

تأثیر نانومواد بر فیبریلایسیون پروتئین‌ها

سارا فیاض‌زاده، پونه سادات پورحسینی

بخش بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

چکیده

برخی فرایندهای زیستی از جمله جهش، تاخوردگی ناقص و یا ناصحیح پروتئین منجر به تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌شود که دارای قطری نانومتری و طولی درحد چند میکرومتر است. مطالعات نشان داده است که تشکیل این فیبریل‌ها با بسیاری از بیماری‌ها در انسان در ارتباط است که از آن جمله می‌توان به آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون، دیابت نوع دو و اشاره کرد. به همین علت، یافتن روشی که تشکیل فیبریل‌ها را مهار کند یا منجر به از بین رفتن فیبریل‌های از پیش تشکیل شده شود می‌تواند در درمان این بیماری‌ها مفید واقع شود. از طرفی، پژوهش‌های دیگر مشخص کرده‌اند، برخی از فیبریل‌ها قابل بهره‌برداری‌اند و به دلیل برخورداری از ویژگی‌هایی مانند پایداری بالا بستر مناسبی برای تولید نانولوله‌ها و نانوسیم‌ها هستند که کاربردهای متنوعی در حوزه نانوزیستی دارند. در این موارد، یافتن مواد و ترکیبات القا کننده فیبریلایسیون در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) می‌تواند مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی: آمیلوئید، ماده فعال در سطح، فیبریل، نانوذرات، نانومایسل

p.pourhosseini@alzahra.ac.ir

۱- مقدمه

۱-۱ فیبریلایسیون

تجمع کلوخه‌ای شکل پروتئین فرایندی است که در آن مولکول‌های پروتئین تجمع یافته، میکروساختارهای بی‌نظم یا منظم تشکیل می‌دهند. میکروساختارهای بی‌نظم ساختارهای سه بعدی ثابتی ندارند، در حالی که انواع منظم دارای اشکالی مانند فیبریل‌ها، کره‌ها، توده‌های بی‌شکل و ژل‌ها هستند [۱]. در این مقاله، به فیبریل‌ها پرداخته می‌شود.

فیبریل‌ها ساختارهایی هستند که در اکثر موجودات زنده یافت می‌شوند. آن‌ها از بیوپلیمرهای خطی تشکیل شده‌اند و دارای ساختار میله‌ای شکل هستند. طول آن‌ها (میکرومتری) در مقایسه با قطرشان (نانومتری) بسیار زیاد است [۲]. برخی از پروتئین‌ها به طور طبیعی دارای ساختار فیبریلی هستند که تضمین کننده عملکرد یا نقش ساختاری آن‌ها است؛ مانند کلاژن [۳]، الاستین [۴]، کراتین [۵] و فیبروئین [۶]. برخی دیگر، به طور طبیعی ساختار فیبریلی ندارند بلکه تغییر ساختار می‌دهند تا به فیبریل تبدیل شوند. در این میان می‌توان به پروتئین‌هایی اشاره کرد که تا

اندازه‌ای تاخوردگی آن‌ها باز شده است، در نتیجه دچار فرایند خودگردمایی شده، فیبریل‌هایی با قطری درحد نانومتر، تشکیل می‌دهند. آن‌ها اغلب بیماری‌زا هستند.

۲-۱ فیبریل‌های آمیلوئیدی

فیبریل‌های آمیلوئیدی به ساختارهای رشته‌ای شکلی گفته می‌شود که به طور غیرطبیعی تشکیل شده، در فضای خارج سلولی بافت‌ها و اندام‌ها رسوب می‌کند. اجزای تشکیل دهنده آن‌ها پروتئین‌های محلول است در حالی که رسوبات، نامحلول و به تجزیه شدن مقاومند. تصور می‌شود تجمع‌های خارج سلولی این میکروساختارهای رشته‌ای، عامل از بین رفتن بافت‌ها و اندام‌ها است که منجر به بیماری‌زایی می‌شود [۷]. بیماری‌هایی که در نتیجه تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی ایجاد می‌شود آمیلوئیدوز نام دارد. بیش از ۳۰ نوع آمیلوئیدوز در انسان وجود دارد که از جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: بیماری آلزایمر، دیابت نوع دو، پارکینسون، اختلالات آمیلوئیدی

¹ Self-assembly

درک عمیق‌تری از ساختار فیبریل‌های آمیلوئیدی در سطح مولکولی انجام شده است [۱۲].

۴-۱ آمیلوئیدسازی: خودگرد همایی پروتئین‌های تولید کننده آمیلوئید

مطالعه ساز و کار^۴ تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی از اهمیت زیادی برخوردار است زیرا درک نحوه^۵ بسپارش پپتید مونومری محلول و تبدیل آن به فیبریل بالغ نامحلول می‌تواند روش‌های درمان احتمالی، مانند به تأخیر انداختن تشکیل فیبریل، معکوس کردن فرآیند تشکیل فیبریل (انحلال فیبریل‌های تشکیل شده) یا جلوگیری از تشکیل فیبریل‌ها، ارائه دهد [۱۳].

نتایج چنین مطالعاتی برای توصیف تشکیل فیبریل، مدلی به نام مدل "بسپارش وابسته به هسته‌گذاری"^۶ [۱۴] پیشنهاد می‌کند. در این مدل ابتدا پپتید در غلظتی بالاتر از غلظت بحرانی، هسته‌ای ناهمگنی به نام مایسل پپتیدی (دانه)^۶ تشکیل می‌دهد. سپس فیبریل‌ها درون این مایسل تجمع می‌یابند و در نهایت، اتصال برگشت ناپذیر مونومرها به انتهای آزاد فیبریل‌ها باعث طویل شدن آنها می‌شود. نمودار رشد فیبریل ممکن است به صورت یک منحنی رشد با فاز تأخیری-صعودی^۷ باشد که در آن، فاز تأخیری در حضور دانه‌ها کوتاه‌تر می‌شود. در مسیر تکامل فیبریل‌های بالغ، چندین واسطه‌ی نیمه پایدار مانند دایمرها، تراپمرها، تترامرها و به طور کلی اولیگومرها شناسایی شده است. در مراحل بعدی، ساختارهای مهرانمانند که دارای طولی تا حدود ۲۰۰ نانومتر هستند و پروتوفیبریل نام دارند، تشکیل می‌شوند. در فرایند تشکیل فیبریل گاه ممکن است یک «مسیر انحرافی» دنبال شود که در آن حدواسطها به جای تشکیل فیبریل به رسوباتی بی‌شکل تبدیل گردند [۱۵].

به نظر می‌رسد در شرایط آزمایشگاهی، تاخوردگی ناصحیح پروتئین نقش کلیدی در تشکیل فیبریل ایفا کند. در این رابطه، تاکنون چندین سازوکار مولکولی مانند مدل‌های زیپ قطبی^۸ [۱۶] و مبادله دومین^۹ [۱۷] برای تشکیل

وابسته به همودیالیز، هانتینگتون، کرویتزفلت-جاکوب^۱ [۸] و انسفالوپاتی اسفنجی شکل (مانند بیماری جنون گاوی) [۹] (جدول ۱). در بیماری آلزایمر، تجمع پپتیدهای $A\beta$ در بافت مغز، دستجاتی نامحلول به نام پلاک ایجاد می‌کند. تجمع این پلاک‌ها که پلاک‌های آمیلوئیدی نام دارد منجر به از بین رفتن بافت عصبی و بیماری‌زایی می‌شود. از این رو، مطالعه فیبریل‌های آمیلوئیدی به علت اختلالات پیش‌رونده‌ای که در بیمار ایجاد می‌کند، حائز اهمیت است [۱۰].

جدول ۱: انواعی از بیماری‌های آمیلوئیدوز، پروتئین‌های پیش‌ساز و پروتئین‌های آمیلوئیدی مربوط به آنها [۹].

Disease	Precursor protein	Amyloid protein
Alzheimer's disease	Amyloid precursor protein	$A\beta$ peptides
Atrial amyloidosis	Atrial natriuretic factor (ANF)	Amyloid ANF
Spongiform encephalopathies	Prion protein (PrPc)	PrPsc
Senile systemic amyloidosis	Wild-type transthyretin	ATTR
Hemodialysis-related amyloidosis	β 2-microglobulin	$A\beta$ 2M
Hereditary non-neuropathic systemic amyloidosis	Lysozyme	ALys
Type II diabetes	Pro-IAPP	IAPP or "amylin"

۳-۱ روش‌های مطالعه‌ی فیبریل‌ها

در اوایل قرن نوزدهم با پیشرفت روش‌های سنتز پروتئین فاز جامد و سنتز سه نوع پپتید (پپتیدهای مرتبط با آلزایمر (پپتید (1-42) $A\beta$))، همولوگ‌های کوتاه شده آن‌ها و پپتیدهای کوتاه تشکیل دهنده آمیلوئید (امکان ایجاد فیبریل‌های مشابه آمیلوئید فراهم شد [۱۱]). این فیبریل‌ها از لحاظ فیزیکی، شکل ظاهری و رنگ آمیزی مشابه فیبریل‌های آمیلوئیدی بودند. از آن زمان تا کنون، با استفاده از ابزارها و روش‌های بیوفیزیکی متفاوت مانند رزونانس مغناطیسی هسته، پراش فیبر پرتو ایکس^۳، طیف سنجی دو رنگ‌نمایی دورانی، طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه و ...

⁴ Mechanism

⁵ Nucleation dependent polymerization model

⁶ Seed

⁷ Lag exponential growth curve

⁸ Polar zipper

⁹ Domain swapping model

¹ Creutzfeldt-Jakob disease

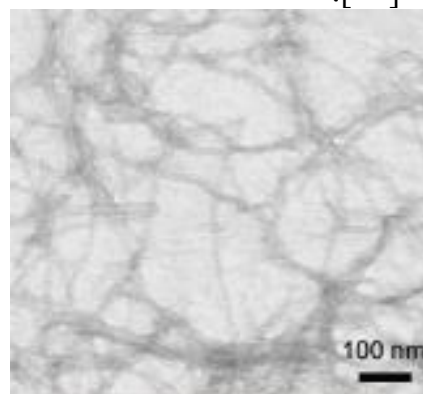
² Amyloid β peptide

³ X-ray fiber diffraction

آمیلولیدها پیشنهاد شده است. همچنین به نظر می‌رسد تشکیل آمیلولید، ویژگی عمومی تمام پپتیدها است زیرا مشخص شده است که تحت شرایط واسرشته شدن، پروتئین‌های گلوبولار (کروی) عادی که بیماری‌زا هم نیستند برای تشکیل فیبریل گردهم می‌آیند [۱۸]. هرچند، گفته می‌شود که تمایل یک (پلی)پپتید برای تشکیل آمیلولید به فاکتورهای متفاوتی از جمله بار، توالی، آب‌گریزی و ساختار دوم (پلی)پپتید بستگی دارد [۹].

۵-۱ ساختار فیبریل‌های آمیلولیدی

به علت این که فیبریل‌های آمیلولیدی ترکیباتی نامحلول و ناهمگن است، با استفاده از روش‌های رایج آزمایشگاهی نمی‌توان ساختار آنها را مطالعه کرد. افزون‌بر روش‌هایی که پیش‌تر نام‌برده شد، امروزه رزونانس مغناطیسی هسته حالت جامد^۱ (ssNMR) و رزونانس الکتروپارامغناطیسی نیز استفاده می‌شود [۱۹]. استفاده از روش‌های میکروسکوپ الکترونی و میکروسکوپ نیروی اتمی^۲ (AFM) نشان داده است که فیبریل‌ها بلند، مستقیم و بدون انشعابند (شکل ۱). اصلی‌ترین زیر واحد تشکیل دهنده یک فیبریل پروتوفیلامنت نام دارد. فیبریل‌های متفاوت سنتزی شبیه آمیلولید، بسته به شرایط خودگردهمایی، دارای تعداد متفاوتی پروتوفیلامنت بوده و از نظر ریخت شناسی بسیار متنوع هستند. پروتوفیلامنت‌ها، اغلب برای تشکیل فیبریل بالغ به دور یکدیگر می‌پیچند [۲۰].



شکل ۱. میکروگراف الکترونی مربوط به فیبریل‌های آمیلولیدی سنتزی پپتید Aβ [۱۶].

تاخوردگی پپتیدها و پروتئین‌ها در فیبریل‌های آمیلولیدی از الگوی خاصی تبعیت می‌کند. موتیف مشخصه این نحوه تاخوردگی، که با استفاده از پراش پرتو ایکس نیز تایید شده است، ساختار کراس بتا (cross-β) است [۲۱]. در این ساختار، صفحات بتا به صورت موازی بر هم قرار می‌گیرند. جهت پیوند هیدروژنی موجود بین رشته‌ها به موازات محور فیبریل بوده و رشته‌های بتا مشابه پله‌های نردبان عمود بر محور فیبریل قرار می‌گیرد (شکل ۲). این مجموعه‌های فیبریلی بسیار پایدارند [۲۲].

۶-۱ مدل‌های تشکیل فیبریل‌های آمیلولیدی

۶-۱-۱ مدل خودگردهمایی سلسله‌وار^۳

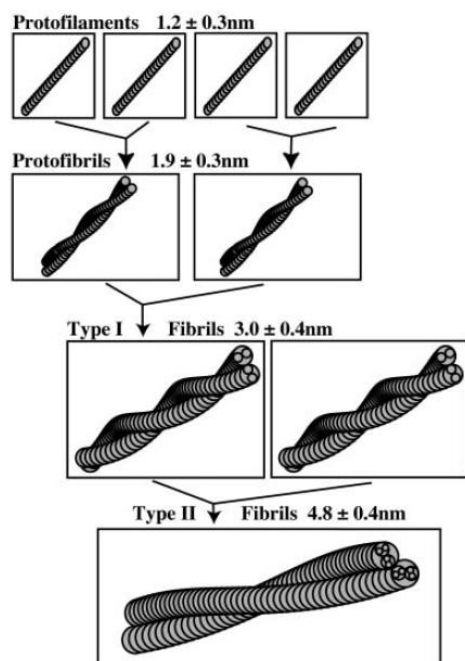
در این مدل، عقیده بر این است که پروتوفیلامنت‌ها از طریق مدل سینتیکی بسپارش هسته‌ای^۴ تشکیل می‌شوند؛ به این طریق که با اضافه شدن حدواسط‌های مونومری با تاخوردگی جزئی به انتهای پروتوفیلامنت‌های ابتدایی، طول شدن آنها انجام می‌شود. سپس، یک پروتوفیلامنت میله‌ای شکل با پروتوفیلامنت دیگر اندرکنش داده، پروتوفیبریل (شامل ۲ و گاهی ۳ پروتوفیلامنت) ایجاد می‌شود (شکل ۳). در نهایت دو پروتوفیبریل درهم پیچیده شده، فیبریل بالغ تولید می‌شود. پروتوفیبریل‌ها و فیبریل‌ها ساختارهای مستقیم میله‌ای شکل هستند و سخت‌تر از پروتوفیلامنت هستند. عامل پیش‌برنده‌ی اندرکنش پروتوفیلامنت‌ها برای تشکیل پروتوفیبریل‌ها، پروتوفیبریل‌ها برای تشکیل فیبریل‌ها و همچنین، اتصال فیبریل‌ها به یکدیگر، اندرکنش‌های آب‌گریزی و الکتروستاتیک است (شکل ۳) [۲۳].

³ The hierarchical assembly model

⁴ Nucleated polymerization kinetic model

¹ Solid-state Nuclear Magnetic Resonance

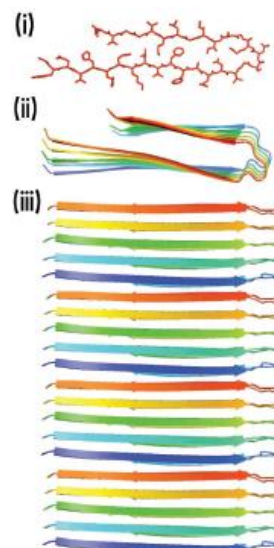
² Atomic Force Microscopy



شکل ۳. مدل خودگرد همایی سلسله‌وار برای تشکیل فیبریل‌های آمیلونیدی انسولین. یک جفت پروتوفیلانمنت برای تشکیل پروتوفیبریل در هم پیچیده می‌شوند. دو پروتوفیبریل با پیچ خوردن به دور هم فیبریل‌های نوع I را ایجاد می‌کند. در هم پیچیده شدن دو فیبریل نوع I فیبریل نوع II را به وجود می‌آورد [۲۳].

۷-۱ فیبریل‌های غیربیماری‌زا

اخیراً پروتئین‌هایی شناسایی شده‌اند که بیماری‌زا نیستند اما در شرایط آزمایشگاهی می‌توانند فیبریل‌های آمیلونیدی تشکیل دهند. از میان آنها می‌توان به اسیل فسفاتازها، پروتئین‌های شوک سرمایی، لیزوزیم سفیده‌ی تخم مرغ، دومین B₁ از پروتئین G، دومین SH3 به عنوان توالی حفاظت شده در بسیاری از پروتئین‌ها، سیتوکروم C و میوگلوبین اشاره کرد [۲۶-۲۷].



شکل ۲. ساختار فیبریل‌های آمیلونیدی مربوط به پپتید Aβ با استفاده از داده‌های ssNMR. (i) نمای بالایی یک صفحه متشکل از دو رشته بتا همراه با زنجیره‌های جانبی به صورت کارتونی، (ii) نمای بالایی ساختار کراس بتا، (iii) نمای جانبی که مشخص می‌کند رشته‌های بتا به صورت عمودی نسبت به محور فیبریل قرار می‌گیرد [۲۴].

۱-۶-۲ مدل خودگرد همایی دو قطبی‌ها^۱

علی‌رغم مشاهدات زیادی که اشاره دارد پرتوفیلانمنت‌ها واحدهای سازنده فیبریل‌های بالغ هستند، مدل خودگرد همایی سلسله‌وار، مدلی که به طور فراگیر پذیرفته شده باشد، نیست. براساس نتایج آنالیزهای انجام شده، مدل دیگری به نام "خودگرد همایی دو قطبی‌ها" ارائه شد. در این مدل، توضیح داده می‌شود که پپتیدهای منفرد به صورت مهره‌های کوچک ظاهر شده، به هم می‌پیوندند تا ساختارهای مهره مانند بزرگتری ایجاد کنند که هر یک شامل ۸ تا ۱۰ مونومر است و واحد هسته‌ای^۲ نامیده می‌شود. واحدهای هسته‌ای با استفاده از ممان دو قطبی ذاتی^۳ یا القایی^۴ به شیوه سر به دم به هم پیوند شده، رشته‌ها (فیبریل‌های بالغ) را به وجود می‌آورند. به عبارتی، مدل خودگرد همایی در دو مرحله انجام می‌شود: (۱) تشکیل واحدهای هسته‌ای و (۲) تجمع واحدهای هسته‌ای. مدل خودگرد همایی دو قطبی‌ها برای پروتئین Sup35 (یکی از زیر واحدهای مربوط به فاکتور پایان ترجمه در مخمر) پیشنهاد شده است [۲۵] (شکل ۴).

¹Dipole assembly model

²Nucleation unit

³Intrinsic dipole moment

⁴Induced dipole moment

⁵ SRC Homology 3 Domain

تشکیل بیوفیلیم، اتصال به سلول میزبان و تهاجم به آن نقش دارد. این ساختار همچنین، القا کننده بالقوه پاسخ التهابی در میزبان است [۲۸]. افزون بر این، قارچ‌ها پروتئین‌هایی به نام آب گریز تولید می‌کنند که توانایی تشکیل فیبریل‌های غنی از صفحات بتا دارند. این فیبریل‌ها در ساختار اسپورها و هاگدان‌های قارچ نقش محافظتی ایفا می‌کنند. همچنین، پروتئین‌ها در مخمر نقش عملکردی دارند و تجمعات رشته‌ای در سیتوپلاسم تشکیل می‌دهند. در پستانداران نیز پروتئینی به نام Pmel۱۷^۲ در سنتر ملانین دخالت دارد. به تازگی مشخص شده است که Pmel۱۷ ساختار رشته‌ای با تمام ویژگی‌های مربوط به فیبریل‌های آمیلوئیدی تشکیل می‌دهد [۲۹].

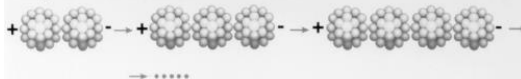
۱-۷-۲ کاربردها در زمینه زیست فناوری

فیبریل‌های آمیلوئیدی به دلیل نقش بالقوه‌ای که در تشکیل داربست‌های نانولوله‌ای دارند، در حوزه بیوتکنولوژی توجه ویژه‌ای به خود جلب کرده‌اند. فیبریل‌ها می‌توانند به تنهایی بسیار محکم باشند و از طریق گردهمایی با پروتئینی دارای عملکرد مورد بهره برداری قرار گیرند [۳۰]. آن‌ها همچنین می‌توانند به عنوان بستری برای اتصال فلزات استفاده شوند [۳۱]. در یک پژوهش، سیتوکروم b562 (پروتئینی دارای عملکرد) را با دومین SH3 (توالی حفاظت شده در بسیاری از پروتئین‌ها، قادر به آمیلوئیدسازی) گردآوردند. این گردهمایی دارای ساختاری مشابه آمیلوئید بوده و در عین حال، ویژگی عملکردی سیتوکروم تاخورده و گلوبولار را نیز نشان می‌دهد [۳۰]. نانوسیم‌ها از طریق گردهمایی ناحیه انتهای آمین در پروتئین Sup35 در مخمر (که تشکیل پروتئین Sup35 می‌دهد) ساخته می‌شود. در پروتئین Sup35 زیرواحدهای سیستئین که به طور مهندسی شده‌ای در دسترس قرار گرفته‌اند با نانوذرات طلا به صورت کونژوگه در می‌آید. تجمع ذرات کلونیدی طلا و نقره در امتداد رشته‌ها، منجر به ایجاد سیم‌هایی با قطری حدود ۱۰۰ نانومتر می‌شود (شکل ۵-۱). از طرف دیگر، خودگردهمایی یک پپتید خیلی کوتاه (متشکل از دو فیل آلانین) نانولوله‌های مشابه آمیلوئید را تشکیل می‌دهد که ممکن است با تجمع یون‌های نقره در مرکز

Step 1: Formation of nucleation units.



Step 2: Formation of fibers.



شکل ۴. مدل تشکیل فیبریل برای پروتئین Sup35 در مخمر. (مرحله ۱) تجمع پپتیدهای دومین NM (تشکیل دهنده فیبریل) با تاخوردگی ناصحیح و تشکیل واحدهای هسته‌ای از طریق اندرکنش‌های آب گریز. (مرحله ۲) تجمع خطی واحدهای هسته‌ای از طریق ممان دوقطبی ذاتی و تشکیل فیبریل‌های آمیلوئید [۲۵].

به طور کلی، هر سیستمی که در آن بتوان آمیلوئیدسازی را در شرایط آزمایشگاهی القا کرد، برای مطالعه در این زمینه ارزشمند است. تصور می‌شود فیبریل‌های آمیلوئیدی دارای محتوای بالایی از صفحات بتا باشد؛ هرچند، میوگلوبین طبیعی فاقد صفحات بتا است و انسولین تنها دارای یک رشته بتای کوچک است. این موارد پیشنهاد می‌کند که برای تشکیل فیبریل آمیلوئیدی در این پروتئین‌ها، ساختار دوم از مارپیچ آلفا به صفحات بتا تغییر می‌کند. همچنین، به نظر می‌رسد صورت بندی‌های با تاخوردگی ناقص که با استفاده از جهش، تغییرات pH و یا قدرت یونی ایجاد می‌شود، حدواسط‌های حساسی در تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی باشد [۲۳].

۱-۷-۱ بهره برداری از آمیلوئیدها در طبیعت

آمیلوئیدهای عملکردی^۱، فیبریل‌های آمیلوئیدی بسیار پایدار و مقاوم به تجزیه هستند. استحکام آن‌ها در مقابل کشش، مشابه فولاد است و در این ویژگی با ساختار هم خانواده خود یعنی ابریشم مشترکند. به تازگی، چندین شکل عملکردی غیر بیماری‌زا از آمیلوئیدها در باکتری‌ها، قارچ‌ها، حشرات و پستانداران شناسایی شده است. کرلی (curli)، ساختار رشته‌ای شکلی است که در سطح باکتری‌هایی مانند E.coli پیدا می‌شود. این رشته‌ها، ساختارهایی مشابه آمیلوئید دارند. تنظیم دقیق فرایند فیبریلاسیون توسط یک کمپلکس پروتئینی انجام می‌شود که در ماتریکس خارج سلولی بسیاری از انتروباکتریاسه‌ها وجود دارد. کرلی در چسبیدن به سطح سلول، تجمع سلول‌ها،

¹Functional amyloids

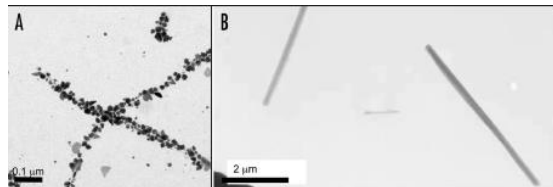
² Premelanosome protein 17

فیبریل‌هایی ایجاد می‌کند که دارای ساختار و پایداری متفاوت هستند؛ همچنین، دارای سمیت سلولی نیز هستند [۳۳]. لیزوزیم سفیده تخم مرغ نیز قابلیت ایجاد گونه‌هایی از فیبریل دارد که ویژگی و ویژگی فیبریل‌های آمیلوئیدی را نشان می‌دهد. بررسی‌ها مشخص کرد تفاوت‌های ساختاری و عملکردی موجود بین آمیلوئید لیزوزیم سفیده تخم مرغ با آمیلوئید لیزوزیم انسانی، در اندرکنش فیبریل‌ها با نانوذرات سوپراپارامغناطیس اکسید آهن تأثیر می‌گذارد. سرعت تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در حضور این نانوذرات کاهش می‌یابد. حداکثر مقدار کاهش در نسبت ۱:۵ از نانوذرات: آمیلوئید لیزوزیم سفیده تخم مرغ است. به وضوح مشخص شده است که آمیلوئیدهای حاصل از لیزوزیم سفیده تخم مرغ برای تمام دودمان‌های سلولی مورد آزمایش سمیت دارند؛ هرچند، در حضور نانوذرات سوپراپارامغناطیسی سمیت آن‌ها حدود ۲۰ تا ۴۰ درصد کاهش می‌یابد [۳۴].

۲-۲ نانوذرات درخت‌سان^۱

در تحقیقاتی، از ترکیبات درخت‌سان پلی‌آمیدوآمین مربوط به نسل‌های دو، سه و چهار استفاده شده است. این ترکیبات از یک هسته اتیلن‌دی‌آمین و انشعابات متیل‌آکریلات و اتیلن‌دی‌آمین ساخته شده‌اند و ساختارهای نانومتری با اندازه‌هایی حدود ۲/۹ نانومتر، ۳/۶ نانومتر و ۴/۵ نانومتر (به ترتیب مربوط به نسل‌های دو، سه و چهار) تشکیل می‌دهند. این ترکیبات براساس نسل خود معرفی می‌شوند، نسل بالاتر نشان‌دهنده‌ی تعداد مونومرهای بیشتر و در نتیجه اندازه‌ی بزرگتر نانوذرات است [۳۵]. در یک تحقیق، مشخص شد ترکیبات درخت‌سان نسل دو در تمام غلظت‌ها و نسل چهار در غلظت‌های بالا، تسریع کننده فرایند فیبریلاسیون است و اثر آن از طریق افزایش سرعت در فاز هسته‌گذاری است، اما مقدار نهایی فیبریل نسبت به حالتی که نانوذرات درخت‌سان وجود ندارد، تفاوتی نمی‌کند. در مقابل، ترکیبات درخت‌سان نسل سه و نسل چهار در غلظت‌های پایین، از سرعت تشکیل فیبریل می‌کاهد؛ هرچند، همچنان مقدار فیبریل تشکیل شده هم‌اندازه‌ی حالت بدون استفاده از این ترکیبات است [۳۶].

نانولوله (شکل ۵-B) [۳۱] نانوسیم‌هایی با قطر ۲۰ نانومتر ایجاد کند.



شکل ۵. فیبریل‌های آمیلوئیدی برای کاربردهای نانوبیوتکنولوژی. (A) نانوسیم‌ها بر پایه‌ی ناحیه انتهایی آمین در پروتئین Sup 35 در مخمر. نانوذرات طلا به صورت کووالانت به زیرواحدهای سیستمین در پروتئین متصل شده است و ذرات نقره و طلای کلونیدی کونژوگه برای تشکیل نانوسیم‌ها در طول فیبریل تجمع پیدا می‌کند. (B) خودگردمایی دی‌فنیل آلانین برای تشکیل نانولوله‌ها که می‌تواند برای تشکیل نانوسیم‌ها با نقره پر شود [۲۹].

۲- بررسی تأثیر نانومواد بر فیبریلاسیون پروتئین

همان‌طور که پیش‌تر توضیح داده شد به دلیل نقش فیبریل‌های آمیلوئیدی در بیماری‌زایی و همچنین کاربردهای نانوزیست فناوری، مهار فرایند تشکیل فیبریل و یا القا آن هر یک از جهاتی حائز اهمیت می‌باشد. تاکنون اثر طیف وسیعی از ترکیبات طبیعی و سنتزی بر فرایند فیبریلاسیون بررسی شده است. گروهی از آن‌ها نانومواد هستند؛ هرچند، اثر آن‌ها بر تشکیل فیبریل بحث برانگیز است. برخی، اثر مثبت بر تشکیل فیبریل دارند [۳۲]، برخی دیگر از تشکیل آن ممانعت به عمل می‌آورند. گروهی نیز تأثیری بر سینتیک تشکیل فیبریل ندارند. در ادامه به برخی از آن‌ها پرداخته می‌شود.

۲-۱ نانوذرات سوپر پارامغناطیسی آهن اکسید

نانوذرات مغناطیسی گروهی از نانومواد زیست سازگار و غیر سمی هستند که اثر آن‌ها بر تشکیل فیبریل آمیلوئیدی و سمیت سلولی بررسی شده است. در یک تحقیق پروتئین مدل، لیزوزیم سفیده تخم مرغ بوده است که از شباهت ساختاری بالایی با لیزوزیم انسانی برخوردار است. این پروتئین دارای چهار باند دی‌سولفیدی است. لیزوزیم انسانی در افرادی که به طور سیستمیک در خانواده از آمیلوئیدوز لیزوزیم رنج می‌برند، آمیلوئید تشکیل می‌دهد. این بیماری زمانی اتفاق می‌افتد که جهش‌های آمیلوئیدساز در پروتئین منجر به تشکیل واسطه‌هایی با تاخوردگی ناقص می‌شود و

۳-۲ نانوذرات حاصل از ماده فعال در سطح

ماده فعال در سطح یک ماده‌ی فعال سطحی است. این مولکول دوگانه‌دوست بوده، دارای هر دو بخش آبگریز و آبدوست است؛ به همین دلیل، توانایی قرارگیری در دو فاز سیال مانند روغن-آب یا هوا-آب دارد. ماده فعال در سطح‌ها باعث کاهش کشش سطحی شده، در غلظت‌های بالاتر از CMC (غلظت بحرانی تشکیل مایسل) به طرز چشمگیری مایسل تشکیل می‌دهند. آن‌ها از نظر بار به انواع غیریونی، آنیونی، کاتیونی و زوئیتريونی (دویونی) تقسیم می‌شوند [۳۷].

۳-۲-۱ ماده فعال در سطح‌های آنیونی

در یک‌سری از مطالعات، اثر ماده فعال در سطح آنیونی سدیم دو دسیل سولفات (SDS) بر فیبریل‌های آمیلوئیدی بررسی شد. بررسی‌ها نشان می‌دهد در نزدیکی CMC، نانومایسل‌های SDS تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی پپتید $A\beta$ را تحریک می‌کنند [۳۸]. مطالعه بر روی پروتئین مدل دیگر به نام پروتئین ریپوزومی S6 (مربوط به زیر واحد کوچک ریپوزوم در باکتری Thermophilus) نشان می‌دهد این پروتئین نیز طی انکوباسیون طولانی مدت در pH پایین و غلظت بالای نمک تشکیل فیبریل می‌دهد [۳۹]. در این مورد، SDS در غلظت‌های زیر CMC موجب القای تجمعات (و نه فیبریل) در پروتئین می‌شود [۴۰].

۳-۲-۲ ماده فعال در سطح زوئیتريونی

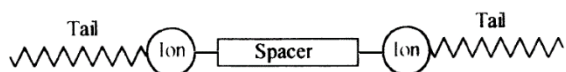
در تحقیقات انجام شده بر روی این دسته از ماده فعال در سطح‌ها اثر دو ماده فعال در سطح $(di-C_7-PC)^2$ و $(di-C_6-PC)$ بر فیبریل‌سازی انسولین گاوی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج، حاکی از آن است که هر دو ماده فعال در سطح باعث کاهش تشکیل صفحات بتا و تجمعات آن‌ها، که مشخصه تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی است، می‌شود [۴۱]. بررسی‌ها نشان داده است مقدار این کاهش به غلظت ماده فعال در سطح بستگی دارد.

۳-۳-۲ ماده فعال در سطح‌های غیریونی

از سایر موادی که اثر آن‌ها بر فیبریل‌سازی مورد بررسی قرار گرفته است می‌توان به تریتون ایکس ۱۰۰ و α -Dودسیل-بتا-دی-مالتوزاید^۴ اشاره کرد. در پژوهشی، اثر این دو دترجنت غیریونی بر تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در لیزوزیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد اندرکنش مولکول‌های مونومر دترجنت (در غلظت‌های پایین‌تر از CMC) با ناحیه آمیلوئیدساز لیزوزیم، منجر به مهار آمیلوئیدسازی در این پروتئین می‌شود [۴۲].

۳-۳-۴ ماده فعال در سطح‌ها

ماده فعال در سطح به گروهی از ماده فعال در سطح‌ها گفته می‌شود که دارای یک زنجیره هیدروکربنی بلند، یک سر قطبی، یک فاصله‌انداز، یک سر قطبی دیگر و یک زنجیره هیدروکربنی دیگر است (شکل ۶). به بیان دیگر، این ماده فعال در سطح‌ها دارای دو گروه آبدوست و دو (یا گاهی سه) زنجیره‌ی آبگریز است [۳۷].

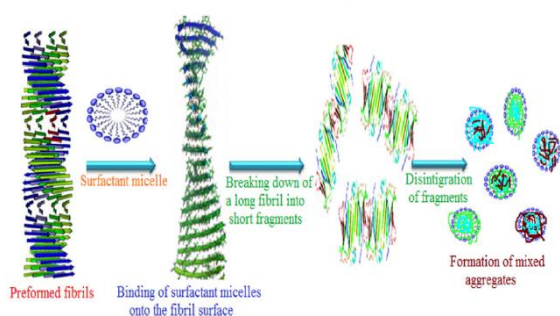


شکل ۶. تصویر طرح‌واره از یک مولکول ماده فعال در سطح [۸۸].

اغلب، مطالعات انجام شده بر اندرکنش ماده فعال در سطح‌ها و فیبریل‌های آمیلوئیدی به صورت مقایسه‌ای انجام می‌شود. به عنوان مثال، اثر ماده فعال در سطح کاتیونی

$[C_{12}H_{25}(CH_3)_2N(CH_2)_6N(CH_3)_2C_{12}H_{25}]^4$ Br_2 (به اختصار $C_{12}C_6C_{12}Br_2$) و ماده فعال در سطح کاتیونی تک زنجیره‌ای دو دسیل‌تری‌متیل‌آمونیم برماید (DTAB) بر تجمع پذیری پپتید $A\beta$ ، مربوط به آلزایمر، بررسی شده است. نتایج نشان می‌دهد هر دو نوع ماده فعال در سطح، بسته به غلظت، می‌توانند تجمعات را در پپتید القا کنند. در غلظت‌های زیر CMC، مونومرهای ماده فعال در سطح به صورت الکتروستاتیک به پپتید $A\beta$ متصل می‌شود. این برهم‌کنش تغییر صورت‌بندی پپتید را از حالت

نشان می‌دهد. این توانایی به وسیله اندرکنش‌های آبریز بین دم‌های مولکول ماده فعال در سطح و مناطق آبریز فیبریل‌ها شدت گرفته، در نهایت به ایجاد اختلال در بخش‌های رشته‌ای فیبریل‌ها می‌انجامد. در نتیجه فیبریل‌های ضخیم به قطعات کوچکتر شکسته می‌شود. سازوکار پیشنهادی برای سازوکار تجزیه فیبریل‌های سیستم‌های مغز بز با نانومایسل‌های ماده فعال در سطح در شکل ۷ آورده شده است [۴۴].



شکل ۷. سازوکار احتمالی تجزیه فیبریل‌های سیستم‌های مغز بز با نانومایسل‌های ماده فعال در سطح [۴۴].

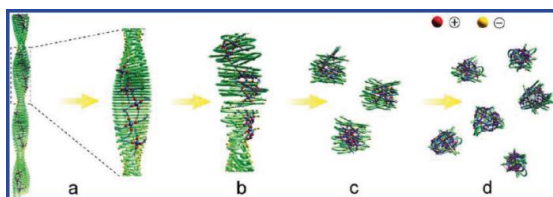
به دلیل این که ماده فعال در سطح‌ها، نسبت به ماده فعال در سطح‌های معمولی، دارای بارهای مثبت و دم‌های آبریز بیشتر هستند و در نتیجه ویژگی خودگردهمایی قوی‌تری دارند، انتظار می‌رفت که این ویژگی منجر به افزایش اثربخشی آن‌ها نسبت به ماده فعال در سطح‌های معمولی شود. به همین دلیل، این ایده به وجود آمد که گونه‌هایی از ماده فعال در سطح‌های کاتیونی جدید، واجد CMC پایین‌تر، طراحی شود تا از مقدار ماده فعال در سطح مورد نیاز برای تجزیه فیبریل‌های حاصل از پپتید $A\beta$ بکاهد. در نهایت، به یک ماده فعال در سطح تترامری که دارای گروه آمین نوع چهارم است رسیدند که رفتار خودگردهمایی ویژه‌ای نشان می‌داد (شکل ۸). این ماده فعال در سطح که به اختصار PATC^۲ نام دارد دارای چهار زنجیره آبریز و چهار سر آبدوست باردار مثبت است که به وسیله‌ی گروه فاصله‌انداز آمیدی به هم متصل شده‌اند. مقدار CMC در این ماده فعال در سطح بسیار کمتر از

کلافی شکل به ساختار منظم صفحات بتا تسهیل می‌کند. با افزایش غلظت ماده فعال در سطح، ساختارهای منظم صفحات بتا شروع به گسیختن کرده، تجمعات کروی شکل کمپلکس پپتید با نانومایسل‌های ماده فعال در سطح ایجاد می‌شود. علت گسیختگی، اندرکنش‌های دافعه بین سرهای ماده فعال در سطح متصل به پپتید $A\beta$ و نیز تشکیل خوشه‌های کوچک آبریز مربوط به مولکول‌های ماده فعال در سطح است. به طور مشخص، برای القا تشکیل فیبریل در غلظت‌های بسیار پایین از ماده فعال در سطح، ماده فعال در سطح $C_{12}C_6C_{12}Br_2$ در مقایسه با DTAB، دارای توانایی اتصال قوی‌تر به پپتید $A\beta$ است [۴۳].

در پژوهشی دیگر، اثر ماده فعال در سطح‌های معمولی SDS، ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم‌برماید (CTAB) و ماده فعال در سطح کاتیونی ($C_{16}C_4C_{16}Br_2$)^۱، در غلظت‌های بالای CMC، بر روی فیبریل‌های سیستم‌های مغز بز بررسی شد. مشاهده می‌شود که نانومایسل‌های ماده فعال در سطح‌های کاتیونی $C_{16}C_4C_{16}Br_2$ و CTAB به صورت مؤثری در فیبریل‌های بالغ سیستم‌های مغز بز اختلال ایجاد می‌کند. هرچند، ماده فعال در سطح بیشترین اثر را نشان می‌دهد. فرایند تجزیه فیبریل‌ها به احتمال زیاد در ابتدا تحت تأثیر اندرکنش‌های الکتروستاتیک انجام می‌شود. به دنبال آن، اجتماعی آبریز بین نانومایسل‌های ماده فعال در سطح و بخش‌های فیبریلی ایجاد می‌شود که منجر به ناپایداری پیوندهای هیدروژنی موجود در صفحات بتای مربوط به فیبریل‌های آمیلوئیدی سیستم‌های مغز بز می‌شود [۴۴]. ماده فعال در سطح $C_{16}C_4C_{16}Br_2$ به دلیل ویژگی آبریزی بیشتر و همچنین، داشتن دو سر کاتیونی در مقایسه با دو ماده فعال در سطح معمولی دیگر (CTAB و SDS)، توانایی بیشتری در اتصال به فیبریل‌های سیستم‌های مغز بز و بی‌ثبات کردن ساختار فیبریلی آن،

^۲ N^1, N^{16} -didodecyl-7,10-bis(3-(2-(dodecyl)dimethylammonio)ethylamino)-3-oxopropyl)- N^1, N^1, N^{16}, N^{16} -tetramethyl-4,13-dioxo-3,7,10,14-tetraazahexadecane-1,16-diaminium tetrabromide

^۱ tetramethylene-1,4-bis (hexadecyldimethylammonium bromide)

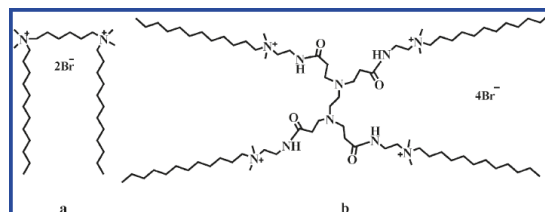


شکل ۹. سازوکار پیشنهادی برای تجمعات پیش مایسلی PATC که منجر به تجزیه فیبریل‌های پپتید $A\beta$ می‌شود. (a) مولکول‌های PATC از طریق اندرکنش‌های الکتروستاتیک روی سطح فیبریل‌ها متصل می‌شود. (b) و (c) فیبریل به دلیل تجمعات شبکه مانند پیش مایسلی PATC به قطعات کوچک‌تر شکسته می‌شود. (d) تجزیه کامل فیبریل‌ها و ایجاد تجمعات کلوخه‌ای شکل مختلط از پپتید و ماده فعال در سطح [۴۵].

۵. منابع

- [1] M.R.H. Krebs, G.L. Devlin, A. Donald, Biophys. J., 92, 1336-1342, (2007).
- [2] P. Fratzl, K. Misof, I. Zizak, G. Rapp, H. Amenitsch, S. Bernstorff, J. Struct. Biol., 122, 119-122, (1998).
- [3] K.E. Kadler, A. Hill, E.G. Canty-Laird, Curr. Opin. Cell Biol., 20, 495-501, (2008).
- [4] B. Aaron, J. Gosline, Biopolymers, 20, 1247-1260, (1981).
- [5] B. Wang, W. Yang, J. McKittrick, M.A. Meyers, Prog. Mater. Sci., 76, 229-318, (2016).
- [6] J.M. Gosline, M.E. DeMont, M.W. Denny, Endeavour, 10, 37-43, (1986).
- [7] M. Pepys, Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences 356, 203-211, (2001).
- [8] A. Rekas, V. Lo, G.E. Gadd, R. Cappai, S.I. Yun, Macromol. Biosci., 9, 230-238, (2009).
- [9] R.N. Rambaran, L.C. Serpell, Prion, 2, 112-117, (2008).
- [10] G.M. Png, R.J. Falconer, D. Abbott, IEEE Trans. Terahertz Sci. Technol., 6, 45-53, (2016).
- [11] L.C. Serpell, Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis., 1502, 16-30, (2000).
- [12] T. Sharma, N. Dohare, M. Kumari, U.K. Singh, A.B. Khan, M.S. Borse, R. Patel, RSC Adv., 7, 16763-16776, (2017).

مقدار آن در ماده فعال در سطح‌ها است. به همچنین، این ماده فعال در سطح در غلظت‌های پیش مایسلی اجتماعات شبکه مانند تشکیل می‌دهد (شکل ۹). پیش از این، مشخص شده بود، ماده فعال در سطح‌های کاتیونی $C_{16}C_4C_{16}Br_2$ سرعت هسته گذاری پپتید $A\beta$ را کاهش می‌دهد و از اتصالات جانبی^۱ بین فیبریل‌ها جلوگیری می‌کند. هرچند، همتای مونومری این ماده فعال در سطح‌های ۱۶ کرانه (C_{16}) رفتاری عکس از خود نشان می‌دهد؛ به این طریق که، سرعت هسته گذاری و اتصالات جانبی بین فیبریل‌ها به وسیله‌ی آن‌ها به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. این موضوع نیز روشن بود که در شرایط آزمایشگاهی، فیبریل‌های بالغ مربوط به پپتید $A\beta$ به طور مؤثری توسط نانومایسل‌های $C_{16}C_4C_{16}Br_2$ تجزیه می‌شود. هدف، بررسی این موضوع بود که آیا ساختارهای ستاره‌ای شکل PATC، در شرایط فیزیولوژیک، قابلیت تجزیه‌ی فیبریل‌های $A\beta$ را دارد؟ نتیجه‌ی مطالعات مشخص کرد که PATC محیطی بسیار قوی برای تجزیه فیبریل‌های $A\beta$ حتی در غلظت‌های خیلی پایین‌تر از CMC ایجاد می‌کند. علت آن، توانایی خودتجمعی قوی PATC در غلظت‌های زیر CMC است [۴۵].



شکل ۸. ساختار مولکولی (a) ماده فعال در سطح $C_{16}C_4C_{16}Br_2$ و (b) ماده فعال در سطح تترامری PATC [۴۵].

^۱ Lateral association



- [28] M.M. Barnhart, M.R. Chapman, *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 131-147, (2006).
- [29] T. Scheibel, R. Parthasarathy, G. Sawicki, X.M. Lin, H. Jaeger, S.L. Lindquist, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 4527-4532, (2003).
- [30] A.J. Baldwin, R. Bader, J. Christodoulou, C.E. MacPhee, C.M. Dobson, P.D. Barker, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 2162-2163, (2006).
- [31] M. Reches, E. Gazit, *Science*, 300, 625-627, (2003).
- [32] S. Linse, C. Cabaleiro-Lago, W.F. Xue, I. Lynch, S. Lindman, E. Thulin, S.E. Radford, K.A. Dawson, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 8691-8696, (2007).
- [33] A. Kastorna, V. Trusova, G. Gorbenko, P. Kinnunen, *Chem. Phys. Lipids*, 165, 331-337, (2012).
- [34] A. Naik, P. Kambli, M. Borana, N. Mohanpuria, B. Ahmad, V. Kelkar-Mane, U. Ladiwala. *Int. J. Biol. Macromol.*, 74, 439-446, (2015).
- [35] B. Klajnert, M. Bryszewska, *Bioelectrochemistry*, 70, 50-52, (2007).
- [36] O. Nowacka, K. Milowska, S. Belica-Pacha, B. Palecz, K. Šipošová. *Z. Gazova. M. Bryszewska, Int. J. Biol. Macromol.*, 82, 54-60, (2016).
- [37] F. Menger, C. Littau, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 10083-10090, (1993).
- [38] V. Rangachari, D.K. Reed. B.D. Moore, T.L. Rosenberry, *Biochemistry*, 45, 8639-8648, (2006).
- [39] J.S. Pedersen. G. Christensen, D.E. Otzen, *J. Mol. Biol.* 341, 575-588, (2004).
- [40] D.E. Otzen, L.W. Nesgaard, K.K. Andersen, J.H. Hansen, G. Christiansen, H. Doe, P. Sehgal, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 1784, 400-414, (2008).
- [41] S.S. Wang, K.N. Liu, T.C. Han, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.*, 1802, 519-530, (2010).
- [13] T.R. Jahn, M.J. Parker, S.W. Homans, S.E. Radford, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 195-201, (2006).
- [14] J.H. Come, P.E. Fraser, P.T. Lansbury, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 5959-5963, (1993).
- [15] J.D. Harper, S.S. Wong, C.M. Lieber, P.T. Lansbury, *Biochemistry*, 38, 8972-8980, (1999).
- [16] M.F. Perutz, T. Johnson, M. Suzuki, J.T. Finch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, 5355-5358, (1994).
- [17] R.A. Staniforth, S. Giannini, L.D. Higgins, M.J. Conroy, A.M. Hounslow, R. Jerala, C.J. Craven, J.F. Walltho, *EMBO J.*, 20, 4774-4781, (2001).
- [18] F. Bemporad, N. Taddei, M. Stefani, F. Chiti, *Protein Sci.*, 15, 862-870, (2006).
- [19] S.A. Jayasinghe, R. Langen, *J. Biol. Chem.*, 279, 48420-48425, (2004).
- [20] J.L. Jiménez, E.J. Nettleton, M. Bouchard, C.V. Robinson, C.M. Dobson, H.R. Saibil, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 9196-9201, (2002).
- [21] A. Geddes, K. Parker, E. Atkins, E. Beighton, *J. Mol. Biol.*, 32, 343-344, (1968).
- [22] O.S. Makin, E. Atkins, P. Sikorski, J. Johansson, L.C. Serpell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 315-320, (2005).
- [23] R. Khurana, C. Ionescu-Zanetti, M. Pope, J. Li, L. Nielson, M. Ramírez-Alvarado, L. Regan, A.L. Fink. *S.A. Carter, Biophys. J.*, 85, 1135-1144, (2003).
- [24] A.T. Petkova, Y. Ishii, J.J. Balbach, O.N. Antzutkin, R.D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 16742-16747, (2002).
- [25] S. Xu, B. Bevis, M.F. Arnsdorf, *Biophys. J.*, 81, 446-454, (2001).
- [26] M. Ramírez-Alvarado, J.S. Merkel, L. Regan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 8979-8984, (2000).
- [27] J. Zurdo, J. Guijarro, J.L. Jiménez, H.R. Saibil, C.M. Dobson, *J. Mol. Biol.*, 311, 325-340, (2001).



- [42] K. Siposova, T. Kozar, A. Musatov. Colloids Surf. B, 150, 445-455, (2017).
- [43] Y. Li, M. Cao, Y. Wang, J. Phys. Chem. B, 110, 18040-18045, (2006).
- [44] W.F. Bhat, I.A. Bhat, S.A. Bhat, B. Bano, Int. J. Biol. Macromol., 93, 493-500, (2016).
- [45] C. He, Y. Hou, Y. Han, Y. Wang, Langmuir, 27, 4551-4556, (2011).