View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 14:37 +0430 on Saturday September 16th 2017

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۷، شماره ۱/ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴/ ۹۶-۸۷

مقاله پژوهشی

بررسی اثر مهاری ریزمولکول دی‌اتیل‌تیاتری‌کربوسیانین‌یدید بر تجمعات پروتئین نوترکیب تاو (TAU) به عنوان کاندیدای داروی ضد آلزایمر

زهرا خسروی[۱]، محمدعلی نصیری‌خلیلی[۲*]، رضا حسن‌ساجدی[۳]، مهدی زین‌الدینی[۲]، غلامرضا اولاد[۴]

[۱]دانشجو، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران؛ [۲]گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران [۳]گروه بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛ [۴]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: **آلزایمر یکی از بیماری‌های تحلیل سیستم عصبی است که عوامل مختلفی در بروز آن نقش دارند. تشکیل تجمعات پروتئین تاو (TAU) یکی از شایع‌ترین مشاهدات این بیماری در مغز افراد مبتلا است. رویکردهای مختلفی برای هدف‌گیری تجمعات پروتئینی تاو در نورون‌های بیماران آلزایمری پیشنهاد شده است که از میان آن‌ها چاپرون‌ها اخیرا مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. هدف این مطالعه، بررسی اثر یک چاپرون ریزمولکول به نام دی‌اتیل‌تیاتری‌کربوسیانین‌یدید بر تجمعات پروتئین تاو می‌باشد.**

روش بررسی: **در این مطالعه بنیادی آزمایشگاهی، پروتئین تاو در باکتری‌ها بیان شد، سپس به روش کروماتوگرافی تعویض یونی و کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شد و خلوص آن با SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. هپارین به عنوان القاگر تجمع اضافه شد و القای تجمع آن، با روش دورنگ‌نمایی‌دورانی (CD) بررسی شد. سپس به تجمعات حاصل، چاپرون دی‌اتیل‌تیاتری‌کربوسیانین‌یدید اضافه شد و تأثیر آن بر این تجمعات با استفاده از SDS-PAGE و نیز روش سنجش فلئورسانس تیوفلاوین T ارزیابی گردید.**

یافته‌ها: **الکتروفورز SDS-PAGE، بیان پروتئین تاو و خلوص آن را تأیید نمود. روش CD، القای تشکیل تجمعات توسط هپارین را نشان داد. همچنین به دنبال تیمار تجمعات حاصل با دی‌اتیل‌تیاتری‌کربوسیانین‌یدید، نتایج SDS-PAGE نشان دادند که تجمعات القاشده، به میزان چشمگیری در مقایسه با نمونه کنترل کاهش می‌یابند. سنجش فلئورسانس تیوفلاوین T نیز برای تأیید نتایج حاصل از SDS-PAGE استفاده شد.**

نتیجه گیری: **نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهند که چاپرون دی‌اتیل‌تیاتری‌کربوسیانین‌یدید قادر است تجمعات پروتئینی تاو را که در حضور القاگر هپارین تولید شده‌اند، مهار نماید. این یافته، می‌تواند ریزمولکول چاپرون دی‌اتیل‌تیاتری‌کربوسیانین‌یدید را به عنوان یک داروی بالقوه در هدف‌گیری تجمعات تاو در بیماران آلزایمری مطرح کند.**

واژه های کلیدی: **بیماری آلزایمر، پروتئین تاو، چاپرون، دی‌اتیل‌تیاتری‌کربوسیانین‌یدید.**

مقدمه:

تاکنون بیش از ۳۰ نوع بیماری در انسان شناسایی شده است که با تشکیل تجمعات پروتئینی موسوم به تجمعات شبه‌آمیلوئیدی همراه هستند. برای مثال بیماری پارکینسون به واسطه تجمع پروتئین آلفا سینوکلئین، اختلال آمیلوئیدوزیس لیزوزوم به واسطه تجمعات آنزیم لیزوزیم جهش‌یافته، آمیوتروفی لترال اسکلروزیس (ALS) به واسطه تجمعات آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و بیماری آلزایمر به واسطه تجمع بتا آمیلوئید و پروتئین تاو شناخته می‌شوند (۱، ۲).

آلزایمر یک اختلال ذهنی مرتبط با سن است که با از دست دادن حافظه کوتاه‌مدت، تغییرات شخصیتی، افسردگی، درک نادرست کلمات و مشکل

نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه صنعتی مالک اشتر- گروه بیوشیمی و بیوفیزیک- تلفن:۰۲۱-۲۲۹۷۰۰۸۵، E-mail:nasiri@mut.ac.ir

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 14:37 +0430 on Saturday September 16th 2017

در تمرکز همراه است که نهایتاً به مرگ منجر می شود. شیوع این بیماری در جمعیت بالای ۶۵ سال، در حدود ۳/۶ تا ۱۰/۳ درصد است (۳). دو ساختار پاتولوژیکی مهم که در مغز بیماران آلزایمری تجمع می‌یابند، عبارتند از آمیلوئیدهای بتای خارج‌سلولی و کلاف‌های نوروفیبریلی داخل‌سلولی که به ترتیب بیشتر در نواحی مغزی مربوط به یادگیری و حافظه دیده می شوند. در بیماری آلزایمر همچنین از دست‌دادن سیناپس و عملکرد آن، تخریب ساختار میتوکندری و از بین رفتن نورون‌ها دیده می‌شود. وجود کلاف‌های نوروفیبریلی یکی از شایع‌ترین مشاهداتی است که در مغز بیماران آلزایمری گزارش می‌شود (۴). این کلاف‌ها متشکل از پروتئین‌هایی به نام تاو هستند که تجمعات آنها به وفور در مغز افراد مبتلا دیده می‌شود. از آنجا که این تجمعات نامحلول تاو، یکی از شایع‌ترین عوامل آسیب‌شناختی در بیماران آلزایمری هستند، هدف‌گیری آن ها از اهمیت خاصی برخوردار است. مهارکننده‌های تجمع پروتئین تاو، ویژگی‌های نفوذپذیری، سمیت و قدرت مهارکنندگی مختلفی دارند و همگی دارای حلقه آروماتیک، ناحیه هیدروفوب و اتم‌هایی برای تشکیل پیوند هیدروژنی هستند. به نظر می‌رسد که توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی و برهم‌کنش‌های هیدروفوبی مهم‌ترین ویژگی همه این مهارکننده‌ها برای جلوگیری از تجمع پروتئین تاو می‌باشد. این ترکیبات احتمالاً برای بازکردن تجمعات حلقه آروماتیک، به داخل زنجیره‌های پپتیدی وارد می‌شوند (۵).

از آنجا که تجمعات غیرطبیعی پروتئین‌های تاو در سلول‌های عصبی را حداقل تا اندازه‌ای می توان به تاخوردگی اشتباه یا ناقص این پروتئین نسبت داد، عواملی که بتوانند مانع از تاخوردگی نامناسب و یا باعث هدایت تاخوردگی صحیح این پروتئین‌ها شوند، ممکن است حتی در اختلالات عصبی نظیر آلزایمر، کاربرد درمانی پیدا کنند. فاکتورهای سلولی اختصاصی در سلول حضور دارند که قادر هستند تجمعات پروتئینی ناجور تاخورده را حذف کرده و یا به صورت اشکال پروتئینی فعال غیرسمی یا هضم‌شده تبدیل کنند. شبکه سلولی چاپرون‌های مولکولی و پروتئازها با کمک یکدیگر، پروتئین‌های فعال را از آسیب‌های استرس محافظت نموده و از تشکیل تجمعات ناجور تاخورده ممانعت به عمل می‌آورند. همچنین می‌توانند اشکال ناجور تاخورده را حل کرده و نهایتاً به صورت تاخورده در آورند و یا تجمعات پروتئینی را هضم کرده و به اشکال پروتئینی غیرسمی تبدیل کنند. مهمترین چاپرون‌های مولکولی که در بیماری‌های تحلیل سیستم عصبی در مهار تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی، بازتاخوردگی اشکال تجمع یافته سمی و هضم و برداشت این اشکال نقش دارند، چاپرون‌های Hsp70 و Hsp40 و سیستم پروتئوزوم یوبی‌کوئیتین می‌باشند. همچنین همکاری ماشین‌های چاپرونی و سیستم پروتئوزوم یوبی‌کوئیتین در فراهم ساختن عملکرد بهتر فرآیند تاخوردگی اهمیت زیادی دارد (۶). علاوه بر این، ریزمولکول‌های شیمیایی شناخته شده‌اند که قادر هستند یک نقش شبه چاپرونی را در طی فرآیند تاخوردگی پروتئین‌ها ایفا نمایند. این ترکیبات سبک وزن شیمیایی که چاپرون‌های شیمیایی نیز گفته می‌شوند، اخیراً به‌عنوان ابزارهایی برای دستکاری آسان تجمعات پروتئینی در شرایط آزمایشگاه و موجودات مدل مورد توجه قرار گرفته‌اند؛ بنابراین در این مطالعه تأثیر یک چاپرون ریزمولکول بر مهار شکل‌گیری تجمعات پروتئین تاو مورد ارزیابی قرار گرفته است. چاپرون شیمیایی ریزمولکول مورد استفاده در این مطالعه دی‌اتیل‌تیاتری‌کربوسیانین‌یدید (N744) نام دارد. چاپرون N744 عضو خانواده رنگ‌های سیانینی است که قبلاً به دنبال یک غربالگری وسیع مولکولی با استفاده از تعداد زیادی ریزمولکول شناسایی شد که هدف از آن، یافتن ریزمولکول‌هایی بود که بتوانند تجمعات پروتئین تاو را مهار نمایند؛ N744 به عنوان یکی از اعضای این خانواده، کاندید مناسبی به شمار می‌رود و بیش از سایر اعضاء مورد مطالعه قرار گرفته است (۹-۷). ریزمولکول N744 به این دلیل که قادر

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 14:37 +0430 on Saturday September 16th 2017

است از غشاهای سلولی عبور کند، پتانسیل برهم‌کنش با بخش‌های آبگریز تجمعات پروتئینی را دارد. از همین قابلیت در مهار تجمعات پروتئین های دیگر نظیر تجمعات آلفا سینوکلئین در بیماری پارکینسون بهره برداری شده است (۱۰). ریزمولکول های چاپرونی دیگر نظیر R55 که دارای چنین ویژگی‌هایی بوده‌اند، توانسته‌اند در مهار تشکیل تجمعات پروتئین آمیلوئید (در بیماری آلزایمر) موثر واقع شوند (۱۱). علاوه بر این، مشخص شده است که رنگ کنگو رد (یک ریزمولکول) نیز که دارای ساختار آبگریز است، می‌تواند از تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی انسولین ممانعت به عمل آورد (۱۲)؛ بنابراین مطالعه بر روی چاپرون شیمیایی N744 (با قابلیت چاپرونی، ساختار آبگریز و توانایی عبور از غشاء) از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف این مطالعه، بررسی اثر یک چاپرون شیمیایی N744 بر تجمعات پروتئین تاو می‌باشد. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند ما را در دستیابی به روشی مناسب و کارا جهت مهار تشکیل و یا حذف تجمعات نامحلول پروتئین تاو در بیماری‌های تحلیل عصبی نظیر آلزایمر و حتی پارکینسون نزدیک نماید.

روش بررسی:

در این مطالعه بنیادی آزمایشگاهی، طراحی اولیه ژن رمزکننده پروتئین تاو بر مبنای ترادف گزارش شده در جستجوگر (National Center for Biotechnology Information= NCBI) با شماره P۱۰۶۳۶ انجام شد. سفارش سنتز ترادف DNA تاو بر اساس طراحی های صورت گرفته طبق کدون کاربری *E.coli* به شرکت Urofine MWG Operon آلمان ارائه شد. پس از سنتز، DNA در جایگاه برش آنزیم های محدودگر NdeI و XhoI در وکتور pET-21a(+) کلون گردید. پس از تحویل پلاسمید حاوی ترادف سنتز شده تاو، پلاسمید درون باکتری *E.coli* BL21(DE3) ترانسفورم شد. بیان پروتئین تاو با استفاده از رشد باکتری حامل پلاسمید (در بر گیرنده ژن TAU) در محیط کشت LB و سپس اضافه‌نمودن ماده القاء کننده ایزو پروپیل تیو بتا دی گالاکتوپیرانوزید (IPTG) در میزان جذب حدود ۰/۶ و در طول موج ۶۰۰ نانومتر به‌مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. جهت بررسی بیان پروتئین مذکور، رسوب حاصل از باکتری در بافر لیزکننده‌ی سلولی به خوبی سوسپانسیون گردید. سپس با استفاده از سونیکاتور طی ۱۰ سیکل ۴۰ ثانیه‌ای تحت شرایط چهار درجه سانتی گراد شکسته و مجدداً سانتریفیوژ گردید. محلول رویی جدا شده واجد پروتئین هدف، با استفاده از ژل الکتروفورز SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد، پروتئین تاو نوترکیب با استفاده از روش های کروماتوگرافی تخلیص شد.

به منظور خالص‌سازی با استفاده از ستون‌های SP-سفاروز و نیکل سفاروز، پس از شستشوی ستون SP-سفاروز با بافر تعادل، فاز محلول جداشده از سلول های بیانی حاوی پروتئین تاو، از این ستون عبور داده شد. جداسازی خروجی های ستون حاوی پروتئین تاو با استفاده از افزایش شیب خطی نمک NaCl (۱M– ۰/۰۵) ایجاد شده بین بافر شستشو و بافر جدا کننده انجام شد. سپس خروجی های تخلیص‌شده اولیه در یک ظرف جمع‌آوری گردید. به منظور دستیابی به خلوص بیشتر، محلول پروتئینی حاصل، از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل- سفاروز نیز عبور داده شد. پس از به تعادل رساندن این ستون، جداسازی پروتئین با افزایش شیب غلظت ایمیدازول (۶۰۰–۲۰ میلی مولار)، با استفاده از بافر شستشو و بافر جداکننده (حاوی ۶۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول) انجام شد. سپس بیان و خلوص پروتئین تاو با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید ۱۰ درصد و رنگ آمیزی با کوماسی‌بلو مورد بررسی قرار گرفت.

پلیمریزاسیون پروتئین تاو نوترکیب خالص‌شده، در حضور مولکول‌های القاگر نظیر هپارین، هپاران سولفات، اسیدهای چرب غیر اشباع، RNA ها و غیره در شرایط In Vitro، تسهیل و انجام پذیر است (۱۴،۱۳). از میان ترکیبات القاگر مختلف، مطالعات متعددی از هپارین برای القاء و تسریع تشکیل تجمعات پروتئین تاو استفاده کرده‌اند (۱۳،۹). در این مطالعه نیز جهت تجمع این پروتئین‌ها، از

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 14:37 +0430 on Saturday September 16th 2017

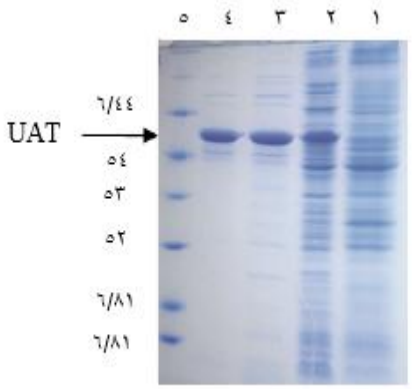
هپارین با نسبت غلظتی ۴:۱ به پروتئین تاو استفاده گردید. سپس ایجاد تجمع پروتئین‌های تاو و همچنین مهار آن در حضور چاپرون N744 با استفاده از سنجش فلئورسانس تیوفلاوین T و الکتروفورز SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت.

به منظور بررسی تغییرات ساختاری پروتئین تاو در حضور هپارین، نمونه‌های پروتئین تاو در حضور این القاگر در دمای ۳۷°C پس از ۷۲ ساعت انکوبه شدند و توسط روش دو رنگ‌نمایی دورانی (CD) آنالیز شدند. از آنجایی که پروتئین تاو به عنوان یک پروتئین دارای ساختار پیچه نامنظم و فاقد ساختار سوم شناخته می شود؛ لذا در این آزمایش، از UV ناحیه دور برای تهیه‌ی طیف CD پروتئین تاو استفاده شد. به این منظور، تمام نمونه‌ها در غلظت ۴۰ میکرومولار پروتئین اندازه‌گیری شدند. همچنین به منظور ارزیابی تاثیر ریز مولکول چاپرون شیمیایی N744 بر روی تجمعات پروتئین تاو، نمونه‌های پروتئین تاو در غلظت ۶۰ میکرومولار تهیه گردید و پس از تیمار با این ریزمولکول و ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷°C با استفاده از ژل پلی‌اکریلامید ۱۰ درصد مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مهار تجمعات فیبریلی پروتئین تاو در حضور چاپرون N744 با استفاده از روش سنجش فلئورسانس تیوفلاوین T نیز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها:

به‌منظور بیان و تخلیص پروتئین تاو، از باکتری *E.coli* BL21(DE3) حاوی پلاسمید واجد ژن کدکننده پروتئین تاو استفاده گردید. نتایج القای ژن مورد نظر با IPTG و بررسی آن با استفاده از SDS-PAGE نشان داد، پروتئین تاو در سلول‌های میزبان به میزان قابل توجهی بیان شده است (تصویر شماره ۱).

استخراج پروتئین تاو از باکتری‌ها، با استفاده از سونیکاسیون و سانتریفیوژ به‌خوبی انجام گردید. نتایج SDS-PAGE برای بررسی پروتئین خالص‌شده بوسیله ستون کروماتوگرافی SP- سفاروز و سپس نیکل- سفاروز، نشان داد که پروتئین تاو حاصل از دو مرحله کروماتوگرافی، از خلوص بالای ۹۰٪ برخوردار می‌باشد (تصویر شماره ۱).

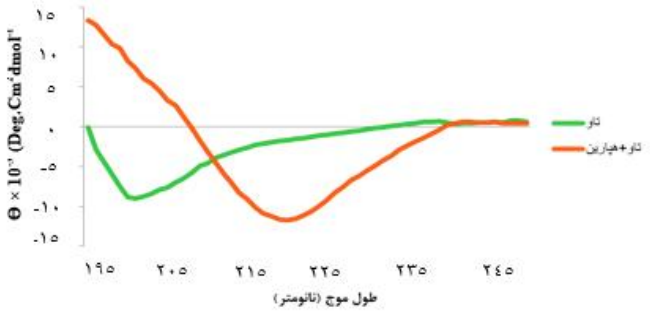


تصویر شماره ۱: بررسی بیان و تخلیص پروتئین تاو با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE

*۱: باکتری قبل از القاء، ۲: باکتری چهار ساعت بعد از القاء، ۳: پروتئین تاو بعد از تخلیص با ستون تعویض یونی **SP**- سفاروز، ٤: پروتئین تاو بعد از تخلیص نهایی با ستون نیکل سفاروز؛ و ۵: مارکر وزن مولکولی.*

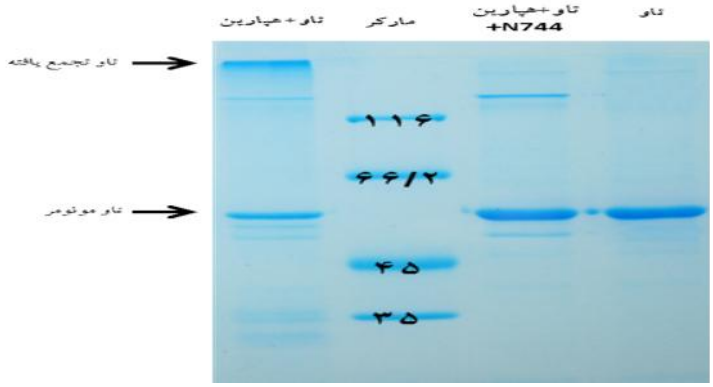
پلیمریزاسیون پروتئین تاو در حضور مولکول‌های القاگر هپارین تسهیل گردید. برای آنالیز تغییرات ساختاری پروتئین تاو در حضور هپارین، از روش دورنگ‌نمایی دورانی (CD) استفاده شد که نتایج حاصل از آن نشان داد که پروتئین تاو قبل از تیمار با هپارین (غیاب القاگر) دارای ساختار پیچه نامنظم (Random coil) است و پس از برهمکنش با هپارین در شرایط انکوباسیون، تغییر ساختار بصورت صفحات بتا نشان می دهد (نمودار شماره۱).

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 14:37 +0430 on Saturday September 16th 2017

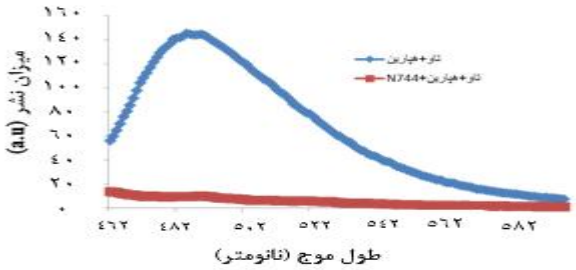


نمودار شماره۱: طیف دورنگ‌نمایی دورانی (CD) ناحیه دور پروتئین تاو در حضور القاگر هپارین

در روش سنجش فلئورسانس تیوفلاوین T، شناساگر تیوفلاوین T قادر است به ساختار صفحات بتا پروتئین متصل شود، بطوری که همراه با افزایش تجمع پروتئین تاو و افزایش ساختار بتا، نشر شناساگر تیوفلاوین T افزایش نشان می دهد. نتایج حاصل از SDS-PAGE و سنجش فلئورسانس نشان داد که چاپرون N744 قادر به مهار شکل گیری تجمعات پروتئین تاو است و باعث می‌شود که پروتئین تاو تجمع‌یافته به صورت اشکال مونومر درآید (تصویر شماره ۲ و نمودار شماره ۲).



تصویر شماره۲: الکتروفورز مربوط به مهار تجمعات فیبریلی پروتئین تاو در حضور چاپرون‌های ریزمولکول با استفاده از ژل پلی‌اکریلامید ۱۰ درصد



نمودار شماره۲: مهار تجمعات فیبریلی پروتئین تاو در حضور چاپرون‌های ریزمولکول با استفاده از سنجش فلئورسانس تیوفلاوین T

*افزایش شدت فلئورسانس پروتئین تاو در حضور هپارین و مهار تجمعات پروتئین تاو در حضور هپارین + چاپرون **N744**.*

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 14:37 +0430 on Saturday September 16th 2017

بحث:

بیش از ۱۰۰ بیماری آمیلوئیدی وجود دارد که از میان آن‌ها بیماری آلزایمر، تاوپاتی، دیابت شیرین نوع II و بیماری مغزی آنسفالوپاتی اسفنجی‌شکل گاوی، با تجمعات یکی از دوازده پروتئین انسانی غیرهمولوگ مرتبط هستند (۱۶،۱۵). اگرچه بیماری آلزایمر شایع‌ترین تاوپاتی به شمار می رود؛ اما رسوبات پروتئین تاو در سایر بیماری‌های تحلیل عصبی نظیر بیماری Pick و پارکینسون نیز دیده شده است. تاوپاتی، بیماری‌های مغزی را توصیف می‌کند که مشخصه آن‌ها وجود توده‌ها و فیبریل‌های نامحلول پروتئین تاو است. به هرحال، پروتئین تاو به عنوان یک بازیگر کلیدی در فرآیندهای تحلیل‌عصبی نقش بسیار مهمی دارد (۱۸،۱۷).

از میان انواع عوامل اثرگذار بر مهار تشکیل تجمعات پروتئین تاو، چاپرون‌ها توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده‌اند (۱۹). چاپرون‌ها ریزمولکول‌های اختصاصی سلولی هستند که می توانند تجمعات پروتئینی ناجور تاخورده را حذف کرده یا به‌صورت اشکال پروتئینی فعال غیرسمی و یا هضم‌شده تبدیل کنند. چاپرون‌های شیمیایی، خود در سه دسته شامل اسمولیت‌ها، ترکیبات هیدروفوبی (فنیل بوتیرات‌ها، لیپیدها و شوینده‌ها) و چاپرون‌های دارویی (آنتاگونیست‌های آنزیمی و آگونیست‌های تاخوردگی) طبقه‌بندی می‌شوند (۲۰). چاپرون‌های شیمیایی آینده درخشانی دارند و به خاطر اندازه کوچک خود، کاربردهای بالقوه بسیاری در مطالعات بالینی و کاربردی دارند. از جمله مزایای این ریزمولکول‌ها می‌توان به ورود آسان به سلول‌ها و اعمال اثر، انتقال آسان به بدن، مقاومت و پایداری بالا در برابر تخریب و فساد، قابلیت تبدیل‌شدن به دارو و اینکه بسیاری از ریزمولکول‌های شناخته‌شده دارای اهداف مولکولی اختصاصی هستند (اثر غیراختصاصی ندارند) اشاره کرد (۲۲،۲۱).

در سال‌های اخیر محققان موفق به کشف ریزمولکول‌هایی شده‌اند که علاوه بر مهار تشکیل تجمعات پروتئینی، توانایی بازکردن تجمعات تشکیل‌شده را نیز دارند (۲۳)؛ البته در مورد مکانیسم عمل و پتانسیل این مولکول‌ها برای آزمایش بر روی موجودات مدل، هنوز اطلاعات کافی وجود ندارد. لازم به ذکر است که ریزمولکول‌های شیمیایی بر روی سایر بیماری‌های تحلیل‌عصبی از جمله هانتیگتون نیز موثر هستند (۲۴). بر اساس گزارش‌های منتشرشده، مشتقات Benzothiazolel که شباهت ساختاری زیادی با N744 دارند، می‌توانند تجمعات پروتئینی تاو را در بیماری‌های تحلیل عصبی در مارماهی مهار کنند (۲۵). همچنین گزارش شده است که این ریزمولکول به رسوبات نامحلول آمیلوئید بتا و با تمایلی بالاتر از آن، به پروتئین تاو در محیط in vitro متصل شده و سبب مهار این تجمعات می‌شود (۲۶). علاوه بر این، در مطالعات دیگر ریزمولکول‌هایی یافت شده‌اند که به میزان قابل توجهی از تشکیل تجمعات فیبریلی پروتئین تاو ممانعت به عمل می‌آورند. از این دسته، می توان به فنوتیازین‌هایی مانند متیلن بلو و مشتقات آن یعنی azure A و azure B، quinacrine خردل و پلی فنول‌هایی مانند myricetin، epicatechin 5-gallate، gossypetin و یک نوع پورفیرین اشاره کرد که با غلظت‌های متفاوت قادر هستند از فیبریله‌شدن پروتئین تاو ممانعت نمایند (۲۷). متیلن بلو همچنین توانسته است که شکل‌گیری تجمعات تاو را در محیط in vitro و نیز در مدل تائوپاتولوژیکی کرم C. elegans مهار کند (۲۸، ۲۹)؛ بنابراین به طور کلی ریزمولکول‌ها پتانسیل مناسبی برای کاربرد بالقوه در مهار تجمعات پروتئینی از خود نشان می‌دهند. مطالعه ریزمولکول N744 برای مهار تجمعات تاو، به خاطر ویژگی چاپرونی، خاصیت ریزمولکولی، ساختار ترکیبی آبگریز و آنیونی (برای بر هم کنش کارآمد با بخش‌های آبگریز و کاتیونی پروتئین تاو) و نیز به خاطر قابلیت

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 14:37 +0430 on Saturday September 16th 2017

عبور از غشاهای زیستی و عدم سمیت برای سلول‌های یوکاریوتی از اهمیت بیشتری برخوردار است (۳۱-۲۹).

در این مطالعه ابتدا پروتئین تاو در باکتری‌های حاوی پلاسمید کدکننده پروتئین، بیان، استخراج و تخلیص گردید و با استفاده از SDS-PAGE بررسی و تأیید شد. به‌منظور تشکیل تجمعات پروتئین تاو، ماده هپارین به عنوان القاگر تشکیل تجمع، اضافه شد و اثر آن به روش دورنگ‌نمایی دورانی (CD) تأیید گردید. سپس تأثیر چاپرون شیمیایی N744 بر روی مهار تجمعات پروتئین تاو با استفاده از SDS-PAGE و روش فلئورسانس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از الکتروفورز نشان داد که تجمعات پروتئین تاو القاشده با هپارین، در حضور N744 به میزان چشمگیری در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌یابد. این یافته توسط روش سنجش فلئورسانس تیوفلاوین T نیز مورد تأیید قرار گرفت، به طوری که پس از تیمار تجمعات تاو با چاپرون N744، نشر شناساگر تیوفلاوین T در فلئورسانس در مقایسه با نمونه کنترل، کاهش پیدا کرد. این مشاهده حاکی از فروپاشی توده‌های پروتئین تاو به صورت ساختارهای تاو مونومری است. از آنجا که شناساگر تیوفلاوین T با تمایل بالایی به ساختارهای بتا متصل می‌شود (۳۲) و نظر به این که صفحات بتا به‌وفور در ساختار تجمعات نامحلول پروتئینی یافت می‌شوند، نتایج حاصل از سنجش تیوفلاوین T در این مطالعه نشان می‌دهند که ماده N744 توانسته است پروتئین تاو را از اشکال تجمع یافته حاوی ساختار غیرطبیعی صفحات بتا به وضعیت طبیعی آن (که به صورت پیچه نامنظم است)، درآورد. به این ترتیب چاپرون N744 قادر است تجمعات پروتئین تاو را در شرایط عاری از سلول مهار نماید. لازم است مطالعات بعدی نشان دهند که چاپرون N744 دقیقاً با چه مکانیسمی تجمعات پروتئین تاو را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مطمئناً گام بعدی برای مطالعه بر روی این ریزمولکول، بررسی اثرات آن بر تجمعات پروتئین تاو در مدل‌های سلولی کشت شده (به طور دقیق، نورون‌های کشت شده) و نیز مطالعه بر مدل‌های تائوپاتولوژیک حیوانی است. همچنین مطالعات دیگری باید انجام شوند تا نشان دهندکه آیا در مدل های موشی آلزایمر، N744 می تواند از سد خونی- مغزی عبور کرده و به اهداف مورد نظر دسترسی پیدا کند؟ بهینه‌سازی بعدی در این مسیر، کاربرد بالقوه‌ی نانومواد در انتقال N744 به جایگاه مورد نظر در بدن می‌باشد (۳۳). همچنین چنانچه بتوان با تکنیک های تصویربرداری، اتصال N744 به پروتئین تاو و اثر مهاری آن را بر تجمعات پروتئینی ردیابی کرد، پیشرفت بزرگتری در کاربرد بالقوه‌ی این ریزمولکول به دست خواهد آمد. نتایج این مطالعه در ترکیب با نتایج حاصل از مطالعاتی که در بالا پیشنهاد شد، مشخص خواهند کرد که آیا چاپرون N744 می‌تواند در آینده به عنوان یک کاندید دارویی برای بیماران آلزایمری مطرح شود؟

نتیجه‌گیری:

نتایج حاصل از این مطالعه به خوبی نشان می‌دهند که ریزمولکول N744، بر روی تجمعات پروتئین تاو دارای اثر مهاری است و می‌تواند سبب مهار اشکال تجمع‌یافته پروتئین تاو شود. به این ترتیب می‌توان N744 را پس از ارزیابی مطالعات بر روی سلول‌های کشت شده‌ی انسانی و مدل حیوانی، به عنوان یک کاندید دارویی بالقوه در درمان انواع تاوپاتی‌ها به‌ویژه بیماری آلزایمر مطرح کرد.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از حمایت‌های مالی پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر در به انجام رسیدن این مطالعه قدردانی می‌شود. همچنین از مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB) دانشگاه تهران به‌خصوص جناب آقای دکتر غلامحسین ریاضی بخاطر راهنمایی و همکاری در انجام آزمایش‌ها و نیز از جناب آقای شریف مرادی، دانشجوی دکتری پژوهشگاه رویان بخاطر همکاری در این مطالعه سپاسگزاری می شود.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 14:37 +0430 on Saturday September 16th 2017

منابع:

1. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. Annu Rev Biochem. 2006; 75: 333-66.
2. Irvine GB, El-Agnaf OM, Shankar GM, 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.
3. Hosseiny R, Bastani F, Sayahi S, Momen-Abadi H, Alijanpoor-Aghamaleki M. The effect of educational- counseling program on general health of women as caregivers of patient, with Alzheimerdisease . J Shahrekord Univ Med Sci. 2011; 13 (5): 83-92.
4. Fandrich M, Schmidt M, Grigorieff N. Recent progress in understanding Alzheimer's beta-amyloid structures. Trends Biochem Sci. 2011; 36(6): 338-45.
5. Dickey CA, Kamal A, Lundgren K, Klosak N, Bailey RM, Dunmore J, et al. The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. J Clin Invest. 2007; 117(3): 648-58.
6. Kuret J, Congdon EE, Li G, Yin H, Yu X, Zhong Q. Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. Microsc Res Tech. 2005; 67(3-4): 141-55.
7. Chirita C, Necula M, Kuret J. Ligand-dependent inhibition and reversal of tau filament formation. Biochemistry. 2004; 43(10): 2879-87.
8. Pickhardt M, Gazova Z, von Bergen M, Khlistunova I, Wang Y, Hascher A, et al. Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells. J Biol Chem. 2005; 280(5): 3628-35.
9. Taniguchi S, Suzuki N, Masuda M, Hisanaga S, Iwatsubo T, Goedert M, et al. Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. J Biol Chem. 2005; 280(9): 7614-23.
10. Kovalska VB, Losytskyy MY, Tolmachev OI, Slominskii YL, Segers-Nolten GM, Subramaniam V, et al. Tri- and pentamethine cyanine dyes for fluorescent detection of alpha-synuclein oligomeric aggregates. J Fluoresc. 2012; 22(6): 1441-8.
11. Mecozzi VJ, Berman DE, Simoes S, Vetanovetz C, Awal MR, Patel VM, et al. Pharmacological chaperones stabilize retromer to limit APP processing. Nat Chem Biol. 2014; 10(6): 443-9.
12. Turnell WG, Finch JT. Binding of the dye congo red to the amyloid protein pig insulin reveals a novel homology amongst amyloid-forming peptide sequences. J Mol Biol. 1992; 227(4): 1205-23.
13. Reddy PH. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. Brain Res. 2011; 1415: 136-48.
14. Motamedi-Shad N, Monsellier E, Chiti F. Amyloid formation by the model protein muscle acylphosphatase is accelerated by heparin and heparan sulphate through a scaffolding-based mechanism. J Biochem. 2009; 146(6): 805-14.
15. Bulic B, Pickhardt M, Schmidt B, Mandelkow EM, Waldmann H, Mandelkow E. Development of tau aggregation inhibitors for Alzheimer's disease. Angew Chem Int Ed Engl. 2009; 48(10): 1740-52.
16. Kelly JW. Towards an understanding of amyloidogenesis. Nat Struct Biol. 2002; 9(5): 323-5.
17. LeVine H. The challenge of inhibiting Abeta polymerization. Curr Med Chem. 2002; 9(11): 1121-33.
18. Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, et al. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. Nature. 2008; 451(7179): 720-4.
19. Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, Hiltunen M, Soininen H. Hsp90 regulates tau pathology through co-chaperone complexes in Alzheimer's disease. Prog Neurobiol. 2011; 93(1): 99-110.
20. Winklhofer KF, Tatzelt J, Haass C. The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. EMBO J. 2008; 27(2): 336-49.
21. Bulic B, Pickhardt M, Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau protein and tau aggregation inhibitors. Neuropharmacology. 2010; 59(4-5): 276-89.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 14:37 +0430 on Saturday September 16th 2017

22. Crowe A, Ballatore C, Hyde E, Trojanowski JQ, Lee VM. High throughput screening for small molecule inhibitors of heparin-induced tau fibril formation. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 358(1): 1-6.
23. Papp E, Csermely P. Chemical chaperones: mechanisms of action and potential use. Handb Exp Pharmacol. 2006(172): 405-16.
24. Necula M, Kayed R, Milton S, Glabe CG. Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. J Biol Chem. 2007; 282(14): 10311-24.
25. Heiser V, Engemann S, Brocker W, Dunkel I, Boeddrich A, Waelter S, et al. Identification of benzothiazoles as potential polyglutamine aggregation inhibitors of Huntington's disease by using an automated filter retardation assay. Proc Natl Acad Sci. 2002; 99(4): 16400-6.
26. Hall GF, Lee S, Yao J. Neurofibrillary degeneration can be arrested in an in vivo cellular model of human tauopathy by application of a compound which inhibits tau filament formation in vitro. J Mol Neurosci. 2002 Dec; 19(3): 251-260.
27. Akoury E, Pickhardt M, Gajda M, Biernat J, Mandelkow E, Zweckstetter M. Mechanistic basis of phenothiazine-driven inhibition of Tau aggregation. Angew Chem Int Ed Engl. 2013; 52(12): 3511-5.
28. Fatouros C, Pir GJ, Biernat J, Koushika SP, Mandelkow E, Mandelkow EM, et al. Inhibition of tau aggregation in a novel Caenorhabditis elegans model of tauopathy mitigates proteotoxicity. Hum Mol Genet. 2012; 21(16): 3587-603.
29. Sima PD, Kanofsky JR. Cyanine dyes as protectors of K562 cells from photosensitized cell damage. Photochem Photobiol. 2000; 71(4): 413-21.
30. Caesar J, Shaldon S, Chiandussi L, Guevara L, Sherlock S. The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function. Clin. Sci. 1961; 21: 43-57.
31. Brancato R, Trabucchi G. Fluorescein and indocyanine green angiography in vascular chorioretinal diseases. Semin Ophthalmol. 1998; 13(4): 189-98.
32. Chirita C, Necula M, Kuret J. Ligand-dependent inhibition and reversal of tau filament formation. Biochemistry. 2004; 43(10): 2879-87.
33. Park JH, von Maltzahn G, Ong LL, Centrone A, Hatton TA, Ruoslahti E, et al. Cooperative nanoparticles for tumor detection and photothermally triggered drug delivery. Adv Mater. 2010; 22(8): 880-5.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2015 Apr, May; 17(1): 87-96.

Original article

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 14:37 +0430 on Saturday September 16th 2017

Study of the inhibitory effect of the small molecule Diethylthia tri carbocyanine iodide, as an anti- Alzheimer's candidate drug on human recombinant tau aggregation

Khosravi Z[1], Nasiri Khalili MA[2*], Sajedi RH[3], Zeinoddini M[2], Olad GhR[4]
[1]Student, Biochemistry and Biophysics Dept., Malek ashtar University of Technology, Tehran, I.R. Iran; [2]Biochemistry and Biophysics Dept., Malek ashtar University of Technology, Tehran, I.R. Iran; [3]Biochemistry Dept., Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran; [4]Applied Biotechnology Research Center, Baqiatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.
Received: 18/Mar/2014 Accepted: 31/May/2014

Background and aims: Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder that is affected by different factors. Forming aggregations of the tau proteins in the brain is one of the most commonly observation in the patients' brains suffered from this disease. Several strategies have been devised to target the tau aggregates in the neuronal cells of the patients. Recently, chaperones have drawn the attention of the researchers as a tool to inhibit or disaggregate the tau protein aggregations. The aim of this study was to investigate the effect of small molecule chaperone called Diethylthia tri carbocyanine iodide on the formation of tau aggregates.
Methods: In this basic laboratory study, Tau protein was expressed in bacteria. Then, Tau protein was purified by the ion-exchange chromatography and affinity chromatography, and its purity was evaluated by SDS-PAGE. Heparin was added as the inducer of tau aggregation, and the inductive effect of heparin on tau aggregation was examinated by circular dichroism (CD) method. Then, Diethylthia tri carbocyanine iodide chaperones was added to the aggregated tau and its effect was evaluated using SDS-PAGE and thioflavin T fluorescence assay.
Results: Electrophoresis SDS-PAGE confirmed the expression of tau protein and its purity. CD validated the successful induction of tau aggregation by heparin. Following treatment of the tau aggregates with Diethylthia tri carbocyanine iodide, the results of SDS-PAGE showed that induced aggregation, remarkably reduced compared to the control sample. Thioflavin T fluorescence assay was used to confirm the results of SDS-PAGE analysis.
Conclusion: The results of this study showed that Diethylthia tri carbocyanine iodide could inhibit the aggregation of the tau protein which they were produced in the presence of heparin inductor. These results can propose Diethylthia tri carbocyanine iodide as a potential treatment to target the tau aggregates in people with Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, Tau protein, Chaperone, Diethylthiatricarbocyanine iodide**.**

Cite this article as: Khosravi Z, Nasiri Khalili MA, Sajedi RH, Zeinoddini M, Olad GhR. Study of the inhibitory effect of the small molecule Diethylthia tri carbocyanine iodide, as an anti- Alzheimer's candidate drug on human recombinant tau aggregation. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(1): 87-96.

[*]**Corresponding author:**
Biochemistry and Biophysics Dept., Malek ashtar University of Technology, Tehran, I.R. Iran; Tel: 00982122970085, E-mail: nasiri@mut.ac.ir