

Fibrillation induction in Bovine serum Albumin and production of amyloid fibrils for use as new Bio-nanomaterial

Zolfaghar Lotfi¹, Mohammad Fazilati²,
Amir Arasteh^{3*}, Habibollah Nazem⁴

1. Instructor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
4. Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: Sep. 28, 2017 - Accepted: Oct. 23, 2017)

ABSTRACT

Amyloid fibrils are a class of protein nanoparticles in which native proteins are converted into dense fibers. The aggregation can be pathogenic or non-pathogenic. Recently, these fibrils have been considered for the production of Bio-nanomaterials due to their unique structure. In this study, Bovine serum albumin was used as a model protein to optimize the fibrillation process. Concentrations of 2-10 mg/ml were prepared in buffer at different pH values of 3-7 and placed at 0-70 °C for 0 to 48 hours, and the amounts of produced amyloid fibrils were analyzed by spectrophotometry, fluorimetry and circular dichroism. The spectra obtained from the Congo red absorption method were compared on the basis of the maximum wavelength and absorption at maximum wavelengths with a sample containing Congo red. The concentration of 10 mg/ml of protein, which was 48 hours in buffer at pH = 4 at 50 °C, produced the highest amounts of amyloid. Optimum conditions were obtained by ThT fluorescence and circular dichroism at a concentration of 10 mg/ml, pH = 4, 70 °C and 48 hours. The presence of the fibers was confirmed by transmission electron microscope images. The insoluble structure and dimensions of amyloid fibrils can be describe them as new Bio-nanomaterials. Optimizing the production of these structures allows them to be produced at higher scales.

Keywords: Amyloid, Bio-nanomaterial, Bovine serum albumin, fibrillation, optimization.

القای فیبریل زایی در سرم آلبومین گاوی و تولید رشته‌های آمیلوئیدی به منظور استفاده از آنها به‌عنوان نانو ماده زیستی جدید

ذوالفقار لطفی^۱، محمد فضیلتی^۲، امیر آراسته^{۳*}،
حبیب اله ناظم^۴

۱. مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
 ۲. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
 ۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، رشت، ایران
 ۴. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۸/۱)

چکیده

رشته‌های آمیلوئیدی دسته‌ای از نانو رشته‌های پروتئینی هستند که در آن پروتئین طبیعی به رشته‌های متراکم تبدیل شده‌اند. تجمع می‌تواند بیماریزا و یا غیربیماریزا باشد. اخیراً این رشته‌ها با توجه به ساختار منحصر به فردی که دارند، برای تولید نانومواد زیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این مطالعه از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان یک پروتئین مدل برای بهینه‌سازی فرایند فیبریل زایی استفاده شد. غلظت‌های ۲-۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر با pHهای مختلف ۳-۷ تهیه شده و برای دوره‌های صفر تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی با روش اسپکتروفوتومتری، فلوریمتری و دورنگ‌نمایی دورانی بررسی شد. طیف‌های حاصل از روش جذب‌سنجی کنگورد بر اساس میزان طول موج ماکزیمم و جذب در طول موج ماکزیمم با نمونه حاوی رنگ کنگورد مقایسه شد. غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین که برای ۴۸ ساعت در بافر با pH=۴ و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند، بیشترین میزان آمیلوئید را تولید کردند. شرایط بهینه با روش فلورسانس ThT و دورنگ‌نمایی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، pH=۴، دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۴۸ ساعت به‌دست آمد. حضور رشته‌ها با تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره تأیید شد. ساختار نامحلول و ابعاد رشته‌های آمیلوئیدی آنها را به‌عنوان نانو مواد زیستی جدید معرفی می‌کند. بهینه‌سازی تولید این ساختارها، مجال تولید آنها را در مقیاس‌های بالاتر فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی: آلبومین سرم گاوی، بهینه‌سازی، فیبریل‌زایی، آمیلوئید، نانو ماده زیستی.

مقدمه

پروتئین‌ها پتانسیل زیادی برای تجمع به ساختارهای مختلف دارند و بر این اساس، عملکردهای متفاوتی از آنها می‌توان انتظار داشت (Sethi et al., 2013). تلاش‌های زیادی برای استفاده از مواد حاصل از فرایند تجمع پروتئین‌ها برای کاربردهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی انجام شده است. فیبریل‌های آمیلوئیدی علی‌رغم اینکه باعث بیماری‌هایی مانند پارکینسون و آلزایمر هستند (Dobson, 2006; Fukuma et al., 2006; Juarez et al., 2009)، می‌توانند بدون ایجاد بیماری نیز تجمع یابند. استفاده از الگوی ساختاری مواد یا همان تقلید زیستی این فرصت را فراهم کرده است تا از الگوی ساختاری رشته‌های آمیلوئیدی در طراحی و تهیه نانو مواد زیستی جدید استفاده شود (Chiti & Dobson, 2006).

پروتئین‌ها توانایی منحصر به فردی برای تبدیل به ساختارهای مختلف دارند، به‌عنوان مثال عملکرد زیستی رشته‌های اکتین و میکروتوبول‌ها که نقش مهمی در شکل، حرکت و تقسیم سلول‌ها ایفا می‌کنند، به فرایند خود تجمعی آنها وابسته است (Alberts et al., 2002). این فرایند خود تجمعی می‌تواند مواد زیستی منحصر به فردی مانند ابریشم را تولید کند که قدرت کشش آن با فولاد قابل مقایسه است (Knowles et al., 2007; Smith et al., 2006).

تقریباً ۲۴ نوع پروتئین انسانی گزارش شده‌اند که در شرایط *in vitro* می‌توانند به‌صورت رشته‌های آمیلوئیدی تجمع یابند. این ساختار رشته‌ای در پروتئین‌ها وابسته به ساختار اول نیست و پروتئین‌هایی هم که هیچ گونه ارتباطی با بیماری‌ها ندارند می‌توانند با یک ساختار مرکزی مشترک و در شرایط *in vitro* به رشته‌های آمیلوئیدی تبدیل شوند (Carrió et al., 2005).

فرایند تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در شرایط *in vivo* از طریق تشکیل پروفیبریل‌ها صورت می‌گیرد ولی تجمع بسیاری از این پروتئین‌ها در شرایط *in vitro* ساختارهای منفذ مانند و کانالی را

ایجاد می‌کنند، که ناشی از ساختارهای پروتو فیبریلی آنها و یا توانایی پروتو فیبریل‌های حدواسط برای تشکیل چنین ساختارهایی به محض بر همکنش با غشاء می‌باشد (Eichner & Radford, 2011). نانو فیبریل‌های آمیلوئیدی به‌عنوان نانو مواد زیستی جدید کاربردهای گوناگونی دارند (Elzoghby et al., 2012). آنها به‌طور فزاینده‌ای در برنامه‌های کاربردی نانوزیست‌فناوری مانند بیوسنسورها، هیدروژل، فیلم‌های نازک و تحویل دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند و می‌توان آنها را از بسیاری از پروتئین‌های خود مونتاژشونده به‌دست آورد (Fink, 1998; Jayawardena et al., 2017). به‌طور طبیعی رشته‌های آمیلوئیدی به‌خاطر ثبات حرارتی و استحکام بالا، به‌عنوان الگوی ساختاری در طراحی نانو مواد زیستی جدید مطرح می‌باشد (Fukuma et al., 2006; Elzoghby et al., 2012; Ganesh et al., 2001; Gras, 2007; Gelamo & Tabak, 2000). رشته‌های آمیلوئیدی، تجدید پذیر و ارزان هستند و می‌توانند به‌صورت بالقوه و در مقادیر صنعتی از منابع پروتئین خام سنتز شوند (Garvey et al., 2009).

رشته‌های آمیلوئیدی کاربردهای بالقوه‌ای در تولید پلیمرهای زیست تخریب پذیر، صنایع بسته‌بندی مواد غذایی، تولید فیلم با خواص نوری، تصفیه هوا، سیستم‌های سنجش و مهندسی بافت و غشاء دارا می‌باشند (Juarez et al., 2009; Honda et al., 2008; Kratz, 2000). پلیمرهای طبیعی و مصنوعی معمولاً به‌عنوان حامل دارو قابل استفاده هستند. در میان آنها، نانو ذرات تهیه‌شده با پروتئین (مثل کازئین، آلبومین و ژلاتین) زیست‌سازگار، زیست‌تخریب‌پذیر و فاقد سمیت هستند (Lorenzo & Yankner, 2004; Militello et al., 1994). آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک پروتئین مدل برای مطالعه فرایند تجمع و فیبریلاسیون پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Dirix et al., 2005; Dobson, 2003; Lashuel &

مخلوط شدن به دو قسمت مساوی برای دو تکرار تقسیم شد. هر غلظت و تکرار آن (درحالی که به‌طور آرام با مگنت ریز به هم زده می‌شد) در پنج دمای مختلف ۳۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و طیف جذبی هر نمونه در حضور بافر کنگورد به‌عنوان بلانک با استفاده از اسپکتروفوتومتر مرئی (SHIMADZU UV 1800) در محدوده بین ۶۰۰-۴۰۰ نانومتر پس از صفر تا ۴۸ ساعت اندازه‌گیری و ثبت شد.

روش اسپکترو فلوریمتری

یکی از روش‌های شناسایی و ردیابی رشته‌های آمیلوئیدی استفاده از رنگ تیوفلاوین T می‌باشد. رنگ تیوفلاوین T با قرار گرفتن در بین صفحات بتای ایجاد شده طی فرایند فیبریل‌زایی موجب افزایش شدت نشر مولکول‌های پروتئین نسبت به حالت طبیعی (کروی) می‌شود. بدین منظور ۶۰۰ میکرولیتر از محلول تیوفلاوین ۶۵ میکرومولار به ۱۵ میکرولیتر از نمونه‌های پروتئینی (مربوط به بهترین حالت تعیین شده با روش کنگورد) اضافه شده و در طول موج ۴۴۰ نانومتر برانگیخته شد. افزایش شدت نشر تیوفلاوین T در محدوده ۴۵۰ تا ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Holm *et al.*, 2007).

روش دورنگ‌نمایی دورانی (CD)

این روش بر اندازه‌گیری میزان اختلاف جذب دو نور پلاریزه حلقوی چپ‌گرد و راست‌گرد توسط یک نمونه فعال نوری استوار است. در این مطالعه، برای به‌دست آوردن طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی پروتئین تغییر یافته از دستگاه اسپکتروپلاریومتر (Jasco J-810 spectropolarimeter) استفاده شد. برای اندازه‌گیری طیف دورنگ‌نمایی دورانی در محدوده فرابنفش دور از غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سرم آلبومین گاوی و سل با ضخامت ۰/۱ سانتی‌متر در مقابل بافر تریس با pH= ۷/۴ به‌عنوان بلانک استفاده شد (Holm *et al.*, 2007).

Lansbury, 2006; Taboada *et al.*, 2006; (Lorenzo & Yankner, 1994).

نانو رشته‌های آمیلوئیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین حامل‌های مواد دارویی در درمان انواع بیماری‌ها از جمله سرطان مورد استفاده قرار گرفته‌اند و با توجه به ظرفیت بالای اتصال برای هر دو نوع داروهای آبدوست و آبگریز بسیار مورد توجه می‌باشد (Kouchakzadeh *et al.*, 2015; MacPhee & Woolfson, 2004). در انجام این فرایند، سازگاری با بدن انسان دارای اهمیت فوق‌العاده‌ای است (Lashuel & Lansbury, 2006). در این تحقیق، فرایند تولید نانو بیوفیبریل‌های آمیلوئیدی از آلبومین سرم گاوی به روش سطح پاسخ (RSM) انجام شده و چهار پارامتر فیزیکی غلظت پروتئین، pH، دما و زمان انکوباسیون پروتئین بهینه‌سازی شده‌اند.

مواد و روش‌ها

مواد

آلبومین سرم گاوی، تیوفلاوین T، کنگورد، سولفات سدیم دی‌بازیک و دیگر مواد شیمیایی از شرکت مرک (Merck, Darmstadt, Germany) خریداری شدند. مواد ذکر شده با بالاترین درجه خلوص، تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند.

روش طیف‌سنجی کنگورد

یکی از روش‌های شناسایی تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی استفاده از رنگ کنگورد است که با اتصال به ساختارهای بتا آمیلوئیدی، امکان تشخیص حضور این ساختارها را ممکن می‌سازد. کنگورد با اتصال بین صفحات بتا باعث افزایش جذب و جابجایی نمودار به سمت طول موج‌های بلندتر می‌شود (Uversky *et al.*, 1998; Waterhouse & Gerrard, 2004). غلظت‌های ۲-۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از سرم آلبومین گاوی در بافر با pHهای ۳-۷ آماده گردید. سپس از هر کدام یک میلی‌لیتر در میکروتیوب کوچک ته‌گرد ریخته و بعد از

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

برای مشاهده رشته‌های آمیلوئیدی از میکروسکوپ الکترونی گذاره استفاده شد. ۵ میکرولیتر از نمونه پروتئینی روی گرید مسی پوشیده از کربن قرار داده شد و پس از ۴۵ ثانیه با آب دوبار تقطیر شسته شد. سپس با محلول اورانیل استات ۲ درصد به مدت ۵-۲ دقیقه رنگ‌آمیزی شد (Holm et al., 2007). پس از خشک شدن به مدت دو ساعت در دمای آزمایشگاه، گریدهای آماده توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره مدل Philips EM 208(S) در ولتاژ ۷۵ کیلو ولت تصویر برداری گردید.

نتایج

بررسی میزان اتصال سرم آلبومین گاوی به کنگورد
از آنجایی که روش طیف سنجی کنگورد روشی آسان و ارزان در ردیابی رشته‌های آمیلوئیدی است، در این تحقیق پنج غلظت مختلف ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از سرم آلبومین گاوی برای پنج دوره زمانی ۰، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ ساعت در بافرهایی با pH ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ و دماهای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بر این اساس برای هر دما ۲۵ آزمایش انجام شد که نتایج به دست آمده برای بررسی اولیه حضور نانو رشته‌های آمیلوئیدی مورد استفاده قرار گرفت. اثر غلظت پروتئین، pH، دما و زمان انکوباسیون بررسی و نتایج به صورت نمودارهای طول موج ماکزیمم (λ_{max}) و جذب در طول موج ماکزیمم ($A\lambda_{max}$) ارائه شده است (شکل ۱). نتایج به دست آمده با این روش نشان داد که بیشترین میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی را از بین حالات مختلف، می‌توان با انکوباسیون سرم آلبومین گاوی با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای ۴۸ ساعت در pH برابر ۴ و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تولید نمود. با توجه به اینکه روش‌های دورنگ‌نمایی دورانی و اسپکتروفلوریمتری در تشخیص حضور آمیلوئیدها اختصاصی‌تر هستند، بنابراین شرایط بهینه فیبریل‌زایی بر اساس نتایج این دو روش و نیز سایر رفرنس‌ها (Arasteh et al., 2012) در غلظت ۱۰ میلی گرم بر

میلی لیتر، دمای ۷۰ درجه، pH برابر ۴ و زمان ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. بنابراین در هر نمودار و برای بررسی اثر هر متغیر، سایر متغیرها در مقادیر بهینه خود ثابت در نظر گرفته شدند.

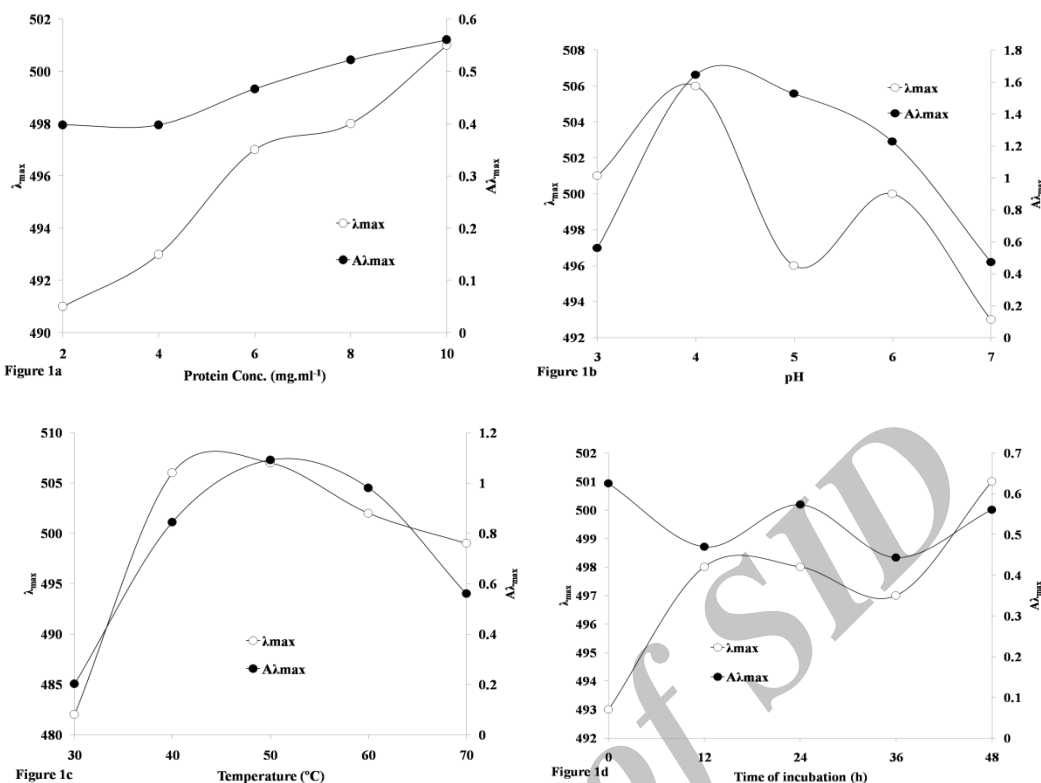
بررسی میزان اتصال سرم آلبومین گاوی به تیوفلاوین T

بر اساس نتایج شدت نشر فلورسانس تیوفلاوین T حداکثر میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر (در دمای ۷۰ درجه، pH برابر ۴ و زمان ۴۸ ساعت) به دست آمد (شکل ۲a). همچنین بررسی دما، pH و زمان به ترتیب دمای ۷۰ درجه، pH برابر ۴ و زمان ۴۸ ساعت را به عنوان بهترین مقادیر در تولید نانو رشته‌های آمیلوئیدی تأیید کردند (شکل ۲b-d).

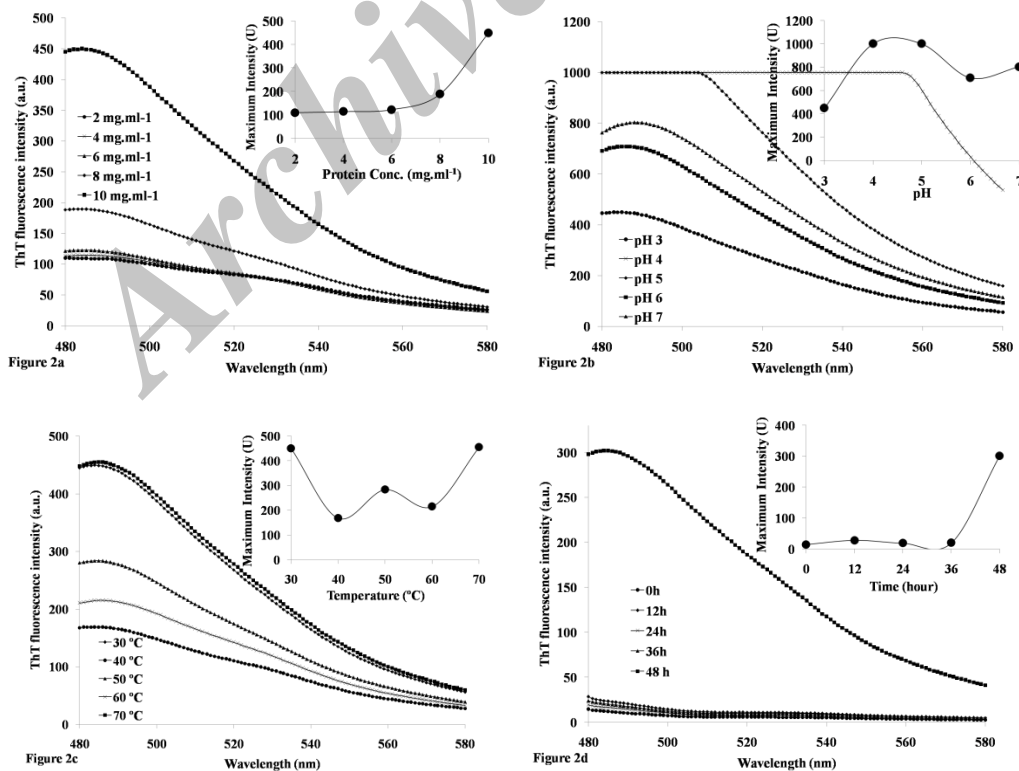
فیبریل‌زایی با افزایش میزان ساختارهای بتا همراه است

روش دورنگ‌نمایی دورانی نیز نتایج حاصل از بررسی فرایند فیبریل‌زایی با روش فلوریمتری را تأیید نمود. در این روش میزان ساختارهای بتا با نرم‌افزار CDNN و در غلظت، دما، pH و زمان‌های مختلف انکوباسیون محاسبه شد که نتایج در شکل ۳a-d نشان داده شده است. همان‌طور که در نمودارها مشخص است، با افزایش میزان حضور ساختارهای بتا، از میزان حضور ساختار آلفا در پروتئین سرم آلبومین گاوی کاسته می‌شود. بنابراین بیشترین میزان ساختار بتا و کمترین میزان ساختار آلفا در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر، دمای ۷۰ درجه، pH برابر ۴ و زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد که مبین بیشترین میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی می‌باشد.

البته برای تأیید حضور رشته‌های آمیلوئیدی و ارتباط دادن این نتایج با حضور رشته‌های آمیلوئیدی در محلول از روش تصویربرداری میکروسکوپی الکترونی گذاره استفاده شد. تصویربرداری در شرایط بهینه فیبریل‌زایی انجام شد و تصاویر حاصله حضور رشته‌های آمیلوئیدی با قطر تقریبی ۱۵ نانومتر و طول تا چند صد نانومتر را در محلول مورد آزمایش از پروتئین سرم آلبومین گاوی تأیید می‌کنند (شکل ۴).



شکل ۱. نمایش میزان تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی با (a) تغییرات غلظت، (b) تغییرات pH، (c) تغییرات دما و (d) تغییرات زمان انکوباسیون



شکل ۲. نمایش میزان تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی در روش طیف سنجی فلورسانس با (a) تغییرات غلظت، (b) تغییرات pH، (c) تغییرات دما و (d) تغییرات زمان انکوباسیون

بحث و نتیجه‌گیری

در حال حاضر تجمعات پروتئینی از جنبه‌های مختلف مورد علاقه محققان قرار گرفته است. به دلیل کاربردهای بیوتکنولوژی و دارویی در تولید فرآورده‌های پروتئینی و همچنین دخالت در ایجاد بیماری‌های مختلف، تجمعات پروتئینی در محدوده وسیعی مورد مطالعه قرار می‌گیرد. به‌علاوه امروزه با درک این مسئله که از فیبرهای آمیلوئیدی می‌توان استفاده‌های متنوعی در علوم نانو همچون تشکیل نانوتیوب‌ها داشت، اهمیت بحث صد چندان گشته است (Chiti & Dobson, 2006; Jeyashekar et al., 2005; Dobson, 2006; Scheibel et al., 2003; Hamada et al., 2004). بررسی فرایند فیبریلاسیون بر روی پروتئین‌های متنوعی انجام شده است.

اگرچه همه این پروتئین‌ها بیماری‌زا نمی‌باشند، اما از آنجاکه تمامی آنها از مکانیسم‌ها و میانکنش‌های بین ملکولی یکسان در روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی استفاده می‌کنند، می‌توان الگوی کلی تشکیل این ساختارها را به‌دست آورد. ساختمان کلی فیبریل‌ها اگرچه تنها شامل صفحات بتا است اما این ساختارها با قرار گرفتن‌های بسیار پیچیده در کنار هم ساختارهایی را ایجاد می‌کنند که بررسی ملکولی آنها بسیار دشوار است. تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی در این پروتئین از طریق مکانیسم پلیمراسیون - هسته‌ای (nucleated-polymerization) انجام می‌شود و بررسی فرایند عموماً یک فاز تأخیر را نشان می‌دهند که به دنبال آن فاز رشد نمایی شروع می‌شود. زمان تأخیر به دلیل تشکیل هسته‌های اولیه برای تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی است و هنگامی که رشته‌ها تشکیل شدند، مرحله طویل‌سازی به سرعت بیشتری از طریق اجتماع مونومرها و اولیگومرها پیش می‌رود. در این فرایند سه حالت تعادلی مونومر، الیگومر و رشته آمیلوئیدی بالغ برای رشته‌ها پیشنهاد شده است (Gras, 2007). در مشاهدات متعدد نقش تعیین‌کننده عوامل محیطی در ایجاد این فیبریل‌های آمیلوئیدی

مورد بررسی قرار گرفته است (Militello et al., 2004; Holm et al., 2007; Arasteh et al., 2010; Pilkington et al., 2012).

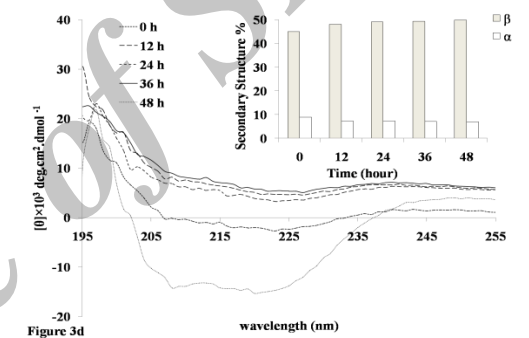
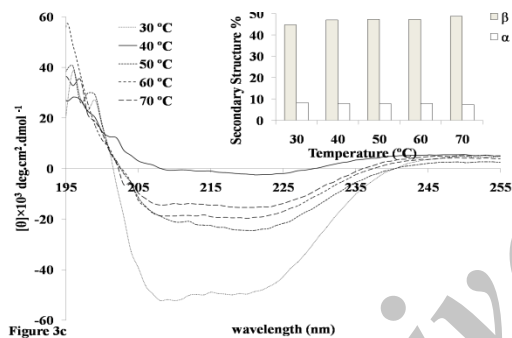
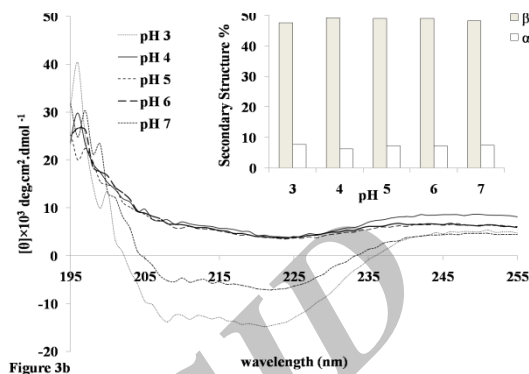
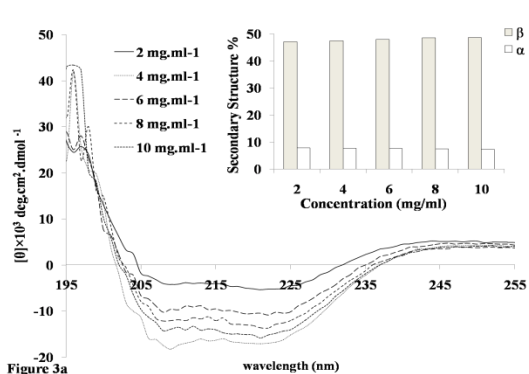
آیا فرایند فیبریل‌زایی قابل بهینه‌سازی است؟

در پژوهش حاضر اثر چهار متغیر غلظت پروتئین، دما، pH و زمان انکوباسیون بر فرایند فیبریل‌زایی از سرم آلبومین گاوی به کمک روش‌های طیف‌سنجی گنگورد، اسپکتروفلوریمتری و دورنگ‌نمایی دورانی مورد بررسی قرار گرفت تا شرایط بهینه برای تولید رشته‌های آمیلوئیدی به‌دست آید. رشته‌های آمیلوئیدی حاصله در شرایط بهینه با میکروسکوپ الکترونی گذاره مورد تأیید قرار گرفت. بر این اساس میزان بهینه رشته‌های آمیلوئیدی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در بافر با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۴ به‌دست آمد.

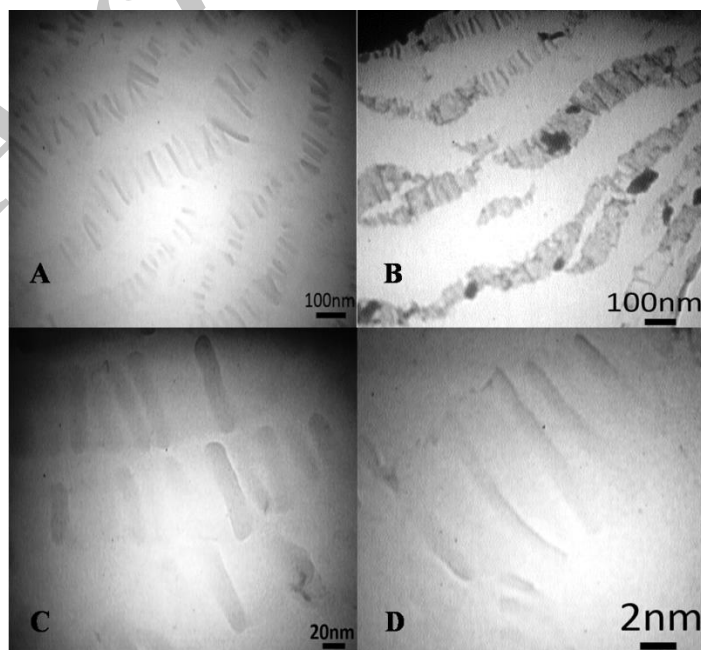
نتایج حاصل از تست‌های جذب‌سنجی با رنگ گنگورد با افزایش مقادیر λ_{max} به‌طور معنی‌دار از غلظت‌های کم به بالا همراه بوده است. این امر مبین این مطلب است که غلظت پروتئین به‌عنوان یکی از عوامل اساسی، مستقیماً فرایند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی را تحریک می‌نماید. میزان جذب در طول موج ماکزیمم به‌دست‌آمده از روش گنگورد نیز به‌عنوان یکی از فاکتورهای دال بر تشکیل رشته‌ها مطرح است. نتایج مشابه به‌دست‌آمده از این فاکتور ($A_{\lambda_{max}}$) نیز مبین این مطلب است که اصولاً فرایند تجمع پروتئین، فرایندی وابسته به غلظت است و با توجه به اینکه تشکیل این تجمعات تحت تأثیر ایجاد میانکنش‌های درون مولکولی از پروتئین‌ها می‌باشد، افزایش غلظت برای بسیاری از پروتئین‌ها موجب افزایش غلظت تجمعات پروتئینی می‌گردد. نتایج حاصل از روش دورنگ‌نمایی دورانی (CD) و نیز اسپکتروفلوریمتری، در این تحقیق، موید این مطلب است که با افزایش غلظت پروتئین، درصد ساختارهای آلفا کاهش یافته و بر میزان ساختارهای ثانویه بتا افزوده شده است. افزایش غلظت پروتئین با بالا

ماکرومولکول‌ها افزایش یافته و حجم بالایی از کل را اشغال می‌کنند و همین امر احتمال برخورد آنها را با هم افزایش می‌دهد.

بردن شانس برخورد حدواسطها به یکدیگر نیز موجب افزایش تجمعات پروتئینی می‌گردد (Finke *et al.*, 2000). در واقع در غلظت‌های بالای پروتئین، جمعیت



شکل ۳. نمایش میزان تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی در روش دورنگ نمایي دوراني با (a) تغييرات غلظت، (b) تغييرات pH، (c) تغييرات دما و (d) تغييرات زمان انکوباسيون



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از رشته‌های آمیلوئیدی با بزرگ‌نمایی (A و B) ۲۰ هزار برابر، (C) ۳۱ هزار و ۵۰۰ برابر و (D) ۱۰۰ هزار برابر تهیه شده در شرایط بهینه فیبریل‌زایی

پروتئین، تعیین‌کننده نوع و نحوه توزیع بارهای سطحی در آن است لذا قادر است از طریق توزیع بار در سطح پروتئین و نیز تأثیر در میانکنش‌های الکتروستاتیک نقش تعیین‌کننده‌ای بر روی رفتار تجمعی پروتئین داشته باشد (Chi *et al.*, 2003). بنابراین pH به‌عنوان پارامتری کلیدی و تعیین‌کننده در میزان تجمعات پروتئینی مطرح می‌باشد. در pH‌های پائین، مثل pH=۴ در مورد سرم آلبومین گاوی، پروتئین‌ها به‌شدت باردارند و این چگالی بار در سطح پروتئین، اثر قابل توجهی بر افزایش میزان میانکنش‌های دافعه‌ای در سطح درون مولکولی و نیز بین مولکولی داشته که منجر به القای تجمعات آمیلوئیدی می‌شود. از نظر تئوری پایداری پروتئین در pI به‌علت به حداقل رسیدن دافعه الکتریکی کاهش می‌یابد ولی نتایج اخیر پیشنهاد می‌کنند، در اطراف pI هنوز میانکنش‌های قابل توجهی بین پروتئین‌ها می‌تواند وجود داشته باشد (Giger *et al.*, 2008) و معمولاً بسیاری از پروتئین‌ها در pH‌هایی کمتر از pI خود مجتمع می‌شوند که در مورد سرم آلبومین گاوی نیز همین‌طور است.

هدف کلی این مطالعه، سنجش توانایی پروتئین با ساختار تمام α به نام سرم آلبومین گاوی برای تشکیل ساختارهای رشته‌ای غنی از صفحات β در شرایط مختلف و بهینه‌سازی آن بوده است. این کار از منظر تولید نانو مواد جدید و امکان استفاده از آنها در موارد مختلف به‌عنوان نانومواد زیستی قابل توجه است، چرا که معمولاً ما این ساختارهای رشته‌ای را به‌عنوان عامل بیماری‌زا می‌شناسیم. نتایج این تحقیق نشان داد که رشته‌های آمیلوئیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی به‌خاطر ابعاد نانو، ساختار فضایی منحصر به فرد و گروه‌های عاملی فراوان و متنوعی که به‌خاطر زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه که در سطح خود دارند، می‌توانند به‌عنوان یک نانو ماده زیستی جدید در موارد مختلف زیستی و بیوتکنولوژی مثل استفاده از آنها به‌عنوان بستری برای تثبیت آنزیم‌ها و یا حامل‌های دارو در سیستم‌های زنده استفاده نمود. البته کار روی سازگاری‌سنجی این نانومواد زیستی جدید

معمولاً پروتئین‌ها در دماهای بالا تا خوردگی خود را از دست داده و به‌علت در معرض قرارگیری باقیمانده‌های آبگریز، تجمعات پروتئینی را به‌وجود می‌آورند. افزایش دما موجب افزایش فرکانس تصادم مولکولی شده و از این طریق سرعت تشکیل تجمعات پروتئینی را بالا می‌برد (Speed *et al.*, 1997). علاوه بر این افزایش دما از طریق تغییراتی که در ساختار پروتئین اعمال می‌کند موجب افزایش میانکنش‌های آبگریز بین مولکولی شده و احتمال تشکیل تجمعات را بالا می‌برد. از طرف دیگر دمای بالا موجب ایجاد تغییرات شیمیایی در پروتئین می‌شود (Vermeer & Norde, 2000). دماهای بالاتر می‌توانند حتی مستقیماً بر روی ساختار فضایی زنجیره پلی‌پپتیدی در سطح سوم و چهارم هم تأثیر گذاشته و موجب تشکیل حدواسط‌هایی شوند که در اغلب موارد منجر به تشکیل تجمعات پروتئینی می‌گردند. میزان حداکثری تجمعات القا شده در این مطالعه که در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد مؤید این مطلب است که دماهای نزدیک به T_m پروتئین سرم آلبومین گاوی (۵۹ درجه سانتی‌گراد) یا کمی بالاتر از آن، اختصاصاً جهت القای تجمعات منظم پروتئینی مناسب هستند (Gspomer & Vendruscolo, 2006). میزان بیشینه نشر فلورسانس ThT در مورد سرم آلبومین گاوی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به حداکثر خود می‌رسد که البته در این میان نوع پروتئین و پایداری ساختاری آن هم از اهمیت بالایی برخوردار است. برای مثال در پروتئین‌هایی مثل β -لاکتاماز (Georgiou *et al.*, 1994) و پروتئین پوششی فاژ P22 (Teschke, 1999)، دمای بالاتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد است که موجب تشکیل تجمعات آمیلوئیدی می‌شود.

بررسی روند فیبریل‌زایی با تغییرات pH نیز در مقادیر اپتیمم غلظت و دما به‌صورت ثابت در نظر گرفته شد و با این کار امکان بررسی اثر تغییرات pH به‌طور منطقی فراهم گردید. از آنجائی که pH محلول در برگیرنده

دکتر محمد علی حسینی، مدیر محترم آزمایشگاه پیام نور قم جناب آقای دکتر مهدی کلهر و کارشناسان آزمایشگاه سرکار خانم لیلا یادگار، خانم سیدزاده و استاد ارجمند سرکار خانم آزاده قرخوانی که ما را در ارتقاء کیفی این پژوهش یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

می‌تواند آنها را در شرایط *inVivo* نیز قابل استفاده سازد که در تحقیقات آینده باید مد نظر قرار گیرد.

سپاسگزاری

از ریاست محترم دانشگاه پیام نور مرکز قم جناب آقای

REFERENCES

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.; (2002). Molecular biology of the cell. New York: Garland Science.
- Arasteh, A.; Habibi-Rezaei, M.; Ebrahim-Habibi, A.; Moosavi-Movahedi, A.A.; (2012). Response surface methodology for optimizing the bovine serum albumin fibrillation. The Protein Journal; 31(6): 457-65.
- Carrió, M.; González-Montalbán, N.; Vera, A.; Villaverde, A.; Ventura, S.; (2005). Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. J Mol Biol; 347: 1025-37.
- Chi, E.Y.; Krishnan, S.; Randolph, T.W.; Carpenter, J.F.; (2003). Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. Pharmaceutical research; 20(9): 1325-36.
- Chiti, F.; Dobson, C.M.; (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. Annu Rev Biochem; 75: 333-66.
- Chiti, F.; Dobson, C.M.; (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. Annu Rev Biochem; 75: 333-66.
- Dirix, C.; Duvetter, T.; Loey, A.V.; Hendrickx, M.; Heremans, K.; (2005). The in situ observation of the temperature and pressure stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectin methylesterase with Fourier transform IR spectroscopy reveals an unusual pressure stability of beta-helices. The Biochemical Journal; 392(Pt 3): 565-71.
- Dobson, C.; (2003). Protein folding and misfolding. Nature; 426(6968): 884-90.
- Dobson, C.; (2006). Protein aggregation and its consequences for human disease. Protein Pept Lett; 13(3): 219-27.
- Dobson, C.M.; (2006). Protein aggregation and its consequences for human disease. Protein Pept Lett; 13(3): 219-27.
- Eichner, T.; Radford, S.E.; (2011). A diversity of assembly mechanisms of a generic amyloid fold. Molecular Cell; 43(1): 8-18.
- Elzoghby, A.O.; Samy, W.M.; Elgindy, N.A.; (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society; 157(2): 168-82.
- Fink, A.L.; (1998). Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. Folding and Design; 3(1): R9-R23.
- Finke, J.M.; Roy, M.; Zimm, B.H.; Jennings, P.A.; (2000). Aggregation events occur prior to stable intermediate formation during refolding of interleukin 1. Biochemistry; 39(3): 575-83.
- Fukuma, T.; Mostaert, A.; Jarvis, S.; (2006). Explanation for the mechanical strength of amyloid fibrils. Tribology Letters; 22(3): 233-7.
- Ganesh, C.; Zaid, F.N.; Udgaonkar, J.B.; Varadarajan, R.; (2001). Reversible formation of on-pathway macroscopic aggregates during the folding of maltose binding protein. Protein Science; 10: 1635-44.
- Garvey, M.; Gras, S.; Meehan, S.; Meade, S.; Carver, J.; Gerrard, J.; (2009). Protein nanofibres of defined morphology prepared from mixtures of

- crude crystallins. *Int J Nanotechnol*; 6: 258-2783.
- Gelamo, E.; Tabak, M.; (2000). Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*; 56(11): 2255-71.
- Georgiou, G.; Valax, P.; Ostermeier, M.; Horowitz, P.M.; (1994). Folding and aggregation of TEM beta-lactamase: analogies with the formation of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein science: a publication of the Protein Society*; 3(11): 1953.
- Giger, K.; Vanam, R.P., Seyrek, E.; Dubin, P.L.; (2008). Suppression of insulin aggregation by heparin. *Biomacromolecules*; 9(9): 2338-44.
- Gras, S.L.; (2007). Amyloid Fibrils: From Disease to Design. *New Biomaterial Applications for Self-Assembling Cross- β Fibrils*. *Applied chemistry*; 5.
- Gsponer, J.; Vendruscolo, M.; (2006). Theoretical approaches to protein aggregation. *Protein and Peptide Letters*; 13(3): 287-93.
- Hamada, D.; Yanagihara, I.; Tsumoto, K.; (2004). Engineering amyloidogenicity towards the development of nanofibrillar materials. *Trends Biotechnol*; 22(2): 93-7.
- Holm, N.; Jespersen, S.; Thomassen, L.; Wolff, T.; Sehgal, P.; Thomsen, L.; et al.; (2007). Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*; 1774(9): 1128-38.
- Honda, C.; Kamizono, H.; Samejima, T.; Endo, K.; (2000). Studies on Thermal Aggregation of Bovine Serum Albumin as a Drug Carrier. *Chem Pharm Bull*; 48(4): 464-6.
- Jayawardena, N.; Kaur, M.; Nair, S.; Malmstrom, J.; Goldstone, D.; Negron, L.; et al.; (2017). Amyloid Fibrils from Hemoglobin. *Biomolecules*; 7(2): 37.
- Jeyashekar, N.S.; Sadana, A.; Vo-Dinh, T.; (2005). Protein amyloidose misfolding: mechanisms, detection, and pathological implications. *Methods Mol Biol*; 300: 417-35.
- Juarez, J.; Taboada, P.; Mosquera, V.; (2009). Existence of different structural intermediates on the fibrillation pathway of human serum albumin. *Biophysical Journal*; 96(6): 2353-70.
- Knowles, T.P.; Fitzpatrick, A.W.; Meehan, S.; Mott, H.R.; Vendruscolo, M.; Dobson, C.M.; et al.; (2007). Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils. *Science*; 318(5858): 1900-3.
- Kouchakzadeh, H.; Safavi, M.S.; Shojaosadati, S.A.; (2015). Efficient delivery of therapeutic agents by using targeted albumin nanoparticles. *Advances in protein chemistry and structural biology*; 98: 121-43.
- Kratz, F.; (2008). Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*; 132(3): 171-83.
- Lashuel, H.A.; Lansbury, P.T.; (2006). Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Quarterly Reviews of Biophysics*; 39(02): 167-201.
- Lashuel, H.A.; Lansbury, P.T.; (2006). Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Quarterly Reviews of Biophysics*; 39(02): 167.
- Lorenzo, A.; Yankner, B.A.; (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc Natl AcadSci USA*; 91(25): 12243-7.
- Lorenzo, A.; Yankner, B.A.; (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 91(25): 12243-7.
- MacPhee, C.E.; Woolfson, D.N.; (2004). Engineered and designed peptide-based fibrous biomaterials. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*; 8(2): 141-9.

- Militello, V.; Casarino, C.; Emanuele, A.; Giostra, A.; Pullara, F.; Leone, M.; (2004). Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering. *Biophysical Chemistry*; 107(2): 175-87.
- Pilkington, S.M.; Roberts, S.J.; Meade, S.J.; Gerrard, J.A.; (2010). Amyloid fibrils as a nanoscaffold for enzyme immobilization. *Biotechnology Progress*; 26(1): 93-100.
- Scheibel, T.; Parthasarathy, R.; Sawicki, G.; Lin, X.M.; Jaeger, H.; Lindquist, S.L.; (2003). Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100(8): 4527-32.
- Sethi, A.; Sher, M.; Akram, M.; Karim, S.; Khiljee, S.; Sajjad, A.; et al.; (2013). Albumin-Lasa drug delivery and diagnostic tool and its market approved products. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research*; 70(4): 597-600.
- Smith, J.; Knowles, T.; Dobson, C.; Macphee, C.; Welland, M.; (2006). Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103(43): 15806-11.
- Speed, M.A.; King, J.; Wang, D.I.C.; (1997). Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation. *Biotechnology and Bioengineering*; 54(4): 333-43.
- Taboada, P.; Barbosa, S.; Castro, E.; Mosquera, V.; (2006). Amyloid fibril formation and other aggregate species formed by human serum albumin association. *The Journal of Physical Chemistry B*; 110(42): 20733-6.
- Teschke, C.M.; (1999). Aggregation and assembly of phage P22 temperature-sensitive coat protein mutants in vitro mimic the in vivo phenotype. *Biochemistry*; 38(10): 2873-81.
- Uversky, V.N.; Segel, D.J.; Doniach, S.; Fink, A.L.; (1998). Association-induced folding of globular proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95: 5480-3.
- Vermeer, A.W.P.; Norde, W.; (2000). The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophysical Journal*; 78(1): 394-404.
- Waterhouse, S.; Gerrard, J.; (2004). Amyloid Fibrils in bionanotechnology. *Current Chemistry*; 57: 519-23.