

پیش‌بینی مهارکننده برای گیرنده سم سیاه‌زخم بر روی سلول‌های انسانی با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی

زینب ساعدی^{1*}، شاهین گوانجی²، حسن محبت‌کار³

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان
2- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اصفهان
3- استاد، گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان

* اصفهان، کد پستی 8174673441

h.mohabatkar.ast.ui.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/9/1 پذیرش مقاله: 95/3/29)

چکیده- اهداف: باکتری *باسیلوس آنتراسیس*، عامل ایجاد کننده سیاه‌زخم می‌باشد که به دلیل تولید اسپور بسیار مقاوم، مستعد تهیه سلاح بیولوژیک بوده، از اینرو یک عامل بیوتروریستی خطرناک به شمار می‌آید. هدف از انجام این پژوهش، پیش‌بینی یک مهار کننده مؤثر برای گیرنده سم سیاه‌زخم بر روی سلول‌های انسانی، با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی است.

برهم‌کنش گیرنده سم سیاه‌زخم با 57 ترکیب گیاهی مختلف، با استفاده از وب سرور Swissdock مورد بررسی قرار گرفت. سپس اسید آمینه‌های دخیل در برهم‌کنش‌های قوی و مؤثر، با استفاده از نرم‌افزار UCSF Chimera به دست آمد. با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، از بین ترکیبات بررسی شده، ده ترکیب آسارون، بیسابولول، کلروژنیک اسید، ژرانیول، هارمین، هارمالین، سولفورافان، فلوپنازین، L و D- کاتچین، قابلیت مهار گیرنده سم سیاه‌زخم را دارند، که از بین آنها احتمالاً سولفورافان بهترین و مؤثرترین مهارکننده می‌باشد. نتایج حاصل از آنالیزهای صورت گرفته، پیشنهاد پژوهش‌های آزمایشگاهی برای تولید دارویی مؤثر برای مقابله با سم سیاه‌زخم، از ترکیبات به دست آمده را ارائه می‌نماید.

کلیدواژگان: *باسیلوس آنتراسیس*، سیاه‌زخم، سلاح بیولوژیک، مهارکننده، ضد رگزایی.

1- مقدمه

25 تا 75 درصد گزارش شده است [1]. عامل بیماری

سیاه‌زخم باکتری اسپوردار، گرم مثبت، هوازی یا بی هوازی اختیاری به نام *باسیلوس آنتراسیس* است. در خون معمولاً فاقد اسپور است ولی در شرایط هوازی، در مجاورت سرم و CO₂ تولید اسپور می‌نماید [2]. بیماری سیاه‌زخم از نظر نظامی نیز دارای اهمیت است. ویژگی‌های منحصر به فرد *باسیلوس آنتراسیس*، آن را مستعد تهیه

سیاه زخم، آنتراکس یا شاربین یک بیماری خطرناک مشترک بین انسان و دام است. عامل بیماری در اثر تماس مستقیم با حیوان بیمار یا فرآورده‌های آن مانند پشم و یا مصرف گوشت آلوده، به انسان منتقل می‌شود. در انسان سیاه‌زخم به سه شکل پوستی، گوارشی و تنفسی بروز می‌نماید و میزان مرگ و میر آن بر حسب شکل بیماری از

سلاح بیولوژیک و یک عامل بیوتروریستی نموده است که از آن جمله می‌توان به قدرت بیماری‌زایی بالا، قابلیت تولید اسپور به صورت انبوه، سهولت رهاسازی آن به صورت آئروسول و تولید اسپور بسیار کوچکی اشاره نمود که به شرایط مختلف فیزیکی و شیمیایی مانند گرما، خشکی، نور ماورای بنفش و حشره‌کش‌ها مقاوم است و به این ترتیب توانایی بقای آن در محیط بسیار بالا است [4,3].

قدرت بیماری‌زایی باسیل سیاه‌زخم به حدی است که 1 میکروگرم از اسپور آن قادر به هلاکت یک انسان است و بسته به شرایط زیست-محیطی و نحوه رهاسازی، یک کیلوگرم از آن قادر است صدها هزار نفر را گرفتار نماید. به این خاطر این باکتری در عوامل بیولوژیک بسیار خطرناک (گروه A) قرار گرفته و امکان انتشار عمدی اسپورهای آن و آلودگی آب و مواد غذایی توسط بیوتروریست‌ها وجود دارد و امروزه به عنوان یکی از جنگ افزارهای بسیار قوی بیوتروریسم مطرح است [4]. به همین جهت یافتن یک مهارکننده مؤثر برای سم این باکتری بسیار پراهمیت می‌نماید. بیماری‌زایی باسیلوس آنتراسیس به دو عامل مربوط است: کپسول پروتئینی که پلیمری از گلوتامیک اسید است و باکتری را در برابر فاگوسیت‌ها و سایر عوامل دفاع غیر اختصاصی بدن محافظت می‌کند و توکسین یا زهرابه که شامل سه جزء پروتئینی به نام‌های آنتی‌ژن محافظت کننده (PA)¹، فاکتور اِدم (EF)² و فاکتور کشنده (LF)³ می‌باشد [5].

آنتی‌ژن محافظت کننده، به گیرنده خود در سطح سلول متصل می‌شود. سپس مولکول‌های EF و LF با اتصال به آن، به درون سیتوپلاسم، یعنی جایی که اثر سمیت خود را نشان می‌دهند، انتقال می‌یابند [6]. فاکتور کشنده، یک نوع متالوپروتئاز است که با ایجاد برش در سمت انتهای آمینی

سوبسترای اختصاصی خود یعنی پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوژن⁴ باعث شکستن آن می‌شود. در اثر این عمل سیگنال‌های لازم جهت تکثیر متوقف شده و سلول به سوی مرگ پیش می‌رود [7]. فاکتور اِدم، یک آدنیلات سیکلاز حساس به کالمدولین است که پس از ورود به سلول سطح آدنوزین مونوفسفات حلقوی⁵ درون سلولی را افزایش داده و بدین ترتیب موجب ایجاد اِدم می‌گردد [8]. همان‌طور که اشاره شد PA برای سمیت، در ترکیب با LF یا EF ضروری است زیرا دارای ناحیه اتصال به گیرنده سلول میزبان بوده و ورود کمپلکس توکسین را به درون سلول تسهیل می‌نماید. به همین دلیل مهار اتصال PA به سطح سلول، در ساخت واکسن و طراحی آنتی‌بادی برای مقابله با عامل بیماری سیاه‌زخم بسیار مورد توجه قرار گرفته است. PA دارای دو گیرنده بر روی غشاء سلول‌های انسانی است: CMG2⁶ و TEM8⁷. هر دو رسپتور از طریق دومینی به نام VWA⁸ به PA متصل می‌گردند. این دومین به طول 180 تا 190 اسید آمینه، کاملاً خارج سلول قرار گرفته و دارای 60 درصد شباهت توالی در دو گیرنده است [9].

تمایل CMG2 برای اتصال به PA ده برابر بیشتر از TEM8 می‌باشد، به همین خاطر از آن به عنوان گیرنده اصلی سم سیاه‌زخم نام برده می‌شود [10]. از اینرو در این پژوهش یافتن مهارکننده ای برای اتصال CMG2-PA، به عنوان مهارکننده سم سیاه‌زخم، با روش‌های بیوانفورماتیکی، هدف قرار گرفته است. ترکیباتی که به عنوان لیگاند برهم‌کنش شان با گیرنده مورد بررسی قرار گرفت، از میان ترکیبات فنلی گیاهی و همچنین ترکیبات گیاهی دارای اثرات ضد سرطانی و ضد توموری انتخاب گردید. ترکیبات فنلی دسته مهمی از متابولیت‌های ثانویه

⁴ Mitogen – Activated Protein Kinase (MAPK)

⁵ cAMP

⁶ Capillary Morphogenesis Protein2

⁷ Tumor Endothelial Marker8

⁸ Von Willebrand Factor A

¹ Protective Antigen

² Edema Factor

³ Lethal Factor

لیگاندها از وبگاه اینترنتی www.chemspider.com به دست آمد.

2-2- بررسی برهم کنش گیرنده با لیگاند با استفاده از

وب سرور Swissdock

برهم کنش گیرنده با هر کدام از لیگاندها، با استفاده از وب سرور Swissdock به آدرس اینترنتی www.swissdock.ch مورد بررسی قرار گرفت. این وب سرور، برای پیش بینی برهم کنش پروتئین‌ها با مولکول‌های کوچک بیولوژیکی یا شیمیایی به عنوان لیگاند می‌باشد، که بر اساس نرم‌افزار داکینگ EADock DSS عمل می‌نماید. نتایج داکینگ به صورت امتیاز برای هر برهم کنش در دسترس قرار می‌گیرد. امتیاز منفی نشان دهنده وجود برهم کنش بوده به طوری که امتیاز منفی تر، نشان دهنده برهم کنش قوی‌تر بین پروتئین و لیگاند خواهد بود [16].

2-3- یافتن اسید آمینه‌های دخیل در اتصال با استفاده از

نرم‌افزار UCSF chimera

پس از یافتن لیگاندهایی که با انرژی مناسب به گیرنده متصل می‌شوند، شناسایی اسید آمینه‌های دخیل در اتصال با استفاده از نرم‌افزار Chimera انجام شد. Chimera یک نرم‌افزار بسیار کاربردی برای آنالیز ساختارهای مولکولی از لحاظ نقشه چگالی، کنفورماسیون‌های احتمالی، برهم کنش پروتئین-لیگاند و هم تراز سازی توالی‌های پروتئینی² است. نتایج داکینگ به صورت اعدادی به نام فول فیتنس³ که بر حسب کیلو کالری بر مول می‌باشد، برای هر اسید آمینه در دسترس قرار می‌گیرد، که نشان دهنده میزان دخالت هر اسید آمینه در اتصال به لیگاند است. هرچه این عدد منفی‌تر باشد، نشان دهنده نقش بیشتر اسید آمینه مربوطه، در برهم کنش می‌باشد [17].

گیاهان هستند که در مواردی مانند دفاع در برابر تابش فرابنفش و تهاجم عوامل بیماری‌زا ایفای نقش می‌کنند. در دهه اخیر توجه بسیاری به فواید سلامتی پلی فنل‌های گیاهی به عنوان آنتی اکسیدان شده است. مطالعات بسیاری نشان داده که رژیم دراز مدت غنی از ترکیبات فنلی گیاهی از پیشرفت سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی عروقی، پوکی استخوان و بیماری‌های تحلیل برنده عصبی جلوگیری می‌کند [11]. برخی ترکیبات فنلی مانند کاتچین دارای اثرات ضد پیری قوی بوده به طوری که مصرف چای سبز که غنی از کاتچین است می‌تواند شروع پیری را به تأخیر بیندازد [12]. همچنین چندین مطالعه اثرات ضد دیابتی ترکیبات پلی فنلی را گزارش کرده‌اند. پلی فنل‌ها ممکن است با مکانیسم‌های مختلفی مانند مهار جذب گلوکز در روده یا مهار جذب آن توسط بافت‌های محیطی، هاپیرگلیسمی را تحت تأثیر قرار دهند [13]. معیار انتخاب ترکیبات فنلی به عنوان لیگاندهای پیشنهادی در این پژوهش، مطالعاتی است که نشان می‌دهد برخی ترکیبات گیاهی دارای خاصیت آنتی‌توموری، همچنین برخی ترکیبات فنلی قابلیت مهار گیرنده‌های سم سیاه‌زخم را دارا می‌باشند [14، 15].

2- روش‌ها

2-1- به دست آوردن ساختار سه بعدی گیرنده و

لیگاندها از بانک‌های اطلاعاتی

ساختار سه بعدی گیرنده از بانک داده‌های پروتئین¹ به آدرس اینترنتی www.rcsb.org به دست آمد. این وب گاه یک بانک اطلاعات شامل ساختار سه بعدی بیش از صد هزار ماکرومولکول زیستی شامل پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک است. همچنین از میان ترکیبات گیاهی فنلی و ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌توموری 57 ترکیب مختلف به عنوان لیگاند انتخاب گردید. سپس ساختار سه بعدی

² Protein Sequence alignment

³ Fullfitness

¹ Protein Data Bank

3- نتایج و بحث

با توجه به تولید راحت و سریع اسپور باسیل عامل سیاه‌زخم و مقاومت بالای آن نسبت به عوامل محیطی، کنوانسیون منع سلاح‌های میکروبی از باکتری باسیلوس آنتراکسیس پاتوژن به عنوان یک سلاح میکروبی خطرناک نام می‌برد. به همین خاطر پژوهش‌های فراوانی برای یافتن راهی برای مهار سم این باکتری انجام گرفته است. گیرنده‌های سم سیاه‌زخم، CMG2 و TEM8، همچنین دارای یک افزایش بیان در سلول‌های اندوتلیال بافت‌های توموری هستند و این بر نقش آنها در رگ‌زایی یا آنژیوژنز بافت تومور تاکید می‌کند و نشان داده شده که ترکیبات دارای اثر مهارکنندگی سم سیاه‌زخم، مهارکننده آنژیوژنز نیز می‌باشند [19,18]. در این پژوهش نتایج حاصل از آنالیز برهم کنش لیگاندها با گیرنده CMG2، با استفاده از وب سرور Swissdoc نشان داد که از 57 ترکیب بررسی شده، 10 ترکیب قابلیت اتصال به گیرنده با انرژی مناسب را دارند. این ترکیبات و انرژی اتصال هر کدام در جدول 1 نشان داده شده است. همان‌طور که اشاره شد دومین VWA که به سم متصل می‌گردد دارای 60 درصد شباهت توالی در دو گیرنده است، اسید آمینه‌هایی که در اتصال به PA ایفای نقش می‌کنند در توالی گیرنده‌ها حفاظت شده هستند. این اسید آمینه‌ها تاحدی و نه کاملاً در دو گیرنده یکسان هستند [9].

راجرز و همکاران در سال 2012 موفق به معرفی دو ترکیب تانیک اسید و سیس پلاتین به عنوان مهارکننده‌های اتصال PA-CMG2 شدند. آنها نشان دادند این دو ترکیب علاوه بر اثر مهار کنندگی سم آنتراکس مهارکننده آنژیوژنز نیز می‌باشند [20]. لورنا و همکاران در مارس 2013، با بررسی 2310 ترکیب شیمیایی بیواکتیو شناخته شده، با استفاده از روش سنجش FRET، موفق به شناسایی و معرفی ابلسن و تایمرازول به عنوان مهارکننده‌های قوی اتصال TEM8-PA گردیدند [21]. همچنین کریان و

همکاران در فوریه 2013، گزارش نمودند که ترکیب پنتا-ا-گلیکول بتا-دی-گلوکز¹ مهارکننده CMG2 و دارای فعالیت آنتی آنژیوژنز می‌باشد. این ترکیب یک گالوتانین² است که به وسیله طیف وسیعی از داروهای گیاهی که اثرات آنتی تومور از خود نشان داده اند، تولید می‌شود [22]. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، ده ترکیب آسارون، بیسابولول، کلروژنیک اسید، ژرانیول، هارمین، هارمالین، سولفورافان، فلوفنازین، ال و دی کاتچین، قابلیت مهار رسپتور توکسین سیاه‌زخم را دارا می‌باشند. با توجه به نتیجه مطالعات پیشین که برخی ترکیبات دارای اثر مهار کنندگی سم سیاه‌زخم، مهارکننده آنژیوژنز نیز می‌باشند [19,18]، بررسی قابلیت ترکیبات به دست آمده در این پژوهش، در مهار رگ‌زایی بافت‌های توموری و اثرات ضدسرطانی آنها توصیه می‌شود.

اسید آمینه‌های دخیل در اتصال به هر یک از لیگاندها، که با نرم‌افزار Chimera به دست آمد، در جدول 2 نشان داده شده است. تعداد این اسید آمینه‌ها برای لیگاندهای مختلف، از دو تا بیش از 20 اسید آمینه متفاوت است. مطالعات نشان داده، چهار اسید آمینه E122, Y158, Y119, H121 در توالی CMG2 که در سطح برهم‌کنش آن با PA قرار دارند، بسیارحفاظت شده اند که این می‌تواند مؤید نقش اساسی آنها در اتصال به PA باشد [6]. همچنین نشان داده شده است که دو اسید آمینه H121 و E122 در توالی CMG2 با اسید آمینه R344 در PA ایجاد پل‌های نمکی می‌کنند که باعث پایداری اتصال می‌گردند، به طوری که پروتونه شدن این دو اسید آمینه باعث از دست رفتن اتصال خواهد شد [23]. اما اسید آمینه E117 در CMG2 یک پیوند هیدروژنی قوی با D683 در PA برقرار می‌کند که به نظر می‌رسد اساسی ترین نقش را در اتصال ایفا می‌کند [24]. بنابراین از بین ده ترکیب به دست آمده در این پژوهش، احتمالاً

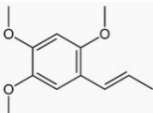
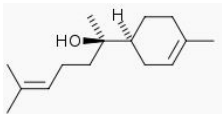
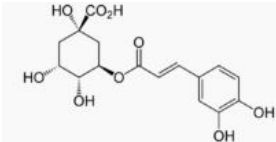
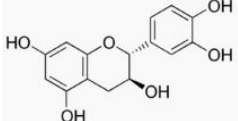
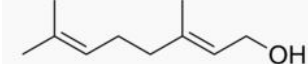
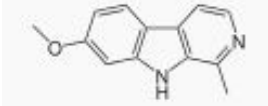
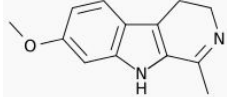
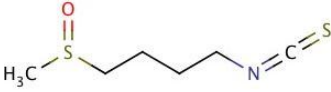
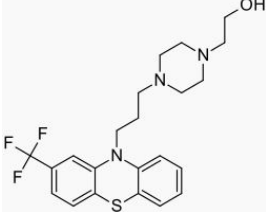
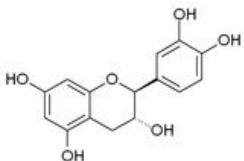
¹ Penta-1,2,3,4,6-O-galloyl-beta-D-glucose (PGG)

² Gallotannin

می‌کند، E117 می‌باشد. همان‌طور که اشاره شد هر دو گیرنده TEM8 و CMG2 از طریق دومین VWA به PA اتصال می‌یابند.

سولفورافان بهترین و مؤثرترین مهار کننده است، زیرا با توجه به نتایج به دست آمده در جدول 2 یکی از اسید آمینه‌هایی که سولفورافان در اتصال خود به CMG2 درگیر

جدول 1 نتایج حاصل از آنالیز برهم کنش لیگاندها با گیرنده، با استفاده از وبگاه Swissdock

ترکیب شیمیایی	ساختمان	انرژی اتصال
آسارون (Asarone)		-37.0217
بیسابولول (Bisabolol)		-29.8471
کلروژنیک اسید (Chlorogenic acid)		-34.1613
دی-(+)-کاتچین (D-(+)-catechin)		-40.0992
ژرانیول (Geraniol)		-64.0383
هارمین (Harmine)		-58.0236
هارمالین (Harmaline)		-84.0765
سولفورافان (Sulforaphane)		-79.2473
فلوفنازین (Fluphenazine)		-39.2699
ال-(-)-کاتچین (L-(-)-catechin)		-26.595

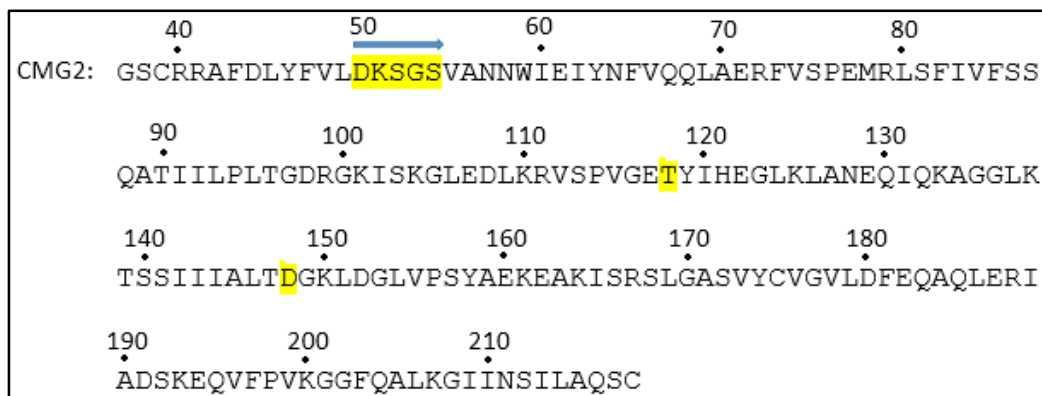
جدول 2 نتایج حاصل از آنالیز برهم‌کنش لیگاندها با گیرنده، با استفاده از نرم‌افزار Chimera

ترکیب شیمیایی	Fullfitness (kcal/mol)
آسارون	ALA 205(-907.1518), ARG 41(-890.0702), GLN 204(-899.7099), GLY 202(-908.1518), GLY 201(-906.86957), LEU 206(-906.86957)
بیسابولول	LEU 206(-943.4764), LYS 200(-939.90735), GLY 170(-941.77747), GLN 68(-941.77747), VAL 199(-934.1404)
کلروژنیک اسید	GLY201(-925.40454), ALA 205(-924.4549), LEU 206(-931.7916), GLN 204(-932.1555)
دی- (+) -کاتچین	GLY201(-925.30365), ALA 205(-924.4549), GLN 204(-932.1555), LYS 207(-923.79236)
ژرانیول	LEU 206(-948.74805), ALA 205(-945.8729)
هارمالین	GLN 216(-919.8108), LEU 206(-920.4607), SER 172(-916.51154), GLU 160(-920.80066), SER 217(-920.67444), ARG 41(-918.1375), ARG 99(-917.91614), ASN 64(-917.82263), GLN 68(-917.13196), ARG 99(-917.13196), GLN 132(-917.43085)
هارمین	LEU 206(-923.857), ALA 205(-921.9784), GLN 216(-924.60315), GLU 162(-925.4435), SER 217(-924.20483), ALA 42(-924.1821), GLN 204(-923.1633), SER 172(-921.77185), GLN 88(-922.9128), GLN 68(-922.5668), PHE 203 (-922.25867), VAL 199(-921.74615)
سولفورافان	GLY201(-932.8764), GLN 204(-932.8242), GLY202(-930.7614), GLN 68(-929.9637), LEU 206(-930.8762), ALA 171(-930.3681), GLU 71(-930.1953), SER 172(-929.7304), ALA 205(-931.8429), GLU 117(-931.4437), SER 54(-929.2939), GLY 97(-930.620), VAL 199(-929.9732)
فلوفنازین	GLN 204(-852.5466), VAL 199(-855.06085), GLY 202(-843.85547), ARG 72(-852.4526), ASN 64(-846.8832)
ال- (-) -کاتچین	GLY208(-931.3860), PHE 203(-934.2352), GLY201(-931.89545), LEU 206(-932.82544), GLY202(-931.9523), GLN 204(-928.76294), ALA 205(-931.87994), LEU 214(-937.0296), SER 172(-934.4519), GLN 216(-931.1631), ARG 41(-934.68823), GLY 170(-930.7379), VAL 199(-932.58545), LEU 179(-932.3382), PHE 181(-932.3382), GLN 183(-932.3382), ASN 64(-931.9523), LYS 200(-931.87994), GLN 68(-927.71606), ALA 42(-931.75385), ASP 191(-929.0345), ARG 167(-922.6128), ILE 131(-930.798), PHE 197(-930.798), GLU 61(-930.24066), ARG 188(-930.5851), GLU 187(-930.5851), THR 139 (-930.46313), ARG 41(-929.8819), ILE 137(-929.8819).

ایفای نقش می‌کند [25]. طبق نتایج آورده شده در جدول 2، سولفورافان در برهم‌کنش خود با CMG2، یکی از ریشه‌های واقع در بنیان I، یعنی S54 را نیز درگیر می‌نماید که این نکته آن را کاندیدای مناسبی برای مهار گیرنده آنتراکس می‌نماید. پیش‌ساز سولفورافان، گلوکورافانین، یک گلیکوزینولات است که به مقدار فراوان در بروکلی و سایر اعضای خانواده کلمیان وجود دارد و مسئول بسیاری از فوائد سلامتی این تیره از سبزیجات است.

تقریباً 46 درصد از تمام دومین‌های VWA دارای یک جایگاه چسبندگی وابسته به یون فلزی¹ (MIDAS) کاملاً حفاظت شده، با توالی (DXSXS...T....D) هستند که بنیان I² نامیده می‌شود و موقعیت آن در توالی CMG2، در شکل 1 نشان داده شده است. بنیان I در اغلب موارد در اتصال دومین‌های VWA به لیگاندهای فیزیولوژیک خود

¹ Metal ion-dependent adhesion site² I-motif



شکل 1 موقعیت بنیان MIDAS در توالی CMG2

4- نتیجه‌گیری

به این دلیل که اتصال یکی از اجزای سم سیاه‌زخم یعنی آنتی‌ژن محافظت‌کننده به گیرنده خود در سطح سلول، مقدمات ورود کمپلکس توکسین را به درون سلول فراهم می‌کند، بنابراین جلوگیری از این اتصال می‌تواند مؤثرترین راه برای مهار سم سیاه‌زخم به حساب آید. نتایج بیوانفورماتیکی حاصل از این پژوهش ده ترکیب را به عنوان کاندیداهای مناسب معرفی می‌نماید. همچنین نتایج نشان می‌دهد که ترکیب سولفورافان یک اتصال قوی و مؤثر با گیرنده آنتی‌ژن محافظت‌کننده برقرار نموده که می‌تواند اتصال آن را به خوبی مهار نماید. بنابراین مطالعات آزمایشگاهی جهت بررسی توان مهارکنندگی سم سیاه‌زخم توسط این ترکیب پیشنهاد می‌گردد.

5- منابع

- [1] Liu, S., Moayeri, M., Leppla, S. H. (2014) Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends Microbiol.* (6):317-325.
- [2] Koehler, T. M. (2009) *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Mol Aspects Med.* 30:386-396.
- [3] Driks, A. (2009) The *Bacillus anthracis* spore. *Mol Aspects Med.* 30(6):368-373.
- [4] Richard, J. L., Grimes, D. E. (2008) Bioterrorism: class A agents and their potential presentations in immunocompromised patients. *Clin J Oncol Nurs.* 12(2):295-302.

گلوکورافانین در اثر هیدرولیز آنزیمی به فرم فعال بیولوژیکی خود یعنی سولفورافان تبدیل می‌گردد که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی بالایی است [27,26] و به دلیل مهار تولید سایتوکین دارای اثرات ضد التهابی نیز می‌باشد [29,28]. سولفورافان همچنین فعالیت ضد میکروبی وسیع الطیفی بر علیه چندین باکتری گرم مثبت و گرم منفی، به طور ویژه هلیکوباکتریلوری، از خود نشان می‌دهد. مطالعه‌ای در سال 2002 نشان داد که سولفورافان فعالیت داخل سلولی و خارج سلولی گونه‌های مقاوم و غیر مقاوم به آنتی بیوتیک هلیکوباکتریلوری را به طور مؤثری مهار می‌کند [31,30]. بنابر نتایج به دست آمده از این پژوهش به نظر می‌رسد ساخت یک داروی بسیار مؤثر برای مقابله با سم سیاه‌زخم از ترکیب سولفورافان امکان‌پذیر است و بررسی آزمایشگاهی این موضوع قویاً پیشنهاد می‌گردد. البته این واقعیت که سولفورافان ترکیبی با دسترسی زیستی پایین می‌باشد و در شرایط مختلف مانند گرما، حضور اکسیژن و یا شرایط قلیایی فعالیت خود را از دست می‌دهد، چالش اصلی در استفاده از سولفورافان به عنوان دارو می‌باشد که طراحی و استفاده از نانوسامانه‌های حامل دارو مانند نانو سامانه‌های مغناطیسی و یا مزوسپوری برای دارورسانی سولفورافان می‌تواند راه گشای حل این مشکل باشد [32].

- Lett. 22(18):5885-5888.
- [15] Rogers, M. S., Cryan, L. M., Habeshian, K. A., Bazinet, L., Caldwell, T. P., Ackroyd, P. C., Christensen, K. A. (2012) A FRET-based high throughput screening assay to identify inhibitors of anthrax protective antigen binding to capillary morphogenesis gene 2 protein. *PLoS One*. 7(6):e39911.
- [16] Grosdidier, A., Zoete, V., Michielin, O. (2011) SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res*. 39:270-277.
- [17] Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 25(13):1605-1612.
- [18] Cryan, L. M., Rogers, M. S. (2011) Targeting the anthrax receptors, TEM-8 and CMG-2, for anti-angiogenic therapy. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 1(16):1574-1588.
- [19] Reeves, C. V., Dufraine, J., Young, J. A., Kitajewski, J. (2010) Anthrax toxin receptor 2 is expressed in murine and tumor vasculature and functions in endothelial proliferation and morphogenesis. *Oncogene*. 29(6):789-801.
- [20] Rogers, M. S., Cryan, L. M., Habeshian, K. A., Bazinet, L., Caldwell, T. P., Ackroyd, P. C., Christensen, K. A. (2012) A FRET-based high throughput screening assay to identify inhibitors of anthrax protective antigen binding to capillary morphogenesis gene 2 protein. *PLoS One*. 7(6):e39911.
- [21] Cryan, L. M., Habeshian, K. A., Caldwell, T. P., Morris, M. T., Ackroyd, P. C., Christensen, K. A., Rogers, M. S. (2013) Identification of small molecules that inhibit the interaction of TEM8 with anthrax protective antigen using a FRET assay. *J Biomol Screen*. 18(6):714-725.
- [22] Cryan, L. M., Bazinet, L., Habeshian, K. A., Cao, S., Clardy, J., Christensen, K. A., Rogers, M. S. (2013) 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose inhibits angiogenesis via inhibition of capillary morphogenesis gene 2. *J Med Chem*. 56(5):1940-1945.
- [23] Gao, M., Schulten, K. (2006) Onset of anthrax toxin pore formation. *Biophys J*. 90(9):3267-3279.
- [24] Chen, K. H., Liu, S., Bankston, L. A., Liddington, R. C., Leppla, S. H. (2007)
- [5] Edwards, K. A., Clancy, H. A., Baemner, A. J. (2006) *Bacillus anthracis*: toxicology, epidemiology and current rapid-detection methods. *Anal Bioanal Chem*. 384(1):73-84.
- [6] Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Melnyk, R. A., Harrison, S. C., Collier, R. J. (2004) Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(36):13147-13151.
- [7] Bardwell, A. J., Abdollahi, M., Bardwell, L. (2004) Anthrax lethal factor-cleavage products of MAPK (mitogen-activated protein kinase) kinases exhibit reduced binding to their cognate MAPKs. *Biochem J*. 378(2): 569-577.
- [8] Leppla, S. H. (1982) Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79(10):3162-3166.
- [9] Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Scobie, H. M., Young, J. A., Collier, R. J. (2004) Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of human capillary morphogenesis protein 2: an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(17):6367-6372.
- [10] Liu, S., Crown, D., Miller-Randolph, S., Moayeri, M., Wang, H., Hu, H., Morley, T., Leppla, S. H. (2009) Capillary morphogenesis protein-2 is the major receptor mediating lethality of anthrax toxin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(30):12424-12429.
- [11] Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2(5): 270-278.
- [12] Maurya, P. K., Rizvi, S. I. (2008) Protective role of tea catechins on erythrocytes subjected to oxidative stress during human aging. *Nat Prod Res*. 23(12):1072-1079.
- [13] Matsui, T., Ebuchi, S., Kobayashi, M., Fukui, K., Sugita, K., Terahara, N., Matsumoto, K. (2002) Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action. *J Agric Food Chem*. 50: 7244-7248.
- [14] Cao, S., Cryan, L., Habeshian, K. A., Murillo, C., Tamayo-Castillo, G., Rogers, M. S., Clardy, J. (2012) Phenolic compounds as antiangiogenic CMG2 inhibitors from Costa Rican endophytic fungi. *Bioorg Med Chem*

- [29] Ritz, S. A., Wan, J., Diaz-Sanchez, D. (2007) Sulforaphane-stimulated phase II enzyme induction inhibits cytokine production by airway epithelial cells stimulated with diesel extract. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 292:L33-L39.
- [30] Johansson, N. L., Pavia, C. S., Chiao, J. W. (2008) Growth inhibition of a spectrum of bacterial and fungal pathogens by sulforaphane, an isothiocyanate product found in broccoli and other cruciferous vegetables. *Planta Med*. 74:747-750.
- [31] Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, PM., Kensler, T. W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., Talalay, P., Lozniewski, A. (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci*. 99:7610-7615.
- [32] Kheiri Manjili, H., Ma'mani, L., Tavaddod, SH., Mashhadikhan, M., Shafiee, A., Naderi-Manesh, H. (2016) D, L-Sulforaphane Loaded Fe₃O₄@ Gold Core Shell Nanoparticles: A Potential Sulforaphane Delivery System. *PLoS One*. 11(3): e0151344.
- Selection of anthrax toxin protective antigen variants that discriminate between the cellular receptors TEM8 and CMG2 and achieve targeting of tumor cells. *J Biol Chem*. 282(13):9834-9845.
- [25] Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Scobie, H. M., Young, J. A., Collier, R. J. (2004) Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of human capillary morphogenesis protein 2: an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(17):6367-6372.
- [26] Liang, H., Yuan, Q. (2012) Natural sulforaphane as a functional chemopreventive agent: including a review of isolation, purification and analysis methods. *Crit Rev Biotechnol*. 32(3):218-234.
- [27] M, painter, F. (2010) Sulforaphane Glucosinolate Monograph. *Altern Med Rev*. 15(4):352-360.
- [28] Heiss, E., Herhaus, C., Klimo, K., Bartsch, H., Gerhäuser, C. (2001) Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J Biol Chem*. 276:32008-32015.

اثر آلومینیوم بر روی پایداری ساختمانی پپسین در حضور و غیاب حلال‌های آلی

کلثوم شهدادنژاد¹، بهزاد شارق^{2*}

1- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه شهرکرد

2- دانشیار، دانشگاه شهرکرد

* شهرکرد، صندوق پستی 115

share.beh@sci.sku.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/9/10 پذیرش مقاله: 96/3/9)

چکیده- آسپارتیک پروتئازها (EC(3.4.23.X پیوندهای پپتیدی را هیدرولیز می‌کنند، واکنشی که برای بسیاری از فرایندهای زیستی اساسی است. آسپارتیک پروتئازها در بیش‌تر قارچ‌ها و همه مهره‌داران به صورت زیموژن سنتز می‌شوند. پپسین خوک (EC(3.4.23.1، متعلق به خانواده آسپارتیک پروتئازها است. پپسین یک پروتئاز معدی و یکی از سه آنزیم‌های اصلی هضم پروتئین در سیستم هضمی است. آنزیم پپسین به عنوان یک آنزیم صنعتی در صنایع غذایی است. در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف آلومینیوم در حضور و غیاب حلال‌های آلی (بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول) بر روی پایداری دمایی پپسین بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نمایانگر افزایش پایداری دمایی پپسین در حضور آلومینیوم و کاهش آن در حضور حلال‌های آلی (بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول) می‌باشد، و پایداری دمایی پپسین در حضور گلیسرول نیز ثابت ماند. پایداری دمایی آنزیم پپسین در حضور حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول با افزودن آلومینیوم نسبت به غیاب آن زیاد شد. یون‌های آلومینیوم از طریق برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک و داتیو با گروه‌های کربوکسیلات اسیدهای آمینه آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید به ساختار پپسین متصل و سبب متراکم شدن ساختار آنزیم شده که منجر به افزایش پایداری دمایی پپسین شده است. علت افزایش پایداری دمایی پپسین در حضور آلومینیوم ناشناخته است. با استفاده از آلومینیوم می‌توان اثر ناپایدارکنندگی حلال‌های آلی را بر روی پپسین کاهش داد.

کلیدواژگان: پپسین، پایداری حرارتی، آلومینیوم، حلال‌های آلی.

1- مقدمه

می‌شکنند، این فرایند هیدرولیز پروتئولیتیک نام دارد. پروتئازها یکی از مهم‌ترین گروه‌های آنزیم‌های صنعتی می‌باشند و 60% از کل فروش آنزیم در سراسر جهان را

پروتئازها (پروتئینازها، پپتیدازها یا آنزیم‌های پروتئولیتیک) آنزیم‌هایی هستند که پیوندهای پپتیدی بین آمینواسیدها را

تشکیل می‌دهند [1]. آنزیم‌های پروتئولیتیک بر اساس فعالیت‌های کاتالیتیکی آن‌ها دسته‌بندی می‌شوند. سرین پروتئازها از سرین، آسپارتیک پروتئازها از آسپاراتات، یا متالوپروتئازها از یون‌های فلزی برای انجام عمل کاتالیتیکی خود استفاده می‌کنند [2]. آسپارتیک پروتئازها در دسته A در بانک داده‌های MEROPS طبقه‌بندی شده‌اند، که دسته بندی پپتیدازها و مهارکننده‌های آن‌ها بر مبنای شباهت‌های ساختار سوم و اول است [3]. 14 خانواده از آسپارتیک پروتئازها وجود دارد، که به طور گسترده در مهره‌داران، قارچ‌ها، گیاهان، پروتوزوا و ویروس‌ها وجود دارند [5,4].

پپتیدازهای آسپارتیک (EC(3.4.23.X پیوندهای پپتیدی را هیدرولیز می‌کنند، واکنشی که برای بسیاری از فرایندهای زیستی اساسی است [6]. علت نامگذاری آن‌ها، وجود دو باقیمانده آسپاراتات اساسی است که از نظر کاتالیتیکی مهم هستند. قبلاً به این گروه، اسیدپروتئاز اطلاق می‌شد و علت هم این بود که بیشتر آن‌ها در pH پایین فعال هستند [7]. آسپارتیک پروتئازها در خصوصیات کاتالیتیکی، محل سلولی، عملکرد بیولوژیکی با هم تفاوت دارند [8].

آنزیم پپسین خوک¹ EC(3.4.23.1، متعلق به آسپارتیک پروتئازها است [9]. پپسین در pH خنثی به صورت زیموژن غیرفعال پیپسینوژن تا می‌خورد [10]. همانند دیگر زیموژن‌های آسپارتیک معده، فعال شدن پیپسینوژن در مقادیر pH بین 1 و 4 اتفاق می‌افتد. در pH اسیدی پل‌نمکی که موقعیت PS ناحیه N-ترمینال را در جایگاه فعال پپسین پایدار می‌کند تخریب می‌شود و PS رها می‌شود، به این طریق تشکیلات کاتالیتیکی و جایگاه اتصال سوبسترا در معرض قرار می‌گیرد [6]. پپسین یک پروتئاز معدی و یکی از سه آنزیم‌های اصلی هضم پروتئین در سیستم هضمی است، در واقع پپسین به اغلب پروتئین‌ها به جز کراتین، ناخن و دیگر پروتئین‌های غنی

از کربوهیدرات حمله می‌کند [11]. آنزیم‌های آسپارتیک-پروتئاز، از مهم‌ترین گروه‌های آنزیمی هستند که 60% از فروش آنزیم‌های صنعتی مربوط به آن‌ها می‌باشد. از جمله کاربردهای صنعتی این آنزیم‌ها عبارتند از صنایع لبنی، تهیه نان، بیسکویت و ویفر، موزدائی چرم، بازیافت روغن‌های پوسته مرکبات، هیدرولیز پروتئین‌های مختلف، خردکردن گوشت و رهاسازی رنگ در تهیه آب میوه‌ها و همچنین تولید دترجنت [12]. آسپارتیک پروتئازها همچنین در داروشناسی برای درمان شرایط پاتولوژی و فیزیولوژی متنوع انسان قابل توجه هستند، شامل پپسین در بیماری زخم گوارشی، رنین در فشار خون بالا، پلاسمپسین‌ها در مالاریا، کاتپسین D در متاستاز سرطان، کاتپسین E در سیستم ایمنی، پپتیداز HIV در سندروم نقص ایمنی [6]. دگرگون‌سازی فرایندی است که بدون قطع و شکستن پیوندهای پپتیدی سبب تغییرات عمده در بنای فضایی پروتئین می‌شود. هدف اصلی از مطالعات دگرگون‌سازی پروتئین‌ها، به دست آوردن اطلاعات اضافی در مورد ساختمان، خواص و عملکرد پروتئین‌ها است. مطالعات غیر طبیعی کردن پروتئین‌ها در محلول‌های آبی انجام می‌شود و بنابراین در درک رفتار پروتئین‌ها تحت شرایط فیزیولوژیک مفید خواهد بود [13]. حلال‌ها بر روی خصوصیات کاتالیتیکی و پایداری آنزیم‌ها به طور قابل توجهی اثر می‌گذارند [14]. مزیت‌های زیادی برای استفاده از آنزیم‌ها در حلال‌های آلی وجود دارد از قبیل 1- جلوگیری از اتولیز (در مورد پروتئازها) 2- افزایش پایداری دمایی به دلیل کاهش تحرک ساختاری؛ در حقیقت، نشان داده شده‌است که آنزیم‌ها می‌توانند در حلال‌های آلی در دماهای بالاتر از دمایی که آنزیم‌ها در محیط‌های آبی دگرگون می‌شوند، کاتالیز انجام دهند؛ با این وجود غیرفعال شدن آنزیم‌ها در حلال‌های آلی گزارش شده‌است. 3- بعضی ترانسفورماسیون‌های زیستی آنزیمی نیاز دارند که حلال‌های آلی به منظور حل شدن

¹ Porcine pepsin

بالتر باز می شود نتایج آن ها نشان داد که برگشت پذیری دمایی برای پپسین طبیعی تقریباً 35% و در حضور آلومینیوم تقریباً 80% می باشد [20].

2- مواد

در این مطالعه از آنزیم پپسین خوک (محصول شرکت سیگما)، بافر گلايسين-اسیدکلریدریک (محصول شرکت مرک) با pH=2 در غلظت 100 میلی مولار، آلومینیوم و حلال های آلی (محصولات شرکت مرک) و از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis مدل فارماسیا-4000، برای اندازه گیری استفاده شده است.

3- روش ها

بررسی پایداری حرارتی آنزیم پپسین در غلظت های مختلف آلومینیوم در حضور و غیاب حلال های آلی در دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین؛ از بافر گلايسين-اسیدکلریدریک با pH=2 در غلظت 100 میلی مولار و غلظت های مختلف آلومینیوم (0 تا 50 میلی مولار) و حلال های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان دیول و گلیسرول (10% حجمی-حجمی) استفاده شد. منحنی های دگرگون سازی در غلظت های مختلف آلومینیوم در حضور و غیاب حلال های آلی در طول موج 280 نانومتر با استفاده از محلول های پپسین با غلظت 0/138 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمده است.

پایداری حرارتی آنزیم پپسین، با اندازه گیری تغییرات انرژی آزاد گیبس و T_m محاسبه می گردد. برای این هدف با تغییر آنزیم از حالت طبیعی به حالت دگرگون شده، کسر دگرگون سازی بصورت رابطه (1) محاسبه می شود:

$$F_U = (A_N - A) / (A_N - A_U) \quad (1)$$

در این رابطه، A_N جذب در حالت طبیعی، A جذب مشاهده شده و A_U جذب در حالت دگرگون شده

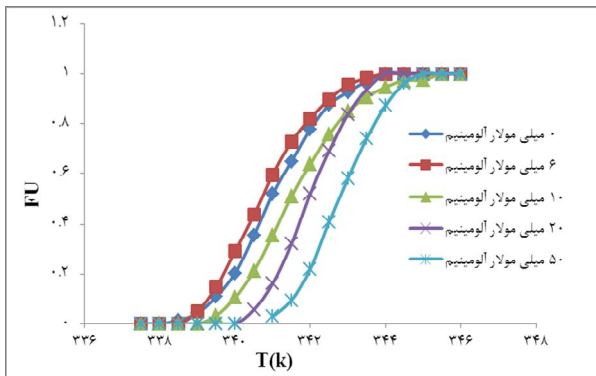
سوبسترا (قندها و مشتقات آنها) به دلیل قطبیت بالای آنها استفاده شوند. 4-جایجایی واکنش های تعادلی در جهت مطلوب همانند استفاده از هیدرولازها برای واکنش های سنتزی. 5- کاهش خطر رشد میکروبی. 6- استفاده سوبستراهای حساس به رطوبت راحت باشد و غیره [15]. در مطالعه ای که سیمون و همکارانش، اثر حلال های آلی را بر روی ساختار و فعالیت آلفا کیموتریپسین و تریپسین بررسی کردند، نشان دادند که حلال های آلی اتانول و 4.1 دی اکسان و استونیتریل ساختار دوم این آنزیم ها را تغییر می دهند. مقدار K_m آلفا کیموتریپسین و تریپسین در غلظت های پایین حلال های آلی کاهش یافت و در غلظت های بالای آنها زیاد شد. پایداری آلفا کیموتریپسین و تریپسین با افزایش غلظت حلال های آلی نیز تغییر پیدا کرد، تریپسین پایداری بیشتری نسبت به کیموتریپسین در همه حلال های آلی داشت [16]. در مطالعه ای که بر روی تریپسین تثبیت شده با آلومینیوم انجام داده اند، نشان داده شده است فعالیت سنتز پپتیدی تریپسین تثبیت شده با آلومینیوم در حضور حلال های آلی آمیل الکل، تتراهیدروفوران و استونیتریل افزایش پیدا می کند، افزایش سنتز پپتیدی آنزیم به طور قوی با محتویات آبی مرتبط است، هر چه محتوای آبی حلال آلی کمتر باشد سنتز پپتیدی تریپسین تثبیت شده بیشتر است [17]. آلومینیوم به طور گسترده برای تولید دارو وافزودنی ها استفاده می شود [18].

در مطالعه ای که اثر یون های آلومینیوم را بر روی فعالیت تریپسین و کیموتریپسین بررسی کردند، نشان دادند یون های آلومینیوم اثر مهاری بر روی تریپسین و کیموتریپسین داشته اند [19].

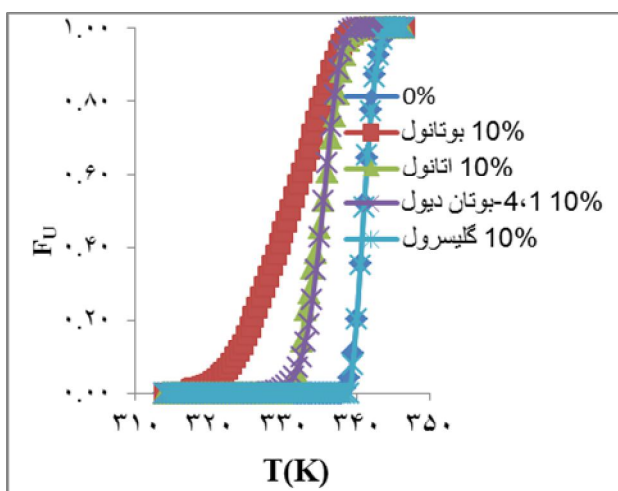
در مطالعاتی که پاولیک² و همکارانش بر روی پایداری دمایی پپسین در حضور یون های آلومینیوم انجام دادند، نشان دادند که پپسین در دمای 70 درجه سانتی گراد و

² V.M Pavelkic

بوتانول کمترین پایداری و در حضور گلیسرول بیشترین پایداری را دارد.



شکل 1 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف آلومینیوم در $\text{pH}=2$ و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلون



شکل 2 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های 10% حجمی - حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1,4- بوتان‌دیول و گلیسرول در $\text{pH}=2$ و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلون

در شکل‌های 3 تا 6 به ترتیب تغییرات کسر دگرگون‌سازی علیه دما در غلظت‌های 10% حجمی - حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1,4- بوتان‌دیول و گلیسرول در حضور و غیاب آلومینیوم در دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلون در $\text{pH}=2$ نشان داده

می‌باشند. K_{eq} یا ثابت تعادل از رابطه (2) بدست می‌آید:

$$K_{eq} = F_U / (1 - F_U) = (A_N - A) / (A - A_U) \quad (2)$$

تغییرات انرژی آزاد گیس نیز از رابطه (3) محاسبه می‌شود:

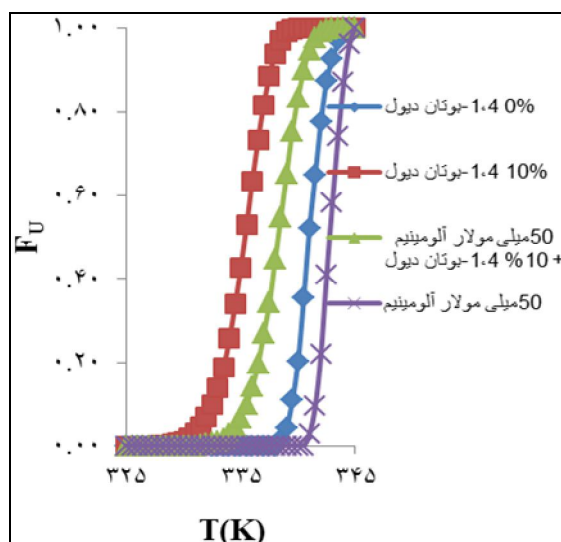
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} = -RT \ln [F_U / (1 - F_U)] = -RT \ln [(A_N - A) / (A - A_U)] \quad (3)$$

در این رابطه، R ، ثابت گازها می‌باشد و برابر با 8.314 ($\text{JK}^{-1} \text{mol}^{-1}$) است و T ، دما بر حسب کلون می‌باشد. T_m یا دمای ذوب یک آنزیم، دمایی است که در آن ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$) ΔG° برابر با صفر است.

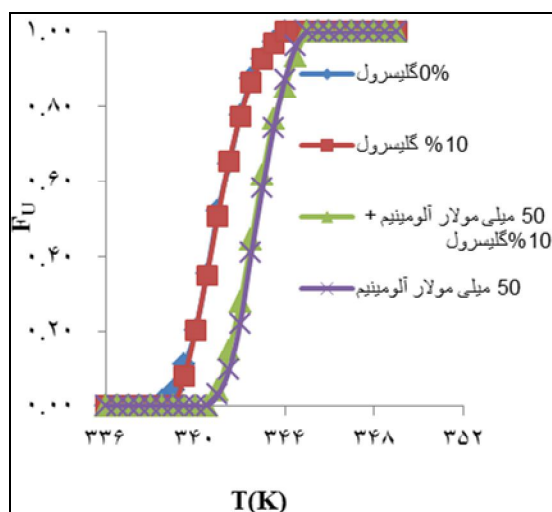
3- نتایج و بحث

دگرگون کردن پروتئین‌ها منجر به تغییراتی در خصوصیات شیمیایی فعالیت گروه‌های خاص و یا خصوصیات فیزیکی مانند تفرق چرخش نوری، طیف ماوراء بنفش و خصوصیات هیدرودینامیکی می‌شود. فرایند دگرگون‌سازی پروتئین‌ها برای مطالعه نیروهای تعیین‌کننده ساختمان سوم حائز اهمیت است. استفاده دیگر از مطالعات دگرگون‌سازی مطالعه نیروهای مؤثر و نقش انواع میان‌کنش‌ها در جایگاه فعال آنزیم است [13].

در شکل‌های 1 و 2 به ترتیب تغییرات کسر دگرگون‌سازی علیه دما در غلظت‌های مختلف آلومینیوم و 10% حجمی - حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1,4- بوتان‌دیول و گلیسرول در دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلون در $\text{pH}=2$ به تصویر کشیده شده است. به طور کلی می‌توان گفت، چنان چه منحنی دگرگون‌سازی آنزیم به سمت راست انتقال پیدا کند، نشان دهنده این است که آنزیم در دمای بیشتری دگرگون و پایداری آن زیاد شده است و برعکس. همان‌طور که در شکل 1 دیده می‌شود، پایداری آنزیم پپسین با افزایش غلظت آلومینیوم زیاد شده است. در شکل 2 نیز دیده می‌شود که پایداری آنزیم پپسین در حضور حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1,4- بوتان‌دیول کم و در حضور گلیسرول ثابت مانده است. پپسین در حضور



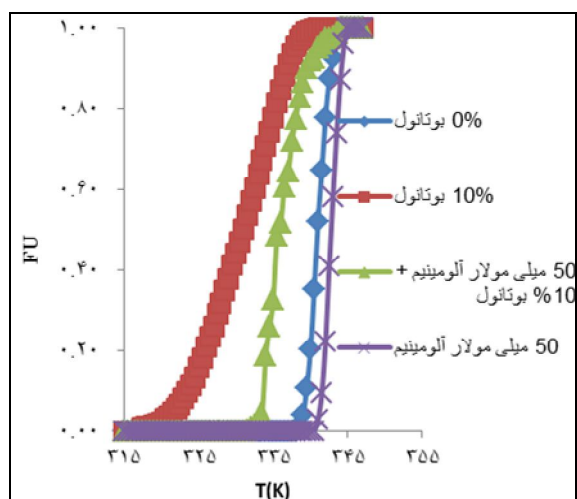
شکل 5 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی 1.4-بوتان‌دیول در حضور و غیاب آلومینیوم در $\text{pH}=2$ و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلون



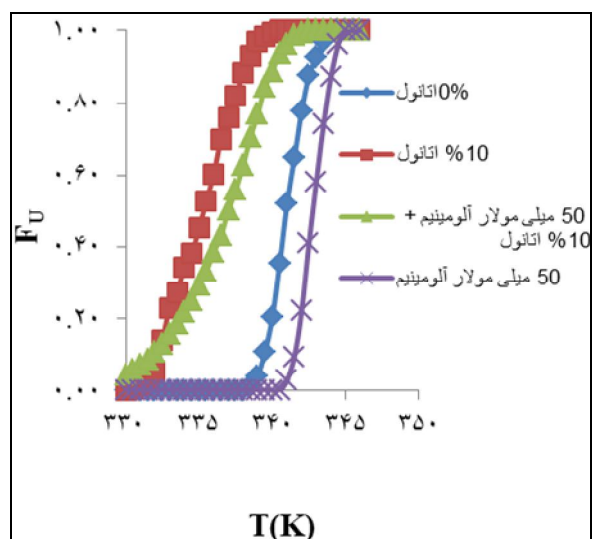
شکل 6 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی-گلیسرول در حضور و غیاب آلومینیوم در $\text{pH}=2$ و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلون

در شکل‌های 7 و 8، به ترتیب تغییرات ΔG° علیه دما در غلظت‌های مختلف آلومینیوم و 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1.4-بوتان‌دیول و گلیسرول در $\text{pH}=2$ به تصویر کشیده شده است. در شکل

شده است. همان‌طور که در این نمودارها دیده می‌شود، پایداری آنزیم پپسین به حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1.4-بوتان‌دیول و گلیسرول در حضور آلومینیوم نسبت به غیاب آن زیاد شده است.

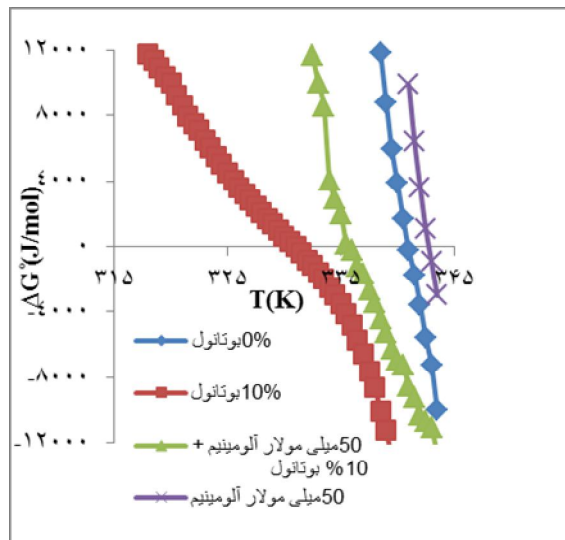


شکل 3 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی بوتانول در حضور و غیاب آلومینیوم در $\text{pH}=2$ و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلون



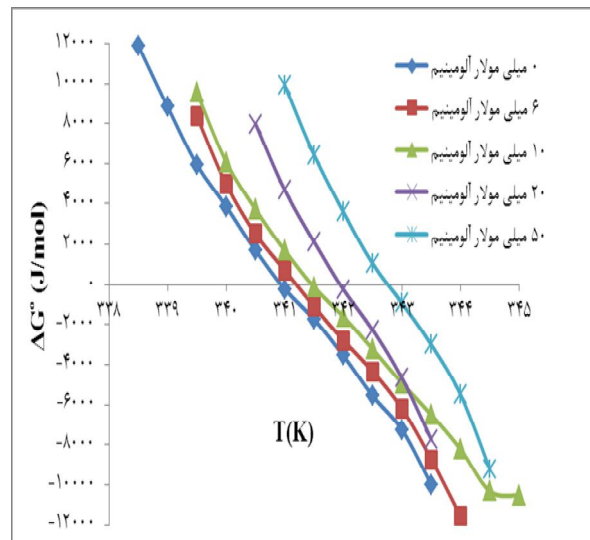
شکل 4 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی اتانول در حضور و غیاب آلومینیوم در $\text{pH}=2$ و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلون

در شکل‌های 9 تا 12، به ترتیب تغییرات ΔG° علیه دما در غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1,4-بوتان‌دیول و گلیسرول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 به تصویر کشیده شده است.

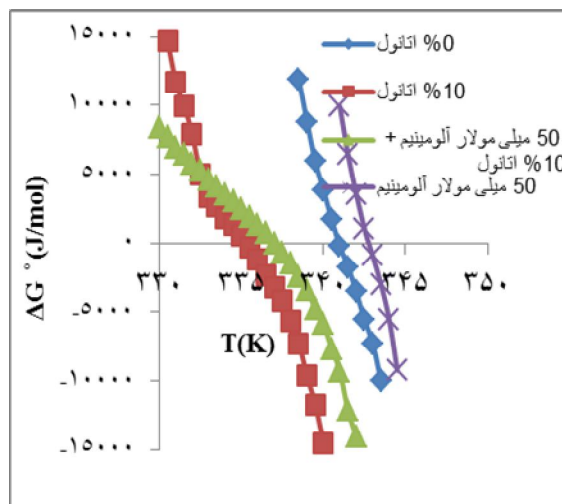


شکل 9 تغییرات ΔG° آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی بوتانول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

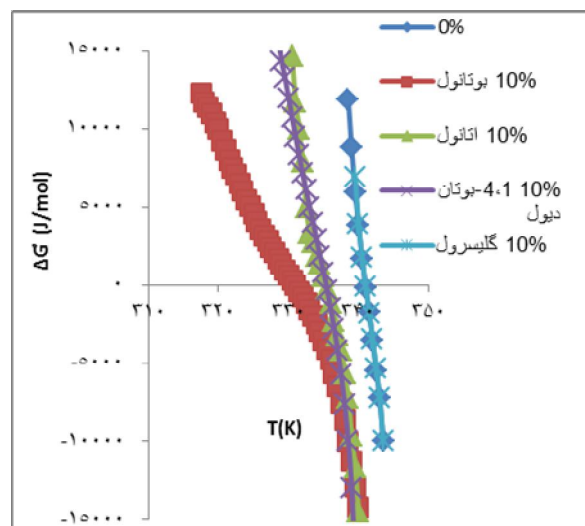
7 دیده می‌شود که با افزایش غلظت آلومینیوم، T_m آنزیم پپسین زیاد شده و در نتیجه پایداری حرارتی آن افزایش یافته است. در شکل 8 نیز دیده می‌شود، T_m آنزیم پپسین در حضور حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1,4-بوتان‌دیول کم و در حضور گلیسرول ثابت مانده است.



شکل 7 تغییرات ΔG° آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین



شکل 10 تغییرات ΔG° آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی اتانول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین



شکل 8 تغییرات ΔG° آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1,4-بوتان‌دیول و گلیسرول در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

گلیسرول در حضور و غیاب آلومینیوم نشان شده است.

جدول 1 تغییرات T_m ، آنزیم پپسین در غلظت‌های مختلف آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلون

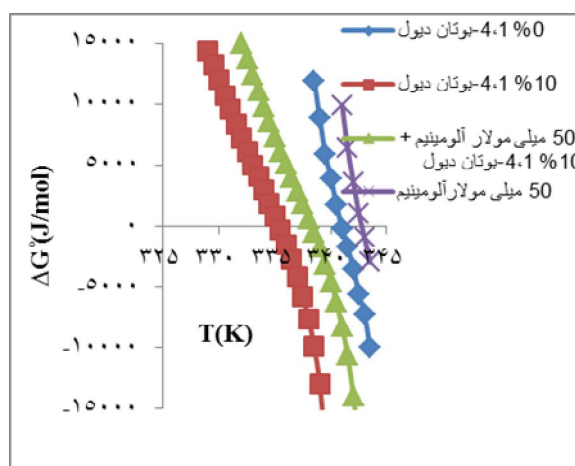
[Aluminium]mM	$T_m(K)$
0 میلی مولار	341
6 میلی مولار	341/2
10 میلی مولار	341/4
20 میلی مولار	341/9
50 میلی مولار	342/7

جدول 2 تغییرات T_m ، آنزیم پپسین در غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1,4-بوتان‌دیول و گلیسرول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلون

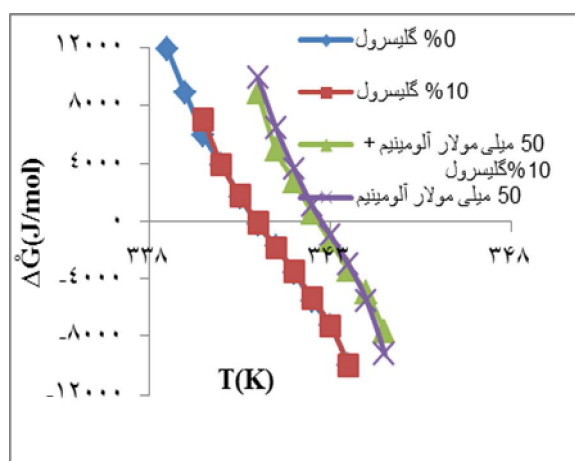
[Alcohol]%V/V	$T_m(^{\circ}K)$
0%	341
%10Butanol	330/8
%10Butanol+50mM Al ³⁺	335/8
%10Ethanol	335/2
%10Ethanol+50mM Al ³⁺	336/9
%101,4-Butanediol	335/4
%101,4- Butanediol+50mM Al ³⁺	338/3
%10Glycerol	341
%10Glycerol+50mM Al ³⁺	342/6

اثر غلظت‌های بالای حلال‌های آلی (بوتانول، اتانول و 1,4-بوتان‌دیول) 10 تا 50 درصد حجمی-حجمی بر روی پایداری پپسین بررسی شد که اثرات مشابهی داشتند؛ در واقع با افزایش غلظت حلال‌های آلی میزان پایداری پپسین بیشتر کاهش یافت، اما در مورد گلیسرول با افزایش غلظت گلیسرول، پایداری پپسین بیشتر شد.

در این نمودارها دیده می‌شود که T_m آنزیم پپسین در غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1,4-بوتان‌دیول و گلیسرول در حضور آلومینیوم نسبت به غیاب آن زیاد شده است.



شکل 11 تغییرات ΔG° آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی 1,4-بوتان‌دیول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلون



شکل 12 تغییرات ΔG° آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی گلیسرول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلون

در جداول 1 و 2 به ترتیب تغییرات T_m ، در غلظت‌های مختلف آلومینیوم، غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1,4-بوتان‌دیول و

یون آلومینیوم یک فلزی خاص است که در pH اسیدی به صورت هیدراته است. هضم اسیدی باعث حلالیت بیش‌تر ترکیبات آلومینیوم وارد شده به بدن به صورت گونه‌های تک مولکولی Al^{3+} می‌شود. بعد جذب آلومینیوم به طور نامساوی به همه بافت‌ها منتقل می‌شود و در بعضی جاها تجمع می‌کند. تقریباً نیمی از آلومینیوم بدن در اسکلت است و تقریباً یک چهارم آن در شش‌ها (از تجمع ترکیبات آلومینیوم نامحلول استنشاقی) است، آلومینیوم به طور گسترده برای تولید دارو و افزودنی‌ها استفاده می‌شود. یکسری از ترکیبات در سیستم زیستی و یا در غذاها به عنوان لیگاند می‌باشند. در نتیجه اتصال لیگاندها با آلومینیوم، خصوصیات فیزیولوژیکی آن‌ها از قبیل حلالیت در محیط آبی، پایداری در pH مختلف، بار الکتریکی، متفاوت می‌شود، بنابراین آلومینیوم خاصیت سمی دارد. آلومینیوم برای انسان‌ها، حیوانات و گیاهان سمی است و کمتر در حوزه بیوشیمی مطالعه شده‌است. آلومینیوم با تعداد بزرگی از پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها برهم‌کنش می‌دهد. نحوه اتصال آلومینیوم با ترکیبات زیستی ناشناخته است. بیشترین جایگاه‌های اتصال آلومینیوم هیدراته در سیستم‌های زیستی، دهنده‌های اکسیژن و خصوصاً دهنده‌های اکسیژن با بار منفی هستند. کربوکسیلات، فسفات، فنولات قوی‌ترین اتصال را دارند [18].

در مطالعه‌ای که اثر یون‌های آلومینیوم را بر روی پیسین و تریپسین بررسی کردند، نشان دادند که یون‌های آلومینیوم سبب افزایش فعالیت پیسین می‌شوند ولی بر روی فعالیت تریپسین اثری ندارند [21].

پاولیک³ و همکارانش در مطالعات کالریمتری اسکن تفاضلی (DSC) که بر روی پایداری دمایی پیسین در حضور یون‌های آلومینیوم انجام دادند، نشان دادند دو نوع

جایگاه اتصال برای یون‌های آلومینیوم روی پیسین است. تمایل آلومینیوم برای اتصال به جایگاه دوم بیشتر از جایگاه اول است. طبق منابع بررسی شده در مورد آلومینیوم، هنوز مشخص نشده است آلومینیوم از چه طریق سبب افزایش پایداری پیسین می‌شود [20]. یون‌های آلومینیوم نیز باعث افزایش فعالیت پیسین می‌شوند. در نتیجه اتصال آلومینیوم به پیسین سبب تغییر صورت‌بندی و افزایش صفحات بتا در پیسین می‌شود. احتمالاً آلومینیوم بر روی جایگاه اتصال سوپسترا به پیسین اثر ندارد اما با تغییر صورت‌بندی آنزیم، سرعت تبدیل سوپسترا به محصول را افزایش می‌دهد [18].

مولکول‌های پروتئین در محلول‌های آبی به وسیله یک پوسته هیدراته احاطه می‌شوند، که از مولکول‌های آب تشکیل شده است و به سطح پروتئین می‌چسبند. اگر یک حلال آلی حضور داشته باشد، مولکول‌های حلال تمایل دارند جایگزین مولکول‌های آب در هر دو قفسه هیدراته و داخلی پروتئین شوند، بنابراین برهم‌کنش‌هایی که مسئول برای صورت‌بندی آنزیم هستند تخریب می‌شوند. در مطالعه‌ای که سیمون و همکارانش بر روی فعالیت پیسین داشتند، نشان دادند که حلال‌های آلی اتانول و استونیتریل تا غلظت 60 % حجمی-حجمی بر فعالیت پیسین اثری ندارند اما از غلظت 60% تا 90 % فعالیت پیسین کم شده است و ۱۰۴ دی اکسان نیز تا غلظت 30 % بر فعالیت پیسین اثر نداشته است اما از غلظت 30 تا 90% فعالیت آن را کاهش داده است. احتمالاً حلال‌های آلی از طریق تغییر محیط کوچک آنزیم (قفسه هیدراته یا جایگاه فعال آنزیم) سبب کاهش فعالیت آن شده‌اند [14].

در مطالعه‌ای که مارتا کوتورمان و همکارانش بر روی آلفا کیموتریپسین داشتند، نشان دادند اگر گروه‌های آمینی آلفا کیموتریپسین با انیدریداسیداستیک، پروپیونیک، سیتراکونیک و فتالیک تغییر پیدا کنند، این تغییرات پایداری آنزیم را در محلول‌های آبی 60% اتانول و 4.1

³ V.M Pavelkic

دی اکسان و استونیتریل افزایش می‌دهند. استیله شدن گروه‌های آمینی پایداری آنزیم را کم می‌کنند اما سیترا ته شدن، پروپیونیل شدن و سوکسیلین شدن کیمو ترپسین پایداری آن را در حلال‌های آلی زیاد می‌کنند، پایداری بیشتر آنزیم ممکن است مربوط به افزایش برهم‌کنش‌های زنجیره‌های جانبی آروماتیک باشد (خصوصاً در مورد مشتقات فتالیک انیدرید) [22].

در مطالعه‌ای که اثر حلال‌های آلی را بر روی فعالیت و ساختار آنزیم لیپاز بررسی کرده‌اند، نشان داده شده است، فعالیت لیپاز با افزایش غلظت استون، استونیتریل و دی متیل سولفوکساید کاهش یافته است اما در غلظت‌های کم (تا 20% درصد حجمی-حجمی) ایزوپروپانول، متانول و دی متیل سولفوکساید افزایش یافته است، احتمالاً تغییر فعالیت مربوط به تغییر جایگاه فعال می‌باشد. مقدار km لیپاز در حضور حلال‌های آلی کاهش یافت و پایداری لیپاز نیز در همه حلال‌های آلی تغییر پیدا کرد [23].

بر طبق یک مکانیسم، الکل‌ها از طریق به هم ریختن اثر هیدروفوبیک و تغییر میان‌کنش‌های یونی و پیوندهای هیدروژنی ساختار سوم پروتئین را ناپایدار می‌نمایند. تغییر در پیوند هیدروژنی علاوه بر ناپایدار کردن ساختار سوم منجر به باز شدن برخی از ساختارهای دوم می‌شود. الکل‌های با زنجیره هیدروکربنی طول‌تر و بدون شاخه نسبت به الکل‌های کوتاه‌تر دارای انشعاب، هیدروفوبیسته بیش‌تری داشته و اثرات قوی‌تری را بر دگرگون‌سازی پروتئین اعمال می‌نمایند [24-26].

با توجه به اینکه آنزیم پپسین یک آنزیم صنعتی است در این مطالعه اثر آلومینیوم و حلال‌های آلی بر روی پپسین در محیط *in vitro* بررسی شده است.

در این مطالعه نشان داده شد که پایداری دمایی پپسین در حضور آلومینیوم زیاد و در حضور حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1,4-بوتان‌دیول به ترتیب کم شده، و در حضور گلیسرول ثابت می‌ماند. در واقع هر چه حلال آلی

غیرقطبی‌تر باشد، بیشتر پایداری آنزیم را کاهش می‌دهد. لذا پپسین در حضور گلیسرول که بیشترین قطبیت را دارد دارای بیشترین پایداری و در حضور بوتانول با کمترین قطبیت دارای کمترین پایداری می‌باشد، در ضمن پایداری دمایی آنزیم پپسین در حضور حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1,4-بوتان‌دیول و گلیسرول با افزودن آلومینیوم نسبت به غیاب آن زیاد می‌شود. تصور می‌شود یون‌های آلومینیوم از طریق برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک و داتیو به گروه‌های کربوکسیلات اسیدهای آمینه آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید در ساختار پپسین متصل و از طریق متراکم کردن ساختار آنزیم منجر به افزایش پایداری دمایی پپسین شده‌اند. بنابراین با استفاده از آلومینیوم می‌توان اثرات ناپایدارکنندگی حلال‌های آلی را بر وی پپسین کاهش داد.

4- منابع

- [1] Mohd Fadli, A. 2006. The production of extracellular protease using bacillus subtilis: effect of temperature and agitation speed.
- [2] Devlin T. M. 1992. Textbook of biochemistry. Wiley-Liss New York.
- [3] Rawlings, N. D., Morton, F. R. & Barrett, A. J. 2006. Merops: The peptidase database. Nucleic Acids Research, 34:D270-D272.
- [4] Mutlu, A. & Gal, S. 1999. Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. Physiologia Plantarum, 105(3):569-576.
- [5] Simões, I. & Faro, C. 2004. Structure and function of plant aspartic proteinases. European Journal of Biochemistry, 271(11): 2067-2075.
- [6] Horimoto, Y., Dee, D. R. & Yada, R. Y. 2009. Multifunctional aspartic peptidase prosegments. New biotechnology, 25(5): 318-324.
- [7] Davies, D. R. 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 19:189-215.
- [8] Koelsch, G., Mareš, M., Metcalf, P. & Fusek,

- pepsin: kinetics and thermodynamics. Medicinal Chemistry and Drug Design, Prof. Deniz Ekinici (Ed.) ISBN: 978-953- 51-0513-8, InTechAvailable from: <http://www.intechopen.com/books/medicinal-chemistry-and-drugdesign/aluminium-non-essential-activator-of-pepsin-kinetics-and-thermodynamics>.
- [19] Zatta, P. Bordin, C. Favarato, M. 1993. The Inhibition of Trypsin and α -Chymotrypsin Proteolytic Activity by Aluminum(III). Archives of Biochemistry and Biophysics, 303(2): 407-411
- [20] Pavelkić, V. M., Beljanski, M. V., Antić, K. M., Babić, M. M., Brdarić, T. P. & Gopčević, K. R. 2011. Thermal stability of porcine pepsin influenced by Al (III) ion: DSC study. Russian Journal of Physical Chemistry A, 85(13): 2245-2250.
- [21] Krejpcio, Z. Wójciak, R.W. 2001. The Influence of Al³⁺ Ions on Pepsin and Trypsin Activity in Vitro. The Journal of Environmental Studies, 11 (3): 251-254
- [22] Kotormán, M. Cseri, A. Laczkó, I. Simon^a, L. M. 2009. Stabilization of α -chymotrypsin in aqueous organic solvents by chemical modification with organic acid anhydrides. PubMed - indexed for MEDLINE.
- [23] Zahid Kamal, Md. Yedavalli, P. . Deshmukh, M V and Madhusudhana Rao, N. 2013. Lipase in aqueous-polar organic solvents: Activity, structure, and stability. Protein Science, 22(7): 904-915.
- [24] Arakawa, T. & Timasheff, S. N. 1982. Stabilization of protein structure by sugars. Biochemistry, 21(25): 6536-6544.
- [25] Kaushik, J. K. & Bhat, R. 1998. Thermal stability of proteins in aqueous polyol solutions: role of the surface tension of water in the stabilizing effect of polyols. the Journal of Physical Chemistry B, 102(36): 7058-7066.
- [26] Timasheff, S. N. 1998. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. Advances in Protein Chemistry, 51: 355-432.
- M. 1994. Multiple functions of pro-parts of aspartic proteinase zymogens. FebsLetters, 343(1): 6-10.
- [9] Okoniewska, M., Tanaka, T. & Yada, R. Y. 1999. The role of the flap residue, threonine 77, in the activation and catalytic activity of pepsin A. Protein Engineering, 12(1):55-61.
- [10] Dunn, B. M. 2002. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. Chemical Reviews, 102(12): 4431-4458.
- [11] Chakraborty, T., Chakraborty, I., Moulik, S. P. & Ghosh, S. 2007. Physicochemical studies on pepsin-CTAB interaction: Energetics and structural changes. the Journal of Physical Chemistry B, 111(10): 2736-2746
- [12] Uhlig, H. & Linsmaier-Bednar, E. M. 1998. Industrial enzymes and their applications, Wiley New York.
- [13] Fink, A. L., Calciano, L. J., Goto, Y., Kurotsu, T. & Palleros, D. R. 1994. Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states. Biochemistry, 33(41): 12504-12511
- [14] Simon, L. M., Kotormán, M., Szabó, A., Nemcsók, J. & Laczkó, I. 2007. The effects of organic solvent/water mixtures on the structure and catalytic activity of porcine pepsin. Process Biochemistry, 42(5): 909-912.
- [15] Simon, L. M., László, K., Vertesi, A., Bagi, K. & Szajáni, B. 1998. Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 4(1-2):41-45.
- [16] Simon LM¹, Kotormán M, Garab G, Laczkó I .2001. Structure and activity of alpha-chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media. Biochem Biophys Res Commun., 280(5):1367-71.
- [17] YESILOGLU, L. SAGIROGLU, A .2001. Trypsin-Catalyzed Peptide Synthesis in Acetonitrile with Low Water Content., Department of Chemistry, Trakya University, 22030 Edirne-TURKEY, 26 (2002): 529 - 534.
- [18] Pavelkic, V., Brdaric, T. & Gopcevic, K. 2012. Aluminium-non-essential activator of