مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) جلد ۳۶، شماره ۲، ۱۴۰۲
DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.2.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۱۴۲-۱۲۸

نقش پیش انکوباسیون در تشکیل کمپلکس سوپرامولکولی لوسیجنین با پاراسولفوناتوکلیکس[4] آرن در محیط کشت سلولی

ریحانه خسروی و امیر نوروزی*

ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی زیست فرآیند

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۴

چکیده

رنگ فلورسانت لوسیجنین (LCG) به مولکول سبد مانند پاراسولفوناتوکلیکس [۴] آرن یا CX4 متّصل شده و ایجاد کمپلکس می‌کند. به موجب تشکیل کمپلکس CX4·LCG رنگ لوسیجنین دچار خاموشی فلورسانسی یا کووینچ می شود. این کمپلکس برای جایگزینی مولکول لیگاند رقیب (به عنوان آنالیت (A)) با LCG مورد استفاده قرار می گیرد. طی "سنجش جایگزینی نشانگر" مولکول آنالیت با کمپلکس CX4·LCG انکوبه می شود و آنالیت جای لوسیجنین را گرفته، کمپلکس CX4·A تشکیل می‌شود و آزاد شدن LCG با افزایش نشر فلورسانس محلول همراه است. در این مطالعه یکبار CX4·LCG با پپتید تراآرژنین به عنوان آنالیت در بافر فسفات (محیط بدون لیگاند رقیب) پیش انکوبه شده و سپس با محیط کشت Ham's F12 (حاوی انواع لیگاندهای رقیب) رقیق شده است و میزان LCG آزاد شده از طریق روبش فلورسانسی اندازه گیری شد. بار دیگر کل فرآیند تشکیل کمپلکس CX4·LCG و انکوبه شدن با آنالیت تراآرژنین از ابتدا در محیط کشت و در حضور لیگاندهای رقیب انجام شده است و سپس محلول مورد روبش فلورسانسی قرار گرفته است. بر خلاف باور رایج نتایج دو آزمایش تفاوت معنی داری نشان نمی دهند. به بیان دیگر ثابت اتّصال دستخوش تغییر نمی شود. بنابراین برهم کنش های سوپرامولکولی در نهایت به تعادل چند جانبه می رسد و از روش "سنجش جایگزینی نشانگر" جهت سنجش آنالیت در محیط های همراه با لیگاندهای رقیب و مزاحم –از جمله محیط کشت که بسیار پرکاربرد و مورد توجه گرایش های مختلف زیستی است– هم می توان استفاده کرد.

واژه های کلیدی: فلورسانس، آنالیت، برهم کنش سوپرامولکولی، سنجش جایگزینی نشانگر

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۷۸۷۳۴۹-۰۲۱ ، پست الکترونیکی: a_norouzy@nigeb.ac.ir

مقدمه

کلیکسرین ها (Calixarenes) کاملاً مشابه پاپیلارن ها هستند و معمولاً از جفت شدن فنل با آلدهید حاصل می شوند. تفاوت عمده بین آنها در ساختار شیمیایی آنها است، جایی که کلیکسرین هادارای یک ساختار سبد و پاپیلارن ها دارای یک ساختار استوانه ای یا ستونی هستند. در نامگذار calix[n]arene، n تعداد واحدهای تکرار شده در ساختارهای حلقوی است. ساختارهای کلیکسارن با پراش سنجی اشعه ایکس مشخص شده است. در عکس های کریستالوگرافی کلیکسرین که یک ساختار سه بعدی سطل مانند با دهانهء پهن و پایین باریک تر مشخص شده است (شکل ۱). به دلیل چرخش در اطراف گروههای متیلن، کلیکسرین می توانند به صورت کانفورماسیون های مختلفی وجود داشته باشند ولی با افزودن یک مولکول نسباتاً بزرگ با ممانعت فضایی زیاد در بالای حلقه برای قفل شدن ترکیب می توان از این چرخش جلوگیری کرد. علاوه بر این، از پل های مولکولی غالباً برای بی حرکتی ترکیبات کلیکسرین استفاده می شود. ساختار منعطف کلیکسارن ها آنها را به میزبان های مولکولی مناسبی تبدیل

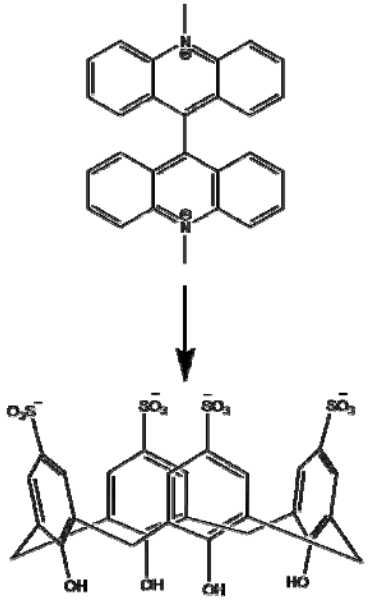
DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.2.5
مقاله پژوهشی، صفحات: ۱۴۲-۱۲۸

کرده است زیرا در برهم کنش با مولکول میهمان می توانند ساختاری متناسب با شکل میهمان خود را به دست بیاورند تا برهمکنش های پایدار کننده بین مولکولی حداکثر شود. (۱۱)

اولین کلیکسارن که با پراش سنجی اشعه ایکس تک کریستالی کشف شد کالیکس[۸]آرن (Calix[8]arene) است که توسط آنگارو و همکاران سنتز شده است. در سال ۱۹۸۱ پس از آن ، سایر کلیکسارن ها با اندازه های چهار، پنج، شش، هفت، و هشت واحد تکرار نیز آماده شده است.(۱۱, ۱۸) سپس این کلیکسرین ها را می توان بیشتر در هوموکلیکسرین ها و هتروکلیکسرین ها دسته بندی کرد، به موجب آن اولی نشان دهنده واحدهای تکراری از همان نوع است و دومی نشان دهنده واحدهای تکراری از انواع مختلف است.

بسیاری از گروه های تحقیقاتی انواع مختلفی از کلیکسرین هارا برای تشکیل مجتمع های میزبان–مهمان در نظر گرفته اند. کلمن و همکاران سنتز *p*-sulfonatocalix[n]aren با ابعاد n=4, 6, 8 را سنتز کردند و امکان ایجاد کمپلکس آنها با اسیدهای آمینه مختلف مطالعه کردند. نتیجه گیری شد که گروههای عاملی در کلیکسارن می توانند بر فعل و انفعالات آنها با اسیدهای آمینه تأثیر بگذارند. طبق مطالعه ایشان CX4 بیشترین قدرت اتّصال را با آرژنین، لایزین و پرولین دارد. (۶) جدای از فعل و انفعالات با اسیدهای آمینه، کلیکسرین ها همچنین می تواند مجتمع هایی با یونهای فلزی تشکیل دهند. گروههای عملکردی خاص که در لبه کلیکسرین ها متّصل می شوند، معمولاً در تثبیت کاتیون ها نقش دارند و مجموعه های میزبان–میهمان نهایی می توانند به عنوان سنسورهای نوری برای تشخیص فلزات مهم بالینی عمل کنند. (۹) بنابراین در محیط کشت سلولی که ۲۰ آمینواسید استاندارد و یونهای مختلف برای رشد و نمو سلولی وجود دارد بلقوه مولکول های میهمان مختلفی جهت اشغال حفره CX4 وجود دارد.

انواع دیگر مولکول میهمانی که برای ترکیب با کالیکسارن استفاده می شوند، رنگهای آلی و مولکولهای کوچک بیولوژیکی هستند. ناو و همکاران از CXn (n=4, 5) برای ترکیب با انواع مولکولهای رنگ آلی برای سنجش کولین اکسیداز و استیل کولین استراز استفاده کردند. (۱۳) در یک بررسی توسط مارا و همکاران، استفاده از گلیکوزیدهای کلیکسرینی برای کاربردهای بیولوژیکی مورد بحث قرار گرفت. کالیکس متصل به فولات [۴] آرن برای تحویل داروی ضد التهاب ایندومتاسین مورد استفاده قرار گرفته است. آزید حاوی هموکالیکس [۴] آرن ابتدا قبل از ترکیب با اسید فولیک سنتز شد. گنجاندن داروی آبگریز ایندومتاسین با کلیکسارن به عنوان سنتز، حلالیت آبی خوبی را نشان داد و می تواند برای تحویل بالقوه دارو مورد استفاده قرار گیرد. (۲۲)



شکل ۱- ساختار شیمیایی رنگ فلورسانت لوسیجنین (بالا) و پاراسولفوناتوکلیکس[۴]آرن یا CX4 (پایین). مسیر ورود لوسیجنین به CX4 با فلش مشخص شده است.

لوسیجنین (bis-N-methylacridinium nitrate) شاید متداول ترین پروب شیمیایی لومینسانس برای تشخیص سوپراکسید در سلول ها و بافت باشد. توجه به این نکته مهم است که در حضور ردوکتازهای سلولی درون زا،

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.2.5
مقاله پژوهشی، صفحات: ۱۴۲-۱۲۸

لوسیجنین در یک چرخه اکسایش-کاهش شرکت می کند که می تواند منجر به تولید مستقیم سوپراکسید توسط پروب شود. علی رغم استفاده معمول از آن در زمینه زیست شناسی اکسیداسیون-احیا بحث بر سر این که آیا لوسیجنین یک پروب مناسب برای تشخیص تولید گونه های رادیکال آزاد است وجود دارد. با این حال، مطالعات اعتبارسنجی با استفاده از طیف گسترده ای از تکنیک ها برای تولید سوپراکسید نشان می‌دهد که اکسیداسیون اتوماتیک در غلظت‌های لوسیجنین ۱-۵ میکرومولار رخ نمی دهد. برای انواع سلول ها، غلظت ۵ میکرومولار برای تشخیص سوپراکسید کافی است و نباید از غلظت های بالاتر استفاده شود. رنگ فلورسانس لوسیجنین (شکل ۱) قابلیّت ورود به حفره کلیکسرین به عنوان مولکول میهمان را دارد. در اثر این جایگزینی لوسیجنین دچار خاموشی فلورسانس (کووینچ) می شود. (۱۳) از آنجا که اتّصال مولکول های میهمان گفته شده مانند آمینو اسیدها، یونها، ترکیبات آلی و غیره به CX4 نشانه یا سیگنال خاصی به جای نمی گذارد لذا اندازه گیری این اتّصال به سادگی قابل تشخیص نیست. ولی با کمک رنگ لوسیجنین می توان مطابق واکنش زیر کمپلکس CX4□LCG را در معرض مولکول متّصل شونده یا آنالیت قرار داد:

$$CX4{\cdot}LCG + A \rightarrow CX4{\cdot}A + LCG$$

لوسیجنین آزاد شده قابلیّت نشر فلورسانس دارد. بنابراین اتّصال آنالیت به کلیکسرین نهایتاً منجر به افزایش نشر در محلول می شود. به این روش "سنجش جایگزینی نشانگر" یا سجن ((Indicator Displacement Assay (IDA) می گویند. در این روش، یک مولکول آنالیت جایگزین مولکول نشانگر متّصل به مولکول میزبان می شود. با این جایگزینی، نشانگر، نشانه ای از خود به جای می گذارد که می تواند بعنوان مثال تغییر در شدّت فلورسانس و یا جذب ماوراء بنفش-مرئی در طول موج خاصی باشد. مولکول نشانگر در اینجا رنگ لوسیجنین است و سنجش بر مبنای جایگزینی نشانگر با مولکول آنالیتی است که قابلیّت اتّصال به کلیکسرین را دارد. روش سنجش جایگزینی نشانگر برای ارزیابی امکان اتّصال و اندازه گیری قدرت اتّصال انواع پپتیدها (۱۰, ۱۲, ۲۰) ، پروتئین ها (۳) از جمله آنزیم های تثبیت شده (۱۴, ۱۶, ۱۷, ۱۹) و سایر بیومولکول ها (۵, ۱۵, ۲۱) به مولکول CX4 می تواند مورد استفاده قرار گیرد. مولکول کلیکسرین به نوبه خود می تواند نفوذپذیری سلولی مواد متّصل به خود را افزایش دهد. (۱۳) لذا اتّصال کلیکسرین به مولکول میزبان راهگشای افزایش نفوذپذیری مولکول میهمان است. در این مطالعه به این پرسش پاسخ خواهیم داد در محیط هایی که علاوه بر مولکول میهمان (خواه با هدف حمل شوندگی یا آنالیتی) سایر مولکول های میهمان به عنوان رقیب ناخواسته وجود دارند، چه تاثیری بر ثابت اتّصال تام خواهد داشت و اینکه آیا سجن در چنین محیطی امکان پذیر می باشد یا خیر.

مواد و روشها

تمامی مواد شیمیایی به کار رفته از شرکت سیگما-آلدریچ تهیه شدند. محیط کشت به کار رفته از نوع Ham's F12 به همراه ۱۰٪ سرم گاوی بوده است. انکوباسیون ها به مدّت حدوداً ۱۰ ثانیه و صرفاً با هم خوردن توسط ورتکس انجام شده اند. دمای آزمایشگاه در ۲۵ درجه سانتی گراد ثابت بوده است. بافر فسفات از امتزاج سدیم دی هیدروژن فسفات و دی سدیم هیدروژن فسفات با غلظت ۵۰ میلی مولار تهیه شده و متعاقباً اسیدیته بافردر pH = 7.4 تنظیم شده است. به منظور به حداقل رساندن پراش ناشی از ذرّات معلق، بافر قبل از استفاده با سانتریفیوژ با دور g ۳۴۰۰ سانتریفیوژ شده و هر گونه ذرّات معلق احتمالی و ناخالصی های نامحلول رسوب داده شده اند. محلول رویی جهت پیش انکوباسیون کلیکسرین و لوسیجنین مورد استفاده قرار گرفته است. برای روبش فلورسانسی از اسپکتروفلوریمتر واریان کری-اکلیپس استفاده شد. لوسیجنین در طول موج ۳۶۹ نانومتر تهییج شده و نشر آن

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.2.5
مقاله پژوهشی، صفحات: ۱۴۲-۱۲۸

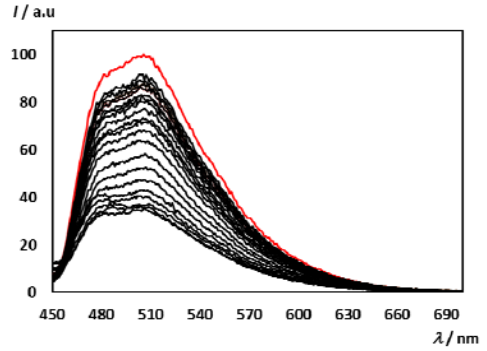
در محدوده ۳۸۰ تا ۸۰۰ نانومتر مورد روبش قرار گرفته است. کووت استفاده شده از نوع کوارتز با حجم ۱/۴ میلی لیتر بوده است. پنجره های تهییج و نشر به عرض ۵ نانومتر و سرعت روبش متوسط بوده است.

نتایج

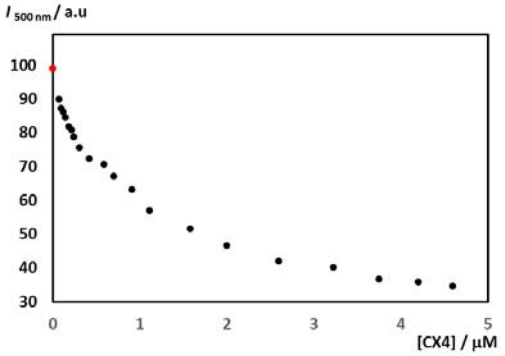
ناو و همکاران به تفصیل نحوه خاموشی فلورسانس لوسیجنین توسط CX4 را توضیح دادند. (۷) تشکیل کمپلکس های میهمان–میزبان بین در (n = 4-5) در CXn و LCG با تکنیک های طیف سنجی نوری، NMR ، ولتامتری چرخه ای، ITC و کریستالوگرافی با اشعه ایکس مورد مطالعه قرار گرفتند. این رنگ با ثابت اتّصال نسباتاً قوی k_a = 10^7 M^{-1} به CXn های مذکور متّصل شد. مکانیسم خاموشی یک نوع انتقال الکترون گرمازا است که منجر به خاموشی استاتیک با فاکتور ۱۴۰ می شود. بنابراین CX4 یک خاموش کننده قوی فلورسانس لوسیجنین محسوب می شود. در شکل ۲ نشر لوسیجنین به تنهایی و نحوه خاموشی آن با اضافه شدن مقادیر مختلف CX4 محلول در بافر فسفات به نمایش در آمده است. به منظور حذف اثر رقّت، محلول غلیظ CX4 اضافه شده حاوی لوسیجنین در غلظت برابر با محلول لوسیجنین تنها (منحنی قرمز) بوده است. به این ترتیب با اضافه کردن محلول فوق به لوسیجنین موجود در کووت فلورسانس، غلظت لوسیجنین ثابت مانده ولی غلظت CX4 با هر بار اضافه کردن افزایش می یابد.

ترکیبات مختلف آلی و معدنی امکان اتّصال به کلیکسرین را دارند. از جمله کاتیون‌ها می توان به عناصر کمیاب جدول تناوبی مانند La^{3+}, Nd^{3+}, Sm^{3+}, Eu^{3+}, Gd^{3+}, Dy^{3+} و Yb^{3+} و همچنین یون های بی والان مانند کلسیم ومنیزیم اشاره کرد (۴). در بین ترکیبات آلی اسیدهای آمینه لوسین، پرولین، تریپتوفان، فنیل آلانین، آسپارتات، سرین، لیزین، آرژنین و هیستیدین توانایی اتّصال به CX4 را دارند.

الف)

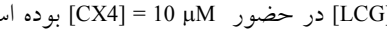


ب)



شکل ۲- الف) طیف نشر فلورسانس لوسیجنین ۱۰ میکرومولار (قرمز) به تنهایی و همراه با غلظت های فزآینده CX4 (مشکی) تهییج شده در طول موج ۳۷۰ نانومتر و ب) میزان افت شدّت فلورسانس در طول موج ۵۰۰ نانومتر بر علیه غلظت‌های CX4

آرژنین از بین همهء اسیدهای آمینه بیشترین توان اتّصال به کلیکسرین را دارد. (۶) کولین، استیل کولین و پپتید پروتامین هم این ویژگی را دارند. (۱۳) شکل ۳ نشر اندک کمپلکس CX4·LCG را نشان می دهد که در آن غلظت [LCG] = 5 μM در حضور [CX4] = 10 μM بوده است. به دلیل ماهیت سوپرامولکولی اتّصال لوسیجنین به کلیکسرین، تشکیل کمپلکس یک واکنش برگشت پذیر است:

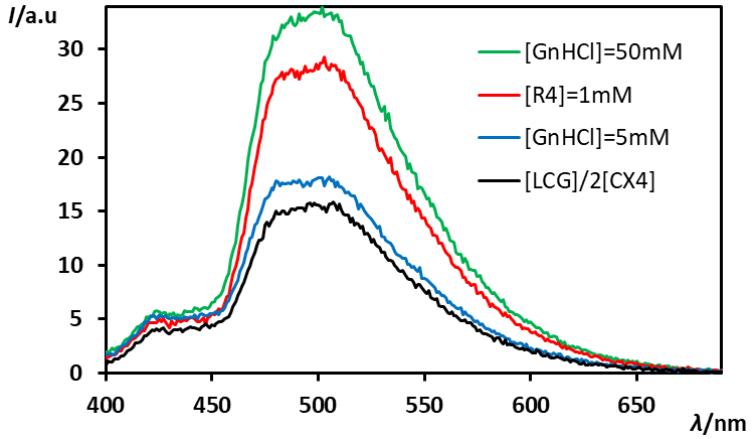


$$CX4 + LCG \leftrightarrow CX4{\cdot}LCG$$

بنابراین علی رغم این که استوکیومتری واکنش سوپرامولکولی لوسیجنین با کلیکسرین ۱:۱ است اما استفاده از غلظت دو برابری کلیکسرین واکنش را طبق اصل لوشتاتلیه به سمت راست می‌برد و تعداد مولکول لوسیجنین بیشتری به فرم کمپلکس در می‌آیند که نتیجتاً

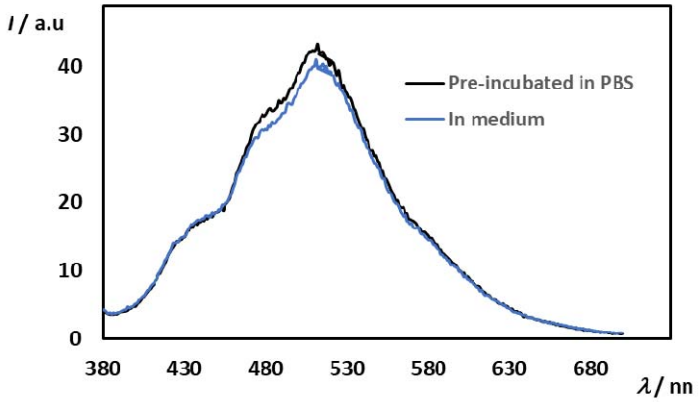
DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.2.5
مقاله پژوهشی، صفحات: ۱۴۲-۱۲۸

خاموشی بیشتری هم گزارش می‌شود. هر چند اضافه کردن کلیکسرین بیشتر خاموشی بیشتری هم در پی دارد ولی در این صورت محلول حاصل با تجمع کلیکسرین‌های خالی بیشتری نیز همراه است و در مرحله بعد که آنالیت اضافه می شود به جای جایگزین با لوسیجنین به کلیکسرین های آزاد متّصل خواهد شد. رها شدن لوسیجنین که با افزایش نشر همراه است در غلظت های آنالیت تراآرژنین با غلظت یک میلی مولار و آنالیت گوانیدین هیدروکلرید با غلظت های ۵ و ۵۰ میلی مولار در شکل ۳ قابل مشاهده است.



شکل ۳- طیف نشر فلورسانس سنجش جایگزینی نشانگر. آزاد شدن لوسیجنین از کمپلکس CX4·LCG توسط جایگزینی با آنالیت های پپتید تترا آرژنین R4 و گوانیدین هیدروکلرید (Gn·HCl) با افزایش نشر فلورسانس همراه است.

به منظور مشاهده میزان اتّصال لوسیجنین به کلیکسرین در حضور رقبای غیر آنالیتی (ناخواسته)، ۱۰ میکرومولار کلیکسرین با ۵ میکرومولار لوسیجنین در محیط کشت با همدیگر انکوبه شدند و سپس آنالیت تراآرژنین با غلظت ۱ میلی مولار به آن اضافه شد (منحنی آبی در شکل ۴). در آزمایش دیگری کلیکسرین با لوسیجنین در محیط بافر فسفات ۵۰ میلی مولار بدون حضور انواع رقبای غیر آنالیتی انکوبه شد و سپس به کمپلکس CX4·LCG حاصل پپتید تترا آرژنین اضافه شد. نهایتاً کل محلول با محیط کشت (حاوی متّصل شونده های غیر اختصاصی) رقیق شده و به غلظت یکسان در حالت قبلی رسید (منحنی مشکی در شکل ۴). به بیان دیگر غلظت نهایی کمپلکس و آنالیت در هر دو محلول یکسان بوده است.



شکل ۴- طیف نشر لوسیجنین آزاد شده از کمپلکس CX4·LCG انکوبه شده در بافر فسفات و رهایش در محیط کشت (منحنی مشکی) و یا انکوباسیون و رهایش در محیط کشت (منحنی آبی).

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.2.5
مقاله پژوهشی، صفحات: ۱۴۲-۱۲۸

بحث

در کمپلکس های سوپرامولکولی اتّصال غیر کووالانسی (مانند پیوندهای واندروالسی، لاندن و هیدروژنی) بین لیگاند و رسپتور برقرار است. در صورتی که در آب خالص و یا بافرهای ساده از این کمپلکس ها استفاده شود، تنها دو جزء لیگاند و رسپتور امکان تشکیل کمپلکس را دارند و ثابت اتّصال آنها عددی ثابت است. اما در صورت نیاز به استفاده از این کمپلکس ها به عنوان حامل دارو نیاز است محیط کشت به عنوان محلول مورد استفاده قرار بگیرد تا امکان ساعت ها و روزها انکوباسیون با سلول ها وجود داشته باشد. همانطور که در مقدمه گفته شد، کلیکسرین ها یکی از انواع رسپتورها می باشند. مشکل عمده در استفاده از میزبان کلیکسرین به عنوان حامل برای پپتیدها، آنزیمها، و سایر ملکلو های میهمان (حمل شونده) این است که این مواد بایستی در محیط کشت حل شوند و سلول در محیط کشت است که می تواند با این مواد مواجه شود. مشکل اینجاست که محیط کشت شامل رقبای مولکولی مختلف جهت اشغال حفره کلیکسرین می باشد. لذا اتّصال مولکول میهمان در رقابت با سایر مولکول ها موجب تضعیف ثابت اتّصال میهمان می شود به بیان دیگر در تعادل زیر که در آن A مولکول میهمان یا آنالیت و C مولکول رقیب است، بخشی بزرگتری از مولکول میهمان به صورت آزاد در محلول وجود خواهد داشت تا در آب خالص.

$$CX4 + A + C \longleftrightarrow CX4{\cdot}A + CX4{\cdot}C$$

شکل ۵- واکنش سوپرامولکولی و برگشت پذیر کلیکسرین با آنالیت (مولکول میهمان) و ملکلول رقیب

یکی از راهکارهایی که در برخی منابع شنیده شده است این است که کمپلکس CX4·A در محیط آبی مانند بافر فسفات ایجاد شود و سپس به محیط کشت اضافه شود تا همزمان مولکول رقیب و میهمان شانس رقابت نداشته باشند و به اصطلاح حفره کلیکسرین از قبل توسط مولکول میهمان اشغال شده باشد. آزمایش ما نشان می دهد که این روش کارایی ناچیزی در حفظ لوسیجنین به عنوان مولکول میهمان دارد (شکل ۴). علّت این امر برگشت پذیر بودن هر گونه اتّصال سوپرامولکولی به کلیکسرین است خواه با مولکول میهمان خواه با مولکول رقیب. بنابراین یک تعادل چند گانه مطابق شکل ۵ تشکیل می شود.

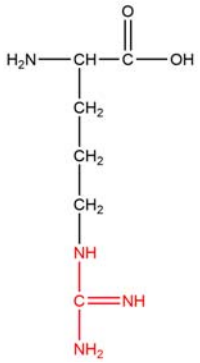
در مقایسه شکل ۴ با شکل ۳ متوجه می شویم که نه تنها شکل طیف های فلورسانسی در محیط کشت تغییر یافته اند بلکه طول موج قله هم از حدود ۵۰۰ نانومتر در شکل ۳ به ۵۳۰ نانومتر در شکل ۴ تغییر کرده است. به این پدیده شیفت استوک می گویند و در نتیجه فاصله انرژی بین الکترون جهش یافته در حالت تهییج شده با سطح پایه افزایش یافته است و این افزایش خود را به صورت کاهش سطح انرژی الکترون در حالت پایه در بافر فسفات با طول موج بیشینه نشر در۵۰۰ نانومتر نسبت به محیط کشت که سطحی انرژی پایینتری دارد به نحوی که طول موج بیشینه نشر در ۵۳۰ نانومتر مشاهده شده است، نشان می دهد.

پپتیدها کاربردهای گسترده ای در زیست شناسی و پزشکی دارند (۱, ۲). پپتیدهای اوکتا و نونا آرژنینی به ترتیب با دارا بودن ۸ و ۹ آرژنین جزء پپتیدهای نفوذ کننده سلولی شناخته شده می باشند. پپتیدها نفوذ کننده به داخل سلول بر خلاف آنچه از نام آنها بر می آید فقط به سلول ورود نمی کنند بلکه همگی آنها حامل هم هستند. حمل شونده می تواند پروتئین ها، دارو ها و ترکیبات عکس برداری از سلول باشند که به تنهایی نفوذپذیری کمی دارند اما با کمک این پپتیدها مشکل نفوذ آنها به سلول یا بافت از بین می رود. اشکال عمده در استفاده از الیگوآرژنین ها یکی سمیّت آنها برای سلول است و دیگری دشواری سنتز آنها. سمیّت آنها به دلیل مکانیسم نفوذ آنها است. طبق مقالات موجود نفوذ آنها با دو مکانیسم اندوسیتوز و نفوذ مستقیم از غشاء انجام می شود. به نظر می رسد مکانیسم نفوذ مستقیم که برای اولین بار توسط گارسیا و دیگران گزارش

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.2.5
مقاله پژوهشی، صفحات: ۱۴۲-۱۲۸

شد (۸) نقش بیشتری در سمیّت الیگو آرژنین ها داشته باشد زیرا در نفوذ مستقیم حفراتی در سطح سلول توسط الیگوآرژنین ایجاد می شود. دیواره این حفرات از جنس فسفولیپید غشایی با بار منفی است که در برهم کنش الکتروستاتیک با الیگوآرژنین، امکان نفوذ آنرا فراهم می آورد. مشاهدات ما در مطالعات گذشته (۱۳) نشانداده است که استفاده از پپتیدهای غنی از آرژنین مانند پروتامین به محض اضافه شدن باعث نکروز سلولی می شوند. به منظور کاستن از خواص سمّی آرژنین می توان از حامل CX4 برای حمل آن به داخل سلول استفاده کرد. اتّصال پپتید تراآرژنین به CX4 توسط روش سجن در شکل ۳ به نمایش در آمده است. به نظر می رسد به دلیل وجود سولفات های بار منفی در حاشیه بالایی کلیکسرین (شکل ۱) اتّصال آرژنین از ناحیه گروه گوانیدینوی زنجیره جانبی باشد (شکل ۶).

به منظور اثبات این فرضیه اتّصال گوانیدین هیدروکلرید و پپتید تراآرژنین به کلیکسرین توسط روش سجن به صورت مجزّا بررسی شد. نتایج حاصل نشان می دهد که هر دو مولکول توانایی اتّصال به کلیکسرین را دارند ولی تراآرژنین در غلظت ۱ میلی مولار رهایش تعداد بیشتری مولکول لوسیجنین را باعث می شود تا گوانیدین هیدروکلرید در غلظت ۵ میلی مولار. تراآرژنین دارای چهار گروه گوانیدینو می باشد و غلظت گروه های گوانیدینو در محلول ۱ میلی مولار تراآرژنین برابر ۴ میلی مولار است.



شکل ۶- ساختار شیمیایی آمینو اسید آرژنین. گروه گوانیدینو در زنجیره جانبی به رنگ قرمز مشخص شده است.

با این حال افزایش نشر به مراتب بیشتر از محلول ۵ میلی مولار گوانیدین هیدروکلرید است. در نتیجه فقط گروه گوانیدینو نیست که زنجیره جانبی را به کلیکسرین متّصل می کنده بلکه، گروه تری متیلن زنجیره جانبی هم نقش مهمی در اتّصال زنجیره جانبی آرژنین به کلیکسرین دارد.

تقدیر و تشکر

این مقاله با حمایت پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری در قالب طرح ۷۳۹ به انجام رسیده است که بدینوسیله نویسندگان لازم می دانند از پژوهشگاه مذکور تقدیر و تشکر نمایند.

منابع

۱- فاطمه د. (۱۳۹۳). "استخراج و خالص سازی پپتید ضد میکروبی جدید از گیاه عناب (*Ziziphus Jujuba*)." مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ۲۷(۲): ۲۱۱-۲۲۳.

۲- لیلا ز. م. الهه ز. ح. (۱۳۹۷). "تجزیه و تحلیل آماری پپتیدهای ضدسرطان گیاهی با استفاده از محیط*R*." مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ۳۱(۳): ۳۱۲-۳۲۴.

3-Abdali, N., Barth E., Norouzy A., Schulz R., Nau W. M., Kleinekathöfer U., Tauch A. and Benz R. (2013). "Corynebacterium jeikeium jk0268 constitutes for the 40 amino acid long PorACj, which forms a homooligomeric and anion-selective cell wall channel." PloS one **8**(10): e75651.

4- Bonal, C., Israëli Y., Morel J.-P. and Morel-Desrosiers N. (2001). "Binding of inorganic and organic cations by p-sulfonatocalix[4]arene in water: a thermodynamic study ″Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2(7): 1075-1078.

5- Carvalho, C. P., Norouzy A., Ribeiro V., Nau W. M. and Pischel U. (2015). "Cucurbiturils as

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.2.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۱۴۲-۱۲۸

supramolecular inhibitors of DNA restriction by type II endonucleases." Organic & biomolecular chemistry **13**(10): 2866-2869.

6- Da Silva, E. and Coleman A. W. (2003). "Synthesis and complexation properties towards amino acids of mono-substituted p-sulphonato-calix-[n]-arenes." Tetrahedron **59**(37): 7357-7364.

7- Guo, D.-S., Uzunova V. D ,.Su X., Liu Y. and Nau W. M. (2011). "Operational calixarene-based fluorescent sensing systems for choline and acetylcholine and their application to enzymatic reactions." Chemical Science **2**(9): 1722-1734.

8- Herce, H. D., Garcia A. E. and Cardoso M. C . ″ .(۲۰۱۴)Fundamental molecular mechanism for the cellular uptake of guanidinium-rich molecules." J Am Chem Soc **136**(50): 17459-17467.

9- Ikeda, A. and Shinkai S. (1997). "Novel Cavity Design Using Calix[n]arene Skeletons: Toward Molecular Recognition and Metal Binding." Chemical Reviews **97**(5): 1713-1734.

10- Jacob, M. H., Dsouza R. N., Ghosh I., Norouzy A., Schwarzlose T. and Nau W. M. (2012). "Diffusion-enhanced förster resonance energy transfer and the effects of external quenchers and the donor quantum yield." The Journal of Physical Chemistry B **117**(1): 185-198.

11- Martino, M., Gregoli L., Gaeta C. and Neri P. (2002). "Regioselective O-Substitution of p-tert-Butylcalix[7]arene." Organic Letters **4**(9): 1531-1534.

12- Norouzy, A., Assaf K. I., Zhang S., Jacob M. H. and Nau W. M. (2014). "Coulomb Repulsion in Short Polypeptides." The Journal of Physical Chemistry B **119**(1): 33-43.

13- Norouzy, A., Azizi Z. and Nau W. M. (2015). "Indicator displacement assays inside live cells." Angewandte Chemie International Edition **54**(3): 792-795.

14- Norouzy, A., Habibi-Rezaei M., Qujeq D., Vatani M. and Badiei A. (2010). "Adsorptive immobilization of acetylcholine esterase on octadecyl substituted porous silica: optical bio-analysis of carbaryl." Bulletin of the Korean Chemical Society **31**(1): 157-161.

15- Norouzy, A. and Nau W. (2014). "Synthetic macrocyclic receptors as tools in drug delivery and drug discovery." Drug Target Review.

16- Norouzy, A., Qujeq D. and Habibi-Rezaei M. (2009). "The inhibitory effect of dissolved carbaryl in dioxane on physically adsorbed acetylcholinesterase." Reaction Kinetics and Catalysis Letters **98**(2): 391.

17- Norouzy, A., Qujeq D. and Habibi-Rezaei M. (2015). "Evaluation and Characterization of Free and Immobilized Acethylcholinesterase with Fluorescent Probe, Differential Scanning Calorimetry and Docking." International Biological and Biomedical Journal **1**(3): 103-111.

18- Ogoshi, T., Kitajima K., Yamagishi T.-a. and Nakamoto Y. (2010). "Synthesis and Conformational Characteristics of Nonsymmetric Pillar[5]arene." Organic Letters **12**(3): 636-638.

19- Qujeq, D., Roushan T., Norouzy A., Habibi-Rezaei M. and Mehdinejad-Shani M. (2012). "Effects of dichlorvos and carbaryl on the activity of free and immobilized acetylcholinesterase." Toxicology and Industrial Health **28**(4): 291-295.

20- Shahabi, M., Hajihosseini R., Nau W. M., Noghabi K. A. and Norouzy A. (2020). "Augmenting Peptide Flexibility by Inserting Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) in Their Sequence." International Journal of Peptide Research and Therapeutics.

21- Shakibaie, M., Tabandeh F., Shariati P. and Norouzy A. (2018). "Synthesis of a thin-layer gelatin nanofiber mat for cultivating retinal cell." Journal of Bioactive and Compatible Polymers **33**(4): 371۳۸۱,-

22- Tan, S. Y., Ang C. Y. and Zhao Y. (2017). 5.17 - Smart Therapeutics Achieved via Host–Guest Assemblies. Comprehensive Supramolecular Chemistry II. J. L. Atwood. Oxford, Elsevier**:** 391-420.

مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) جلد ۳۶، شماره ۲، ۱۴۰۲
DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.2.5 مقاله پژوهشی، صفحات: ۱۴۲-۱۲۸

The Role of Pre-incubation in Formation of Supramolecular Complex Between Lucigenin and *p*-Sulfonatocalix[4]arene in Cell Culture Medium

Khosravi R. and Norouzy A.*

Dept of Bioprocess Engineering, Institute of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran. I.R. of Iran

Abstract

Lucigenin (LCG) is a fluorescent dye that can form supramolecular complex with *p*-Sulfonatoclix[4]arene by doing a simple incubation. By formation of CX4·LCG complex, fluorescence intensity of LCG is quenched. The complex is used in indicator displacement assay (IDA), in which an analyte (A) is incubated with the CX4·LCG complex, the A then displaces LCG and CX4·A complex forms in real time. The liberated LCG regains its fluorescence. In cell culture medium there are ample of competitor ligand molecules for LCG. The presence of competitors decreases the association constant (k_a) of LCG to CX4. In this study, the CX4·LCG complex were pre-incubated with tetra-arginine peptide in phosphate buffer, a solution devoid of any competitor molecule, prior to dilution with the cell culture medium to the desired concentration. The fluorescence intensity of the solution was measured hoping for maximum fluorescence recovery. Next time, all incubations were performed in the medium then the fluorescence was measured. Contrary to popular belief, two experiments did not show a significant difference *i.e.,* the k_a value remains unchanged. We concluded that the supramolecular interactions will come to a multi-lateral equilibrium; therefore, IDA can be used for monitoring and measuring the concentration of analyte-of-interest even in the presence of competitors in the cell culture medium which is an interesting solvent in many biological sciences.

Keywords: Fluorescence, Analyte, Supramolecular interaction, Indicator displacement assay