

کاهش میزان تشکیل آمیلوئید انسولین در اثر تغییر شیمیایی اسید آمینه لیزین توسط سیتراکونیک انهیدرید

عاطفه ربیعی^۱، عطیه قاسمی^۲، دینا مرشدی^۳، مرجان صباغیان^۴، آزاده ابراهیم حبیبی^{۵*}

چکیده

مقدمه: فیبرهای آمیلوئیدی، ساختارهای منظم حاصل از تجمع پروتئینی می‌باشند که از جمله در محل تزریق‌های مکرر انسولین مشاهده شده‌اند. تغییر در ساختار انسولین می‌تواند باعث کاهش میل به این تجمع شود. در تحقیق حاضر، لیزین انسولین با استفاده از سیتراکونیک انهیدرید تغییر داده شده است و تاثیر این تغییر بر این فرایند بررسی شده است. **روش‌ها:** برای جدا کردن یون روی انسولین و تبدیل فرم هگزامری آن به فرم مونومری و فعال، از بافر حاوی EDTA استفاده شد. تغییر شیمیایی لیزین به سیتراکونیل لیزین با استفاده از سیتراکونیک انهیدرید در محیط بازی انجام شد. سپس هر دو نمونه طبیعی و تغییر داده شده به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تشکیل تجمعات آمیلوئیدی برای پروتئین انسولین انکوبه شدند. **یافته‌ها:** مطالعه ساختارهای دوم و سوم پروتئین شاهد و تغییر داده شده، به وسیله تکنیک‌های دورنگ نمایی دورانی و فلورسانس ذاتی، تفاوت محسوسی را در این ساختارها بین این دو نمونه نشان نداد. بررسی و مقایسه دو نمونه شاهد و آزمودنی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط تشکیل تجمعات به وسیله تکنیک‌های دو رنگ نمایی دورانی دور، مطالعه تغییرات جذب نوری کنگورد با تکنیک اسپکتروسکوپی، بررسی طیف نشر تیوفلاوین T با دستگاه فلورسانس و تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی، کاهش قابل ملاحظه تجمعات فیبرهای آمیلوئیدی را در نمونه تغییر داده شده نسبت به نمونه شاهد نشان داد. **نتیجه‌گیری:** تغییر شیمیایی اسید آمینه لیزین در پروتئین انسولین به وسیله سیتراکونیک انهیدرید باعث کاهش قابل ملاحظه تجمعات آمیلوئیدی می‌شود که بالقوه نوع مطلوب‌تری از انسولین را بدست می‌دهد.

واژگان کلیدی: انسولین گاوی، لیزین، سیتراکونیک انهیدرید، تجمعات پروتئینی (فیبرهای آمیلوئیدی)

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران

۲. مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران

۳. پژوهشکده صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

۴. گروه آندرولولژی، مرکز تحقیقات پزشکی ناباروری، پژوهشگاه رویان، تهران

۵. مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: aehabibi@sina.tums.ac.ir

مقدمه

دیابت نوع ۱، یکی از عمده‌ترین اختلالات متابولیسمی می‌باشد. دیابت نوع ۱ و ۲ به صورت هیپرگلیسمی مزمن و اختلال در متابولیسم قندها، چربی‌ها و پروتئین‌ها مشخص می‌شوند [۱-۳]. مطالعات نشان داده است که تجمع انسولین به صورت فیبرهای آمیلوئید در محل تزریق زیر پوستی انسولین و همچنین در استفاده از پمپ‌های انسولین در بیماران دیابتی نوع ۱ مشاهده شده است که این تجمع باعث بروز مقاومت به انسولین می‌گردد [۴]. طی مطالعات مختلف، تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی انسولین در شرایط متفاوت انجام شده است. برای مثال انسولین قادر است در $pH = 2$ و دمای $57^\circ C$ (درجه اسیدی و دمای بالا) آمیلوئید تشکیل دهد [۵]. به علاوه اگر با جدا شدن یون روی انسولین هگزامر به فرم مونومری فعال تبدیل شود، تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در $pH = 7.5$ و دمای $37^\circ C$ درجه امکان‌پذیر می‌باشد، در شرایط آزمایشگاهی، برای بدست آوردن مونومر انسولین می‌توان از یک جداکننده یون روی مانند اتیلن دی آمین تتراسیتیک اسید (EDTA) استفاده کرد [۶]. یکی از روش‌های اختصاصی برای بررسی ساختمان پروتئین‌ها تغییر شیمیایی می‌باشد. انواع مختلف زنجیره جانبی اسیدهای آمینه در عملکرد یک پروتئین نقش دارند که به سادگی می‌توانند توسط تغییر شیمیایی شناسایی گردند [۸،۷]. در تغییر شیمیایی، یک معرف شیمیایی اختصاصی در تماس با پروتئین قرار می‌گیرد و یک واکنش شیمیایی اتفاق می‌افتد. این معرف به صورت کووالان به زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه پروتئین متصل می‌شود و تغییرات خاصی در پاره‌ای از خواص قابل اندازه‌گیری آن ایجاد می‌نماید. به طور ایده‌آل این معرف باید به اندازه کافی ویژه باشد تا فقط با یک نوع زنجیره جانبی اسید آمینه ترکیب شود و موجب حداقل تغییر در بنای فضائی پروتئین گردد. از بین بیست اسید آمینه طبیعی، فقط زنجیره جانبی اسیدهای آمینه قطبی با معرف‌های تغییر شیمیایی وارد واکنش می‌شوند. در تحقیق حاضر، اثر تغییر شیمیایی اسید آمینه لیزین در انسولین به وسیله معرف اختصاصی سیتراکونیک انهیدرید مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

تهیه انسولین مونومر و تعیین غلظت آن

برای انجام آزمایش‌ها از انسولین با منشأ گاوی استفاده گردید که با انسولین انسان تنها در سه اسید آمینه اختلاف دارد. از آنجا که این انسولین هگزامر و حاوی یون روی Zn^{2+} می‌باشد، برای جدا کردن یون روی و تبدیل فرم هگزامری انسولین به فرم مونومری و فعال، انسولین در بافر (فسفات 50 میلی‌مولار + 2 میلی‌مولار EDTA) و $pH = 7.5$ حل شد. EDTA قادر به جداسازی یون‌های دو ظرفیتی مثبت می‌باشد. سپس برای خارج کردن EDTA متصل به یون‌های روی از محلول انسولین، از روش دیالیز استفاده شد. اندازه منافذ کیسه‌های دیالیز به کار رفته $3/5$ بود که برحسب وزن مولکولی انسولین ($5/5$ KD) انتخاب شده بود. بدین منظور هر بار پیش از استفاده، انسولین محلول در بافر (فسفات + EDTA) درون کیسه دیالیز ریخته می‌شد و طی سه مرحله در مقابل بافر فسفات بدون EDTA و $pH = 7.5$ دیالیز گردید. غلظت انسولین پس از دیالیز به کمک اسپکتروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. غلظت انسولین با قرائت میزان جذب آن در طول موج 280 نانومتر محاسبه گردید (ضریب جذب انسولین برای محلول یک گرم بر میلی لیتر، 1 در نظر گرفته شد).

تغییر شیمیایی لیزین پروتئین

دو میلی‌لیتر محلول پروتئینی حاوی 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات 50 میلی‌مولار $pH = 8$ تهیه شد. یک میلی‌لیتر به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و به 1 میلی‌لیتر آن 20 میکرولیتر سیتراکونیک انهیدرید 2 میلی‌مولار اضافه گردید. سیتراکونیک انهیدرید در حلال دی متیل فراماید حل شد، 20 میکرولیتر سیتراکونیک انهیدرید با DMF به حجم 400 میکرولیتر رسید و pH دوباره ثابت نگه داشته شده و به عدد 8 برگردانده شد. محلول به دست آمده به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرارداد شد تا تغییر شیمیایی انجام شود. پس از تغییر پروتئین، به جهت خروج اضافات معرف تغییر شیمیایی، دیالیز وسیع در برابر بافر فسفات 50 میلی‌مولار $pH = 8$ و فاقد EDTA انجام شد.

القای تجمع آمیلوئیدی در انسولین گاوی در pH خنثی و دمای ۳۷ درجه

هر دو نمونه شاهد و تغییر داده شده در دمای ۳۷ درجه و $pH = 7.5$ درحالی که با استفاده از مگنت ریز تفلونی به نحو آرام هم زده می‌شد، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

بررسی تجمعات پروتئینی

طیف نشرفلوئورسانس تیوفلاوین T

برای ارزیابی تشکیل یا عدم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی از محلول تازه تهیه شده تیوفلاوین T که با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرونی و سرنگ فیلتر شده بود، استفاده گردید. غلظت تیوفلاوین در این محلول ۶۵ میکرومولار بود. در نهایت با اضافه شدن پروتئین، نسبت مولی تیوفلاوین T به پروتئین جهت اندازه‌گیری نشر تیوفلاوین T حدود ۳۰ به ۱ شد. یعنی در نهایت طیف‌ها در شرایطی رسم گردید که به کمک محلول تیوفلاوین فوق‌الذکر، ۱۵ میکرولیتر پروتئین انکوبه شده در شرایط آمیلوئیدی به حجم نهایی ۶۰۰ میکرولیتر رسانده شد. طول موج برانگیختگی ۴۴۰ نانومتر و پهنای اسلیت برانگیختگی و نشر به ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر بود. تیوفلاوین T با قرار گرفتن در بین صفحات بتا باعث افزایش نشر می‌گردد و بنابراین افزایش شدت نشر تیوفلاوین T به عنوان دلیلی بر تشکیل احتمالی فیبرهای آمیلوئیدی تفسیر می‌شد [۱۱].

جذب نوری کنگورد

برای ارزیابی تشکیل یا عدم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی از محلول تازه تهیه شده کنگورد که با استفاده از صافی ۰/۲ میکرونی صاف شده بود، استفاده گردید. این ترکیب با توان قرارگیری در بین صفحات بتا باعث افزایش جذب شده و همچنین بدلیل جا به جایی ابر الکترونی، جابه جایی به سمت قرمز را باعث می‌گردد. بدین منظور طیف جذب نوری کنگورد در فاصله ۶۰۰-۴۰۰ نانومتر در غیاب یا حضور نمونه پروتئینی اندازه‌گیری و تفاضل میان دو طیف جذبی پیش و پس از افزودن پروتئین محاسبه شد. افزایش جذب نوری کنگورد و انتقال به قرمز آن و به ویژه مشاهده بیشترین تفاوت در ۵۳۰-۵۲۰ نانومتر به عنوان یکی از

انجام شدن تغییر لیزین بر اساس روش فلوئورسکامین بررسی گردید. ۵ میلی‌لیتر نمونه پروتئینی، ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، ۹۰ میکرولیتر آب دیونیزه و ۱۰۰ میکرولیتر فلورسکامین با غلظت ۳. mg/ml (حل) گردیده در استو نیتریل) به خوبی مخلوط گردیده و در تاریکی به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه در ۳۹۰ نانومتر برانگیخته گردید و فلورسانس در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد [۹، ۱۰].

بررسی ساختار

فلورسانس ذاتی برای بررسی ساختار سوم پروتئین قبل و بعد از تغییر شیمیایی صورت گرفت. بررسی‌های فلوئورسانس با استفاده از ابزار اسپکترو فلوئوریمتر (کری اکلپس واریان) انجام شد. برای ثابت نگه داشتن دما از کنترل کننده کری استفاده شد که قادر است دما را در محدوده ± 0.1 درجه ثابت نگه دارد. برای اندازه‌گیری نشر فلوئورسانس ذاتی پروتئین از غلظت ۰/۰۲-۰/۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انسولین استفاده شد. طول موج ۲۸۰ نانومتر جهت برانگیختگی پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. پهنای اسلیت برانگیختگی و نشر، ۵ نانومتر در نظر گرفته شد.

طیف‌های دورنگ نمایی دورانی (CD) پروتئین با استفاده از ابزار اسپکترو پلاریومتر AVIV 215 به منظور مقایسه ساختارهای دوم پروتئین بررسی گردید. برای اندازه‌گیری طیف CD در محدوده فرابنفش دور (۱۹۰ تا ۲۶۰ نانومتر) از غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین و سل با ضخامت ۰/۱ سانتی‌متر استفاده می‌شد. پارامتر θ (بیضی واری مولی) با استفاده از فرمول زیر اندازه‌گیری می‌گردد:

$$[\theta] = (\theta \text{ obs} / 10) (MRW/lc)$$

واری مشاهده شده بر حسب درجه، MRW جرم مولکولی متوسط باقیمانده‌ها، ۱ طول مسیر نور بر حسب سانتی‌متر و c غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

یافته‌ها

نتایج حاصل از فلورسکامین

شکل ۱ میزان نشر فلورسنس فلورسکامین را در حضور انسولین تغییر داده شده با سیتراکونیک انهیدرید و نمونه انسولین تغییر داده شده نشان می‌دهد. نشر فلورسکامین در حضور آمین آزاد (زنجر جانبی لیزین) افزایش می‌یابد و در حالتی که آمین در دسترس نباشد، تغییری نمی‌کند. مقایسه طیف انسولین طبیعی و انسولینی که در معرض سیتراکونیک انهیدرید قرار گرفته، تایید کننده وجود تغییر شیمیایی در آمین آزاد لیزین است. با توجه به اینکه طیف‌های بدست آمده از نمونه‌های تغییر یافته و طیف کنترل فلورسکامین بر یکدیگر منطبق شده‌اند، مشخص است که غلظت ۱ میلی‌مولار واکنشگر نیز برای تغییر دادن لیزین انسولین کافی است.

تأثیر تغییر شیمیایی بر ساختارهای دوم و سوم انسولین

مقایسه ساختارهای سوم در انسولین طبیعی و تغییر داده شده به کمک نشر فلوئورسانس نشان داد که نشر ذاتی این دو گونه تفاوت معنی‌داری ندارند (شکل ۲). مقایسه ساختارهای دوم با کمک طیف سنجی دورانی نیز تفاوتی در فرم سیتراکونیک شده و طبیعی نشان نداد (شکل ۳).

طیف جذب نوری کنگورد

همان طور که در شکل ۴ مشخص است، با بررسی نتایج کنگورد مشخص می‌شود که سیتراکونیک شدن لیزین در انسولین، توانسته است تشکیل فیبریل را در انسولین تا حدود بسیار زیادی مهار کند و مانع از شیفت به سمت قرمز شود.

نشر فلوئورسانس تیوفلاوین T

چنانکه در شکل ۵ نشان داده شده است، نتایج حاصل از نشر فلوئورسانس تیوفلاوین T بعد از انکوباسیون نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت کاهش قابل ملاحظه‌ای در شدت نشر فلوئورسانس را در شکل سیتراکونیک شده انسولین نشان می‌دهد.

معیارهای تشکیل فیبر آمیلوئیدی مورد استفاده قرار گرفت. رنگ قرمز کنگو با غلظت نهایی ۵۰ میکرومولار استفاده شد، ۱۰ میکرولیتر از نمونه انکوبه شده به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آمیلوئیدی، توسط محلول ۵۰ میکرومولار رنگ قرمز کنگو به حجم نهایی ۲۳۵ میکرولیتر رسید. پس از انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در محیط تاریک، طیف‌ها به کمک اسپکترو فوتومتر کری ۱۰۰- بیوواریان بررسی گردید [۱۱].

دورنگ‌نمایی دورانی دور

این بررسی شامل آنالیز مستقیم طیف CD در محدوده ۱۹۰ تا ۲۶۰ نانومتر بود. طیف‌های دو رنگ‌نمایی دورانی پروتئین با استفاده از ابزار اسپکترو پلاریمتر AVIV 215 به دست آمدند. برای اندازه‌گیری طیف CD در محدوده فرابنفش دور از غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین و سل با ضخامت ۰/۱ سانتی‌متر استفاده شد. شاخصه ساختار آلفا در پروتئین‌ها وجود ۲ پیک منفی در ۲۰۴ و ۲۲۲ نانومتر و شاخصه ساختار بتا وجود یک پیک منفی در ناحیه ۲۱۸ نانومتر می‌باشد.

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی انتقالی

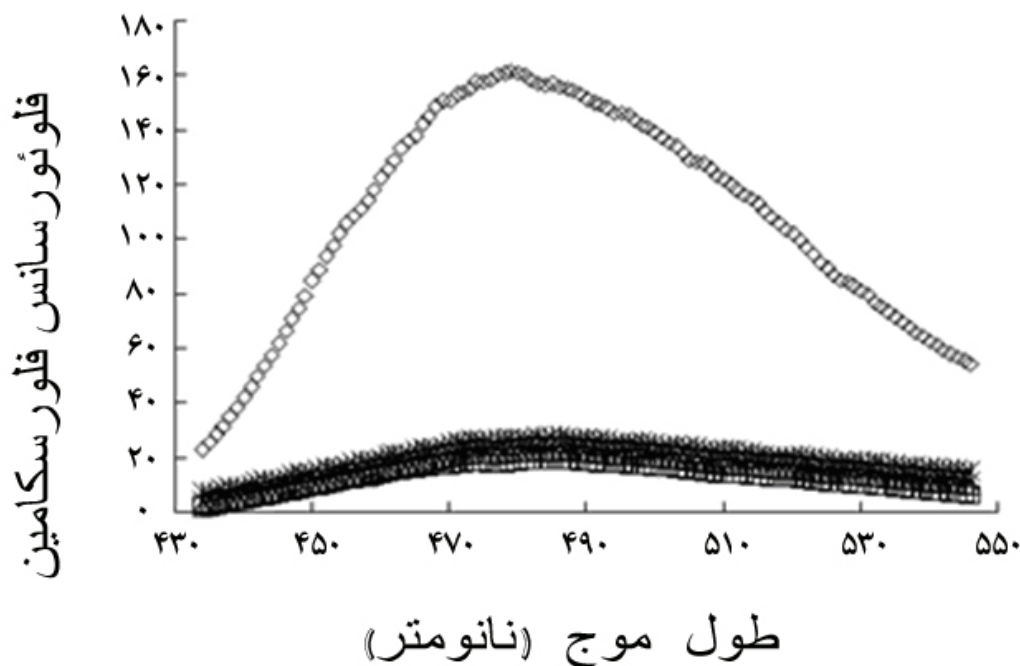
در این راستا، ۱۰-۵ میکرولیتر از نمونه پروتئینی برداشته شده و بر روی گریدهای پوشیده از کربن (۴۰۰) قرار داده شد. پس از ۴۵ ثانیه، گریدها با آب دو بار تقطیر شسته شده و سپس رنگ‌آمیزی با اورانیل استات ۲ درصد انجام شد و پس از ۵-۲ دقیقه دیگر، آنالیز نمونه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انتقالی انجام شد. شاخصه تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی یا شبه آمیلوئیدی، مشاهده فیبرهای مستقیم، طولانی و فاقد شاخه با قطر تقریبی ۱۲-۴ نانومتر در تصاویر میکروسکوپ الکترونی انتقالی نمونه پروتئینی است.

طیف دورنگ نمایی دورانی دور

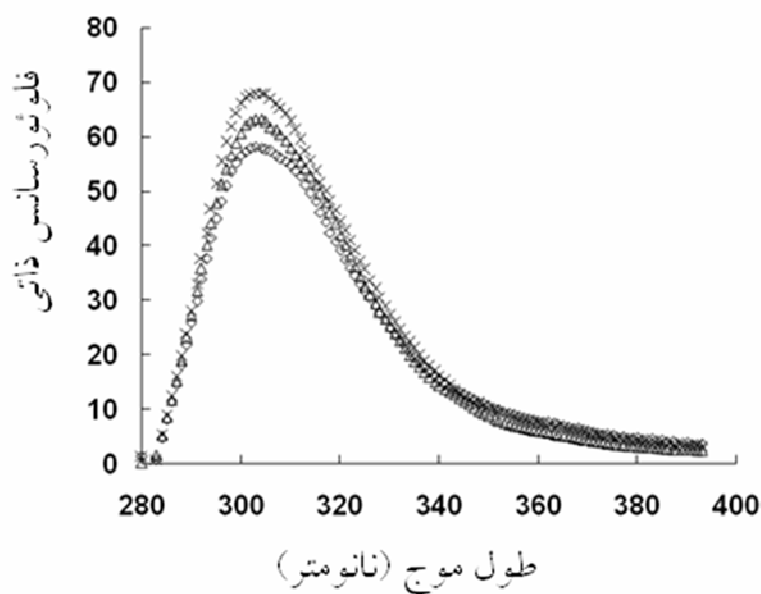
با توجه به نتیجه بدست آمده از مطالعه صورت گرفته با استفاده از نشر فلورسانس تیوفلاوین T، به مطالعه تغییرات در ساختار سوم پروتئین انسولین در حالت سیتراکونیل شده و مقایسه آن با شکل طبیعی پرداخته شد. چنان که در شکل ۶ نشان داده شده است، با استفاده از آنالیز طیف‌های جذبی دورنگ نمایی دورانی، در حالی که در ساختار دوم شکل طبیعی انسولین تغییر اتفاق می‌افتد، عدم افزایش میزان ساختارهای بتا در فرم سیتراکونیل شده پروتئین به وقوع می‌پیوندد که تایید کننده نتایج پیشین می‌باشد.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی انتقالی

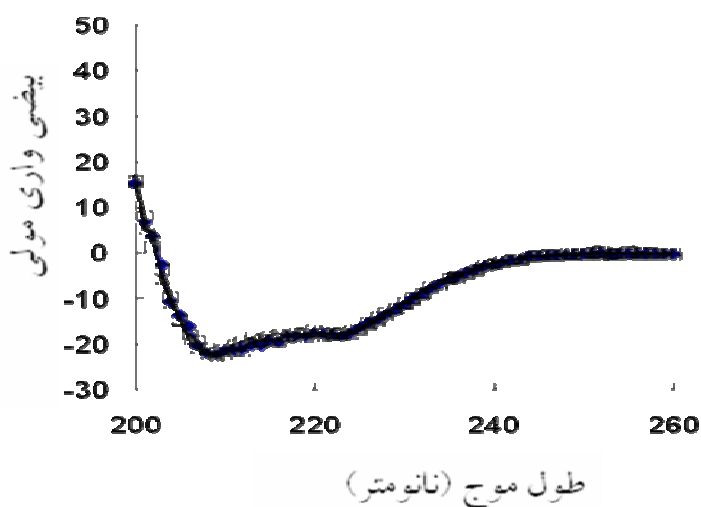
مطالعه تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی نیز نشان داد که در نمونه سیتراکونیل شده نسبت به نمونه طبیعی، فیبریل مشاهده نمی‌شود. شکل ۷ فیبریل‌های به دست آمده از نمونه طبیعی (A) را در مقایسه با نمونه سیتراکونیل شده نشان می‌دهد. هر دو نمونه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده بودند. تراکم فیبریل‌ها به میزان قابل توجهی در نمونه سیتراکونیل شده کمتر است و در واقع تشکیل فیبریل مهار شده است.



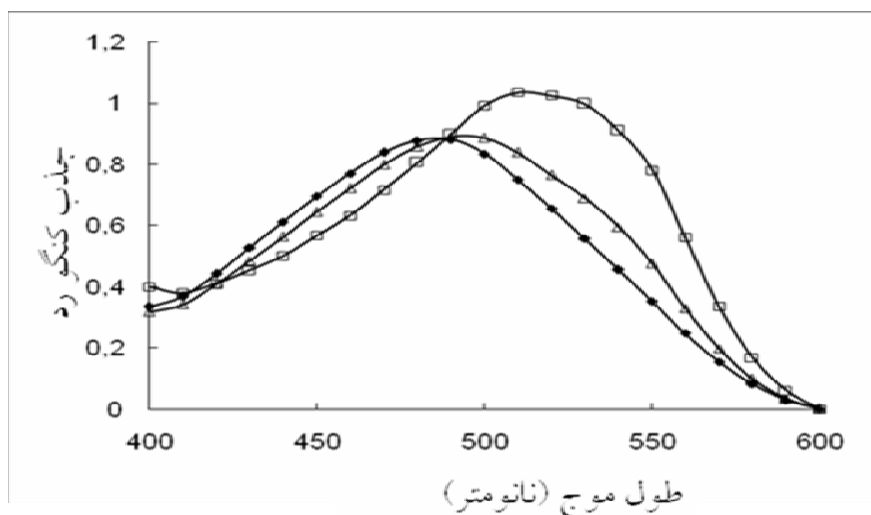
شکل ۱- نشر فلورسانس فلورسکامین در مجاورت انسولین طبیعی (□) و تغییر داده شده با سیتراکونیک، ۱ (◇)، ۲ (Δ) و ۳ (×) میلی مولار؛ علامت (*) نمایانگر نشر پایه فلورسکامین می‌باشد.



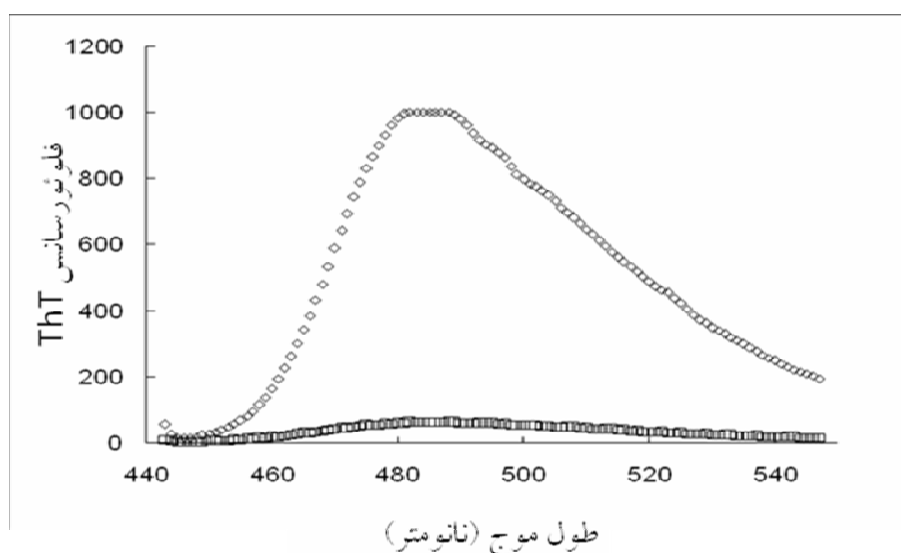
شکل ۲- طیف نشری فلورسانس ذاتی انسولین طبیعی (x) و سیتراکونیل شده (◇: سیتراکونیک انهیدراید ۱ میلی مولار، Δ: سیتراکونیک انهیدراید ۲ میلی مولار) در pH=۷/۵ طول موج برانگیختگی ۲۸۰ نانومتر بود.



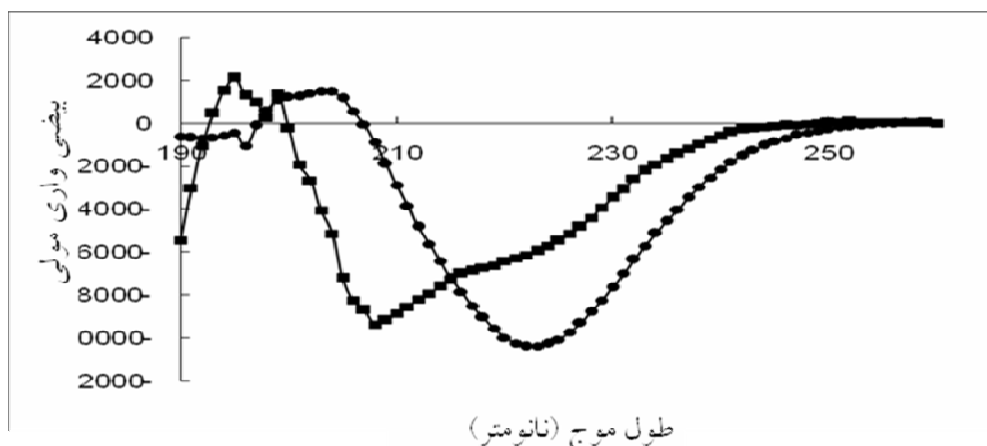
شکل ۳- طیف جذبی دورنگ نمایی دور انسولین در pH=۷/۵ نمونه طبیعی (◇) و تغییر داده شده با سیتراکونیک انهیدراید ۱ میلی مولار (□) و ۲ میلی مولار (Δ) (واحد بیضی واری مولی $\text{degree. cm}^2. \text{dmol}^{-1}$ است).



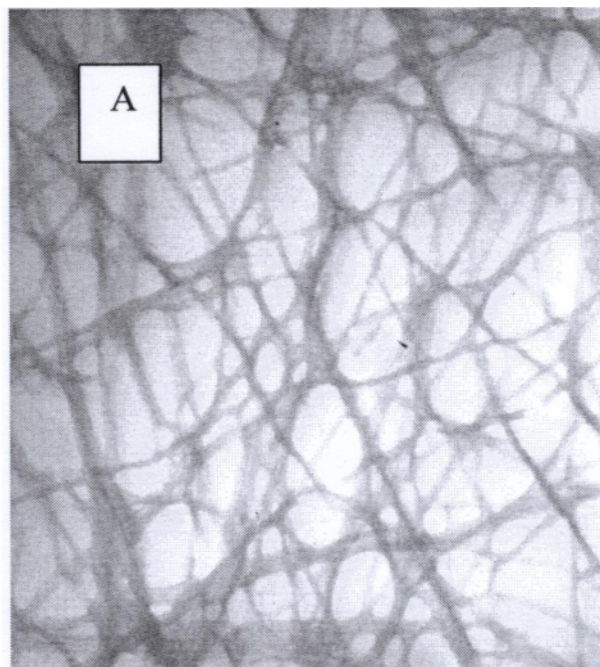
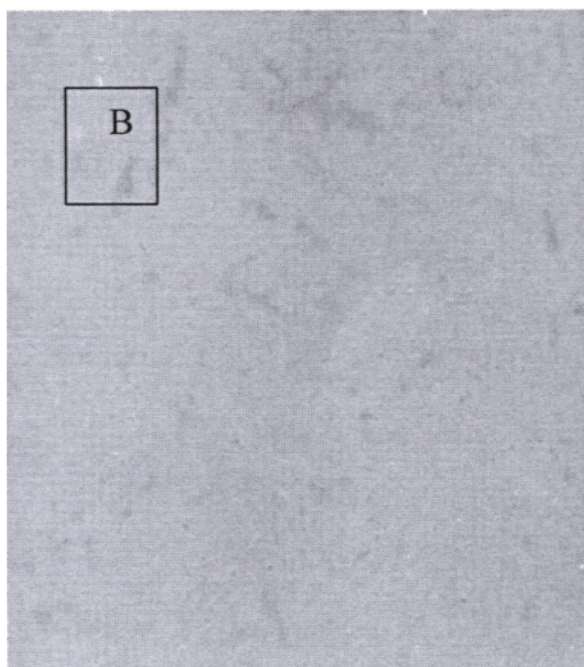
شکل ۴- اثر سیتراکونیک انهیدرید بر روی تشکیل آمیلوئید در نمونه انسولین سیتراکونیک شده و انکوبه شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و pH=۷/۵: جذب کنگورد (♦)، جذب انسولین طبیعی در شرایط آمیلوئیدی (□) و جذب انسولین سیتراکونیک شده در شرایط آمیلوئیدی (Δ)



شکل ۵- نشر فلورئورسانس تیوفلاوین T بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط آمیلوئیدی در نمونه انسولین طبیعی (♦) و انسولین تغییر داده شده با سیتراکونیک انهیدرید (■)



شکل ۶- طیف دورنگ نمایی دورانی انسولین طبیعی (●) و انسولین سیتراکونیل شده (■) انکوبه شده در $\text{pH}=7/5$ و دمای 37°C درجه. (واحد بیضی واری مولی $\text{degree. cm}^2. \text{Dmol}^{-1}$ است).



شکل ۷- تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) نمونه انسولین طبیعی (الف) و انسولین سیتراکونیل شده (ب) به مدت ۲۴ ساعت در $\text{pH}=7/5-8$ و دمای 37°C درجه.

بحث

برای شناخت سازوکار تجمع، شناخت نقش اسیدها با آمینه و تغییر شیمیایی آنها بسیار مهم می باشد. بعنوان مثال، در بیماری های آمیلوئیدی با منشاء ژنتیکی، وجود جهش در یک اسید آمینه می تواند حتی منجر به بروز آمیلوئیدوزیز در سال های جوانی گردد. موقعیت و خصوصیات اسیدهای آمینه در پروتئین ها و مسأله میان کنش های داخل مولکولی پایدار کننده ساختاری در آنها نیز اهمیت دارد. بسیاری از

بیماری های آمیلوئیدوزیز به ویژه مربوط به سیستم اعصاب مرکزی، وابسته به سن بوده و بیشتر در بعد از دهه هفتاد ظاهر می شوند، چنانکه گفته می شود از هر سه نفر یک نفر در سنین بالای ۸۵ سال دچار این گونه بیماری ها می شوند [۱۲]. یکی از دلایلی که در ارتباط با نقش افزایش سن در تشدید این گونه بیماری ها مطرح می شود تغییرات متابولیسمی فیزیولوژیکی است، از جمله افزایش قند خون، افزایش استرس های اکسیداتیو، تغییر در فعالیت ارگانل های سلولی به ویژه میتوکندری و تغییراتی که به طور کلی

نکته قابل توجه در این زمینه، وجود یک باقیمانده لیزین در تمامی مولکول انسولین است. یک اسید آمینه دیگر نیز در توالی انسولین موجود است که بار مثبت دارد و آن آرژنین ۲۲ زنجیره B می باشد. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می رسد که حضور لیزین واجد بار مثبت در ایجاد اشکال آمیلوئیدی نقش بسیار مهمی دارد. در تغییر انجام شده، قطعه ای به این اسید آمینه اضافه شده است که آن را به صورت بدون بار و یا احتمالاً واجد بار منفی می نماید یعنی شکل سیتراکونیل در pH خنثی دارای بار منفی خواهد بود. بنابراین کاهش برهم کنش بین بارهای مثبت احتمالاً دلیل کاهش تجمع پروتئین می باشد. روش ها و ابزارهایی برای پیشگویی احتمال تجمع در پروتئین ها وجود دارند که می توانند تا حدودی سکانس هایی را که پروتئین را مستعد ایجاد تجمع می کنند پیشگویی نمایند و البته صحت این پیشگویی ها هنوز مورد بررسی می باشد [۱۶-۱۹]. در مجموع، نتیجه این تحقیق نشان می دهد که با یک تغییر کوچک در ساختار انسولین که با استفاده از یک تکنیک ساده تر از نو ترکیبی امکان پذیر است، می توان با حفظ خصوصیات ساختاری، به نوعی از انسولین دست یافت که میزان تجمع آن کمتر است.

سپاسگزاری

از تمامی اعضای محترم آزمایشگاه مواد حیاتی مرکز تحقیقات بیوشیمی- بیوفیزیک دانشگاه تهران به جهت زحمات بی شائبه شان تشکر می شود و با سپاس از آقای دکتر محسن نعمت گرگانی که جهت انجام طرح مورد نظر بذل محبت نمودند. این مطالعه با پشتیبانی مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور انجام شده است.

می تواند تعادل فعالیت ها و متابولیت های سلولی را به هم بزند. از جمله این تغییرات، تغییرهای شیمیایی بعد از بیان در پروتئین ها می باشد؛ از جمله اضافه شدن قند، اکسیداسیون و دimer شدن. لیزین یکی از اسید آمینه هایی است که بسیار مستعد واکنش با ترکیبات مختلف است. لیزین می تواند تحت واکنش های وابسته به آنزیمی و یا غیر وابسته آنزیمی تحت تغییرات شیمیایی مختلف قرار گیرد که از جمله مهم ترین آنها اضافه شدن قند و متیلاسیون غیر آنزیمی است و در این راستا تغییر شیمیایی لیزین نیز اهمیت دارد [۱۳-۱۵]. در این تحقیق، تغییر شیمیایی باقیمانده لیزینی در پروتئین انسولین با ترکیب سیتراکونیک انهیدرید انجام شد. از آنجایی که پروتئین انسولین فقط ۱ اسید آمینه لیزین دارد، استفاده از یک میلی مول واکنشگر برای تغییر دادن آن کافی بود. لیزین تغییر داده شده موجب تغییرات قابل توجهی در تجمع پذیری پروتئین شد در حالتی که ۱ لیزین انسولین سیتراکونیل شده است مطالعه ویژگی های ساختاری پروتئین انجام گرفت. بسیاری معتقدند در پروتئین های دارای ساختارهای منظم، یک سری ناپایداری های ساختاری اتفاق می افتد که پروتئین را مستعد تجمع و تشکیل ساختارهای فیبریلی می کند. مشاهده عدم تغییر ساختارهای دوم و سوم از این جنبه، دارای اهمیت است که باقیمانده های آروماتیکی دارای نقش بسیار مهمی در برهم کنش های بین مولکولی فیبریل ها می باشند. اما نکته قابل تأمل، پایین بودن میزان نشر فلوئورسانس تیوفلاوین T مربوط به نمونه سیتراکونیل شده است که می تواند به جهت خنثی شدن بار لیزین در این pH باشد. سیتراکونیل کردن لیزین در انسولین منجر به مهار روند فیبریلایسیون گردید.

مأخذ

۱. هرولد، آنتونی، بیوشیمی هارپر، ترجمه حمیدرضا کریم زاده، مهدی ابطحی، علیرضا رفتاری، چاپ اول. سماط، ۱۳۷۸ صفحه ۷۰۷-۷۱۲.
2. Hershel R. Physiology Secrets. HANLEY and BELFUS. INC. Medical Publishers 2010 South 13 th Street. Philadelphia; 1999 P. 203-202.
3. Azizi F, Gouya MM, Vazirian P, Dolatshahi P and Habbian S. Secreting for Type 2 Diabetes in the Iranian National Programme: a preliminary report. *Eastern Mediterranean Health Journal* 2003; 9: 5-6.
4. Albert S, Obadijah J, Parseghian S, Yadira Hurley M, Mooradian M. Severe insulin resistance associated with subcutaneous amyloid deposition. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2007; 75(3): 374-376.
5. Mauro M, Craparo EF, Podesta A, Bulone D, Carrotta R, Mortona V, Tiana G, San Biaque

- PL. Kinetics of different processes in human insulin amyloid formation. *J Mol Biol* 2007; 366(1): 258-74.
6. Quinn R, Andrade JD. Minimizing the aggregation of neutral insulin solutions. Department of bioengineering, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112. 1982.
7. DeSantis G, Jones JB. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10(4):324-330.
8. Eyzaguirre J. Chemical modification of enzymes. John Wiley and sons, New York. 1989; first edition, chapter 1, P 9-23.
9. Dixon HB, Perham RN. Reversible blocking of amino groups with citraconic anhydride. *Biochem J* 1968; 109: 312-314.
10. Schmitt A, Schmitt J, Munch G, Gasic-Milencovic J. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Anal Biochem* 2005; 338: 201-215.
11. Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 2004; 34: 151-160.
12. Irvine GB, El-Agnaf OM, Shankar GM, and Walsh DM. Protein aggregation in the brain-the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Mol Med* 2008; 14(7-8): 451-64.
13. Shaikh S, Nicholson LF. Advanced glycation end products induce in vitro cross-linking of alpha-synuclein and accelerate the process of intracellular inclusion body formation. *J Neurosci Res* 2008; 86(9): 2071-82.
14. Floor E, Maples A. M, Rankin C. A, Yaganti V. M, Shank S. S, Nichols G. S, O'Laughlin M, Galeva N.A, and Williams T. D. A one-carbon modification of protein lysine associated with elevated oxidative stress in human substantia nigra. *J Neurochem* 2006; 97: 504-14.
15. Wilmarth PA, Tanner S, Dasari S, Nagalla SR, Riviere MA, Bafna V, Pevzner PA, and David LL. Age-related changes in human crystallins determined from comparative analysis of post-translational modifications in young and aged lens: does deamidation contribute to crystallin insolubility? *J Proteome Res* 2006; 5: 2554-66.
16. Sánchez de Groot N, Pallarés I, Avilés FX, Vendrell J, Ventura S. Prediction of "hot spots" of aggregation in disease linked polypeptides. *BMC Struct Biol* 2005; 30: 5:18.
17. Oscar Conchillo-Solé, Natalia S de Groot Francesc X Avilés, Josep Vendrell, Xavier Dauraand, Salvador Ventura. Aggrescan: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics* 2007; 8:65.
18. Rune Linding, Joost Schymkowitz, Frederic Rousseau Francesca Diella and Luis Serrano. A comparative study of the relationship between protein structure and β aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *J Mol Biol* 2004; 342: 345-353.
19. Gian Gaetano Tartaglia, Amol P. Pawar, Silvia Campioni, Christopher M. Dobson, Fabrizio chitiand Michele Vendruscolo. Prediction of aggregation prone regions in structured proteins. *J Mol Biol* 2008; 380: 425-436.