

مطالعات ساختار آلفا - ۱ - آنتی تریپسین در حالت طبیعی و پلیمر

عباس لطفی^۱، معصومه نژادعلی^۲، سامان حسین خانی^۳، بیژن رنجبر^۳، افشین محسنی فر^۱ و بتول اعتمادی کیا^۱

^۱ تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی

^۲ گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی

^۳ تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم، گروه بیوشیمی

تاریخ پذیرش: ۸۵/۶/۲۷

تاریخ دریافت: ۸۴/۵/۲۹

چکیده

آلفا-۱- آنتی تریپسین (AAT) عضوی از خانواده بزرگ مهار کننده سرین پروتئازها است و شامل ۳۹۴ اسید آمینه می باشد که از ۳ صفحه بتا (A-C) و ۹ مارپیچ آلفا (A-I) و یک لوپ واکنش گر تشکیل شده است. موتاسیونهای نقطه‌ای و عوامل محیطی می تواند صفحه بتا A را ناپایدار نموده و ساختار پروتئین را تخریب کند. و در نتیجه با میان کنش پروتئین - پروتئین در نتیجه اتصال باقیمانده های یک مولکول سرپین به صفحه بتای مولکول دیگر موجب تشکیل پلیمر لوپ - شیت شود. این پلیمرها در شبکه اندوپلاسمی سلولهای کبدی تجمع می یابند و انکلوژیون بادیها را تشکیل می دهد که منجر به تعدادی از بیماریها مانند هپاتیت نوزادی، سیروز کبدی، کارسینومای کبدی، آمفیوزم و ترمبوز می شود. در این مطالعه ما فاکتورهایی را که موجب تغییر ساختار فضایی می شود (درجه حرارت، غلظت، زمان انکوباسیون) بر روی پلیمریزاسیون AAT با استفاده از روشهای طیف سنجی، کدورت سنجی و دو رنگ نمایی دورانی و فلورومتری بررسی نمودیم. نتایج حاصل از الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید نیز چندین مرحله از پلیمریزاسیون را در حضور فاکتورهای محیطی فوق تأیید می کند بر این اساس AAT در حالت طبیعی پس از مهاجرت به صورت یک باند منومر ظاهر می شود در حالی که در پلیمرهای لوپ - شیت بصورت چندین باند دیده می شود. بنابراین نتیجه می گیریم که عواملی از قبیل دما، غلظت، می تواند موجب تغییرات اساسی ساختاری در AAT شده که نهایتاً این تغییرات به پلیمریزاسیون آن می انجامد؛ بعلاوه پلیمریزاسیون با درجات مختلفی روی داده و منجر به کاهش فعالیت مهاری پروتئین می گردد.

واژه های کلیدی: مهارکننده سرین پروتئیناز (سرپین)، آلفا - ۱- آنتی تریپسین، لوپ واکنش گر، صفحه بتا، مارپیچ آلفا، پلیمریزاسیون

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۲۳۸۷۵۴۹۳، پست الکترونیکی: lotfi-ab@modares.ac.ir

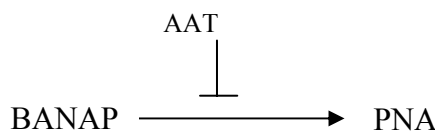
مقدمه

۱۴ ساخته می شود. در هپاتوئیستها و منوسیتها مهمترین نقش سرپین ها مهار پروتئاز می باشد که برای انجام این هدف لوپ واکنش گر (RCL) سرپین در جایگاه فعال پروتئاز لنگر می اندازد، سپس این لوپ واکنش گر توسط پروتئاز شکسته و با یک مکانیسم تله موشی، در حالیکه پروتئاز به آن متصل است، سرعت داخل صفحه بتای A

همه مهارکننده های سرین پروتئاز (سرپین ها) حدوداً (۸) ۴۰۰ اسید آمینه دارند که حاوی ۳ صفحه بتا و ۹-۷ مارپیچ آلفا و همچنین دارای یک لوپ واکنش گر هستند (۳). آلفا - ۱- آنتی تریپسین عضو اصلی خانواده مهارکننده سرین پروتئازها و یک گلیکوپروتئین پلی مورفیک kD52 است که عمدتاً توسط یک ژن منفرد در بازوی بزرگ کروموزوم

اسپکتروفتومتر، اندازه گیری خواندن جذب نوری در طول موج ۴۹۵ نانومتر انجام، منحنی استاندارد رسم، و غلظت پروتئین در نمونه مجهول اندازه گیری شد.

۲) تعیین فعالیت های مهارى AAT با استفاده از روش تعیین ظرفیت مهارى تریپسین (TIC): در این روش برای بررسی فعالیت AAT از روش آنزیماتیک استفاده گردید، تریپسین آنزیمی است که با تأثیر بر سوبسترای صناعی (N BAPNA - بنزوئیل - DL - آرژنین - پارانیتر و آنیلید) و هیدرولیز آن (P PNA - نیتروآنیلید) زردرنگ را آزاد می نماید:



هرچه میزان AAT در سرم یا نمونه مورد نظر بیشتر باشد رنگ ایجاد شده کمتر خواهد بود..

تریپس آمینومتان، کلرید کلسیم، سوبسترای کروموزنیک، دی متیل سولفوکسید، اسید استیک ۳۰ درصد، آلومین و تریپسین خریداری شده شرکت های Sigma و Merk استفاده قرار گرفت.

در لوله شاهد، کنترل و مجهول سوبسترای رقیق BAPNA ریخته و بعد از ۱۰ دقیقه برای ختم واکنش اسید استیک ۳۰ درصد اضافه و سپس جذب در ۴۰۰nm اندازه گیری شد.

۳) الکتروفورز SDS-PAGE: برای تعیین خلوص انواع پروتئینهای موجود در نمونه از این روش استفاده شد(۱).

۴) فلورومتري: با استفاده از بافر AAT یا بافر تریپس ۲۰μM نمونه هایی با غلظت ۱ و ۲ میکرومولار تهیه شد و طیف فلورسانس با تحریک در ۲۸۰nm و نشر در ۳۳۰nm بدست آمد.

می شود، که این عمل موجب تغییر بنای فضایی پروتئاز می گردد(۶، ۴، ۱۱) سپس کمپلکس سرپین - پروتئاز حاصل توسط چندین گیرنده از جمله رسپتورهای کمپلکس آنزیم- سرپین و رسپتورهای LDL و VLDL، بسرعت از جریان خون حذف می شود.

اطلاعات ساختاری AAT بسیار مهم است، چون زمینه ساز فهم دقیق مکانیسم اختلالات ناشی از عملکرد AAT و اعضای دیگر خانواده سرپین هاست (۷) از شایع ترین ساختارهای غیرفعال این مهارکننده ها فرم پلیمر می باشد، که این فرم در برخی از بیماریها مرتبط با انواع مختلف ژنتیکی سرپینها دیده می شود، این بیماریها شامل آمفیژم، سیروزکبدی، ترمبوز است (۵ و ۱۱). پلیمیزاسیون AAT نتیجه اتصال لوپ واکنش گر یک مولکول به صفحه بتای A یا C مولکول دیگر می باشد. دو فرایند مولکولی را در پلیمیزاسیون شاهد هستیم، اول، تشکیل پروتودیمر که با تغییر برگشت پذیر می تواند جدا شود و سپس یک تغییر بنای فضایی برگشت ناپذیر اتفاق می افتد که منجر به پایداری دیمر و طویل شدن مداوم پلیمر می شود (۶). این مسئله که چه شرایط و یا جهش هایی از اتصال مرکز واکنش گر به صفحه بتای A ممانعت می کند، از جمله سوالاتی می باشد که پاسخ به آن نیازمند شناخت کامل تغییرات ساختاری و فعالیت سرپین پروتئاز است.

لازم بذکر است که یافتن این پاسخها در ارائه راهکارهای درمانی مناسب برای بیماریهای ناشی از پلیمیزاسیون نیز مفید می باشد(۲).

مواد و روشها

الف) تعیین ویژگیهای AAT: برای تعیین ویژگیهای AAT از AAT تخلیص شده از پلاسماى انسانی استفاده شد.

۱) تعیین پروتئین تام به روش برادفورد: با استفاده از رنگ کوماسی بلو G25، اتانل با خلوص ۹۵ درصد، اسید فسفریک غلیظ ۸۵ درصد، آلومین سرم گاو و

از این طریق معلوم می شود با پلیمریزه شدن AAT تغییر در ظرفیت مهارت AAT نسبت به حالت طبیعی ایجاد می شود.

۳- تعیین غلظت AAT با روش SRID(Single Radial Immunodiffusion): در این روش براساس میزان AAT موجود در حفرات پلیت آگار هاله های تشکیل شده اطراف چاهکها متفاوت خواهد شد (۱۲ و ۱۴).

۴- انکوباسیون پروتئین در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد و قرائت جذب در طول موج nm400 (کدورت سنجی). در این مرحله $10 \mu\text{M}$ از آلفا آنتی تریپسین را در ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده و در زمانهای ۵ و ۳۰ و ۶۰ دقیقه بعد از انکوباسیون جذب قرائت و سپس نمودار جذب علیه زمان رسم شد.

۵- فلورومتری از AAT بعد از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد: در این روش دو غلظت از AAT تهیه گردید ($1 \mu\text{M}$ و $2 \mu\text{M}$) و میزان فلورسانس را تعیین و سپس از همین نمونه ها بعد از ۶۰ دقیقه انکوباسیون مجدداً طیف فلورومتری گرفته شد.

۶- اندازه گیری طیف دو رنگ نمایی دورانی ناحیه دور (Far-UV-CD)

- نمودار CD برای AAT در دو حالت طبیعی و پلیمر با غلظت $1 \mu\text{M}$ رسم شد.

- Far-UV-CD برای AAT با غلظت $10 \mu\text{M}$ در حالت طبیعی و در مراحل انکوباسیون ۵ و ۳۰ و ۶۰ دقیقه اندازه گیری گردید و مطالعه تغییر ساختار دوم حالت طبیعی و پلیمر صورت پذیرفت.

نمودار تغییرات ساختار دوم علیه زمان با غلظت $10 \mu\text{M}$ رسم گردید.

۵) دو رنگ نمایی دورانی (CD): نمونه هایی با غلظت ۱ و ۲ و ۱۰ میکرومولار تهیه گردید و طیفهای دو رنگ نمایی دورانی آنها بدست آمد. نمونه با غلظت $10 \mu\text{M}$ را در انکوباتور و دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده و پس از مدت ۵ و ۳۰ و ۶۰ دقیقه طیف CD گرفته شد.

۶) تعیین میزان AAT با روش SRID: از پلیتهای آماده آگار استفاده شد که در سطح آن آنتی AAT بطور یکنواخت پخش است و چاهکهایی که نمونه های مورد نظر را در آن ریخته و براساس واکنش آنتی ژن و آنتی بادی و قطر هاله تشکیل شده، میزان AAT را می توان تعیین کرد. منحنی استاندارد با توجه به قطر هاله های کالیبراتور با غلظت معین، رسم می شود.

ب- ایجاد پلیمریزاسیون در AAT تحت شرایط متفاوت و تعیین خصوصیات ساختاری AAT پلیمریزه: پلیمریزاسیون از طرق مختلف مانند تغییر pH و یا تغییر دما امکان پذیر می باشد. در اینجا از تغییر دما برای پلیمریزه کردن AAT استفاده شد که براساس دمای مورد استفاده زمان انکوباسیون برای پلیمریزه کردن متفاوت است مثلاً در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد مدت زمان لازم ۱۵ دقیقه می باشد تا کل AAT پلیمریزه شود و یا در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد حداکثر ۶۰ دقیقه طول می کشد تا کل AAT پلیمریزه گردد که در این تحقیق از دمای ۶۵ درجه سانتی گراد استفاده شد مراحل آزمایش و تعیین خصوصیات ساختاری AAT پلیمریزه و مقایسه آن با حالت طبیعی به ترتیب زیر انجام شد:

۱- از تکنیک SDS PAGE 5/7 درصد جهت مقایسه باندهای حاصل از AAT در حالت طبیعی و پلیمر استفاده شد.

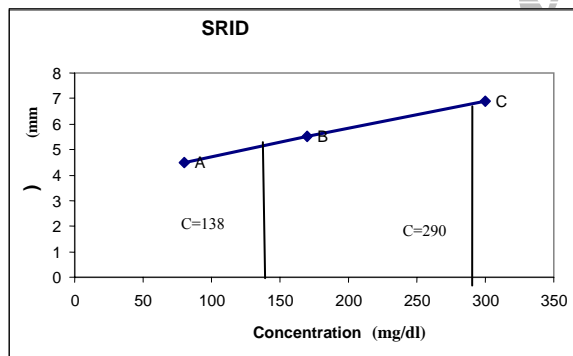
۲- تعیین فعالیت مهارت AAT پلیمریزه با استفاده از روش تعیین ظرفیت مهارت (AAT Trypsin Inhibitory) (TIC) Capacity انجام شد.

نتایج و بحث

مهاری تریپسین را ندارد و رنگ زرد پر رنگی در اثر تجزیه BAPNA توسط تریپسین حاصل می شود

Devlin و همکارانش در سال ۲۰۰۲ فعالیت مهاری AAT را ضمن پلیمریزاسیون مورد بررسی قرار دادند این گروه از pH=4 برای ایجاد شکل پلیمر استفاده کردند و نتایج آزمایشات آنها نشانگر از بین رفتن قدرت مهاری با زمان انکوباسیون بود. کاهش فعالیت مهاری ضمن پلیمریزاسیون در آزمایشات ما نیز مشاهده شد.

همچنین با استفاده از روش SRID که مکانیسم آن براساس واکنش آنتی ژن و آنتی بادی است میزان ایمونو راکتیویته AAT با توجه به قطر هاله ایجاد شده قابل محاسبه می باشد، در حالت پلیمر به دلیل درگیر شدن گروههای واکنش گر ایمونوراکتیویته کاهش می یابد بعبارتی در حالت طبیعی قطر هاله بزرگتر و با شروع پلیمریزاسیون قطر هاله یا AAT فعال کاهش می یابد (میزان کل AAT در همه حالات یکسان است) (۱۲ و ۱۴).

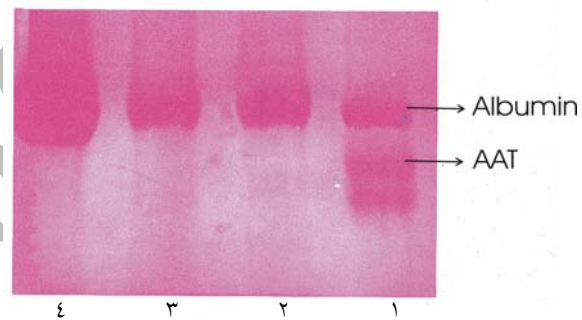


شکل ۲- منحنی کالیبراسیون اندازه گیری غلظت AAT به روش SRID. A, B و C کالیبراتورهای با غلظت نامشخص می باشد منحنی فوق ارتباط قطر هاله با غلظت را نشان می دهد. با استفاده از این منحنی و قطر هاله طبیعی AAT = ۶/۸ و پلیمر = ۵/۲ غلظت آنها بترتیب $C_N = 290$ و $C_P = 138$ می باشد.

یکی از بهترین روشها برای تأیید پلیمریزاسیون روش PAGE می باشد. همانطور که در شکل ۳ دیده می شود با انکوباسیون AAT در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد با گذشت

برای بررسی تأثیر عوامل مختلف محیطی در تبدیل شکل طبیعی (منومر) AAT به اشکال با وزن مولکولی بالا و یا پلیمر اثر چند فاکتور محیطی از جمله تغییر درجه حرارت، تغییر غلظت و زمان انکوباسیون بررسی شد.

برای بررسی خلوص AAT تجاری از روش SDS-PAGE استفاده شد و چنانکه در شکل ۱ دیده می شود AAT تجاری صد در صد خالص نیست و ناخالصی عمده آلبومین نیز در آن وجود دارد که با توجه به گزارشهای موجود تأثیری در میزان و یا عمل پلیمریزاسیون AAT ندارد.



شکل ۱- SDS-PAGE از آلفا-۱- آنتی تریپسین تجاری

۱- AAT تجاری ۳۰ µg ۲- آلبومین انسانی ۲۰ µg
۳- آلبومین انسانی ۲۰ µg ۴- آلبومین گاوی ۳۰ µg

جهت تأیید فعالیت AAT از روش تعیین فعالیت مهاری (TIC) استفاده گردید. فعالیت مهاری AAT قبل و بعد از پلیمریزاسیون مورد بررسی قرار گرفت و چون در اثر پلیمریزاسیون لوپ واکنش گر از یک مولکول با صفحه بتای مولکول دیگر درگیر می شود و بعبارت دیگر تغییر ساختمانی بوجود می آید. لذا شدت رنگ در حالت پلیمر بیشتر از حالت طبیعی می شود که نشان دهنده کاهش یا عدم فعالیت AAT است

بعبارتی با کامل شدن پلیمریزاسیون AAT تقریباً قسمت عمده فعالیت خود را از دست می دهد و در نتیجه قدرت

با افزایش زمان ملاحظه می شود که بیانگر افزایش پلیمریزاسیون است. Devlin و همکارانش در سال ۲۰۰۲ افزایش کدورت را در AAT انکوبه شده در ۴ pH نشان دادند که در آزمایشات ما نیز این افزایش کدورت با افزایش زمان انکوباسیون مشاهده می شود.

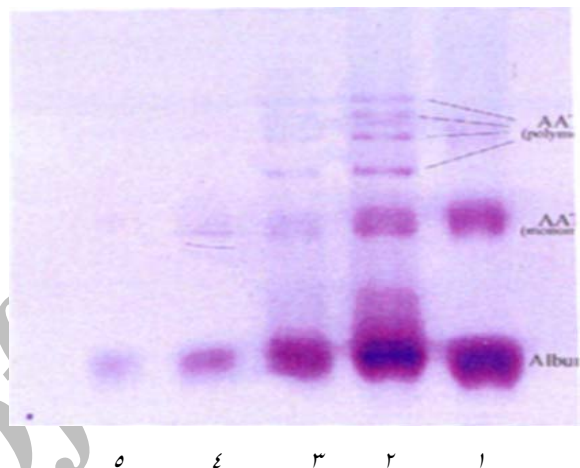
روش فلورومتری نیز بعنوان یکی از روشهای دقیق و حساس جهت مطالعه تغییر ساختار حالت پلیمر نسبت به حالت طبیعی بکار گرفته شده است. پلیمریزاسیون یک فرایند دو مرحله ای است که ابتدا تغییر بنای فضایی با شکاف در صفحه بتا ایجاد می شود که این شکاف کمک می کند که نواحی هیدروفوبیک هسته AAT در سطح قرار گیرد بعبارتی اسیدهای آمینه آروماتیک در سطح قرار می گیرد و فلورسانس افزایش می یابد در نتیجه در نمونه های موجود با غلظتهای یکسان فرم پلیمر فلورسانس بیشتری از فرم طبیعی خواهد داشت (۱، ۵، ۸، ۱۰، ۱۱ و ۱۳).

بعبارتی تغییرات قابل توجهی در طیف فلورسانس فرم طبیعی و پلیمر وجود دارد که نتیجه تغییر کنفورماسیون و قرار گرفتن اسیدهای آمینه حلقوی در سطح می باشد

همانطور که در شکل ۴ و ۵ الف و ب دیده می شود برای مطالعه تغییر ساختاری AAT پلیمر نسبت به حالت طبیعی دو نمونه از AAT با غلظت ۱ و ۲ میکرومولار تهیه و از آن طیف فلورومتری گرفته سپس همین نمونه ها بدون تغییر غلظت با انکوباسیون در C65 به حالت پلیمر درآمد و دوباره از آن طیف گرفته شده و چنانکه در اشکال فوق دیده می شود در حالت ۵ و ۴-ب یا حالت پلیمر نسبت به حالت ۵ و ۴-الف یا طبیعی، فلورسانس افزایش یافته است.

James و همکارانش در سال ۱۹۹۸ افزایش فلورسانس AAT انکوبه شده در دمای ۶۵ درجه را نشان دادند همچنین افزایش فلورسانس با افزایش غلظت نیز در آزمایشات آنها مشاهده می شود.

زمان باندهای جدید دایمر، تریمر، تترامر و الیگومر ایجاد شده در حالیکه در فرم طبیعی AAT، فقط یک باند دیده می شود که باندهای جدید، حاصل الحاق لوپ و اکنشگر یک مولکول به صفحه بتا مولکول دیگر می باشد. مطالعات Devlin در سال ۲۰۰۲ پلیمریزاسیون AAT را با تغییر pH از ۴ تا ۸ ایجاد نمود که تغییرات ساختاری با ایجاد باندهای دایمر تریمر تترامر و... در PAGE حاصل دیده میشود

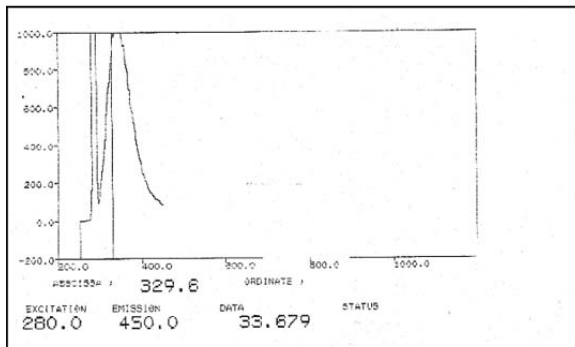


شکل ۳ - PAGE آلفا-۱-آنتی تریپسین در حالت طبیعی و پلیمر ۱- AAT در حالت طبیعی ۳- AAT در حالت پلیمر ۱۵ میکروگرم ۲- AAT در حالت پلیمر ۳۰ میکروگرم ۴- AAT پلیمر ۶ میکروگرم ۵- آلبومین

همچنین James و همکارانش در سال ۱۹۹۸ از دمای ۶۵ درجه برای القا پلیمریزاسیون AAT استفاده کردند و ایجاد اشکال پلیمر را ۲ دقیقه بعد انکوباسیون گزارش کردند. در آزمایشات ما نیز در حالت پلیمر انواع باند ها به وضوح دیده میشود (۶ و ۴).

روش دیگری که برای تأیید القا پلیمریزاسیون استفاده شده کدورت سنجی است.

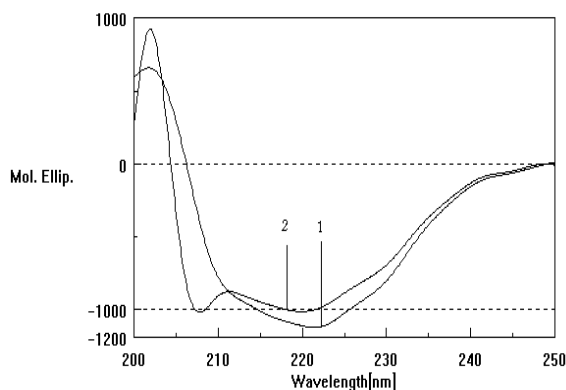
افزایش کدورت با افزایش زمان حضور شرایط دناتوره کننده، در تحقیقات Devlin مشخص شده است. در مطالعات ما نیز با انکوباسیون ۱۰ میکرومول آلفا-۱-آنتی تریپسین در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد، افزایش کدورت



شکل ۵- ب - طیف فلورسانس

پلیمر با غلظت ۲ میکرومولار

Far-UV-CD مشابه با حالت فلورسانس است. چنانکه در شکل ۶ دیده می شود طیف CD در ناحیه دور از AAT طبیعی و پلیمر با غلظت $1 \mu\text{M}$ بدست آمد که با کاهش در میزان ۲۲۲ نانومتر همراه است. این نتیجه، یعنی کاهش در میزان ساختار دوم در آزمایشات Devlin نیز دیده می شود که دلیل این کاهش در ۲۲۲ nm در فرم پلیمر ناشی از تغییر ساختار است.



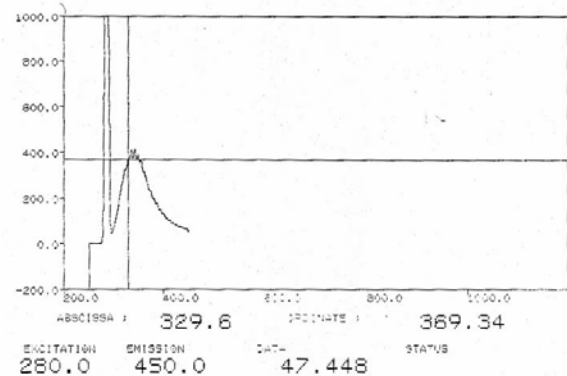
Far-UV CD از AAT شکل ۶- با غلظت ۱ میکرومولار

۱- طیف CD از نمونه AAT طبیعی

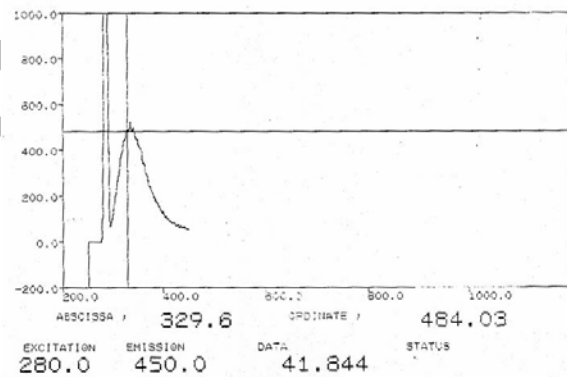
۲- طیف CD از نمونه AAT پلیمر

طیف Far-UV-CD حاصل انکوباسیون $10 \mu\text{M}$ آلفا-۱-آنتی تریپسین در زمان های ۵ و ۳۰ و ۶۰ دقیقه در شکل ۷ نشان داده شده و کاهش سطح زیر منحنی هنگام پلیمریزاسیون نسبت به حالت طبیعی دیده می شود.

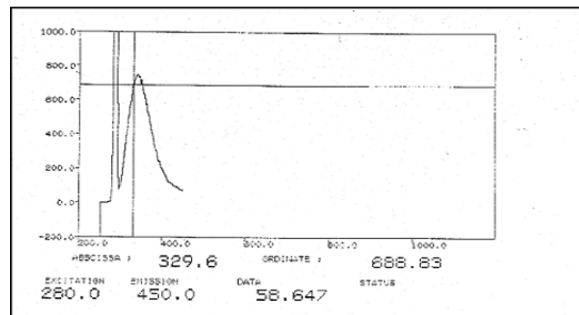
آزمایشات Devlin نیز یک افزایش دو برابر در شدت فلورسانس در ۳۳۰ نانومتر در حالت پلیمر نشان می دهد. در آزمایشات ما نیز تغییر در شدت فلورسانس حالت پلیمر نسبت به طبیعی دیده میشود که حاصل تغییرات ساختاری است.



شکل ۴- الف - طیف فلورسانس AAT طبیعی با غلظت ۱ میکرومولار

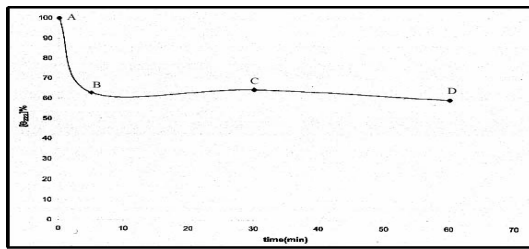


پلیمر با غلظت ۱ میکرومولار AAT شکل ۴- ب - طیف فلورسانس



طبیعی با غلظت ۲ میکرومولار AAT شکل ۵- الف - طیف فلورسانس

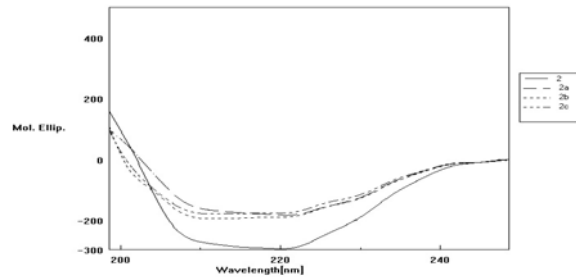
پلیمر AAT را ایجاد نمودند و کاهش ساختار دوم پلیمر نسبت به طبیعی از نتایج مطالعات این گروه است (۳و ۴).



شکل ۸- نمودار تغییر ساختار دوم علیه زمان A: حالت طبیعی B: AAT بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در ۶۵ درجه C: بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون D: بعد از ۶۰ دقیقه انکوباسیون

البته در آزمایشات ما نیز این کاهش ساختار به خوبی در منحنی ها مشاهده میشود.

بنابراین می توان چنین نتیجه گیری کرد که تغییرات درجه حرارت و تغییرات غلظت از عواملی هستند که می توانند منجر به پلیمریزه شدن و تغییرات ساختاری در AAT گردد شناخت دقیق و چگونگی این تغییرات می تواند برای استفاده در *in vivo* کاربرد داشته باشد (۸ و ۱۳).



شکل ۷- طیف CD حاصل از AAT با غلظت ۱۰ میکرومولار در دمای ۶۵ درجه و در زمانهای متفاوت. ۲: طیف CD در حالت طبیعی
a: ۲: طیف CD از AAT بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در ۶۵ درجه
b: ۲: طیف CD حاصل از AAT بعد از ۳۰ دقیقه. c: ۲: طیف CD بعد از ۶۰ دقیقه

این کاهش ساختار دوم حدود ۲۰ درصد در آزمایشات Devlin بدست آمد اما بدلیل ناخالصی آلبومین در آزمایش ما مقدار کاهش متفاوت است. شکل ۸ کاهش ساختار دوم در مقابل زمان در حضور عامل پلیمریزه کننده (تغییرات دما) را نشان می دهد.

Dafforn و همکارانش در سال ۱۹۹۸ با ۱۲ ساعت انکوباسیون AAT در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد شکل

منابع

- 1- Bottomley S.P., Paul C.R. 1998. α_1 - Antitrypsin polymerization can occur. *Biochemical and Biophysical research communications*, 251: 1-5.
- 2- Dafforn T.R., Mahadeva R. Elliott P.R. 1999. A Kinetic Mechanism for the polymerization. *Biochemistry and molecular Biology*, 274: 9548-9555
- 3- Dafforn T.R., Pike R.N. 2004. Physical characterization serpin conformation methods., 32: 150-158
- 4- Devlin G.L, chow K.M. 2002. Acid Denaturation of α_1 -Antitrypsin. *I.M.Biol.*, 324: 859-870
- 5- Green C., Brown G. 2003. *Drosophila* necrotic mutation. *Development.*, 130: 1473-1478
- 6- James E.L., Bottomley S.P. 1998. The mechanism of α_1 - Antitrypsin polymerization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 356: 296-300
- 7- Jezierski G., Pasenkiewicz- Gierula.M. 2001. The effect of the Glu 342 Lys mutation. *Acta Biochemica Polonica.*, 48: 65. 75.
- 8- Koloczek H. 1996. Fluorescence- Detected polymerization kinetics. *Journal of protein chemistry.*, 15: 447-454
- 9- Lee C. Joo seo E. 2001. Role of the connectivity. *Biochemical and Biophysical Research Communication.*, 281: 636-41.
- 10- Parfrey H., Mahadeva R. 2003. α_1 - Antitrypsins deficiency, liver. *The International Journal of Biochemistry & cell Biology*, 35: 1009-1014
- 11- Peltier M.R., Grant T.R., 2000. Type-1-inhibitor of Distinct physical and structural properties. *Biocheminca et Biophysica Acta.*, 1470: 37-51.

- 12- Rose N.R. et al ,1986 , Manual of Clinical of Laboratory Immunology.3rd ed.ASM publication.
- 13- Tew D.J., Bottomley S.P. 2001. Intrinsic fluorescence changes and rapid., FBES Letter 494,30-33
- 14- Tietz N.W. 1994,Textbook of Clinical Chemistry . USA,Second Edition W.B.Saunders CO. pp 296-300.

Structural Studies of Alpha-1-Antitrypsin in Native and Polyper State

Lotfi A.¹, Nejad Ali M.², Hosseinkhani S.³, Ranjbar B.³, Etemadikia B.¹

¹ Biochemistry Dept., Faculty of Medicine, Tarbiat Modarres University, Tehran, I.R. of Iran

² Eslamic Azad University , Garmsar Branch , I.R. of Iran

³ Biochemistry Dept., Faculty of Science, Tarbiat Modarres University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Alpha- 1-Antitrypsin (AAT) is a member of a superfamily of serine proteinase inhibitors, and consists of 394 amino acids ,which form three β -sheets (A-C), nine α -helices (A-I) and a reactive center loop. Point mutation and environmental factors can destabilize β -Sheet A and distort the structure of the protein to allow a unique protein-protein interaction residues of one serpin molecule to be inserted into the β -sheet A of another, that loop-sheet polymerization will be formed. These polymers accumulate within the endoplasmic reticulum of the hepatocyte fromed inclusion bodies which causes a range of diseases such as : neonatal hepatis, Juvenil cirrhosis and adult hepatocellular carcinoma, emphysema, and thrombosis. In this work it has been studied the conformational factors (Temperature, concentration and incubation time) on AAT polymerization. Using spectrofluremetry ,turbidometry, circular dichroism ,and flourometric methods. The results of nondenaturing polyacrylamid gel electrophoresis confirmed several steps in polymerization , in presence of above mentioned environmental factors. Accordingly native of AAT migrated as a monomeric band where formed multimeric species of loop-sheet polymer seen. In conclusion it has been established that incubation temprature , concentration can cause essential variation in the structure of AAT ,and leads to its di,tri,oligo and polymerization.In addition ,the polymerization occures with different rate and this structural changs accounts the activity of AAT.

Keywords: serine proteinase inhibitorse (serpin) , Alpha -1-Antitrypsin, reactive center loop , β -sheets , α - helices, polymerization.