

بررسی اثرات سینتیکی و ترمودینامیکی سوربیتول بر روی سودوموناس فلئورسانس لپاز

فروغ حکیمی نیا¹، خسرو خلیفه²، خسرو خواجه³، بیژن رنجبر^{4*}

1- دکتری بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

2- استادیار بیوفیزیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان

3- استاد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

4- استاد بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

* تهران، کد پستی 14115-175

ranjbarb@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: 93/12/26 پذیرش مقاله: 94/9/1)

چکیده - لپازها به عنوان یک گروه آنزیمی مهم باعث هیدورلیز و سنتز استرها می‌شوند. لپاز سودوموناس فلئورسانس یک نوع گرمادوست از لپازها است که وزن مولکولی آن در حدود 33 کیلودالتون می‌باشد. در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف سوربیتول بر روی فعالیت و پایداری کنفورماسیونی سودوموناس فلئورسانس لپاز با استفاده از تکنیک‌های جذب و دورنگ‌نمایی دورانی مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج مطالعات ترمودینامیکی غلظت 0/6 مولار سوربیتول برای اندازه‌گیری‌های سینتیکی بازتاخوردگی و اسرشتگی با استفاده از دستگاه فلئورسانس جریان متوقف انتخاب شد. نتایج مطالعات سینتیکی نشان داد که اسرشتگی لپاز از طریق دو مسیر متفاوت صورت می‌گیرد، یکی از آن‌ها مستلزم اسرشتگی و جدا شدن همزمان زیرواحدها بوده و دیگری دربرگیرنده یک فرایند دو مرحله‌ای شامل جدا شدن زیرواحدها و به دنبال آن اسرشتگی کامل زیرواحدها می‌باشد. یافته‌های بدست آمده حاکی از آن بود که در حضور سوربیتول بیشتر جمعیت ملکول‌ها از طریق مسیر آهسته دچار اسرشتگی می‌شوند. نتایج سینتیکی بازتاخوردگی نیز نشان داد که در حضور سوربیتول سد انرژی واکنش بازتاخوردگی کاهش پیدا می‌کند.

کلیدواژگان: سوربیتول، سودوموناس فلئورسانس لپاز، سینتیک، اسرشتگی، بازتاخوردگی.

1- مقدمه

این آنزیم وظیفه‌ی هیدورلیز لپیدها با ویژگی‌پذیری¹ انتخابی مبتنی بر انانتیومری استرها را بر عهده دارد، بنابراین از این دسته از لپازها برای مصارف صنعتی و

سودوموناس فلئورسانس لپاز (EC 3.1.1.3) یک زنجیره پلی‌پپتیدی است که در حالت تکی از 296 اسیدآمینو با وزن مولکولی حدود 33 کیلودالتون تشکیل شده است.

1. Specificity

شیمیایی به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود [2,1]. سودوموناس فلوئورسانس لیپاز مکانیسم متفاوتی برای هیدرولیز از خود نشان می‌دهد که به آن فعال‌سازی سطحی می‌گویند. این نوع فعال‌سازی به دلیل وجود ساختار متحرک جایگاه فعال لیپاز به نام دریچه می‌باشد که در فرم فعال آنزیم، این دریچه از روی جایگاه اتصال آنزیم و سوبسترا کنار می‌رود. بر این اساس، دو شکل باز و بسته آنزیم وجود دارد که شکل باز آنزیم همان حالت فعال و فرم بسته حالت غیرفعال آنزیم می‌باشند. بر این اساس، برای فعالیت این لیپاز ایجاد حالت باز آنزیم ضروری است زیرا فقط در حالتی که دریچه بر روی جایگاه فعال قرار ندارد سوبسترا می‌تواند به لیپاز متصل شود [3-5].

جایگاه‌های هیدروفوبی سودوموناس فلوئورسانس لیپاز با ایجاد میانکنش‌های آبریز باعث دوتایی شدن² این لیپاز با وزن مولکولی حدود 66 کیلوالتون می‌شوند. سودوموناس فلوئورسانس لیپاز می‌تواند حتی در غلظت‌های میانه‌ی آنزیمی نیز ساختار دوتایی به خود بگیرد. اما در غلظت‌های خیلی پایین از لیپاز و یا در حضور دترجنت‌هایی مانند تریتون X-100 این فرم دوتایی به حالت تکی تبدیل می‌شود [6-9].

تاخوردگی پروتئین‌های دوتایی از طریق مکانیسم‌های متفاوتی انجام می‌گیرد که از حالت انتقال دو حالت³ شامل تنها فرم دوتایی طبیعی و یا تکی واسرشته) تا تشکیل انواع متفاوتی از حدواسط‌های تکی یا دوتایی می‌باشد. البته مکانیسم تاخوردگی دو حالت فقط در فرم‌های دوتایی کوچک قابل تشخیص است [10-12].

سوربیتول به عنوان یک قند الکلی با فرمول شیمیایی $C_6H_{14}O_8$ در طی فرایندهای متابولیسم ایجاد می‌شود. این سوربیتول شیرین‌کننده از احیای گلوکز و جابجایی گروه آلدئید با هیدروکسیل به دست می‌آید. در این مقاله تأثیر

سوربیتول به عنوان یک اسمولیت بر فعالیت، پایداری ترمودینامیکی و همچنین سینتیک تاخوردگی لیپاز مورد بررسی قرار گرفته است [13,14].

2- مواد و روش‌ها

سودوموناس فلوئورسانس لیپاز از شرکت سیگما (st.louis,MO,USA) خریداری شد سپس عمل حذف دترجنت‌ها از محیط آنزیمی توسط دیالیز در بافر تریس-HCL با pH برابر با 8 و غلظت 100 میلی‌مولار انجام گرفت. دیالیز در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در حجم 1 لیتر از بافر به مدت 14 ساعت صورت گرفت سپس نمونه‌های دیالیز شده تعیین غلظت شدند. در مرحله بعد برای حصول اطمینان، وزن مولکولی لیپاز با استفاده از تکنیک SDS-PAGE مشخص شد. برای تعیین فعالیت سودوموناس فلوئورسانس لیپاز از غلظت 0/05 mg/ml پروتئین استفاده شد. این کار در غلظت‌های مختلف سوربیتول (0 تا 1 M) انجام شد. برای این کار از ترکیب پارائیتروفنیل پالمیتات (PNPP) به عنوان سوبسترا و دستگاه طیف‌سنج UV/Vis استفاده شد. طول موج مورد استفاده 410 نانومتر و زمان مورد نیاز برای انجام واکنش 30 ثانیه در نظر گرفته شد [7].

2-1- تکنیک دورنگ‌نمایی دورانی

موادی که از نظر جذب متفاوت نور راست‌گرد و چپ‌گرد فعال باشند، دارای طیف دورنگ‌نمایی دورانی⁴ می‌باشند. این پدیده در کروموفورهای رخ می‌دهد که به لحاظ شیمیایی نامتقارن بوده و یا در محیطی نامتقارن قرار گرفته باشند. در این تحقیق سیگنال دورنگ‌نمایی دورانی در محدوده ناحیه دور از طیف ماورای بنفش⁵ توسط دستگاه اسپکتروپلاریومتر JASCO-J-715 ثبت گردید. غلظت پروتئین مورد استفاده در این مرحله 0/2 mg/ml بود.

4. Circular Dichroism (CD)

5. Far-UV CD

2. Dimerization

3. Two-State Transition

تغییرات طول موج نشری از فلئورسانس در طول موج 340 نانومتر برحسب زمان ثبت گردید.

برای آزمایش‌های بازتاخوردگی، ابتدا پروتئین لیپاز در بافر اوره با غلظت 4 مولار به مدت 5 ساعت انکوبه گردید و پس از به تعادل رسیدن واکنش واسرشتگی و ثابت شدن نسبت تعداد پروتئین‌های واسرشته به تاخورده، آزمایش‌های بازتاخوردگی انجام شد. بدین صورت که پروتئین واسرشته را در سرنگ شماره 1 و بافر را در سرنگ شماره 2 ریخته و با مخلوط کردن محتوای این دو سرنگ به نسبت 1:6 و رقیق شدن ناگهانی اوره در محلول حاوی پروتئین، شرایط برای تاخوردن پروتئین فراهم شد، با این توضیح که در این بافر غلظت‌های مورد نظر از سوربیتول استفاده شده، و عمل بازتاخوردگی در غلظت‌های مختلف سوربیتول ثبت گردید. با ثبت فلئورسانس ناشی از تهییج در 280 نانومتر بلافاصله پس از شروع واکنش یک منحنی نمایی که نشان‌دهنده کاهش تدریجی تعداد مولکول‌های واسرشته و افزایش تدریجی مولکول‌های بازتاخورده می‌باشد به دست آمد. تفسیر داده‌ها با در نظر داشتن پیش‌فرض‌های ترمودینامیک کلاسیک آماری صورت گرفت.

در واکنش واسرشتگی، پروتئین موجود در بافر در سرنگ شماره 1 و بافر حاوی اوره 4 مولار همراه با غلظت‌های مورد نظر سوربیتول در سرنگ شماره 2 ریخته شد و عمل بازشدن لیپاز با مخلوط کردن ناگهانی پروتئین و اوره به نسبت 1:6 شروع شد و یک طیف نمایی دیگر بدست آمد که نشان دهنده افزایش تدریجی تعداد مولکول‌های واسرشته و کاهش همزمان تعداد مولکول‌های طبیعی می‌باشد.

منحنی‌های نمایی یا همان نتایج سینتیکی بدست آمده توسط دستگاه با معادله نمایی (1) تطبیق داده شد و پارامتر مجهول یعنی ثابت سرعت واکنش بدست آمد.

$$Y = at + b + \sum_i^n c_i e^{-kt} \quad (1)$$

نتایج به صورت بیضی‌واری مولی⁶ ($[\theta] \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) و بر اساس میانگین وزن اسیدهای آمینه ارائه شد. این پارامتر با فرمول $[\theta]_\lambda = (\theta \times 100 \text{ MRW}) / (cl)$ محاسبه گردید که در آن c غلظت پروتئین برحسب mg/ml، l طول مسیر عبور نور بر حسب سانتیمتر از کووت حاوی نمونه و θ پارامتر بیضی‌واری اندازه‌گیری شده بر حسب درجه در طول موج λ می‌باشد. سپس آشفتگی‌های موجود در طیف‌ها توسط نرم‌افزار کاهش‌دهنده آشفتگی بر مبنای عمل تبدیل فوریه با کمترین تغییر در شکل پیک همراه با بیشترین کاهش آشفتگی برطرف گردید و پس از آن با استفاده از نرم‌افزار JASCO درصد ساختارهای دوم در پروتئین مورد نظر و تغییرات این ساختار تحت تأثیر سوربیتول تعیین شد [16,15].

2-2- مطالعات سینتیکی

تکنیک جریان متوقف⁷ امروزه رایج‌ترین روش برای مطالعات سینتیکی و ثبت وقایع اولیه در واکنش‌های سریع می‌باشد. در این روش حجم کمی از محلول‌های واکنش‌دهنده از طریق سرنگ‌های حاوی محلول‌های مورد نظر با سرعت بالا به یک مخلوط‌کننده مناسب منتقل می‌شوند تا واکنش در کووت آغاز گردد. این تکنیک اطلاعات خود را بر مبنای تغییرات جذب، فلئورسانس، دورنگ‌نمایی دورانی و پراکنش نوری به دست می‌دهد. مهمترین کاربرد این تکنیک بدست آوردن ثابت سرعت واکنش می‌باشد که در این مقاله پارامتر مورد نظر با k نشان داده شده است.

در این آزمایش از دستگاه فلئورسانس جریان متوقف با مشخصات Biologic μ -SFM-20 همراه با کووت 0/8 استفاده شد و تغییرات طیف فلئورسانس بر حسب زمان ثبت گردید. سپس نتایج بدست آمده با نرم‌افزار Biokin آنالیز شد. برای این بررسی پس از مخلوط شدن مواد موجود در سرنگ‌ها با عمل تحریک در 280 نانومتر

6. Molar Ellipticity

7. Stopped-Flow

3- نتایج

3-1- فعالیت سنجی سودوموناس فلوئورسانس لیباز

فعالیت آنزیم با استفاده از سوبسترای آن یعنی پارائیتروفنیل پالمیتات و در حضور غلظت‌های مختلف سوربیتول مورد سنجش قرار گرفت؛ البته فعالیت آنزیم بدون حضور سوربیتول نیز به عنوان کنترل منفی مورد بررسی قرار گرفت. شکل 1 نتایج حاصل از فعالیت‌سنجی آنزیم را نشان می‌دهد [20-23].

با توجه به این نمودار فعالیت آنزیم ابتدا با افزایش غلظت سوربیتول کاهش یافته و به نقطه حداقل خود در محدوده غلظتی 0/2 تا 0/4 مولار سوربیتول می‌رسد و سپس دوباره شروع به افزایش کرده تا اینکه از غلظت 0/6 مولار سوربیتول فعالیت دوباره شروع به کاهش می‌کند تا در نقطه 1 مولار دوباره به نقطه حداقل خود برسد که این نقطه مطابق با نقطه‌ی حداقل قبلی یعنی محدوده غلظتی 0/2 تا 0/4 مولار است. در نتیجه این نمودار یک شکل نسبتاً سینوسی را برای فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف سوربیتول از خود نشان می‌دهد.

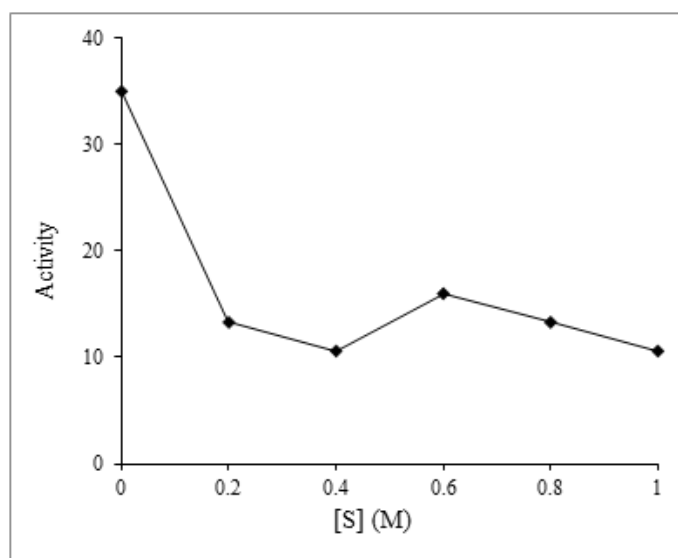
در این رابطه a شیب منحنی، b محل تقاطع خط مبنای منحنی با محور y و c دامنه می‌باشد.

با استفاده از این شیوه آنالیز، ثابت‌های سرعت پروتئین لیباز در شرایط مختلف بدست می‌آید که با دیمانسیون s^{-1} بیان می‌شود. برازش مطابق با منحنی از طریق تست‌های آماری تعیین شده و میزان صحت تطبیق معادله با نتایج آزمایشگاهی معلوم می‌شود [17-19].

از طرف دیگر برای بدست آوردن سطح انرژی گذار، ثابت سرعت واکنش و اسرشتگی را در رابطه (2) قرار داده و تغییرات انرژی حالت گذار ΔG_{\ddagger} نسبت به حالت تاخوردگی در مورد طیف‌های سینتیکی محاسبه می‌گردد.

$$k = \left(\frac{K_B T}{h} \right) \exp\left(\frac{-\Delta G_{\ddagger}}{RT} \right) \quad (2)$$

در این رابطه k ثابت سرعت واکنش و اسرشتگی می‌باشد که اطلاعات آن از طیف‌های سینتیکی و اسرشتگی یا بازتاخوردگی بدست می‌آید. K_B ثابت بولتسمن، T دمای آزمایش برحسب درجه کلین و h ثابت پلانک است. ΔG_{\ddagger} انرژی آزاد فعال‌سازی یا سد انرژی واکنش تبدیل از حالت تاخوردگی به واسرشته (و یا برعکس) می‌باشد.



شکل 1 نمودار فعالیت لیباز برحسب غلظت‌های مختلف سوربیتول، S سوربیتول. نمودار در حضور پروتئین لیباز، PNPP به عنوان سوبسترا و غلظت‌های خاص سوربیتول بدست آمده است.

دیده می‌شود. علاوه بر این در غلظت 0/6 مولار سوربیتول بخش عمده‌ای از ساختار آلفای القا شده در پروتئین ناشی از کاهش پیچیده نامنظم و تبدیل آن به آلفا است.

3-3- مطالعات سینتیکی

با در نظر گرفتن مطالعات فعالیت‌سنجی و ساختاری مشخص گردید که در غلظت 0/6 مولار سوربیتول توام با افزایش ساختار آلفا فعالیت نیز نسبت به غلظت‌های قبل و بعد از این مقدار افزایش پیدا کرده است. بنابراین غلظت 0/6 مولار سوربیتول را برای انجام مطالعات سینتیکی و اسرشتگی و بازتاخوردگی انتخاب کرده و این واکنش‌ها در این غلظت و همچنین عدم حضور سوربیتول مورد بررسی قرار گرفتند. در شکل 2 طیف‌های سینتیکی و اسرشتگی پروتئین لیپاز در حضور و عدم حضور سوربیتول نشان داده شده است. در آنالیز این طیف‌ها می‌توان آن‌ها را با معادله نمایی مرتبه اول و یا مرتبه دوم (معادله 1) در بخش مواد و روش‌ها) مطابقت داده و به ترتیب 1 یا 2 ثابت سرعت از داده‌های آزمایشگاهی به دست آورد (شکل 3).

در عمل مطابق شکل 4 که مربوط به آنالیز طیف سینتیکی بازتاخوردگی لیپاز در حضور سوربیتول می‌باشد بهتر است که منحنی با معادله‌ی نمایی مرتبه دوم مطابقت داده شود زیرا در این حالت میزان برازش بیشتر می‌شود.

با قرار دادن ثابت‌های سرعت حاصل از جورشدگی طیف‌های نمایی در معادله 2 سد انرژی واکنش و اسرشتگی بدست می‌آید. نتایج حاصل از این شیوه آنالیز و محاسبات مربوطه در جدول 2 آورده شده است. در این جدول k ثابت سرعت بوده و دیمانسیون آن S^{-1} است. T زمان آسایش با واحد S بوده و W بر حسب درصد، جمعیت مولکول‌های متعلق به هر ثابت سرعت بوده و فاقد دیمانسیون می‌باشد. ΔG_+ تغییرات انرژی آزاد واکنش و اسرشتگی برحسب $kcal/mol$ می‌باشد.

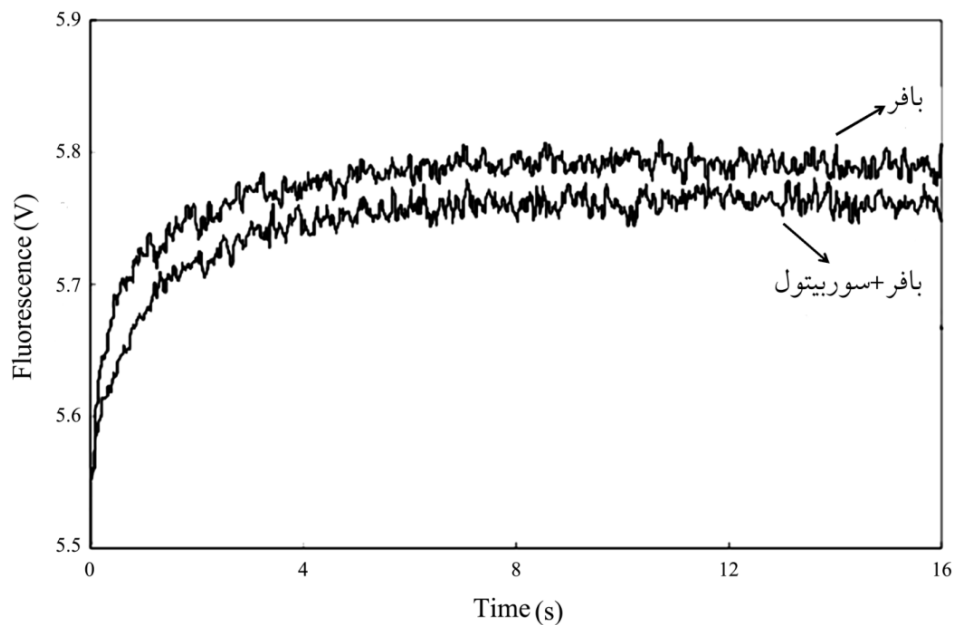
3-2- مطالعات ساختاری با استفاده از تکنیک CD

برای مطالعه تغییرات ایجاد شده در محتوای ساختار دوم پروتئین در حضور و عدم حضور سوربیتول از روش طیف‌سنجی دو رنگ نمایی دورانی در ناحیه دور استفاده شد. توجه داشته باشید که این طیف‌سنجی پس از چند ساعت انکوبه کردن پروتئین با سوربیتول و حصول اطمینان از به تعادل رسیدن واکنش‌ها انجام شده است. جدول 1 نشان دهنده تغییرات ایجاد شده در مارپیچ‌های آلفا، صفحات بتا و همچنین ساختارهای پیچیده نامنظم تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سوربیتول می‌باشد.

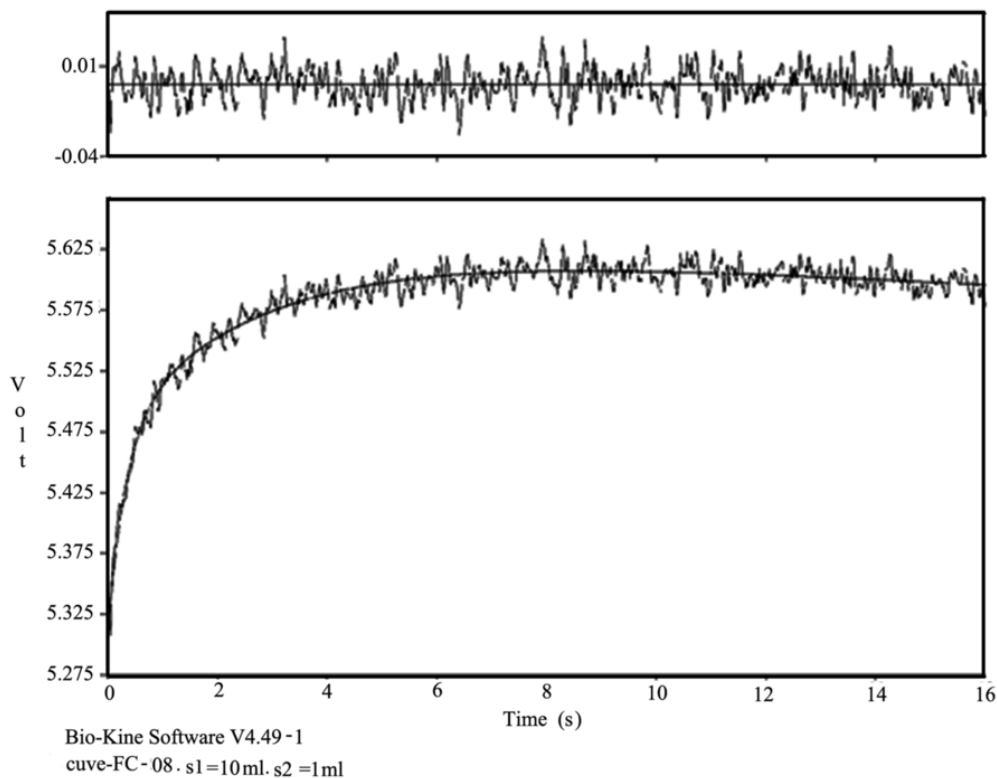
جدول 1 درصد ساختارهای متفاوت لیپاز در شرایط بافری مختلف بر اساس نتایج طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی در ناحیه ماورای بنفش دور

	درصد عناصر ساختار دوم		
	مارپیچ آلفا	صفحات بتا	پیچیده نامنظم
لیپاز	30/7	56/2	13/1
لیپاز+غلظت 0/2 مولار سوربیتول	0/1	57/2	42/7
لیپاز+غلظت 0/4 مولار سوربیتول	31/9	68/1	0
لیپاز+غلظت 0/6 مولار سوربیتول	41/8	58/2	0
لیپاز+غلظت 0/8 مولار سوربیتول	0	32/5	67/5
لیپاز+غلظت 1 مولار سوربیتول	20/8	52/9	26/3

دقت در این نتایج نشان می‌دهد که در حضور سوربیتول درصد ساختار آلفا به صورت سینوسی تغییر می‌کند، به طوری که در غلظت 0/6 مولار سوربیتول بیشترین القای ساختار آلفا در پروتئین دیده می‌شود در حالی که در غلظت‌های 0/8 و 0/2 مولار بیشترین کاهش در این ساختار



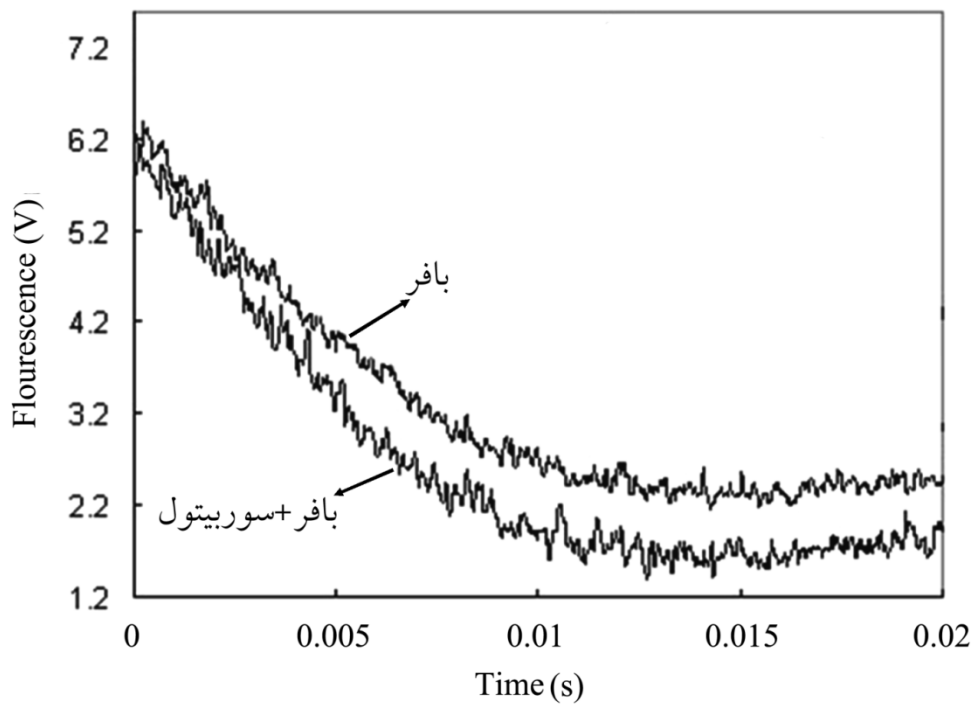
شکل 2 طیف سینتیکی واکنش واسرشتگی پروتئین سودوموناس فلوئورسانس لیپاز تحت تاثیر اسمولیت سوربیتول. طیف‌ها از پایین به بالا در شرایط حضور سوربیتول و بدون سوربیتول.



شکل 3 برازش منحنی طیف سینتیکی واسرشتگی سودوموناس فلوئورسانس لیپاز در حضور اسمولیت سوربیتول با معادله حاوی دو ثابت سرعت. کادر بالایی نشان‌دهنده برازش بالا می‌باشد.

در شکل 4 طیف‌های سینتیکی بازتاخوردگی پروتئین سودوموناس فلوئورسانس لپياز در حضور غلظت 0/6 مولار سوربیتول و عدم حضور آن آمده است. همان‌طور که از شکل ظاهری طیف‌ها مشخص است لپياز در هر دو شرایط آزمایش تقریباً در 0/015 ثانیه ساختار طبیعی خود را بدست می‌آورد با این حال در حضور سوربیتول منحنی مربوطه با شیب تندتری این واکنش را به انجام می‌رساند. آنالیز این طیف‌ها با استفاده از معادله نمایی درجه اول صورت گرفته و یک ثابت سرعت از هرکدام از طیف‌های

سینتیکی بازتاخوردگی بدست آمد. به عبارت دیگر چه در حضور و چه در عدم حضور سوربیتول ملکول‌های لپياز فقط یک مسیر را برای رسیدن به حالت طبیعی از حالت واسرشته انتخاب می‌کنند. نتایج حاصل از آنالیز و محاسبات آزمایش‌های بازتاخوردگی در جدول 3 آمده است. در این جدول k ثابت سرعت بوده و دیمانسیون آن S^{-1} است. T زمان آسایش با واحد S بوده و ΔG_{\pm} تغییرات انرژی آزاد واکنش بازتاخوردگی برحسب $kcal/mol$ می‌باشد.



شکل 4 طیف سینتیکی مربوط به واکنش بازتاخوردگی سودوموناس فلوئورسانس لپياز در حضور و عدم حضور اسمولیت سوربیتول

جدول 2 پارامترهای سینتیکی واسرشته‌گی لپياز در حضور و عدم حضور سوربیتول

	پارامترهای سینتیکی							
	k_1	k_2	W_1	W_2	ΔG_{\pm}^1	ΔG_{\pm}^2	T_1	T_2
لپياز	$6/16 \pm 0/26$	$0/44 \pm 0/003$	43/14	56/86	16/31	17/93	0/16	2/24
لپياز+سوربیتول	$13/44 \pm 0/82$	$0/67 \pm 0/005$	38	62	15/93	17/62	0/07	1/49

در این جدول k ثابت سرعت بوده و دیمانسیون آن S^{-1} است. T زمان آسایش با واحد S بوده و W بر حسب درصد، جمعیت مولکول‌های متعلق به هر ثابت سرعت بوده و فاقد دیمانسیون می‌باشد. ΔG_{\pm} تغییرات انرژی آزاد واکنش واسرشته‌گی برحسب $kcal/mol$ می‌باشد.

جدول 3 پارامترهای سینتیکی بازتاخوردگی لیپاز در حضور و

عدم حضور سوربیتول			
پارامترهای سینتیکی			
	k	ΔG_+	T
لیپاز	57/17+ 0/02	15/01	0/01
لیپاز+سوربیتول	74/16+0/05	14/92	0/01

در این جدول k ثابت سرعت بوده و دیمانسیون آن S^{-1} است. T زمان آسایش با واحد S بوده و ΔG_+ تغییرات انرژی آزاد واکنش بازتاخوردگی برحسب kcal/mol می باشد.

3-4- فرونشانی داخلی در سودوموناس فلئورسانس

لیپاز

برطبق طیف‌های فلئورسانس جریان متوقف پدیده فرونشانی داخلی در پروتئین لیپاز دیده شد. این پدیده عجیب برای خانواده پروتئین‌هایی با تعداد کم تریپتوفان مشاهده می‌شود. در حالتی که فرونشانی در اثر عوامل خارجی غیر از ساختار خود پروتئین باشد، علت آن جابجایی تریپتوفان از یک محیط غیرقطبی به محیط قطبی و در پی آن واکنش با مولکول‌های قطبی حلال و یا ملکول‌های دیگری در حلال است که از آن‌ها با عنوان عوامل فرونشان خارجی نام برده می‌شود. بنابراین انتظار می‌رود که توأم با باز شدن پروتئین شدت طیف فلئورسانس تریپتوفان شروع به کاهش نماید. با این حال در مورد لیپاز وضعیت به گونه دیگری است به این معنا که توأم با باز شدن پروتئین افزایش فلئورسانس تریپتوفان مشاهده می‌شود. لذا می‌توان گفت که در ساختار فشرده و طبیعی این پروتئین فلئورسانس ناشی از ملکول‌های تریپتوفان توسط بخش‌هایی در داخل ساختار پروتئین دچار فرونشانی می‌شوند که با باز شدن ساختار و کنار رفتن این عوامل داخلی فرونشان طیف فلئورسانس افزایش می‌یابد [25,24].

این نکته مشخص شده است که سودوموناس فلئورسانس لیپاز مورد مطالعه فقط دارای 4 عدد

تریپتوفان می‌باشد. لذا این ساختار با استفاده از نرم‌افزار SPDBV مورد آنالیز قرار گرفت و نتایج حاصل از این آنالیز به صورت برهمکنش اسیدهای آمینه درگیر در پدیده فرونشانی داخلی با تریپتوفان‌های موجود در ساختار پروتئین مطابق جدول 4 بدست آمد.

با توجه به مقالات موجود، فاصله مورد نیاز اسیدهای آمینه‌ای که به نظر می‌رسد باعث فرونشانی می‌شوند (Glu-His-Asn-Asp-Cys- Tyr-Phe-Gln) کمتر از 6Å تخمین زده شده است [26]. بنابراین نتایج جدول 4 به خوبی می‌تواند توجیه کننده فرونشانی داخلی در ساختار لیپاز باشد. تریپتوفان‌های شماره 29، 99، 187 و 203 چهار تریپتوفان موجود در پروتئین لیپاز می‌باشند و برهم‌کنش‌های هر کدام از تریپتوفان‌ها نشان‌دهنده اسید- آمینه‌های عامل فرونشانی مجاور با تریپتوفان‌ها می‌باشد. بر اساس جدول 4 علت ایجاد فرونشانی داخلی در سودوموناس فلئورسانس لیپاز مشخص می‌شود که حضور اسید آمینه‌های ایجادکننده فرونشانی در اطراف 4 اسید آمینه تریپتوفان و در فاصله نزدیک به آنها باعث ایجاد این حالت می‌شود.

جدول 4 برهمکنش‌های تریپتوفان با اسیدهای آمینه‌ی عامل

فرونشانی داخلی در لیپاز

اسید آمینه‌های تریپتوفان	برهمکنش‌های تریپتوفان
Trp29	Tyr28-Asn78-His82-Phe284
Trp99	Gln66-Asp98
Trp187	Glu186-Tyr247
Trp203	Tyr259-His287-Phe284

4- بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیقات زیست‌فناوری معمولاً از اسمولیت‌ها برای القای بازتاخوردگی پروتئین‌ها و پایدارسازی آنها استفاده می‌شود. سوربیتول به عنوان یک قند الکلی از نظر بار

ساختار پیچیده نامنظم نیز بالا می‌رود و این کاهش فعالیت تا غلظت 1 مولار سوربیتول ادامه می‌یابد که آن نیز به دلیل القای ساختار بتا می‌باشد. به نظر می‌رسد که فعالیت بهینه در ترکیب‌بندی خاصی از مجموعه ساختارهای دوم وجود دارد و بهترین حالت در شرایط بافری و بدون حضور اسمولیت بوده و در حضور غلظت 0/6 مولار سوربیتول نیز اگرچه ترکیب‌بندی انواع ساختارها موجب فعالیت آنزیم مشابه شرایط عدم حضور سوربیتول نمی‌شود ولی در این غلظت؛ پروتئین نسبت به بقیه غلظت‌ها فعالیت بهتری از خود نشان می‌دهد.

برای مطالعات سینتیکی واسرشتگی و بازتاخوردگی سدوموناس فلوئورسانس لپاز در حضور اوره از تکنیک فلوئورسانس جریان متوقف استفاده شد. بررسی کیفی منحنی واکنش واسرشتگی لپاز (شکل 2) نشان می‌دهد که توام با واسرشته شدن پروتئین و افزایش نسبت تعداد پروتئین‌های واسرشته به پروتئین‌های طبیعی شدت فلوئورسانس افزایش می‌یابد. با توجه به اینکه معمولاً در هنگام واسرشتگی بیشتر پروتئین‌ها به علت قرار گرفتن کروموفورهای مورد بررسی (تریپتوفان و تیروزین) در معرض محیط قطبی شدت فلوئورسانس کاهش پیدا می‌کند، لذا افزایش شدت فلوئورسانس توام با باز شدن ساختار پروتئین در لپاز حاکی از احتمالاً فرونشانی داخلی می‌باشد، به این معنا که در حالت طبیعی احتمالاً کروموفورها در موقعیتی از ساختار قرار گرفته‌اند که در فاصله نزدیک نسبت به عوامل فرو نشان داخلی بوده و بخشی از فوتون‌های فلوئورسانس ناشی از نشر این کروموفورها توسط این عوامل فرو نشان جذب می‌شود به طوری که با کنار رفتن این عوامل در اثر باز شدن ساختار پروتئین؛ بخشی از فوتون‌ها که قبلاً به دام می‌افتادند اکنون آزاد شده و به سمت آشکارساز گسیل می‌شوند، البته به علت قرار گرفتن در محیط قطبی و میانکنش با ملکول‌های آب (جدول 4) در هنگام واسرشتگی یک

الکتریکی خنثی است، علاوه بر این با وزن مولکولی پایین می‌تواند فرایند بازتاخوردگی پروتئین را مطلوب نماید. سوربیتول با توجه به اثر اسمولیتیکی خود می‌تواند پیوندهای مطلوبی بین خود و ساختار طبیعی پروتئین برقرار کرده و در نتیجه تعادل را به سمت تشکیل حالت طبیعی پروتئین پیش برد. در این تحقیق با توجه به مشاهده اثرات غیرطبیعی غلظت 0/6 مولار سوربیتول بر روی فعالیت پروتئین لپاز از این غلظت برای مطالعات بازتاخوردگی و واسرشتگی استفاده شد.

با توجه به شکل 1 و جدول 1 روند کاهش فشرده‌گی ساختار و سپس افزایش بازتاخوردگی ساختار آنزیم با تغییرات فعالیت برحسب غلظت سوربیتول مطابقت دارد یعنی کاهش فشرده‌گی ساختار آنزیم رابطه مستقیمی با کاهش فعالیت آنزیم دارد. بنابراین می‌توان گفت که برهم خوردن ساختار و شکل فضایی جایگاه فعال بر اثر کاهش مارپیچ آلفا و افزایش صفحات بتا و شل شدن احتمالی جایگاه فعال بر اثر افزایش درصد پیچیده نامنظم دلالت بر این نکته دارد که با افزایش غلظت سوربیتول تا 0/4 مولار و ادامه این روند القای ساختاری همراه با کاهش فعالیت مشاهده می‌شود. بعد از گذر از غلظت 0/4 مولار سوربیتول، در غلظت 0/6 مولار سوربیتول افزایش فعالیت مشاهده می‌شود که بعد از بررسی‌های انجام شده با تکنیک دورنگ‌نمایی دورانی در ناحیه دور مشخص می‌شود که در این غلظت از سوربیتول درصد مارپیچ آلفا افزایش یافته و از میزان پیچیده نامنظم نسبت به قبل کاسته شده است پس ایجاد مارپیچ آلفا همراه با افزایش فعالیت بوده است، البته در این نقطه باز هم همچنان فعالیت آنزیم از حالت بدون اسمولیت کمتر می‌باشد. بررسی‌ها در غلظت‌های بالاتر سوربیتول نشان می‌دهد که بعد از غلظت 0/8 مولار میزان فعالیت با شیب تندی شروع به کاهش می‌نماید و در این غلظت، درصد مارپیچ آلفا نیز دوباره شروع به کاهش شدید می‌نماید و به همان اندازه میزان

وجود ندارد. اما در مورد جمعیتی از مولکول‌ها که با ثابت سرعت کندتر به حالت واسرشته می‌رسند، می‌توان گفت که این مولکول‌ها به صورت غیرمتعاون و احتمالاً از طریق مسیری که مستلزم جدا شدن زیرواحدها از یکدیگر و به دنبال آن از هم گسیختگی هر کدام از زیرواحدها می‌باشد، به حالت واسرشته می‌رسند. در مورد تأثیر اسمولیت بر واکنش واسرشتگی لیپاز از دیدگاه سینتیکی، براساس داده‌های حاصل از آنالیز طیف‌ها (جدول 2) مشاهده می‌شود که سوربیتول بر روی هر دو مسیر تأثیرگذار بوده و روند واسرشتگی پروتئین در حضور این اسمولیت تغییر می‌کند. این جدول نشان می‌دهد که برخلاف قوانین شیمی-فیزیک مبنی بر اینکه مولکول‌های شیمیایی از مسیری واکنش خود را به انجام می‌رسانند که دارای سد انرژی کمتری باشد ولی در این فرایند زیستی، بیشتر مولکول‌های لیپاز از مسیری با سد انرژی بالاتر واسرشته می‌شوند یعنی $A_2 > A_1$ است در صورتی که سد انرژی مسیر شماره 2 نسبت به 1 بالاتر است پس این حالت بیانگر عدم تمایل مولکول‌های لیپاز برای واسرشتگی می‌باشد. علاوه بر این سوربیتول اگرچه به میزان خیلی کمی سد انرژی مسیر اول را کمتر می‌کند، ولی این نسبت جمعیتی را بیشتر به نفع مسیر دوم به پیش می‌برد.

با توجه به طیف‌های سینتیکی بازتاخوردگی لیپاز (شکل 4) و این که واکنش در محدوده‌ی زمانی بسیار پایین ردیابی شده است می‌توان گفت که این گونه طیف‌های سینتیکی و ثابت سرعت حاصل از آنالیز آن‌ها، احتمالاً نشان‌دهنده یک روی هم افتادگی هیدروفوبی در لحظات اولیه بازتاخوردگی پروتئین بوده و نوآرایی ساختاری بعد از این مرحله به علت عدم تغییر در محیط اطراف تریپتوفان قابل ردیابی نیست. تفاوت در ثابت‌های سرعت حاصله، مبین تأثیر اسمولیت بر لحظات اولیه بازتاخوردگی لیپاز بوده و افزایش سرعت این فرایندها است (جدول 3). به بیان دیگر در حضور سوربیتول سد

فرونشانی خارجی نیز مشاهده می‌شود، با این حال شدت فرونشانی داخلی در ساختار طبیعی پروتئین به گونه‌ایست که برآیند این دو نوع فرونشانی در حالت‌های طبیعی و واسرشته، باعث افزایش نشر فلئورسانس در اثر باز شدن پروتئین می‌شود. البته بررسی مکانیسم دقیق این نوع فرونشانی در لیپاز نیاز به بررسی‌های ساختاری بیشتر دارد.

نتایج آزمایش سینتیکی واسرشتگی پروتئین نشان می‌دهد که باز شدن پروتئین در حضور و همچنین عدم حضور سوربیتول با دو ثابت سرعت صورت گرفت. این نتیجه نشانگر این نکته است که احتمالاً جمعیت مولکول‌های پروتئین بلافاصله پس از فراهم شدن شرایط واسرشتگی به دو گروه تفکیک می‌شوند و هر گروه با ثابت سرعت جداگانه‌ای به حالت واسرشته می‌رسند یعنی دو مسیر مختلف برای واسرشتگی پروتئین وجود دارد. توجه به این نکته مهم است که در آنالیز این طیف‌ها در مورد هر ثابت سرعت یک دامنه نیز به دست می‌آید که در مورد همه طیف‌ها براساس دامنه متعلق به دو ثابت سرعت، می‌توان نسبت جمعیت مولکول‌هایی که از هر مسیر فرایند مورد نظر را انجام می‌دهند، محاسبه نمود. منظور از انتخاب مسیر واسرشتگی، ترتیب شکسته شدن میانکشی‌های درگیر در حفظ پایداری ساختار پروتئین است. با توجه به اینکه لیپاز مورد بررسی به صورت دوتایی می‌باشد این احتمال وجود دارد که جمعیتی از مولکول‌ها که با ثابت سرعت بالا واسرشته می‌شوند آنهایی هستند که واسرشتگی‌شان به صورت متعاون بوده و توام با جدا شدن زیرواحدها، واسرشتگی هر زیرواحد نیز به صورت همزمان و به سرعت انجام می‌شود؛ به طوری که در مورد این جمعیت از مولکول‌ها می‌توان اظهار داشت که در هر لحظه از واکنش واسرشتگی فقط دو گونه مولکولی متمایز یعنی حالت واسرشته و یا حالت دوتایی وجود داشته و حدواسط سینتیکی مابین این دو ساختار

- [3] Brzozowski, A.M., Savag, H., Verma, C.S., Turkenburg, J.P., Lawson, D.M., Svendsen, A., Patkar, S. (2000) Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces* (*Humicola*) lanuginosa lipase. *J. Biochem.* **39**, 15071–15082.
- [4] Brzozowski, A.M., Derewenda, U., Derewenda, Z.S., Dodson, G.G., Lawson, D.M., Turkenburg, J.P., Bjorkling, F., Høge-Jensen, B., Patkar, S.A., Thim, L. (1991) A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature.* **351**, 491-494.
- [5] Gorokhova, A.V., Ivanov, A.E., Zubov, V.P. (2001) Increase in catalytic activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase upon its coprecipitation with hexadecane 1,2- diol suspension. *Russian chemical bulletin.* **50**, 152-154.
- [6] Sugiura, M., Oikawa, T., Hirano, K., Inukai, T. (1977) Purification, crystallization and properties of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim.* **488**, 353-358.
- [7] Antonian, E. (1988) Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. *Lipids.* **23**, 1101-1106.
- [8] Chakraborty, K., Paulraj, R. (2009) Purification and Biochemical Characterization of an Extracellular Lipase from *Pseudomonas fluorescens* MTCC 2421. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3859–3866.
- [9] Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Fuentes, M., Mateo, C., Guisasa'n, J.M., Fernandez-Lafuente, R. (2003) Self-Assembly of *Pseudomonas fluorescens* Lipase Into Bimolecular Aggregates Dramatically Affects Functional Properties. *Biotechnology and Bioengineering.* **82**, 233-237.
- [10] Rumpfheldt, J.A.O., Galvagnion, C., Vassall, K., Meiering, E.M. (2008) Conformational stability and folding mechanisms of dimeric proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* **98**, 61–84.
- [11] Gloss, L.M., Simler, B.R., Matthews, C.R. (2001) Rough Energy Landscapes in Protein Folding: Dimeric *E. coli* Trp Repressor folds through three parallel channels. *J. Mol. Biol.* **312**, 1121-1134.
- [12] Hakiminia, F., Ranjbar, B., Khalifeh, K., Khajeh, K. (2013) kinetic and thermodynamic properties of *pseudomonas fluorescence* lipase upon addition of proline. *international journal*

انرژی واکنش بازتاخوردگی کاهش پیدا کرده و واکنش بازتاخوردگی و رسیدن به ساختار طبیعی پروتئین مطلوب تر می شود. این احتمال وجود دارد که میانگین بین سوربیتول و زنجیره پروتئین در حالت واسرشته نامطلوب بوده و لذا سوربیتول به عنوان یک اسمولیت با اثر اسموفوبی خود باعث می شود که از طریق سوق دادن پروتئین به سمت ساختار طبیعی پیوندهای نامطلوب بین زنجیره پروتئین در حالت واسرشته و اسمولیت به حداقل رسیده و در عوض پیوندهای مطلوب تری بین ساختار طبیعی پروتئین و سوربیتول برقرار شود.

به طور خلاصه اگرچه در حالت تعادل غلظت 0/6 مولار سوربیتول باعث القای ساختاری در آنزیم می شود که نسبت به بقیه غلظت ها موجب فعالیت بهتر آنزیم می شود، با این حال در همین غلظت نیز فعالیت آنزیم نسبت به شرایط عدم حضور سوربیتول کمتر است. بر خلاف حالت تعادل در بررسی سینتیکی واکنش های بازتاخوردگی و واسرشتگی اهمیت سوربیتول در کمک به تشکیل ساختار طبیعی پروتئین قابل توجه بوده و می توان گفت تأثیر مثبت سوربیتول در حین فرایند بازتاخوردگی و همچنین واسرشتگی پروتئین بیشتر از تأثیر ترمودینامیکی آن بر روی پیکربندی طبیعی و عملکردی پروتئین در حالت تعادل می باشد.

5- سپاسگزاری

تمام منابع مالی انجام این تحقیق توسط دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است.

6- منابع

- [1] Jaeger, K.E., Arpigny J.L. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties *Biochem. J.* **343**, 177-183.
- [2] Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., Heuvel, M.V., Misset, O. (1994) Bacterial. *FEMS Microbiology.* **15**, 29-63.

تحت تأثیر اسمولیت‌های پرولین، سوربیتول و اوره،
دانشگاه تربیت مدرس

- [20] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochem.* **72**, 248-54.
- [21] Maurich, V., Zacchigna, M., Pitotti, A. (1991) p-Nitrophenyllaurate: a substrate for the high-performance liquid chromatographic determination of lipase activity. *Chromatogr.* **566**, 453-459.
- [22] Safarjk, I. (1991) A spectrophotometric assay for lipase activity utilizing immobilized triacylglycerols. *Methods.* **23**, 249-253.
- [23] Teng, Y., Xu, Y. (2007) A modified paranitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. *Analytical Biochemistry.* **363**, 297-299.
- [24] Dorothy, B., Calhoun, J.M.V., Holtorn, G.R., Walter Englander, S., (1986) Protein Fluorescence Quenching by Small Molecules: Protein Penetration Versus Solvent Exposure. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics.* **1**, 109-115.
- [25] Bolen, E.J., Holloway, P.W. (1990) Quenching of Tryptophan Fluorescence by Brominated Phospholipid. *Biochemistry.* **29**, 9638-9643.
- [26] Ganjalikhanya, M.R., Ranjbar, b., Hosseinkhanib, S., Khalifeha, K., Hassania, L., (2010) Roles of trehalose and magnesium sulfate on structural and functional stability of firefly luciferase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* **62**, 127-132.
- of biological macromolecules. **55**, 123-126.
- [13] Zhaohui, L.I.U., Wei, Q.I., Weina, W.U., Yue, L.I.U., Zhimin, H.E. (2008) Enhancing thermostability of b-mannanase by protective additives. *Front. Chem. Eng. China.* **2**, 439-442.
- [14] El Kadi, N., Taulier, N., Le Huerou, J.Y., Gindre, M., Urbach, W., Nwigwe, I., Kahn, P.C., Waks, M. (2006) Unfolding and Refolding of Bovine Serum Albumin at Acid pH: Ultrasound and Structural Studies. *Biophysics J.* **91(9)**, 3397-404.
- [15] Protasevich, I., Ranjbar, B., Lobachov, V., Makarov, A., Gilli, R., Briand, C., Lagtte, D., Haiech, J. (1997) Conformation and thermal denaturation of apocalmodulin: role of electrostatic mutations. *Biochemistry.* **36**, 2017-2024.
- [16] Ranjbar, B., Gill, P. (2009) Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. *Chem Biol Drug Des.* **74**, 101-120.
- [17] Khalifeh, K., Ranjbar, B., Alipour, B.S., Hosseinkhani, S. (2010) The effect of surface charge balance on thermodynamic stability and kinetics of refolding of firefly luciferase. *BMB reports.* **44(2)**, 102-106.
- [18] Khalifeh, K., Ranjbar, B., Khajeh, K., Naderi-Manesh, H., Sadeghi, M., Gharavi, S. (2007) A stopped-flow fluorescence study of the native and modified lysozyme. *Biologia.* **62(3)**, 258-264.
- [19] حکیمی نیا، فروغ (1389) بررسی خصوصیات سینتیکی و ترمودینامیکی آنزیم سودوموناس فلوئورسانس لپاز