویر برداری شدند. برای این کار، پروتئین ترانستیرتین تنها، و آمیلوئید بتا تنها و هم‌منظور ترانستیرتین در حضور آمیلوئید بتا پس از قرارگیری در شرایط دما و pH مورد نظر، مطالعه شد. سپس، نمونه‌ها توسط طلا پوشش داده شده و برای

داده‌های اخیر نشان می‌دهد که ترانستیرتین با هدایت هسته‌های الیگومری به تجمعات غیر آمیلوئیدی باعث کاهش سمیت $A\beta$ شده، و همچنین با اتصال به الیگومرهای $A\beta$ ، از فرایندهای هسته‌زایی اولیه و ثانویه جلوگیری می‌کند و در نتیجه باعث مهار رشد فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌شود [۴].

همانطور که گفته شد، بیماری آلزایمر با رسوب پپتید آمیلوئید بتا ($A\beta$) در پلاک‌های خارج سلولی در مغز همراه است. مطالعات آزمایشگاهی و داخل بدن انسان نشان داده است که ترانستیرتین به عنوان یک مهار کننده $A\beta$ در مغز عمل می‌کند، اما مکانیسم آن به طور کامل مشخص نشده است. فرایند تجمع بسیار پیچیده است و به همین دلیل، روشن شدن مکانیزم تجمع $A\beta$ بسیار چالش برانگیز است. در سال‌های اخیر، جامعه علمی بر روی رویکردهای جنبشی برای شناسایی سازوکارها در سطح مولکولی این تجمعات و کاربرد اثرات چاپرون‌ها تمرکز کرده است. بنابراین، درک فرایند تجمع یک گام مهم در جهت درمان و تشخیص بیماری است. مکانیسم‌های تجمع‌های مولکولی تولید کننده فیبریل‌های آمیلوئید را می‌توان به هسته‌زایی و مکانیسم‌های رشد (رویدادهایی که منجر به افزایش جرم تجمع می‌شود) تقسیم کرد. رویدادهای هسته‌زایی را می‌توان با در نظر گرفتن اینکه آیا آنها به جمعیت تجمعات بستگی دارد به عنوان فرایندهای اولیه و ثانویه طبقه‌بندی کرد. در مراحل اولیه رشد فیبریل‌های آمیلوئیدی هسته‌های اولیه به هم متصل شده و اولیگومرها تشکیل می‌شوند [۵]. در سال‌های اخیر، شواهد نشان می‌دهد که گونه‌های اولیگومری $A\beta$ که در اثر فرایند تجمع تشکیل شده‌اند سمی‌تر از فیبریل‌های بالغ هستند. چندین گزارش نشان داده است که چنین واسطه الیگومری نیز ممکن است توسط اتصال با پروتئین‌های مولکولی چاپرون تعدیل شود. این چاپرون‌های مولکولی می‌توانند عوامل درمانی باشند که چنین گونه‌های سمی را مورد هدف قرار می‌دهند و یک هدف درمانی هیجان‌انگیز در بیماری‌های تخریب کننده سیستم عصبی هستند.

چندین مطالعه نقش محافظت‌کنندگی عصبی را به ترانستیرتین نسبت می‌دهند، که در محل‌های مختلف، هم در سیستم عصبی مرکزی و هم در سیستم عصبی محیطی به ایفای نقش می‌پردازد، اما هنوز مکانیسم دقیق نحوه اتصال آمیلوئید بتا به

ظاهری ANS می‌باشد [۷, ۸]. برای به دست آوردن میزان [ANS] آزاد، نمودار شدت فلئورسانس (F) در مقابل غلظت کل ANS (c) رسم شد. پروتئین دارای چندین جایگاه اتصال برای ANS است. در این آزمایش تا غلظت مشخصی ANS برابر با غلظت پروتئین می‌باشد. به این معنی که همه‌ی مولکول‌های ANS به پروتئین متصل شده اند، به عبارتی تا غلظت مشخصی از ANS، هر مقدار که ANS به محلول پروتئینی اضافه شود، به پروتئین متصل می‌شود و ANS آزاد در محلول وجود نخواهد داشت. بنابراین، در این محدوده، رابطه‌ی خطی بین شدت فلئورسانس و غلظت ANS وجود دارد که این معادله‌ی خطی برابر است با:

$$F = \beta c \quad (2-1)$$

در این رابطه β (شیب خط) ضریب تناسب بین شدت فلئورسانس و غلظت ANS محسوب می‌شود. ضریب تناسب بین شدت فلئورسانس و غلظت ANS (β) از شیب خط نمودار مربوطه (شدت فلئورسانس در مقابل محدوده‌ی غلظتی ANS) محاسبه شد. سپس، در ادامه، غلظت ANS متصل شده با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه شد:

$$[ANS]_{\text{bound}} = \frac{F}{\beta} \quad (3-1)$$

به این معنا که برای به دست آوردن مقدار ANS متصل شده، شدت‌های فلئورسانس مربوط به غلظت‌های بیشتر از محدوده‌ی خطی ANS، بر ضریب تناسب تقسیم شد. در ادامه غلظت مولکول‌های ANS آزاد از طریق معادله‌ی زیر به دست آمد:

$$[ANS]_{\text{free}} = [ANS]_{\text{total}} - [ANS]_{\text{bound}} \quad (4-1)$$

حال با رسم نمودار $F/[ANS]_{\text{free}}$ در برابر F ، K_d^{app} از شیب نمودار و F_{max} (شدت فلئورسانس بیشینه در غلظت اشباع ANS) از طول از مبدا به دست می‌آید. پس

تصویربرداری به دستگاه میکروسکوپ الکترونی نگاره منتقل شدند.

۲-۴ بررسی میزان هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین به کمک ANS

شدت نشر ANS در محلول‌های آبی به تنهایی به شدت پایین است، ولی با اتصال آن به مناطق آبگریز ماکرومولکول، نشر آن افزایش یافته و بیشینه‌ی نشرش به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر جابه‌جا می‌شود. از طرف دیگر این مولکول به دلیل باردار بودن، قادر به نفوذ به مناطق آبگریز داخلی نمی‌باشد، از این رو از این ترکیب به عنوان یک نشانگر برای اندازه‌گیری نسبی و کمی میزان آبگریزی سطحی پروتئین‌ها می‌توان استفاده کرد [۷]. تیتراسیون محلول پروتئین با غلظت‌های متغیر و افزایش یابنده ANS می‌تواند اطلاعاتی را در مورد تغییرات میزان اتصال ANS به آن، که معیاری از سطوح آبگریز آن است، فراهم کند. جهت انجام این آزمایش از غلظت 0.2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین استفاده شد. طول موج تهییج 380 نانومتر، شکاف تهییج 10 و نشر 10 نانومتر و محدوده 400 تا 600 نانومتر جهت ثبت طیف نشری ANS انتخاب شد. برای انجام تیتراسیون و رسم نمودار، پروتئین با غلظت‌های مختلف ANS از محلول ذخیره 6 میلی‌مولار تیترا شده و بعد از 3 دقیقه آنکوباسیون طیف نشری آن ثبت شد، تا زمانی که دیگر با افزایش ANS شدت نشر آن تغییر نکند. آزمایش با بافر فسفات سدیم 50 میلی‌مولار $\text{pH } 7.4$ و در دمای اتاق داخل سل فلئورسانس 3 میلی‌لیتر انجام شد. اتصال ANS به پروتئین از قوانین اتصال لیگاند به ماکرومولکول تبعیت می‌کند و برای آنالیز داده‌های آن می‌توان از معادله اسکاچارد استفاده کرد. معادله اسکاچارد برای اتصال ANS به پروتئین به صورت زیر است:

$$(1-1)$$

$$\frac{F}{[ANS]_{\text{free}}} = \frac{F_{\text{max}}}{K_d^{\text{app}}} - \frac{F}{K_d^{\text{app}}}$$

که در آن F شدت نشر فلئورسانس ANS، $[ANS]_{\text{free}}$ غلظت ANS آزاد، F_{max} مقدار بیشینه‌ی نشر ANS می‌باشد، که نشانگری از تعداد جایگاه‌های آبگریز سطحی برای اتصال ANS می‌باشد و K_d^{app} ثابت تفکیک

۳- نتایج

۳-۱- تخلیص پروتئین ترانسیتیرین انسانی

ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) پروتئین ترانسیتیرین خالص شده به روش ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها در شکل ۲ (ستون ۱) مشاهده می‌شود. ستون ۱ پروتئین استخراج شده و ستون ۲ مربوط به مارکر می‌باشد که در آن ۱۲ پروتئین با وزن مولکولی مشخص قرار دارد. با توجه به نتایج آنالیز تصویر به کمک نرم‌افزار ImageJ درجه خلوص ترانسیتیرین تقریباً ۹۹ درصد است.

۳-۲- سینتیک تجمع آمیلوئید بتا در حضور و عدم حضور پروتئین ترانسیتیرین انسانی

پروسه شکل‌گیری آمیلوئید با پیروی از الگوی nucleation-elongation pattern، با سه فاز جداگانه: هسته‌سازی اولیه، طولیل شدن و فاز تعادل بنا نهاده شده است. سینتیک تجمع آمیلوئید بتا در حضور غلظت‌های مختلف پروتئین ترانسیتیرین با دنبال کردن تغییرات جذب در ۴۰۰ نانومتر بررسی شد.

از به‌دست آوردن مقادیر K_d^{app} و F_{max} از نمودار اسکاتچارد، اندیس آبگریزی سطحی پروتئین در حضور و غیاب آمیلوئید بتا، با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه می‌شود:

(۵-۱)

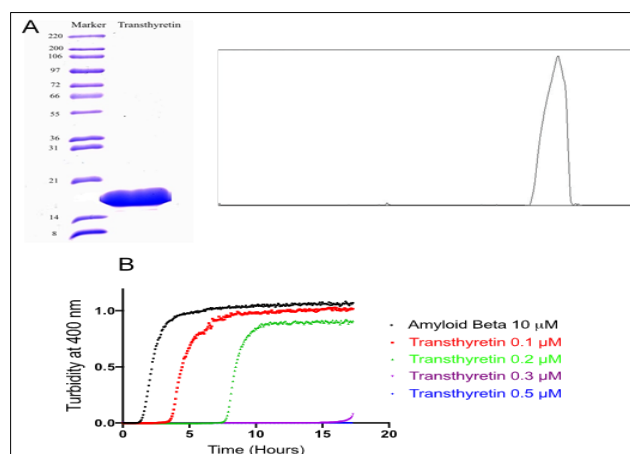
$$\text{Surface Hydrophobicity Index} = \frac{F_{max}}{[\text{Protein}] \times K_d^{app}}$$

در این رابطه غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ثابت تفکیک نیز با واحد میکرومولار می‌باشد [۷، ۸].

۲-۵- بررسی ساختار دوم پروتئین به کمک دورنگ

نمایی دورانی در ناحیه دور (Far-UV CD)

دستگاه دورنگ نمایی دورانی در ناحیه دور برای آشکار ساختن جزئیات ساختار دوم استفاده شد [۹]. ثبت طیف‌های مربوطه با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریمتر (۲۱۵- AVIV) انجام شد. مطالعه ساختار دوم در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین قبل و پس از تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی انجام شد.



شکل ۲ نمایش ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) نمونه خالص شده پروتئین ترانسیتیرین انسانی. (A) ستون ۱ مربوط به پروتئین ترانسیتیرین انسانی خالص شده می‌باشد و شماره ۲ مربوط به مارکر است. نتایج مطالعه ژل به کمک نرم‌افزار ImageJ نشان دهنده خلوص ۹۹ درصدی پروتئین مورد نظر می‌باشد. تاثیر غلظت‌های مختلف پروتئین ترانسیتیرین انسانی روی سینتیک تجمع آمیلوئید بتا (B) القاء شده در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH برابر با ۷/۴. غلظت نهایی پروتئین به ترتیب بر روی شکل مشخص می‌باشد.

پروتئین ترانسیتیرین به دلیل داشتن خاصیت چاپرونی و میل اتصال به آمیلوئید بتا، امکان اتصال هسته‌های آمیلوئیدی به همدیگر را کاهش داده، که این مرحله، تعیین کننده سرعت فرایند تجمع می‌باشد و به دلیل اتصال ترانسیتیرین به آمیلوئید بتا مانع تجمع بین هسته‌ها (مونومر) پروتئین آمیلوئید بتا شده و این فرایند باعث کند شدن سرعت تجمع می‌شود.

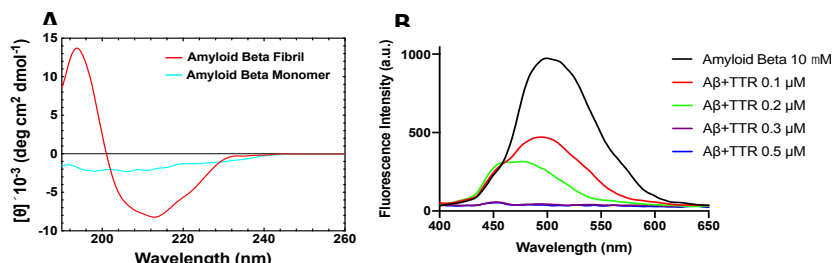
۳-۳ بررسی تغییرات نشر فلورئورسانس تیوفلاوین تی^۳

تیوفلاوین تی یکی از رنگ‌های متداول برای شناسایی آمیلوئید می‌باشد. از طریق دنبال کردن تغییرات نشر فلورئورسانس تیوفلاوین تی می‌توان تغییرات ساختاری پروتئین را تا حدی بررسی کرد. برای این کار، با قرار دادن سل حاوی آمیلوئید بتا به تنهایی و در حضور غلظت‌های مختلف پروتئین ترانسیتیرین و با اضافه کردن تیوفلاوین تی، طیف نشری تیوفلاوین در بازه ۶۶۰-۴۲۰ نانومتر ثبت شد. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌کنید با تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی نشر فلورئورسانس تیوفلاوین تی افزایش پیدا می‌کند. با تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی، مولکول‌های تیوفلاوین تی در بین رشته‌های بتا قرار می‌گیرند. با قرار گرفتن مولکول‌های تیوفلاوین تی در بین رشته‌های بتا حلقه‌های آروماتیک این مولکول‌ها قادر به چرخش نیستند و نشر فلورئورسانس آنها افزایش پیدا می‌کند [۱۰، ۱۱]. این نتایج با مشاهدات کدورت سنجی مطابقت دارد و این احتمال را تقویت می‌کند که این افزایش جذب به دلیل افزایش شکل‌گیری ساختارهای β -sheet (فیبریل) در پروتئین آمیلوئید بتا نسبت به پروتئین طبیعی می‌باشد (شکل ۳) و احتمالاً نوع تجمعات تشکیل شده در پروتئین آمیلوئید بتا از نوع آمیلوئید باشد. برای اطمینان از افزایش ساختارهای صفحات بتا طیف سنجی دورنگ نمایشی دورانی دور (Far-UV CD) پروتئین آمیلوئید بتا به صورت مونومر و در حالت فیبریل گرفته

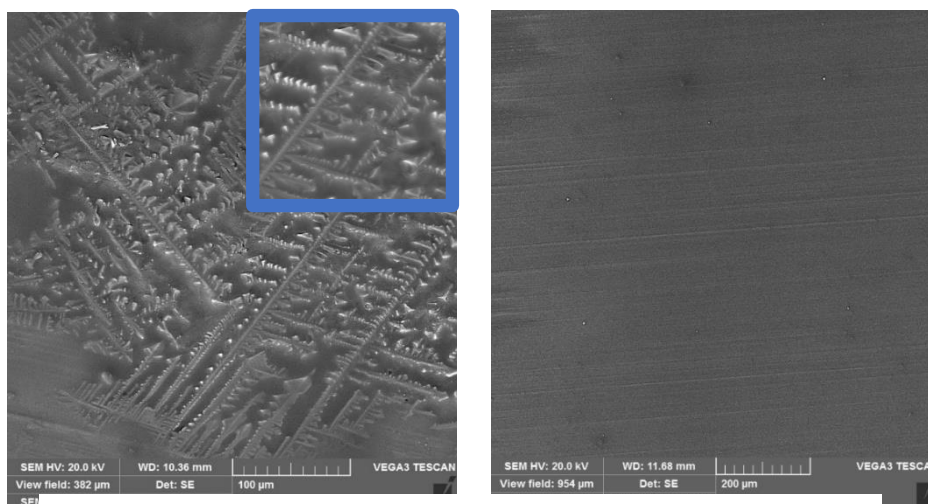
همچنان که شکل ۲ نشان می‌دهد، مدت زمان فاز تاخیری در غلظت‌های بیشتر ترانسیتیرین نسبتاً طولانی است و بصورت مستقیم با غلظت اولیه‌ی پروتئین متناسب است. یعنی هرچه غلظت پروتئین ترانسیتیرین بالا برود مدت زمان فاز تاخیر افزایش می‌یابد. در ضمن باید توجه داشت که وجود مرحله تشکیل هسته اولیه (nucleation) و طویل سازی ممکن است یکی از دلایل پدیدار شدن فاز تاخیری روی منحنی‌های سینتیکی تجمع باشد. همانطور که در شکل کدورت سنجی مشاهده می‌شود (شکل ۱ قسمت B)، این مسئله نشان دهنده این است که مرحله تعیین کننده سرعت فرایند تجمع، مرحله طویل‌سازی می‌باشد. فرایند تجمع و تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی همانطور که در شکل مشاهده می‌شود در عدم حضور ترانسیتیرین نسبت به حضور این پروتئین افزایش چشمگیری داشته است، از طرفی با افزایش غلظت پروتئین ترانسیتیرین زمان لازم برای تجمع افزایش یافته است، به این معنا در حضور پروتئین ترانسیتیرین در غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ میکرومولار تجمع مشاهده نشد اما در غلظت‌هایی پایین‌تر از این پروتئین در زمان‌های مختلف تجمع مشاهده شد. از لحاظ زمانی همانطور که مشخص است، در پروتئین آمیلوئید بتا در عدم حضور پروتئین ترانسیتیرین برای رسیدن به مرحله تعادل ۱۸۰ الی ۲۰۰ دقیقه لازم است، اما در حضور پروتئین ترانسیتیرین با غلظت ۰/۱ میکرومولار به ۳۲۰ الی ۳۵۰ دقیقه زمان نیاز است و در حضور غلظت ۰/۲ میکرومولار این چاپرون، به بیشتر از ۶۰۰ دقیقه زمان نیاز می‌باشد و در غلظت ۰/۳ میکرومولار ترانسیتیرین بعد از گذشت تقریباً ۱۷ ساعت تاخیر پروتئین شروع به تجمع می‌کند و در غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ میکرومولار ترانسیتیرین حتی پس از گذشت ۲۰ ساعت هیچگونه تجمعی مشاهده نمی‌شود. برای کاهش این تجمعات می‌توان این طور فرض کرد، که

³ Thioflavin T

شد. همانطور که در شکل ۳A دیده می‌شود، افزایش سیگنال در محدوده ۱۹۰ نانومتر و وجود پیک منفی در پروتئین فیبریل شده آمیلوئید بتا می‌باشد.



شکل ۳ نتایج طیف سنجی دورنگ نمایی دور (CD-Far) مربوط به پروتئین آمیلوئید بتا (A)، در حالت مونومر و پس از تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی که نشان دهنده تشکیل ساختار دوم صفحات بتا در حالت فیبریلی این پروتئین می‌باشد. تست تیوفلاوین تی برای تشخیص تشکیل آمیلوئید در پروتئین بتا و اثر پروتئین ترانسیتیرین انسانی در مهار تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی (B). غلظت پروتئین در شکل مشخص می‌باشد و غلظت تیوفلاوین تی ۲۰ میکرومولار می‌باشد.



آمیلوئید بتا (۱۰ میکرومولار)

آمیلوئید بتا در حضور ترانسیتیرین (۰/۵ میکرومولار)

شکل ۴ تصاویر تهیه شده به کمک میکروسکوپ الکترونی نگاره از پروتئین آمیلوئید بتای انسانی با غلظت ۱۰ میکرومولار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH برابر با ۷/۴ در سمت چپ و پروتئین آمیلوئید بتای انسانی با همان شرایط در حضور پروتئین ترانسیتیرین انسانی با غلظت ۰/۵ میکرومولار در سمت راست.

بتای انسانی و اثر مهار تشکیل فیبریل‌ها در حضور پروتئین ترانسیتیرین انسانی از میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده شد. همانطور که در شکل ۴ مشخص است، تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی پروتئین بتا به

۳-۴ نتایج میکروسکوپ الکترونی گذاره

با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره یا SEM^۴ می‌توان جسمی به اندازه چند انگستروم را مشاهده کرد. به همین دلیل برای مشاهده فیبریل‌های آمیلوئیدی در آمیلوئید

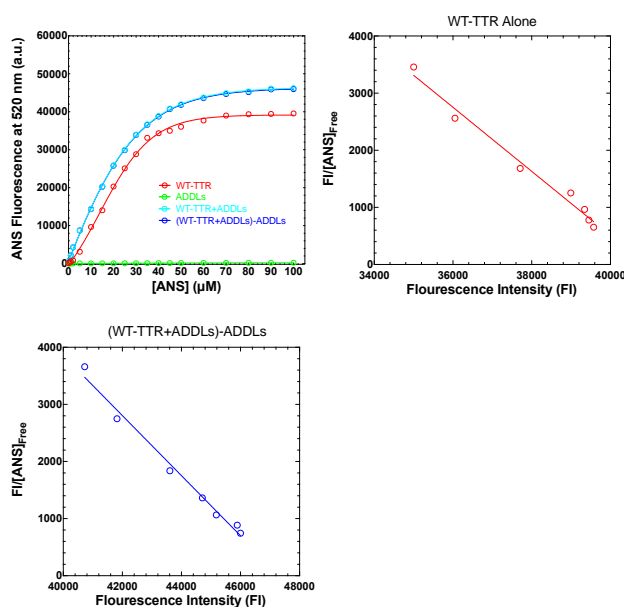
⁴ Scanning Electron Microscopy

نشانه‌گر مناسب، امکان به دست آوردن مقدار تخمینی PSH، وجود دارد. با انجام آز مایش تیتراسیون پروتئین های ترانستیرتین و آمیلوئید بتا با غلظت های افزایش یابنده ANS نشان می دهد که میزان اتصال نشانه‌گر به پروتئین ترانستیرتین با اتصال تغییر کرده و افزایش می یابد (شکل ۵). رسم نمودار اسکاچارد برای بیان کمی میزان آگریزی سطحی پروتئین (PSH) حاکی از افزایش میزان هیدروفوبیسیته ترانستیرتین ۷۶۴۷۰ پس از اتصال به فرم های اولیگومری آمیلوئید بتا ۸۲۹۴۰ را دارند. نتایج ارائه شده در این پژوهش بینشی در مورد طبیعت و میانکنش های درگیر در مراحل اولیه تشکیل فیبریل در پروتئین آمیلوئید بتا و نحوه میانکنش آن با ترانستیرتین فراهم می کند. نتایج نشان داد که احتمالاً میانکنش های هیدروفوبیسیته در اتصال مورد مطالعه نقش دارد. با توجه به شباهت سیستم های تشکیل آمیلوئید، یافته های توصیف شده می تواند درک عمیق تری از آسیب شناسی بیماری های آمیلوئیدی ایجاد کند.

و سیله میکرو سکوپ نگاره اثبات شد. همچنین، نتایج در شکل ۴ نشان می دهد که در حضور غلظت ۰/۵ میکرومولار ترانستیرتین انسانی فیبریل های آمیلوئیدی پروتئین آمیلوئید بتای انسانی تشکیل نشده است.

۳-۵ اندازه گیری آگریزی سطحی پروتئین ترانستیرتین در حضور و عدم حضور پروتئین آمیلوئید بتا

برخی از محققان تلاش کرده اند که اهمیت هیدروفوبیسیته سطحی (PSH^۵) در تشکیل فیبریل های آمیلوئید و یا عملکرد چاپرون ها را با استفاده از نشانه‌گر حساس به قطبیت ANS^۶ نشان دهند [۱۳ و ۱۲]. برای بررسی احتمال تغییر الگوی هیدروفوبیسیته ی سطحی پروتئین ترانستیرتین متصل شده به آمیلوئید بتا نسبت به پروتئین طبیعی، فلورئورسانس ANS این دو مقایسه شد. مشاهده باز آرایی گروه های هیدروفوب سطحی پروتئین می تواند به ما در درک میانکنش های موجود در تشکیل فیبریل های آمیلوئیدی و یا مهار آنها کمک کند. با استفاده از یک



شکل ۵ نمودار تیتراسیون پروتئین های ترانستیرتین و آمیلوئید بتای انسانی (A) و نمودار اسکاچارد اتصال ANS به پروتئین ترانستیرتین انسانی (B) و پروتئین ترانستیرتین انسانی در حضور آمیلوئید بتا (C).

⁶ 8-Anilinonaphthalene-1-sulfonic acid

⁵ Protein surface hydrophobicity

۴- نتیجه‌گیری و بحث

مراحل تشکیل رشته‌ها از الگوی خاصی پیروی می‌کند. با استفاده از تکنیک‌های مختلف اسپکتروسکوپی، میکروسکوپی و ترکیباتی که اختصاصاً به رشته‌ها متصل می‌شوند، می‌توان روند تغییرات را مشخص کرد. سینتیک معمول تشکیل آمیلوئید شامل سه مرحله است مرحله اولیه وابسته به هسته‌زایی است که مرحله‌ای حساس و محدود کننده در فرایند تشکیل آمیلوئید است و از نظر ترمودینامیکی غیر مناسب می‌باشد. وابستگی سینتیک تجمع به هسته‌زایی، با پیدایش فاز تاخیری ظاهری در روند تجمع تشخیص داده می‌شود و طولانی شدن این پدیده موجب افزایش فاز تاخیری می‌شود. همچنین، حذف فاز تاخیری پس از اضافه کردن یک هسته اولیه (رشته‌های از قبل شکل گرفته)، می‌تواند اثبات کننده مرحله هسته‌زایی در تجمع باشد. مرحله بعدی، مرحله طویل شدن و افزایش اندازه رشته است. این مرحله سریع ترین مرحله می‌باشد و ساختارهای رشته‌ی با سرعت تشکیل می‌شوند و میزان فلئورسانس و جذب شناساگرهایی مانند تیوفلاوین تی و گنکور رد به شدت تغییر می‌کند. مرحله نهایی فاز تعادلی است که معمولاً میزان فلئورسانس یا جذب شناساگرهای مخصوص آمیلوئید تغییر شدیدی ندارند و سیستم از نظر ظاهری حالت ایستایی دارد [۱۴]. اما محققان نشان داده‌اند که رشته‌ها در این حالت نیز فعال بوده و مونومرها در آنها تبادل می‌شوند، همچنین میان‌کنش‌های جانبی بین رشته‌ها و ایجاد رشته‌های بالغ و ضخیم صورت می‌گیرد [۹]. سازوکار دقیق چگونگی ایجاد بیماری‌های آمیلوئیدی به طور کامل مشخص نشده است. در برخی از موارد ممکن است ر سوبات پروتئینی باعث ایجاد بیماری با شد و این بیماری‌ها فعالیت‌های روزمره زندگی انسان را مختل می‌کند. اگرچه فرد هنوز هم ممکن است بتواند به‌طور مستقل

زندگی کند، اما این عوارض کم کم از اختلالات شناختی و غیر شناختی شروع شده و سرانجام فرد دیگر قادر نیست به‌طور مستقل به زندگی ادامه دهد و سرانجام از دنیا می‌رود [۱۵].

در سال ۱۹۹۳ میلادی، نشان داده شد که تشکیل فیبریل $A\beta$ پس از انکوبا سیون با مایع مغزی-نخاعی (CSF) فرد سالم مهار می‌شود. چندین پروتئین به‌عنوان حامل $A\beta$ تعیین شد، محققان نتیجه گرفتند که TTR پروتئین اصلی است که می‌تواند آمیلوئید بتا را در CSF حذف کند. این اولین شواهد مربوط به حضور TTR در بیماری آلزایمر بود و نشان داد که این پروتئین‌های خارج سلولی به‌طور معمول تولید $A\beta$ را متوقف می‌کنند، در نتیجه از تشکیل آمیلوئید و سمیت آن جلوگیری می‌کند [۱۶]. با توجه به خصوصیات اتصال آمیلوئید بتا به ترانستیرین نشان دادند که TTR قادر است با مونومرهای محلول $A\beta$ ، و همچنین الیگومرها و فیبریل‌ها، با تمایل اتصال مشابه تعامل داشته باشد. علاوه بر خنثی کردن سمیت $A\beta$ ، TTR مانع از الیگومریزاسیون می‌شود و تخریب فیبریل‌ها را افزایش می‌دهد. داده‌های اخیر نشان می‌دهد که TTR با هدایت هسته‌های الیگومری به تجمعات غیر آمیلوئیدی با $A\beta$ تداخل دارد، احتمالاً بر میزان پاکسازی و بر اجتماعات مجموعه $A\beta$ سیتوتوکسیک تأثیر می‌گذارد. اخیراً، قدمی و همکارانش نشان دادند که با اتصال TTR به الیگومرهای $A\beta$ ، نقش محافظتی خود را اعمال می‌کند و در نتیجه از فرایندهای هسته‌زایی اولیه و ثانویه جلوگیری می‌کند و در نتیجه باعث مهار سمیت الیگومرهای $A\beta$ و جلوگیری از رشد فیبریل می‌شود، اما مکانیسم آن به‌طور کامل مشخص نشده است. مشخص شد که هر دو فرم تترامر (WT-TTR) و مونومر ترانستیرین (M-TTR) مراحل خاصی از فرایند تشکیل فیبریل $A\beta$ را که هسته اولیه و ثانویه هستند مهار می‌کنند، بدون این که بر طول

⁷ Cerebrospinal fluid

فیبریل‌های حاصله تأثیر بگذارد. علاوه بر این، آنالیزها نشان می‌دهد که هر دو $M-TTR$ و $WT-TTR$ به الیگومرهای $A\beta$ در واکنش‌های تجمعی متصل می‌شوند و مانع از تبدیل فیبریل‌های کوتاه که توانایی طولانی شدن دارند می‌شوند. با استفاده از روش‌های بیوفیزیکی، مشخص شد که TTR برخی از جنبه‌های ساختار کلی خود را در پی چنین اینترکشن‌هایی با الیگومرهای $A\beta$ و همچنین با الیگومرهای $A\beta$ تغییر می‌دهد، در حالی که توپولوژی کلی خود را حفظ می‌کند. بنابراین، به احتمال زیاد مکانیسم غالب که TTR نقش محافظتی خود را ایفا می‌کند، در اتصال TTR به الیگومرهای $A\beta$ و در مهار فرایندهای هسته‌زایی اولیه و ثانویه است، که هم سمیت الیگومرهای $A\beta$ و هم توانایی تکثیر فیبریل‌ها را محدود می‌کند به تغییرات ساختار سوم ارتباط پیدا می‌کند و ساختار دوم پروتئین ترانستیرین تغییر محسوبی پیدا نمی‌کند. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نیز نشان می‌دهد که اتصال آمیلوئید بتا به پروتئین ترانستیرین میزان هیدروفوبیسیته ترانستیرین را افزایش داده و تغییرات ساختاری را در پروتئین ترانستیرین ایجاد کرده است که باعث اتصال ANS بیشتر به نقاط هیدروفوب و افزایش میزان هیدروفوبیسته آن شده است [۵، ۱۷-۱۹].

همچنین، تأثیر جهش‌های TTR در اتصال TTR به $A\beta$ نیز بررسی شده است. محققان تقریباً ۴۰ نوع TTR جهش یافته آمیلوئیدوزنیک/غیر آمیلوئیدوزنیک نو ترکیب را سنتز کردند و با استفاده از چندین تکنیک آزمایشگاهی، آنها توانستند نشان دهند که واریانت‌های TTR به‌طور متفاوت به $A\beta$ متصل می‌شوند. واریانت‌های ترانستیرین $E42G$ و $L55P$ انواع آمیلوئیدوزنیک قوی، تنها چندتایی از آنها بودند که کاملاً به پپتید متصل نشدند. کوستا و همکارانش از انواع TTR آمیلوئیدوزنیک و غیر آمیلوئیدوزنیک استفاده کردند و مشخصات زیر را برای قدرت تعامل انواع TTR با پپتید $A\beta$ محلول به‌دست آوردند: $T119M > WT >$

آمیلوئیدوزنیک TTR بیشتر باشد، تعامل با پپتید بتا ضعیف تر است. از آنجایی که، پتانسیل آمیلوئیدوزنیک TTR با پایداری تترامر آن ارتباط منفی دارد، این نتایج همچنین نشان می‌دهد که هر چه پایداری TTR پایین‌تر باشد، برهمکنش $TTR/A\beta$ ضعیف‌تر است. علاوه بر این، واریانت $L55P TTR$ همچنین نمی‌تواند از سمیت $A\beta$ را در محیط کشت جلوگیری کند، و تأیید می‌کند که یکی از اهداف تعامل $TTR/A\beta$ جلوگیری از اثرات سمی و مضر پپتید است [۲۰-۲۲]. این مشاهدات همچنین نشان می‌دهد که گونه TTR مورد نیاز برای این تعامل، تترامر است. در حمایت از این ایده، نشان داده شده است که پایداری ژنتیکی TTR از طریق وجود آلل $T119M$ که یک تترامر پایدارتر است، با کاهش خطر بیماری‌های عروق مغزی و افزایش امید به زندگی در مجامع عمومی همراه است، که اهمیت بیشتر تترامر TTR در فعالیت بیولوژیکی پروتئین را نشان می‌دهد. فرایند تجمع بسیار پیچیده است و به همین دلیل، روشن شدن مکانیزم تجمع $A\beta$ بسیار چالش برانگیز است. در سال‌های اخیر، جامعه علمی بر روی رویکردهای جنبشی برای شناسایی مکانیزم‌ها در سطح مولکولی این اثرات چارپون تمرکز کرده است، سعی در شناسایی گونه‌های مورد هدف چارپون‌ها و روشن ساختن مراحل مهار شده در سطح میکروسکوپی دارد. بنابراین، درک فرایند تجمع یک گام مهم در جهت درمان و تشخیص بیماری است.

مطالعات *in vitro* و *in vivo* نشان می‌دهد، که تعامل مستقیم بین TTR و $A\beta$ پپتید وجود دارد که منجر به مهار تجمع $A\beta$ ، تخریب فیبریلی یا هر دو می‌شود، بنابراین از این نظر TTR یک پروتئین حامل است در سال‌های گذشته، مطالعات مختلفی نشان می‌دهد که گونه‌های الیگومری $A\beta$ که در اثر فرایند تجمع تشکیل شده‌اند، سمی‌تر از فیبریل‌های بالغ هستند. چندین مطالعه نشان

Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics 1698, 131-153.

[10] M. R. Krebs, E. H. Bromley, and A. M. Donald. (2005) The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications, *Journal of structural biology* 149, 30-37.

[11] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S. A. Carter, V. Krishna, R. K. Grover, R. Roy, and S. Singh. (2005) Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils, *Journal of structural biology* 151, 229-238.

[12] N. Rezaei-Ghaleh, H. Ramshini, A. Ebrahim-Habibi, A. A. Moosavi-Movahedi, and M. Nemat-Gorgani. (2008) Thermal aggregation of α -chymotrypsin: role of hydrophobic and electrostatic interactions, *Biophysical chemistry* 132, 23-32.

[13] S. S. Shahangian, B. Rasti, R. H. Sajedi, R. Khodarahmi, M. Taghdir, and B. Ranjbar. (2011) Artemin as an Efficient Molecular Chaperone, *The Protein Journal* 30, 549-557.

[14] M. R. Nilsson. (2004) Techniques to study amyloid fibril formation in vitro, *Methods* 34, 151-160.

[15] A. M. Landes, S. D. Sperry, M. E. Strauss, and D. S. Geldmacher. (2001) Apathy in Alzheimer's disease, *Journal of the American Geriatrics Society* 49, 1700-1707.

[16] J. Serot, D. Christmann, T. Dubost, and M. Couturier. (1997) Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 63, 506-508.

[17] D. Jazaj, S. A. Ghadami, F. Bemporad, and F. Chiti. (2019) Probing conformational changes of monomeric transthyretin with second derivative fluorescence, *Sci Rep* 9, 10988.

[18] S. A. Ghadami, F. Bemporad, B. M. Sala, G. Tiana, S. Ricagno, and F. Chiti. (2017) FRET studies of various conformational states adopted by transthyretin, *Cell Mol Life Sci* 74, 3577-3598.

[19] S. Conti, X. Li, S. Gianni, S. A. Ghadami, J. Buxbaum, C. Cecchi, F. Chiti, and F. Bemporad. (2014) A complex equilibrium among partially unfolded conformations in monomeric transthyretin, *Biochemistry* 53, 4381-4392.

[20] M. J. Saraiva. (1995) Transthyretin mutations in health and disease, *Hum Mutat* 5, 191-196.

[21] C. A. Ribeiro, M. J. Saraiva, and I. Cardoso. (2012) Stability of the transthyretin molecule as a key factor in the interaction with a-beta peptide-relevance in Alzheimer's disease.

[22] M. Vieira, and M. J. Saraiva. (2014) Transthyretin: a multifaceted protein, *Biomolecular concepts* 5, 45-54.

داده است که چنین واسطه الیگومری نیز ممکن است

توسط ایترکشن با پروتئین‌های مولکولی چاپرون تعدیل

شود. این چاپرون‌های مولکولی می‌توانند عوامل درمانی

باشند که چنین گونه‌های سمی را مورد هدف قرار می

دهند و یک هدف درمانی هیجان انگیز در بیماری‌های

نورودژنرتیو هستند.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

۵- منابع

[1] M. A. Liz, T. Coelho, V. Bellotti, M. I. Fernandez-Arias, P. Mallaina, and L. Obici. (2020) A Narrative Review of the Role of Transthyretin in Health and Disease, *Neurol Ther* 9, 395-402.

[2] M. Vieira, and M. J. Saraiva. (2014) Transthyretin: a multifaceted protein, *Biomol Concepts* 5, 45-54.

[3] T. Giao, J. Saavedra, E. Cotrina, J. Quintana, J. Llop, G. Arsequell, and I. Cardoso. (2020) Undiscovered Roles for Transthyretin: From a Transporter Protein to a New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease, *Int J Mol Sci* 21.

[4] R. Costa, F. Ferreira-da-Silva, M. J. Saraiva, and I. Cardoso. (2008) Transthyretin protects against A-beta peptide toxicity by proteolytic cleavage of the peptide: a mechanism sensitive to the Kunitz protease inhibitor, *PLoS One* 3, e2899.

[5] S. A. Ghadami, S. Chia, F. S. Ruggeri, G. Meisl, F. Bemporad, J. Habchi, R. Cascella, C. M. Dobson, M. Vendruscolo, T. P. J. Knowles, and F. Chiti. (2020) Transthyretin Inhibits Primary and Secondary Nucleations of Amyloid-beta Peptide Aggregation and Reduces the Toxicity of Its Oligomers, *Biomacromolecules* 21, 1112-1125.

[6] S. A. Ghadami, F. Bemporad, B. M. Sala, G. Tiana, S. Ricagno, and F. Chiti. (2017) FRET studies of various conformational states adopted by transthyretin, *Cellular and Molecular Life Sciences* 74, 3577-3598.

[7] M. Cardamone, and N. K. Puri. (1992) Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins, *Biochem J* 282 (Pt 2), 589-593.

[8] M. Möller, and A. Denicola. (2002) Study of protein-ligand binding by fluorescence, *Biochemistry and Molecular Biology Education* 30, 309-312.

[9] V. N. Uversky, and A. L. Fink. (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded, *Biochimica et*

Effect of amyloid-beta oligomers on surface hydrophobicity of human transthyretin protein

Seyyed Abolghasem Ghadami*

Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

a.ghadami@alzahra.ac.ir

Receipt: 2022/04/03

Accepted: 2022/11/21

Abstract

Transthyretin (TTR) is a highly conserved 55 kDa homotetrameric protein that exists in several vertebrate species including humans, bacteria, nematodes, and plants. Previous studies have shown a direct interaction between TTR and amyloid beta (A β) (the causative agent of Alzheimer's disease), which leads to the inhibition of A β aggregation, fibrillar destruction, or both. In recent years, evidence has shown that the oligomeric species of A β formed by the aggregation process are more toxic than mature fibrils. Studies have shown that such an oligomeric mediator is modulated by interaction with TTR. However, the exact mechanism of binding of A β to TTR has not yet been determined. In this study, after the purification of human transthyretin protein, the inhibitory effects of TTR on the formation of A β were shown in different ways, and finally, the role of hydrophobicity interactions in the chaperone activity of TTR was investigated with the help of protein surface hydrophobicity (PSH) measurement studies. The Scatchard diagram for quantitative measurement of PSH indicates an increase in the hydrophobicity of TTR after binding to oligomeric forms of A β . The results presented in this research provide insight into the nature and interactions involved in the initial stages of fibril formation in A β and its interaction with TTR. The results showed that hydrophobic interactions probably play a role in the binding between TTR and A β . Considering the similarity of amyloid formation systems, the described findings of this study can provide a deeper understanding of the pathology of amyloid diseases.

Keywords: Neurodegenerative diseases, transthyretin, amyloid fibrils, amyloid beta