١٠٢٦٣٤

وزارت علوم، تحقیقات و فن‌آوری

دانشگاه علوم پایه دامغان

دانشکده شیمی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیمی فیزیک

بررسی ترمودینامیکی و مطالعه ساختاری برهمکنش مزو-تتراکیس(٤-سولفوناتوفنیل)پورفیرین و مزو-تتراکیس(٣-سولفوناتو-٤-متوکسی فنیل)پورفیرین با آلبومین سرم انسانی

استاد راهنما :

دکتر داود عاجلو

استاد مشاور :

دکتر سعید زکوی

توسط :

علیرضا تیمورتاش

تیرماه ۱۳۸۷

۱۳۸۷ /۸/ ۱۱۱

۱۰۲۶۵۴

به نام خدا

بررسی ترمودینامیکی و مطالعه ساختاری برهم‌کنش مزو-تتراکیس
(۴-سولفوناتوفنیل)پورفیرین و مزو-تتراکیس(۳-سولفوناتو-۴-متوکسی
فنیل)پورفیرین با آلبومین سرم انسانی

ارائه:

علیرضا تیمورتاش

پایان‌نامه ارائه شده به تحصیلات تکمیلی
به عنوان بخشی از فعالیت های لازم جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد
در رشته‌ی شیمی(گرایش شیمی فیزیک) از دانشگاه علوم پایه دامغان

ارزیابی وتصویب توسط کمیته داوران با درجه: عالی

دکتر داود عاجلو، استادیار دانشکده شیمی (استاد راهنما):

دکتر سعید زکوی، استادیار دانشکده شیمی (استاد مشاور):

دکتر علی اکبر صبوری، استاد دانشگاه تهران (داور خارجی):

دکتر سید احمد نبوی امری، استادیار دانشکده شیمی (داور داخلی):

دکتر سید محمود حسین نژاد، استادیار دانشکده زمین شناسی و نماینده تحصیلات تکمیلی:

تیرماه ۱۳۸۷

۱۰۲۶۳۴

نام و نام خانوادگی دانشجو: علیرضا تیمورتاش

عنوان پایان نامه:

بررسی ترمودینامیکی و مطالعه ساختاری برهمکنش *مزو*-تتراکیس(٤-سولفوناتوفنیل)پورفیرین و مزو-تتراکیس(٣-سولفوناتو-٤-متوکسی فنیل)پورفیرین با آلبومین سرم انسانی

رشته تحصیلی: شیمی **گرایش :** شیمی فیزیک

سال ورود : بهمن ١٣٨٤ **شماره دانشجویی :** ٨٤٨٩١٠٤

نام و نام خانوادگی استاد راهنما: داود عاجلو

چکیده:

تأثیر دو پورفیرین *مزو*-تتراکیس(٤-سولفوناتوفنیل)پورفیرین یا H_2TPPS_4 و مزو-تتراکیس(٣-سولفوناتو-٤-آنیسیل)پورفیرین یا H_2TAPS_4 روی آلبومین سرم انسانسی با استفاده از طیف‌بینی UV-Vis، فلوئورسانس، دورنگ‌نمایی‌دورانی (CD) و نیز کالریمتری تیتراسیون هم‌دما در pH های مختلف، دماهای مختلف و قدرت‌های یونی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. هم‌دماهای اتصال بدست آمد و بر اساس نظریه وایمن و اسکاچارد تحلیل شد. پارامترهای ترمودینامیکی نظیر انرژی آزاد اتصال، انتالپی اتصال، ثابت اتصال و تعداد لیگاندهای متصل شده به ازاء هر مول پروتئین، ν، بدست آمد. از معادله اسکاچارد مشاهده شد که جایگاه‌های اتصال روی HSA در حضور دو لیگاند مستقل از هم هستند. نتایج نشان داد که افزایش pH با کاهش ν همراه بود. در لیگاند H_2TPPS_4 افزایش قدرت یونی و افزایش دما ν را کاهش می‌دهد در حالی که تغییر دو مقدار ذکر شده برای H_2TAPS_4 برعکس H_2TPPS_4 بود. همچنین در نتیجه تغییر ساختار مولکولی، مقدار ν برای H_2TAPS_4 بیشتر از H_2TPPS_4 است. داده‌های CD و فلوئورسانس نشان داد که لیگاندهای فوق ساختارهای دوم و سوم HSA را کاهش می‌دهد. نتایج دناتوره شدن حرارتی با استفاده از فلوئورسانس نشان داد، تغییر T_m چندان محسوس نیست.

تقدیم به:

همسر مهربان و پدر و مادر عزیزم

تقدیر و تشکر

اکنون که به لطف ایزد منان موفق به اتمام این مقطع از تحصیل گشته‌ام بر خود واجب می‌دانم از کسانی که در این مسیر مرا راهنمایی نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

لازم است مراتب سپاس و قدردانی خود را خدمت استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر داود عاجلو که در طول دوران تحصیل و ارائه این پایان‌نامه از راهنمایی‌های ایشان بهره‌مند گشتم ابراز نمایم.

از جناب آقای دکتر سعید زکوی که در طول این مدت از راهنمایی‌های ایشان بهره‌مند گشتم کمال تشکر و قدردانی را دارم

از جناب آقای دکتر علی اکبر صبوری استاد محترم دانشگاه تهران برای مطالعه این پایان‌نامه و شرکت در جلسه دفاعیه صمیمانه متشکرم

از جناب آقای دکتر سید احمد نبوی امری استاد محترم دانشکده شیمی برای مطالعه این پایان‌نامه و شرکت در جلسه دفاعیه صمیمانه متشکرم

از جناب آقای دکتر حسینی نژاد که به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی در جلسه دفاعیه اینجانب حضور داشتند، کمال تشکر را دارم.

در نهایت سپاس و تشکر خود را تقدیم دوستان عزیزم که همواره همراه من بودند می‌کنم

فصل اول

مقدمه

۱-۱- آلبومین سرم انسانی (HSA)..... ۱

۱-۱-۱- ساختار اول آلبومین..... ۲

۱-۱-۲- ساختار دوم HSA..... ۵

۱-۱-۳- مشاهدات تجربی در مورد ساختار آلبومین..... ٦

۱-۱-٤- اثرات pH روی ساختمان HSA..... ۷

۱-۱-۵- اثرات دما و غلظت روی ساختمان HSA..... ۱۱

۱-۱-٦- ماهیت اتصال لیگاند به آلبومین سرم انسانی..... ۱۲

۱-۱-۷- استفاده از کاوشگرهای فلوئورسانس جهت بررسی ساختار پروتئین..... ۱٤

۱-۲- برهمکنش لیگاند – پروتئین..... ۱٤

نظریه عمومی پیوند شدن لیگاند به ماکرومولکول..... ۱۵

۱-۳- پورفیرین‌ها..... ۲۱

۱-۳-۱- ساختار پورفیرین‌ها..... ۲۱

۱-۳-۲- طیف جذبی الکترونی پورفیرین‌ها..... ۲۳

۱-۳-۳- پروتون‌دار کردن پورفیرین‌ها (اثر pH)..... ۲۵

۱-۳-٤- خود انبوهش پورفیرین‌ها..... ۲٦

۱-۳-۵- تأثیر قدرت یونی در خود انبوهش پورفیرین‌ها..... ۲۸

۱-۳-٦- پورفیرین‌ها و متالوپورفیرین‌ها در سیستم های حیاتی..... ۲۹

۱-۳-۷- کاربردهای داروئی پورفیرین‌ها و متالوپورفیرین‌ها..... ۲۹

۱-۳-۸- اهداف تحقیق..... ۳۱

فصل دوم

مواد و روشها

۲-۱- مواد مورد استفاده..... ۳۳

۲-۲- روشهای تهیه، خالص سازی و شناسایی پورفیرینهای مورد استفاده..... ۳٤

۲-۲-۱- روش تهیه مزو-تترافنیل پورفیرین (H_2TPP)..... ۳٤

۲-۲-۲- روش تهیه مزو-تتراکیس(٤-متوکسی فنیل) پورفیرین، $H_2t(4\text{-methoxyphenyl})p$ یا مزو-تتراکیس(٤-آنیسیل)پورفیرین، $H_2t(4\text{-anisyl})p$..... ۳۷

۲-۲-۳- تهیه مزو-تتراکیس(٤-سولفوناتوفنیل)پورفیرین، H_2TPPS_4..... ۳۹

۲-۲-٤- روش تهیه مزو-تتراکیس(۳-سولفوناتو-٤-آنیسیل)پورفیرین، H_2TAPS_4..... ٤۱

۲-۲-٥- تهیه محلولهای مورد نیاز..... ٤٤

۲-۲-٦- اندازه گیری ضرایب جذب مولی..... ٤٥

۲-۲-۷- بررسی اتصال لیگاند به پروتئین توسط روش طیف بینی UV-Vis..... ٤٦

۲-۲-۸- مطالعات کالریمتری تیتراسیون همدمای برهم‌کنش پروتئین با لیگاند (ITC یا Isothermal Titration Colorimetry)..... ٤٦

۲-۲-۹- مطالعه طیف بینی فلوئورسانس..... ٤۷

۲-۲-۹-۱- مطالعه اثر لیگاند روی دمای ذوب (T_m) پروتئین..... ٤۷

۲-۲-۹-۲- مطالعه اثر ANS روی HSA توسط طیف بینی فلوئورسانس..... ٤۸

۲-۲-۱۰- مطالعات CD (Circular Dichroism).....۴۹

فصل سوم

بحث و نتیجه گیری

۳-۱- اندازه گیری ضرایب جذب مولی.....۵۱

۳-۲- روشهای بررسی اتصال لیگاند پورفیرینی به ماکرومولکول.....۵۹

۳-۲-۱- بررسی اتصال لیگاند پورفیرینی بر اساس روش اسپکتروفوتومتری UV-Vis در pH های مختلف.....۵۹

۳-۲-۲- بررسی اتصال لیگاند پورفیرینی به HSA با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری در قدرت‌های یونی مختلف.....۷۳

۳-۲-۳- بررسی اتصال لیگاند پورفیرینی به HSA با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری در دماهای مختلف.....۷۷

۳-۳- مطالعه کالریمتری تیتراسیون همدمای بر هم کنش سرم آلبومین با لیگاندهای H_2TPPS_4 و H_2TAPS_4.....۸۵

۳-۴- بررسی دمای ذوب پروتئین در حضور لیگاندهای H_2TPPS_4 و H_2TAPS_4.....۸۷

۳-۵- مطالعه برهمکنش H_2TPPS_4 و H_2TAPS_4 با سرم آلبومین انسانی توسط اسپکتروفوتومتری فلوئورسانس.....۸۸

۳-۶- مطالعه برهمکنش H_2TPPS_4 و H_2TAPS_4 با سرم آلبومین انسانی در حضور ANS توسط اسپکتروفوتومتری فلوئورسانس.....۹۵

۳-۷- مطالعه دو رنگ نمایی دورانی یا CD (Circular Dichroism).....۹۶

۳-۸- نتیجه گیری.....۱۰۳

ضمیمه.....۱۱۱

مراجع.....۱٤۱

فصل اول

مقدمه

۱-۱- آلبومین سرم انسانی (HSA)[1]

آلبومین سرم به عنوان جزء اصلی خون از سال ۱۸۳۹ شناسایی شده است [۱]. آلبومین فراوانترین پروتئین خون می‌باشد که غلظت آن در خون ۵۰ گرم در لیتر (۷۰۰ μM) است و ۸۰ درصد تنظیم فشار اسمزی به عهده این پروتئین می‌باشد. علاوه بر این، مشخص شده است که این پروتئین اساساً عهده دار تنظیم pH خون می‌باشد [۲].

درپستانداران آلبومین در کبد تولید می شود [۳] و نیمه عمر آن در بدن ۱۹ روز است [٤]. شاید، برجسته ترین ویژگی آلبومین توانایی آن در اتصال برگشت پذیر به بسیاری از لیگاندها باشد. آلبومین حامل اصلی اسیدهای چرب می‌باشد. در شرایط عادی این اسیدها در پلاسما غیر محلول می‌باشند. اما آلبومین عملکردهای دیگری نظیر حذف رادیکالهای آزاد اکسیژن و غیرفعال سازی بسیاری از متابولیتهای سمی نظیر بیلی‌روبین نیز دارد [٥]. آلبومین تمایل زیادی به ترکیبات آروماتیک با بار منفی، اسیدهای چرب، هماتین و بیلی‌روبین از خود نشان می دهد [٦].

آلبومین به خانواده پروتئین‌های مولتی‌ژن تعلق دارد که شامل α-فتوپروتئین (AFP) و پروتئین متصل‌شونده به ویتامین D (VDP)، که به عنوان پروتئین مکمل G (GC) نیز شناخته می‌شود، تعلق دارد.

انعطاف‌پذیری کنفورماسیونی آلبومین نسبتاً زیاد است. علی‌رغم انعطاف‌پذیری کنفورماسیونی آلبومین به سادگی تغییر ماهیت نمی‌دهد و در دمای $60\ ^{\circ}C$ به مدت ۱۰ ساعت سالم می‌ماند [۷]. در استخراج آلبومین از پلاسما غالباً ۲۰ درصد آن به شکل دی‌مر است. درصد این دی‌مر با افزایش

1 -Human Serum Albumin

عمر پروتئین افزایش می‌یابد مگر این که Cys -34 با سیستئین، گلوتاتیونین و یا یدواستامید بلوکه شود [۸].

۱-۱-۱- ساختار اول آلبومین

در سالهای اخیر اطلاعات زیادی در مورد ترتیب اسیدهای آمینه آلبومین پستانداران منتشر شده است. در اینجا به توالی اسیدهای آمینه انسان می‌پردازیم. توالی اسیدهای آمینه HSA در شکل ۱-۱ نشان داده شده است. مشخص شده است که توالی کامل سرم آلبومین شامل ۵۸۵ اسید آمینه و جرم مولکولی آن ٦٦۵۰۰ است. طرز قرار گرفتن اسیدهای آمینه به نحوی است که نواحی سه‌گانه‌ای به وجود آمده است که از نظر ساختار تکراری است [۹].

در هر ناحیه[1] پل‌های دی‌سولفیدی مشابهی وجود دارد [۱۰]. لیگاندها بسته به نوع آنها به ناحیه‌های جداگانه‌ای وصل می‌شوند. در اثر عمل پپسین روی این پروتئین در pH، ۳/۵ قطعات بزرگتری به دست می‌آیند و با توجه به توالی اسیدهای آمینه در این قطعات، موقعیت این اجزا در ساختار اول پروتئین شناسایی شد [۸].

ترتیب استقرار اسیدهای آمینه درناحیه‌ها و زیرناحیه‌ها[2] به شرح زیر است:

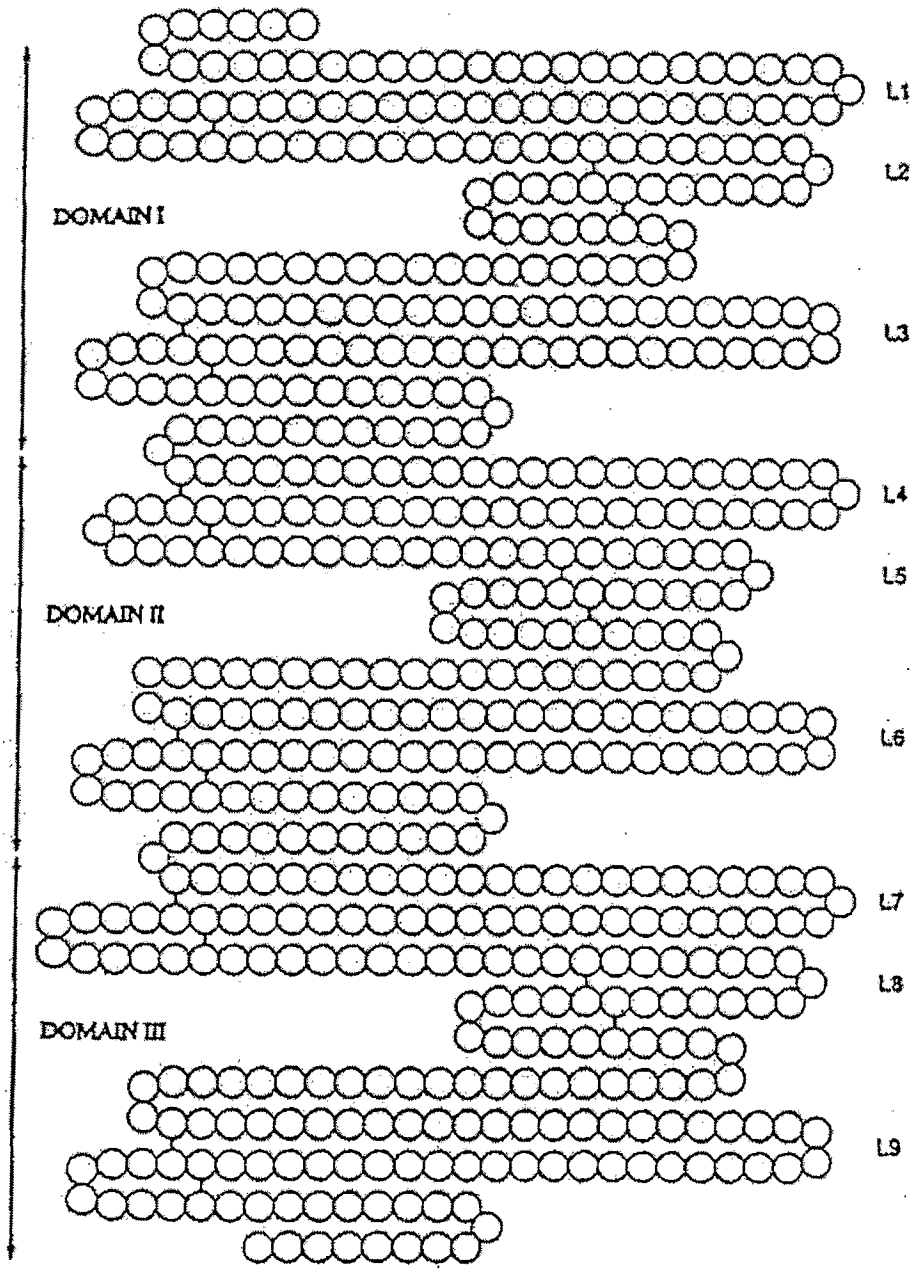
اسیدهای آمینه شماره ۱ تا ۱۸۵ همراه با شش پل دی‌سولفید در ناحیه اول قرار دارند. این ناحیه دارای سه زیرناحیه است. زیرناحیه اول دارای حلقه[3] بزرگ و حلقه کوچک و اسیدهای آمینه شماره ۱ تا ٦۷ است. در زیرناحیه دوم، دو حلقه کوچک به همراه اسیدهای آمینه شماره ٦۸ تا ۱۱۸ قرار دارند. در زیرناحیه سوم، اسیدهای آمینه ۱۱۹ تا ۱۸۵، یک حلقه کوچک و یک حلقه بزرگ

1 - Domain
2- Subdomain
3- loop

وجود دارند. در ناحیه دوم، همراه با اسیدهای آمینه ۱۸۶ تا ۳۸۲، شش پل دی سولفیدی قرار دارند. بقیه اسیدهای آمینه و پنج پل دی‌سولفیدی در ناحیه سوم قرار می‌گیرند. شکل ۱-۲ الگوی Loop-Link-Loop ناحیه‌ها و حلقه‌های شماره‌گذاری شده در سرم آلبومین انسانی را نشان می‌دهد [۹].

```
                    5                  10                  15
  1  Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly-
 16  Glu-Glu-Asn-Phe-Lys-Ala-Leu-Val-Leu-Ile-Ala-Phe-Ala-Gln-Tyr-
 31  Leu-Gln-Gln-Cys-Pro-Phe-Glu-Asp-His-Val-Lys-Leu-Val-Asn-Glu-
 46  Val-Thr-Glu-Phe-Ala-Lys-Thr-Cys-Val-Ala-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-
 61  Asn-Cys-Asp-Lys-Ser-Leu-His-Thr-Leu-Phe-Gly-Asp-Lys-Leu-Cys-
 76  Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Arg-Glu-Thr-Tyr-Gly-Glu-Met-Ala-Asp-Cys-
 91  Cys-Ala-Lys-Glu-Gln-Pro-Glu-Arg-Asn-Glu-Cys-Phe-Leu-Gln-His-
106  Lys-Asp-Asp-Asn-Pro-Asn-Leu-Pro-Arg-Leu-Val-Arg-Pro-Glu-Val-
121  Asp-Val-Met-Cys-Thr-Ala-Phe-His-Asp-Asn-Glu-Glu-Thr-Phe-Leu-
136  Lys-Lys-Tyr-Leu-Tyr-Glu-Ile-Ala-Arg-Arg-His-Pro-Tyr-Phe-Tyr-
151  Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Phe-Phe-Ala-Lys-Arg-Tyr-Lys-Ala-Ala-Phe-
166  Thr-Glu-Cys-Cys-Glu-Ala-Ala-Asp-Lys-Ala-Ala-Cys-Leu-Leu-Pro-
181  Lys-Leu-Asp-Glu-Leu-Arg-Asp-Glu-Gly-Lys-Ala-Ser-Ser-Ala-Lys-
196  Gln-Arg-Leu-Lys-Cys-Ala-Ser-Leu-Gln-Lys-Phe-Gly-Glu-Arg-Ala-
211  Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg-Leu-Ser-Gln-Arg-Phe-Pro-Lys-
226  Ala-Glu-Phe-Ala-Glu-Val-Ser-Lys-Leu-Val-Thr-Asp-Leu-Thr-Lys-
241  Val-His-Thr-Glu-Cys-Cys-His-Gly-Asp-Leu-Leu-Glu-Cys-Ala-Asp-
256  Asp-Arg-Ala-Asp-Leu-Ala-Lys-Tyr-Ile-Cys-Glu-Asn-Gln-Asp-Ser-
271  Ile-Ser-Ser-Lys-Leu-Lys-Glu-Cys-Cys-Glu-Lys-Pro-Leu-Leu-Glu-
286  Lys-Ser-His-Cys-Ile-Ala-Glu-Val-Glu-Asn-Asp-Glu-Met-Pro-Ala-
301  Asp-Leu-Pro-Ser-Leu-Ala-Ala-Asp-Phe-Val-Glu-Ser-Lys-Asp-Val-
316  Cys-Lys-Asn-Tyr-Ala-Glu-Ala-Lys-Asp-Val-Phe-Leu-Gly-Met-Phe-
331  Leu-Tyr-Glu-Tyr-Ala-Arg-Arg-His-Pro-Asp-Tyr-Ser-Val-Val-Leu-
346  Leu-Leu-Arg-Leu-Ala-Lys-Thr-Tyr-Glu-Thr-Thr-Leu-Glu-Lys-Cys-
361  Cys-Ala-Ala-His-Asp-Pro-Tyr-Glu-Cys-Ala-Ala-Lys-Val-Phe-Asp-
376  Glu-Phe-Lys-Pro-Leu-Val-Glu-Glu-Pro-Gln-Asn-Leu-Ile-Lys-Gln-
391  Asn-Cys-Glu-Leu-Phe-Glu-Gln-Leu-Gly-Glu-Tyr-Lys-Phe-Gln-Asn-
406  Ala-Leu-Leu-Val-Arg-Tyr-Thr-Lys-Lys-Val-Pro-Gln-Val-Ser-Thr-
421  Pro-Thr-Leu-Val-Glu-Val-Ser-Arg-Asn-Leu-Gly-Lys-Val-Gly-Ser-
436  Lys-Cys-Cys-Lys-His-Pro-Glu-Ala-Lys-Arg-Met-Pro-Cys-Ala-Glu-
451  Asp-Tyr-Leu-Ser-Val-Val-Leu-Asn-Gln-Leu-Cys-Val-Leu-Glu-His-
466  Lys-Thr-Pro-Val-Ser-Asp-Arg-Val-Thr-Lys-Cys-Cys-Thr-Glu-Ser-
481  Leu-Val-Asn-Arg-Arg-Pro-Cys-Phe-Ser-Ala-Leu-Glu-Val-Asp-Glu-
496  Thr-Tyr-Val-Pro-Lys-Gln-Phe-Asn-Ala-Glu-Thr-Phe-Thr-Phe-His-
511  Ala-Asp-Ile-Cys-Thr-Leu-Ser-Glu-Lys-Glu-Arg-Gln-Ile-Lys-Lys-
526  Gln-Thr-Ala-Leu-Val-Glu-Leu-Val-Lys-His-Lys-Pro-Lys-Ala-Thr-
541  Lys-Glu-Gln-Leu-Lys-Ala-Val-Met-Asp-Asp-Phe-Ala-Ala-Phe-Val-
556  Glu-Lys-Cys-Cys-Lys-Ala-Asp-Asp-Lys-Glu-Thr-Cys-Phe-Ala-Glu-
571  Glu-Gly-Lys-Lys-Leu-Val-Ala-Ala-Ser-Gln-Ala-Ala-Leu-Gly-Leu
```

شکل۱-۱ توالی اسیدهای آمینه آلبومین سرم انسانی (HSA)



شکل۱-۲ نمایشی از الگوی حلقه-اتصال-حلقه در ساختار اولیه آلبومین سرم انسان

۱-۱-۲- ساختار دوم HSA

اساس ساختار دوم، مبتنی بر پل‌های دی‌سولفیدی، توزیع نواحی آب‌گریز و نقاط قابل برش توسط آنزیم‌ها بر روی این پروتئین می‌باشد. ساختار دوم به کمک اطلاعات ساختار اول پیشگویی شده است. برای مولکول سرم آلبومین یک حالت بیضی شکل با ابعاد ۱٤۰×٤۰ آنگستروم در نظر گرفته شده است: مطالعات CD[1] سرم آلبومین انسانی در حین انتقال از خنثی به بازی (N-B) نشان داد که از نظر شکل ظاهری ساختار قلبی شکل دارد. شکل ۱-۳ این ساختار را نشان می‌دهد [۹].

مطالعات CD نشان می‌دهد که ساختار دوم سرم آلبومین بیشتر مارپیچ آلفا[2] است و اصولاً صفحات بتا[3] وجود ندارد. به عبارت دیگر، ٦۷ درصد آن مارپیچ است و بقیه پلی‌پپتید، در دورها[4] قرار دارد. مطالعات طیف‌بینی CD در سرم آلبومین نشان می‌دهد که ساختار آن حدود ۵۰ تا ۵۵ درصد مارپیچ آلفا و حدود ۱۵ درصد صفحات بتا و مابقی پیچه نامنظم است [۱۱]. مطالعات CD افزایش در ساختمان β را در اثر حرارت و سپس سرد کردن نشان می‌دهد [۹].

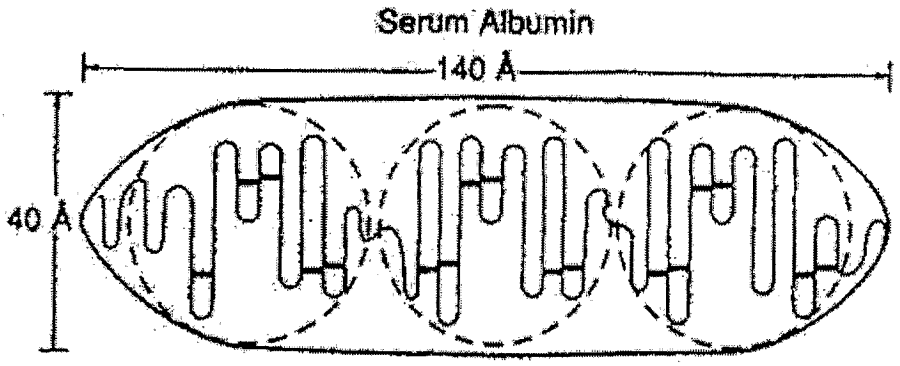
براساس مطالعات طیف‌بینی رامان، کنفورماسیونهای دی‌سولفیدی، به طور عمده گوژ-گوژ-گوژ هستند و زوایای پیچ خوردگی حدود ۸۰ ± درجه است. به عبارت دیگر، جفتهای دی‌سولفیدی در بین بندهای هلیکال قرار دارند که این موقعیت هلیکال مانع از آن می‌شود که اکثریت دی‌سولفیدها در معرض حلال قرار گیرند. خصوصاً در pH خنثی در مقابل عوامل کاهنده محافظت می‌شود [۸].

1- circular dichrosm spectroscopy
2 - α-Helix
3 - β-Sheets
4 - Turns

۱-۱-۳- مشاهدات تجربی در مورد ساختار آلبومین

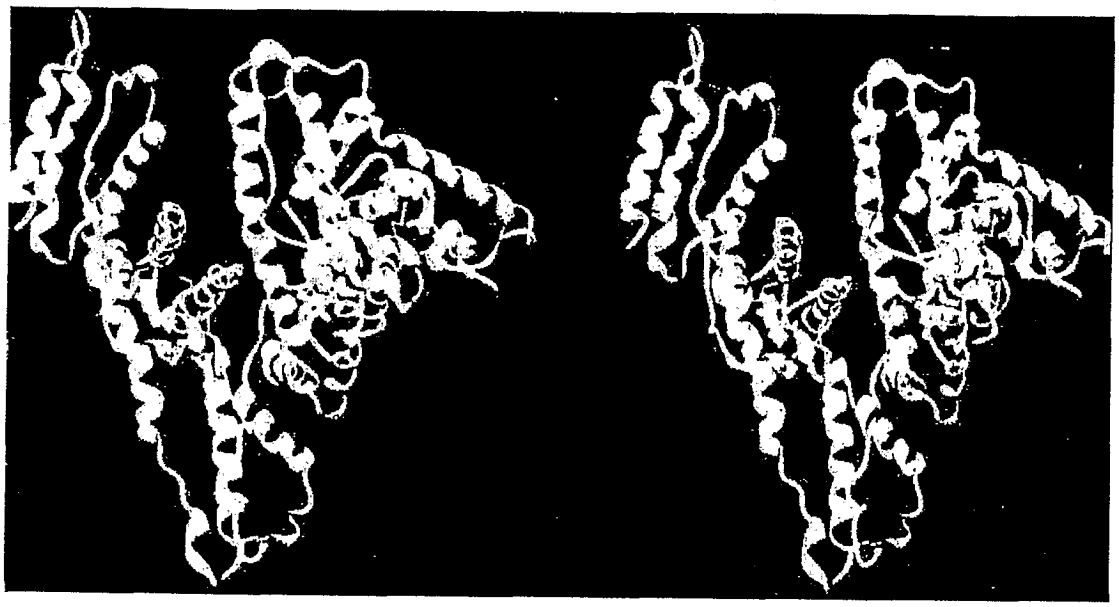
بر اساس آزمایش‌های هیدرودینامیک و پراش اشعه-X، ساختار اولیه‌ای که برای آلبومین پیشنهاد شد یک بیضوی کشیده بود (شکل۱-۳) [۱۲-۱٤]. نتایج پراش اشعه-X اولیه نیز مدل سیگار مانند را برای آلبومین تأیید کرد [۱۵-۱٦].

علی‌رغم پذیرش عمومی ساختار سیگار مانند برای آلبومین سرم انسانی، مشاهدات میکروسکوپ الکترونی نشان داد که آلبومین سرم گاوی تقریباً یک ساختار کروی با ابعاد ٦۰×۴۵ آنگسترم دارد [۱۷]. آزمایش‌های تکمیلی بعدی نیز ساختار کروی یا U-شکل را برای آلبومین تأیید کرد [۱۸]. آزمایشات ^1H NMR بر روی تبدیل‌های کنفورماسیونی نیز تأیید کننده ساختار U-شکل یا قلب مانند برای HSA بود [۱۹].



شکل۱-۳ نمایشی از اولین ساختار پیشنهاد شده برای آلبومین سرم

ساختار کریستالی آلبومین تأیید کننده مولکول قلبی شکلی با ابعاد ۸۰ آنگستروم و عمق ۳۰ آنگستروم می‌باشد (شکل۱-٤) [۲۰-۲۳].



شکل۱-٤ ساختار مولکولی پیشنهاد شده برای HSA بر اساس نتایج کریستالوگرافی اشعه-X

۱-۱-۴- اثرات pH روی ساختمان HSA

عملکرد هر پروتئین تابع pH محیط است چون pH بر میزان بارهای یک پروتئین اثر مستقیم دارد. آلبومین یک پروتئین باردار به شدت قطبی است و به دلیل داشتن بار منفی زیاد در pH خنثی، در ساختار اول خود توزیع بار نامتقارن دارد. اتصال یونهای سدیم، کلسیم، کلرید و لیتیم

تابع pH محیط است. در pH پایین، محدوده pH ٤ تا ۹، یونهای کلرید و در pH به شدت بالا یون‌های کلسیم با HSA پیوند می‌دهند [۹]. سرم آلبومین در محدوده pH ٤ تا ۹ کنفورماسیون خاصی از خود بروز می‌دهد که در برهم‌کنش اسیدهای چرب و برخی داروها با سرم آلبومین تأثیر دارد [۲٤]. منحنی‌های تیتراسیون سرم آلبومین در ناحیه اسیدی تند و در ناحیه خنثی پهن است. فوستر[1] در سال ۱۹٦۰ شکلهای وابسته به pH آلبومین را به صورت ذیل نامگذاری کرد:

شکل N : به عنوان شکل نرمال که در pH فیزیولوژیک یک شکل عمده است.

شکل B : برای حالت بازی که در pH بالای ۸ اتفاق می‌افتد.

شکل F : در pH کمتر از ٤ دیده می‌شود.

شکل E : این فرم حالت باز شده و گسترده مولکول است که در pH کمتر از ۳/۵ دیده می‌شود.

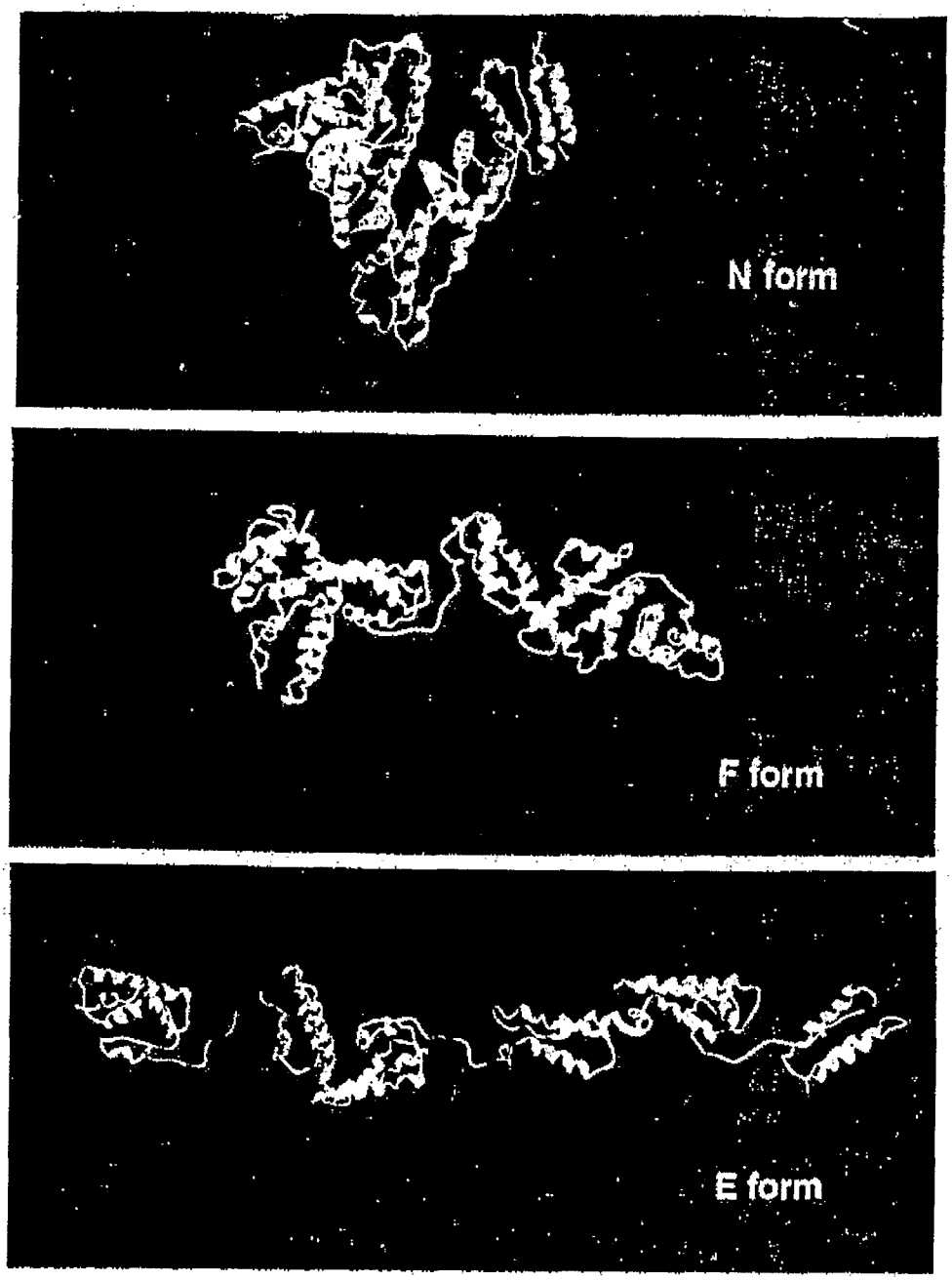
شکل A : دارای عمر طولانی است که در pH بالای ۸ اتفاق می‌افتد [۲۵].

در شکل۱-۵ شمای نواری آلبومین در سه حالت F و N و E مشاهده می‌شود.

الف) تغییرشکل N-F

در این تغییرشکل، ناحیه سوم از بقیه مولکول به طور مجزا باز می‌شود یعنی خود زیرناحیه‌های سوم از هم جدا می‌شوند که شامل اسیدهای آمینه ۳۷۷ تا ۵۸٤ است [۲٦]، ولی هیچ گونه تغییرشکلی در زیر نواحی I و II اتفاق نمی‌افتد. در حین این تغییرشکل، نیمه حاوی پایانه کربوکسیلی یا دم، از ناحیه سر حاوی پایانه آمینی، جدا می‌شود.

1 - Foster



شکل۱-۵ شمای نواری آلبومین در سه حالت N، E و F

البته با برگشت pH به حالت خنثی، این قطعات با هم ترکیب می‌شوند این تغییرشکل در pH بین ۵ تا ۳/۵ اتفاق می‌افتد [۲۷].