Archive of SID

اثرمهاری چند آلکیل زانتات تازه سنتز شده بر فعالیت کرزولازی آنزیم تیروزیناز قارچ خوراکی

مهدی علی‌جانیان‌زاده[۱*]

۱. دانشجوی دکترای بیوفیزیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا

محل انجام تحقیق: مرکز تحقیقات بیوشیمی-بیوفیزیک دانشگاه تهران

***مسئول مکاتبات:** مهدی علی‌جانیان‌زاده، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین

پست الکترونیکی: Alijanian@ibb.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۳ تاریخ پذیرش: ۸۸/۴/۷

چکیده

سه ایزوآلکیل دی تیوکربنات (زانتات) به صورت نمک‌های سدیم، $C_3H_7OCS_2Na$ (I)، $C_4H_9OCS_2Na$ (II) و $C_5H_{11}OCS_2Na$ (III) توسط واکنش بین CS_2 با ایزوالکل مربوطه در حضور NaOH سنتز شدند و مهار آن‌ها بر روی فعالیت کرزولازی آنزیم تیروزیناز قارچ خوراکی *Agricus bisporous* خریداری شده از سیگما، امتحان شد. از4-[(4-methylphenyl)azo]-phenol (MePAPh) به‌عنوان سوبسترای سنتزی آنزیم برای فعالیت کرزولازی استفاده شد. نمودارهای لاین ویور-برک نشان دادند که این لیگاندها از الگوهای رقابتی و مختلط برای مهار آنزیم استفاده می‌کنند. برای فعالیت کرزولازی، ترکیبات I و II از الگوی مهاری مختلط پیروی کردند، اما ترکیب III از الگوی مهاری رقابتی پیروی کرد. ثابت مهاری (K_i) ترکیبات I، II و III برای فعالیت کرزولازی به ترتیب برابر با ۹/۸، ۷/۲ و ۶/۱ است. این ثابت‌های مهاری نشان می‌دهند که این سه لیگاند مهارکننده‌های خوبی برای آنزیم تیروزیناز قارچ خوراکی‌اند. هم سوبسترا و هم مهارکننده می‌توانند به صورت تعاونی منفی بین جایگاه‌های اتصال، به آنزیم متصل شوند ($\alpha > 1$) که میزان این تعاونی منفی با افزایش طول زنجیره آلیفاتیک در مهارکننده‌ها افزایش می‌یابد. مهار کرزولازی، به چلاته شدن یون‌های مس در جایگاه فعال توسط گروه S^- زانتات‌ها بستگی دارد که همین امر باعث شده است مقادیر K_i در فعالیت کرزولازی برای هر سه لیگاند یکسان باشد.

واژه‌های کلیدی: تیروزیناز قارچ خوراکی، آلکیل زانتات، مهار مختلط، مهار رقابتی، ثابت مهاری

مقدمه

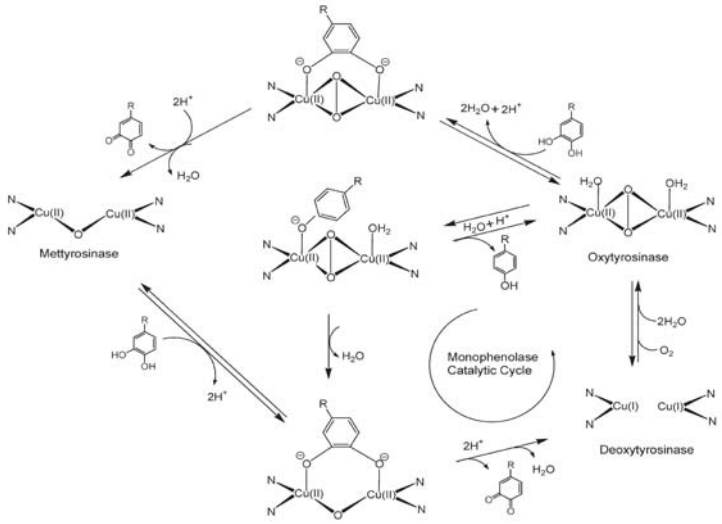
تیروزیناز (EC 1.14.18.1) یک آنزیم حاوی مس است که دو واکنش مختلف سنتز ملانین را کاتالیز می‌کند: هیدروکسیله شدن تیروزین توسط عمل مونوفنلازی آنزیم و اکسید شدن ۳و۴ دی هیدروکسی فنیل آلانین (L-DOPA) به *o*-دوپاکینون توسط عمل دی فنلازی. این آنزیم به میزان زیاد در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان، حیوانات و قارچ‌ها یافت می‌شود و مسؤول بیوسنتز ملانین و ترکیبات پلی‌فنلیک است. در پستانداران، تیروزیناز عامل تشکیل رنگدانه‌های پوست، مو و چشم است. در گیاهان، اهمیت کلیدی تیروزیناز در فرایندهایی نظیر پیگمانتاسیون و سیاه‌شدگی آنزیمی میوه‌ها و سبزیجات است. در حشرات، نقش مهمی در عمل تدافعی و اسکلت‌سازی ایفا می‌کند.

ملانین یکی از بیشترین رنگدانه‌های موجود در باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و جانوران و یک بیوپلیمر شبیه به مشکی است (۱). رنگ پوست و موی پستانداران توسط تعدادی فاکتور تعیین می شود که مهمترین آن‌ها میزان و نحوه پراکندگی تولید ملانین است. ملانین توسط سلول‌های ملانوسیت پراکنده در

www.SID.ir

Archive of SID

لایه بازال پوست ترشح می‌شود (۲). بسیاری از بیماری‌های پوستی، نتیجه سطح بالای عمل تولید رنگدانه پوستی است (۳). اختلالات متعدد پوستی ناشی از افزایش سطح پیگمانتاسیون اپیدرمی است. از انواع این اختلالات می‌توان به ملازما، لکه های پوستی و آسیب‌های آکتینی اشاره کرد (۷). تیروزیناز به طور گسترده در جانوران و گیاهان وجود دارد و در تشکیل رنگدانه‌های ملانین شرکت دارد (۶،۴،۵). در صنایع غذایی، تیروزیناز در کنترل کیفی و اقتصادی میوه‌ها و سبزیجات نقش مهمی دارد (۵، ۶ و ۷). تیروزیناز اکسید شدن ترکیبات فنلی را به کینون‌ها کاتالیز می‌کند و همچنین عامل رنگی شدن آنزیمی میوه‌ها و سبزیجات است. تیروزیناز را می‌توان از منابع ارزان مثل قارچ خوراکی *(Mushroom tyrosinase)* استخراج کرد. تیروزیناز قارچ خوراکی، ویژگی‌های جالب توجهی داشته و به نظر می‌رسد جایگاه فعال آن به سطح پروتئین نزدیک باشد. لذا برای بخش‌های فنلی ملکول‌های بزرگ مثل پپتیدها، قابل دسترسی است. جایگاه فعال تیروزیناز دو اتم مس و سه حالت دارد. مدل های ساختاری برای جایگاه فعال این سه فرم تیروزیناز فرض شده است (شکل ۱)(۹،۸).



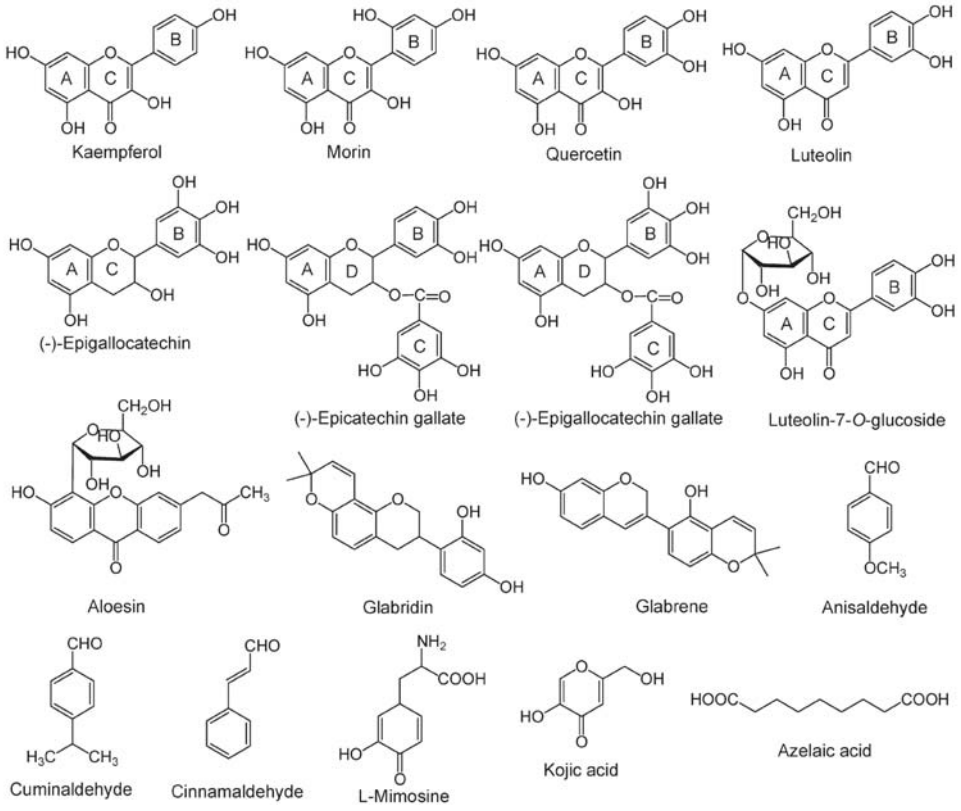
شکل ۱- چرخه کاتالیتیک هیدروکسیلاسیون مونوفنل و اکسیداسیون دی فنل (۸).

با توجه به موارد بالا یک مکانیسم مولکولی برای فعالیت های مونوفنلازی و دی فنلازی تیروزیناز در نظر گرفته شده است. مکانیسم فعالیت مونوفنلازی تیروزیناز بر پایه سه فرم آنزیم به طور گسترده مطالعه شده است (۱۰ و ۱۱). در چرخه مونوفنلازی، مونوفنل می تواند فقط با فرم اکسی واکنش دهد و به موقعیت عمودی یکی از مس ها در این فرم متصل شود (شکل ۱).o –دی فنل می تواند با فرم مت واکنش دهد. در چرخه دی فنلازی، هر دو فرم اکسی و مت می توانند با *o*-دی فنل واکنش دهند و آن را به *o*-کینون اکسید می کنند.

بیوسنتز ملانین با در معرض قرار نگرفتن در مقابل UV، مهار تیروزیناز و مهار متابولیسم ملانوسیت ها، مهار می شود (۱۳،۱۲). یکی از راه‌های درمان بیماری های مربوط به هایپر پیگمانتسیون استفاده از مهارکننده های تیروزیناز است. بنابراین، مطالعه این مهارکننده ها حایز اهمیت است. تعدادی از مهارکننده های تیروزیناز، هم از منابع طبیعی که هر دو فعالیت مونوفنلازی و دی فنلازی را مهار می کنند در شکل ۲ آمده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲- ساختار مهارکننده‌های طبیعی تیروزیناز.

در این مطالعه، اثر مهاری سه لیگاند سنتزی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد و وسایل مورد نیاز در این تحقیق عبارتند بودند از:

۱- تیروزیناز قارچ خوراکی با وزن ملکولی kD ۱۲۰=MW، جامد و با فعالیت ویژه ۳۴۰۰ unit/mg خریداری شده از سیگما

۲- 4-[(4-methylphenyl)azo]-phenol (MePAPh) سوبسترای سنتزی برای فعالیت کرزولازی (شکل ۳)

۳- n-alkyl xanthates لیگاندهای تازه سنتز شده (شکل ۴) .

۴- Na_2HPO_4 و NaH_2PO_4 خریداری شده از شرکت مرک برای تهیه بافر فسفات ۱۰ میلی مولار، pH = 6.8.

۵- اسپکتروفتومتر مرئی فرابنفش ساخت ژاپن UV-Vis, UV 3100 model shimadzu,

۶- -دستگاهpH متر Q50 - Beckman.

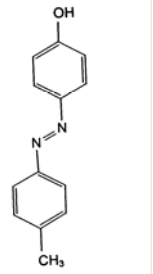
برای مطالعه سینتیکی آنزیم تیروزیناز برای واکنش کرزولازی از سوبسترای MePAPh استفاده شده است (شکل ۳). استفاده از این سوبسترا مشکلی در تداخل جذب بین محصولات، حد واسطها و مهارکننده‌ها با جذب سوبسترا ایجاد نمی‌کند.

سنجش فعالیت کرزولازی از طریق مصرف سوبستراهای MePAPh، به ترتیب، به مدت ۲ دقیقه صورت گرفته است. غلظت آنزیم مورد استفاده ۱۱۲/۶۸ µg/ml می باشد.

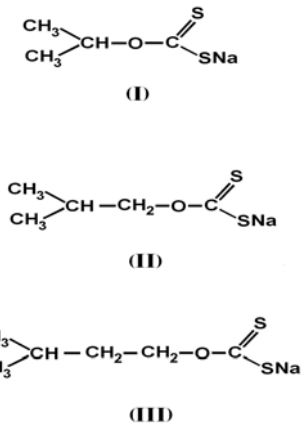
فعالیت کرزولازی در λ_{max} = 352 nm اندازه‌گیری شده است. تمام مواد به‌کار رفته در آزمایش‌های فوق از قبیل آنزیم، سوبسترا و لیگاندها به‌صورت محلول‌های تازه تهیه شده مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳- MePAPh سوبسترای سنتزی برای فعالیت کرزولازی.



شکل۴- ساختار لیگاندها.

بحث و نتیجه گیری

نمودارهای لاین ویور-برک برای فعالیت کرزولازی تیروزیناز قارچ خوراکی که MePAPh را هیدروکسیله می کند (به عنوان سوبسترا)، در حضور غلظت‌های مختلف Iso-propyl xanthate (I) و iso-butyl xanthate (II) و iso-pentyl xanthate (III) در شکل‌های ۵، ۶ و۷ به ترتیب نشان داده شده است. برای ترکیبات I و II این نمودارها یک‌سری خطوط راست هستند که در سمت چپ محور عمودی همدیگر را قطع می‌کنند. برای ترکیب I این تقاطع نزدیک به محور افقی (شکل ۵) و برای ترکیب II کمی دورتر از محور افقی است (شکل ۶) که نشان می‌دهد نوع مهار، مختلط است. مقادیر سرعت ماکزیمم ظاهری (V_{max}') و ثابت میکائیلیس ظاهری (K_m') و همچنین شیب خطوط (K_m'/V_{max}') را می توان در غلظت های مختلف مهارکننده (I, II) به دست آورد. نمودار ثانویه شیب در مقابل غلظت مهارکننده خط راستی ایجاد می‌کند که محل تلاقی آن با محور Xها $-K_i$ است (شکل-های به ترتیب ۸ و ۹ برای ترکیبات I و II است). همچنین نمودار ثانویه دیگر که معکوس سرعت ماکزیمم ظاهری در مقابل غلظت مهارکننده است، خط راستی تشکیل می دهد که محل تلاقی آن با محور Xها $-\alpha K_i$ است (شکل‌های به ترتیب ۱۰و ۱۱ برای I و II است) که K_i ثابت مهار و α فاکتور اندرکنش بین جایگاه اتصال سوبسترا و مهارکننده است. نمودارهای لاین ویو-ربرک برای ترکیب III یک‌سری خطوط راست ایجاد می کند که یکدیگر را دقیقا روی محور عمودی قطع می کنند. مقدار سرعت ماکزیمم ظاهری در حضور مهارکننده III بدون تغییر مانده، اما K_m' افزایش یافته است که نشان دهنده مهار رقابتی است (شکل ۷). نمودار ثانویه که شیب در هر غلظت مهارکننده در مقابل غلظت های مختلف مهارکننده (III) می باشد که از روی محل تلاقی آن با محور Xها ثابت مهار ($-K_i$) به دست می آید (شکل ۱۲).

www.SID.ir

Archive of SID

مقادیر K_i و α فعالیت کرزولازی تیروزیناز در حضور ترکیبات I، II و III در جدول ۱ نوشته شده است. مقدار α برای I، ۱/۲ است. برابر بودن مقدار α با یک این معنی را می دهد که مهار، از نوع غیررقابتی است. در مهار غیررقابتی، هیچ اندرکنشی بین جایگاه اتصال مهارکننده و سوبسترا وجود ندارد. بنابراین، یک اندرکنش ضعیف (تعاونی منفی) بین جایگاه اتصال سوبسترا و I وجود دارد که باعث انحراف کم α از یک می شود. مقدار α برای II برابر با ۴/۱ است که نشان می دهد با اضافه کردن یک گروه CH_2 به ساختار لیگاند، تعاونی منفی بین جایگاه اتصال سوبسترا و مهارکننده افزایش یافته است. اضافه کردن یک گروه دیگر CH_2 به لیگاند باعث شده که مهار برای III رقابتی با مقدار بی‌نهایت برای α شود که نشان میدهد اندرکنش بین جایگاه اتصال سوبسترا و مهارکننده آن‌قدر زیاد است که فقط یا سوبسترا می تواند به آنزیم متصل شود یا مهارکننده. همان‌طور که جدول۱ نشان می دهد، بزرگترین مقدار K_i برای I برابر با μM ۹/۸ و کوچکترین آن برای III برابر با μM ۶/۱.. بنابراین، تمایل اتصال مهارکننده به آنزیم از I تا III زیاد تغییر نکرده است، فقط با اضافه کردن گروه CH_2 تعاونی منفی بین جایگاه اتصال سوبسترا و مهارکننده زیاد شده است.

همچنین تغییرات انرژی آزاد استاندارد گیبس ($\Delta G°$) برای اتصال این سه لیگاند به آنزیم در فعالیت کرزولازی محاسبه شد. برای محاسبه $\Delta G°$ از رابطه ۱ استفاده گردید (۱۴). که در آن، K همان ثابت اتصال تجمع است که از معکوس کردن ثابت های مهار K_i حاصل شده است.

$$\Delta G° = -R\ T\ \ln K$$

در این رابطه، R ثابت گازها و T دمای محیط است.

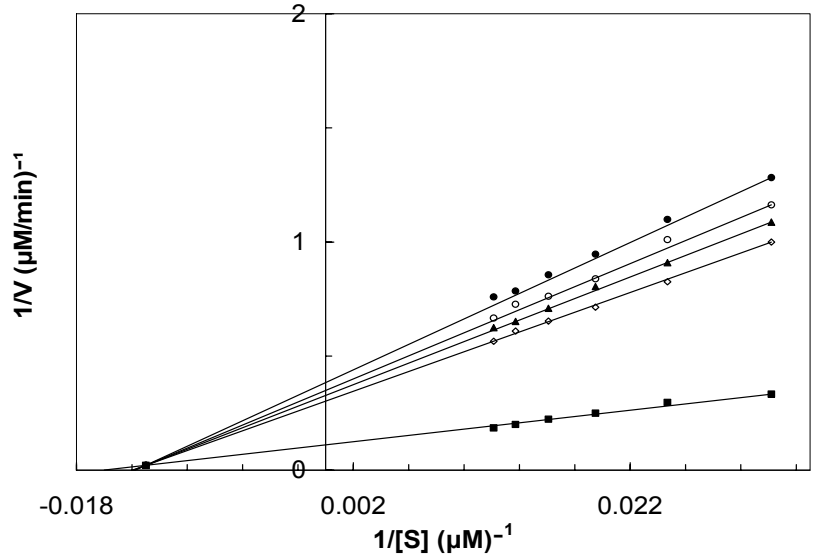
بدین صورت مقادیر ($\Delta G°$) محاسبه شده است:

برای **I** $\Delta G° = -0.008314 \times 293 \times \ln (1.0 \times 10^5) = -28.1\ kJ\ mol^{-1}$

برای **II** $\Delta G° = -0.008314 \times 293 \times \ln (1.4 \times 10^5) = -28.9\ kJ\ mol^{-1}$

برای **III** $\Delta G° = -0.008314 \times 293 \times \ln (1.6 \times 10^5) = -29.2\ kJ\ mol^{-1}$

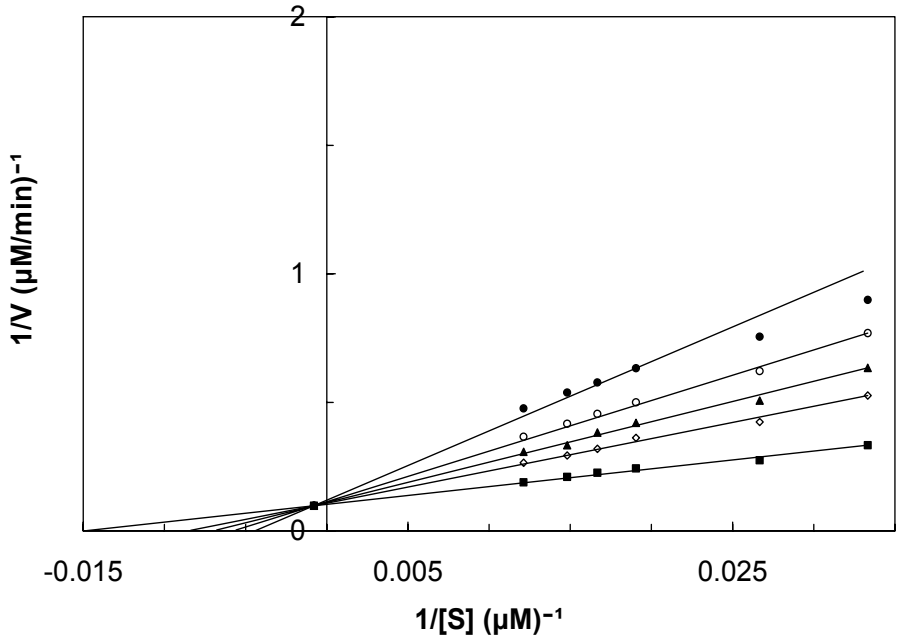
مقادیر ($\Delta G°$) برای هر سه لیگاند در جدول ۱ نوشته شده است.



شکل ۵- نمودار لاین ویوربرگ سینتیک تیروزیناز قارچ خوراکی برای واکنش کرزولازی و استفاده از MePAPh به عنوان سوبسترا در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار، pH = ۶/۸ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت آنزیمی ۱۱۲/۶۸µg/ml، در حضور غلظت های مختلف **I**:

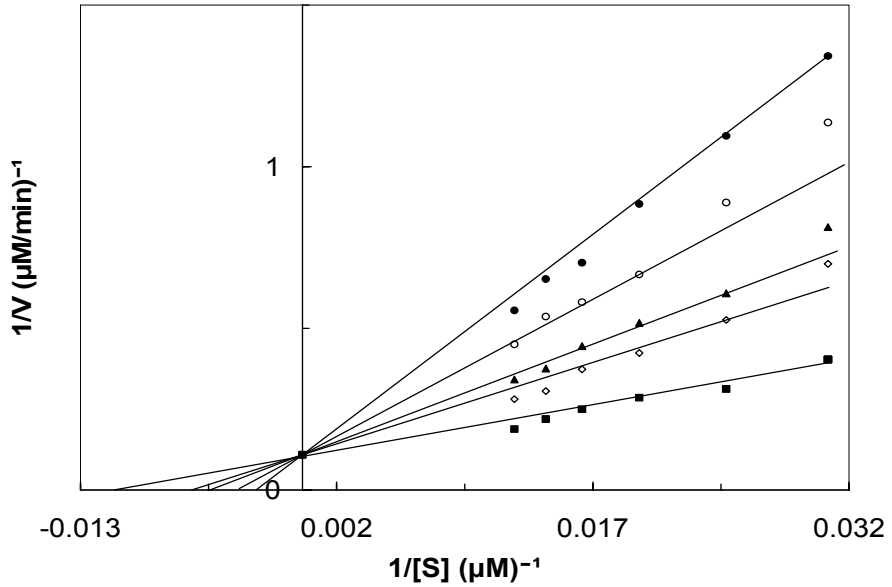
0 mM (■), 0.02 mM (◊), 0.0225 mM (▲), 0.025 mM (○), 0.03 mM (●)

www.SID.ir



شکل۶- نمودار لاین ویوربرگ سینتیک تیروزیناز قارچ خوراکی برای واکنش کرزولازی و استفاده از MePAPh به عنوان سوبسترا در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار، pH = ۶/۸ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت آنزیمی ۱۱۲/۶۸µg/ml، در حضور غلظت های مختلف I I I:

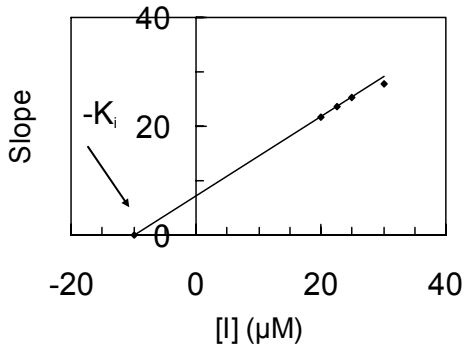
0 mM (■), 0.0175 mM (◊), 0.02 mM (▲), 0.0225 mM (○), 0.025 mM (●)



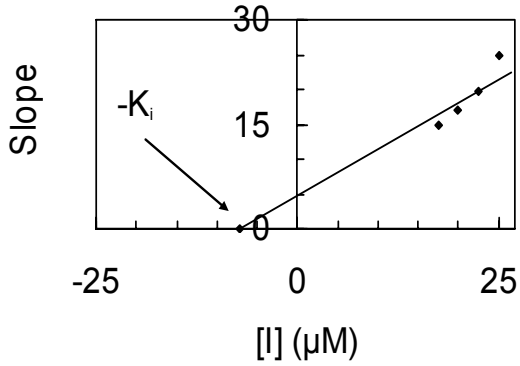
شکل۷- نمودار لاین ویوربرگ سینتیک تیروزیناز قارچ خوراکی برای واکنش کرزولازی و استفاده از MePAPh به عنوان سوبسترا در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار، pH = ۶/۸ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت آنزیمی ۱۱۲/۶۸µg/ml، در حضور غلظت های مختلف **I I I**:

0 mM (■), 0.0125 mM (◊), 0.015 mM (▲), 0.0175 mM (○), 0.02 mM (●).

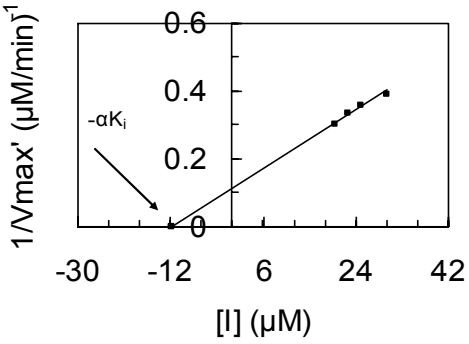
www.SID.ir



شکل ۸- نمودار ثانویه اول به دست آمده از شکل ۵ که شیب در مقابل غلظت مهارکننده است که از روی نقطه تقاطع آن با محور X، $-K_i$ به دست می آید.

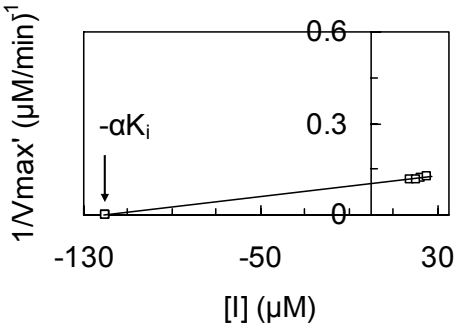


شکل ۹- نمودار ثانویه اول به دست آمده از شکل ۶ که شیب در مقابل غلظت مهارکننده می باشد که از روی نقطه تقاطع آن با محور X، $-K_i$ به دست می آید.

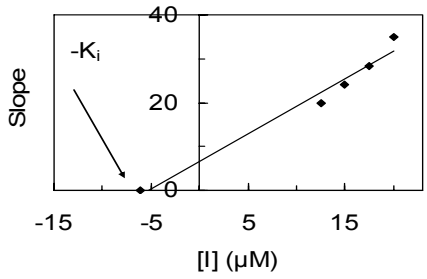


شکل ۱۰ - نمودار ثانویه دوم به دست آمده از شکل ۵ که معکوس سرعت ماکزیمم ظاهری در مقابل غلظت مهارکننده است که از روی نقطه تقاطع آن با محور X، $-\alpha K_i$ به دست می آید.

www.SID.ir



شکل۱۱- نمودار ثانویه دوم به دست آمده از شکل۶ که معکوس سرعت ماکزیمم ظاهری در مقابل غلظت مهارکننده می باشد که از روی نقطه تقاطع آن با محور X، $-\alpha K_i$ به دست می آید



شکل۱۲- نمودار ثانویه به دست آمده از شکل ۷ که شیب در مقابل غلظت مهارکننده است که از روی نقطه تقاطع آن با محور X، $-K_i$ به دست می آید

جدول ۱- پارامترهای ترمودینامیکی اتصال 2-Propanol dithioxantate (**I**)، iso-butanol dithioxantate (**II**) و iso-pentanol dithioxantate (**III**) به تیروزیناز قارچ خوراکی در pH = ۶/۸ و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد.

Reaction type	Ligands	$K_a\,(M)^{-1}$	K_i (µM)	$\Delta G°(kJ\ mol)^{-1}$	α
Cresolase activity	**I**	1.0×10^5	9.8	–28.1	1.2
	II	1.4×10^5	7.2	–28.9	4.1
	III	1.6×10^5	6.1	–29.2	∞

بعضی از ترکیبات تیول به خاطر توانایی چلات کردن Cu^{+2} می توانند به عنوان مهارکننده تیروزیناز مورد استفاده قرار گیرند (۱۵). همچنین هر سه این ترکیبات تازه سنتز شده، به عنوان مهارکننده عمل می کنند. هر نمک سدیم n-آلکیل زانتات یک آنیون حاوی گروه S^- تولید می کند و یک دم هیدروفوب دارد. با مقایسه مقادیر K_i و $\Delta G°$ در جدول ۱ درمی یابیم که این سه لیگاند فعالیت کرزولازی تیروزیناز قارچ خوراکی را به خوبی مهار کرده اند. نتایج در اینجا نشان می دهند که نوع پروسه اتصال مهارکننده در فعالیت کرزولازی از طریق اندرکنش های الکترواستاتیک است (۱۶). از این رو، انتظار داریم که هر سه مهارکننده در فعالیت کرزولازی به خاطر داشتن گروه باردار مشابه، K_i مشابه داشته باشند.

تقدیر و تشکر

از جناب آقای پروفسور صبوری، رییس مرکز تحقیقات بیوشیمی-بیوفیزیک دانشگاه تهران به

www.SID.ir

Archive of SID

خاطر فراهم آوردن امکانات لازم برای انجام این تحقیق، صمیمانه تشکر می‌کنم.

منابع مورد استفاده

1- Prota, G., 1988. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. Med Res Rev 8: 525-556.
2- Spritz, R. A., Hearing, V., 1994. Genetic disorders of pigmentation. Adv Hum Genet 22: 1-45.
3- Kim, Y. J., Uyama, H., 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. Cell Mol Life Sci 62: 1707-1723.
4- Pawelek, J. M., Korner, M. M., 1982. The biosynthesis of mammalian melanin. Am Sci 70: 136-145.
5- Whitaker, J. R., 1995. Structure and mechanisms. In: Wong DWS, ed. Food enzymes.Chapman and Hall, New York. 271–307.
6- Mayer, A. M., 1987. Polyphenol oxidases in plants: recent progress. Phytochemistry 26: 11-20.
7- Friedman, M., 1996. Food browning and its prevention: an overview. J Agric Food Chem 44: 631-653.
8- Sánchez-Ferrer, Á., Bru, R., García-Carmona, F., 1990. Partial purification of a thylakoid-bound enzyme using temperature- induced phase partitioning. Anal Biochem 184: 279–282.
9- Solomon E. I., Sundaram, U. M., Machonkin, T. E., 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. Chem Rev 96: 2563–2605.
10- Espin, J. C., Garcia-Ruiz, P. A., Tudela J., Garcia-Canovas, F., 1998. Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase. Biochem J 15: 547-51.
11- Naish-Byfield, S., Riley, P. A., 1992. Biochem J 288: 63-67.
12- Seiberg, M., Paine, C., Shalow, E., Andrade-Gordon, P., Costanzo, M., Eisinger, M., 2000. Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. J Invest Dermatol 115: 162-167.
13- Seiberg, M., Paine, C., Sharlow, E., Andrade-Gordon, P., Costanzo, M., Eisinger, M., 2000. The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. Exp Cell Res 254: 25-32.
14- Atkins. P., DePaula J., 2002. Physical Chemistry, 7th Ed. WH Freeman & Company: New York. Chap 9.
15- Hanlon, D. P., Shuman S., 1975. Copper ion binding and enzyme inhibitory properties of the antithyroid drug methimazole. Experientia 31: 1005-1006.
16- Saboury, A. A., Zolghadri, S., Haghbeen, K., Moosavi-Movahedi, A. A., 2006. The inhibitory effect of benzenethiol on the cresolase and catecholase activities of mushroom tyrosinase. J Enz Inhib Med Chem 21: 711-717.

www.SID.ir