Archive of SID

بررسی نقش متانول در القای تشکیل آمیلوئید در آپوالکل دهیدروژناز مخمر

مهران میراولیایی[1*]، بهنام ابراهیمیان[2]، سامان حسینخانی[3] و عطیه قاسمی[4]

[1] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، بخش بیولوژی سلولی- مولکولی، گروه زیست شناسی

[2] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات ، دانشکده زیست شناسی

[3] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

[4] تهران، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۳ تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۱٦

چکیده

تشکیل آمیلوئید در پروتئین های غیر بیماری زا تحت تأثیر برخی حلال های قابل امتزاج با آب مثل الکل ها کمتر مطالعه شده است . در تحقیق حاضر فرآیند تشکیل آمیلوئید در آپوالکل دهیدروژناز مخمر(apoI-YADH)که در اثر تخلیه اتم روی ساختاری تهیه شده، در محیط آب-متانول ارزیابی گردید.ایجاد آمیلوئید به کمک معرفهای Congo Red و Thioflavin T واستفاده از روش های طیف سنجی فلورسانس و دو رنگ نمایی دورانی مورد مطالعه قرار گرفت. تشکیل آمیلوئید در apoI-YADHتابع غلظت متانول است و از ترتیب (٪۸۰>٪۷۰>٪٦۰>٪٤۰>٪۲۰) پیروی می کند. روند تشکیل آمیلوئید در آنزیم همراه با انتقال ساختار از حالت طبیعی (Native) به حالت غنی از صفحات بتا (ß- sheet rich) است. مطالعات توسط طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی (far-UV CD)چنین تغییرات ساختاری در آنزیم را به خوبی تأیید نمود.

واژه های کلیدی: آمیلوئید – طیف سنجی فلورسانس، طیف سنجی CD – متانول – Congo red – Thioflavin T .

***نویسنده مسئول، تلفن:** 0311-7932455 **پست الکترونیکی:** mmiroliaei@sci.ui ac.ir

مقدمه

هنگامی پروتئین ها در شرایط نامساعد قرار می گیرند ممکن است فعالیت خود را از دست بدهند و در نتیجه به صورت توده هایی (aggregates) در محیط رسوب کنند (۲۲).

به خوبی معلوم شده است که چندین بیماری در انسان، به خصوص بیماری های تخریب کننده سلولهای مغزی مثل آلزایمر و پارکینسون در اثر رسوب مقدار زیادی از این توده های پروتئینی ایجاد می شوند. در واقع این توده های پروتئینی تشکیل ساختار فیبر مانندی می دهند که به عنوان فیبرهای آمیلوئیدی شناخته می شوند (۱-۲).

اصطلاح آمیلوئید که برگرفته شده از کلمه لاتین آمیلوم (Amylum) است برای اولین بار در سال ۱۸٤٥ توسط ویرکف(Virchow) دانشمند آلمانی مطرح شد (۲۰). در حقیقت، علت تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی حاصل تاخوردگی اشتباه (misfolding) وتوده ای شدن (aggregation) پروتئین ها است (۱۷). تحقیقات نشان داده

www.SID.ir

Archive of SID

است که یکی از مراحل مهم در تشکیل آمیلوئید انتقال ساختار از حالت (Native) به حالت غنی از صفحات بتا (ß-rich) می باشد. شرایط و نوع حلال اغلب تاثیر مستقیمی بر انتقال ساختار در فیبرهای آمیلوئیدی دارد (١٤). در ضمن ، با وجود تفاوت در توالی و ساختار پروتئینهای پیش ساز آمیلوئید، تمام فیبرهای آمیلوئیدی سیمای مورفولوژیکی یکسان دارند (٤).

تحقیقات نشان داده است برخی پروتئینهای غیر بیماریزا توانایی تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی را در محیطهای غیر نرمال مثل الکل و اسید دارند (١٦). آنزیم الکل دهیدروژناز مخمر (E.C.1.1.1.1؛YADH) یکی از این پروتئینها است (٢١). این پروتئین آنزیمی تترامر با هشت اتم روی(Zn) و وزن مولکولی ١٥٠ kDa است . در هر زیرواحد آنزیم دو اتم Zn وجود دارد. یکی از این اتمها در جایگاه فعال قرار دارد و برای فعالیت آنزیم ضروری است و اتم Zn دوم با دارا بودن نقش ساختاری باعث استحکام ساختمان سوم آنزیم می شود. با خارج کردن اتم روی ساختاری می توان فرم apo را تهیه کرد(١٨). هدف از تحقیق حاضر ، مطالعه تشکیل آمیلوئید در متالوپروتئین apo-YADH است. تشکیل آمیلوئید به وسیله دو معرف Congo Red و Thioflavin T و همچنین تغییر در ساختار apo-YADH با استفاده از اسپکتروسکوپی دو رنگ نمایی دورانی (CD) مورد مطالعه قرار گرفت .

مواد و روشها

الکل دهیدروژناز مخمر(YADH) ، NAD^+ (با خلوص ٩٩ درصد) ، DTT (دی تیوتریتول) ، سدیم فسفات ، Congo Red و Thioflavin T از شرکت سیگما خریداری شد. متانول و سایر معرف ها از شرکت مرک تهیه شده اند.

سنجش فعالیت آنزیمی: فعالیت آنزیمی به روش Magonet (١٢) ارزیابی شد. الکل دهیدروژناز مخمر واکنش اتانول به استالدئید را کاتالیز می کند. برای انجام این واکنش به ترتیب ٩٨٠µl از محلول اتانول (٠/٣ M) با ١٠ µl از محلول β-NAD (٠/٥ mM) و ١٠µl از آنزیم رقیق شده (از محلول ١ mg/ml آنزیم در بافر فسفات) مخلوط گردید. تشکیل NADH در دمای ٢٥ درجه و ٣٤٠ nm به وسیله دستگاه طیف سنج UV مدل 160 – Shimadzu بررسی شد.

تهیه apoI YADH : فرم آپو YADH به روش Magonet تهیه شد(١٢). ابتدا محلول بافر Tris-HCl با غلظت ٠.١ M و pH ٦.٥ حاوی NaCl (٠.١ M) و DTT (١٠٠ mM) تهیه گردید. سپس آنزیم طبیعی به ٥ ml محلول فوق الذکر اضافه و به مدت ٣-٢ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد (در ظرف حاوی یخ) تیمارگردید. در مرحله بعد Zn^{2+} های (ساختاری) کیلیت شده توسط DTT به روش ژل فیلتراسیون از محلول آنزیمی جدا شدند. خروج Zn های ساختاری از آنزیم توسط تکنیک طیف سنجی جذب اتمی به کمک دستگاه ChemTech مدل CTA-2000 تأیید گردید. تخلیه شدن اتم های روی از آنزیم قبلاً نیز تائید شده است (١٣).

تشخیص فیبرهای آمیلوئیدی به روش رنگ آمیزی Congo Red : Congo Red (CR) معرف رنگی اختصاصی برای شناسایی فیبرهای آمیلوئیدی است (٩). سپس تشکیل آمیلوئید در apoI-YADH درمحیط آبی محلول آب – متانول به روش Klunk (١١) مورد آزمایش قرار گرفت. بر اساس این روش محلول apoI-YADH در محیط الکل (٣٠ بار رقت) قرار داده شد. برای رقیق کردن الکل از بافر فسفات pH ٧.٥ استفاده شد. این محلول شامل Congo Red با غلظت ٥ µM و حجم نهایی ١ mL است. به منظور برهم کنش بین مولکول های رنگ و فیبرهای آمیلوئیدی، نمونه به مدت ١٥ دقیقه و دمای ٢٥ درجه سانتی گراد با Congo red تیمار شد. طیف جذبی در طول موج nm ٦٥٠–٣٥٠ به وسیله دستگاه طیف سنج Perkin –1000 Elmer ثبت گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

تشخیص فیبرهای آمیلوئیدی به روش فلورسانس ThT : ارزیابی بر هم کنش مولکول های Thioflavin T (ThT) به فیبرهای آمیلوئیدی apo-YADH به این ترتیب انجام شد که در ابتدا ۱ mg، apoI-YADH در محلول الکلی حل گردید. برای رقیق کردن محلول الکلی از فسفات بافر mM ۱۵۰، PH= ۷.۵ استفاده شد. غلظت معرف رنگی Thioflavin T در بافر مورد استفاده برابر ۳ µM است. pH محلول مورد آزمایش باید در حدود ۷ حفظ شود، زیرا در pH های کمتر از ۵ بین پروتئین و مولکول های رنگ برهم کنش ایجاد نمی شود (۱۱). محلول ThT حاوی آنزیم به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. در این مرحله تشکیل آمیلوئید به روش فلورسانس توسط اسپکتروفلوریمتر (Cary Eclipse) مدل VARIAN مورد آزمایش قرار گرفت.

بررسی تغییر ساختار در apoI-YADH با استفاده از Far-UV CD : طیف سنجی CD در ناحیه Far-UV به منظور آشکار ساختن جزئیات ساختار دوم مورد استفاده قرا می گیرد (۱۰). مطالعه تشکیل آمیلوئید، با استفاده از 0.۳ میلی گرم apo-YADH در غلظت های مختلف متانول به مدت ۱۰ دقیقه و در ۲۵ درجه سانتی گراد به انجام رسید. ثبت طیف های مربوطه با استفاده از دستگاه اسپکترو پلاریمتر (AVIV 215) انجام شد. در غلظت های زیاد به علت Noise در طیف های CD ، غلظت پروتئین در این آزمایش تقریبا ۵۰٪ آزمایشات قبلی (در روش رنگ آمیزی و فلورسانس) بوده است.

نتایج

تشکیل ساختارآمیلوئید در آنزیم طبیعی الکل دهیدروژناز (Holo-YADH) به اثبات رسیده است. Shimizo و همکاران تشکیل این نوع ساختار را به رفتار دینامیکی مولکول های آب محیط اطراف که توأم با بروز حالت غنی از صفحات بتا (ß-sheet rich) در شکل طبیعی آنزیم است، نسبت داده اند (۱۹). انتقال ساختار به حالت کاملاً و یا قدری باز شده، عامل بنیادین در تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی محسوب می شود.از طرف دیگر، YADH در زمره پروتئین های ناپایدار قرار دارد (۱۳)، و این نقصان در فرم apo-I آنزیم به ویژه در مواجه با شرایط دمای زیاد، محیط های اسیدی و قلیایی قوی تشدید می شود (۹). حساسیت بیشتر apo-YADH در مقایسه با فرم Holo درجریان aggregate شدن (که خود عامل کلیدی در پیدایش فیبرهای آمیلوئیدی است)هنگام مواجه با چنین شرایطی تأیید شده است (۱۳). ضمناً فرم apo-I آنزیم درجه بالاتری از هیدروفوبیسیتی را نسبت به هولو-آنزیم نشان می دهد (۱۳). چنین مشخصه هایی مؤید ساختار ناپایدارتر apoI-YADH است. لذا به نظر می رسد حالت آپو،الگوئی قابل تعمیم برای بررسی روند تشکیل آمیلوئید در محیط های آبی-الکلی باشد. محلول های الکلی می توانند با دناتوره کردن پروتئین ها، باعث انتقال ساختار در آنها شوند. بر این اساس، در پروژه حاضر تلاش گردید با طراحی یک آنزیم کاملاً ناپایداراز طریق تشکیل حالت مصنوعی "*آپو*" ، جزئیات بیشتری از مکانیسم پیدایش ساختارهای آمیلوئیدی روشن شود. این گونه مطالعات می تواند در تفسیر مکانیسم های دخیل در روند آمیلوئیدی شدن پروتئین ها، الگوی مناسبی فراهم نماید.

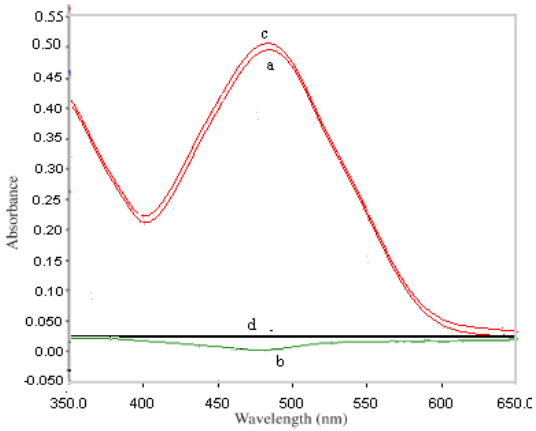
تشکیل آمیلوئید در apo-YADH با استفاده از دو معرف قرمز کنگو (CR) و تیوفلاوین T (ThT)،از طریق تفاضل طیف Congo Red و apo-YADH از طیف حاصل از ترکیب YADH–*Congo Red* به روش طیف تفاضلی (difference spectrum) به دست می آید. شکل ۱a نشان می دهد طیف تفاضلی ترکیب YADH–*Congo Red* در محدوده ۳۵۰ –۶۵۰ نانومتر دارای جذب مشخصی نیست.این نتایج با آنچه در خصوص حالت طبیعی Holo-YADH گزارش شده (۱۹) مطابقت دارد. برخورد فضایی مولکول های CR و ساختارهای بتا باعث ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین معرف رنگی و فیبرهای آمیلوئیدی می شود. این برخورد همچنین همراه با انکسار مضاعف نور است

www.SID.ir

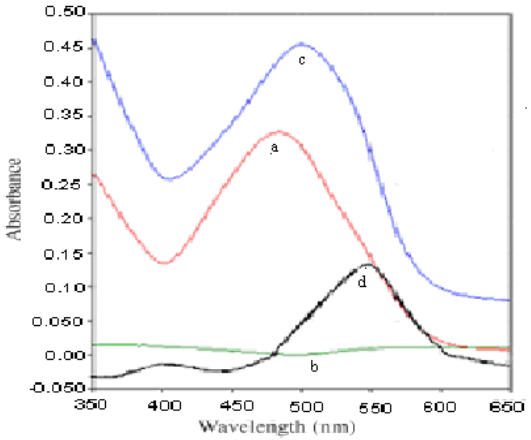
Archive of SID

(۹ و ۸). در محلول آبی apoI-YADH به علت عدم وجود ساختار غنی از صفحات بتا برخوردی بین این صفحات و مولکولهایCR ایجاد نمی شود ودر نتیجه انتقالی در طیف ۳ نسبت به طیف 2 دیده نمی شود.

(a)



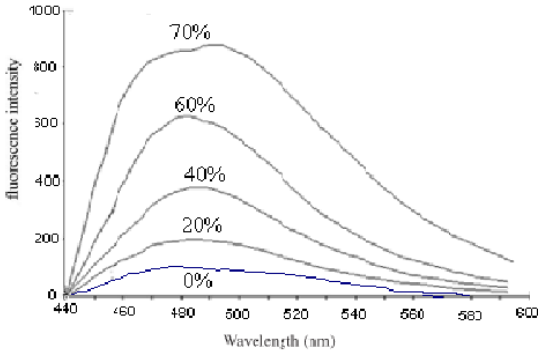
(b)



شکل ۱- طیف محلول های Congo Red (a) در آب و (b) در متانول ٦۰٪ در ۲۵ °C. طیف ها به ترتیب شامل apoI-YADH , Congo Red (2)، (1) (3) 1+2،(٤) طیف تفاضلی.

با افزودن متانول (٦۰٪) انتقال در طیف ۳ نسبت به طیف ۲ مشاهده می گردد (شکل۱b). در این صورت طیف تفاضلی در ٥٤۱nm دارای پیک می شود. وجود این پیک معرف تشکیل آمیلوئید است (۱۹).

افزایش شدت نشر فلورسانس مولکولهای ThT ، روش دیگری برای نمایش تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی است. این معرف مارکری اختصاصی برای شناسایی ساختار ß- sheet در فیبرهای آمیلوئیدی محسوب می شود (٦). طیف های حاصل از تیمار (۱۵ دقیقه) آپوآنزیم- متانول با ThT در شکل ۲ نمایش داده شده است. به وضوح مشخص است با افزایش غلظت متانول، شدت طیف های فلورسانس ThT افزایش نشان داده اند. حضور متانول باعث تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می شود. خصوصیات فلورسانسی ThT، صرفا برخواسته از تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی است و اتصال آن با پروتئین های بیش ساز آمیلوئید و همچنین تجمع های بی شکل (amorphous aggregates) سبب بروز این پدیده نمی شود (٦). از آنجایی که برخی یافته ها اتصال این معرف را به گونه های پروتوفیبریلی نیز نشان داده اند، با این وجود لازم است داده های حاصل از آزمایشات ThT با داده های به دست آمده از روش میکروسکپی نیز تأیید شوند. ThT آزاد در٤٤۰ nm دارای نشر فلورسانس است. این طول موج هنگام اتصال مولکول های ThT به فیبرهای آمیلوئیدی به ٤۸۰nm انتقال می یابد (٦ و ۱۵). بر این اساس، وجود پیک در ٤۸۰nm ممکن است مؤید اتصال تیوفلاوین به فیبرهای آمیلوئیدی نیز باشد (شکل۲).

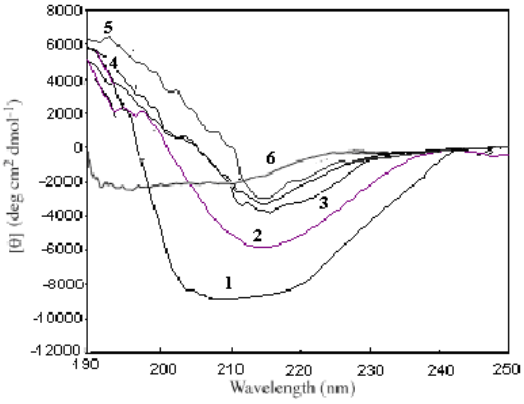


شکل ۲- طیف فلورسانس حاصل از Thioflavin T در محلول متانول آبدار حاوی apoI- YADH. اعداد معرف غلظت های متانول برحسب درصد است.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۳ نشان دهنده طیف far-UV CD مربوط به apoI-YADH در غلظت های مختلف متانول و در ۲۵ C° است. طیف CD حاصل از apoI-YADH در عدم حضور متانول دارای دو مینیمم در۲۰۸ nm و۲۲۲nm است. این پدیده انعکاسی از وجود ساختار α-helix است (۱۹). با اضافه شدن متانول به apoI- YADH یک مینیمم در ۲۱۵ nm طیف CD مشاهده می شود. وجود پیک در این طول موج مؤید حضور صفحات بتا است. این نوع انتقال ساختار از –αهلیکس به صفحه–ß ، خود یک مرحله مهم در تشکیل ساختار آمیلوئید محسوب می شود (۵).



شکل ۳- طیف far-UV CD مربوط به apoI- YADH در غلظت های مختلف محلول متانول- آب در ۲۵ C° به مدت ۱۰دقیقه .غلظت های متانول بر حسب (درصد):

(1) 0 (2) 20 (3) 40 (4) 60 (5) 70 (6) 80

از آنجایی که پارامتر دورنگ نمائی [θ] با غلظت پروتئین موجود در نمونه رابطه معکوس دارد، افزایش این پارامتر با افزایش مقدار الکل ممکن است در اثر افزایش میزان aggregation آنزیم ودر نتیجه کاهش مقدار پروتئین محلول باشد (۱۹). این در حالی است که نتایج حاصل از فلورسانس به صورت نسبی بیان می شوند وتغییرات طیف بستگی به غلظت پروتئین دارد.از طرفی غلظت الکل مورد نیاز برای انتقال ساختار در پروتئین با کاهش غلظت پروتئین کاهش می یابد، بر این مبنااختلاف ظاهری داده های حاصل از این دو تکنیک قابل تفسیر خواهد بود.

بحث و نتیجه گیری

بدون شک بررسی تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی به ویژه در پروتئین های غیر بیماری زا در عرصه پزشکی اهمیت زیادی دارد. تا کنون تشکیل آمیلوئید در پروتئین های متعدد مورد بررسی قرار گرفته است .با این وجود گزارشات اندکی در مورد تشکیل آمیلوئید در پروتئین های دستکاری شده انتشار یافته است.

آنزیم الکل دهیدروژناز یک متالو پروتئین حاوی روی است . DTT با خاصیت احیا کنندگی زیاد خود باندهای دی سولفیدی موجود در این آنزیم را باز کرده و با کیلیت شدن به اتم های Zn ساختاری می تواند آنها را از آنزیم خارج نماید (۱۲). در نتیجه با خارج شدن انتخابی اتم های Zn (ساختاری) فرم apoI آنزیم الکل دهیدروژناز ایجاد می شود.

ساختار محلول می تواند در حفظ پایداری ساختمان apoI-YADH تأثیر زیادی داشته باشد. محلول هایی مثل محلول های الکلی واسیدی با دناتوره کردن پروتئین، باعث انتقال ساختار در آنها می شوند. در تحقیق حاضر انتقال ساختار در apoI-YADH از حالت طبیعی به ساختار آمیلوئید حاصل از حضور متانول مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج به دست آمده، این انتقال ارتباط زیادی به نوع الکل و غلظت آن دارد. الکل ها اثرات متفاوتی بر روی پروتئین ها دارند. تخریب حالت طبیعی پروتئین و انتقال ساختار α-helix **به** ß- sheet یکی از این اثرات است (۳). ساختار پروتئین در الکل به طور کامل تخریب نمی شود و نوعی حالت واسط را به خود می گیرد. در این حالت زیر واحدهای حاوی صفحات ß با یکدیگر برهم کنش داده و با ایجاد صفحات داخل مولکولی باعث تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می شوند (۱۹). نتایج حاضر (شکل۳) نیز نشان می دهد که ایجاد صفحات ß در apoI-YADH و در حضور متانول باعث تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می شود. پایداری ساختار پروتئین در محلول آبی –الکلی تحت تأثیر

www.SID.ir

Archive of SID

رقابت بین پروتئین ،آب والکل مشخص می شود. چنانچه قدرت برهم کنش بین پروتئین و آب بیشتر از قدرت برهم کنش بین الکل و آب باشد، ساختار پروتئین در حالت طبیعی خود باقی می ماند. برهم کنش قوی تر بین الکل و آب نسبت به بر هم کنش بین آب و پروتئین سبب نا پایدار شدن ساختار پروتئین به واسطه دهیدراتاسیون آن می شود و زمینه را برای انتقال ساختار مهیا می سازد (۷). بر این اساس با افزایش غلظت متانول، قدرت برهم کنش الکل–آب بیشتر از قدرت برهمکنش پروتئین–آب می شود. از آنجائی که اولین قدم در تشکیل آمیلوئید ناپایدار شدن ساختمان پروتئین است ،کاهش آب هیدراته می تواند این امر را تشدید کند. تشکیل آمیلوئید در apoI-YADH در محلول آبدار الکل به طور قوی توسط جذب مولکول های آب (دهیدراتاسیون) به سمت مولکول های الکل تشدید می شود. پارامتر B_R (Dynamic Water Structure) به خوبی منعکس کننده قدرت محلول الکلی در جذب مولکولهای آب و تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی است (۲۰). مطالعات Shimizu و همکارانش (۱۹) برروی holo-YADH نشان داد که افزایش B_R متناسب با افزایش تعداد کربن الکل است . یافته های تحقیق حاضر بر روی apoI-YADH به کمک دو معرف قرمز کنگو و تیو فلاوین نیز ثابت می نماید که با افزایش تعداد کربن در سایرالکل ها، به واسطه افزایش قدرت محلول الکلی در جذب مولکول های آب، تشکیل آمیلوئید تشدید می شود (داده ها نشان داده نشده است).

طیفهای CD (شکل۳) نشان داد که یکی از مراحل اولیه و مهم در تشکیل آمیلوئید انتقال ساختار از حالت طبیعی به حالت غنی از صفحات ß است. طیف به دست آمده از پروتئین apoI-YADH در بافر فسفات (بدون حضور متانول) گویای حضور α-helix وß- sheet در ساختار دوم آن است. وجود یک مینیمم در پیک ۲۰۸ nm (α-helix) و یک پهنا در ۲۱۵nm (ß- sheet) مؤید این پدیده است(۵). با افزودن غلظتهای مختلف متانول، تغییر ساختار از حالت α-helix **به** ß- sheet می دهد . این تغییر ساختار با انتقال طیف از ۲۰۸nm به ۲۱۵ nm نمایان شده است.

به طور کلی، نتایج به دست آمده نشان می دهند که متانول به عنوان یک حلال آلی دناتوره کننده باعث القاء تشکیل آمیلوئید در apo-YADH می شود. با توجه به عدم حضور Zn ساختاری در پروتئین ،حضور متانول به کلی باعث تخریب ساختار نمی شود بلکه صرفا انتقال در ساختاررا باعث می شود. نتایج CD، این نوع انتقال ساختار از α-helix به ß- sheet را تأیید می نماید. تغییر در شدت تشکیل آمیلوئید (شکل۲) بیانگر این واقعیت است که القاء ساختار آمیلوئیدی در آنزیم با افزایش غلظت الکل رابطه مستقیم دارد.

منابع

1. Carrell R.W., Lomas D.A. (1997) Conformational disease . Lancet 350: 134-38.
2. Dobson C.M. (2003) Protein folding and misfolding. Nature 426:884-890.
3. Fasman, G.D. (1996) Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. Adv. Protein Chem. 64:327-334.
4. Fermandez A. (2005) What factor drives the fibrillogenic association of ß-sheets? Federation of European Biochemical Societies Let. 579: 6635-6640.
5. Greenfield N., Fasman G.D. (1969)Computed circular dichroism spectra for theevaluation of protein conformation. Biochemistry 8:4108-16.
6. Groenning M., Olsen L., Vande W.M. (2006) Study on the binding of thioflavin T to ß-sheet – rich and non ß-sheet cavities. J. Struc. Biol. 158(3):358-69.
7. Hirota N., Mizuno K., Goto Y. (1998) Alcohol-induced denaturation of ßlactogolobulin:a close correlation to the alcohol-induced α-helix formation of melitin. J. Mol. Boil. 275:365-378.
8. Khurana R., Fink A.L. (2000) Do parallel beta-helix proteins have a unique fouier transform infrared spectrum. Biophys. J.78 : 994 -1000
9. Khurana R., Uversky V.N., Nielsen L. (2001) Is congo red an amyloid –specific dye? J. Biol. Chem. 276: 22715-22721.

www.SID.ir

Archive of SID

10. Klewpatinond M., Viles J.H. (2007) Empirical rules for rationalizing visible circular dichroism of Cu2+ and Ni2+ histidine complexes: Applications to the prion protein. Federation of European Biochemical Societies Letters .581: 1430-1434.
11. Klunk W.E , Jacob R.E., Mason R.P. (1999) Inhibition of fibril formation of Aβ by guanidiniocarbonyl pyrrole receptors. Anal. Biochem. 266: 66-67.
12. Magonet E., Hayen P., Delforge D., Delaive E., Remacle J. (1992) Importance of the structural zinc atom for the stability of yeast alcohol dehydrogenase. Biochem. J. 287: 361-365.
13. Miroliaei M., Nemat-Gorgani M. (2001) Sugars protect native and apo Yeast alcohol dehydrogenase ageinst irreversible thermoinactivation . Enz. Microb. Technol. 20: 554-559.
14. Miroliaei M., Nemat – Gorgani M. (2002) Effect of organic solvents on stability and activity of two related alcohol dehydrogenase . Int. J. Biochem. Cell Biol. 34: 169-175.
15. Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M., Takeda T. (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the flourescent dye, thioflavin T. Anal. Biochem. 177:244-249.
16. Rochet C., lansbury P.T. (2000) Amyloid fibrillogensis: themes and variations. J. Struc. Biol. 10:60-68.
17. Rosenberg A.S. (2006) Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. American Association of Pharmaceutical Scientists 8:501-507.
18. Saboury A.A., Miroliaei M., Nemat-Gorgani M., Moosavi- Movahedi A.A. (1999) Kinetics denaturation of yeast alcohol dehydrogenase and the effect of temperature and trehalose. An isothermal microcalorimetry study. Thermochimica Acta. 326:127-131.
19. Shimizu A., Yamada Y., Mizuta T., Haseba T., Sugai K. (2004)The contribution of the dynamic behavior of a water molecule to the amyloid formation of yeast alcohol dehydrogenase. J. Mol. Liqu. 109: 45-52.
20. Shimizu A., Fumino K., Yukiyasu K., Taniguchi Y. (2000) Effect of urea on the structural dynamics of water. J. Mol. Liqu. 85:269-278.
21. Yang Y, Zhou H.M. (2001) Effect of zinc ions on conformation stability of yeast alcohol dehydrogenase . Biochemistry 66:47-54.
22. Vetri V., Canale C ., Relini A. (2006)Amyloid fibrils formation and amorphous aggregation in concanavalin A. Biophys. Chem. 125:184-190.

www.SID.ir

Archive of SID

On the role of methanol in amyloid formation induction in apo-yeast alcoholdehydrogenase

Miroliaei M.*[1], Ebrahimian B.[2], Hosseinkhani S.[3], and Ghasemi A.[4]

[1] Cell, Developmental and Molecular Biology Division, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

[2] Department of Biology, Research and Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[3] Department of Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

[4] Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, P.O. Box 13145-1384, Tehran, Iran

Abstract

Amyloid formation in non disease proteins has little been studied. In the present study, to reveal the trend of amyloid formation in a typical protein, apo I- yeast alcohol dehydrogenase (apo I-YADH) which was obtained by removing of the structural zinc, was subjected to aqueous solution of methanol . Amyloid formation was evaluated by Congo red (CR) and thioflavin T staining method using fluorescence and CD spectroscopy. The amyloid-inducing aptitude of methanol showed a concentration dependent manner: 20%< 40% < 60%< 70% <80%. The established amyloid formation monitored by spectroscopic studies, was ascribed to the conformational transition from native to the ß-sheet rich structure in the enzyme molecules.

Keywords: Amyloid, Methanol, fluorescence spectroscopy, CD spectroscopy, thioflavin T, Congo red.

*Corresponding author.

www.SID.ir