دانشکده علوم پایه

توسعه و پیشنهاد الگوهای عاملی جدید آنزیم وانادیم برمو پراکسیداز دارای لیگاندهای گوناگون سه پایه ی آمینی: مطالعه ی محاسبه های نظری

ارائه شده جهت دریافت درجه دکتری تخصصی شیمی محض گرایش معدنی

نگارنده:

محمد چهکندی

استادان راهنما:

دکتر حسین اشتیاق حسینی

دکتر محمد رضا حسین دخت

استاد مشاور:

دکتر علی مرسلی

بهمن ماه ۱۳۹۱

به نام خدا

سپاس مخصوص خداوندی است که نخستین موجود است و پیش از او چیزی نبوده است و آخرین موجود است و بعد از او چیزی نیست. دیده بینندگان ، از مشاهده او ناتوان است و اندیشه گویندگان، از وصف او عاجز است، به وسیله قدرت خود، آفریدگان را آفرید و با اراده خود آنها را از نیستی، به وجود آورد. آن ها را در راه راست خود روان کرد و در راه محبت خود بر انگیخت. نسبت به آن چه که او به جلو انداخته است، نمی توانند تاخیر نمایند و آن چه را که او به تاخیر انداخته است را نمی توانند به جلو بیندازند و از رزق خود برای هر جانداری روزی مشخصی قرار داده است. کسی نمی تواند روزی فراوان او را کاهش دهد و یا روزی کم او را افزایش دهد. سپس در زندگی، برای او مدت معینی و پایان مشخصی قرار داد که با روز های زندگی بسوی آن قدم بر می دارد و با سال های عمر، به آن نزدیک می شود. هنگامی که به پایان عمر نزدیک می شود، حساب عمر خود را کامل دریافت می کند و خداوند او را به سوی پاداش فراوان یا کیفر ترسناک، روانه می سازد تا بدکاران را نسبت به کار زشت خود و نیکوکاران را نسبت به کار نیکشان جزا دهد.

تقدیم به

پدر و مادرم عزیز و مهربانم

که معنای عشق و فداکاری را به من آموخته اند.

تقدیم به

خواهران و برادران عزیزم

که به ترین دوست و یاورم هستند.

متواضعانه از استادان علم و اخلاقم آقایان دکتر حسین اشتیاق حسینی و دکتر محمد رضا حسین دخت از دانشگاه فردوسی مشهد که در طول دوره کارشناسی تا دوره دکتری از ایشان بسیار آموخته ام سپاس گذاری می کنم. بی شک بدون راهنمایی ها، حمایت ها و زحمات دلسوزانه این بزرگواران موفقیت علمی بنده بدست نمی آمد. برای ایشان سعادت و طول عمر با عزت از خداوند متعال آرزومندم. از استاد مشاور ارجمندم، جناب آقای دکتر علی مرسلی از دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که راهنمایی های علمی و ارزنده ی ایشان در پیش برد این پروژه بسیار موثر بود صمیمانه تشکر می کنم. بایستی از پروفسور پلاس و گروه تحقیقاتی ایشان از دانشگاه فردریش شیلر–ینا کشور آلمان که در طول دوره فرصت مطالعاتی از دانش ایشان برای رفع نواقص و به سرانجام رساندن این پژوهش بسیار بهره بردم سپاس گزاری نمایم. از جناب آقایان دکتر محمد یزدان بخش، دکتر محمد حسن علی زاده قناد و دکتر مصطفی محمد پور امینی که از کلاس های علمی مفید ایشان بسیار آموختم تشکر و قدردانی می کنم. از دوست و همکار عزیز آقای دکتر میرزایی که بی دریغ در کنارم بود صمیمانه سپاس گزاری می کنم.

از جناب آقای دکتر محمد ایزدیار به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی در جلسه دفاع از این پروژه و جناب آقایان دکتر مصطفی محمد پورامینی، دکتر علی‌رضا سلیمی که زحمت داوری این پروژه را بر عهده داشتند سپاس گزاری می‌نمایم. از جناب آقای دکتر حسین عشقی مدیر محترم گروه شیمی دانشگاه فردوسی مشهد و سرکار خانم شجاعی مسئول امور اداری گروه شیمی به دلیل همکاری صمیمانه در رتق و فتق امور تحصیلاتی بنده تشکر می‌نمایم. در پایان از کلیه دوستان گرامی در آزمایشگاه تحقیقاتی شیمی معدنی به ویژه اعضای گروه پژوهشی دکتر حسین اشتیاق حسینی که لحظات به یاد ماندنی را در کنار این عزیزان تجربه کردم، تشکر کرده و برای تک تک آن‌ها موفقیت روزافزون آرزو دارم.

چکیده

در این پژوهش، مکانیسم فرایند اکسایش کاتالیز شده ی برماید به وسیله ی کمپلکس اکسو-پراکسو وانادیم $K[VO(O_2)Hheida]$ به کمک محاسبه های نظریه تابع چگال مورد بررسی قرار گرفت. این کمپلکس الگوی آنزیم وانادیم برمو پراکسیداز دارای بالاترین ثابت سرعت اکسایش گزارش شده در بین تمام کمپلکس های وانادیمی است. دو مسیر مکانیسمی حمله برماید به اتم اکسیژن پروتونه شده و نشده ی گروه پراکسو امکان پذیر است. حمله هسته دوستی مستقیم برماید به اکسیژن پروتونه شده ی پراکسو آغاز کننده واکنش است. پنج حالت گذار متفاوت برای مکانیسم فرایند کاتالیز شده به وسیله ی این کمپلکس پیدا شد که دو حالت گذار کم ترین مقدار سد انرژی را نشان می دهند. محاسبه های نظری مشابه درباره یک سری ۱۴ تایی از کمپلکس های اکسو-پراکسو وانادیم(V) دارای لیگاندهای سه پایه آمینی (V-Hheida (۱)، V-Hhmida (۲)، V-ada (۳)، V-ceida (۴)، V-pyc (۵)، V-peyc (۶)، V-pyg (۷)، V-nta (۸)، V-aada (۹)، V-Haada (۱۰)، V-pda (۱۱)، V-imea (۱۲)، V-bpg (۱۳) و V-bpa (۱۴)) انجام شد. طراحی کمپلکس های جدید **۲، ۵، ۶، ۹، ۱۰** و **۱۲** برای نخستین بار در این پروژه انجام گرفته است. مرحله تعیین کننده ی سرعت، انتقال اتم اکسیژن پروتونه شده از واحد پراکسو به سوبسترای برماید طی مکانیسم S_N2 است. وابستگی مستقیم پوشش مغناطیسی وانادیم به ویژگی الکترونی لیگاند به وسیله ی اندازه گیری جا بجایی شیمیایی وانادیم-۵۱ مشاهده شد. کاهش سد انرژی فعال سازی در اثر پروتونه شدن گروه عاملی ایمین (۱-۶kcal mol^{-1}) یا بلندتر شدن زنجیره جانبی سوم لیگاندهای سه پایه آمینی قابل توجه است. ارتباط بین جا بجایی شیمیایی وانادیم-۵۱ و انرژی های انتقال بار از لیگاند به فلز نشان می دهد که افزایش توانایی الکترون دهندگی لیگاند باعث کاهش فاصله ی انرژی اوربیتال های مرزی کمپلکس های پراکسو می شود. هم چنین قدرت الکترون دهندگی لیگاند بر اساس میزان هم پوشانی اوربیتال های $HOMO_{Br}$ و $LUMO_{O-O}$ قابل تفسیر است. پویا ترین کمپلکس ها دارای لیگاندهای سه پایه آمینی با الکترون دهندگی ضعیف و توانایی تشکیل پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی هستند. کاهش سدهای انرژی فعال سازی در محیط استونیتریل با به کار گیری روش پیوسته قطبش پذیر نشان دهنده ی پایدار شدن بیش تر حالت های گذار نسبت به واکنش گرها است. از آن جایی که مولکول استونیتریل با موضع فعال ترکیب **II** درگیر می شود، تأثیر واضح حلال باعث افزایش چشم گیر سد های انرژی فعال سازی و هم خوانی به تر ثابت های سرعت محاسبه ای با مقدارهای تجربی شد. بر پایه ی نتیجه های محاسبه ای بدست آمده، کمپلکس های V-peyc، V-Haada و V-pyc که قابل رقابت با کمپلکس نمونه ی V-Hheida هستند به عنوان الگوهای جدید VBPO پیشنهاد می شوند.

اختصارهای به کار رفته در متن (به ترتیب حروف الفبا آمده است).

H_2aada = 2,2'-(2-iminoacetamido) diacetic acid

H_3aada = 2,2'-(2-aminoacetamido) diacetic acid

H_2ada = N-(2-amidomethyl) iminodiacetic acid

H_2ceida = N-(carbamoylethyl) iminodiacetic acid

CP = η^5-cyclopentadienyl(-1)

Hal = halide

H_3heida = N-(2-hydroxyethyl) iminodiacetic acid

H_3hmida= N-(2-hydroxymethyl) iminodiacetic acid

H_2HPS = N-(2-hydroxyphenyl) salicylideneamine

H_2imea = N-(2-imidazoleethyl) iminodiacetic acid

H_2ida = iminodiacetic acid

DMF = dimethylformamide

Salnptn = N,N'-2,2'-dimethltrimethylene-*bis*[salicylideneiminate(-2)]

Hnaphnptn = N,N'-2,2'-dimethltrimethylene-*bis*[naphtaldehyde]

TMB = 1,3,5-trimethoxybenzene

H_3nta = nitrilotriacetic acid

Hbpa = N-*bis* (picolyl)-B-alanine

H_2pyc = N-(2-pyridylmethyl-6-carbamoyl) iminodiacetic acid

H_2peyc = N-(2-pyridylethyl-6-carbamoyl) iminodiacetic acid

H_2pda = N-(pyridylmethyl) iminodiacetic acid

Hbpg = N,N-*bis* (2-pyridylmethyl) glycine

H_2pyg = N-(2-pyridylmethyl-6-amino) iminodiacetic acid

H_2salphe = N-salicylidene-L-phenyalanine

H_2salGly = N-salicylideneglycine

Salhyph = N-salicylidenehydrazidephenyl

Salhyglcpa = N-salicylidenehydrazideglucopyranuronic acid

VHPO = Vanadium-dependent Haloperoxidase

VBPO = Vanadium-dependent Bromoperoxidase

VCPO = Vanadium-dependent Chloroperoxidase

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل نخست: نقش وانادیم و ترکیب های طبیعی آن در فرایندهای زیستی

۱-۱ ویژگی حیاتی وانادیم..... ۲
۱-۲ وانادیم در اندام های زنده: آنزیم های وابسته به وانادیم..... ۶
۱-۲-۱ هالوپراکسیدازها و وانادات در آنزیم های انتقال دهنده فسفریل..... ۶
۱-۳ مکانسیم پیشنهاد شده برای VHPO..... ۱۳
۱-۴ فعالیت و انتخاب گری واکنش های کاتالیز شده به وسیله ی VHPO..... ۱۵
۱-۵ پیوند کوئوردیناسیونی یا کووالانسی..... ۱۸
۱-۶ بلور شناختی ساختار VBPO با پراش پرتوی X..... ۲۰
۱-۶-۱ ساختار کلی..... ۲۰
۱-۶-۲ موضع اتصال وانادات: مرکز فعال..... ۲۱
۱-۷ طیف سنجی رزونانس مغناطیسی وانادیم-۵۱ آنزیم VBPO..... ۲۲
۱-۸ نگاهی به محاسبه های نظری درباره ی وانادیم هالوپراکسیدازها..... ۲۳
۱-۹ ترکیب های وانادیم ایفاگر نقش انسولین..... ۲۴
۱-۱۰ هدف از این پژوهش ۲۶
۱-۱۱ مرجع ها..... ۲۸

فصل دوم: ساختار و عمل کرد مکانیسمی کمپلکس های الگوی وانادیم برموپراکسیداز

۲-۱ کمپلکس های الگوی آنزیم وانادیم هالو پراکسیداز..... ۳۱
۲-۱-۱ الگو های عمل کردی VHPO..... ۳۱
۲-۱-۲ الگوهای ساختاری VHPO..... ۳۶
۲-۲ کمپلکس های پراکسو وانادیم..... ۳۹
۲-۲-۱ مونو پراکسوها..... ۴۰
۲-۲-۲ دی پراکسوها..... ۴۱
۲-۲-۳ تری پراکسوها..... ۴۳
۲-۲-۴ اکسایش سوبسترا های الکترون دوست..... ۴۴
۲-۲-۵ اکسایش سوبسترا های هسته دوست..... ۴۵

۲-۲-۶ واکنش های برم دار کردن.....۴۸
۲-۳ نقش شبکه پیوندهای هیدروژنی.....۵۰
۲-۳-۱ کمپلکس های الگوی فرا مولکولی.....۵۰
۲-۳-۲ مولکول های فرامولکولی الگو بر پایه لیگاندهای N-سالیسیلیدین هیدرازید.....۵۱
۲-۳-۳ کمپلکس های پراکسو وانادیم دارای لیگاندهای سه پایه آمینی.....۵۴
۲-۴ مکانیسم تشکیل کمپلکس پراکسو وانادیم و اکسایش برماید به وسیله ی آن.....۵۴
۲-۵ روش های فیزیکو-شیمیایی برای شناسایی ترکیب های طبیعی و الگوی وانادیم.....۵۷
۲-۵-۱ طیف سنجی رزونانس مغناطیسی وانادیم-۵۱.....۵۷
۲-۵-۱-۱ گستره پوششی.....۵۸
۲-۵-۲ طیف سنج مرئی-فرابنفش.....۶۰
۲-۶ نگاهی به محاسبه های انجام شده روی کمپلکس های الگوی VHPO.....۶۱
۲-۷ مرجع ها.....۶۲

فصل سوم: شیمی محاسبه ای و کاربرد آن در بررسی نمودار پتانسیل فرایند های معدنی: اکسایش کاتالیز شده ی برماید به وسیله ی $^{-}[VO(O_2)Hheida]$

۳-۱ شیمی محاسبه ای.....۶۵
۳-۲ رایانه یا انسان؟.....۶۶
۳-۳ روش های شیمی کوانتومی.....۶۸
۳-۳-۱ محاسبه های آغازین.....۷۱
۳-۳-۲ روش های هم بستگی الکترونی.....۷۱
۳-۳-۲-۱ نظریه اختلال مولر-پلست.....۷۲
۳-۳-۲-۲ نظریه تابع چگال (DFT).....۷۲
۳-۳ بهینه سازی ساختار.....۷۳
۳-۴ بررسی نظری مکانیسم های واکنش معدنی.....۷۶
۳-۴-۱ بررسی عینی سطح های انرژی پتانسیل: اکسایش برماید به وسیله ی $^{-}[VO(O_2)Hheida]$.....۷۹
۳-۴-۱-۱ بخش محاسبه ای.....۸۰
۳-۴-۱-۲ $^{-}[VO(O_2)Hheida]$ و گونه های پروتونه شده ی آن.....۸۲
۳-۴-۱-۳ حالت های گذار.....۸۶
۳-۴-۱-۴ اثرهای حلال پوشی.....۹۰
۳-۴-۲ نتیجه گیری.....۹۵

۳-۵ مرجع ها..... ۹۶

فصل چهارم: مکانیسم فرایند اکسایش کاتالیز شده ی برماید به وسیله ی کمپلکس های پراکسو وانادیم دارای لیگاندهای سه پایه آمینی: محاسبه های DFT

۴-۱ معرفی کمپلکس های مورد مطالعه در این پژوهش..... ۹۹
۴-۲ ساختار و فعالیت کمپلکس های دارای لیگاندهای سه پایه آمینی..... ۱۰۳
۴-۲-۱ طیف سنجی زیر قرمز..... ۱۰۸
۴-۲-۲ طیف سنجی الکترونی و رزونانس مغناطیسی وانادیم-۵۱..... ۱۱۰
۴-۲-۳ اوربیتال های مولکولی مرزی و انتقال های الکترونی..... ۱۱۴
۴-۳ مکانیسم اکسایش برماید به وسیله ی $[VO(O_2)L]^{n-}$: حالت های گذار..... ۱۲۴
۴-۴ حلال پوشی واضح..... ۱۳۳
۴-۴-۱ ساختار واکنش گرها..... ۱۳۴
۴-۴-۲ حالت های گذار..... ۱۳۸
۴-۴-۳ نتیجه گیری..... ۱۴۱
۴-۵ مرجع ها..... ۱۴۳

پیوست ها

پیوست ۱: داده های بلورشناختی و محاسبه ای..... ۱۴۶
پیوست ۲: طیف های ارتعاشی..... ۱۵۳
پیوست ۳: طیف های الکترونی..... ۱۶۱
پیوست ۴: ساختار بهینه شده ی واکنش گرها..... ۱۶۸
پیوست ۵: نمودارهای انرژی پتانسیل..... ۱۷۳

فصل ۱

نقش وانادیم و ترکیب های طبیعی آن در فرایندهای زیستی

۱-۱ ویژگی حیاتی وانادیم

انتخاب یک فلز به عنوان یک گونه ضروری در فرایندهای زیستی به چندین عامل از جمله دسترس پذیری در **آب کُره**[1]، سمی بودن نامحسوس در محیط زنده و کارایی آشکار در فرایندهای زیستی مانند فعل و انفعال های اکسایش-کاهشی در محیط **تن کرد شناختی**[2] یا فعالیت به عنوان اسید لوویس بستگی دارد. سامانه ی Fe^{3+}/Fe^{2+} نمونه ای برای فرایندهای **اکسایش-کاهشی**[3] و موضع فعال Zn^{2+} در بسیاری از آنزیم های کاتالیزکننده ی فرایند آب کافت، نمونه ای برای اسید لوویس محسوب می شوند. **توده های انباشته**[4] وانادیم به شکل سنگ های معدنی (وانادینیت $Pb_5(VO_4)_3Cl$ یا پاترونیت VS_4) کم یابند، در حالی که وانادیم(V) به شکل زوج یون $Na^+H_2VO_4^-$ با غلظت بالایی در حد ۳۰ نانو مولار در آب دریا وجود دارد. وانادیم پس از مولیبدن (با غلظت ۱۰۰ نانو مولار به صورت مولیبدات) دومین فلز واسطه فراوان در آب دریا و بسیار فراوان تر از آهن (۱-۰/۰۲ نانو مولار) است. حالت اکسایش

1. Aqua sphere: منشأ تمام حیات روی زمین است
2. Physiological
3. Redox
4. Accumulated

وانادیم به آسانی بین V و IV (که هم راه با III، حالت اکسایش بیش تر ترکیب ها ی طبیعی وانادیم هستند) تغییر می کند. پتانسیل اکسایش-کاهش واکنش برگشت پذیر $H_2VO_4^- + 4H^+ + e \leftrightarrow VO^{2+} + 3H_2O$ در $pH = ۷$ برابر ۰/۳۴۱- ولت است. وانادیل به وسیله ی فرایند اکسایش هوازی به وانادات و وانادات به کمک جزءهای سلولی از قبیل پپتیدها و پروتئین های دارای سیستئین (**گلوتاتیون**[1])، **آسکوربات**[2] و ترکیب های فنولی کاهش یافته، به وانادیل تبدیل می شوند. گونه های کاتیونی وانادیم(V) از قبیل VO^{3+} یا VO_2^+ در محلول با $pH \sim ۷$، تنها در مجاورت با لیگاندهای قوی که مانع از رسوب هیدروکسیدها می شوند پایدارند. شرایط مشابه برای VO^{2+}،گونه ی غالب در محیط تن کرد شناختی بی هوازی،که در $pH < ۷$ به فرم زوج اسید-باز $[VO(H_2O)_5]^{2+} \leftrightarrow [VO(OH)(H_2O)_4]^+ + H^+$ وجود دارد، صادق است. به بیان دیگر، کاتیون های اکسو وانادیم اسیدهای لوویس قوی هستند؛ بنابراین وانادیم به طور ذاتی دو شرط یک فلز حیاتی را دارا است، (i) فعالیت اکسایش-کاهش در یک چارچوب پتانسیل (و انرژی آزاد) الکتروشیمیایی (ii) تمایل به واکنش با سوبسترا های هسته دوست. ارتباط بین وانادات (H_2VO_4) و فسفات (HPO_4^{2-}) در pH و غلظت های تن کرد شناختی (۰/۲ میکرو مولار برای وانادات و ۳۰ میلی مولار برای فسفات در پلاسمای خون آدمی) نکته جالب توجه دیگری است که ویژگی حیاتی وانادیم را به عنوان یک عنصر ضروری نشان می دهد. وانادات افزون بر این که یک بازدارنده ی به خوبی شناخته شده برای آنزیم های **سوخت و ساز**[3] کننده ی فسفات (فسفاتازها، کینازها و ریبونوکلئازها) است، آنزیم های ویژه ای از قبیل فسفوموتازها و ایزومرازها را نیز تحریک می کند. وانادات با توقف مرحله کلیدی عمل آنزیم پروتئین-تیروزین-فسفاتاز می تواند رفتار انسولین را

2. Glutathione
3. Ascorbate
3. Metabolism

تقلید کند. وانادات نه تنها به صورت مونو وانادات بلکه به فرم های دی وانادات $H_2V_2O_7^{2-}/HV_2O_7^{3-}$، ترا وانادات $V_4O_{10}^{4-}$، پنتا وانادات $V_5O_{12}^{5-}$ و دکا وانادات $V_{10}O_{28}^{6-}/HV_{10}O_{28}^{5-}$ (با غلظت های بالاتر) نیز در محیط تن کرد شناختی فعالیت می کند (۱). توانایی پراکسو وانادات (V) در درمان سرطان و دیابت و هم این طور هالوژن دار شدن ترکیب های آلی به کمک پراکسیدازهای وابسته به وانادات مورد توجه قرار گرفته است. آنیون های $cis\text{-}[VO_2(O_2)_2(H_2O)]^{3-}$، $[V_2O_3(O_2)_4]^{4-}$ (یا فرم پروتونه شده ی آن) $[VO(OH)(O_2)_2(H_2O)]^{2-}$ و $[VO(O_2)_2(H_2O)]^{-}$ در گستره ی ۹-۵ = pH به کمک طیف سنج های رامان (۲a)، $^{17}ONMR$ (۲b) و $^{51}VNMR$ شناسایی شده اند (۲a,b). مقدار جا به جایی شیمیایی وانادیم-۵۱ برای ترکیب ها ی پراکسو به طور مشخص بالاتر از وانادات های ساده و بین ppm ۶۹۰- و ۷۶۰- ثبت شده است. تمام این ترکیب ها به طور هم زمان، بعد از اعمال آب اکسیژنه در محلول قابل مشاهده اند. کاتیون های آزاد $[V(H_2O)_6]^{3+}$، $[VO(H_2O)_5]^{2+}$ و $[VO_2[H_2O)_4]^{+}$ به این دلیل که تنها در محیط های بسیار اسیدی پایدارند از اهمیت زیستی کم تری برخوردار هستند. وانادیم(III) در pH > ۲/۲ یک رسوب اکسید وانادیم تولید می کند. کاتیون آبی رنگ $[VO(H_2O)_5]^{2+}$ در $pH \sim$ ۶ با فرم پروتونه نشده ی خود $[VO(OH)(H_2O)_4]^{+}$ در تعادل قرار دارد. افزون بر این، یک **دوپار**[1]، که احتمال می رود $[\{VO(H_2O)_4\}_2(\mu\text{-}OH)_2]^{2+}$ باشد، نیز وجود دارد. در این گستره ی pH، ترسیب وانادیل هیدروکسید، $VO(OH)_2$، آغاز می شود. وانادات(IV) تنها در محلول قلیایی قوی تشکیل می شود (۳).

1. Dimmer

نگاهی اجمالی به تاریخچه آنزیم های دارای وانادیم و الگوهای آن ها (۹).

۱۹۳۳-۱۹۳۶	پیشنهاد نقش وانادیم در تثبیت N_2 به وسیله ی آزوباکتر.
۱۹۷۱	کاهش N_2 به NH_3 به وسیله ی $V^{II}/Mg(OH)_2/OH^-$.
۱۹۷۷	وانادات یک بازدارنده ضروری برای ATP است.
۱۹۸۴	جداسازی و شناسایی نخستین آنزیم وانادیم برموپراکسیداز وابسته به وانادات از مرجان های دریایی **اسکُفیلیوم نودوسوم**[1].
۱۹۸۶	تشخیص یک وانادیم-نیتروژناز در آزوباکتر.
۱۹۹۰/۱۹۹۱	نخستین الگوهای **عمل کردی**[2] وانادیم-نیتروژناز دارای لیگاند N_2 انتهایی یا پل.
۱۹۹۲	معرفی VO^{2+} به عنوان تقلید کننده ی عمل کردی برموپراکسیداز.
۱۹۹۳	کشف کلروپراکسیداز وابسته به وانادات در قارچ **کُرولاریا ایناگوالیس**[3].
۱۹۹۵	توسعه ی الگوهای ساختاری (Fe_3VS_4 مکعبی) **خوشه**[4] M از نیتروژناز.
۱۹۹۵	اکسایش هدف مند ایزومرهای نوری سولفیدها به سولفون ها به کمک ترکیب های کایرال الگوی برموپراکسیدازها.
۱۹۹۶	تعیین ساختار آنزیم کُرولاریا ایناگوالسین.
۱۹۹۹/۲۰۰۰	تعیین ساختار آنزیم اسکُفیلیوم نودوسوم.
۲۰۰۲	کلروپراکسیداز، تحریک کردن فسفاتاز/ بازدارندگی وانادات را نشان می دهد، اسید فسفاتاز تحریک کردن برموپراکسیداز را نشان می دهد.
۲۰۰۳	ارائه مدرکی (تأئید نشده) برای یک نیترات رداکتاز بر پایه وانادیم در **تیواکالیوبریو نیترات رداکتاز**[5].
۲۰۰۵	تعیین محل برماید در **کُرالینا ایناگوالیس**[1] برموپراکسیداز به کمک پراش پرتوی X.

1. Ascophyllum nodosum
2. Functional
3. Curvularia inaequalis
4. Cluster
5. Thioalkalivibrio nitratireducens

۱-۲ وانادیم در اندام های زنده: آنزیم های وابسته به وانادیم

هالوپراکسیدازها به عنوان طبقه اصلی آنزیم های دارای وانادیم و طبقه های مهمی از فسفاتازها، جنبه های ساختاری و عمل کردی مشابه ای را در هر دو حالت بدون وانادات و بعد از اتصال وانادات نشان می دهند. اسیدهای آمینه ی نزدیک به موضع فعال آن ها نیز بسیار هم سان هستند. آنزیم های وانادات-فسفاتاز مانند فسفوتیروزیل فسفاتاز گاوی دارای پیوند کووالانسی وانادیم(V) با سیستئین و وانادیم-نیتروژنازها دارای پیوند کوئوردیناسیون با گوگرد (به صورت μ–S^{2-}) هستند. نمونه ی نخست دارای وانادیم(II/IV) ولی کمپلکس های الگوی وانادات-فسفاتاز و هالوپراکسیدازها، دارای وانادیم(V) هستند.

۱-۲-۱ هالوپراکسیدازها و وانادات در آنزیم های انتقال دهنده فسفریل

نمونه های نمادین از پروتئین های دارای وانادیم که ساختار آن ها به وسیله ی پراش پرتوی X شناسایی شده است در جدول ۱-۱ گردآوری شده اند. محیط کوئوردیناسیون وانادیم نیز در شمای ۱-۱ نمایش داده شده است. هالوپراکسیدازها به عنوان دسته ای از خانواده ی گسترده پراکسیدازها، شبیه پراکسیداز **تُرب کوهی**[۲]، بر پایه گروه **پروستاتیکِ**[۳] کوفاکتور خود به دو دسته ی آنزیم های دارای هِم و بدون هِم تقسیم می شوند. پراکسیدازها نیز به زیر مجموعه های پراکسیدازهای بدون فلز و پراکسیدازهای وابسته به فلز (وانادیم) تقسیم می گردند.

1. Corallina inaequalis
2. Horseradish
3. Prosthetic: بخشی غیر پروتئینی که با پیوندی قوی به بخش پروتئینی آنزیم متصل شده و برای عمل کرد آن لازم است

جدول ۱-۱. نمونه های نمادین از آنزیم های وابسته به وانادیم.

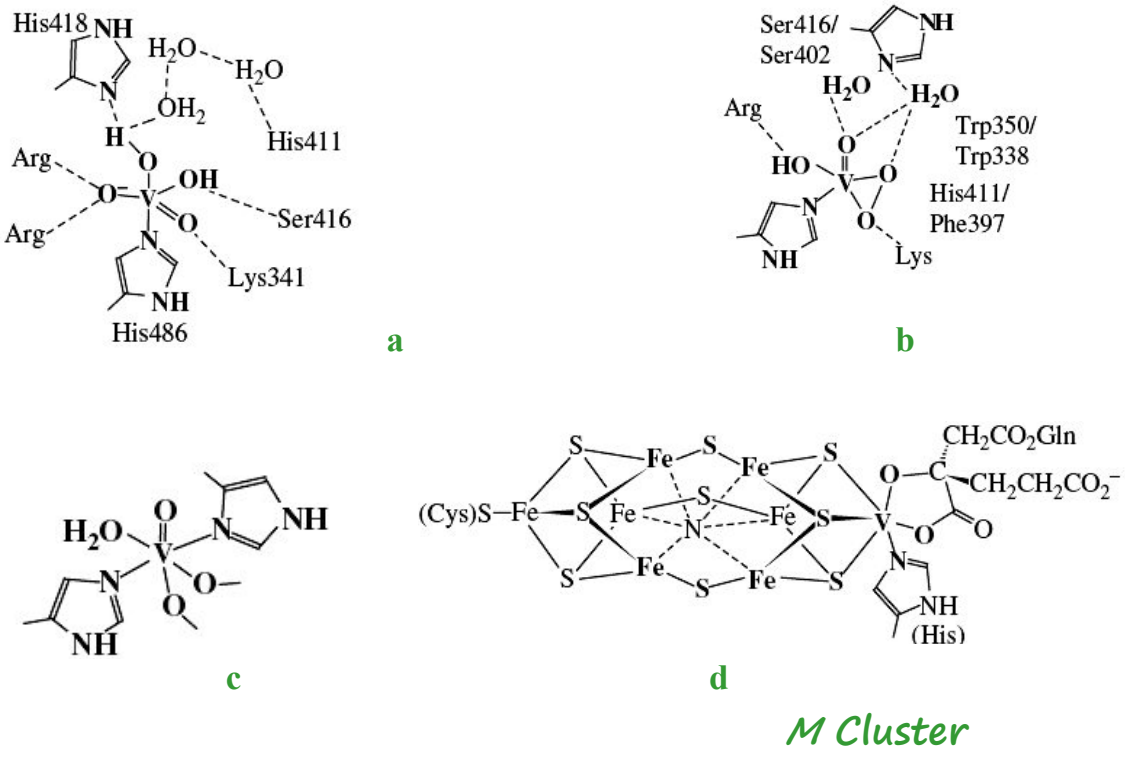
طبقه بندی	نام	منشأء حیاتی	کد PDB	عمل کرد حیاتی	ملاحظه ها	مرجع ها
پراکسیداز	بروموپراکسیداز	اسکُفیلیوم نودوسوم	1QI9	برم و ید دار کردن سوبستراهای آلی	اتصال وانادات به هیستیدین	۵
	بروموپراکسیداز	**کُرالینا افیشینالیس**[1]	1QHB	برم و ید دار کردن سوبستراهای آلی	اتصال وانادات به هیستیدین	۶
	کلروپراکسیداز	کُرولاریا ایناگوالیس	1VNE to-I 1VNES	هالوژن دار کردن؛ اکسایش تخریبی	دارای **آپو**[2]، **هولو**[3] و بخش های قابل جهش	۷
فسفاتاز	اسید فسفاتاز	موش صحرایی	1RPT	حالت گذار در آب کافت فسفواستر	اتصال وانادات به هیستیدین	۸
	فسفاتاز قلیایی	**ای-کولای**[4]	1B8J	حالت گذار در آب کافت فسفواستر	اتصال وانادات به سرین	۸
فسفو دی استراز	تیروزیل- دی DNA- فسفو استراز	انسان	1NOP	الگوی حالت گذار	اتصال وانادات به هیستیدین و تیروزین	۸
فسفاتاز	فسفو تیروزیل فسفاتاز	گاو	1Z12	بازدارندگی از تشکیل حالت گذار	اتصال وانادات به سیستئین	۲

1. Corallina officinalis
2. Apo: بخشی از آنزیم که بدون کوفاکتور و غیر فعال است را اپو-آنزیم می گویند
3. Holo: بخش پیچیده آنزیم که شامل اپو و کو آنزیم است
4. E-coli

هالوپراکسیدازها به دلیل توانایی کاتالیز فرایند هالوژن دار شدن ترکیب های آلی، در صنایع کاتالیزوری وابسته، به طور گسترده ای مورد توجه قرار گرفته اند. آنزیم های دارای هِم به علت عدم توانایی تمایز سوبسترا ها و پایداری پایین که ناشی از اکسایش سریع و شکسته شدن پیوند لیگاند هِم پروستاتیک است، کاربردهای صنعتی ندارند. در مقابل هالوپراکسیدازهای وابسته به وانادیم به دلیل داشتن مزیت هایی برای کاربردهای عملی مانند پایداری بالا، متمایز کردن خوب سوبستراها و در دسترس بودن برای فرایندهای **مقدار بالا**[1] (۵) یا **سامانه های تلقیح شده**[2] مورد توجه اند. هالوپراکسیدازهای وابسته به وانادیم از جلبک های قهوه ای و قرمز دریایی و از قارچ کُرولاریا اینا‌گوالیس جداسازی شده اند. ساختار برمو/یدو پراکسیدازهای جداسازی شده از جلبک دریایی اسکُفیلیوم نودوسوم (۵)، کلروپراکسیداز جداسازی شده از جلبک قرمز (۶) و قارچ کُرالینا افیشینالیس (آخری در فرم های **بومی**[3] و پراکسودار) (۹) شناسایی شده اند. موضع فعال آنزیم های به دست آمده از منبع های متفاوت، هم سانی بسیاری دارند. فرم های بومی VHPOs دارای وانادیم(V) در مرکز یک دو هرمی با قاعده مثلثی هستند که به صورت کووالانسی به یک هیستیدین محوری متصل شده است (شکل ۱-۱). ترکیب های وانادات-فسفاتاز دارای اسید های آمینه ی هیستیدین (پروستاتیکِ اسید فسفاتاز موش)، سرین (فسفاتاز قلیایی به دست آمده از باکتری ای-کولای) یا سیستینِ (فسفوتیروزیل فسفاتاز گاوی) متصل شده به موضع فعال هستند. ساختار دو هرمی با قاعده مثلثی در هالو پراکسیداز دارای پراکسو (جداسازی شده از قارچ)، که یک **ترکیب میانی**[4] در فرایند کاتالیزوری است، به سمت ساختار هرم با قاعده مربعی با گروه پراکسو در

1. Large-scale
2. Expression system: در این روش ژن های مورد نظر برای تولید پروتئین های مطلوب به سلول های میزبان تلقیح می شوند
3. Native
4. Intermediate

موقعیت شبه محوری-استوایی منحرف می شود (b در شمای ۱-۱). کاهش تک الکترونی وانادات پراکسیداز به وانادیل و تغییر محیط کوئوردیناسیون، آنزیم را غیر فعال می کند (c در شمای ۱-۱) (۴).



شمای ۱-۱. شمایی ساده از پروتئین های دارای وانادیم. خط های ناپیوسته، پیوندهای غیر کووالانسی با باقی مانده های اسید آمینه ی نزدیک مرکز وانادیم را نشان می دهند. (a) برموپراکسیداز جداسازی شده از جلبک اسکُفیلیوم نودوسوم. (b) فرم پراکسودار کلروپراکسیداز جداسازی شده از قارچ کُرولاریا ایناگوالیس. (c) ساختار پیشنهادی برای فرم کاهش یافته ی (V^{IV}) برموپراکسیداز. (d) خوشه M از آنزیم وانادیم نیتروژناز (۴).

جنبه اصلی واکنش پذیری هالوپراکسیدازها، کاتالیزکردن واکنش اکسایش دو الکترونی هالیدها (و شبه هالیدها مانند سیانید، تیوسیانید و آزید که از اکسایش هالید جلوگیری می کنند) است. Hal^- (Hal_2، Hal_3^- یا HOHal) که فراورده ی اکسایش است، سوبسترا های آلی را در نبودآنزیم هالوژنه می کند

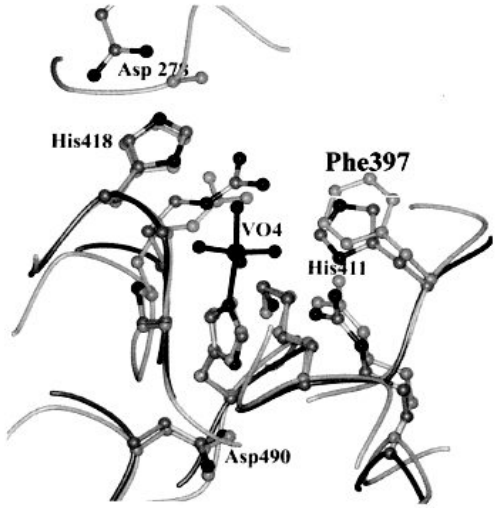
(معادله های ۱-۱ و۱-۲). در غیاب سوبسترا، اکسیژن یکتائی به وجود می آید (معادله ۱-۳). نام گذاری هالوپراکسیدازها بر اساس هالید با بیش تر ین الکترونگاتیویته است که به وسیله ی آن ها اکسید می شود. کلروپراکسیدازها اکسایش هر سه هالید را کاتالیز می کنند، در حالی که برموپراکسیدازها فقط در غلظت های بالای کلراید نسبت به آن فعال هستند. ثابت های تفکیک برای بروموپراکسیداز جداسازی شده از کُرولاریا ایناگوالیس در $pH = ۵/۵$ (pH بهینه برای فعالیت آنزیمی) $K_m\,(H_2O_2) = ۱\times۱۰^{-۴}\ M$ و $K_m\,(Br^-) = ۲/۱۷\times۱۰^{-۴}\ M$ است (۴).

$$Br^- + H_2O_2 + H^+ \rightarrow HOBr + H_2O \qquad (۱-۱)$$

$$HOBr + RH \rightarrow RBr + H_2O \qquad (۱-۲)$$

$$HOBr + H_2O_2 \rightarrow {}^1O_2 + Br^- + H^+ + H_2O \qquad (۱-۳)$$

پیوند کووالانسی وانادات با هیستیدین محوری در کلروپراکسیداز جداسازی شده از کُرولاریا ایناگوالیس برای فعالیت آنزیم ضروری است؛ جانشینی هیستیدین با آلانین از شرکت وانادات در شبکه پیوندهای هیدروژنی جلوگیری نمی کند اما آنزیم را غیر فعال می کند. جانشینی آمینواسیدهای پیرامون موضع فعال که در متعادل کردن بار منفی وانادات (و تشکیل پیوندهای هیدروژنی) نقش دارند و کلروپراکسیداز را به همتای برموی آن تبدیل می کنند، نشان گر وابسته بودن انتخاب گری سوبسترا به پخش بار در موضع فعال آنزیم است (۴).



شکل ۱-۱. انطباق موضع های فعال برموپراکسیداز جداسازی شده از جلبک اسکُفیلیوم نودوسوم (تیره) و کلروپراکسیداز جداسازی شده از قارچ کُرولاریا ایناگوالیس (روشن).

طبق معادله ۱-۱ ، پروتون ها در تشکیل هیپوهالواسید به کار می روند. یک مطالعه ی **نظری تابع چگال (DFT)**[1] درباره واکنش های فرم پراکسوی آنزیم کلروپراکسیداز (جداسازی شده از کُرولاریا ایناگوالیس) و ترکیب های الگوی آن، نقش کلیدی لیزین**۳۵۳**، که با اکسیژن استوائی پیوند هیدروژنی دارد، را در فعال سازی گروه پراکسو نشان می دهد. طبق این پژوهش، سوبسترای هسته دوست به اکسیژن شبه محوری لیگاند پراکسو حمله می کند (۱۱). مکانسیم فعال سازی VHPO و اکسایش هالید به کمک آن در بخش ۱-۳ شرح داده شده است. هالیدها و شبه هالیدها تنها سوبستراهای مناسب برای هالوپراکسیدازهای وابسته به وانادیم نیستند. سولفیدهای آلی، ایندول ها و مونوترپن ها نیز به طور مستقیم به وسیله ی پراکسیدازها اکسید می شوند. سوبسترا برای انجام واکنش های **موقعیت گزین**[2] بایستی با بسته ی پروتئینی حمل کننده مرکزهای کایرال (که پیرامون مرکز وانادات غیر کایرال قرار دارد) پیوند برقرار کند. ثابت پیوند ۲-فنیل ایندول با آنزیم اسکُفیلیوم نودوسوم ($۱/۱\times۱۰^{۵}\ M^{-1}$)، و متیل-فنیل سولفید

1. Density Functional Theory
2. Regioselective