زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 8، شماره 1، بهار و تابستان 1396

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

زینب ساعدی[1*]، شاهین گوانجی[2]، حسن محبت کار[3]

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، پیش بینی 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 برهم کنش‌های 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، فلوفنازین، 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 داروئی 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

سیاه زخم، آنتراکس یا شاربن 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 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

Archive of SID
www.SID.ir

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 آئروسل 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 اِدِم (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 میتوژن[4] باعث شکستن آن می‌شود. در اثر این عمل سیگنال‌های لازم جهت تکثیر متوقف شده و سلول به سوی مرگ پیش می‌رود [7]. فاکتور اِدِم، یک آدنیلات سیکلاز حساس به کالمودولین است که پس از ورود به سلول سطح آدنوزین مونوفسفات حلقوی[5] درون سلولی را افزایش داده و بدین ترتیب موجب ایجاد اِدِم 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: CMG2[6] و TEM8[7]. هر دو رسپتور از طریق دومینی به نام VWA[8] 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

[1] Protective Antigen
[2] Edema Factor
[3] Lethal Factor

[4] Mitogen –Activated Protein Kinase (MAPK)
[5] cAMP
[6] Capillary Morphogenesis Protein2
[7] Tumor Endothelial Marker8
[8] Von Willebrand Factor A

Archive of SID
www.SID.ir

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 آنتی‌اکسیدان 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 طوری‌که مصرف چای سبز که غنی از کاتچین است می‌تواند شروع پیری را به تأخیر بیاندازد [12]. همچنین چندین مطالعه اثرات ضد دیابتی ترکیبات پلی‌فنلی را گزارش کرده‌اند. پلی‌فنل‌ها ممکن است با مکانیسم‌های مختلفی مانند مهار جذب گلوکز در روده یا مهار جذب آن توسط بافت‌های محیطی،هایپرگلیسمی 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 پروتئین[1] 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 لیگاندها از وبگاه اینترنتی www.chemspider.com به دست آمد.

2-2- بررسی برهم‌کنش گیرنده با لیگاند با استفاده از وب سرور Swissdock

برهم‌کنش 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 برهم‌کنش 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 برهم‌کنش بوده به طوری که امتیاز منفی تر، نشان دهنده برهم‌کنش 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 پروتئینی[2] است. نتایج داکینگ به صورت اعدادی به نام فول فیتنس[3] 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 برهم‌کنش می‌باشد [17].

[1] Protein Data Bank

[2] Protein Sequence alignment
[3] Fullfitness

Archive of SID
www.SID.ir

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 آنتراسیس* 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 ابسلن و تایمرازول به عنوان مهارکننده‌های قوی اتصال TEM8-PA گردیدند [21]. همچنین کریان و همکاران در فوریه 2013، گزارش نمودند که ترکیب پنتا-اُ-گلیکول بتا-دی-گلوکز[1] مهارکننده CMG2 و دارای فعالیت آنتی آنژیوژنز می‌باشد. این ترکیب یک گالوتانین[2] 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.

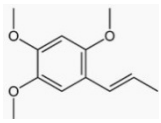
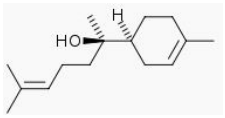
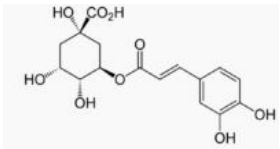
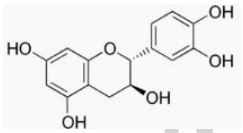
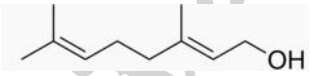
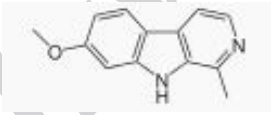
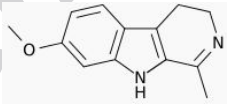
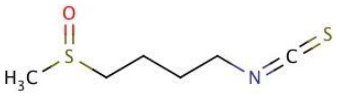
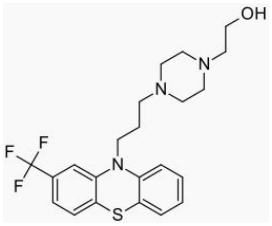
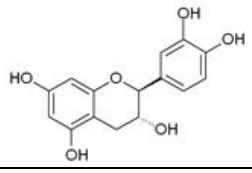
اسید آمینه‌های دخیل در اتصال به هر یک از لیگاندها، که با نرم‌افزار Chimera به دست آمد، در جدول 2 نشان داده شده است. تعداد این اسید آمینه‌ها برای لیگاندهای مختلف، از دو تا بیش از 20 اسید آمینه متفاوت است. مطالعات نشان داده، چهار اسید آمینه E122, Y158,Y119, H121 در توالی CMG2 که در سطح برهم‌کنش آن با PA 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 اسیدآمینه H121 و E122 در توالی CMG2 با اسیدآمینه 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، احتمالا

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

Archive of SID
www.SID.ir

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

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

ترکیب شیمیایی	ساختار	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

Archive of SID

www.SID.ir

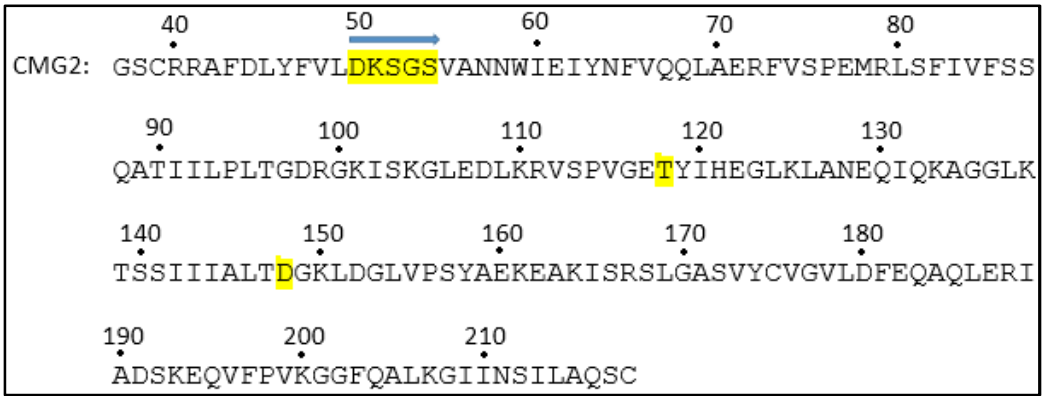
جدول 2 نتایج حاصل از آنالیز برهم کنش لیگاندها با گیرنده، با استفاده از نرم‌افزار Chimera

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).

تقریباً 46 درصد از تمام دومین‌های VWA دارای یک جایگاه چسبندگی وابسته به یون فلزی (MIDAS)[1] کاملاً حفاظت شده، با توالی (DXSXS…T….D) هستند که بنیان I[2] 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 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.

[1] Metal ion-dependent adhesion site
[2] I-motif

Archive of SID
www.SID.ir



شکل 1 موقعیت بنیان MIDAS در توالی CMG2

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 هلیکوباکترپیلوری، 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 بیوتیکِ هلیکوباکترپیلوری 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].

4- نتیجه‌گیری

به این دلیل که اتصال یکی از اجزای سم سیاه‌زخم یعنی آنتی‌ژن محافظت کننده 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 محافظت کننده 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.

Archive of SID
www.SID.ir

[5] Edwards, K. A., Clancy, H. A., Baeumner, 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 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)

www.SID.ir

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 sulforaphanemediated anti-inflammatory mechanisms. J Biol Chem. 276:32008-32015.

[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.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 8، شماره 1، بهار و تابستان 1396

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

کلثوم شهدادنژاد[1]، بهزاد شارقی[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 وگلیسرول) 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

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

Archive of SID
www.SID.ir

تشکیل می‌دهند [1]. آنزیم‌های پروتئولیتیک بر اساس فعالیت‌های کاتالیتیکی آن‌ها دسته‌بندی می‌شوند. سرین پروتئازها از سرین، آسپارتیک پروتئازها از آسپارتات، یا متالوپروتئازها از یون‌های فلزی برای انجام عمل کاتالیتیکی خود استفاده می‌کنند [2]. آسپارتیک پروتئازها در دسته A در بانک داده‌های MEROPS طبقه بندی شده‌اند، که دسته بندی پپتیدازها و مهارکننده‌های آن‌ها بر مبنای شباهت‌های ساختار سوم و اول است [3]. 14 خانواده از آسپارتیک‌پروتئازها وجود دارد، که به طور گسترده در مهره‌داران، قارچ‌ها، گیاهان، پروتوزوآ 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 آسپارتات 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]. آسپارتیک‌پروتئازها در خصوصیات کاتالیتیکی، محل سلولی، عملکرد بیولوژیکی با هم تفاوت دارند [8].

آنزیم پپسین خوکA[1] EC(3.4.23.1)، متعلق به آسپارتیک‌پروتئازها است [9]. پپسین در pH خنثی به صورت زیموژن غیرفعال پپسینوژن تا می‌خورد [10]. همانند دیگر زیموژن‌های آسپارتیک معده، فعال شدن پپسینوژن در مقادیر pH بین 1 و 4 اتفاق می‌افتد. در pH اسیدی پل‌نمکی که موقعیت PS ناحیه *N*-ترمینال را در جایگاه‌فعال 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، پپتیدازHIV 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

Archive of SID
www.SID.ir

سوبسترا (قندها و مشتقات آن‌ها) به دلیل قطبیت بالای آن‌ها استفاده شوند. 4-جابجایی واکنش‌های 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 مطالعه‌ای که سیمون و همکارانش، اثر حلال‌های آلی را بر روی ساختار و فعالیت آلفا کیموتریپسین و تریپسین بررسی کردند، نشان دادند که حلال‌های آلی اتانول و 1،4 دی اکسان و استونیتریل ساختار دوم این آنزیم‌ها را تغییر می‌دهند. مقدار km آلفا کیموتریپسین و تریپسین در غلظت‌های پایین حلال‌های آلی کاهش یافت و در غلظت‌های بالای آن‌ها زیاد شد. پایداری آلفا کیموتریپسین و تریپسین با افزایش غلظت حلال‌های آلی نیز تغییر پیدا کرد، تریپسین پایداری بیشتری نسبت به کیموتریپسن در همه حلال‌های آلی داشت [16]. در مطالعه‌ای که بر روی تریپسین تثبیت شده با **آلومینیوم** انجام داده‌اند، نشان داده شده است فعالیت سنتز پپتیدی تریپسین تثبیت شده با آلومینیم در حضور حلال‌های آلی آمیل الکل، تتراهیدروفوران و استونیتریل افزایش پیدا می‌کند، 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 بیشتراست [17].

آلومینیوم به طور گسترده برای تولید دارو وافزودنی‌ها استفاده می‌شود [18].

در مطالعه‌ای که اثر یون‌های **آلومینیوم** را بر روی فعالیت تریپسین و کیموتریپسن بررسی کردند، نشان دادند یون‌های **آلومینیوم** اثر مهاری بر روی تریپسین و کیموتریپسن داشته‌اند [19].

در مطالعاتی که پاولیک[2] و همکارانش بر روی پایداری دمایی پپسین در حضور یون‌های **آلومینیوم** انجام دادند، نشان دادند که پپسین در دمای 70 درجه سانتی‌گراد و بالاتر باز می‌شود نتایج آن‌ها نشان داد که برگشت‌پذیری دمایی برای پپسین طبیعی تقریباً 35% و در حضور **آلومینیوم** تقریباً 80% می‌باشد [20].

2- مواد

در این مطالعه از آنزیم پپسین خوک (محصول شرکت سیگما) ، بافر گلایسین-اسیدکلریدریک (محصول شرکت مرک) با pH=2 در غلظت 100 میلی‌مولار، **آلومینیوم** و حلال‌های آلی (محصولات شرکت مرک) و از دستگاه اسپکتروفتومتر *UV-Vis* مدل فارماسیا-4000، برای اندازه‌گیری استفاده شده است.

3- روش‌ها

بررسی پایداری حرارتی آنزیم پپسین در غلظت‌های مختلف **آلومینیوم** در حضور و غیاب حلال‌های آلی در دامنه حرارتی303 تا 363 درجه کلوین: از بافر گلایسین-اسیدکلریدریک با pH= 2 در غلظت 100 میلی‌مولار و غلظت‌های مختلف **آلومینیوم** (0تا50 میلی‌مولار) و حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول (10% حجمی-حجمی) استفاده شد. منحنی‌های دگرگون سازی در غلظت‌های مختلف **آلومینیوم** در حضور و غیاب حلال‌های آلی در طول موج 280 نانومتر با استفاده از محلول‌های پپسین با غلظت 0/138 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمده است.

پایداری حرارتی آنزیم پپسین، با اندازه‌گیری تغییرات انرژی آزاد گیبس و T_m محاسبه می‌گردد. برای این هدف با تغییر آنزیم از حالت طبیعی به حالت دگرگون‌شده، کسر دگرگون‌سازی بصورت رابطه (1) محاسبه می‌شود:

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

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

[2] V.M Pavelkic

Archive of SID
www.SID.ir

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 گیبس نیز از رابطه (3) محاسبه می‌شود:

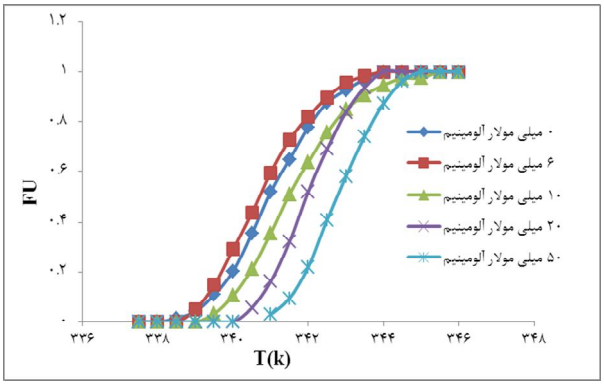
$$\Delta G°=-RTlnK_{eq}=-RTln[F_U/(1-F_U)]= -RTln[(A_N-A)/(A-A_U)] \quad (3)$$

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

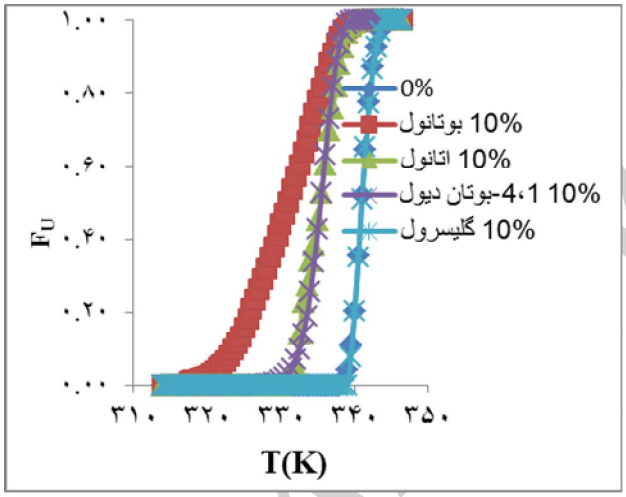
3- نتایج و بحث

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 دگرگون-سازی مطالعه نیروهای مؤثر و نقش انواع میان‌کنش‌ها در جایگاه‌فعال 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 حرارتی303 تا 363 درجه کلوین در pH=2 به تصویر کشیده شده است. به طور کلی می‌توان گفت، چنان چه منحنی دگرگون سازی 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 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 pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

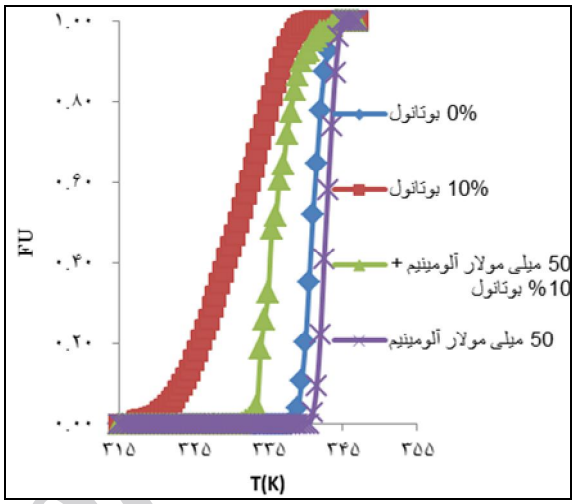


شکل 2 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4 -بوتان‌دیول و گلیسرول در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

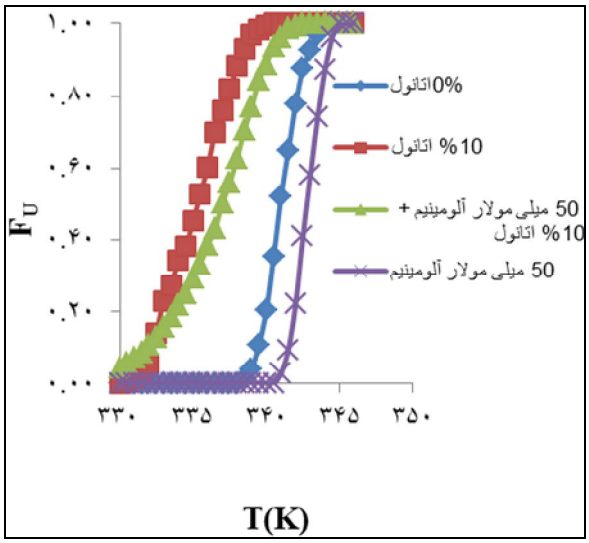
در شکل‌های 3 تا 6 به ترتیب تغییرات کسر دگرگون-سازی علیه دما در غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4 -بوتان‌دیول و گلیسرول در حضور و غیاب **آلومینیوم** در دامنه حرارتی303 تا 363 درجه کلوین در pH=2 نشان داده

www.SID.ir

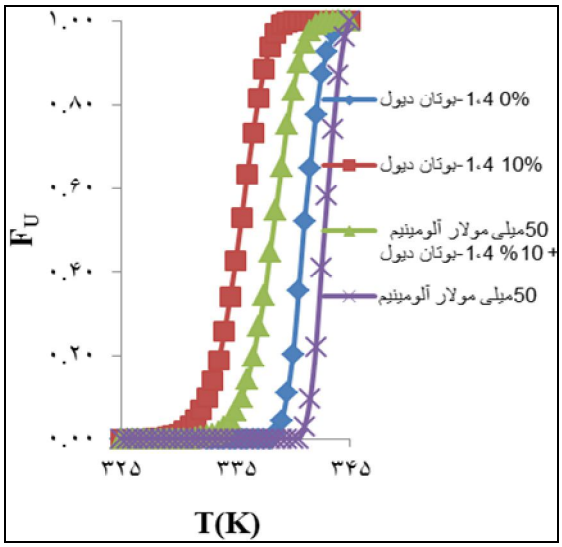
شده است. همان‌طور که دراین نمودارها دیده می‌شود، پایداری آنزیم پپسین به حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول در حضور **آلومینیوم** نسبت به غیاب آن زیاد شده است.



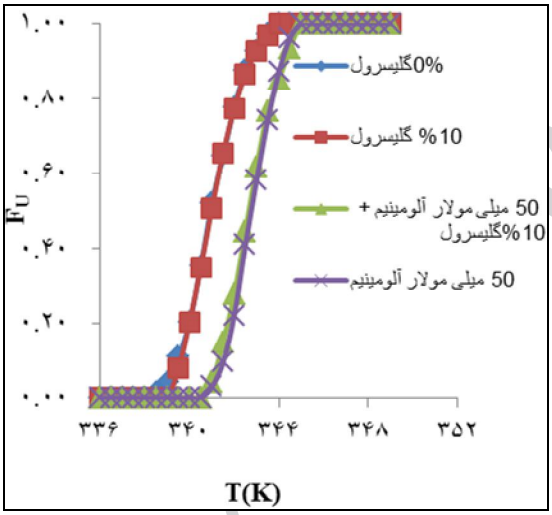
شکل 3 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی بوتانول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین



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 pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین



شکل 5 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی1،4-بوتان‌دیول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

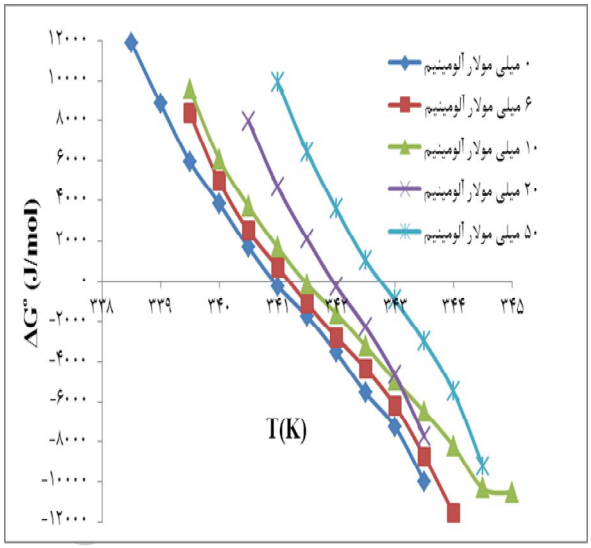


شکل 6 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلیگلیسرول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

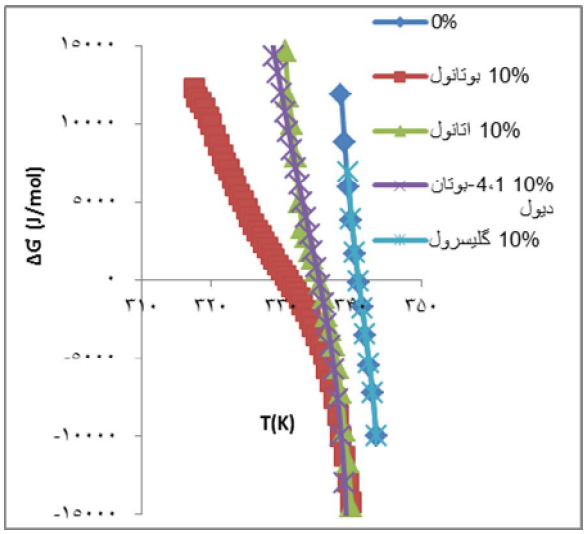
در شکل‌های 7 و 8، به ترتیب تغییرات ΔG° علیه دما در غلظت‌های مختلف **آلومینیوم** و 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول در pH=2 به تصویر کشیده شده است. در شکل

www.SID.ir

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.

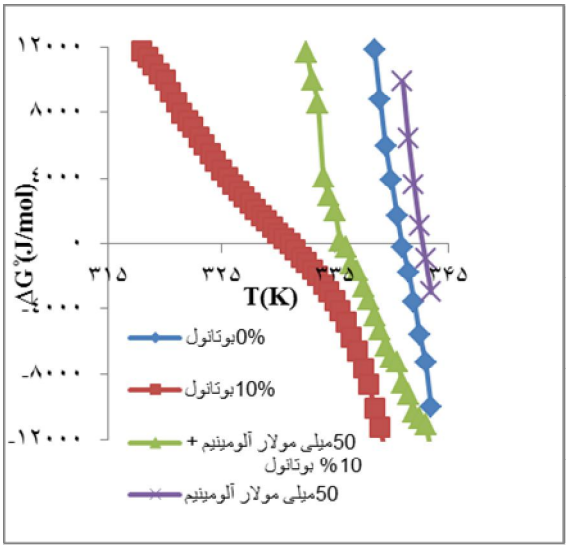


شکل 7 تغییرات $\Delta G°$ آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

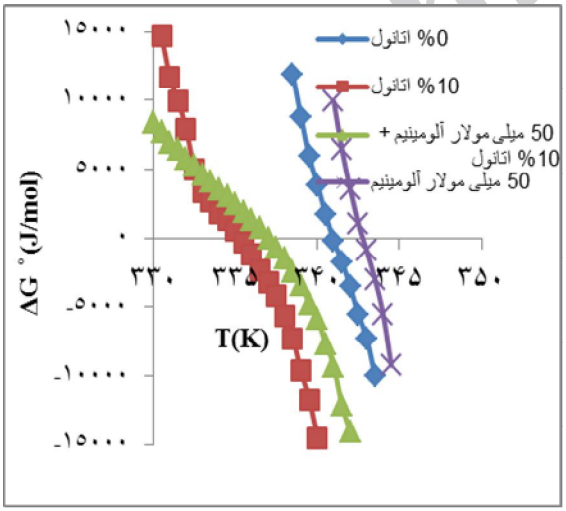


شکل 8 تغییرات $\Delta G°$ آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

در شکل‌های 9 تا 12، به ترتیب تغییرات $\Delta G°$ 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.



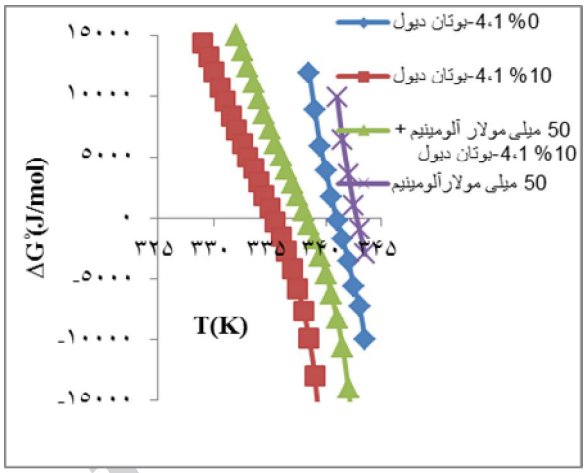
شکل 9 تغییرات $\Delta G°$ آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی بوتانول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین



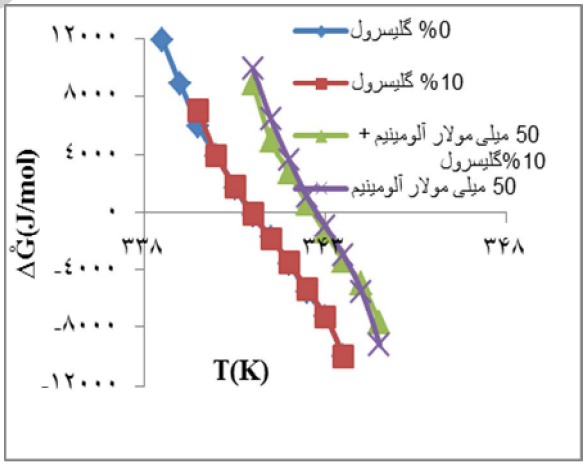
شکل 10 تغییرات $\Delta G°$ آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی اتانول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

www.SID.ir

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 $\Delta G°$ 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 کلوین



شکل 12 تغییرات $\Delta G°$ 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 کلوین

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 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 کلوین

[Aluminium]mM	Tm(K)
0 میلی‌مولار	341
6 میلی‌مولار	341/2
10 میلی‌مولار	341/4
20 میلی‌مولار	341/9
50 میلی‌مولار	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 کلوین

[Alchol]%V/V	*Tm*(°K)
0%	341
%10Butanol	330/8
%10Butanol+50mM Al3+	335/8
%10Ethanol	335/2
%10Ethanol+50mM Al3+	336/9
%101,4-Butanediol	335/4
%101,4- Butanediol+50mM Al3+	338/3
%10Glycerol	341
%10Glycerol+50mM Al3+	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.

Archive of
www.SID.ir

یون آلومینیم 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 سمّی 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 پپسین و تریپسین بررسی کردند، نشان دادند که یون‌های **آلومینیوم** سبب افزایش فعالیت پپسین می‌شوند ولی بر روی فعالیت تریپسین اثری ندارند [21].

پاولیک[3] و همکارانش در مطالعات کالریمتری اسکن تفاضلی (*DSC*) که بر روی پایداری دمایی پپسین در حضور یون‌های **آلومینیوم** انجام دادند، نشان دادند دو نوع جایگاه اتصال برای یون‌های **آلومینیوم** روی پپسین است. تمایل آلومینیم برای اتصال به جایگاه دوم بیشتر از جایگاه اول است. طبق منابع بررسی شده در مورد آلومینیم، هنوز مشخص نشده است **آلومینیوم** از چه طریق سبب افزایش پایداری پپسین می‌شود [20]. یون‌های **آلومینیوم** نیز باعث افزایش فعالیت پپسین می‌شوند. در نتیجه اتصال **آلومینیوم** به پپسین سبب تغییر صورت‌بندی و افزایش صفحات بتا در پپسین می‌شود. احتمالاً **آلومینیوم** بر روی جایگاه اتصال سوبسترا به پپسین اثر ندارد اما با تغییر صورت‌بندی آنزیم، سرعت تبدیل سوبسترا 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 پپسین داشتند، نشان دادند که حلال‌های آلی اتانول و استونیتریل تا غلظت 60 % حجمی-حجمی بر فعالیت پپسین اثری ندارند اما از غلظت 60% تا 90 % فعالیت پپسین کم شده است و ۱،۴ دی اکسان نیز تا غلظت 30 % بر فعالیت پپسین 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 هکارانش 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

Archive of SID
www.SID.ir

دی اکسان و استونیتریل افزایش می‌دهند. استیله شدن گروه‌های آمینی پایداری آنزیم را کم می‌کنند اما سیتراته شدن، پروپیونیله شدن و سوکسیلینه شدن کیمو تریپسین 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. تغییردر پیوند هیدروژنی علاوه بر ناپایدار کردن ساختار سوم منجر به باز شدن برخی از ساختارهای دوم می‌شود. الکل‌های با زنجیره هیدروکربنی طویل‌تر 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 بااستفاده 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,

Archive of SID
www.SID.ir

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 LM[1], 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 pepsin: kinetics and thermodynamics. Medicinal Chemistry and Drug Design, Prof. Deniz Ekinci (Ed.) ISBN: 978-953- 51-0513-8, InTechAvailablfrom: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.

www.SID.ir