١٠٣٧٦٤

دانشکده علوم پایه

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد شیمی فیزیک

عنوان:

مطالعه ترمودینامیکی برهمکنش پروتئین بازی میلین با برخی از کاتیون‌های فلزی

اساتید راهنما:

دکتر غلامرضا رضایی بهبهانی

دکتر علی اکبر صبوری

استاد مشاور:

دکتر بهمن واشقانی فراهانی

۱۳۸۶ /۱۱/ ۲

تهیه و تنظیم:

آزاده فلاح باقری

تابستان ۸۶

۱۰۳۷۶۲

تاریخ:.....
شماره:.....
پیوست:.....

باسمه تعالی

جلسه دفاع از پایان نامه خانم آزاده فلاح باقری دانشجوی کارشناسی ارشد رشته شیمی فیزیک با عنوان "مطالعه ترمودینامیکی برهمکنش پروتئین بازی میلین با برخی از کاتیون های فلزی" با حضور اعضای محترم هیأت داوران در محل دانشکده علوم پایه دانشگاه بین المللی امام خمینی در تاریخ ۸۶/۷/۹ برگزار شد.

به موجب آیین نامه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد ارزیابی هیأت داوران به شرح زیر است:

-قبول(با درجه عالی..امتیاز ۱۹/۱۰) - دفاع مجدد - مردود

۱-عالی ۲۰-۱۸

۲- بسیار خوب ۱۷/۹۹-۱۶

۳-خوب ۱۵/۹۹-۱۴

۴-قابل قبول ۱۳/۹۹-۱۲

۱۳۸۶/۱۱/۲

اعضای هیأت داوران

اساتید راهنما:

۱-دکتر غلامرضا رضایی بهبهانی درجه علمی: استادیار امضا:

۲- دکتر علی اکبر صبوری درجه علمی: استاد امضا:

استاد مشاور: دکتر بهمن واشقانی فراهانی درجه علمی: استادیار امضا:

۳- داور داخلی : دکتر محمدرضا خانمحمدی خرمی درجه علمی: دانشیار امضا:

۴-داور خارجی: دکتر نعمت ا... غیبی درجه علمی: استادیار امضا:

۵- نماینده تحصیلات تکمیلی : دکتر مجید سلیمانی درجه علمی: استادیار امضا:

به مادر مهربانم که بهار زندگیش مرا بـه شـکوفه نشاند و به پدر نـازنینم کـه خورشـید وجـودش فروغ زندگی‌ام شد.

به برادر عزیز، این بهترینم کـه شـکوه حـضورش بدرقه راهـم شـد و خـواهران مهربـانم کـه مهـر حضورشان همواره مرا یاور بود.

به استادان گرامی‌ام دکتر غلامرضا رضایی بهبهانی و دکتر علی‌اکبر صبوری که اشارتشان در این فراز و نشیب‌ها مرا حامی بود.

سپاس

با تشکر و قدردانی از استادان ارجمند:
جناب آقای دکتر علی اکبر صبوری و دکتر غلامرضا رضایی بهبهانی که راهنمایی این پروژه را بر عهده داشتند و در این مدت همواره یاورم بودند.

با تشکر و قدردانی از استاد محترم مشاور:
دکتر بهمن واشقانی فراهانی

با تشکر فراوان از جناب آقای دکتر نعمت‌ا... غیبی و جناب آقای دکتر خان‌محمدی که با بر عهده گرفتن داوری این پایان نامه باعث افتخارم شدند.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه

مقدمه ۱

فصل دوم: تئوری

۲-۱ پروتئین‌ها ۹

۲-۱-۱ خصلت اسیدی و بازی پروتئین‌ها ۹

۲-۱-۲ ساختمان پروتئین‌ها ۱۰

۲-۱-۳ برهمکنش‌های ضعیف در پروتئین‌ها ۱٤

۲-۲ تقلیب پروتئین (غیر طبیعی شدن پروتئین) ۱٦

۲-۲-۱ اثر تغییر pH در غیر طبیعی شدن پروتئین‌ها ۱۷

۲-۳ میلین سیستم عصبی مرکزی ۱۷

۲-٤ پروتئین بازی میلین ۱۹

۲-٤-۱ ترادف ۱۹

۲-٤-۲ فرمهای مولکولی ۲۱

۲-۵ ساختمان و رفتار پروتئین بازی میلین (MBP) ۲۲

۲-۵-۱ ساختمان مونومری MBP در محلول ۲۲

۲-۵-۲ ساختمان سه بعدی MBP ۲۳

۲-۵-۳ ساختمان MBP در داخل میلین ۲۵

۲-۵-٤ پدیده‌ی خودتجمعی در MBP ۲٦

۲-۵-۵ اثر پروتئین بازی میلین روی فضای بین دو لایه لیپیدی ۲۷

۲-۵-٦ میانکنشهای داخل میلین ۲۷

۲-۵-۷ اتصال فلزات به MBP ۲۸

۲-٦ پیوند لیگاند به ماکرومولکول ۳۰
۲-٦-۱ پیوند لیگاند به یک مجموعه جایگاه‌های یکسان و مستقل ۳۲
۲-٦-۲ پیوند لیگاند به چند مجموعه جایگاه‌های یکسان و مستقل..... ۳۵
۲-٦-۳ پیوند لیگاند به مجموعه‌ای از جایگاه‌های یکسان و غیرمستقل..... ۳٦
۲-۷ کالریمتری تیتراسیونی همدما ۳۷
۲-۷-۱ دستگاهوری کالریمتری تیتراسیونی همدما..... ۳۸
۲-۸ تجزیه و تحلیل داده‌های کالریمتری..... ٤٤
۲-۸-۱ مطالعه پیوند لیگاند به ماکرومولکول براساس آنالیز شبیه اسکاچارد داده‌های کالریمتری تیتراسیونی همدما..... ٤٤
۲-۸-۲ روش جایگزینی گرافیکی برای تعیین ثابت پیوند و آنتالپی پیوند..... ٤۸
۲-۹ کاربرد روش کالریمتری در تئوری انحلال ۵۰
۲-۹-۱ تعیین فاکتور حلالیت ترجیحی به وسیله تئوری کالریمتری..... ۵۱
فصل سوم
تجربی و آزمایشگاهی
۳-۱ نحوه‌ی انجام آزمایش در دستگاه میکروکالریمتری تیتراسیونی همدما..... ٦۱
۳-۱-۱ تبدیل واحد گرمایی رقیق‌شدن و گرمای پیوندی لیگاند-پروتئین از μJ به $\frac{kJ}{mol}$ ٦۵
۳-۱-۲ محاسبه غلظت پروتئین و لیگاند بعد از هر بار تزریق..... ٦۵
۳-۱-۳ محاسبات لازم جهت بدست آوردن K_d و ΔH با استفاده از روش‌های متفاوت..... ٦۸
۳-۱-٤ نرم‌افزارهای مورد استفاده..... ۷۸
فصل چهارم
بحث و نتیجه‌گیری
٤-۱ آنالیز داده‌های کالریمتری با استفاده از روش‌های متفاوت..... ۷۹
٤-۱-۱ برهمکنش یون کلسیم با پروتئین بازی میلین ۷۹

٤-١-٢ برهمکنش یون منیزیم با پروتئین بازی میلین ٨٠
٤-١-٣ برهمکنش یون کبالت با پروتئین بازی میلین ٨٠
٤-٢ بررسی داده‌های میکروکالریمتری با استفاده از تئوری انحلال ٨٢
٤-٢-١ نتایج مطالعات میکروکالریمتری در برهمکنش یون کلسیم با پروتئین بازی میلین..... ٨٢
٤-٢-٢ نتایج مطالعات میکروکالریمتری در برهمکنش یون منیزیم با پروتئین بازی میلین..... ٨٣
٤-٢-٣ نتایج مطالعات میکروکالریمتری در برهمکنش یون کبالت (II) با پروتئین بازی میلین ٨٤
٤-٣ بحث و نتیجه‌گیری کلی و مقایسه نتایج ٨٦
منابع و مآخذ ٩١

فهرست اشکال

صفحه

(۲-۱) مدل یک مارپیچ آلفا ۱۱

(۲-۲) صفحه‌ی چین‌دار بتای موازی ۱۲

(۲-۳) یک دور بتا امکان خم شدن یک زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی را بر روی خود بوجود می‌آورد..... ۱۳

(۲-٤) اتصال عرضی دی‌سولفیدی ۱٤

(۲-۵) نمایش شماتیک صفحه‌ی میلینی حول یک آکسون..... ۱۸

(۲-٦)ترادف اسیدهای آمینه پروتئین بازی میلین ۲۰

(۲-۷) نسخه های اولیه پروتوین بازی میلین..... ۲۱

(۲-۸) مدل استونر برای پروتئین بازی میلین ۲٤

(۲-۹) مدل مارتنسون برای پروتئین بازی میلین..... ۲۵

(۲-۱۰) شمایی از هگزامر شدن پروتئین بازی میلین ۲٦

(۲-۱۱)نمودار اسکاچارد برای ماکرومولکولی شامل g جایگاه پیوندی یکسان و مستقل ۳٤

(۲-۱۲) نمودار خطی کلودز برای ماکرومولکولی شامل g جایگاه پیوندی یکسان و مستقل ۳۵

(۲-۱۳) نمودار اسکاچارد..... ۳۷

(۲-۱٤)مبادله‌ی گرما بین ظرف واکنش و محیط در میکروکالریمتر همدما..... ۳۹

(۲-۱۵) شمای کلی نشان دهنده‌ی فعالیت گرمایی..... ٤۰

(۲-۱٦) سل نمونه در میکروکالریمتر همدما ٤۲

(۲-۱۷) نمونه‌ای از ترموگرام کالریمتری تیتراسیون همدما..... ٤۳

(۲-۱۸) نحوه ارزیابی نتایج از ترموگرام کالریمتری تیتراسیونی همدما..... ۵۰

(۳-۱۹) نمودار خطی $(\frac{\Delta q}{q_{max}})M_0$ در مقابل $(\frac{\Delta q}{q})L_0$در برهمکنش MBP-Ca..... ٦۹

(۳-۲۰)نمودار خطی $(\frac{\Delta q}{q_{max}})M_0$ در مقابل $(\frac{\Delta q}{q})L_0$در برهمکنش MBP-Mg..... ۷۰

(۳-۲۱)نمودار خطی $(\frac{\Delta q}{q_{max}})M_0$ در مقابل $(\frac{\Delta q}{q})L_0$در برهمکنش MBP-Co ۷۱

(۳-۲۲) نمودار خطی $\frac{-1}{q}$در مقابل $\frac{1}{[L]}$ در برهمکنش MBP-Ca ۷۳

(۳-۲۳) نمودار خطی $\frac{-1}{q}$در مقابل $\frac{1}{[L]}$ در برهمکنشMBP-Mg ۷٤

(۳-۲٤) نمودار خطی $\frac{-1}{q}$در مقابل $\frac{1}{[L]}$ در برهمکنشMBP-Co ۷۵

(۳-۲۵) نمودار K_d در مقابل ΔH در برهمکنش MBP- Ca ۷٦

(۳-۲٦) نمودار K_d در مقابل ΔH در برهمکنش MBP-Mg ۷۷

(۳-۲۷) نمودار K_d در مقابل ΔH در برهمکنش MBP-Co ۷۸

(٤- ۲۸) مقایسه‌ی بین آنتالپی تجربی (Δ) و داده‌های محاسباتی در برهمکنش Ca^{+2}-MBP ۸۸

(٤-۲۹)مقایسه‌ی بین آنتالپی تجربی (□) و داده‌های محاسباتی در برهمکنش Mg^{+2}-MBP ۸۹

(٤-۳۰) مقایسه‌ی بین آنتالپی تجربی (Δ) و داده‌های محاسباتی در برهمکنش Co^{+2}-MBP ۹۰

فهرست جداول

صفحه

(۲-۱) ترکیبات لیپیدی و پروتئینی میلین در سیستم عصبی مرکزی ۱۹

(۲-۲) فلزات جداشده از غشاهای میلین طناب نخاعی گاوی ۲۹

(۲-۳)اتصال اشباعی یون‌های فلزی دو ظرفیتی روی پروتئین بازی میلین..... ۳۰

(۳-٤) داده‌های خام دستگاه میکروکالریمتری در برهمکنش Ca^{+2}-MBP..... ٦۲

(۳-٥) داده‌های خام دستگاه میکروکالریمتری در برهمکنش Mg^{+2}-MBP ٦۳

(۳-٦) داده‌های خام دستگاه میکروکالریمتری در برهمکنش Co^{+2}-MBP ٦٤

(۳-۷) آنتا لپی برهمکنش Ca^{+2}-MBP (Q) با یون کلسیم..... ٦٦

(۳-۸) آنتا لپی برهمکنش Mg^{+2}-MBP (Q) با یون منیزیم ٦۷

(۳-۹) آنتا لپی برهمکنش Co^{+2}-MBP (Q) با یون کبا لت..... ٦۷

(٤-۱۰)پارامترهای حلالیت برهمکنش Ca^{+2}-MBP ۸۲

(٤-۱۱)پارامترهای حلالیت برهمکنش Mg^{+2}-MBP..... ۸٤

(٤-۱۲)پارامترهای حلالیت برهمکنش Co^{+2}-MBP..... ۸٥

چکیده

برهمکنش پروتئین بازی میلین از سیستم عصبی گاو با سه یون فلزی دو ظرفیتی کلسیم، منیزیم و کبالت با استفاده از کالریمتری تیتراسیونی همدما در ۳۰۰K در محلول آبی مطالعه شده است. گسترش تئوری حلالیت برای بدست آوردن مجدد آنتالپی برهمکنش، پروتئین‌بازی میلین ـ یون فلزی بکار برده شده است.

پارامترهای حلالیتی که از تئوری حلالیت بدست می‌آیند به تغییرات ساختمانی پروتئین بازی میلین به خاطر برهمکنش با یون فلزی نسبت داده می‌شوند. ما دریافتیم که یک دسته‌ی دو، دو و سه‌تایی از جایگاه‌های پیوندی یکسان و غیرمستقل، به ترتیب برای یون‌های کلسیم، منیزیم و کبالت وجود دارد.

آنتالپی مولی پیوند برای یون‌های کلسیم، منیزیم و کبالت بترتیب ۱٤/٦-، ۱۵/٤- و ۱۵/۱- $kJmol^{-1}$ است و ثابت تعادل تجمعی برای یون‌های کلسیم، منیزیم و کبالت بترتیب ٦۳، ٤۲ و ٤۸ μM^{-1} است. مطالعات گروه ما برای گسترش درک این مطلب که چگونه یون‌های فلزی و لیگاندهای پیوندی دیگر، با پروتئین‌ها، روی پایداری مولکول‌های زیستی تأثیر می‌گذارند گزارش شده است. یکی از جنبه‌های منحصر به فرد روش ما مطالعه پایداری پروتئین با استفاده از گسترش تئوری حلالیت است. این تئوری می‌تواند طی یک روش ساده پارامترهای حلالیت را، به اثر فلزات روی پایداری پروتئین ارتباط دهد. برهمکنش یون‌های کلسیم، منیزیم با پروتئین بازی میلین، پایداری و فعالیت زیستی پروتئین بازی میلین را افزایش می‌دهند و برهمکنش یون کبالت با پروتئین بازی میلین، پایداری و فعالیت زیستی پروتئین بازی میلین را کاهش می‌دهد.

فصل اول

مقدمه

بیش از ۳۰ سال پیش انفینسن وهمکارانش نشان دادند که اطلاعات لازم برای شکل‌گیری بنای فضایی پروتئین‌ها، در توالی اسیدهای آمینه‌ی آن نهفته است [۱]. وقتی که پروتئین‌ها در محیط آبی قرار می‌گیرند، بخش‌های آبدوست در معرض مولکول‌های آب و بخشهای آبگریز دور از آن قرار گرفته [۳-۲] و آرایش فضایی خاصی را به وجود می‌آورند که پروتئین در آن حالت، عمل خاص خود را ایفا می‌کند [٤]، چنین پدیده‌ای نشان‌دهنده‌ی رابطه‌ی بین ساختمان و عمل پروتئین[1] می‌باشد. بر طبق نظریه‌ی انفینسن، تاخوردگی پروتئین‌ها، می‌تواند تحت کنترل سینتیکی باشد [٦-٥]، اکنون محققان پذیرفته‌اند که ساختمان سه بعدی اکثر پروتئین‌ها تحت کنترل ترمودینامیکی شکل گرفته و با عبور از حد واسط‌های ساختمانی، که تحت کنترل سینتیکی هستند، بنای فضایی طبیعی خود را بدست می‌آورند.

غیرطبیعی کردن پروتئین‌ها[2]، فرایندی است که در آن آرایش فضایی[3] حالت طبیعی[4] ماکرومولکول تغییر می‌کند، بدون آنکه پیوندهای کووالانسی اولیه تخریب شود، یعنی در فرایند فوق ساختمان اولیه (توالی اسیدهای آمینه) ماکرومولکول تغییرنمی‌کند، بلکه آرایش فضایی (ساختمان سه بعدی) آن تغییر می‌کند، منظور از آرایش فضایی، آرایش خاص اتمها در فضای سه بعدی و طول زوایای پیوندی می‌باشد [۷].

مولکول پروتئین که در حالت تاخورده دارای فعالیت زیستی است، با بازشدن ساختمان سوم، فعالیت زیستی خود را از دست می‌دهد، این نوع غیرطبیعی شدن ساختمان پروتئین، پدیده‌ای متعاون بوده و با حذف تأثیر عوامل غیرطبیعی کننده‌ی پروتئین، برگشت‌پذیر می‌باشد. همچنین پروتئین با ایجاد تغییرات شیمیایی بطور برگشت‌ناپذیر فعالیت خود را از دست داده و غیرفعال می‌گردد. حالت تاخورده‌ی پروتئین‌ها از حالت بازشده‌ی آنها پایدارتر می‌باشد، که این غیرفعال‌شدن می‌تواند در نتیجه

[1] - Structure- function relation ship
[2] - Denaturation
[3] - Conformation
[4] - Native

برهمکنش لیگاند- پروتئین باشد.

پیوند غیرکووالان بین ماکرومولکول‌های کوچک باردار یا قطبی، انواع یون‌های فلزی و غیرفلزی و داروها، با ماکرومولکول‌ها بویژه پروتئین‌ها، طیف وسیعی از مطالعات بیوشیمی فیزیکی را تحت عنوان پیوند لیگاند[1] دربرگرفته است. برهمکنش لیگاند-پروتئین اغلب از نوع برهمکنش فیزیکی است. لیگاندها، شامل سوبستراهای آنزیمی، آنیون‌های اسیدچرب، کاتیون‌های کوچک و فلزی و غیره هستند. یک ماکرومولکول ممکن است یک یا چند جایگاه پیوندی یا حتی چندین دسته جایگاه پیوندی داشته باشد. جایگاه‌های پیوندی ممکن است یکسان یا غیریکسان، مستقل یا وابسته باشند.

روش‌های مختلفی برای بررسی اتصال لیگاند به ماکرومولکول استفاده می‌شود، از جملهآنها را می توان به:

دیالیز تعادلی، طیف سنجی و روش‌های کالریمتری اشاره کرد که با تحلیل داده‌های حاصل از این آزمایش‌ها می‌توانیم اطلاعاتی در مورد لیگاند متصل شونده به ماکرومولکول، تعداد مجموعه جایگاه‌ها، تعداد جایگاه‌های پیوندی در هر مجموعه و قدرت و ماهیت پیوند را بدست آوریم.

الف: روش طیف سنجی UV: جهت ارزیابی ثابت تفکیک و استوکیومتری اتصال کمپلکس پروتئین- لیگاند می‌باشد[۸]. در این روش غلظت ثابتی از پروتئین (یا لیگاند) بوسیله محلول لیگاند (یا پروتئین) تیتر می‌گردد و تغییرات در پیام طیف بینی پس از هر بار افزودن تیترکننده ثبت می‌شود، این سیگنال مربوط به میانکنش پروتئین با لیگاند در ابتدا افزایش می‌یابد و به یک حد ماکزیمم می‌رسد و سپس بخاطر اثر رقت کاهش می‌یابد. حجم تیترکننده‌ی مورد نیاز برای رسیدن به ماکزیمم فوق، در جهت محاسبه ثابت اتصال و استوکیومتری اتصال بکار می‌رود[۱۰-۹].

ب: کالریمتری [۱۱]، که منبع اصلی اطلاعات ترمودینامیکی بوده و یک روش بسیار مستعد و حساس بوده و بر این پایه که از نظر تجربی، تمام فرایندهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی، همراه با

[1] - Ligand Binding

مبادله گرما می‌باشند، استوار است. طی چند قرن، این واقعیت باعث شده است که اندازه‌گیری‌های جریان گرما، یکی از قدرتمندترین ابزار بسط دانش و درک وقایع در رشته‌های مختلف علوم و تکنولوژی باشد. کالریمتری یک روش تجزیه‌ای عام و مناسب برای ثبت پدیده‌هایی است که کاملاً ناشناخته و حتی غیرقابل انتظار می‌باشند [۱۳-۱۱]، بنابراین کالریمتری یک ابزار قدرتمند برای گسترش دانش و درک در زمینه‌های مختلف علم و تکنولوژی است[۱۷-۱٤].

تکنیک‌های کالریمتری اصلی که در حصول اطلاعات ترمودینامیکی نقش داشته‌اند، عبارتند از:

کالریمتری جاروب تفاضلی[1] و کالریمتری تیتراسیونی همدما[2]

کالریمتری جاروب تفاضلی: که روشی است برای تعیین میزان متوسط لیگاند پیوندشده به پروتئین و در این روش طبیعت و اندازه‌ی نیروهای پایدارکننده ماکرومولکول‌های زیستی تحقیق می‌شود [۲۱-۱۸و۱۰].

کالریمتری تیتراسیونی همدما: که در آن انرژی‌های واکنش‌های بیوشیمیایی، یا برهمکنش‌های مولکولی (پدیده‌های پیوند لیگاند، برهمکنش‌های آنزیم- سوبسترا و برهمکنش‌های میان اجزا و کمپلکس‌های چند مولکولی) در دمای ثابت اندازه‌گیری می‌شود.

آزمایشات از طریق تیتراسیون و افزودن یک واکنشگر به داخل محلول نمونه ی حاوی دیگر واکنشگرهای مورد نیاز انجام می‌گیرد [۲۹-۲۲و۲۰-۱۸و۱۰-۹].

کالریمتری تیتراسیونی همدما در دهه‌ی هفتاد میلادی به جهت شناخت ترمودینامیکی واکنش‌های کاتالیزوری آنزیمی، پیوند لیگاند به ماکرومولکول‌ها و القا تغییرات در بنای فضایی ماکرومولکول در اثر لیگاند یا pH، استفاده می شد، لکن اندازه‌گیری‌های اثرات گرمایی فقط در محدوده یک میلی‌کالری یا بزرگتر قابل انجام بود و با این میزان دقت، تنها واکنش‌های زیستی که نسبتاً اثرات قوی دمایی نشان می‌دادند، می‌توانستند مورد مطالعه قرار گیرند. سالیان زیادی

[1] - Differential Scanning Calorimetry

[2] - Isothermal Titration Calorimetry

تکنولوژیست‌ها و طراحان دستگاه سعی کردند تا کالریمتری‌های تیتراسیونی همدمایی با قابلیت‌های پیشرفته برای کشف اثرات گرمایی کوچکتر بسازند. این کوشش‌ها در طول دهه هشتاد میلادی منجر به طراحی و ساخت میکروکالریمتری تیتراسیونی همدما با قابلیت اندازه‌گیری اثرات گرمایی درحد یک میکروکالریمتر شد [۳۰-۱۶]. تیتراسیون کالریمتری همدما، اطلاعات با ارزشی در ارتباط با برهمکنش لیگاند ـ پروتئین [۴۵-۳۱]، بازدارندگی آنزیم [۵۰-۴۶] ، ایمنی، نیمه عمر و پایداری مواد ارائه می‌دهد [۵۶-۵۱] . نمونه مورد مطالعه می‌تواند،جامد، مایع و یا مخلوطی از این دو باشد. داده‌های حاصل از بررسی پایداری مواد توسط میکروکالریمتری می‌تواند به سرعت، مطلوب و بدون بررسی نمونه و بدون تخریب آن بدست آورده شود.

ثابت‌های سرعت، انرژی‌های فعال‌کنندگی و دیگر پارامترهای ترمودینامیکی می‌تواند در دماهای خیلی نزدیک به شرایط حقیقی تعیین شوند. حساسیت زیاد تیتراسیون کالریمتری همدما این امکان را فراهم می‌سازد که این روش در صنایع دارویی کاربرد وسیعی یابد. تعیین سرعت تجزیه داروها (پایداری ، طول عمر مفید) در دماهای مختلف، دمای نگهداری دارو را از طریق برونیابی داده‌های تجربی قابل سنجش می نماید. بعلاوه، در دهه نود میلادی، اثر پاک‌کننده ها بر پایداری پروتئین ها، تعیین آنتالپی مولار بازشدن پروتئین‌ها، تعیین ثابت مهارکنندگی پیوند لیگاند به آنزیم، توسط تیتراسیون کالریمتری همدما گزارش شده است[۱۱].

از جمله مطالعات انجام شده توسط گروه ما در خصوص برهمکنش لیگاند- پروتئین در طی ٦ سال گذشته، با استفاده از روش‌های طیف سنجی ماوراء بنفش و کالریمتری تیتراسیونی همدما و کالریمتری جاروب تفاضلی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

به دلیل اهمیت دارویی هورمون رشد و استفاده‌ی گسترده‌ی کلینیکی از آن، برهمکنش هورمون رشد با یون‌های فلزی [۲۹و۲٦و۲٤و۲۰و۱۰]، و تأثیر مواد و عوامل مختلف برروی پایداری و ساختمان آن صورت گرفته است این مطالعات در زمینه‌ی استخراج، بدست آوردن فرمولاسیون

مناسب و نگهداری از این شرایط،به ما کمک می نمایند. معمولاً پیوندشدن یک فلز برروی ساختمان و عملکرد پروتئین تأثیر می‌گذارد [۵۷]. مطالعات دورنگ نمایی حلقوی[1] در برهمکنش روی با هورمون رشد انسانی نشان داده که ساختمان پروتئین در حضور Zn^{+2} تا نسبت مولی ۱:۳ پروتئین به Zn^{+2} هیچ تغییری در ساختمان سوم پروتئین ایجاد نمی‌کند [۵۸] و با توجه به مطالعات اسپکتروسکوپی وتغییر در میزان جذب هورمون، در نتیجه‌ی برهمکنش روی با هورمون رشد به این نتیجه رسیدند که روی، ساختمان هورمون رشد را پایدار می‌کند ولی مقدار این پایداری به طور کمی مشخص نشد [۵۸] .

در مورد برهمکنش یون کلسیم با هورمون رشد انسانی با استفاده از دو روش الکتروشیمی و کالریمتری تیتراسیونی همدما مشخص شد که یون‌های کلسیم، سه جایگاه اتصال یکسان و مستقل برروی هورمون رشد انسانی دارند. برای تعیین اثر یون کلسیم برروی پایداری پروتئین، از غیرطبیعی شدن گرمایی، که یکی از روش‌های مناسب برای بررسی ساختمان پروتئین می‌باشد، استفاده شد ولی باز هم مقدار پایداری بطور کمی قابل تشخیص نبود. در این برهمکنش با استفاده از تحلیل داده‌های کالریمتری از طریق جایگزینی گرافیکی مقدار K_d و ΔH مشخص شد[۲۴و۲۰].

در برهمکنش منیزیم با هورمون رشد انسانی، با استفاده از دو روش الکتروشیمی و کالریمتری تیتراسیونی همدما، مشخص شد که برای یون‌های منیزیم نیز مانند کلسیم، سه جایگاه اتصال یکسان و مستقل وجود دارد و اتصال دو یون منیزیم به پروتئین، پایداری گرمایی را افزایش می‌دهد [۵۹] ولی باز هم مقدار آن بطور کمی مشخص نبود و در این تحقیق، این برهمکنش را با توجه به تئوری جدید نیز بررسی کرده و با معرفی پارامترهایی، بطور کمی میزان پایداری پروتئین را در نتیجه‌ی برهمکنش با یون منیزیم ارائه نموده و به این نتیجه رسیدیم که یون منیزیم در غلظت‌های کم پروتئین را غیرفعال

[1] - Circular Dichroism

نمی‌کند و روی پایداری هورمون رشد، تأثیر منفی نمی‌گذارد، ولی در غلظت‌های بالا، پایداری پروتئین را به مخاطره می‌اندازد [۲۹] و مزیت این تئوری جدید، در مقابل روش‌های دیگر این است که علاوه بر آنکه نتایج روش‌های دیگر را تایید می‌کند، در ضمن با معرفی پارامترهایی، در مورد میزان پایداری یا فعالیت زیستی پروتئین بطور کمی نظر می‌دهد.

در برهمکنش یون نیکل و هورمون رشد [۲۶]، با استفاده از تئوریارائه شده و پارامترهای مربوطه، به این نتیجه رسیدیم که مقدار کمی از Ni^{+2}، پروتئین را ناپایدار می‌کند و ساختمان هورمون رشد را به هم می‌ریزد، نیکل یک فلز سمی است و می‌تواند ساختمان هورمون را تخریب کند، که بطور تجربی نیز ثابت شده است.

در برهمکنش آهن (III) با هورمون رشد انسانی [۱۰]، نتایج بدست آمده با طیف بینیUV، نشان می‌دهد که تقلیب گرمایی هورمون رشد برگشت‌ناپذیر است، به جز در نسبت مولی $\frac{۶}{۸}$ مول آهن به مول پروتئین، که این نسبت مولی مطابق با $V=۳$ ، بوده که می‌تواند بیانگراین باشد که سه یون آهن مانع تجمع هورمون رشد می‌شوند.

نقش $Fe^{+۳}$ در جلوگیری از تجمع ممکن است، اثری روی آبگریزی پروتئین داشته باشد، که نتایج ایزومر پیوندی هم نشان می‌دهد که یون‌های آهن تأثیر قابل توجهی روی آبگریزی دارند و طیف هورمون رشد در حضور یون آهن نشر بلندتری از هورمون رشد در غیاب یون آهن دارند، که این نتایج بطور کمی از تئوری ارائه شده قابل درک است. برحسب تمایل پیوند به هورمون رشد، به ترتیب از یون‌های روی، مس، آهن، منیزیم، کلسیم به غیر از مس و نیکل که پایداری را کاهش می‌دهند [۵۷] می‌توان در صنایع دارویی استفاده کرد.

در برهمکنش آلبومین سرم انسانی با یون نیکل، که توسط کالریمتری تیتراسیونی همدما انجام شد، یک گروه از جایگاه‌های پیوندی یکسان و مستقل ۸ تایی برای یون‌های نیکل وجود دارد، در این برهمکنش تنها هدف بدست آوردن تعداد جایگاه‌های پیوندی، K_d و ΔH بود که با استفاده از

روش‌های مختلف، نتایج خام حاصل از کالریمتری را آنالیز کرده و به مقادیر K_a و ΔH رسیدند و بحثی در ارتباط با پایداری نبود.

برهمکنش یون‌های مس (II) با کربونیک انهیدراز [۲۵]، که این مطالعه توسط کالریمتری تیتراسیونی همدما، دورنگ نمایی حلقوی وطیف بینی UV مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که سه جایگاه پیوندی متفاوت غیریکسان برای یون مس (II) روی پروتئین وجود دارد و اتصال Cu^{+2} به پروتئین باعث تغییرات کوچکی در ساختمانهای دوم و سوم آنزیم می‌شود که آشکار نیست، ولی باعث کاهش در فعالیت و پایداری آنزیم می‌شود، که این نتیجه را از روی نموداری که براساس درصد فعالیت نسبی آنزیم در فقدان و در حضور غلظت‌های متفاوت Cu^{+2} بود، این نتیجه بدست آمد و دیده شد، که در نتیجه برهمکنش یون مس (II) با کربونیک انهیدراز، فعالیت پروتئین کاهش می‌یابد، بطوری که در غلظت‌های بالای Cu^{+2} فعالیت آنزیم بسیار کم شد، ولی بطور کمی این مقدار فعالیت مشخص نشد.

در مطالعات ترمودینامیکی پروتئین بازی میلین، برهمکنش آن با یون‌های روی، مس (II) و کلسیم کالمودولین[1] [۵۷و۱۸و۱۹]جهت کسب اطلاعات بیشتر در رابطه با میزان اتصال، قدرت و آنتالپی پیوند و همچنین میزان برهمکنش بین جایگاه‌های پیوندی با کمک روش‌های مختلف طیف-بینی، دیالیز تعادلی و کالریمتری تیتراسیونی همدما بررسی شد. البته با استفاده از نتایج بدست آمده در روش‌های فوق، مانند ثابت پیوند و تغییرات جذب در نتیجه‌ی برهمکنش، می‌توان اثر یون‌ها را به طور تقریبی برروی پایداری پروتئین‌ها نشان داد و یا بطور تقریبی مشخص کرد که یون روی قویتر از سایر یون‌های فلزی، به پروتئین بازی میلین[2] متصل می‌شود، ولی این روش قادر نیست بطور کمی این اثر را بررسی کند. مثلاً در برهمکنش یون کلسیم- کالمودولین [۵۷] که توسط روش UV یا فلوئورسانس بررسی شده، برهمکنش ضعیف را با توجه به تغییرات بسیار کم در جذب پروتئین بازی

[1] - Ca^{2+}-Calmodulin
[2] - Myelin Basic Protein