



Analyzing Structure, Chaperone Activity and Aggregation of Human α B-Crystallin in the Presence of Copper Ions and Glutathione

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Gorjizadeh N.¹ MSc,
Shahsavani M.¹ MSc,
Moosavi-Movahedi F.² MSc,
Yousefi R.^{*1} PhD

How to cite this article

Gorjizadeh N, Shahsavani M, Moosavi-Movahedi F, Yousefi R. Analyzing Structure, Chaperone Activity and Aggregation of Human α B-Crystallin in the Presence of Copper Ions and Glutathione. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(2):155-166.

ABSTRACT

The lenticular levels of copper ions significantly enhance in diabetic patients, aged and cataractous lenses. In eye lenses, the free copper ions induce ascorbic acid auto-oxidation, leading to formation of dehydroascorbic acid and other oxidative products as well as reactive oxygen species. The oxidized forms of ascorbic acid along with the reducing sugars enter into pathological reactions with the eye lens proteins, forming toxic advanced glycation end-products (AGEs). As one of the main components of eye lens antioxidant defense mechanism, glutathione could scavenge the copper ions, inhibiting the formation of reactive oxygen species in eye lenses. In the current study, the structural and functional properties of human α B-crystallin were assessed using different spectroscopic methods in the presence of copper ions and glutathione. In the presence of copper ions, α B-crystallin exhibited important alterations in both structure and chaperone activity which upturned in the presence of glutathione. Moreover, incubation of human α B-crystallin with copper resulted in a significant increase in the protein oligomeric size distribution which largely prevented upon simultaneous incubation with glutathione. Overall, glutathione may scavenge free copper ions in the lenticular tissue, inhibiting their damaging effects on crystallin proteins and other redox-sensitive molecular targets such as ascorbic acid. The results may introduce a new protective role for glutathione which is highly important in diabetic and aged lenses showing increased levels of copper ions.

Keywords α B-Crystallin; Chaperone Activity; Copper Ions; Glutathione; Ascorbic Acid

CITATION LINKS

[1] Genetics ... [2] Alpha... [3] Crystallins in the eye ... [4] Global data on ... [5] Protein misfolding and aggregation in cataract ... [6] Age-related changes in human lens ... [7] Differential phosphorylation ... [8] Cataract-associated ... [9] Protein-protein ... [10] Ageing and vision: Structure, stability and function of lens ... [11] The ageing lens and cataract ... [12] Evolution of crystallins ... [13] Estimation of the secondary structure and ... [14] Effects of temperature and concentration on bovine lens α -crystallin secondary structure: A circular dichroism ... [15] Temperature-dependent chaperone activity and structural ... [16] Genealogy of the α -crystallin-small heat-shock ... [17] Chaperone-like activity ... [18] Structure and mechanism of protein stability sensors ... [19] Selective Cu²⁺ binding ... [20] α B subunit of ... [21] Lens α -crystallin ... [22] Structure and function ... [23] Small heat-shock ... [24] The small heat shock ... [25] Chaperone-like ... [26] Effects of divalent ... [27] Zn²⁺ enhances the molecular ... [28] Interaction of α -crystallin ... [29] Identification and ... [30] Pathophysiology of cataracts ... [31] Antioxidant capacity of ... [32] Oxidative stress and ... [33] The role of ascorbic ... [34] Transition metal-catalyzed ... [35] Binding of γ -crystallin ... [36] Activation of metallothioneins ... [37] Glutathione: A vital ... [38] Viewing molecular mechanisms ... [39] Redox regulation ... [40] Evaluation of structure ... [41] Mimicking phosphorylation ... [42] How to study proteins ... [43] The impact of different mutations ... [44] Clinical detection of precatactous ... [45] Antiaggregation activity of ... [46] Gel electrophoresis of ... [47] SDS polyacrylamide ... [48] Cleavage of structural ... [49] Partition chromatography ... [50] A rapid and sensitive method ... [51] Student's t-tests international ... [52] Effect of long-term ... [53] Diabetic cataract-pathogenesis ... [54] Age and smoking related ... [55] On the cytotoxicity of vitamin ... [56] The major chromophore ... [57] Activation of protein-bound ... [58] Altered metabolism of copper ... [59] Vitamin C degradation ... [60] Isolation and characterization ... [61] Targeting the receptor ... [62] Comprehensive analysis of ... [63] Effects of copper ions on ... [64] The role of glutathione in ... [65] Copper(I) transfer into ... [66] The copper(II)-catalyzed ... [67] Structural and mechanistic ... [68] Crystal structure of R120G ... [69] Identification of histidine

¹Biology Department, Sciences Faculty, Shiraz University, Shiraz, Iran

²Institute of Biochemistry & Biophysics (IBB), University of Tehran, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Biology Department, Sciences Faculty, Shiraz University, Jomhuri-e Eslami Boulevard, Shiraz, Iran

Phone: +98 (71) 36137617

Fax: -

ryousefi@shirazu.ac.ir

Article History

Received: November 4, 2019

Accepted: December 11, 2019

ePublished: June 10, 2020

مطالعه ساختار، اولیگومریزاسیون و فعالیت چاپرونی آلفا-B کریستالین نوترکیب انسانی در حضور یون‌های مس و آنتی‌اکسیدان گلوکاتایون

نوشین گرجی‌زاده MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

محمدباقر شاهسونی MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

فائزه موسوی‌موحدی MSc

مرکز تحقیقات بیوشیمی- یوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

رضا یوسفی* PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

چکیده

غلظت یون مس در لنز بیماران دیابتی، افراد مسن و بیماران مبتلا به آب مروارید به میزان چشمگیری افزایش می‌یابد. آسکوربیک‌اسید که غلظت بالایی در لنز چشم دارد، در حضور یون‌های مس اکسید می‌شود و هم‌زمان با این فرآیند اکسایشی رادیکال آزاد در محیط تولید می‌شود. محصولات اکسایشی آسکوربیک‌اسید به همراه قندهای احیاکننده با پروتئین‌های لنز برای ایجاد ترکیبات سمی که در کدورت لنز و بروز بیماری آب مروارید نقش مهمی دارند، واکنش می‌دهند. از طرفی مولکول تیولی گلوکاتایون که یکی از اجزای اصلی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی لنز است با یون مس کمپلکس ایجاد می‌کند و به این ترتیب مانع از تولید گونه‌های فعال اکسیژنی می‌شود. در مطالعه حاضر، ساختار و عملکرد پروتئین آلفا-B کریستالین نوترکیب انسانی در حضور یون‌های مس و گلوکاتایون به روش‌های مختلف اسپکتروسکوپی مطالعه شد. نتایج نشان داد که مس ضمن اتصال به آلفا-B کریستالین تغییرات مهمی در ساختار آن ایجاد می‌کند که به افزایش شعاع هیدرودینامیکی و نیز افزایش فعالیت چاپرونی آن می‌انجامد. براساس نتایج این مطالعه، تغییرات ساختاری و عملکردی که به وسیله یون‌های مس در آلفا-B کریستالین القا می‌شود به میزان قابل توجهی در حضور گلوکاتایون جلوگیری می‌شود. بنابراین گلوکاتایون با اتصال به یون مس در بافت عدسی از اثرات تخریبی آن جلوگیری می‌کند. از این رو نتایج مطالعه حاضر علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، نقش حفاظتی جدیدی را برای گلوکاتایون معرفی کرده که این وظیفه در لنزهای افراد دیابتی و مسن با غلظت بالای مس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

کلیدواژه‌ها: آلفا-B کریستالین، فعالیت چاپرونی، یون مس، گلوکاتایون، آسکوربیک‌اسید

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۲۰

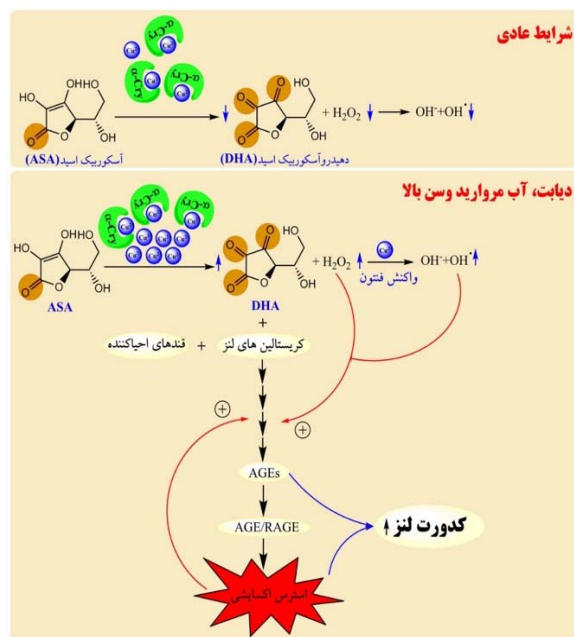
*نویسنده مسئول: ryousefi@shirazu.ac.ir

مقدمه

کریستالین‌های آلفا، بتا و گاما حدود ۹۰٪ پروتئین‌های محلول لنز چشم مهره‌داران را تشکیل می‌دهند[1]. در حالی که کریستالین‌های بتا و گاما اساساً وظایف ساختاری دارند، کریستالین آلفا با فعالیت چاپرونی خود نقش مهمی در جلوگیری از رسوب دیگر پروتئین‌های واسرشته در لنز و حفظ شفافیت این اندام مهم بینایی در طول زندگی ایفا می‌کند[1,2]. همچنین این چاپرون در حفاظت و بازآرایی اسکلت سلولی، مقاومت در برابر استرس و مهار مرگ برنامه‌ریزی‌شده

سلولی نیز نقش مهمی دارد[3,4]. آب مروارید که مهم‌ترین عامل نابینایی در سراسر جهان و یکی از چالش‌های مهم بهداشت عمومی در قرن ۲۱ است، در اثر توده‌ای شدن پروتئین‌ها درون بافت لنز ایجاد می‌شود[4,5]. جهش‌های ژنتیکی و واکنش‌های شیمیایی پس از فرآیند ترجمه دو عامل مهم تغییرات ساختاری کریستالین‌ها و از عوامل ایجاد حدواسط‌های پروتئینی فاقد تاخوردگی مناسب با تمایل زیاد برای تشکیل توده‌های پروتئینی در لنز چشم هستند که در بروز عارضه آب مروارید و کوری نقش مهمی دارند[6-9]. پروتئین چاپرون آلفا کریستالین از دو زیرواحد آلفا-A و آلفا-B با وزن مولکولی حدود ۲۰ کیلودالتون تشکیل شده است که به ترتیب دارای ۱۷۳ و ۱۷۵ آمینواسید با ۵۷٪ همسانی هستند و به ترتیب به وسیله ژن‌های *CRYAA* و *CRYAB* بیان می‌شوند[10-12]. همچنین این دو زیرواحد پروتئینی آلفا کریستالین به صورت اولیگومرهایی با وزن مولکولی بین ۳۰۰ تا ۱۰۰۰ کیلودالتون سازمان‌دهی می‌شوند و با توجه به گونه و سن نسبت آنها از ۱ تا ۳ به ۱ تغییر می‌کند[10]. محتوای ساختار دوم این پروتئین‌ها نیز شامل حدود ۵ تا ۱۵٪ مارپیچ آلفا، ۴۰ تا ۵۰٪ صفحات بتا است و باقی‌مانده را پیچ‌ها و ساختارهای نامنظم تشکیل می‌دهند[13-15]. همچنین گزارش شده است که زیرواحدهای آلفا کریستالینی شبیه دیگر اعضای خانواده پروتئین‌های کوچک شوک گرمایی دارای یک دومین مرکزی موسوم به دومین آلفا کریستالینی حفاظت‌شده با طول حدود ۹۰ آمینواسید است که در آلفا کریستالین نقش اساسی در اتصال به یون‌های مس دارد، به طوری که این یون‌ها با ثابت اتصال حدود پیکومولار به این پروتئین متصل می‌شود[3-19]. در حالی که بیان زیرواحد آلفا-A کریستالینی اساساً به بافت لنز محدود است، آلفا-B کریستالین در بافت‌های متعددی نظیر لنز چشم، مغز، شبکیه، قلب، ماهیچه‌های اسکلتی و شش‌ها بیان می‌شود[20,21]. سطح بیان این پروتئین‌ها علاوه بر شوک گرمایی به وسیله استرس‌های دیگر نظیر استرس‌های اکسایشی، آسیب‌های ایسکمی و فلزات سنگین نیز بالا می‌رود و افزایش سطح بیان پروتئین‌های کوچک شوک گرمایی با برخی بیماری‌ها نظیر سرطان، بیماری‌های انحطاط سیستم عصبی، میوپاتی و آب مروارید مرتبط است[22-24]. ساختار و عملکرد پروتئین‌های لنز متاثر از برهم‌کنش با یون‌های فلزی نظیر مس، روی و کلسیم تغییر می‌کند[25-28]. اگرچه غلظت معمولی یون مس در لنز چشم افراد سالم حدود ۳ تا ۱۰ میکرومولار است، ولی غلظت آن در لنزهای افراد مبتلا به آب مروارید و افراد پیر و در بخش زجاجیه افراد دیابتی به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد[29]. همچنین مطالعات پیشین نشان داده است که غلظت خونی یون مس در برخی بیماری‌ها به‌ویژه دیابت به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد[30]. یون مس به‌عنوان کاتالیزور تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژنی عمل می‌کند و این پدیده نیز به نوبه خود به ایجاد استرس اکسایشی در لنز منجر می‌شود[30]. همچنین استرس اکسایشی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بروز بیماری‌های دژنراتیو از جمله آب مروارید مطرح است. افزایش غلظت یون مس، باعث کاهش

یون‌های مس پیشنهاد شده است^[11]. گلو تاتیون با غلظت ۲ تا ۴ میلی‌مولار به‌عنوان یکی از اجزای مولکولی اصلی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی لنز شناخته می‌شود^[37, 38]. اپی‌تلیوم لنز گلو تاتیون را به شکل احیایی می‌سازد و گلو تاتیون‌های اکسایش یافته (GSSG) به‌سرعت به وسیله آنزیم گلو تاتیون ردوکتاز و در حضور NADPH به گلو تاتیون احیا می‌شوند^[39]. هدف مطالعه حاضر نیز بررسی اثر حفاظتی احتمالی گلو تاتیون بر تغییرات ساختاری و عملکردی است که به وسیله یون‌های مس در آلفا کریستالین-B نو ترکیب انسانی القا می‌شود.



شکل ۱) نمای شماتیکی از آلفا کریستالین در مهار اکسایش آسکوربیک اسید به واسطه یون‌های مس و نقش این دو در ایجاد کدورت لنز چشم

مواد و روش‌ها

مواد

مواد استفاده شده شامل بیس‌اکریل آمید، کوماسی بلو G250، کوماسی بلو R250، دی‌سدیم هیدروژن فسفات (Na₂HPO₄)، سدیم دی‌هیدروژن فسفات (NaH₂PO₄)، تریس، سدیم دودسیل سولفات، ۱- آنیلینو-۸- نفتالین سولفونات (ANS)، از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. همچنین دی‌تیوتریتول، گلو تاتیون، کانامایسین، بتامرکاپتوتاتانول، ایزوپروپیل بتا-D-1-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) و TEMED از شرکت سیگما آلد ریچ ایالات متحده خریداری شد. آگار، عصاره مخمر و تریپتون از شرکت هایمدیا مربوط به کشور هند تهیه شدند.

روش‌ها

کشت باکتری حاوی ژن آلفا-B کریستالین

سویه باکتریایی *E. coli* BL21 (DE3) حاوی پلاسمید نو ترکیب PET28b⁺ که ژن آلفا-B کریستالین انسانی در آن کلون شده بود، در محیط کشت جامد LB (حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین) و در

فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، افزایش غلظت پراکسید هیدروژن، القای واکنش فنتون و تولید رادیکال آزاد می‌شود^[31, 32]. همچنین یون مس می‌تواند در تولید رادیکال‌های آزاد آسکوربیک اسید دخالت کند که این پدیده باعث مهار آنزیم‌های گلیکولیز و چرخه پنتوز فسفات می‌شود^[30]. آسکوربیک اسید یکی از اجزای اصلی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی لنز چشم است و در لنز بیماران آب مرواریدی همراه با افزایش قابل ملاحظه غلظت یون مس سطح این ترکیب آنتی‌اکسیدان نیز به میزان زیادی کاهش می‌یابد^[19, 33]. شرایط ذکر شده زمینه مساعدی برای بروز واکنش‌های پاتولوژیک بین قندها و پروتئین‌های کریستالینی و تشکیل ترکیبات سمی و هتروژنی موسوم به محصولات نهایی قندی شدن پیشرفته (AGEs) را می‌کند که به نوبه خود از عوامل مهم بروز آب مروارید محسوب می‌شود^[34]. از این رو بین آب مروارید و افزایش غلظت یون مس در لنز چشم ارتباط معنی‌داری گزارش شده است^[35]. تاثیر یون‌های فلزی به‌ویژه مس بر ساختار و فعالیت پروتئین‌های لنز به‌خصوص آلفا کریستالین تا حد زیادی هنوز ناشناخته مانده است. از طرفی تمایل آلفا کریستالین برای اتصال به یون مس و فعالیت احیایی این پروتئین ساز و کار دفاعی جدیدی ایجاد می‌کند که احتمالاً از سمیت غلظت‌های پاتولوژیک این فلز اکسایشگر در شرایط خاص به‌ویژه در عارضه دیابت می‌کاهد. اتصال این یون به آلفا کریستالین باعث القای تغییرات ساختاری، افزایش شعاع هیدرودینامیکی، افزایش پایداری در واسرشتگی شیمیایی و افزایش فعالیت چاپرونی این پروتئین می‌شود^[19, 33]. همچنین آلفا کریستالین از اکسایش آسکوربیک اسید (یکی از اجزای مهم سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی لنز) به واسطه یون مس جلوگیری و از این رو این چاپرون نقش مهمی در هوموستازی یون مس ایفا می‌کند. همچنین نشان داده شده است که سطح بیان آلفا کریستالین ضمن تیمار سلول‌های اپی‌تلیال لنز چشم با یون مس به میزان چشمگیری افزایش می‌یابد^[36]. با توجه به مطالب فوق، یون مس می‌تواند در لنز چشم نقش دوگانه‌ای داشته باشد، به‌طوری که در غلظت‌های فیزیولوژیک باعث افزایش فعالیت چاپرونی آلفا کریستالین می‌شود و به بهبود عملکرد لنز کمک می‌کند، ولی در غلظت‌های پاتولوژیک با تسریع روند اکسایش پروتئین‌ها، آسکوربیک اسید و دیگر مولکول‌های حساس به اکسایش و همچنین تسریع فرآیند تشکیل مولکول‌های سمی موسوم به AGEs در محیط اکسایشی که مسبب ایجاد آن است زمینه آسیب‌های جدی به لنز چشم را فراهم می‌کند (شکل ۱). از آنجایی که آلفا کریستالین می‌تواند با غلظت پیکومولار به یون‌های مس متصل شود، احتمالاً قادر به رفع کامل آسیب‌های ناشی از بالا رفتن غلظت یون‌های مس در محدوده‌های پاتولوژیک که به‌طور معمول در لنز افراد مسن و دیابتی دیده می‌شود، نیست.

اخیراً از بین مولکول‌های کوچک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی لنز چشم شامل ویتامین E، گلو تاتیون (GSH)، آسکوربیک اسید (ASA)، سیستئین و متیونین، برای گلو تاتیون قابلیت اتصال به

دمای 37°C کشت داده شد. سپس باکتری‌های حاوی ژن مورد نظر انتخاب و پس از تهیه پیش‌کشت در یک‌لیتر محیط کشت مایع LB کشت داده شدند [40].

بیان پروتئین‌های نوترکیب آلفا-B کریستالین

به‌منظور بیان پروتئین نوترکیب، یک کلنی از باکتری حاوی ژن پروتئین آلفا کریستالین انسانی به 10^8 میلی‌لیتر محیط کشت LB اضافه و سپس در دمای 37°C به مدت ۱۲ ساعت کشت داده شد. باکتری‌های کشت‌شده به یک‌لیتر محیط کشت مایع (حاوی 50 mg میکروگرم در لیتر کانامایسین) منتقل شدند. محیط کشت مایع در انکوباتور و در شرایط هوادهی مناسب انکوبه شد تا زمانی که چگالی نوری آن در طول موج 600 nm به 0.6% برسد. سپس برای بیان پروتئین نوترکیب، از ماده القاکننده IPTG با غلظت 0.25 mM میلی‌مولار استفاده شد و کشت باکتری‌ها به مدت ۱۶ ساعت ادامه یافت [40].

تخلیص پروتئین نوترکیب آلفا-B کریستالین

تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون تعویض آنیونی دی‌اتیل‌آمینواتیل‌سلولز با ابعاد 8 cm در 15 mL سانتی‌متر انجام شد. همچنین ستون کروماتوگرافی قبل از شروع تخلیص پروتئین با همین بافر به تعادل رسیده بود. سپس از شیب خطی صفر تا یک‌مولار نمک کلرید سدیم برای تخلیص پروتئین‌ها استفاده شد. پروتئین‌های خارج‌شده از ستون در حجم‌های 4 mL میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند و غلظت آنها با استفاده از روش سنجش پروتئین برادفورد تعیین شد. در این مرحله میزان خلوص حجم‌های حاوی پروتئین خارج‌شده از ستون به روش SDS-PAGE بررسی شد. سپس نمونه‌ها برای انجام مراحل بعدی تخلیص جمع‌آوری و پس از دیالیز علیه بافر تریس 25 mM میلی‌مولار با pH برابر ۸، شامل 1 M مولار سدیم کلرید، 5 mM میلی‌مولار EDTA، 10 mM میلی‌مولار بتامرکاپتواتانول و 0.1% آزیدسدیم با استفاده از غشای اولترافیلتراسیون (UF) تغلیظ شد. به‌منظور تهیه نمونه با خلوص مناسب ادامه فرآیند تخلیص پروتئین با استفاده از ستون فیلتراسیون ژلی سفاکریل S-300 (100 mL سانتی‌متر) انجام شد [40]. پس از به‌تعادل‌رساندن ستون فیلتراسیون ژلی به وسیله بافر مناسب محلول پروتئینی تغلیظ‌شده روی ستون بارگذاری و با بافر تعادل با سرعت 25 mL میلی‌لیتر بر دقیقه از ستون خارج شد. سپس نمونه‌های پروتئینی در حجم‌های 2 mL میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند. از روش برادفورد (خوانش جذب نمونه‌ها در طول موج 595 nm نانومتر) برای تعیین غلظت و از روش SDS-PAGE برای سنجش میزان خلوص پروتئین‌ها استفاده شد. در نهایت نمونه‌های خالص جمع‌آوری و علیه آب مقطر دیالیز شدند. پودر نمونه‌های پروتئینی خالص تهیه و تا زمان استفاده در دمای 4°C نگهداری شدند.

مطالعه فلورسانس ذاتی پروتئین آلفا-B کریستالین

نمونه‌های پروتئینی با غلظت یک‌میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات 50 mM میلی‌مولار با pH برابر 7.2 آماده شدند. به‌منظور بررسی اثر یون مس بر ساختار پروتئین آلفا-B کریستالین انسانی از

غلظت‌های مختلف یون مس، در محدوده ۱ تا 300 mM میکرومولار در حضور و عدم حضور آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون (غلظت ۱ تا 10 mM میلی‌مولار) استفاده شد [40]. سپس نشر ذاتی پروتئین‌ها در بافر فسفات 50 mM میلی‌مولار در دمای محیط و در شرایط مختلف انکوباسیون، با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوریمتر مدل Cary Eclipse سنجیده شد. به‌منظور سنجش نشر فلورسانس ذاتی اسیدآمینه‌های تریپتوفان و تیروزین، نمونه‌های پروتئینی به ترتیب با طول موج‌های ۲۹۵ و 280 nm نانومتر برانگیخته شدند. شکاف برانگیختگی و شکاف نشری برای اسیدآمینه تریپتوفان $10/5$ و برای اسیدآمینه تیروزین $10/10$ نانومتر تنظیم شد [40].

مطالعه فلورسانس عارضی پروتئین آلفا-B کریستالین

به‌منظور بررسی تغییرات سطوح آب‌گریز نمونه‌های پروتئینی، از نشر فلورسانس ANS (100 mM میکرومولار) در حضور نمونه‌های مختلف پروتئینی (15 mM میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) پس از انکوباسیون در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. طول موج برانگیختگی نمونه‌ها 365 nm نانومتر و طیف نشری آنها در طول موج‌های 400 تا 600 nm نانومتر (شکاف برانگیختگی و شکاف نشری نمونه‌ها در 10 نانومتر) ثبت شد [41].

مطالعه ساختار دوم پروتئین با استفاده از روش طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی

در این مطالعه، طیف CD ناحیه دور فرابنفش نمونه‌های مختلف پروتئینی در بافر فسفات 50 mM میلی‌مولار، با pH برابر ۷ و در دمای 25°C با استفاده از دستگاه اسپکتروپولاریمتر (JASCO 810) ثبت شد. غلظت پروتئین در 2 mM میلی‌گرم در میلی‌لیتر و طول مسیر عبور نور در 1 mm سانتی‌متر تنظیم بود. با توجه به اینکه آلفا-B کریستالین انسانی دارای ۱۷۵ اسیدآمینه و وزن مولکولی 20000 Da دالتون است، با استفاده از معادله ۲-۱، می‌توان بیضی‌واری میانگین برای هر باقی‌مانده در یک طول موج مشخص را تعیین کرد [42].

$$[\theta]_{\text{mrw},\lambda} = \frac{\text{MRW} \cdot \theta_{\lambda}}{10 \cdot C \cdot d} \quad \text{معادله ۲-۱}$$

در این معادله θ_{λ} نشان‌دهنده بیضیت مشاهده‌شده در یک طول موج معین، C نماینده غلظت پروتئین بر حسب گرم در میلی‌لیتر، d طول مسیر نور بر حسب سانتی‌متر و MRW نشان‌دهنده میانگین وزن باقی‌مانده‌های آمینواسیدی است (وزن مولکولی زنجیره پلی‌پپتیدی بر حسب دالتون (M) تقسیم بر تعداد پیوندهای پپتیدی یا همان تعداد اسیدآمینه‌ها (N) منهای یک).

مطالعه وضعیت اولیگومری پروتئین با استفاده از روش پراکنش پویای نور

دستگاه پراکنش پویای نور (DLS) به‌عنوان یک ابزار دقیق برای مطالعه اندازه اولیگومرهای پروتئینی و توده‌ای شدن آنها استفاده می‌شود. در این روش نور لیزر با طول موج 532 nm نانومتر و با زاویه 173° درجه به نمونه تابیده می‌شود و نور پراکنش‌یافته دارای اطلاعات ارزشمندی در مورد اندازه ذرات مختلف و جمعیت آنها

نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر ثبت شد. ضریب خاموشی آلفا-B کریستالین ۰/۶۹ میلی‌گرم بر سانتی‌متر است [۱۹]. تعیین غلظت پروتئین انسولین با سنجش میزان جذب در طول موج ۲۷۶ نانومتر (ضریب خاموشی ۰/۰۸ میلی‌گرم بر سانتی‌متر) انجام شد [۴۹]. برای تعیین غلظت نمونه‌های پروتئینی ناخالص از روش برادفورد با استفاده از نمودار استاندارد مناسب استفاده شد [۵۰].

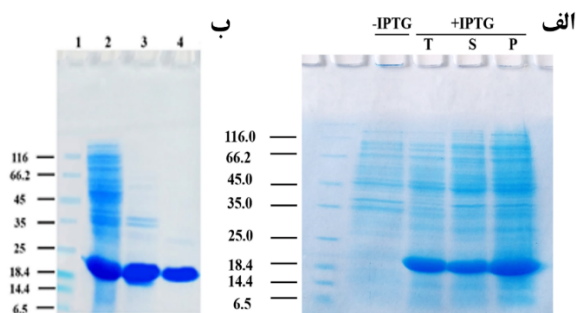
آنالیزهای آماری

معنی‌دار بودن نتایج حاصل بین گروه‌های کنترل و تیمار با استفاده از روش آماری آزمون T استودنت بررسی شد. نتایج با $p \leq 0.05$ به عنوان یافته‌های علمی معنی‌دار در نظر گرفته شدند [۵۱].

یافته‌ها

بیان و تخلص آلفا-B کریستالین انسانی

در مطالعه حاضر، بیان پروتئین آلفا-B کریستالین در میزبان باکتریایی / شیریشیا کلی BL21 سویه DE3 انجام شد. پس از اضافه کردن ماده القاکننده IPTG (۰/۲۵ میلی‌مولار) به محیط کشت LB، باکتری‌ها در دمای ۳۷°C و در شرایط هوادهی مناسب رشد یافت. پس از پایان کشت، محیط حاوی باکتری‌ها سانتریفیوژ و رسوب سلولی حاصل در بافر هضم‌کننده حل شد. به منظور اطمینان از بیان پروتئین‌ها، نمونه‌های باکتریایی حاصل از هضم سلولی قبل و بعد از القا و همچنین محلول رویی و رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ به کمک ژل ۱۲% SDS-PAGE مطالعه شد (شکل ۲- الف).



شکل ۲ بررسی القا و تخلص پروتئین آلفا-B کریستالین به روش الکتروفورز ژلی؛ الف) بررسی نمونه‌های پروتئینی حاصل از هضم باکتری به کمک ژل ۱۲% SDS-PAGE، نمونه باکتریایی قبل از القا (-IPTG)، نمونه باکتریایی بعد از القا شامل پروتئین کل (T) بعد از هضم سلولی، محلول رویی نمونه‌های القاشده (S) بعد از سانتریفیوژ، رسوب باکتریایی (P) پس از سانتریفیوژ؛ ب) الکتروفورز ژلی SDS-PAGE نمونه‌های حاصل از مراحل تخلص پروتئین آلفا-B کریستالین به روش کروماتوگرافی؛ ردیف‌های ۱، ۲، ۳، ۴ به ترتیب معرف نمونه‌های پروتئینی قبل از شروع تخلص، پس از خروج از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی و پس از خروج از ستون فیلتراسیون ژلی سفارکیل S-300 است.

همان‌طور که در شکل ۲- الف مشاهده می‌شود، بیان پروتئین آلفا-B کریستالین انسانی در حضور ماده القاکننده IPTG به میزان قابل توجهی القا شده است. همچنین علاوه بر محلول رویی حضور این

است. در این روش نمونه‌های مختلف آلفا-B کریستالین با غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۴ تهیه شدند [۴۳]. آنگاه با استفاده از دستگاه DLS مدل SZ-100 (هوریبا؛ ژاپن) قطر هیدرودینامیکی اولیگومرهای پروتئینی تعیین شد [۴۴].

مطالعه فعالیت چاپرونی آلفا-B کریستالین

فعالیت چاپرونی آلفا-B کریستالین با استفاده از پروتئین هدف انسولین سنجش شد. در این روش پروتئین انسولین با غلظت ۳/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حضور و عدم حضور چاپرون (۱/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و به کمک ماده شیمیایی دی‌تیوتریتول توده‌ای شد. فعالیت چاپرونی با ثبت میزان جذب نور در طول موج ۳۶۰ نانومتر بر حسب زمان و در یک بازه زمانی ۳۰ دقیقه‌ای سنجیده شد. میزان جذب نور نشان‌دهنده میزان توده‌ای شدن پروتئین هدف است که با فعالیت چاپرونی نسبت عکس دارد. برای سنجش فعالیت چاپرونی از دستگاه اسپکتروسکوپی مرئی-فرابنفش مدل Cecil CE 7200 مجهز به سیستم تنظیم دمایی استفاده شد. به منظور کمی کردن فعالیت چاپرونی از معادله ۲-۲ استفاده شد [۴۵]:

$$\text{معادله ۲-۲} \quad P(\%) = \frac{1 - Ar}{Ar_0} \times 100$$

در این معادله Ar و Ar_0 به ترتیب نشان‌دهنده سطح زیر منحنی جذب نور در برابر زمان در حضور و عدم حضور چاپرون است. مقدار عددی $\frac{1 - Ar}{Ar_0}$ بین صفر و ۱ متغیر است. میزان حفاظت از پروتئین هدف (P) در برابر توده‌ای شدن در عدم حضور چاپرون صفر و در این حالت مقدار عددی $\frac{Ar}{Ar_0}$ برابر یک است. میزان حفاظت زمانی ۱۰۰ است که چاپرون به‌طور کامل بتواند از توده‌ای شدن پروتئین هدف جلوگیری کند. در این شرایط مقدار Ar صفر می‌شود [۴۳، ۴۵].

الکتروفورز ژلی پروتئین

برای تعیین میزان خلوص پروتئین، تعیین وزن مولکولی تقریبی، تشکیل توده‌های پروتئینی، شکل‌گیری اتصالات متقاطع پروتئینی به وسیله پیوندهای کووالانسی دی‌سولفیدی و غیردی‌سولفیدی و بررسی برهم‌کنش‌های پروتئینی از ژل پلی‌اکریل‌آمید استفاده می‌شود [۴۶]. در این روش از ماده واسرشته‌کننده سدیم‌دودسیل‌سولفات برای منفی کردن بار سطحی پروتئین استفاده شد. در این شرایط حرکت پروتئین‌ها روی ژل پلی‌اکریل‌آمید به وزن مولکولی آنها بستگی دارد [۴۷].

روش SDS-PAGE با استفاده از پروتکل استاندارد Laemmli انجام می‌شود [۴۸]. الکتروفورز نمونه‌ها به مدت یک ساعت در یک ولتاژ ثابت (۴۰ ولت) انجام شد. در پایان به منظور مشاهده نمونه‌های پروتئینی از روش رنگ‌آمیزی کوماسی (CBB) استفاده شد. در این روش ۱۵ میکروگرم از نمونه‌های پروتئینی در چاهک‌های ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲% بارگذاری شد.

تعیین غلظت پروتئین

به منظور تعیین غلظت آلفا-B کریستالین انسانی و پس از حل کردن نمونه پروتئینی در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۴، جذب

پروتئین در رسوب سلولی بیانگر بیان میزان قابل توجه این پروتئین نو ترکیب در ساختارهایی موسوم به اینکلوزن بادی است.

به‌منظور تخلیص پروتئین آلفا- B کریستالین از ستون‌های کروماتوگرافی تعویض آنیونی (DEAE- سلولز) و فیلتراسیون ژلی (سفاکریل-300 S) استفاده شد. پس از انجام خالص‌سازی غلظت پروتئین تعیین و میزان خلوص آن به کمک الکتروفورز ژلی مشخص شد (شکل ۲- ب). در نهایت نمونه‌هایی که بیشترین خلوص را داشتند جمع‌آوری و برای انجام آزمایش‌های مختلف ذخیره شدند.

بررسی تغییرات ساختاری پروتئین آلفا- B کریستالین در حضور یون‌های مس و ترکیب آنتی‌اکسیدان گلوکاتینون

در این مطالعه نشر فلورسانس آمینواسیدهای تریپتوفان و تیروزین با هدف بررسی تغییرات ساختاری پروتئین آلفا- B کریستالین انسانی انجام شد. همان‌طور که در نمودارهای ۱- الف و ۱- ب مشاهده می‌شود، تیمار پروتئین آلفا- B کریستالین با یون‌های مس باعث کاهش نشر فلورسانس تریپتوفان و تیروزین می‌شود که نشان‌دهنده تغییرات ساختاری فضایی این پروتئین است. نقش یون مس در ایجاد تغییرات ساختاری آلفا- B کریستالین در مطالعات قبلی نیز مشخص شده است [19].

از آنجا که یون مس واکنش‌هایی که به اکسایش پروتئین‌ها منجر می‌شود را تسریع می‌کند [30]، در ادامه این مطالعه پروتئین آلفا- B کریستالین با یون مس و آنتی‌اکسیدان گلوکاتینون انکوبه شد. تیمار پروتئین انکوبه‌شده با یون مس با غلظت‌های ۱ تا ۵ میلی‌مولار گلوکاتینون باعث افزایش نشر فلورسانس تریپتوفان در مقایسه با نمونه‌های پروتئینی که فقط با یون مس انکوبه شده‌اند می‌شود. این پدیده نشان‌دهنده نقش مهم گلوکاتینون در خنثی‌کردن اثر یون مس در ایجاد تغییرات ساختاری در این پروتئین چاپرون لنز است. در مطالعه حاضر، از رنگ فلورسنت ANS با هدف بررسی تغییرات سطح آب‌گریز در معرض پروتئین آلفا- B کریستالین انسانی استفاده شد. همان‌گونه که در نمودار ۱- ج نشان داده شده است، انکوبه‌کردن پروتئین آلفا- B کریستالین با یون مس باعث کاهش شدید سطح آب‌گریزی این پروتئین می‌شود. نشر فلورسانس ANS نمونه‌های پروتئینی تیمار شده با یون مس در حضور گلوکاتینون نیز جمع‌آوری شد (نمودار ۱- ج). نتایج حاصل نشان داد که گلوکاتینون باعث افزایش نشر نمونه‌های تیمار شده با یون مس می‌شود و این پدیده نشان‌دهنده افزایش سطوح آب‌گریز در معرض این پروتئین با این ترکیب آنتی‌اکسیدان است.

به‌طور کلی نتایج مطالعات فلورسانس آلفا- B کریستالین نو ترکیب انسانی به‌وضوح پیشنهاد می‌کند که یون‌های مس باعث تغییرات مهم ساختاری در این پروتئین می‌شوند که به میزان قابل توجهی به وسیله گلوکاتینون جلوگیری می‌شود.

مطالعه ساختار دوم آلفا- B کریستالین در حضور یون‌های مس و گلوکاتینون

به‌منظور مطالعه تغییرات ساختار دوم آلفا- B کریستالین در حضور

یون‌های مس و گلوکاتینون از روش اسپکتروسکوپی CD ناحیه دور استفاده شد (نمودار ۲). طیف CD ناحیه دور پروتئین آلفا- B کریستالین یک کمینه جذب در اطراف طول موج ۲۱۷ نانومتر نشان‌دهنده درصد بالایی از ساختارهای بتا است [42]. طبق یافته‌ها، اتصال یون مس باعث افزایش جذب آلفا- B کریستالین در ناحیه ۲۱۷ نانومتر می‌شود. اتصال گلوکاتینون به‌تنهایی با پروتئین تغییرات بارزی در ساختار دوم پروتئین ایجاد نمی‌کند، ولی اگر از افزایش ناچیز آن در ۲۱۷ نانومتر صرف نظر نشود، نشان‌دهنده تغییرات کوچک ساختار دوم در حضور گلوکاتینون است.

در زمان انکوبه هم‌زمان با مس و گلوکاتینون به نظر می‌رسد که این ترکیب آنتی‌اکسیدان مانع از اتصال مس به پروتئین می‌شود و در نتیجه ساختار دوم پروتئین را به حالت طبیعی باز می‌گرداند. این ساختار بازگردانده‌شده با افزایش ناچیزی در ناحیه ۲۱۷ نانومتر و همچنین افزایش ناچیز ماریچ آلفا همراه است که قابل اغماض نیست و نشان می‌دهد که اگرچه گلوکاتینون مانع از اتصال مس می‌شود، اما اثرات ناچیز گلوکاتینون همچنان باقی است.

مطالعه الگوی اولیگومریزاسیون آلفا- B کریستالین انسانی در حضور یون‌های مس و گلوکاتینون

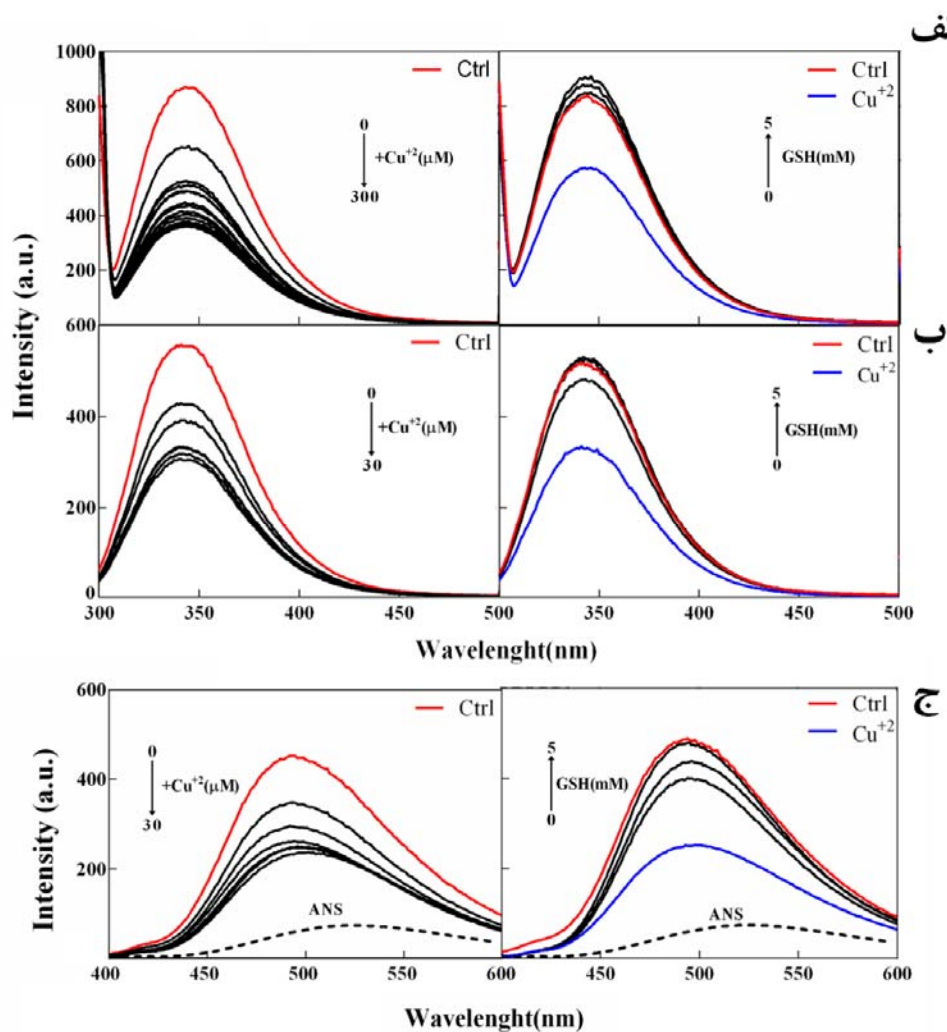
با توجه به اینکه یون مس می‌تواند زمینه اکسایش پروتئین‌ها را فراهم کند، در این مطالعه نمونه‌های پروتئینی به‌طور هم‌زمان و به‌صورت جداگانه با یون‌های مس و گلوکاتینون انکوبه شدند و سپس شعاع هیدرودینامیکی نمونه‌های پروتئینی به کمک دستگاه پراکنش پویای نور تعیین شد. همان‌گونه که در نمودار ۳ نشان داده شده است، اندازه اولیگومرهای پروتئین آلفا- B کریستالین در اثر تیمار با یون مس افزایش می‌یابد.

یون مس باعث افزایش شعاع هیدرودینامیک اولیگومرهای پروتئینی آلفا کریستالین می‌شود. تیمار پروتئین‌های آلفا- B کریستالین با گلوکاتینون به‌تنهایی و انکوبه هم‌زمان با یون‌های مس تاثیر مهمی بر اندازه اولیگومرها داشت. انکوبه‌کردن پروتئین آلفا- B کریستالین با گلوکاتینون باعث کاهش اندازه اولیگومرها می‌شود (نمودار ۴).

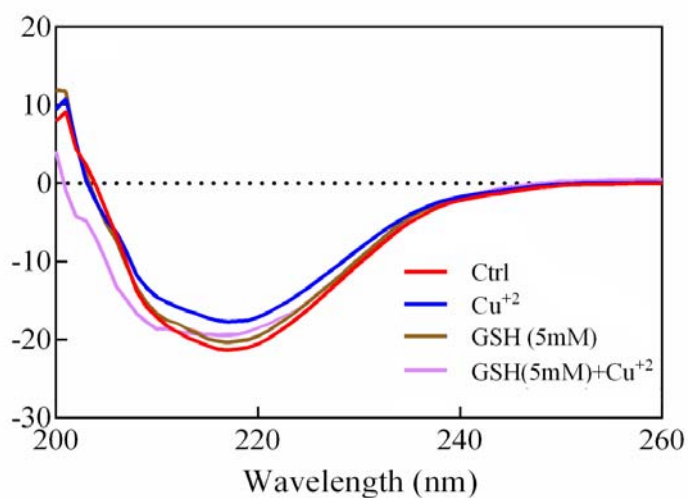
به نظر می‌رسد که گلوکاتینون اثر یون‌های مس در افزایش شعاع هیدرودینامیکی پروتئین آلفا- B کریستالین انسانی را به میزان قابل توجهی خنثی می‌کند.

مطالعه فعالیت چاپرونی آلفا- B کریستالین انسانی در حضور یون‌های مس و گلوکاتینون

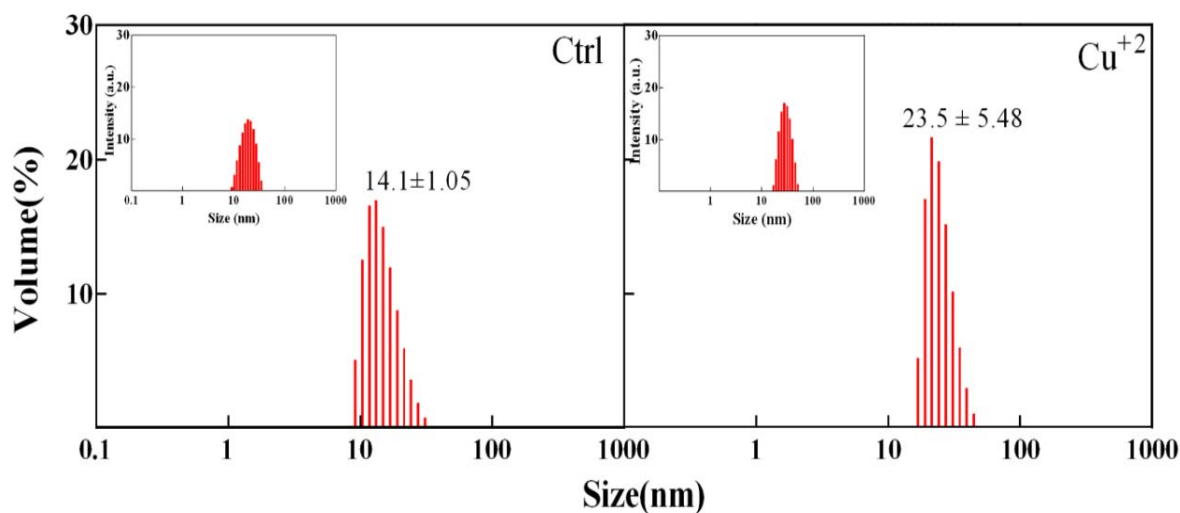
فعالیت چاپرونی آلفا- B کریستالین نقش مهمی در محلول نگه‌داشتن پروتئین‌های لنز و حفظ شفافیت آن ایفا می‌کند [52]. در این مطالعه فعالیت چاپرونی آلفا- B کریستالین با استفاده از پروتئین هدف انسولین مطالعه شد. فعالیت چاپرونی درواقع با سنجش عملکرد ضدتوده‌ای شدن انسولین و به روش توده‌ای شدن شیمیایی و در یک بازه زمانی ۲۰ دقیقه‌ای به‌صورت سینتیکی مطالعه شد (نمودار ۵).



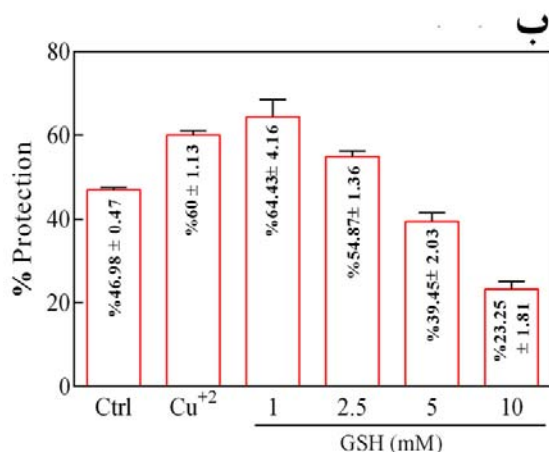
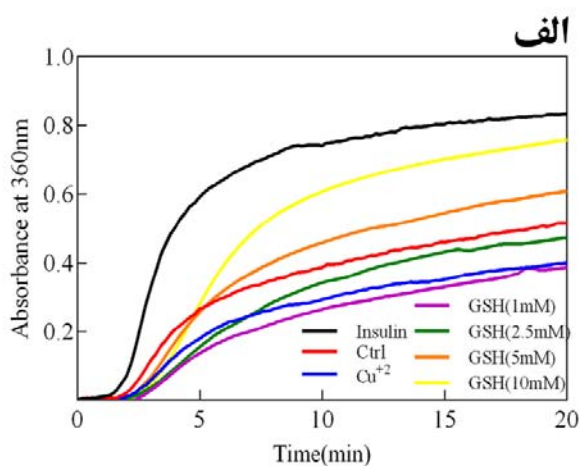
نمودار ۱) مطالعه نشر فلورسانس پروتئین آلفا-B کریستالین در حضور یون‌های مس و گلووتاتیون؛ الف) طیف نشری فلورسانس ذاتی اسیدآمینه تریپتوفان در طول موج برانگیختگی ۲۹۵ نانومتر برای پروتئین آلفا-B کریستالین ضمن تیمار با یون‌های مس (غلظت ۱ تا ۳۰۰ میکرومولار) و ترکیب آنتی‌اکسیدان گلووتاتیون (غلظت ۱ تا ۵ میلی مولار)؛ ب) طیف نشری فلورسانس ذاتی اسیدآمینه تیروزین در طول موج برانگیختگی ۲۷۶ نانومتر برای پروتئین آلفا-B کریستالین تحت تیمار با یون مس (غلظت ۱ تا ۳۰ میکرومولار) و ترکیبات آنتی‌اکسیدان گلووتاتیون (۱ تا ۵ میلی‌مولار)؛ ج) طیف نشری فلورسانس ANS در طول موج برانگیختگی ۳۶۵ نانومتر برای پروتئین آلفا-B کریستالین ضمن تیمار با یون مس (۱ تا ۳۰ میکرومولار) و گلووتاتیون (۱ تا ۵ میلی‌مولار)



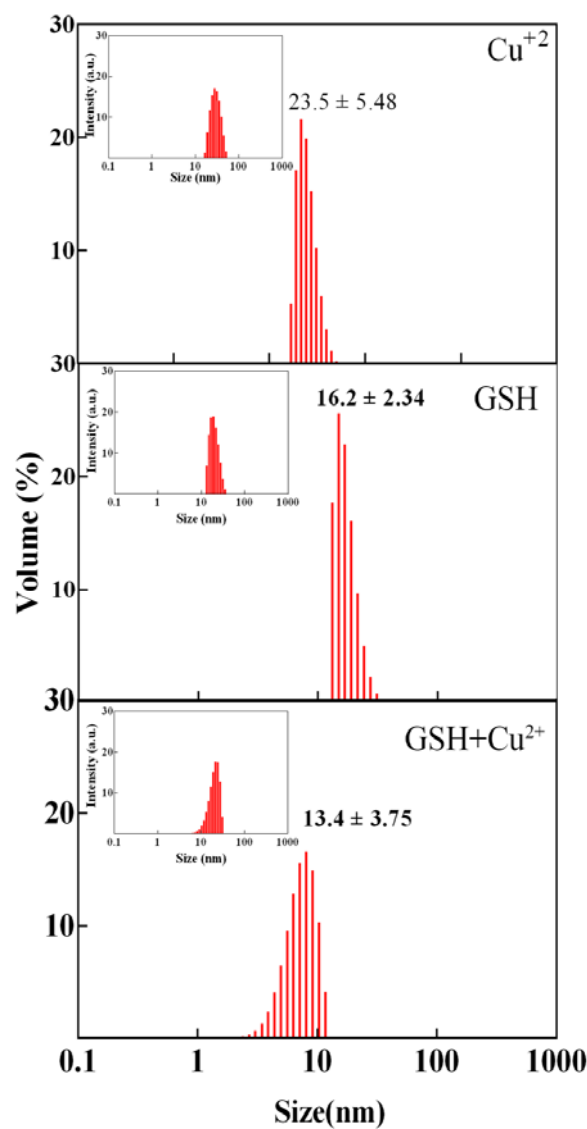
نمودار ۲) طیف CD ناحیه دور آلفا-B کریستالین در حضور یون مس و گلووتاتیون (۵ میلی‌مولار)



نمودار ۳) مطالعه اندازه اولیگومرهای آلفا- B کریستالین انسانی (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به روش پراکنش پویای نور در حضور و عدم حضور یون مس



نمودار ۵) مطالعه فعالیت چاپرونی آلفا- B کریستالین در حضور یون های مس و گلو تاتیون: الف) تاثیر یون مس در حضور و عدم حضور غلظت های مختلف گلو تاتیون (۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی مولار) بر فعالیت چاپرونی آلفا- B کریستالین انسانی (غلظت ۱/۰ میلی گرم بر میلی لیتر) در حضور پروتئین هدف انسولین (غلظت ۳/۰ میلی گرم بر میلی لیتر) با ثبت میزان جذب نور در طول موج ۳۶۰ نانومتر بر حسب زمان و در یک بازه زمانی ۳۰ دقیقه ای؛ ب) نتایج کمی شده فعالیت چاپرونی انواع نمونه ها آلفا- B کریستالین با استفاده از محاسبه سطح زیر منحنی توده ای شدن انسولین به کمک فرمول ۱-۲



نمودار ۴) مطالعه وضعیت اولیگومری آلفا- B کریستالین در حضور یون های مس و گلو تاتیون

فرآیندهای پاتولوژیکی درون سلول به راه می افتند که در نهایت به استرس اکسایشی می انجامد^[61]. فرآیندهای اکسایشی نیز بستر مساعدی را برای قندی شدن غیر آنزیمی پروتئین های لنز چشم فراهم می کنند^[62]. کلیه این فرآیندها در نهایت بافت شفاف لنز را کدر و زمینه بروز آب مروارید و کوری را فراهم می کنند (شکل ۱).

گلوتاتیون یکی از اجزای اصلی سیستم دفاع آنتی اکسیدانی لنز چشم است^[37]. اخیراً گزارش شده است که مولکول واجد گروه تیولی گلوتاتیون نقش مهمی در کاهش سمیت کاتیون های مس دارد^[63].

مطالعات پیشین نشان داده است که مس با تمایل زیادی به گلوتاتیون متصل می شود و این پدیده به نوبه خود باعث احیای کاتیون مس II به مس I می شود. به این ترتیب با احیای یون مس و ایجاد کمپلکس گلوتاتیون- مس از تولید گونه های فعال اکسیژنی به وسیله عنصر اکسایشگر جلوگیری می شود^[63-65]. اخیراً ساز و کار کاملی از اتصال گلوتاتیون و یون مس گزارش شده است^[66]. از این

رو در مطالعه حاضر ساختار و عملکرد پروتئین آلفا-B کریستالین نو ترکیب انسانی در حضور یون های مس و گلوتاتیون بررسی شد. براساس نتایج مطالعات پیشین آلفا کریستالین دارای جایگاه اتصال برای یون های مس در دومینی موسوم به دومین آلفا کریستالینی است. همچنین آمینواسیدهای هیستیدین ۸۳، هیستیدین ۱۰۴، هیستیدین ۱۱۱ و آسپاراتات ۱۰۹ نقش مهمی در اتصال به یون های مس دارند^[67]. بین اسید آمینه هایی که در اتصال به مس نقش دارند، آسپاراتات ۱۰۹ در دیم شدن این پروتئین نقش ویژه ای دارد^[68]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اتصال یون مس به این پروتئین باعث تغییرات مهم ساختاری (نمودار ۱)، افزایش شعاع هیدرودینامیکی (نمودار ۳) و افزایش فعالیت چاپرونی (نمودار ۵) می شود. نتایج این مطالعه، نتایج مطالعات پیشین با یون مس و پروتئین آلفا کریستالین را تایید می کند^[19, 26, 40]. همچنین گلوتاتیون مانع تغییرات ساختاری حاصل از یون های مس در پروتئین آلفا-B کریستالین نو ترکیب انسانی می شود (نمودار ۱). همچنین این ترکیب مهم آنتی اکسیدانی از تشکیل ساختارهای اولیگو مری بزرگتر که به وسیله یون های مس القا می شود، ممانعت می کند (نمودار ۴). ساختارهای اولیگو مری بزرگ احتمالاً نقش مهمی در پراکنش نور در لنز چشم دارند که می توانند مانع تشکیل تصویر واضح در شبکیه شوند. از این رو نقش گلوتاتیون در کاهش اندازه ساختارهای اولیگو مری پروتئین آلفا-B کریستالین به وسیله یون های مس از اهمیت زیادی برخوردار است. یکی از موضوعات مهمی که تاکنون توضیح روشنی برای آن موجود نبوده، افزایش فعالیت چاپرونی آلفا کریستالین ضمن اتصال با یون های مس و روی است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که گلوتاتیون مانع افزایش فعالیت چاپرونی آلفا-B کریستالین نو ترکیب به وسیله یون های مس می شود (نمودار ۵).

مطالعات پیشین نشان داده اند که پروتئین آلفا-B کریستالین دارای جایگاه ویژه ای برای اتصال به یون مس است و این اتصال تا حدی باعث بازآرایی ساختاری در دومین آلفا کریستالینی می شود^[67, 69].

از آنجایی که افزایش سطح یون مس در عارضه دیابت، پیری و آب مروارید در لنز چشم به اثبات رسیده است، در مطالعه حاضر، تاثیر آن بر فعالیت چاپرونی آلفا-B کریستالین انسانی بررسی شد. مشاهده سینتیک توده ای شدن انسولین در حضور و عدم حضور یون مس نشان می دهد که این یون باعث افزایش فعالیت چاپرونی پروتئین آلفا-B کریستالین می شود. تاثیر مثبت یون مس بر فعالیت چاپرونی آلفا-B کریستالین در مطالعات قبلی نیز به اثبات رسیده است^[26, 40].

از آنجایی که یون مس به عنوان یک عامل القای اکسایش درون سلول مطرح است، در این مطالعه نقش حفاظتی آنتی اکسیدان گلوتاتیون در مهار اثرات احتمالی اکسایشی یون مس ارزیابی شد. انکوبه هم زمان پروتئین آلفا-B کریستالین با یون مس و ترکیب آنتی اکسیدان گلوتاتیون باعث کاهش فعالیت چاپرونی آن می شود (نمودار ۵- الف).

به منظور مقایسه آماری و تحلیل دقیق تر نتایج نمودار ۵- الف، این داده ها به کمک معادله ۲-۲ و با محاسبه سطح زیر منحنی توده ای شدن انسولین در حضور و عدم حضور چاپرون به صورت کمی ارائه شد. نتایج کمی شده فعالیت چاپرونی نمونه های مختلف آلفا-B کریستالین در نمودار ۵- ب نشان داده شده است. به نظر می رسد که گلوتاتیون در الگوی وابسته به غلظت، فعالیت چاپرونی پروتئین آلفا-B کریستالین انسانی تیمار شده با یون های مس را کاهش می دهد.

بحث

مطالعات پیشین نشان می دهند که در لنزهای بیماران دیابتی، افراد مسن و بیماران مبتلا به عارضه آب مروارید غلظت یون های مس به میزان قابل توجهی افزایش می یابد^[30, 53, 54]. یون های مس می توانند آسکوربیک اسید که غلظت بالایی در لنز چشم دارد را به سرعت به ترکیب موسوم به دهیدروآسکوربیک اسید و پراکسید هیدروژن تبدیل کند (شکل ۱). همچنین یون مس طی واکنشی موسوم به واکنش فنتون پراکسید هیدروژن را به رادیکال آزاد هیدروکسیل تبدیل می کند^[55]. از آنجایی که قندی شدن غیر آنزیمی پروتئین در محیط های اکسایشی به میزان قابل توجهی تسریع می شود، شرایط اکسایشی که تحت تاثیر بالا رفتن غلظت یون های مس در لنز چشم ایجاد می شود، احتمالاً واکنش های قندی شدن غیر آنزیمی پروتئین های لنز را به میزان قابل توجهی سرعت می بخشد (شکل ۱) ^[56-58]. آثار تخریبی یون مس ضمن مواجهه با آسکوربیک اسید احتمالاً به موارد فوق محدود نمی شود، زیرا محصولات اکسایشی حاصل از اکسایش آسکوربیک اسید از جمله دهیدروآسکوربیک اسید که در حضور یون های مس با سرعت بیشتری تولید می شوند نیز همچون قندهای احیا کننده برای تشکیل مولکول های سمی موسوم به AGEs با پروتئین های لنز واکنش می دهند^[59, 60]. مولکول های AGEs نیز دارای گیرنده موسوم به RAGE هستند که ضمن برهم کنش این دو (لیگاند و گیرنده)

- 2- Horwitz J. Alpha-crystallin. *Exp Eye Res.* 2003;76(2):145-53.
- 3- Andley UP. Crystallins in the eye: Function and pathology. *Prog Retin Eye Res.* 2007;26(1):78-98.
- 4- Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ.* 2004;82:844-51.
- 5- Moreau KL, King JA. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends Mol Med.* 2012;18(5):273-82.
- 6- Ma Z, Hanson SR, Lampi KJ, David LL, Smith DL, Smith JB. Age-related changes in human lens crystallins identified by HPLC and mass spectrometry. *Exp Eye Res.* 1988;67(1):21-30.
- 7- Takemoto LJ. Differential phosphorylation of alpha-A crystallin in human lens of different age. *Exp Eye Res.* 1996;62(5):499-504.
- 8- Banerjee PR, Pande A, Patrosz J, Thurston GM, Pande J. Cataract-associated mutant E107A of human γ D-crystallin shows increased attraction to α -crystallin and enhanced light scattering. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(2):574-9.
- 9- Takemoto L, Sorensen CM. Protein-protein interactions and lens transparency. *Exp Eye Res.* 2008;87(6):496-501.
- 10- Bloemendal H, De Jong W, Jaenicke R, Lubsen NH, Slingsby Ch, Tardieu A. Ageing and vision: Structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol.* 2004;86(3):407-85.
- 11- Michael R, Bron AJ. The ageing lens and cataract: A model of normal and pathological ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011;366(1568):1278-92.
- 12- Slingsby Ch, Wistow GJ, Clark AR. Evolution of crystallins for a role in the vertebrate eye lens. *Protein Sci.* 2013;22(4):367-80.
- 13- Lamba OP, Borchman D, Sinha SK, Shah J, Renugopalakrishnan V, Yappert MC. Estimation of the secondary structure and conformation of bovine lens crystallins by infrared spectroscopy: Quantitative analysis and resolution by Fourier self-deconvolution and curve fit. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol.* 1993;1163(2):113-23.
- 14- Farnsworth PN, Groth-Vasselli B, Greenfield NJ, Singh K. Effects of temperature and concentration on bovine lens α -crystallin secondary structure: A circular dichroism spectroscopic study. *Int J Biol Macromol.* 1997;20(4):283-91.
- 15- Reddy GB, Das KP, Petrash JM, Surewicz WK. Temperature-dependent chaperone activity and structural properties of human α A- and α B-crystallins. *J Biol Chem.* 2000;275(7):4565-70.
- 16- De Jong WW, Caspers GJ, Leunissen JA. Genealogy of the α -crystallin-small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol.* 1998;22(3-4):151-62.
- 17- Reddy G, Kumar P, Kumar M. Chaperone-like activity and hydrophobicity of α -crystallin. *IUBMB Life.* 2006;58(11):632-41.
- 18- Mchaourab HS, Godar JA, Stewart PL. Structure and mechanism of protein stability sensors: Chaperone activity of small heat shock proteins. *Biochemistry.* 2009;48(18):3828-37.
- 19- Ahmad MF, Singh D, Taiyab A, Ramakrishna T, Raman B, Rao CM. Selective Cu²⁺ binding, redox silencing, and cytoprotective effects of the small heat shock proteins α A- and α B-crystallin. *J Mol Biol.* 2008;382(3):812-24.
- 20- Bhat SP, Nagineni CN. α B subunit of lens-specific protein α -crystallin is present in other ocular and non-

این بازآرایی ساختاری به احتمال زیاد می‌تواند بر الگوی تشکیل اولیگو‌مرها تأثیرگذار باشد، به‌طوری که در اثر اتصال یون مس شعاع هیدرو‌دینامیک اولیگو‌مرهای پروتئین افزایش می‌یابد. افزایش اندازه اولیگو‌مرها در اثر انکوباسیون با یون مس در مطالعات قبلی نیز تأیید شده است [19]. همچنین اتصال یون مس به آلفا-B کریستالین تا حد زیادی باعث کاهش نشر فلورسانس ذاتی می‌شود که نشان‌دهنده تغییرات ساختاری پروتئین است (نمودار ۱). این تغییرات ساختاری احتمالاً می‌تواند ناشی از بازآرایی ساختاری اعمال‌شده در اثر اتصال یون مس به دومین آلفاکریستالینی باشد. همچنین اتصال یون مس می‌تواند موجب افزایش فعالیت چاپرونی پروتئین شود (نمودار ۵) که در مطالعات گذشته نیز مشاهده شده است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی براساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان گفت که یون مس به احتمال زیاد با اتصال به دومین آلفاکریستالینی و نقشی که در بازآرایی ساختاری آن دارد می‌تواند بر ساختار پروتئین آلفا-B کریستالین و فعالیت چاپرونی آن اثرگذار باشد. از آنجا که افزایش غلظت یون مس به‌عنوان یک عامل مهم در تسریع روند اکسایش پروتئین‌ها و همچنین یک شاخص مهم در لنزهای آب مرواریدی شناخته می‌شود، نقش گلو‌تاتیون به‌عنوان یکی اجزای مهم سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در مهار اثرات تخریبی احتمالی یون مس اهمیت زیادی دارد. احتمالاً گلو‌تاتیون با جمع‌آوری یون مس از محیط باعث می‌شود که پروتئین آلفا-B کریستالین تا حدودی ساختار طبیعی خود بازیابی کند. از این رو نتایج مطالعه حاضر علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، نقش حفاظتی جدیدی برای گلو‌تاتیون معرفی می‌کند که این نقش به‌ویژه در لنزهای افراد دیابتی و افراد مسن که سطح مس در آنها به میزان قابل توجهی بالا می‌رود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

تشکر و قدردانی: از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شیراز و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) به‌دلیل تأمین امکانات و حمایت‌های مالی قدردانی می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: نو‌شین گرجی‌زاده (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۵٪)؛ محمدباقر شاهسونی (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ فائزه موسوی‌موحدی (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری (۲۵٪)؛ رضا یوسفی (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۵٪)؛

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- 1- Graw J. Genetics of crystallins: Cataract and beyond. *Exp Eye Res.* 2009;88(2):173-89.

Res. 2003;22(5):657-82.

40- Ghahramani M, Yousefi R, Khoshaman K, Moghadam SS, Kurganov BI. Evaluation of structure, chaperone-like activity and protective ability of peroxy nitrite modified human α -crystallin subunits against copper-mediated ascorbic acid oxidation. *Int J Biol Macromol*. 2016;87:208-21.

41- Ecroyd H, Meehan S, Horwitz J, Aquilina JA, Benesch JL, Robinson CV, et al. Mimicking phosphorylation of α B-crystallin affects its chaperone activity. *Biochem J*. 2007;401(1):129-41.

42- Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics*. 2005;1751(2):119-39.

43- Khoshaman K, Yousefi R, Tamaddon AM, Abolmaali SS, Oryan A, Moosavi-Movahedi AA, et al. The impact of different mutations at Arg54 on structure, chaperone-like activity and oligomerization state of human α A-crystallin: The pathomechanism underlying congenital cataract-causing mutations R54L, R54P and R54C. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics*. 2017;1865(5):604-18.

44- Datiles MB. Clinical detection of precatactous lens protein changes using dynamic light scattering. *Arch Ophthalmol*. 2008;126(12):1687-93.

45- Kurganov BI. Antiaggregation activity of chaperones and its quantification. *Biochemistry*. 2013;78(13):1554-66.

46- Hames BD. Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. Hames BD, editor. 3rd Edition. Oxford: Oxford University Press; 1998.

47- Smith BJ. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: Walker JM, editor. *Proteins*. Totowa: Humana Press; 1984. pp.41-56.

48- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.

49- Porter RR. Partition chromatography of insulin and other proteins. *Biochem J*. 1953;53(2):320-8.

50- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.

51- Kalpić D, Hlupić N, Lovrić M. Student's t-tests international encyclopedia of statistical science. Lovric M, editor. Heidelberg: Springer; pp.1559-63.

52- Reddy GB, Reddy PY, Vijayalakshmi A, Kumar MS, Suryanarayana P, Sesikeran B. Effect of long-term dietary manipulation on the aggregation of rat lens crystallins: Role of alpha-crystallin chaperone function. *Mol Vis*. 2002;8:298-305.

53- Pollreis A, Schmidt-Erfurth U. Diabetic cataract-pathogenesis, epidemiology and treatment. *J Ophthalmol*. 2010;2010:608751.

54- Langford-Smith A, Tilakaratna V, Lythgoe PR, Clark SJ, Bishop PN, Day AJ. Age and smoking related changes in metal ion levels in human lens: Implications for cataract formation. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147576.

55- Samuni A, Apronovitch J, Godinger D, Chevion M, Czapski G. On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions: A site-specific Fenton mechanism. *Eur J Biochem*. 1983;137(1-2):119-24.

56- Ávila F, Schmeda-Hirschmann G, Silva E. The major chromophore arising from glucose degradation and oxidative stress occurrence during lens proteins glycation induced by glucose. *Molecules*. 2018;23(1):6.

57- Argirova MD, Ortwerth BJ. Activation of protein-bound copper ions during early glycation: Study on two

ocular tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;158(1):319-25.

21- Horwitz J, Bova MP, Ding LL, Haley DA, Stewart PL. Lens α -crystallin: Function and structure. *Eye*. 1999;13(3):403-8.

22- Van Montfort R, Slingsby Ch, Vierling E. Structure and function of the small heat shock protein/ α -crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem*. 2001;59:105-56.

23- Clark JI, Muchowski PJ. Small heat-shock proteins and their potential role in human disease. *Curr Opin Struct Biol*. 2000;10(1):52-9.

24- Sun Y, MacRae TH. The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS J*. 2005;272(11):2613-27.

25- Moschini R, Marini I, Malerba M, Cappiello M, Del Corso A, Mura U. Chaperone-like activity of α -crystallin toward aldose reductase oxidatively stressed by copper ion. *Arch Biochem Biophys*. 2006;453(1):13-7.

26- Ganadu ML, Aru M, Mura GM, Coi A, Mlynarz P, Kozłowski H. Effects of divalent metal ions on the α B-crystallin chaperone-like activity: Spectroscopic evidence for a complex between copper(II) and protein. *J Inorg Biochem*. 2004;98(6):1103-9.

27- Biswas A, Das KP. Zn²⁺ enhances the molecular chaperone function and stability of α -crystallin. *Biochemistry*. 2008;47(2):804-16.

28- Biswas A, Karmakar S, Chowdhury A, Das KP. Interaction of α -crystallin with some small molecules and its effect on its structure and function. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2016;1860(1):211-21.

29- Raju M, Santhoshkumar P, Henzl TM, Sharma KK. Identification and characterization of a copper-binding site in α A-crystallin. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(10):1429-36.

30- Lin J. Pathophysiology of cataracts: Copper ion and peroxidation in diabetics. *J Ophthalmol*. 1997;41(3):130-7.

31- Kisić B, Mirić D, Zorić L, Ilić A, Dragojević I. Antioxidant capacity of lenses with age-related cataract. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:467130.

32- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19.

33- Bensch KG, Fleming JE, Lohmann W. The role of ascorbic acid in senile cataract. *Proc Natl Acad Sci*. 1985;82(21):7193-6.

34- Saxena P, Saxena AK, Cui XL, Obrenovich M, Gudipaty K, Monnier VM. Transition metal-catalyzed oxidation of ascorbate in human cataract extracts: Possible role of advanced glycation end products. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(6):1473-81.

35- Ghosh KS, Pande A, Pande J. Binding of γ -crystallin substrate prevents the binding of copper and zinc ions to the molecular chaperone α -crystallin. *Biochemistry*. 2011;50(16):3279-81.

36- Hawse JR, Cumming JR, Oppermann B, Sheets NL, Reddy VN, Kantorow M. Activation of metallothioneins and α -crystallin/sHSPs in human lens epithelial cells by specific metals and the metal content of aging clear human lenses. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2003;44(2):672-9.

37- Giblin FJ. Glutathione: A vital lens antioxidant. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2000;16(2):121-35.

38- Harding JJ. Viewing molecular mechanisms of ageing through a lens. *Ageing Res Rev*. 2002;1(3):465-79.

39- Lou MF. Redox regulation in the lens. *Prog Retin Eye*

Implications of a complex formation. *J Trace Elem Med Biol.* 2000;14(3):161-7.

64- Freedman JH, Ciriolo MR, Peisach J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J Biol Chem.* 1989;264(10):5598-605.

65- Ferreira AD, Ciriolo MR, Marcocci L, Rotilio G. Copper(I) transfer into metallothionein mediated by glutathione. *Biochem J.* 1993;292(3):673-6.

66- Ngamchuea K, Batchelor-McAuley Ch, Compton RG. The copper(II)-catalyzed oxidation of glutathione. *Chem A Eur J.* 2016;22(44):15937-44.

67- Mainz A, Bardiaux B, Kuppler F, Multhaup G, Felli IC, Pierattelli R, et al. Structural and mechanistic implications of metal binding in the small heat-shock protein α B-crystallin. *J Biol Chem.* 2012;287(2):1128-38.

68- Clark AR, Naylor CE, Bagn  ris C, Keep NH, Slingsby C. Crystal structure of R120G disease mutant of human α B-crystallin domain dimer shows closure of a groove. *J Mol Biol.* 2011;408(1):118-34.

69- Karmakar S, Das KP. Identification of histidine residues involved in Zn^{2+} binding to α a- and α b-crystallin by chemical modification and MALDI TOF mass spectrometry. *Protein J.* 2012;31(7):623-40.

proteins. *Arch Biochem Biophys.* 2003;420(1):176-84.

58- Viktor  nov   A, To  erov   E, Kri  ko M,   ura  kov   Z. Altered metabolism of copper, zinc, and magnesium is associated with increased levels of glycated hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Metabolism.* 2009;58(10):1477-82.

59- Nemet I, Monnier VM. Vitamin C degradation products and pathways in the human lens. *J Biol Chem.* 2011;286(43):37128-36.

60- Argirov OK, Lin B, Olesen P, Ortwerth BJ. Isolation and characterization of a new advanced glycation endproduct of dehydroascorbic acid and lysine. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2003;1620(1):235-44.

61- Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee AD. Targeting the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE): A medicinal chemistry perspective. *J Med Chem.* 2017;60(17):7213-32.

62- Smuda M, Henning Ch, Raghavan CT, Johar K, Vasavada AR, Nagaraj RH, et al. Comprehensive analysis of maillard protein modifications in human lenses: Effect of age and cataract. *Biochemistry.* 2015;54(15):2500-7.

63- Jim  nez I, Speisky H. Effects of copper ions on the free radical-scavenging properties of reduced glutathione: