

The Inhibitory Effects of Cuminaldehyde on Amyloid Fibrillation and Cytotoxicity of Alpha-synuclein

Dina Morshedi^{1*}, Farhang Aliakbari²

1- Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

2- M.Sc., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1417863171, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
Email: morshedi@nigeb.ac.ir

Received: 10/Jan/2012, Accepted: 12/Apr/2012

Abstract

Objective: Alpha-synuclein is a major component of protein plaques in synucleinopathies, particularly Parkinson's disease. The purpose of this study is to assess the inhibitory effects of cuminaldehyde on the fibrillation of alpha-synuclein.

Methods: Alpha-synuclein was expressed in *Escherichia coli* and subsequently purified. For the process of fibrillation, purified protein was incubated at 37°C and pH 7.2. Fibrillation was analyzed by the standard fibril methods. The effects of different concentrations of cuminaldehyde (20-500 µM) on alpha-synuclein fibrillation were studied by assessment of the cytotoxic effects of samples on the neuroblastoma cell line, SK-N-MC. To study the protein aggregation forms that were generated in the presence of cuminaldehyde, SDS resistance and induced fibrillation (seeding) methods were employed. For studying its specificity on alpha-synuclein, the effect of cuminaldehyde on lysozyme fibrillation was also examined.

Results: We showed, for the first time, that cuminaldehyde inhibited fibrillation by more than 80%. The highest inhibition was observed at the ratio of 5-15 moles of drug to protein. The viability of the treated cells with inhibited proteins was more than 90%, whereas non-inhibited samples caused a decrease in viability by 50%. Inhibited samples were not resistant to SDS and they were unable to induce fibrillation. Cuminaldehyde did not inhibit lysozyme fibrillation.

Conclusion: Cuminaldehyde inhibited fibrillation of alpha-synuclein which was accompanied by small amorphous aggregated particles of alpha synuclein. The inhibited protein samples did not induce aggregation. Thus, cuminaldehyde can be considered as a candidate to inhibit the formation of alpha-synuclein plaques.

Keywords: Alpha-synuclein, Cuminaldehyde, Fibril inhibitor, Parkinson's

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 1, Spring 2012, Pages: 45-60

اثر مهاری کومین آلدئید بر فیبریل‌های آمیلوئیدی و سمیت سلولی آلفا سینوکلئین

دینا مرشدی^{۱*}، فرهنگ علی‌اکبری^۲

۱- استادیار، پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۲- کارشناس ارشد، پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۸۶۳۱۷۱، پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

Email: morshedi@nigeb.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۱/۲۳

دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۲۰

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه، مهار فیبریل‌های پروتئین آلفا سینوکلئین در حضور کومین آلدئید است. آلفا سینوکلئین جزء اصلی در پلاک‌های پروتئینی در بیماری‌های موسوم به سینوکلئینوپاتی به‌ویژه پارکینسون است. **مواد و روش‌ها:** آلفا سینوکلئین در اشرفیا کلی بیان و خالص شد. برای فیبریل‌سازی، پروتئین خالص شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH: ۷/۲ گرم‌گذاری شد. با روش‌های استاندارد سنجش، تشکیل فیبریل‌ها بررسی شد. تأثیر غلظت‌های مختلف از کومین آلدئید (۲۰ تا ۵۰۰ میکرومولار) بر فیبریل‌سازی پروتئین مطالعه و اثر سمیت سلولی نمونه‌های تیمار شده و کنترل روی کشت سلول‌های دودمانی نوروبلاستوما SK-N-MC با روش‌های استاندارد بررسی شد. برای مطالعه فرم پروتئینی تشکیل شده در حضور دارو از آزمون مقاومت به سدیم دودسیل سولفات و قدرت القای فیبریل‌سازی استفاده شد. همچنین اثر دارو بر فیبریل‌سازی پروتئین لیزوزیم برای مطالعه ویژگی عملکرد دارو بررسی شد. **نتایج:** برای اولین بار مشاهده شد که کومین آلدئید می‌تواند فیبریل‌سازی را در پروتئین آلفا سینوکلئین تا بیش از ۸۰ درصد مهار نماید. در نسبت مولی ۵ تا ۱۵ از دارو به پروتئین، بیشترین مهار مشاهده شد. سلول‌های تیمار شده با نمونه‌های پروتئینی مهار شده با دارو تا ۹۰ درصد بقای سلولی داشتند در حالی که تیمار با نمونه‌های کنترل فیبریلی موجب مرگ سلولی تا بیش از ۵۰ درصد شد. نمونه‌های مهار شده نسبت به سدیم دودسیل سولفات مقاوم نبوده و قدرت بالایی برای القای فیبریل‌سازی نداشتند. کومین آلدئید تأثیری در روند فیبریل‌سازی لیزوزیم نداشت. **نتیجه‌گیری:** کومین آلدئید موجب مهار فیبریل‌سازی آلفا سینوکلئین شد که همراه با تشکیل تجمعات کوچک بی‌شکلی بود و این نمونه‌های مهار شده موجب القای تجمع نمی‌شد و این ترکیب می‌تواند به‌عنوان کاندیدی در مهار تولید پلاک‌های آلفا سینوکلئینی مطرح شود.

کلیدواژگان: آلفا سینوکلئین، پارکینسون، کومین آلدئید، مهارکننده فیبریل‌سازی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات: ۴۵-۶۰

مقدمه

واسطه‌های آن‌ها می‌تواند عامل اصلی برخی از بیماری‌های

تحلیل برنده سیستم عصبی (Neurodegenerative Diseases)

از جمله بیماری‌های آلزایمر (Alzheimer's Disease)،

مطالعات ثابت نموده است که تشکیل فرم‌های تجمع یافته

پروتئینی به‌ویژه تجمعات معروف به فیبریل‌های آمیلوئیدی و حد

مهار فیبریل کومین آلدئید

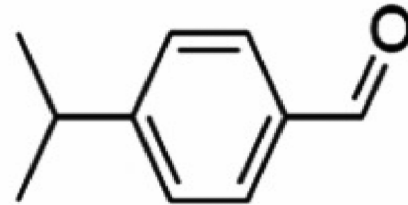
تاکنون روش درمانی موفقی برای حذف آسیب‌های مغزی ناشی از تجمعات آلفا سینوکلئین در پارکینسون و سایر بیماری‌های سینوکلئینوپاتی ارائه نشده است [۱۸]. یکی از بزرگ‌ترین اهداف در درمان این نوع بیماری‌ها مهار تشکیل تجمعات و حذف فرم‌های تجمع‌یافته آلفا سینوکلئین است. از روش‌های مورد توجه استفاده از ترکیباتی است که با اتصال ویژه و مؤثر به پروتئین می‌تواند مانع از تجمع‌یافتگی آن شود. این ترکیبات می‌توانند هم در روشن‌تر شدن مکانیزم تجمعات بسیار مؤثر بوده و هم به‌عنوان کاندیدی برای درمان بیماری‌های وابسته به پروتئین مطرح باشند. تاکنون تنها چند ترکیب شیمیایی و آنتی‌بیوتیک معرفی شده است که می‌تواند موجب مهار فیبریل‌اسیون در آلفا سینوکلئین شود از جمله فتالوسیانین تتراسولفونات (Phthalocyanine Tetrasulfonates) [۱۹] و پلی‌فنل‌هایی مانند اکسیفون (Exifone) و گوسپیتین (Gossypetin) [۱۶] یا ترکیبی مانند سلژیلین (Selegiline) که علاوه بر مهار منوآمین اکسیداز می‌تواند با پروتئین آلفا سینوکلئین میان‌کنش داشته باشد [۱۸] که این امر با میان‌کنش با فرم‌های حد واسط یا منومری مانع تشکیل حد واسط‌هایی با سمیت بالای سلولی می‌شود.

در مطالعه حاضر برای اولین بار اثر ترکیب بنز آلدئیدی (4-Isopropylbenzaldehyde) موسوم به کومین آلدئید (Cuminaldehyde) (شکل ۱) بر روند فیبریل‌اسیون آلفا سینوکلئین بررسی شد. کومین آلدئید یک ترکیب طبیعی در برخی از قدیمی‌ترین اسانس‌ها است که در طب سنتی و صنایع غذایی و آرایشی مصرف می‌شود. در مطالعات سلولی مشاهده شد حضور این ترکیب در غلظت‌های میکرومولار اثرکشنده‌گی بر سلول‌ها ندارد [۲۰]. در غلظت‌های بالاتر مانند بسیاری از ترکیبات فعال در اسانس‌ها و خود اسانس‌های گیاهی می‌تواند اثر بالای ضد باکتری، ضد قارچی، ضد ویروس و ضد سرطان داشته باشد [۲۱، ۲۲]. با توجه به ویژگی ترکیبات آروماتیک، این ترکیبات با استفاده از روش‌های مناسب انتقالی می‌تواند از سد خونی-مغزی عبور نمایند و با داشتن عوارضی کمتر

هانگینگیتون (Huntington's Disease) و پارکینسون (Parkinson's Disease) باشد [۱-۳]. در این گونه بیماری‌ها تجمعات وسیعی از جنس پروتئین به‌صورت گسترده در خارج و داخل سلول‌ها تشکیل می‌شود که پلاک‌های پروتئینی خوانده می‌شود و در آن‌ها ساختار پروتئین‌ها به شکل ساختارهای منظم از نوع صفحات بتای گسترده تغییر می‌یابد که با ساختار طبیعی آن‌ها متفاوت است [۴]. یکی از پرسش‌های اصلی در زمینه بیماری‌های آمیلوئیدی این است که چگونه یک تعداد معدودی از پروتئین‌ها به سمت تشکیل فیبریل می‌روند و آیا می‌توان از تشکیل این تجمعات جلوگیری نمود؟

آلفا سینوکلئین (Alpha Synuclein) پروتئینی است که با تشکیل پلاک‌های پروتئینی موسوم به لویی‌بادی (Lewy Body) و لویی‌نوریت (Lewy Neurite) در بیماری‌های معروف به سینوکلئینوپاتی (Synucleinopathies) از جمله پارکینسون به‌عنوان عامل اصلی آسیب‌های سلولی و زوال بافت مغزی محسوب می‌شود [۵-۷]. تغییرات ژنتیکی مانند جایگزینی آلانین در موقعیت ۳۰ و ۵۳ به ترتیب با پرولین و ترئونین یا چندتایی شدن ژن آلفا سینوکلئین منجر به پارکینسون زودرس و شدید می‌شود [۸]. آلفا سینوکلئین پروتئینی با ۱۴۰ اسید آمینه است و در گروه پروتئین‌های با ساختار نامنظم یا بی‌شکل قرار دارد [۹، ۱۰]. این پروتئین از نظر ویژگی‌های ساختاری و اسید آمینه‌ای به سه بخش تقسیم می‌شود؛ بخش انته‌ای آمینی که شامل توالی تکرار شونده‌ای بوده که می‌تواند در مجاورت غشا یا برخی پروتئین‌ها ساختار ماریپچ آلفا بگیرد [۱۱، ۱۲]، بخش میانی که کاملاً آب‌گریز بوده و نقش اصلی را در آغاز فرایند تجمع‌یافتگی پروتئین بازی می‌نماید [۱۳] و بخش انته‌ای کربوکسی پروتئین که اسیدی بوده و نقش محافظتی در مقابل تجمعات را بازی می‌کند [۱۴]. عملکرد دقیق این پروتئین کاملاً شناخته شده نیست اما مشاهدات متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد حضور این پروتئین در نقل و انتقالات پیام‌رسان‌های عصبی و همچنین پایداری ساختار وزیکول‌ها ضروری است [۱۵-۱۷].

کاندیدهای مناسبی به عنوان دارو محسوب شود.



شکل ۱ ساختار شیمیایی کومین آلدئید

(DMSO) از شرکت Merck (آلمان)، محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) از شرکت Gibco (آمریکا)، سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) و همچنین آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (Streptomycin) و پنی‌سیلین (Penicillin) از شرکت بیوسرا (Biosera) انگلستان، پلیت‌های کشت و فلاسک‌ها از شرکت‌های اورنج بلژیک (Orange) و نانک آمریکا (Nunc) تهیه شد. کیت سنجش لاکتات دهیدروژناز از شرکت زیست شیمی (ایران) تهیه شد.

جداسازی و خالص‌سازی پروتئین آلفا سینوکلئین

پلاسمید بیانی pNIC28-Bsa4 حاوی cDNA ژن آلفا سینوکلئین انسانی با کدون‌های قابل بیان در باکتری از دانشگاه استنفورد آمریکا اهدا شده بود. خالص‌سازی پروتئین که در اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) بیان شده بود مطابق روش هوانگ (Huang) و همکاران [۲۳] انجام شد و شامل سه مرحله خالص‌سازی شوک اسمزی، کروماتوگرافی تعویض آنیونی و کروماتوگرافی تمایلی بود.

با توجه به مطالعات انجام شده آلفا سینوکلئین به صورت طبیعی به بخش پری‌پلاسم باکتری منتقل می‌شود [۲۴]. به همین دلیل برای خالص‌سازی در مرحله نخست از سیستم شوک اسمزی استفاده شد. رسوب سلولی حاصل از یک لیتر کشت شبانه در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر شوک اسمزی حاوی ۳۰ میلی‌مولار تریس، ۲ میلی‌مولار EDTA (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید) و ۴۰ درصد سوکروز تعلیق مجدد شد و در دمای اتاق انکوبه شد. رسوب‌دهی با سرعت ۱۰۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه و سپس معلق کردن رسوب در آب صفر درجه با اضافه نمودن کلرید منیزیم ($MgCl_2$) اشباع به میزان ۳۷ میکرولیتر در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر آب انجام شد. سانتریفوژ مجدد با سرعت ۱۰۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت و سوپ رویی حاصل از سانتریفوژ آماده مرحله بعدی خالص‌سازی کروماتوگرافی تعویض آنیونی شد. با توجه به

در مطالعه حاضر تأثیر ترکیب کومین آلدئید بر روند فیبریلاسیون آلفا سینوکلئین با استفاده از روش‌های استاندارد رهگیری فرایند فیبریلاسیون از جمله تغییرات نشر فلورسانس تیوفلاوین T (Thioflavin T)، تغییرات جذب رنگ کنگو رد (Congo Red) و تصاویر میکروسکوپی بررسی شد. آزمایش‌ها ثابت نمود که کومین آلدئید مهار کننده تشکیل فیبریل‌های پروتئینی است که مهار کنندگی آن وابسته به غلظت دارو است. همچنین در مقایسه با اثر دهی آن بر فیبریلاسیون یک پروتئین دیگر مشخص شد که احتمالاً اثر مهار کنندگی آن برای آلفا سینوکلئین ویژه است. همچنین اثر دارو و تجمعات پروتئینی روی سلول بررسی شد. وضعیت پایداری سلول‌ها با کشت رده سلولی SK-NMC در حضور پروتئین تجمع‌یافته و فرم مهار شده پروتئین در حضور کومین آلدئید با آزمون‌های رایج بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد نیاز

تیوفلاوین T یا ThT، کنگو رد، دی متیل دیازول دیفنیل تترازولیوم یا MTT (4,5-(dimethylthiazol-2-yl)-2,5-thiazolmethylDi3-(4,5-))، سدیم آزید، کوکتل مهار کننده پروتئینازو کیسه دیالیز از شرکت Sigma (آمریکا) تهیه شد. گلاسیسین، دی متیل سولفوکسید (Dimethyl Sulfoxide):

DMSO تهیه و سپس غلظت کومین آلدئید در نمونه‌های پروتئینی به ۲۰-۵۰۰ میکرومولار رسانده شد. غلظت نهایی DMSO در نمونه‌ها ۴ درصد و در محیط کشت ۰/۴ درصد بود که در روند واکنش‌ها تأثیری نداشت.

روش‌های مطالعه فیبریل‌های آمیلوئیدی

- سنجش برانگیختگی فلورسانس ThT

به منظور بررسی تشکیل فیبریل‌های آلفا سینوکلئین در محلول گرماگذاری باید از نشر فلورسانس ThT استفاده شود. ۹۹۰ میکرولیتر محلول ThT به غلظت ۱۰ میکرومولار با ۱۰ میکرولیتر نمونه پروتئینی به مدت ۳ دقیقه گرماگذاری شد. با برانگیختگی نمونه در طول موج ۴۴۰ نانومتر نشر فلورسانس در طیف ۴۵۰ تا ۵۵۰ نانومتر قرائت شد [۲۶].

- جذب نوری کنگو رد

برای ارزیابی تشکیل یا عدم تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی یا شبه آمیلوئیدی از محلول تازه تهیه شده کنگو رد که با استفاده از سرنگ فیلتر شده بود، استفاده شد. بدین منظور طیف جذب نوری کنگو رد در فاصله ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر در غیاب یا حضور نمونه پروتئینی اندازه‌گیری و تفاضل میان دو طیف جذبی پیش و پس از افزودن پروتئین بررسی شد. افزایش جذب نوری کنگو رد و انتقال به قرمز آن و به‌ویژه مشاهده بیشترین تفاوت در ۵۳۰-۵۴۰ نانومتر به‌عنوان یکی از معیارهای تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی استفاده شد [۲۶].

- تصویربرداری میکروسکوپ فلورسانس

یکی دیگر از معیارهای تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی مشاهده فیبرهای مستقیم، طولانی و فاقد شاخه با قطر تقریبی ۴-۱۲ نانومتر در تصاویر میکروسکوپی است [۲۷]. در پژوهش حاضر از روش مشاهده تصاویر میکروسکوپ فلورسانس استفاده شد [۲۸]، به این منظور ۱۵ میکرولیتر از نمونه پروتئینی به

نقطه ایزو الکتریک (pI) آلفا سینوکلئین (حدود ۴/۷) از کیو سفارز (Q sepharose) با جریان سریع (Fast Flow) استفاده شد. با سرعت خطی ۳۰۰ سانتی‌متر در ساعت با توجه به ظرفیت ۲۰ میلی‌گرم برای هر میلی‌لیتر رزین براساس چگالی جذبی در طول موج ۲۸۰ نانومتر انتخاب شد و گرادیان نمکی از کلرید سدیم با غلظت صفر تا ۴۰۰ میلی‌مولار در بافر تریس ۳۰ میلی‌مولار برای جداسازی استفاده شد. سپس مرحله کروماتوگرافی تمایلی با ستون پر شده با بستر نیکل انجام گرفت و با گرادیان ۱۰ تا ۲۰۰ میلی‌مولار از ایمیدازل (Imidazole)، نمونه از ستون جدا شد. بافر حاوی ۳۰ میلی‌مولار از تریس و ۳۰۰ میلی‌مولار از نمک بود. نمونه‌های جدا شده در هر مرحله با الکتروفورز صفحه‌ای پلی‌اکریل‌امید حاوی سدیم دودسیل سولفات (Sodium Dodecyl Sulfate) (Polyacrylamide Gel Electrophoresis: SDS-PAGE) بررسی و نمونه خالص با بافر بی‌کربنات آمونیوم دیالیز شد.

تعیین غلظت پروتئین

با فرض خالص بودن نمونه پروتئینی به‌کار گرفته شده در مطالعه حاضر، سنجش غلظت پروتئین همه جا براساس جذب ۲۸۰ نانومتر محلول حاوی پروتئین در مقایسه با حلال به‌کار گرفته شده انجام شد. ضریب جذب ویژه آلفا سینوکلئین ۵۶۰۰ بر مول در مسیر یک سانتی‌متری در نظر گرفته شد [۲۵].

روش القای ساختار فیبریلی در پروتئین و تیمار

با دارو

پروتئین به میزان ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر ۳۰ میلی‌مولار تریس به همراه ۸۰ میلی‌مولار نمک با pH=۷/۲ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، به گونه‌ای که در تمام مدت با استفاده از آهن‌ربای میله‌ای ریز تغلونی محلول با سرعت ثابت هم زده شد. برای بررسی اثر کومین آلدئید بر تشکیل ساختارهای فیبریلی ابتدا یک نمونه غلیظ از دارو در

۱۵ میکرولیتر از محلول ۱۵ میکرومولار ThT اضافه و به مدت ۵ دقیقه انکوبه و سپس با میکروسکوپ فلورسانس مطالعه شد.

کشت سلولی

- کشت و تیمار رده سلولی SK-N-MC

در این پروژه از رده سلولی SK-N-MC که از سلول‌های نوروبلاستوما (Humane Neuronal Epithelium Zell-) است، استفاده شد. این رده سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. 3×10^4 سلول در هر چاهک در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای در محیط RPMI ۱۶۴۰ با FBS به میزان ۱۰ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۹۰ درصد و ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت انکوبه‌گذاری با ۱۰ درصد حجم دارو تیمار شدند.

- بررسی بقای سلولی

آزمون MTT با اندازه‌گیری میزان جذب نمک تترازولیوم [۲۹] انجام شد. برای تهیه محلول ذخیره MTT، ۵ میلی‌گرم از این ترکیب در یک میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات حل شد. سلول‌ها در ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای کشت و با غلظت‌های متفاوت دارو به صورت سه‌گانه تیمار شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. چهار ساعت قبل از سنجش، مقدار ۱۰ میکرولیتر از MTT به سلول‌ها اضافه و واکنش با اضافه کردن DMSO متوقف شد. چون این محلول باعث حل شدن رسوب فورمازان (Formazan) بنفش رنگ در سلول‌های سالم می‌شود، بنابراین میزان جذب توسط دستگاه سنجش الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای بررسی میزان تولید آنزیم لاکتات دهیدروژناز از کیت LDH-P LS (ZiestChem Diagnostics Tehran, Iran) طبق دستورالعمل کیت استفاده شد و نتایج از رابطه زیر به دست آمد:

$$LDH (U/L) = \Delta A / \min \times 16030$$

$\Delta A / \min$: تغییرات جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر در دقیقه

- ارزیابی ریخت‌شناختی سلولی

سلول‌های تحت تیمار با دارو و کنترل از نظر شکل ظاهری توسط میکروسکوپ فازکنتراست نیز مطالعه شدند.

- تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد. بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶/۰ به روش تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه (Student's t-test) و مقایسه میانگین به روش LSD (Least Significant Difference) و دانکن (Duncan) صورت پذیرفت و مقدار P value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

القای تجمعات فیبریلی در آلفا سینوکلئین و

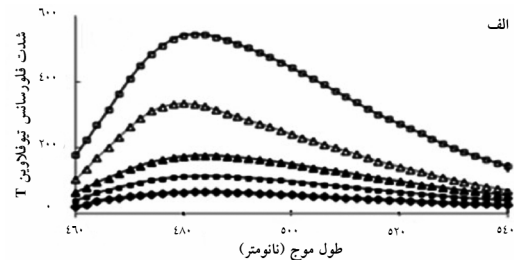
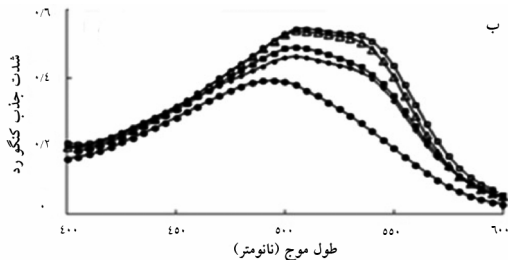
تعیین شاخصه‌های فیبریلایسیون

پروتئین نوترکیب آلفا سینوکلئین تخلیص شده با غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مطابق روش ذکر شده در بخش روش‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با چرخش ثابت با آهنربای کوچک و شرایط استریل انکوبه شد. از محلول پروتئینی در زمان‌های مختلف گرماگذاری، نمونه‌برداری شد. برای رهگیری فرآیند فیبریلایسیون در نمونه از سنجش نشر فلورسانس ThT که به صورت ویژه به فرم‌های فیبریلی متصل می‌شود، استفاده شد. افزودن نمونه پروتئینی گرماگذاری شده به محلول ThT نشان از افزایش نشر فلورسانس با بیشینه‌ای در ۴۸۰ نانومتر داد که با افزایش زمان گرماگذاری پروتئین شدت آن بیشتر شد و یکی از نشانه‌های شکل‌گیری ساختارهای فیبریلی از نوع صفحات بتا است. نمودار ۱ الف تغییرات نشر فلورسانس ThT در حضور نمونه‌های پروتئینی گرماگذاری شده در زمان‌های صفر تا ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد. روند تغییرات جذب و انتقال بیشینه جذب به سمت راست (Red Shifting) در رنگ کنگو رد نشانه دیگر تشکیل تجمعات فیبریلی آلفا

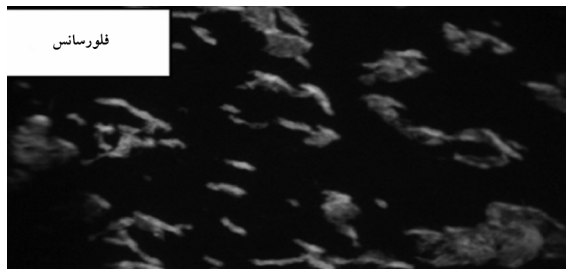
مهار فیبریل کومین آلدئید

تا ۲۰ نانومتر تغییر نموده است که از ویژگی‌های اتصال کنگو رد به ساختارهای فیبریلی است.

سینوکلئین است، چنانچه در نمودار ۱ ب نشان داده شده است علاوه بر افزایش جذب، شدت جذب بیشینه به سمت راست



نمودار ۱ الف) طیف نشر فلورسانس ThT، ب) طیف جذبی کنگو رد پس از اضافه کردن نمونه سینوکلئین که در زمان‌های صفر (●)، ۸ (◆)، ۱۰ (■)، ۲۰ (Δ) و ۲۴ ساعت (□) در $\text{pH} = 7/2$ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۳ میلی‌گرم گرماگذاری شده بود.



شکل ۲ تصاویر میکروسکوپ فلورسانس و نوری نمونه آلفا سینوکلئین گرماگذاری شده به مدت ۲۴ ساعت در $\text{pH} = 7/2$ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۳ میلی‌گرم، بزرگنمایی: تصاویر ۲۰ برابر

پروتئین آلفا سینوکلئین شود. غلظت‌های ۲۰ تا ۵۰۰ میکرومولار از کومین آلدئید مطابق روش ذکر شده در بخش روش‌ها تهیه شد. با اضافه کردن کومین آلدئید به نمونه پروتئینی تغییرات نشر فلورسانس ThT نمونه‌های گرماگذاری شده در ۲۴ ساعت در حضور غلظت‌های ۱۰ تا ۵۰۰ میکرومولار از کومین آلدئید بررسی شد. در نمودار ۲ الف تغییرات طیف جذبی نشر فلورسانس ThT نشان داده شده است که هیچ تغییر طول موجی در بیشینه نشر مشاهده نمی‌شود، بنابراین تغییرات نشر در طول موج ۴۸۰ نانومتر با برانگیختگی نمونه‌ها در طول موج ۴۴۰ نانومتر مقایسه شد. در نمودار ۲ ب تغییرات نشر فلورسانس ThT در ۴۸۰ نانومتر که بیشینه نشر است نشان داده شده است. حضور کومین آلدئید موجب کاهش شدید در نشر فلورسانس ThT می‌شود که می‌تواند نشانه‌ای از تشکیل نشدن

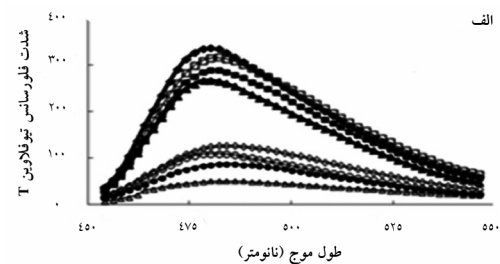
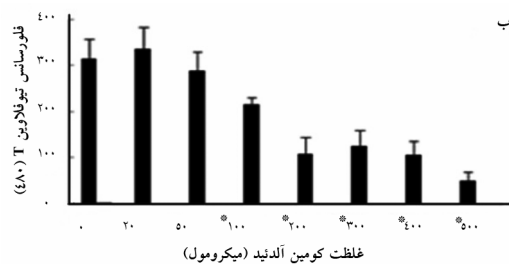
تصاویر میکروسکوپ فلورسانس نیز چنانچه در شکل ۲ مشخص است، نشان دهنده تشکیل ساختارهای گسترده فیبریلی از پروتئین است که دارای نشر فلورسانس است. فیبریل‌های آمیلوئیدی به دلیل داشتن ساختارهای منظم در نور مرئی تقریباً شفاف بوده و به سختی مشاهده می‌شود. چنانچه در شکل نشان داده شده نمونه‌ها در نور مرئی کمتر قابل مشاهده است.

بررسی مهار فیبریل‌اسیون پروتئین آلفا سینوکلئین در حضور کومین آلدئید

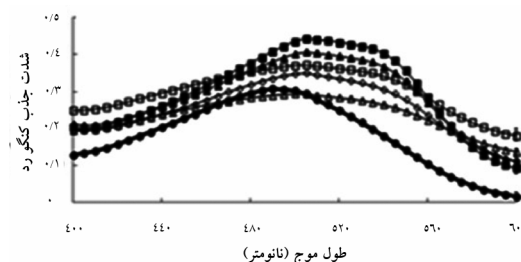
بررسی‌های انجام شده نشان داد که حضور کومین آلدئید می‌تواند با اثردهی بالایی موجب مهار فرآیند فیبریل‌اسیون در

کومین آلدئید در نمودار ۳ نشان داده شده است که روند تغییرات تقریباً مشابه تغییرات نشر فلورسانس ThT بود. با توجه به شکل شدت جذب و همچنین انتقال بیشینه جذب بسیار کمتر از نمونه کنترل و با شیب کمتری همراه است که می‌تواند نشانه‌ای از تشکیل ذرات تجمع‌ی نامنظم (Amorphous) باشد.

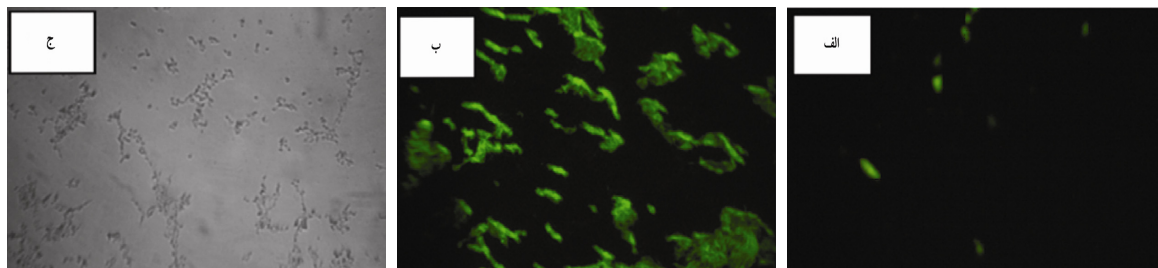
ساختارهای فیبریلی گسترده در پروتئین باشد. روند مهار دارو از غلظت ۱۰۰ میکرومولار رو به افزایش گذاشت و در غلظت ۴۰۰ و ۵۰۰ بیشترین میزان مهار تا حدود ۸۰-۸۵ درصد کاهش نشر مشاهده شد که تغییرات کاملاً معنی‌دار بود. تغییرات جذب کنگو رد در حضور نمونه‌های پروتئینی گرماگذاری شده در ۲۴ ساعت در حضور غلظت‌های ۲۰-۵۰۰ میکرومولار از



نمودار ۲ الف) تغییرات طیف نشری ThT، ب) نشر بیشینه در ۴۸۰ نانومتر در حضور سینوکلئین گرماگذاری شده به مدت ۲۴ ساعت در pH=7/2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت صفر (□)، ۲۰ (◇)، ۵۰ (■)، ۱۰۰ (▲)، ۲۰۰ (○)، ۳۰۰ (◊)، ۴۰۰ (●) و ۵۰۰ میکرومولار (Δ) از کومین آلدئید. * تغییرات معنی‌دار، P < 0/05



نمودار ۳ تغییرات طیف جذبی کنگو رد در حضور سینوکلئین گرماگذاری شده به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت صفر (■)، ۱۰۰ (▲)، ۲۰۰ (□)، ۳۰۰ (◊)، ۵۰۰ میکرومولار (Δ) از کومین آلدئید و طیف جذبی کنگو رد با بافر نمونه (●)

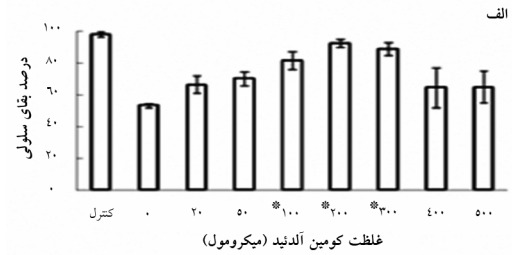
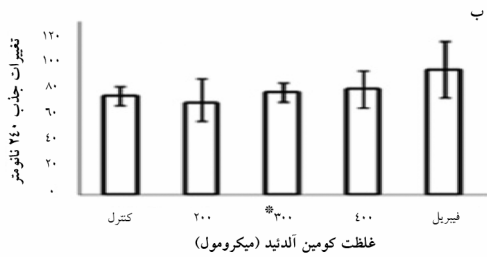


شکل ۳ تصاویر میکروسکوپ فلورسانس نمونه آلفا سینوکلئین گرماگذاری شده به مدت ۲۴ ساعت در pH=7/2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۳ میلی‌گرم در حضور ۳۰۰ میکرومولار از کومین آلدئید (الف) در مقایسه با تیمار نشده (ب) و در نور معمولی (ج)؛ بزرگنمایی تصاویر: ۲۰ برابر

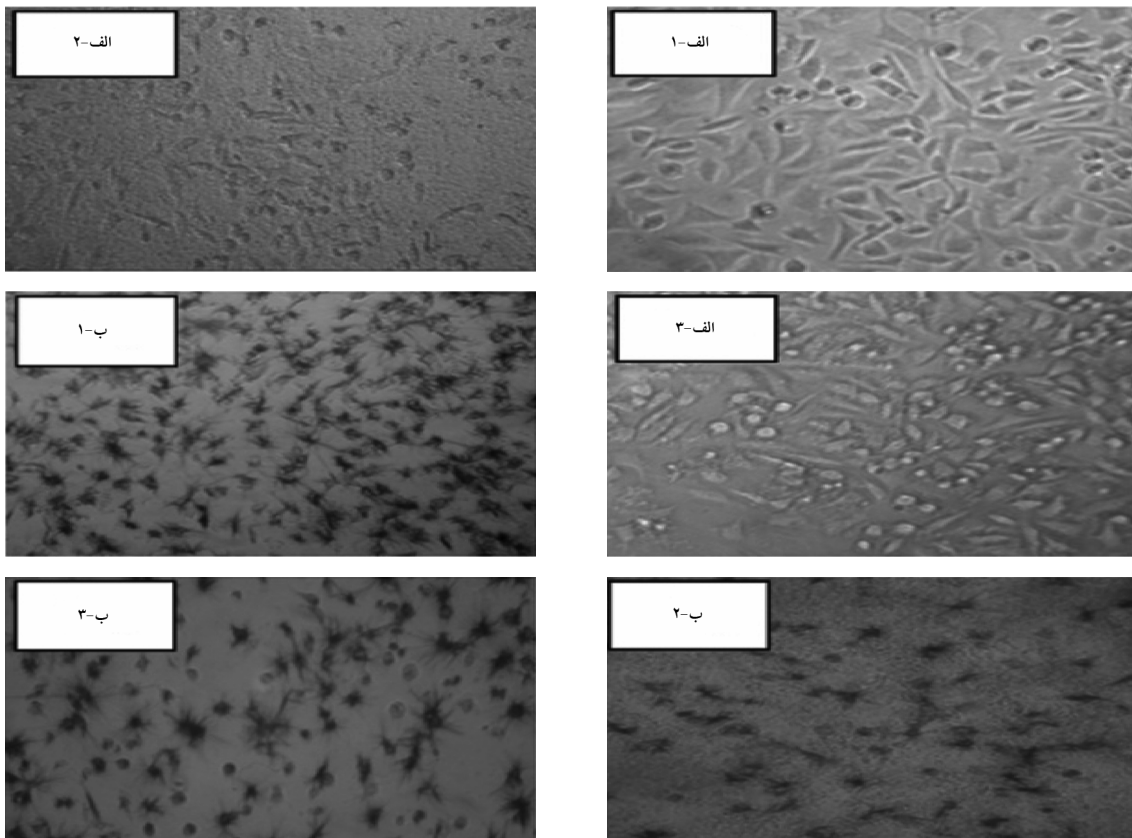
مهاری فیبریلی کومین آلدئید

تصاویر میکروسکوپی فلورسانس در شکل ۳ نشان داده شده است. نمونه‌ها در نور مرئی دارای تجمعات پراکنده تیره‌ای است که نشانه‌ای از تجمعات بی‌شکل است.

مطالعات میکروسکوپی تأیید نمود که حضور کومین آلدئید در نمونه پروتئینی موجب حذف تجمعات گسترده منظم فیبریلی و تشکیل تجمعات کوچک نامنظم در نمونه می‌شود.



نمودار ۴ (الف) آزمون MTT و (ب) لاکتات دهیدروژناز؛ سلول‌های SK-N-MC تیمار شده با ۵ درصد از نمونه ۲۴ ساعته آلفا سینوکلئین به تنهایی و به همراه غلظت‌های متفاوت از کومین آلدئید (میکرومولار) پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری. در نمونه کنترل نمونه صفر ساعته سینوکلئین به سلول افزوده شده است. * پایداری معنی‌دار و $P < 0/05$



شکل ۴ تصاویر میکروسکوپی سلول‌های SK-N-MC (الف) و تراکم بلورهای فورمازان (ب) در حضور گونه‌های فیبریلی شده (۲) و مهار شده با کومین آلدئید ۳۰۰ میکرومولار (۳)؛ به نمونه کنترل (۱) میزان معادل بافر اضافه شده است.

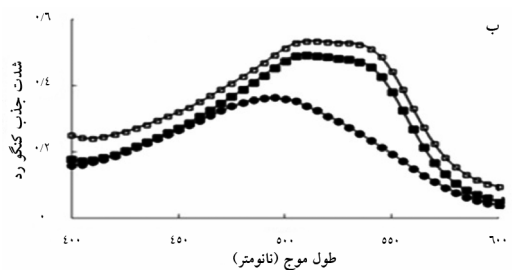
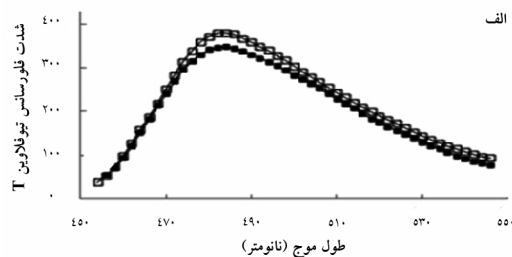
بررسی سمیت سلولی نمونه‌های فیبریلی پروتئین و نمونه‌های پروتئینی مهار شده در حضور کومین آلدئید

با توجه به این که اهمیت اصلی مطالعات انجام شده در زمینه مهار کنندگی، ممانعت از عمل سمیت سلولی تجمع‌های فیبریلی است، در ادامه نقش این ترکیب بر سمیت سلولی فیبریل‌های آمیلوئید بیان می‌شود. نمودار ۴ الف میزان زنده ماندن سلول‌های SK-N-MC در حضور آلفا سینوکلئین گرماگذاری شده به مدت ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد. در نمونه کنترل، محلول پروتئینی آلفا سینوکلئین تازه تهیه شده و منومری به محیط کشت سلول اضافه شد که سنجش MTT نشان داد تأثیری در مرگ سلولی ندارد. در حالی که نمونه آلفا سینوکلئینی فیبریل شده بیش از ۵۰ درصد موجب مرگ بعد از ۲۴ ساعت شده بود. نقش مهار کومین آلدئید کاملاً معنی‌دار بود و بیشترین بقای سلولی در غلظت‌های بین ۱۰۰-۳۰۰ میکرومولار مشاهده شد که تا ۹۲ درصد موجب بقای سلولی شد. برای تأیید نتایج سمیت سلولی آزمون سنجش فعالیت آنزیمی لاکتات دهیدروژناز نیز انجام شد. در صورت تخریب سلولی و خروج آنزیم لاکتات دهیدروژناز از سلول، آنزیم با ترکیب نیکوتین آمید دی نوکلئوتید (Nicotinamide Adenine Dinucleotide: NADH) یا فرم اکسید آن بنا بر سوبسترای موجود در کیت واکنش می‌دهد و تغییر جذب در ۳۴۰ نانومتر مشاهده خواهد شد. با توجه به نمودار ۴ ب در کشت‌های کنترل میزان جذب در پایین‌ترین حد خود بود در حالی که در کشت تیمار شده با نمونه فیبریلی میزان جذب افزایش یافت. در کشت‌های تیمار شده با پروتئین مهار شده با دارو، میزان فعالیت آنزیمی در محلول پایین بود.

شکل ۴ می‌توان تغییر شکل ظاهری سلول‌ها و تراکم بلورهای فورمازان غیرمحلول در زیر میکروسکوپ را در نمونه‌های کنترل و تیمار شده با نمونه‌های فیبریلی و مهار شده مشاهده نمود.

ویژگی مهار کنندگی کومین آلدئید بر تجمع‌های آلفا سینوکلئین

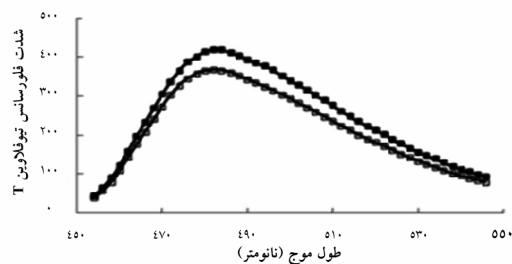
برای روشن شدن بیشتر عملکرد مهار کومین آلدئید بر فیبریل‌های آمیلوئیدی اثر حضور آن در فیبریل‌های لیزوزیم نیز بررسی شد. بررسی‌ها نشان داد کومین آلدئید بر فرایند فیبریل‌های لیزوزیم اثر مهاری ندارد و چنانچه در نمودار ۵ الف مشاهده می‌شود تغییرات نشر فلورسانس ThT در حضور نمونه‌های پروتئینی گرماگذاری شده در ۲۴ ساعت در حضور غلظت ۳۰۰ میکرومولار از کومین آلدئید تغییر قابل ملاحظه‌ای در شدت نشر نشان نداد. در نمودار ۵ ب تغییرات جذب کنگو رد نیز تغییر قابل ملاحظه‌ای در شدت جذب نشان نداد. مطالعات تصاویر میکروسکوپ فلورسانس نیز تأیید کننده تشکیل تجمع‌های وسیع فیبریلی چه در حضور و چه در عدم حضور کومین آلدئید در پروتئین لیزوزیم است (داده‌ها نشان داده نشده است).



نمودار ۵ الف) طیف نشر فلورسانس ThT، ب) طیف جذبی کنگو رد پس از اضافه کردن نمونه فیبریلی ۲۴ ساعته لیزوزیم تیمار نشده (■)، تیمار شده با ۳۰۰ میکرومولار (□) کومین آلدئید و جذب کنگو رد به تنهایی (●)

مهار فیبریلاسیون کومین آلدئید

در مسیر فیبریلاسیون، مرحله هسته‌گذاری (Nucleation) مرحله محدود کننده واکنش (Rate Limiting) است و معمولاً افزودن هسته‌های آماده شده (Seeding) به علت کوتاه کردن یا حذف مرحله تأخیری باعث افزایش سرعت فیبریلاسیون می‌شود. افزودن نمونه‌های مهار شده با غلظت ۳۰۰ میکرومولار از کومین آلدئید افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان شدت نشر فلورسانس ThT ایجاد نکرد (نمودار ۶) و این مطلب تأیید کننده آن است که فرمی که احتمالاً دارو در پروتئین القا می‌نماید مستعد هسته‌گذاری و افزایش فیبریلاسیون نیست.



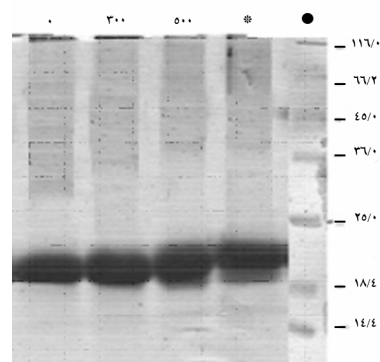
نمودار ۶ طیف نشر فلورسانس ThT پس از اضافه کردن نمونه سینوکلئین بدون بذر (□) و همراه با بذر (■) در pH=۷/۲ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۳ میلی‌گرم که به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شده بود.

بحث

امروزه استراتژی‌های متفاوتی برای مبارزه با بیماری‌های رو به گسترشی به نام بیماری‌های تحلیل برنده مغزی صورت می‌گیرد. در بیماری‌هایی مانند آلزایمر، هانتینگتون یا پارکینسون، پروتئین به صورت تجمع یافته در سلول یا خارج آن تشکیل شده که ثابت شده است می‌تواند به عنوان عامل تخریب در سلول‌ها عمل کند. مکانیزم‌های تخریبی که برای تجمعات آمیلوئیدی مشاهده شده است در سه بخش اصلی قرار می‌گیرد: شناخته شده‌ترین گروه تخریبی ناشی از افزایش نفوذپذیری غشاها و تغییر ساختار آنها است [۳۳-۳۵]. مکانیزم دیگر به دام انداختن پروتئین‌های دیگر فعال در سلول [۳۶، ۳۷] یا حذف فعالیت پروتئین تجمع یافته است. راه‌های درمانی که تاکنون استفاده شده است با جایگزینی ترکیبات

بررسی تجمعات حد واسط

تجمع‌یافتگی پروتئین به صورت فیبریلی مستلزم عبور از یک فرایند پیچیده و چندین مرحله‌ای از تجمعات کوچک‌تر و ساختارهای متفاوت است. ثابت گردیده که مهم‌ترین عامل آسیب‌رسان سلولی و اندامک‌های سلولی به ویژه میتوکندری در فرایند تجمعات پروتئین فیبریلی به واسطه تشکیل گونه‌های حد واسط مانند الیگومرها و پیش فیبریلاسیون است [۳۰، ۳۱]. فرم‌های حد واسط در مسیر فیبریلاسیون می‌توانند ناپایدار بوده که به گونه‌های «در مسیر یا on-pathway» معروف هستند و در حضور SDS یا ان-سدیم لورویل سارکوزینات (Sodium Lauroyl Sarcosinate) ناپایدار بوده و تفکیک و به شکل منومری پروتئین بر می‌گردند [۳، ۳۲] در مسیر تجمعات گونه‌های «بیرون از مسیر یا off-pathway» پایدار بوده و به منومر برگشت ندارند. در شکل ۵ مطالعه ژل الکتروفورز صفحه‌ای نمونه‌ها نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است نمونه‌ها با وجود تشکیل تجمعات فیبریلی یا بی‌شکل دارای حد واسط‌های ناپایدار و حساس به SDS بودند. نمونه‌ها در مدت یک هفته بعد از گرماگذاری نیز الگوی مشابهی از خود نشان دادند. لازم به ذکر است که هضم پروتئینی قابل توجهی نیز در نمونه‌ها دیده نشد.



شکل ۵ الگوی SDS-PAGE نمونه‌های پروتئینی آلفا سینوکلئین گرماگذاری شده به مدت ۲۴ ساعت در حضور غلظت‌های ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار کومین آلدئید؛ ● نشانگر وزن مولکولی (کیلوالتون) و * نمونه مهار شده با ۳۰۰ میکرومولار از دارو به مدت ۴ روز است.

مشابه، اغلب نقش کاهش عوارض را دارد. راه‌های دیگر درمانی که بیشتر جنبه حذف فرایند فیبریلایسیون را دارد هنوز در مراحل آزمایشگاهی است [۳۸، ۳۹]. این دسته از راه‌ها شامل استفاده از آنتی‌بادی‌هایی برای برطرف کردن پلاک‌های تشکیل شده است. روش دیگر مهار بیان یا تولید پروتئین یا پپتید فیبریل شونده است. به‌کارگیری ترکیباتی که فرم‌های خطرناک پروتئین را هدف گرفته و با میان‌کنش ویژه مانع تشکیل فرم‌های تجمع‌یافته سمی می‌شود روش دیگری است که امروزه به آن توجه ویژه‌ای می‌شود [۴۰].

کومین آلدئید یکی از ترکیبات اصلی در برخی از اسانس‌های گیاهان دارویی است و مانند بسیاری از ترکیبات گیاهی استخراج شده در زمینه‌های مختلف درمانی بهداشتی استفاده شده است [۲۰، ۴۱، ۴۲]. کومین آلدئید نسبتاً ساختار ساده‌ای داشته که شامل یک بخش بنزنی با یک شاخه کوتاه آلدئیدی است. مطالعات نشان داده است که معمولاً ریز مولکول‌هایی که در مهار فیبریلایسیون شرکت می‌کنند دارای یک بخش آروماتیکی است و گفته می‌شود این ساختارها می‌تواند با باقیمانده‌های آروماتیکی مانند تیروزین یا تریپتوفان میان‌کنش داشته باشد که احتمالاً به علت نقش ریشه‌های آروماتیکی در پروتئین‌ها در آغاز تجمع پروتئین است [۱۹، ۴۳]. در یک مطالعه انجام شده با رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (Nuclear Magnetic Resonance) مشخص شده است که ترکیب آروماتیک و مهارکننده فتالوسیانین تراسولفونات میان‌کنش مستقیمی با ناحیه انتهای آمینی و تیروزین ۳۹ پروتئین آلفا سینوکلئین دارد [۴۴]. اما نکته‌ای که باعث می‌شود یک ترکیب به‌صورت اختصاصی روی یک پروتئین عمل کند و مهار فیبریلایسیون پروتئین دیگری را باعث نشود کاملاً ثابت نشده است. گاهی اختصاصی بودن مهار حتی در گونه‌های متفاوت یک پروتئین متفاوت است؛ به‌عنوان مثال ترکیب رزوراتل (Resveratrol) می‌تواند روی قطعه ۴۲ پپتیدی از آ-بتا (A-beta) عمل کند [۳] و نقش مهاری روی پپتید ۴۰ تایی ندارد [۳]. لیزوزیم سفیده تخم مرغ پروتئین مدلی است که در

مطالعات مربوط به پدیده فیبریلایسیون پروتئین‌ها تحقیقات بسیاری روی آن انجام [۴۵] و ترکیبات آروماتیک متعددی به‌عنوان مهارکننده برای آن معرفی شده است [۴۳]. در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که ترکیب کومین آلدئید در فرایند فیبریلایسیون دو پروتئین آلفا سینوکلئین و لیزوزیم متفاوت عمل می‌کند به نحوی که در لیزوزیم نه تنها مهاری مشاهده نمی‌شود بلکه تا حدی فرایند فیبریلایسیون در این پروتئین افزایش می‌یابد؛ در حالی که در آلفا سینوکلئین افزایش شدت نشر ThT در نمونه‌های مهارشده تا بیش از ۸۰ درصد کاهش می‌یابد. تغییرات جذب کنگو رد نیز نشان دهنده مهار شدن فیبریلایسیون می‌دهد. در بررسی طیف جذبی کنگو رد نکته قابل ذکر کاهش شیب نزولی جذب در نمونه‌های مهار شده است که می‌تواند نشانه‌ای از کدورت و وجود تکه‌های تجمع‌ی بی‌شکل باشد. تصاویر میکروسکوپی تکه‌های کوچک بی‌شکل را در نمونه‌های تیمار شده به‌صورت پراکنده نشان می‌دهد. در گزارش‌های گذشته نشان داده شده بود که تجمع‌ی بی‌شکل حاصل از مهار معمولاً سمیت سلولی ندارد [۱۹]. در آزمون‌های سنجش بقای سلولی نیز محققان حاضر شاهد پایداری بالای سلول‌ها به میزان بیش از ۹۰ درصد بودند. شکل سلولی در نمونه‌های سلولی که در معرض پروتئین تیمار شده با کومین آلدئید قرار گرفته بودند نیز مشابه سلول‌های کنترل بود، در حالی که در نمونه‌های تیمار نشده با دارو کاملاً تغییر شکل یافته بود. لازم به ذکر است که افزایش غلظت کومین آلدئید در محیط کشت می‌تواند موجب کاهش درصد بقای سلولی گردد. علت، ماهیت آب‌گریزی و چربی دوستی این نوع ترکیبات است که می‌تواند در غلظت‌های بالاتر موجب اختلال در ساختار غشا و نفوذپذیری آن گردند؛ اثری که در نابودی سلول‌های سرطانی از آن استفاده می‌شود [۴۶]. بررسی‌های فیزیکوشیمیایی در لوله آزمایش تا حدی علت سمیت غلظت‌های بالای این ترکیبات را نشان داده است. ترکیبات مؤثر موجود در اسانس‌ها معمولاً آنتی‌اکسیدانت است. با این حال این ترکیبات می‌تواند در سلول‌های یوکاریوتی به عنوان پراکسیدانت روی غشاهای سلولی و اندامک‌هایی مانند

مهار فیبریله کومین آلدئید

برخلاف برخی از مهار کننده‌هایی که تجمعات کوچک پایداری ایجاد می‌کند [۳]. در مطالعه حاضر برای اولین بار از ترکیب کومین آلدئید به عنوان مهار کننده فیبریلایسیون در آلفا سینوکلئین استفاده شد و ویژگی مهارکنندگی و ضد سمیتی آن روی فرایند فیبریلایسیون با آزمون‌های مختلف تأیید شد، اما برای شناسایی مکانیزم عمل این ترکیب و اثرگذاری مثبت آن بر سلول به مطالعات بیشتری نیاز است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی ۳۵۲ پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام شده است.

میتوکندری اثر گذار باشد؛ البته این اثر بسته به نوع و غلظت آن‌ها است و در غلظت‌های بالا باعث افزایش نفوذپذیری غشاها به‌ویژه در میتوکندری می‌شود که در این حالت، موجب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود و می‌تواند به‌عنوان پرواکسیدانت به DNA و پروتئین آسیب وارد کند [۴۶].

نکته مهم دیگر در مهار تجمع‌یافتگی پروتئین‌ها نتیجه نهایی مهار و گونه پروتئینی ایجاد شده است. این احتمال وجود دارد که گونه ایجاد شده خود به‌عنوان هسته اولیه عمل نموده و فرایند را به سمت شرایط وخیم‌تری سوق دهد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که گونه‌های ایجاد شده دارای چنین خاصیتی نیست و همچنین ساختارهای پایداری ندارد و در بررسی مقاومت به SDS روی ژل نوار بالاتری دیده نشد.

منابع

- [1] Luheshi LM, Crowther DC, Dobson CM. Protein misfolding and disease: from the test tube to the organism. *Curr Opin Chem Biol* 2008; 12(1): 25-31.
- [2] Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(2): 101-12.
- [3] Ladiwala AR, Lin JC, Bale SS, Marcelino-Cruz AM, Bhattacharya M, Dordick JS, Tessier PM. Resveratrol selectively remodels soluble oligomers and fibrils of amyloid Abeta into off-pathway conformers. *J Biol Chem* 2010; 285(31): 24228-37.
- [4] Suk JE, Lokappa SB, Ulmer TS. The clustering and spatial arrangement of beta-sheet sequence, but not order, govern alpha-synuclein fibrillogenesis. *Biochemistry* 2010; 49(7): 1533-40.
- [5] Chung JY, Lee SJ, Lee SH, Jung YS, Ha NC, Seol W, Park BJ. Direct interaction of α -synuclein and AKT regulates IGF-1 signaling: implication of Parkinson disease. *Neurosignals* 2011; 19(2):86-96.
- [6] Puschmann A, Ross OA, Vilarinho-Güell C, Lincoln SJ, Kachergus JM, Cobb SA, Lindquist SG, Nielsen JE, Wszolek ZK, Farrer M, Widner H, van Westen D, Hägerström D, Markopoulou K, Chase BA, Nilsson K, Reimer J, Nilsson C. A Swedish family with de novo alpha-synuclein A53T mutation: evidence for early cortical dysfunction. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15(9): 627-32.
- [7] Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein

- gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276(5321): 2045-7.
- [8] Waxman EA, Giasson BI. Molecular mechanisms of alpha-synuclein neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(7): 616-24.
- [9] Del Mar C, Greenbaum EA, Mayne L, Englander SW, Woods VL Jr. Structure and properties of alpha-synuclein and other amyloids determined at the amino acid level. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(43): 15477-82.
- [10] Frimpong AK, Abzalimov RR, Uversky VN, Kaltashov IA. Characterization of intrinsically disordered proteins with electrospray ionization mass spectrometry: conformational heterogeneity of alpha-synuclein. *Proteins* 2009; 78(3): 714-22.
- [11] Georgieva ER, Ramlall TF, Borbat PP, Freed JH, Eliezer D. Membrane-bound alpha-synuclein forms an extended helix: long-distance pulsed ESR measurements using vesicles, bicelles, and rodlike micelles. *J Am Chem Soc* 2008; 130(39): 12856-7.
- [12] Lokappa SB, Ulmer TS. Alpha-synuclein populates both elongated and broken helix states on small unilamellar vesicles. *J Biol Chem* 2011; 286(24): 21450-7.
- [13] Waxman EA, Mazzulli JR, Giasson BI. Characterization of hydrophobic residue requirements for alpha-synuclein fibrillization. *Biochemistry* 2009; 48(40): 9427-36.
- [14] Fernández CO, Hoyer W, Zweckstetter M, Jares-Erijman EA, Subramaniam V, Griesinger C, Jovin TM. NMR of alpha-synuclein-polyamine complexes elucidates the mechanism and kinetics of induced aggregation. *EMBO J* 2004; 23(10): 2039-46.
- [15] Lee HJ, Kang SJ, Lee K, Im H. Human α -synuclein modulates vesicle trafficking through its interaction with prenylated Rab acceptor protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 412(4): 526-31.
- [16] Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga S, Kato K, Hasegawa M. Characterization of inhibitor-bound alpha-synuclein dimer: role of alpha-synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding. *J Mol Biol* 2009; 395(3): 445-56.
- [17] Bellani S, Sousa VL, Ronzitti G, Valtorta F, Meldolesi J, Chieriegatti E. The regulation of synaptic function by alpha-synuclein. *Commun Integr Biol* 2010; 3(2): 106-9.
- [18] Braga CA, Follmer C, Palhano FL, Khattar E, Freitas MS, Romão L, Di Giovanni S, Lashuel HA, Silva JL, Foguel D. The anti-Parkinsonian drug selegiline delays the nucleation phase of α -synuclein aggregation leading to the formation of nontoxic species. *J Mol Biol* 2011; 405(1): 254-73.
- [19] Lee EN, Cho HJ, Lee CH, Lee D, Chung KC, Paik SR. Phthalocyanine tetrasulfonates affect the amyloid formation and cytotoxicity of alpha-synuclein. *Biochemistry* 2004; 43(12): 3704-15.
- [20] Nitoda T, Fan MD, Kubo I. Effects of cuminaldehyde on melanoma cells. *Phytother Res* 2008; 22(6): 809-13.
- [21] O'Mahony R, Al-Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, Holton J, Basset C. Bactericidal and anti-adhesive properties of

- culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol 2005; 11(47): 7499-507.
- [22] Pai MB, Prashant GM, Murlikrishna KS, Shivakumar KM, Chandu GN. Antifungal efficacy of *Punica granatum*, *Acacia nilotica*, *Cuminum cyminum* and *Foeniculum vulgare* on *Candida albicans*: an in vitro study. Indian J Dent Res 2010; 21(3): 334-6.
- [23] Huang C, Ren G, Zhou H, Wang CC. A new method for purification of recombinant human alpha-synuclein in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif 2005; 42(1): 173-7.
- [24] Ren G, Wang X, Hao S, Hu H, Wang CC. Translocation of alpha-synuclein expressed in *Escherichia coli*. J Bacteriol 2007; 189(7): 2777-86.
- [25] Antony T, Hoyer W, Cherny D, Heim G, Jovin TM, Subramaniam V. Cellular polyamines promote the aggregation of alpha-synuclein. J Biol Chem 2003; 278(5): 3235-40.
- [26] Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. Methods 2004; 34(1): 151-60.
- [27] Malinchik SB, Inouye H, Szumowski KE, Kirschner DA. Structural analysis of Alzheimer's beta(1-40) amyloid: protofilament assembly of tubular fibrils. Biophys J 1998; 74(1): 537-45.
- [28] Ban T, Hamada D, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y. Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. J Biol Chem 2003; 278(19): 16462-5.
- [29] Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods 1989; 119(2):203-10.
- [30] Glabe CG. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. Neurobiol Aging 2006; 27(4): 570-5.
- [31] Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. Science 2003; 300(5618): 486-9.
- [32] Falsone SF, Leitinger G, Karner A, Kungl AJ, Kosol S, Cappai R, Zangger K. The neurotransmitter serotonin interrupts α -synuclein amyloid maturation. Biochim Biophys Acta 2011; 1814(5): 553-61.
- [33] Connelly L, Jang H, Arce FT, Capone R, Kotler SA, Ramachandran S, Kagan BL, Nussinov R, Lal R. Atomic force microscopy and MD simulations reveal pore-like structures of all-D-enantiomer of Alzheimer's β -amyloid peptide: relevance to the ion channel mechanism of AD pathology. J Phys Chem B 2012; 116(5): 1728-35.
- [34] Mezler M, Barghorn S, Schoemaker H, Gross G, Nimmrich V. A β -amyloid oligomer directly modulates P/Q-type calcium currents in *Xenopus* oocytes. Br J Pharmacol 2011; 165(5): 1572-83.
- [35] Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, Frangione B, Kagan B, Ghiso J, Lal R. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102(30): 10427-32.
- [36] Vabulas RM, Hartl FU. Aberrant protein interactions in amyloid disease. Cell Cycle 2011; 10(10): 1512-3.

- [37] Olzscha H, Schermann SM, Woerner AC, Pinkert S, Hecht MH, Tartaglia GG, Vendruscolo M, Hayer-Hartl M, Hartl FU, Vabulas RM. Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell* 2011; 144(1): 67-78.
- [38] Citron M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(5): 387-98.
- [39] Middleton LE, Yaffe K. Promising strategies for the prevention of dementia. *Arch Neurol* 2009; 66(10): 1210-5.
- [40] Nordberg A. Molecular imaging in Alzheimer's disease: new perspectives on biomarkers for early diagnosis and drug development. *Alzheimers Res Ther* 2010; 3(6): 34.
- [41] Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Huang B, Wang Y. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int J Food Microbiol* 2010; 145(2-3): 464-70.
- [42] Hierro I, Valero A, Pérez P, González P, Cabo MM, Montilla MP, Navarro MC. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomedicine* 2004; 11(1): 77-82.
- [43] Morshedi D, Rezaei-Ghaleh N, Ebrahim-Habibi A, Ahmadian S, Nemat-Gorgani M. Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by indole derivatives--possible mechanism of action. *FEBS J* 2007; 274(24): 6415-25.
- [44] Lamberto GR, Binolfi A, Orcellet ML, Bertoncini CW, Zweckstetter M, Griesinger C, Fernández CO. Structural and mechanistic basis behind the inhibitory interaction of PcTS on alpha-synuclein amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(50): 21057-62.
- [45] Swaminathan R, Ravi VK, Kumar S, Kumar MV, Chandra N. Lysozyme: a model protein for amyloid research. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2011; 84: 63-111.
- [46] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(2): 446-75.