

بهینه سازی فرایند فیبریل زایی از آلبومین سرم گاوی با روش جذب سنجی کنگورد به منظور استفاده از آنها به عنوان نانو مواد زیستی

امیر آراسته^{۱*}، علی صالح زاده^۱، مهران حبیبی رضایی^۲، علی اکبر موسوی موحدی^۳

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، رشت، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران

چکیده

سابقه و هدف: رشته های آمیلوئیدی نانو ساختارهایی هستند که در نتیجه اتصال پپتیدها و پروتئین ها به یکدیگر به وجود می آیند. در سال های اخیر رشته های آمیلوئیدی به عنوان نانو مواد جدید مورد توجه قرار گرفته اند. از این منظر، افزایش میزان آمیلوئیدی شدن پروتئین ها می تواند مطلوب باشد. در این مطالعه فرایند آمیلوئیدی شدن آلبومین سرم گاوی به عنوان یک پروتئین مدل، بهینه سازی شده است.

مواد و روش ها: پروتئین آلبومین سرم گاوی در بافر میکس سیترا-فسفات با pH های مختلف ۱ و ۲ و ۳ و ۴/۷ و ۷/۴ قرار گرفته و هر کدام در حمام آب با دماهای مختلف (از ۴۰-۸۰ درجه سانتی گراد) قرار گرفته و به کمک مگنت های کوچک (برنجی) با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و برای زمان های مختلف ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بهم زده شدند تا رشته های پروتئینی در هر یک به وجود آید. سپس میزان رشته های آمیلوئیدی حاصله به روش جذب سنجی مرئی و با استفاده از رنگ کنگورد مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در این تحقیق اثر چهار متغیر دما، pH، زمان و غلظت پروتئین بر فرایند فیبریل زایی بررسی شده و نتایج حاصله با روش طیف سنجی کنگورد به صورت تغییرات طول موج ماکزیمم (λ_{max}) و جذب در طول موج ماکزیمم ($A\lambda_{max}$) و نیز میکروسکوپ الکترونی گذاره مورد تأیید قرار گرفت. مشخص شد که بهترین شرایط تشکیل رشته های آمیلوئیدی در غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر از پروتئین BSA و در pH بافر برابر ۳ و پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد می باشد.

نتیجه گیری: از روش ساده جذب سنجی کنگورد می توان به عنوان آزمایش اولیه برای تأیید حضور نانو رشته های پروتئینی استفاده نمود و در این راستا، میزان جذب در طول موج ماکزیمم به عنوان یک شاخص موثق معرفی می شود.

کلمات کلیدی: آلبومین سرم گاوی، آمیلوئید، اسپکتروفوتومتری، کنگورد

مقدمه

در فرایند تجمع پروتئین^۱، مولکول هایی که در حالت طبیعی به شکل منومری یا الیگومرهای کوچک در محلول وجود دارند، به یکدیگر متصل شده و ذرات پروتئینی درشت تری را تشکیل می

دهند که یا به صورت پراکنده^۲ در محلول می مانند و یا به تدریج رسوب یافته و از محلول جدا می شوند (۳۰). کلمه آمیلوئید^۳ برای اولین بار در سال ۱۸۵۴ توسط فیزیکدان آلمانی رودولف ویرکوف^۴ برای نامیدن رسوب های رشته ای شکلی که در بافت غیر طبیعی مغز مشاهده می شدند به کار گرفته شد. مطالعه های میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده ساختار پیچ خورده فیبری و بدون انشعاب است که قطر آن ها به طور معمول در حدود ۷-۱۲ نانومتر می باشد. مطالعه های دقیق تر در این زمینه توسط سوند و همکارانش بر روی شش نوع فیبریل متفاوت انجام شد و مشخص شد همه آن ها از پروتوفیلament هایی متشکل از صفحات بتای متقاطع تشکیل شده اند (۳۱، ۲۲). شکل زیر

نویسنده مسئول :

رشت، پل تالشان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، دانشکده ی علوم پایه، گروه میکروبیولوژی

پست الکترونیک: arasteh@iaurasht.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۰۳

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۰۷

2 Dispersed

3Amyloid

4Rudolph Virchow

1 Protein aggregation

دی سولفید جدیدی بین آمینو اسید های سیستمین آزاد ایجاد می شود (۲۵). از جمله دلایلی که از این پروتئین به عنوان منبع پروتئینی برای فیبریل زایی استفاده شده یکی ساختار کروی آن است که با تغییر فضایی و رشته ای شدن به راحتی قابل شناسایی است و دیگری ارزان بودن و در دسترس بودن این پروتئین بوده است.

فیبریل زایی را در پروتئین آلبومین سرم گاوی تحت تاثیر دما و pH در حالات مختلفی مورد بررسی قرار داده اند. در دمای اتاق و pH پائین، پروتئین حالتی شبیه به مولتن گلوبول^۹ پیدا کرده که نواحی آب گریز خود را در غلظت های کم، در معرض قرار می دهد. افزایش غلظت پروتئین می تواند سبب القای اتصال این تجمعات از طریق دمن یک (به صورت ساختار های بتای متقاطع) گردد. در دماهای بالا یک تبدیل کانفورماسیونی از ماریچ آلفا و ساختار پیچیده نامنظم به ساختارهای غنی از بتا روی می دهد که در جهت تشکیل ساختارهای بالغ آمیلوئیدی پیش می رود. مطالعه های زیادی به بررسی اثر دما و pH بر روی تشکیل تجمع های آمیلوئیدی در پروتئین BSA پرداخته اند. به طور معمول در این مطالعه ها میزان pH را در دامنه ای بین ۱ تا ۷/۴ و نیز دماهای مختلف (۴۰ تا ۸۰ درجه سانتی گراد) در نظر می گیرند. دمای بالا موجب ایجاد تجمع های شیمیایی در پروتئین ها نیز می شوند مثل افزایش تشکیل الیگومرهای کووالانسی در انسولین و سایر پلیمرها در دماهای بیش از ۲۵ درجه سانتی گراد رخ می دهد. این تغییرها ممکن است حتی ترکیب نسبی ساختارهای ثانویه را تغییر داده و رفتار فرایند تجمع را عوض کنند (۳۴). میزان pH محلول در بر گیرنده پروتئین، دیکته کننده نوع و نحوه توزیع بارهای سطحی در آن است. در pH های خیلی بالا یا خیلی پائین، پروتئین ها به شدت باردارند. این چگالی بار بر روی سطح پروتئین اثر قابل توجهی بر افزایش میزان میان کنش های دافعه ای در سطح درون مولکول و نیز بین مولکولی دارد که حداقل منجر به باز شدن تاخوردگی طبیعی پروتئین می گردد.

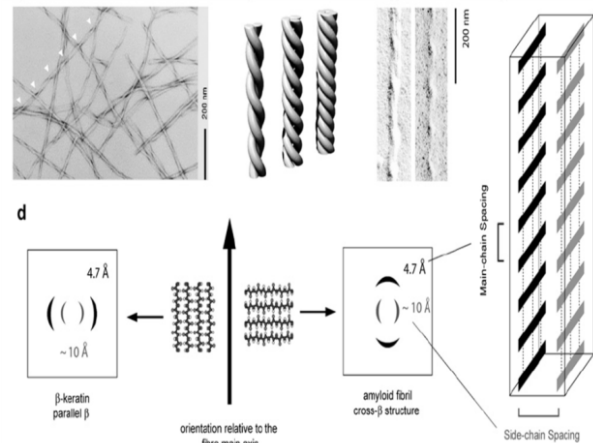
پژوهش صورت گرفته به منظور شناخت هرچه بیش تر خصوصیات آمیلوئید ها و هم چنین بررسی شرایط بهینه برای فیبریل زایی از پروتئین آلبومین سرم گاوی به منظور استفاده از آنها به عنوان نانو مواد زیستی می باشد.

مواد و روش ها

مواد

تیوفلاوین T، کنگورد و سدیم آزید از شرکت سیگما (St Louis, MO, USA)، آلبومین سرم گاوی (BSA)، رنگ کوماسی بریلیانت بلو، گلاسیسین و سایر نمک ها و مواد شیمیایی نیز از 9 Molten globule

نمایی از رشته های آمیلوئیدی و نحوه قرار گیری رشته ها در کنار هم را نشان می دهد.



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از رشته های آمیلوئیدی و

الگوی شماتیک پراش اشعه ایکس (۷)

مراحل فیبریل زایی از الگوی خاصی پیروی می کند. با استفاده از روش های مختلف اسپکتروسکوپی، میکروسکوپی و ترکیب هایی که به طور ویژه به فیبریل ها متصل می شوند، می توان روند تغییرها را مشخص نمود (۲۷، ۲۱، ۱۹، ۵). کنگورد^۵ یکی از ترکیب های رنگی آلی به شمار می رود که قادر است با ساختارهای بتای متقاطع^۶ موجود در آمیلوئیدها، پیوند عرضی ایجاد کرده و موجب افزایش میزان λ_{max} مربوط به رنگ کنگورد شود (۳۶). البته این تغییر مکان قرمز^۷، به طور معمول با افزایش میزان جذب^۸ نیز همراه است.

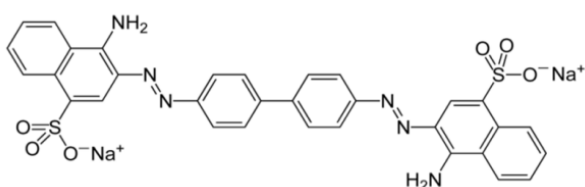
آلبومین سرم خون یکی از پروتئین هایی است که بیش ترین تحقیقات در مورد آن صورت گرفته است. این پروتئین بیش ترین پروتئین پلاسماست و غلظت آن در حدود پنجاه میلی مولار است. آلبومین مسئول تنظیم حدود ۸۰ درصد از پتانسیل اسمزی خون است (۱). هم چنین آلبومین عمده ترین عامل ثبات pH خون (۸) و ناقل بسیاری از متابولیت ها در پلاسما می باشد. از نظر پایداری گرمایی، آلبومین سرم گاوی نسبتا پروتئین مقاومی است. هنگامی که BSA گرما داده شود در دو مرحله واسرشت می شود. مرحله اول به صورت برگشت پذیر است و در دماهای ۳۰ تا ۶۵ درجه سانتی گراد دیده می شود اما مرحله دوم فرایند در دماهای بالاتر از ۶۵ درجه سانتی گراد رخ می دهد و به صورت برگشت ناپذیر است (۱۷). در این دما، ساختار دوم پروتئین و پیوند های هیدروژنی آن متحمل تغییرهایی می شوند (۲۴، ۲۶). در دماهای بالاتر از ۶۵ درجه سانتی گراد واسرشتگی به صورت برگشت ناپذیر است. در این محدوده دمایی، پل های

- 5 Congored
- 6 Cross beta structures
- 7 Red shift
- 8 Hyper chromacity

۱ و ۲ و ۳ و ۴/۷ و ۷/۴ قرار گرفته و هر کدام در حمام آب با دماهای مختلف (از ۴۰-۸۰ درجه سانتی گراد) قرار گرفته و به کمک مگنت های کوچک (برنجی) با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و برای زمان های مختلف ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بهم زده شدند تا رشته های پروتئینی در هر یک بوجود آید. بر این اساس تعداد زیادی از حالات مختلف فیبریل زایی مورد بررسی قرار گرفت. پس از پایان زمان انکوباسیون، نمونه ها تا بررسی به روش طیف سنجی کنگورد در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

جذب سنجی کنگورد

برای این منظور در یک میکروتیوپ نیم میلی لیتری میزان ۵۰۰ میکرولیتر از بافر کنگورد با ۲۵ میکرولیتر محلول پروتئینی نمونه مخلوط شده و پس از بهم زدن برای مدت ۱۰ دقیقه تا تثبیت رنگ در شرایط آزمایشگاه قرار داده شد. سپس طیف جذبی آن ها توسط دستگاه طیف سنج مرئی (Shimadzu UV-1800 Spectrophotometer) در طول موج ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر در مقابل بافر کنگورد به عنوان بلانک اندازه گیری شد. اطلاعات حاصل از هر بار اسکن توسط دستگاه ذخیره شده و به کمک نرم افزار Excel برای تعیین میزان λ_{max} و جذب در λ_{max} مورد استفاده قرار گرفت. در این محدوده مولکول کنگورد به تنهایی، حداکثر جذب را در طول موج ۴۸۵ نانومتر دارد ولی در صورت تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی، این میزان می تواند تا بیش از ۵۰۰ نانومتر نیز افزایش پیدا کند. شکل زیر ساختار شیمیایی کنگورد را نشان می دهد.



شکل ۲- ساختار شیمیایی مولکول کنگورد (۱۶) (diazene-2,1-diyl) bis (4-aminonaphthalene-1 sulfonate)

یافته ها

با روش طیف سنجی مرئی میزان تغییرهای طول موج ماکزیمم (λ_{max}) و تغییرهای جذب در طول موج ماکزیمم ($A\lambda_{max}$) در زمان های مختلف شامل صفر، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از فیبریل زایی در برابر طول موج رسم شده است. اثر غلظت پروتئین، دما و pH نیز با گذشت زمان مورد بررسی قرار گرفته و نتایج مربوط به هر یک در قالب نمودارهای λ_{max} و $A\lambda_{max}$ در مقابل زمان آورده شده است. شکل (۳) طیف به دست آمده در شرایط بهینه را در کنار نمونه کنترل (فاقد رشته های آمیلوئیدی) نشان می دهد. همان طور که در شکل مشخص

محصولات شرکت مرک استفاده گردید (Merck-Germany-Darmstadt). فیلترهای با منافذ ۰/۲۲ و ۰/۴۵ میکرومتر از Milipore خریداری شد.

روش ها

تهیه محلول ها و بافرهای مورد نیاز

بافر میکس سیترا-فسفات-گلیسین: یک محلول ذخیره با غلظت ۰/۱ مولار از اسید سیتریک و ۰/۲ مولار از فسفات سدیم دی بازیک و ۵۰ میلی مولار از گلیسین در آب دو بار تقطیر و تهیه شده و با نسبت های مشخص با هم ترکیب شدند تا بافرهایی با pH های مختلف از ۱ تا ۷/۴ تهیه گردد. در نهایت میزان pH آنها به طور جداگانه توسط pH متر تنظیم گردید (۳۲). جهت جلوگیری از آلودگی احتمالی، ۰/۰۵٪ سدیم آزید به محلول بافر اضافه شده و پس از عبور دادن از فیلتر در شیشه های تیره و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

بافر میکس سیترا-فسفات: با تهیه یک استوک ۰/۱ مولار از سیتریک اسید و ۰/۲ مولار از فسفات سدیم دی بازیک در آب دوبار تقطیر و ترکیب نمودن آن ها با نسبت های مشخص، می توان بافرهایی با pH های مختلف از ۲/۶ تا ۷ تهیه نمود و در نهایت توسط pH متر و HCl، pH آن ها را به طور جداگانه تنظیم کرد (۳۲). این بافر نیز با سدیم آزید محافظت شد.

بافر کنگورد: میزان مورد نظر از رنگ کنگورد در بافر فسفات بافر سالین (PBS) شامل ۱۴۰ میلی مولار NaCl و ۲/۵ میلی مولار KCl و ۱۰ میلی مولار Na_2HPO_4 و ۲ میلی مولار KH_2PO_4 حل شده و از آب مقطر به طوری که غلظت نهایی کنگورد به ۲۰ میکرو مولار برسد اضافه گردید. پس از تنظیم pH بر روی ۷/۴ از فیلترهای مخصوص عبور داده شده و در شیشه های تیره در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شدند.

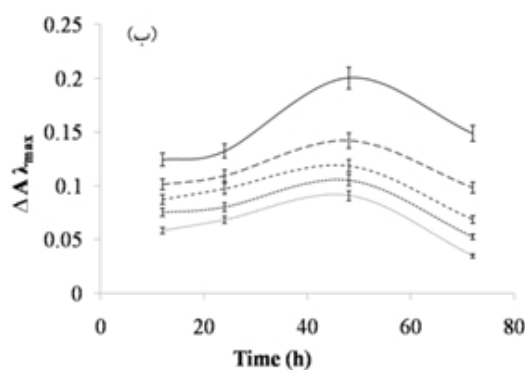
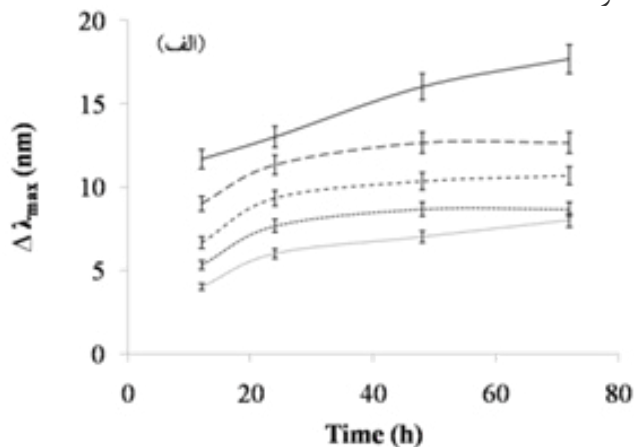
تهیه ی محلول آلبومین سرم گاوی و تعیین غلظت آن

محلول آلبومین سرم گاوی از انحلال مقدار مورد نظر از پروتئین در بافر به آرامی و بدون بهم زدن شدید به دست آمد. با توجه به خالص بودن نمونه پروتئینی به کار گرفته شده در این مطالعه، سنجش غلظت پروتئین در همه آزمایشات بر اساس روش دقیق برادفورد انجام شد تا حداکثر اطمینان از میزان غلظت پروتئین برای تشکیل آمیلوئید حاصل گردد.

القای تجمع آمیلوئیدی در آلبومین سرم گاوی

برای القای تجمع های آمیلوئیدی و بررسی تمام شرایط ممکنه پنج حالت مختلف از متغیر های چهارگانه شامل غلظت پروتئین، pH، دما و زمان انکوباسیون در نظر گرفته شد. بدین معنی که هر یک از غلظت های یک تا پنج میلی گرم بر میلی لیتر از آلبومین سرم گاوی در بافر میکس سیترا-فسفات با pH های مختلف

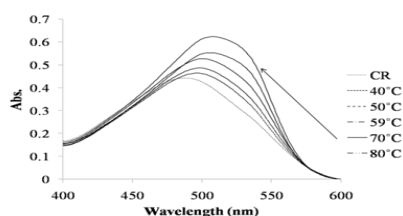
هاى آميلوئيدى در نمودار λ_{max} در غلظت ۵ ميلي گرم بر ميلي ليتر مشاهده مى شود و همين الكو نيز در نمودار $A\lambda_{max}$ وجود دارد.



شكل ۵- روند فيبريل زايى در بافر با $pH=3$ و دماى $70^\circ C$ در مقابل زمان در غلظت هاى ۱ (.....)، ۲ (....)، ۳ (---)، ۴ (--) و ۵ (—) ميلي گرم بر ميلي ليتر

روند فيبريل زايى با تغيير دما

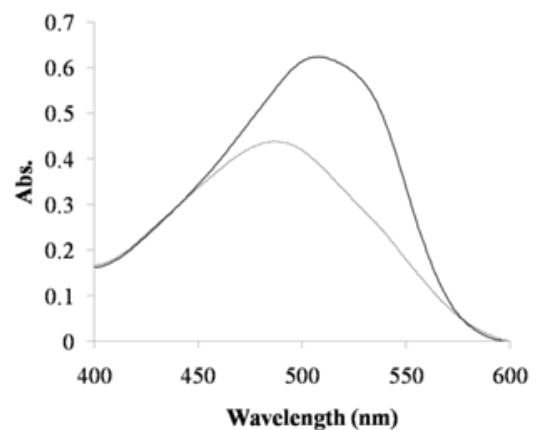
در اين مطالعه، اثر تغيير دما بر حسب درجه سانتى گراد بر روى روند فيبريل زايى در غلظت ۵ ميلي گرم بر ميلي ليتر از پروتئين و $pH=3$ تعيين شده است (شرائط بهينه) كه طيف مربوط به هر دما پس از ۷۲ ساعت (شكل ۶) و نيز نمودارهاى λ_{max} و $A\lambda_{max}$ در مقابل زمان آورده شده است (شكل ۷).



شكل ۶- طيف كنغورد آلبومين سرم گاوى در دماهاى مختلف بر حسب درجه سانتى گراد، پس از گذشت ۷۲ ساعت در غلظت ۵ ميلي گرم بر ميلي ليتر از پروتئين و $pH=3$

همان طور كه در نمودار نيز مشاهده مى شود، با افزايش دما، هم

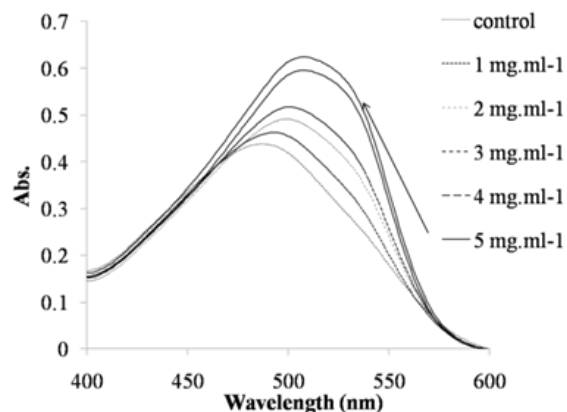
است، نمونه حاوى رشته هاى آميلوئيدى با افزايش طول موج ماكزيمم و افزايش جذب در اين طول موج همراه است.



شكل ۳- طيف كنغورد براى نمونه كنترل (.....) و نمونه حاصل از شرايط بهينه فيبريل زايى (—) از آلبومين سرم گاوى

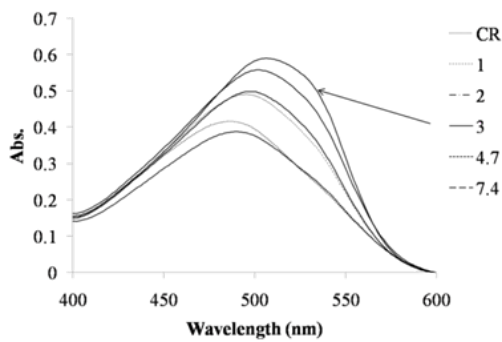
روند فيبريل زايى با تغييرات غلظت پروتئين

براى تعيين روند فرايند فيبريل زايى بر حسب متغيرهاى غلظت پروتئين، دما و pH لازم است در هر مورد، دو فاكتر ديگر را بايد ثابت در نظر گرفته شود. براى مثال در بررسى روند فيبريل زايى با تغييرهاى غلظت بايستى تغييرات دما و pH را ثابت نگه داشت. در اين مطالعه، اثر تغييرهاى غلظت پروتئين بر روى روند فيبريل زايى در دماى $70^\circ C$ و $pH=3$ (شرائط بهينه) تعيين شده است (شكل ۴) و همين طور طيف مربوط به هر غلظت پس از ۷۲ ساعت به صورت نمودارهاى λ_{max} و $A\lambda_{max}$ در برابر زمان رسم شده است (شكل ۵).



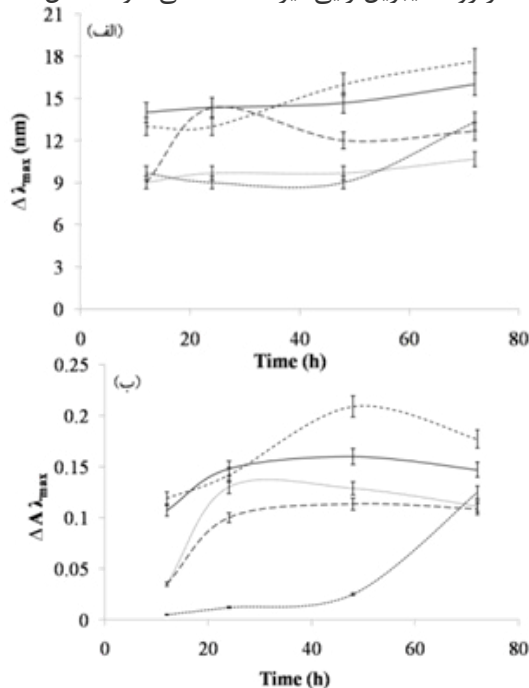
شكل ۴- طيف هاى كنغورد آلبومين سرم گاوى در غلظت هاى مختلف بر حسب ميلي گرم بر ميلي ليتر، پس از گذشت ۷۲ ساعت در دماى $70^\circ C$ و $pH=3$ سانتى گراد

روند فيبريل زايى در غلظت هاى مختلف پروتئين روندى صعودى از خود نشان مى دهد و اين روند با افزايش غلظت، سرعت بيش ترى به خود گرفته به طورى كه بالاترين ميزان تشكيل رشته



شکل ۸- طیف کنگورد آلبومین سرم گاوی در pH های مختلف، پس از گذشت ۷۲ ساعت در غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر از پروتئین و دمای ۷۰ درجه سانتی گراد

همان طور که در نمودار نیز مشاهده می شود، با افزایش pH، هم میزان تغییر مکان قرمز و هم میزان جذب مربوطه تا $pH=3$ بالاتر می رود به طوری که بالاترین قله در بین طیف ها مربوط به $pH=3$ می باشد در حالی که پس از آن $pH=7/4$ و سپس در $pH=2$ بیش ترین تغییر مشاهده می شود (شکل ۸) که این وضعیت در روند فیبریل زایی نیز مشاهده می شود (شکل ۹).

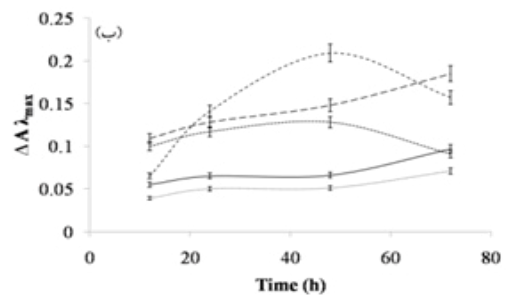
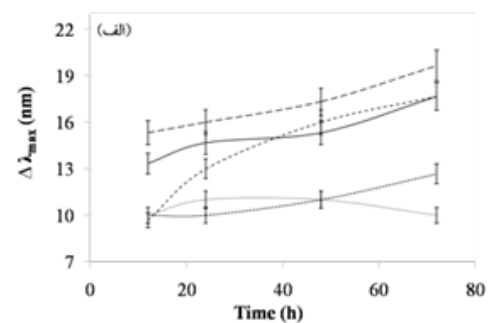


شکل ۹- روند فیبریل زایی در pH های مختلف در غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر از پروتئین و دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به صورت تغییر λ_{max} (الف) و $A\lambda_{max}$ (ب) در مقابل زمان در pH های ۱ (.....)، ۲ (....)، ۳ (---)، ۴/۷ (--) و ۷/۴ (—)

بحث

به دلیل کاربردهای بیوتکنولوژی و دارویی در تولید فرآورده های پروتئینی و هم چنین دخالت در ایجاد بیماری های مختلف، تجمعات پروتئینی در محدوده ی وسیعی مورد مطالعه قرار

میزان تغییر مکان قرمز و هم میزان جذب مربوطه بالاتر می رود به طوری که بالاترین قله در بین طیف ها مربوط به دمای ۷۰ درجه سانتی گراد می باشد. روند فیبریل زایی در دماهای مختلف در بافر با $pH=3$ و غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر از پروتئین الگوهای مشابهی را از خود نشان می دهد به طوری که بالاترین میزان تشکیل رشته های آمیلوئیدی پس از ۷۲ ساعت در نمودار λ_{max} در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد مشاهده می شود و پس از آن در دمای ۵۹ درجه سانتی گراد بالاترین تولید مشاهده شد. همین وضعیت نیز در نمودار $A\lambda_{max}$ وجود دارد.



شکل ۷- روند فیبریل زایی در دماهای مختلف در بافر با $pH=3$ و غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر از پروتئین به صورت تغییر λ_{max} (الف) و $A\lambda_{max}$ (ب) در مقابل زمان در دماهای ۵۹°C (---)، ۵۰°C (....)، ۴۰°C (.....)، ۸۰°C (—) و ۷۰°C (--)

روند فیبریل زایی با تغییر pH

در این مطالعه، اثر تغییر pH بر روی فیبریل زایی در غلظت ثابت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر از پروتئین و دمای ۷۰ درجه سانتی گراد تعیین شده است (شرایط بهینه) که طیف مربوط به هر pH پس از ۷۲ ساعت و نیز نمودارهای λ_{max} و $A\lambda_{max}$ در مقابل زمان آورده شده است.

می گیرد. به علاوه امروزه با درک این مساله که از فیبرهای آمیلوئیدی می توان استفاده های متنوعی در علوم نانو هم چون تشکیل نانوتیوب ها داشت، اهمیت بحث صد چندان گشته است (۲۸، ۱۵، ۱۳، ۶، ۳). از آن گذشته این ساختارها با تاثیرهای ناهنجار بسیار پیچیده بر عوامل مختلف سلولی سوال های متعددی را در ذهن دانشمندان ایجاد کرده اند. این ناهنجاری های سلولی در نهایت باعث ایجاد بیماری های مختلف هم چون آلزایمر و پارکینسون می شود. نکته قابل توجه آن است که اغلب دانشمندان عوامل محیطی را در تغییر پروتئین های طبیعی به ساختارهای بیماری زا دخیل می دانند و تنها درصد کمی از بیماری های عصبی را نتیجه تغییرهای ژنتیکی می دانند. به این ترتیب بررسی مکانیزم های تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی و یافتن راههای درمان و حتی پیش گیری از ابتلا به آن ها موثر است (۱۸، ۵). در این بخش ابتدا به بحث و بررسی فرایند تشکیل تجمع های آمیلوئیدی پرداخته و اثر عوامل مختلف را بر روی این فرایند مورد بررسی قرار خواهد داده شد.

بررسی فرایند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی

هدف کلی این بخش از مطالعه، سنجش توانایی پروتئین با ساختار تمام α بنام آلبومین سرم گاوی برای تشکیل ساختارهای رشته ای غنی از صفحات β در شرایط مختلف و بهینه سازی آن بوده است. در مطالعه های مختلف از شرایط متفاوتی برای تشکیل تجمع های آمیلوئیدی در آلبومین سرم گاوی استفاده شده است. در این مطالعه به منظور تشکیل تجمع های آمیلوئیدی تحت شرایط مختلفی از غلظت پروتئین، دما، pH و زمان استفاده شد تا تاثیر هر یک به طور جداگانه مورد بررسی قرار گیرد.

دلیل استفاده از pH های اسیدی این است که در pH اسیدی بار خالص پروتئین تغییر می کند. با توجه به این که pI آلبومین سرم گاوی ۴/۷ است، در pH های اسیدی بار خالص این پروتئین مثبت می باشد در نتیجه نیروهای دافعه بین بخش های مختلف پروتئین به وجود می آید و منجر به بازشدگی نسبی ساختار سوم پروتئین می گردد. البته تغییرهای pH نمی تواند باعث بازشدگی کامل پروتئین مانند حالتی که ترکیب هایی هم چون گوانیدین هیدروکلراید ایجاد می کند، گردد. باز شدن نسبی ساختار پروتئین به عنوان یک حد واسطه ناپایدار شناخته می شود به همین دلیل این حدواسطه ها در بخش هایی با یکدیگر برهم کنش کرده، ساختارهای پیش فیبری و در نهایت فیبریل ها را که ساختارهای پایدارتری هستند به وجود می آورند. لازم به ذکر است که نیروهای دافعه بارهای مثبت در pH های پایین به اندازه ای نیست که به تواند مانع شکل گیری نیروها و برهم کنش های دیگر در پروتئین (مانند نیروهای آب گریز) که نقش اساسی

دارند گردد. بسیاری از پروتئین ها در pH های پایین بسیار ناپایدار بوده تا حدی که با تخریب زیاد ساختار خود مواجه می شوند. آلبومین سرم گاوی پروتئین پایداری می باشد و استفاده از pH پایین به تنهایی موجب تغییر عمده ی ساختار آن و القای تشکیل تجمع های آمیلوئیدی نمی گردد. بنابراین در کنار آن به طور معمول از دماهای بالا نیز استفاده می کنند تا باز شدگی موثر جهت آمیلوئیدی شدن اتفاق بیفتد. البته در دماهای بالای ۶۰ درجه سانتی گراد و pH های پایین احتمال شکست زنجیره ی پلی پپتیدی وجود دارد که منجر به پدید آمدن قطعه های مختلفی از پروتئین می گردد (۱۴).

تشکیل حد واسطه های ذکر شده با افزایش خاصیت آب گریزی در سطح همراه است که منجر به تجمع خود به خودی و فیبریلی شدن آن ها می گردد (۲۳). مطالعه های قبلی بر روی آلبومین سرم گاوی نشان داده بود که دمای ذوب این پروتئین ۵۹ درجه سانتی گراد می باشد. این نکته در میزان باز شدگی ساختار سوم پروتئین تاثیر دارد و می تواند تشکیل تجمع ها را تسریع کند. استفاده از روش هم زدن محلول یا عدم کاربرد آن، در زمان تشکیل تجمع ها و هم چنین اشکال آمیلوئیدی ایجاد شده اختلاف ایجاد می کند به طوری که هم زدن محلول، زمان لازم برای تشکیل فیبریل ها را تسریع می کند و دلیل آن هم ممکن است احتمال برخورد بیش تر بین گونه های حد واسطی باشد که در سینتیک تشکیل آمیلوئید تاثیر گذار هستند ولی عدم هم زدن محلول باعث ایجاد فیبریل های طویل تر و با قطر بیش تر می گردد.

در این مطالعه اثر همزمان دو عامل pH و دما مورد بررسی قرار گرفته است که در ضمن آن اثر دماهای مختلف در pH فیزیولوژیک و اثر pH های مختلف در دمای فیزیولوژیک بررسی شده است که به معنی بررسی اثر هریک از فاکتورهای pH و دما به تنهایی بر روی فرایند فیبریل زایی است. آیا دما به تنهایی صرف نظر از فاکتور pH قادر است تا رشته های آمیلوئیدی را به وجود آورد و یا فاکتور pH به تنهایی موجب تشکیل رشته های آمیلوئیدی در پروتئین ها می شود؟ برای پاسخ به این سوال از روش اتصال کنگورد استفاده شد و مشاهده گردید که انکوباسیون ساده در pH فیزیولوژیک ولی دمای بالا برای القای تجمع های آمیلوئیدی کافی است. تجمع هایی که از این حالت به دست می آیند دارای ویژگی های خاصی هستند که آن ها را از فیبریل های کلاسیک مجزا می سازد (۱۴). نخست این تجمع ها، میزان تغییر مکان قرمز خیلی کمی در مقایسه با انواع فیبریل های $A\beta$ از خود نشان می دهند. دوم این که این تجمع ها دارای هسته های مقاوم به پروتئاز نبوده و بر خلاف فیبریل

های $A\beta$ و β_2 -میکروگلوبولین و لیروزیم، در حضور پروتئازها به قطعات کوچکتر تقسیم می شوند، مورد سوم اینکه نسبت به فیبریل های کلاسیک بسیار باریک و دراز و درهم و برهم هستند و در نهایت در فرایند تشکیل تجمع های آن ها فاز تاخیری دیده نمی شود (۱۴). علاوه بر این انکوباسیون ساده در دمای فیزیولوژیک ولی pH پائین نیز می تواند برای القای تجمع های آمیلوئیدی کافی باشد و نکته جالب تر این که فرایند تشکیل تجمع های آمیلوئیدی حتی در دما و pH فیزیولوژیک نیز انجام شدنی است. دلیل این مطلب را می توان در ماهیت فیبریل ها و نیز ساختار پروتئین مورد نظر جستجو کرد.

بررسی روند فیبریل زایی با تغییر غلظت پروتئین، دما و pH

در بررسی روند فیبریل زایی در هر مورد می توان با ثابت در نظر گرفتن هم زمان دو فاکتور دیگر، تغییر یکی از آن ها را مورد بررسی دقیق و منطقی قرار داد. دلیل این کار حذف هر گونه عامل تغییر دیگر از شرایط موجود در سیستم مطالعه و بررسی متغیر مورد نظر، به طور ویژه می باشد.

نتایج حاصل از تست های جذب سنجی با رنگ کنگورد با افزایش مقادیر λ_{max} به طور معنی دار از غلظت های کم به بالا همراه بوده است. این امر مبین این مطلب است که غلظت پروتئین به عنوان یکی از عوامل اساسی، به طور مستقیم فرایند تشکیل تجمع های آمیلوئیدی را تحریک می نماید. میزان جذب در طول موج ماکزیمم به دست آمده از روش کنگورد نیز به عنوان یکی از فاکتور های دال بر تشکیل فیبریل مطرح می باشد. نتایج مشابه به دست آمده از این فاکتور ($A\lambda_{max}$) نیز مبین این مطلب است که به طور اصولی فرایند تجمع پروتئین، فرایندی وابسته به غلظت است و با توجه به اینکه تشکیل این تجمع ها تحت تاثیر ایجاد میان کنش های درون مولکولی از پروتئین ها می باشد، افزایش غلظت برای بسیاری از پروتئین ها موجب افزایش غلظت تجمع های پروتئینی می گردد.

افزایش غلظت پروتئین از طریق بالا بردن شانس برخورد حد واسط ها به یکدیگر نیز موجب افزایش تجمع های پروتئینی می گردد (۹). در واقع در غلظت های بالای پروتئین، جمعیت ماکرومولکول ها افزایش یافته و حجم بالایی از کل را اشغال می کنند و همین امر احتمال برخورد آنها را با هم بالا می برد.

در بررسی روند فیبریل زایی با تغییر دما نیز فاکتورهای غلظت و pH در مقادیر اپتیمم خودشان، ثابت در نظر گرفته شد و با این کار امکان بررسی اثر تغییر دمایی به طور منطقی فراهم گردید. از آنجائی که دما به عنوان موثر ترین فاکتور در تشکیل تجمع های پروتئینی به حساب می آید، لذا انتظار می رود تغییر دما

مستقیم بر روی روند فیبریل زایی موثر باشد. به طور معمول پروتئین ها در دماهای بالا تاخوردگی خود را از دست داده و به علت در معرض قرار گیری باقی مانده های آب گریز، تجمع های پروتئینی را به وجود می آورند. افزایش دما موجب افزایش فرکانس تصادم مولکولی شده و از این طریق سرعت تشکیل تجمع های پروتئینی را بالا می برد (۲۹). علاوه بر این افزایش دما از طریق تغییرهایی که در ساختار پروتئین اعمال می کند موجب افزایش میان کنش های آب گریز بین مولکولی شده و احتمال تشکیل تجمع ها را بالا می برد. از طرف دیگر دمای بالا موجب ایجاد تغییرهای شیمیایی در پروتئین ها نیز می شوند و این تغییرها ممکن است حتی ترکیب نسبی ساختارهای ثانویه را تغییر داده و رفتار فرایند تجمع را عوض کنند (۳۴). دماهای بالاتر می توانند مستقیم بر روی ساختار فضایی زنجیره پلی پپتیدی در سطح سوم و چهارم تاثیر گذاشته و موجب تشکیل حدواسط هایی شوند که در اغلب موارد منجر به تشکیل تجمع های پروتئینی می گردند. میزان حداکثری تجمع های القا شده در این مطالعه که در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد مشاهده می شود موید این مطلب است که دماهای نزدیک به T_m پروتئین (۵۹ درجه سانتی گراد) یا کمی بالاتر از آن، به طور اختصاصی جهت القای تجمع های منظم پروتئینی مناسب هستند که توسط مقادیر λ_{max} و $A\lambda_{max}$ تائید می گردد. افزایش یا کاهش بیش از حد دما امکان مشاهده ساختارهای منظم را کاهش می دهد به طوریکه در دماهای خیلی بالا (۸۰ درجه سانتی گراد)، تجمع های ناپایدار بوده و در دماهای پائین تر (۴۰ و ۵۰ درجه سانتی گراد) پپتید ها یا پروتئین ها به صورت بی شکل خودشان باقی می مانند (۱۲). البته در این میان نوع پروتئین و پایداری ساختاری آن هم از اهمیت بالایی برخوردار است. برای مثال در پروتئین هایی مثل β -لاکتاماز (۱۰) و پروتئین پوششی فاژ P22 (۳۳)، دمای بالاتر از ۳۵ درجه سانتی گراد است که موجب تشکیل تجمع های آمیلوئیدی می شود.

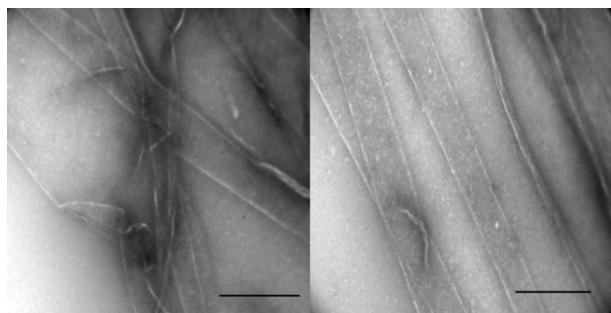
تغییر دمای یک محلول پروتئینی مستقیم می تواند بر روی میزان نوسان های پیوندی در مولکول های پروتئینی که مرحله ای ضروری در القای تجمع ها است تاثیر داشته باشد و از این طریق موجب تشکیل تجمع های آمیلوئیدی گردد (۲۰). بعضی از پروتئین ها نظیر پروتئین آلبومین سرم گاوی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت می توانند به سادگی در دمای اتاق تجمع یابند. این مطلب به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت و معلوم شد که افزایش دما بالاتر از میزان فیزیولوژیک می تواند با اثرهای متنوعی بر روی پروتئین ها فرایند تشکیل تجمع های آمیلوئیدی را شتاب بخشد (۳۵). این اثرها شامل کاهش

آمیلولیدی مشاهده شد.

بررسی فرایند فیبریل زایی در دما و pH فیزیولوژیک

اصولا توانایی یک پروتئین برای تشکیل رشته های منظم از ساختار های متقاطع بتا به طبیعت آمینواسید های شرکت کننده در زنجیره اصلی آن بر می گردد و مستقل از ساختار طبیعی پروتئین است (۴). بنابراین وقتی یک پروتئین ساده تر از دیگر پروتئین ها رشته ای می شود، امکان دارد تا با شرایطی روبرو شد که ساختار طبیعی را به اندازه کافی ناپایدار کرده و امکان نشان دادن کانفورماسیون های جایگزین را مشتمل بر تجمع های پایدار از صفحات β فراهم آورد است (۱۴). امکان دارد تا چنین شرایطی را نیز به توان در مورد یک پروتئین بزرگ چند دمینی مثل آلبومین سرم گاوی مشاهده کرد که در آن کثرت ساختار های آلفا قادر هستند از دسترسی نواحی بتای حاصله به هم ممانعت نمایند.

به نظر می رسد در مورد پروتئین بزرگی مثل آلبومین سرم گاوی حضور دمین های مارپیچ α به عنوان عامل ممانعت کننده فضایی در برابر تشکیل ساختار های منظم تر از صفحات β عمل نموده و تجمعات را در مراحل ابتدایی تجمع حبس نمایند. حضور این تجمع ها با تمام ویژگی هایی که برای آنها ذکر شد به عنوان یک زمینه رشته ای پایدار حائز اهمیت بوده و در دماهای بالاتر از T_m نسبت به دماهای دیگر فراوانی بیش تری از خود نشان می دهد. شکل (۱۰) ساختار رشته های آمیلولیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی را با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره نشان می دهد.



شکل ۱۰- تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از آلبومین سرم گاوی پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در شرایط بهینه فیبریلازی، خطوط میزان فاصله ۵۰ نانومتری را در تصویر نشان می دهند.

نتیجه گیری

در این تحقیق اثر چهار متغیر دما، pH، زمان و غلظت پروتئین بر فرایند فیبریل زایی بررسی شده و نتایج حاصله با روش طیف سنجی کنگورد به صورت تغییر طول موج ماکزیمم (λ_{max}) و جذب در طول موج ماکزیمم ($A\lambda_{max}$) و نیز میکروسکوپ الکترونی گذاره مورد تأیید قرار گرفت. مشخص شد که بهترین شرایط تشکیل رشته های آمیلولیدی در غلظت ۵ میلی گرم

انرژی فعال سازی، القای میان کنش های آب گریز، افزایش نفوذ پذیری و نیز افزایش فرکانس برخورد مولکول های پروتئینی به هم می باشد. در واقع انرژی فعال سازی فرایند تجمع، همان میزان انرژی است که برای تشکیل ترکیب های حدواسط لازم است و دما به عنوان یک فاکتور القا کننده تشکیل تجمع های آمیلولیدی قادر است از طریق کاهش انرژی فعال سازی عمل کند.

بررسی روند فیبریل زایی با تغییرات pH نیز فاکتورهای غلظت و دما در مقادیر اپتیمم خودشان، ثابت در نظر گرفته شد. از آنجائی که pH محلول در برگیرنده پروتئین، تعیین کننده نوع و نحوه توزیع بارهای سطحی در آن است لذا قادر است از طریق توزیع بار در سطح پروتئین و نیز تاثیر در میان کنش های الکتروستاتیک نقش تعیین کننده ای بر روی رفتار تجمعی پروتئین داشته باشد (۲). بنابراین pH به عنوان پارامتری کلیدی و تعیین کننده در میزان تجمع های پروتئینی مطرح می باشد. از نظر تئوری پایداری پروتئین در pI به علت به حداقل رسیدن دافعه الکتریکی کاهش می یابد ولی نتایج اخیر پیشنهاد می کنند، در اطراف pI هنوز میان کنش های قابل توجهی بین پروتئینی ها می تواند وجود داشته باشد (۱۱)، و به طور معمول بسیاری از پروتئین ها در pH هایی کمتر از pI خود مجتمع می شوند که در مورد آلبومین سرم گاوی نیز همین طور است. در pI آلبومین سرم گاوی (۴/۷)، نتایج حاصل از تست کنگورد کم ترین میزان تجمعات آمیلولیدی را نشان می دهد، لذا به نظر می رسد در pI هنوز میان کنش های فراوانی در ساختار پروتئین موجود باشد. در pH های خیلی پائین، مثل pH=۳ در مورد آلبومین سرم گاوی، پروتئین ها به شدت باردارند و این چگالی بار بر روی سطح پروتئین، اثر قابل توجهی بر افزایش میزان میان کنش های دافعه ای و نیز بین مولکولی داشته که منجر به القای تشکیل تجمع های آمیلولیدی می گردد. تجمع های آمیلولیدی در pH=۷/۴ نیز از میزان بالایی برخوردار بوده که دلیل آن را می توان به همین اثرهای چندگانه pH بر روی پروتئین و یا محیط در برگیرنده آن نسبت داد. البته نقش دما را در این pH بایستی بیش تر مد نظر داشت زیرا برای تشکیل تجمع های آمیلولیدی، دماهای بالاتری نسبت به pH=۳ مورد نیاز است. این مطلب مبین ناکافی بودن pH های بالاتر برای تشکیل تجمع های آمیلولیدی و یا حداقل توانایی کم تر فاکتور pH به تنهایی در این فرایند است. البته این میزان بالای تغییر مکان قرمز در نتایج تست کنگورد را نمی توان تنها به دما نسبت داد و بایستی به عوامل دیگر مثل ساختار پروتئینی نیز توجه داشت. از این رو حتی در دما و pH فیزیولوژیک نیز تشکیل تجمع های

بر میلی لیتر از پروتئین BSA و در pH بافر برابر ۳ و پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد می باشد. در این تحقیق مشاهده شد که انکوباسیون ساده در pH فیزیولوژیک و دماهای بالا برای القای تجمع ها کافی است. این مشاهده با روش اسپکتروسکوپی کنگورد و میکروسکوپ الکترونی گذاره مورد تأیید قرار گرفت که تأییدی بر توانایی ذاتی آلبومین سرم گاوی برای تشکیل تجمع ها آمیلوئیدی می باشد. در دمای فیزیولوژیک نیز با توجه به پیوند های زیادی که ساختار پروتئین را پایدار می کنند، امکان تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی کم تر می شود ولی در همین شرایط نیز که هم زمان در شرایط معمولی از نظر pH است، غلظت پروتئین به عنوان یک عامل سینتیکی موثر در تشکیل تجمع ها، نقش موثر خود را ایفا می کند. به نظر می رسد بیش تر تجمع ها نیز که در این شرایط نسبتا پایدار ایجاد می شوند، ساختارهایی هستند که با شکل طبیعی پروتئین در تعامل بوده و میزان پایه ای از تجمع ها را به طور همیشگی در محیط به وجود می آورند. به عنوان نتیجه کلی اینکه از روش ساده جذب سنجی کنگورد می توان به عنوان آزمایش اولیه برای تأیید حضور نانو رشته های پروتئینی استفاده نمود و در این راستا، میزان جذب در طول موج ماکزیمم به عنوان یک شاخص موثق معرفی می شود.

سپاسگزاری:

از کلیه همکاران و دوستانی که در انجام این پژوهش همکاری و زحمت کشیدند، تشکر و سپاسگزاری می گردد.

منابع

- 1.Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv pro chem*, 1994; 45:153-204
- 2.Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm res*, 2003; 20:1325-1336
- 3.Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*, 2006; 75:333-366
- 4.Chiti F, Webster P, Taddei N, Clark A, Stefani M, Ramponi G, Dobson CM. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Pro Nat Acad Sci U S A*, 1999; 96:3590
- 5.Collins SR, Douglass A, Vale RD. Weissman JS, Mechanism of prion propagation: amyloid growth occurs by monomer addition. *PLoS Biol*, 2004; 2:e321
- 6.Dobson CM. Protein aggregation and its consequences for human disease. *Pro Pept Lett*, 2006;13:219-227
- 7.Fändrich M. On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cellular and molecular life sci*, 2007; 64:2066-2078
- 8.Figge J, Rossing T, Fencel V. The role of serum proteins in acid-base equilibria. *J lab clin med*, 1991; 117:453
- 9.Finke JM, Roy M, Zimm BH, Jennings P. Aggregation events occur prior to stable intermediate formation during refolding of interleukin 1. *Biochem*, 2000; 39:575-583
- 10.Georgiou G, Valax P, Ostermeier M, Horowitz PM. Folding and aggregation of TEM beta-lactamase: analogies with the formation of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Prot sci Prot Soc*, 1994; 3:1953
- 11.Giger K, Vanam RP, Seyrek E, Dubin PL. Suppression of insulin aggregation by heparin. *Biomacromolecules*, 2008; 9:2338-2344
- 12.Gsponer J, Vendruscolo M. Theoretical approaches to protein aggregation. *Prot pep let*, 2006; 13:287-293
- 13.Hamada D, Yanagihara I, Tsumoto K. Engineering amyloidogenicity towards the development of nanofibrillar materials. *Trends Biotechnol*, 2004; 22:93-97
- 14.Holm NK, Jespersen SK, Thomassen LV, Wolff TY, Sehgal P, Thomsen LA, Christiansen G, Andersen CB, Knudsen AD, Otzen DE. Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin. (BBA) *Proteins Proteom*, 2007; 1774:1128-1138
- 15.Jeyashekar NS, Sadana A, Vo-Dinh T. Protein amyloidose misfolding: mechanisms, detection, and pathological implications. *Methods Mol Biol*, 2005; 300:417-435
- 16.Khurana R, Uversky VN, Nielsen L, Fink AL. Is Congo red an amyloid-specific dye?. *J Biol Chem*, 2001; 276:22715
- 17.Kuznetsov A, Ebert B, Lassmann G, Shapiro A. Adsorption of small molecules to bovine serum albumin studied by the spin-probe method. (BBA)-*Protein Structure*, 1975; 379:139-146
- 18.Li J, Uversky VN, Fink AL. Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochem*, 2001; 40:11604-11613
- 19.Lomakin A, Teplow DB, Kirschner DA, Benedek GB. Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid

- beta-protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94:7942-7947
20. Macchioni A, Ciancaleoni G, Zuccaccia C, Zuccaccia D. Determining accurate molecular sizes in solution through NMR diffusion spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* 2007; 37:479-489
21. Modler AJ, Gast K, Lutsch G, Damaschun G. Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers--a novel pathway of amyloid formation. *J Mol Biol*, 2003; 325:135-148
22. Ohnishi S, Takano K. Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding. *Cell Mol Life Sci*, 2004; 61:511-524
23. Platt GW, Routledge KE, Homans SW, Radford SE. Fibril growth kinetics reveal a region of beta2-microglobulin important for nucleation and elongation of aggregation. *J Mol Biol*, 2008; 378:251-263
24. Poole S, West S, Fry J. Effects of basic proteins on the denaturation and heat-gelation of acidic proteins. *Food Hydrocolloids*, 1987; 1:301-316
25. Richardson JS, The anatomy and taxonomy of protein structure; 1981
26. Rüegg M, Moor U, Blanc . A calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate. *J Dairy Res*, 1977; 44:509-520
27. Scheibel T, Bloom J, Lindquist SL. The elongation of yeast prion fibers involves separable steps of association and conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; 101:2287-2292
28. Scheibel T, Parthasarathy R, Sawicki G, Lin XM, Jaeger H, Lindquist SL. Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100:4527-4532
29. Speed MA, King J, Wang DIC. Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation. *Biotechnol bioeng*, 1997; 54:333-343
30. Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med*, 2003; 81:678-699
31. Stefani, M. and Rigacci, S. Protein folding and aggregation into amyloid: the interference by natural phenolic compounds. *Int j mol sci* 2013; 14: 12411-12457.
32. Stoll VS, Blanchard JS. [4] Buffers: Principles and practice. *Method enzymol*, 1990; 182:24-38
33. Teschke CM. Aggregation and assembly of phage P22 temperature-sensitive coat protein mutants in vitro mimic the in vivo phenotype. *Biochem*, 1999; 38:2873-2881
34. Vermeer AWP, Norde W. The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys J*, 2000; 78:394-404
35. Wang W, Nema S, Teagarden D. Protein aggregation-Pathways and influencing factors. *Int j pharm*, 2010; 390:89-99
36. Wu, C., Scott, J. and Shea, J.-E. Binding of Congo Red to Amyloid Protofibrils of the Alzheimer A β 9–40 Peptide Probed by Molecular Dynamics Simulations. *Biophys j* 2012; 103: 550-557.

