The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Mosul University/College of science
Department of Chemistry

Study and Isolation of Methionine Sulfoxide Reductase A in Patients with Autism and Down Syndrome and Its Relationship with Some Biochemical Parameters of the Neural Pathway

Othman Qusay Abdulhameed Khuder AlKassab

M.Sc. Thesis

Chemistry/ Biochemistry

Supervised by

Prof. Dr. Luay Abed Ali Al-Helaly

2024 A.D **1446 A.H**

Summary

Autism spectrum disorder (ASD) and Down syndrome (DS) are two distinct diagnoses, but both are linked to neurodevelopmental implications and cognitive impairment. Oxidative stress (OS) and neurotransmission abnormalities were observed in the brain of these patients, in which proteins and enzymes within brain are exposed to oxidative injury. Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) plays a vital role in repairing proteins and peptides that contain oxidized methionine. We introduced this antioxidant enzyme as a potential marker for OS and methionine oxidation, and we investigated its correlation with neurotransmission-related enzymes selected in the study. The study concentrated on the blood serum of DS and ASD in which the blood samples were taken from 25 DS individuals, 40 ASD patients (Dystocia problems were experienced by 15 individuals and 25 individuals had idiopathic autism) with age range of 5-26 years and 25 healthy persons as a control group with same ages.

The study has three aims: **first part (clinical part)**, investigating the levels of various biochemical parameters in the blood serum of these patients against healthy group which included MsrA and other oxidative stress-related parameters including thioredoxin (Trx), senescence marker protein-30 (SMP-30), peroxynitrite ($ONOO^-$) and malondialdehyde (MDA). Enzymes that affect neurotransmission including glutamate decarboxylase 1 brain (GAD67), catechol-o-methyltransferase (COMT), serotonin-N-acetyltransferase (AANAT), methionine adenosyltransferase (MAT) and monoamine oxidase (MAOA) in addition to total calcium, were also measured, and **Second Part,** the isolation and purification of MsrA from blood serum of healthy people by gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography and electrophoresis followed by the determination of its molecular weight

approximately and **third part** included studying the optimal conditions of MsrA and the influences of some pharmaceutical on its activity.

The results demonstrated that MsrA significantly decreased in both ASD and DS patients compared to control group while no alterations in its level was observed in dystocia related-ASD compared to idiopathic ASD. The levels of antioxidant SMP-30 in the blood serum of ASD and DS were significantly lower, the level of Trx was increased in both groups compared to healthy group. The concentrations of oxidants $ONOO^-$ were elevated while MDA did not elevate in DS. Serum levels of neurotransmission-related enzymes (GAD67, AANAT, COMT) increased significantly in ASD patients, similar to those of DS individuals, except for COMT, which did not change. On the same side, MAOA and MAT had a significant decrease in ASD individuals while no change was observed in DS. For dystocia-related ASD, compared to idiopathic autism, there were no alterations except for significant increases in GAD67 levels and decreases in MAOA and MAT levels.

Partial purification of MsrA reveals that this enzyme has one peak in gel filtration and ion exchange chromatography with an approximate molecular weight of (24641.1 Dalton), while the molecular weight was (27545.45 Dalton) that determined by SDS-PAGE electrophoresis and optimum conditions (20mg/mL for conc. of MsrA, pH7 in 55mmol/L of Tris-HCl, 10min and 34°C beside 5.263μmole/L, 847.5U/L for K_m and V_{max}).

It was noted that there are many drugs that have different rates of inhibition, especially Adrenaline and Ascorbic acid, which have a high rate of inhibition that reached -46.69 and -45.44, respectively. There is also a high rate of inhibition for the chemicals compounds of Calcium chloride ($CaCl_2$) and Cobalt chloride ($CoCl_2$), reaching -73.48 and -64.04 respectively.

الملخص

إضطراب طيف التوحد ومتلازمة داون هما حالتان مختلفتان من حيث السبب وبعض الأعراض ولكنهما مرتبطتان بإضطرابات النمو العصبي وضعف الإدراك. لقد تم ملاحظة وجود الكرب التأكسدي واضطرابات النقل العصبي في دماغ الافراد المصابين. يلعب إنزيم مثيونين سلفوكساید ردكتيز دورا هاما في إصلاح البروتينات والببتيدات المتأكسدة.

ركزت الدراسة على مصل الدم لدى الأفراد المصابون بمتلازمة دوان وإضطراب طيف التوحد، حيث تم جمع عينات الدم من 25 فردا من المصابين بمتلازمة داون و 40 فردا من المصابين باضطراب طيف التوحد(عانى 15 فردا منهم من مشاكل عسر الولادة بينما كان 25 فردا مصابا بالتوحد مجهول السبب) وبأعمار تتروح بين 26–5 سنة ولنفس الفئة العمرية تم سحب 25 عينة دم من أشخاص أصحاء كمجموعة ضابطة.

تتضمن هذه الدراسة هدفين: **الجزء الأول (الجزء السريري)**، تقييم مستويات بعض المتغيرات الكيموحيوية السريرية في مصل دم المرضى ومقارنتها مع المجموعة الضابطة حيث تضمنت قياس الإنزيم مثيونين سلفوكساید ردكتيز والمتغيرات المتعلقة بالكرب التأكسدي كالبيروكسي نتريت والمالوندايالديهايد والثايوريدوكسين وبروتين علامة الشيخوخة 30 وبيروكسي نيتريت ومالوندايالديهايد وكذلك تم قياس مستويات الأنزيمات لتي لها دور في النقل العصبي متمثلة بالكلوتاميت ديكاربوكسيليز 1 وكاتيكول أمين مثيل ترانسفيريز ووسيروتونين أستيل ترانسفيريز ومونو أمين أوكسيديز ومثيونين أدينوسيل ترانسفيريز بالإضافة الى ذلك قياس مستوى الكالسيوم الكلي. أما **الجزء الثاني**، فهو عزل و تنقية إنزيم مثيونين سلفوكساید ردكتيز من مصل الدم لأشخاص أصحاء بوساطة تقنية الترشيح الهلامي وكروماتوكرافيا التبادل الأيوني وكذلك الترحيل الكهربائي ثم إيجاد الوزن الجزيئي له والظروف المثلى.

لقد أظهرت النتائج وجود إنخفاض معنوي في فعالية إنزيم مثيونين سلفوكساید ردكتيز في مرضى التوحد ومتلازمة داون بينما لم يتغير عند مجموعة التوحد المرتبطة بعسر الولادة. كانت مستويات مضادات الأكسدة الأخرى من بروتين علامة الشيخوخة 30 منخفض بشكل معنوي عند المرضى وأما الثايوريدوكسين فقد إرتفع تركيزه معنويا مقارنة بمجموعة السيطرة. كان هناك إرتفاع في تركيز البيروكسي نيتريت في كلا المرضين بينما لم يكن هناك إرتفاع معنوي في مستوى المالوندايالديهليد عند مرضى متلازمة داون. كذلك أظهرت النتائج وجود إرتفاع معنوي في مستويات الكلوتاميت ديكاربوكسيليز 1 و سيروتونين أستيل ترانسفيريز وكاتيكول أمين مثيل ترانسفيريز في مصل دم مرضى التوحد وكذلك مرضى متلازمة داون بإستثناء أنزيم كاتيكول أمين مثيل ترانسفيريز الذي لم يتغير مستواه بشكل ملحوظ. أظهرت مستويات الإنزيمات مونو أمين أوكسيديز ومثيونين أدينوسيل ترانسفيريز إنخفاضا معنويا في مصل دم مرضى التوحد بينما لم يكن هناك تغيرات في مستويات هذين الإنزيمين عند مرضى متلازمة داون. أما

مصل دم مرضى التوحد المرتبط بعسرة الولادة أظهر إرتفاعا معنويا في تركيز كلوتاميت ديهايدروجينيز 67 وإنخفاضا في مونو أمين أوكسيديز ومثيونين أدينوسيل ترانسفيريز مقانة مع الأفراد المصابين بمرض التوحد مجهول السبب.

فيما أظهرت نتائج تنقية الإنزيم وجود قمة واحد في كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي وكروماتوكرافيا التبادل الأيوني مع وزن جزيئي تم تقديره بحوالي(24641.1) دالتون بينما كان وزنه الجزيئي (27545.45) دالتون عندما تم تقديره بتقنية الترحيل الكهربائي والظروف المثلى كانت تشمل: تركيز الإنزيم 20 ملغرام لكل مل في المحلول المنظم نوع ترس الهايدروكلوريك بتركيز 55 مل مولاري عند أس هيدروجيني يساوي 7 وكانت مدة التحضين للتفاعل 10 دقائق عند 34 درجة مئوية. بالإضافة الى ان قيمة ثابت مكيليس–منتن K_m 5.263 مايكرومول لكل لتر بينما كانت قيمة السرعة القصوى V_{max} تساوي 847.5 وحدة انزيمية لكل لتر.

تم ملاحظة وجود تأثير على فعالية الأنزيم للعديد من العقاقير والتي أظهرت معدلات مختلفة من التثبيط، خاصة: الأدرينالين وحامض الأسكوربيك، اللذين يظهران معدل تثبيط عالي وصل إلى 46.69– و 45.44– على التوالي. هناك أيضًا معدل تثبيط عالي لمركبات كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) وكلوريد الكوبالت($CoCl_2$) ، حيث وصل إلى 73.48– و 64.04– على التوالي.

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل/كلية العلوم
قسم الكيمياء

دراسة وعزل إنزيم مثيونين سلفوكسايد ردكتيز A لدى مرضى التوحد ومتلازمة داون وعلاقته مع بعض المتغيرات الكيموحيوية للمسار العصبي

عثمان قصي عبد الحميد خضر القصاب

رسالة ماجستير

الكيمياء/ الكيمياء الحياتية

بإشراف

الأستاذ الدكتور لؤي عبد علي الهلالي

1446 هـ **2024 م**