بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

گرایش بیوشیمی

عنوان:

مطالعه خصوصیات بیوشیمیایی ترمولیزین

از:

محسن عیسی‌زاده زارع

استاد راهنما:

دکتر سیدمحسن اصغری

استاد مشاور:

دکتر مجید تقدیر

مهر ۱۳۹۲

تقدیر و تشکر:

اکنون که بالطف خداوند موفق به گذراندن این دوره از تحصیل و نگارش این پایان نامه شدم، بر خود لازم می دانم کمال تقدیر و تشکر خود را ابراز کسانی کنم که در این مسیر پرفراز و نشیب لحظه ای از راهنمایی، پشتیبانی و تشویق من دریغ نکردند.

از استاد راهنمای فرهیخته و بزرگوارم آقای دکتر سید محسن اصغری که تمام روزهایی که تحت نظارت این بزرگوار مشغول به کار بودم سرشار از آموختن توامان علم و اخلاق بود، نهایت تشکر را دارم. همچنین از استاد مشاور گرامی آقای دکتر مجید تقدیر به خاطر تمام حمایت ها و راهنمایی هایشان کمال تشکر و قدردانی را دارم. در پرتو روحیه پر از امید این اساتید بزرگوار بود که تمام دلسردی ها رنگ می باخت و در سایه وجود همتی نایذیرشان، پرسش های گاه و بی گاهم پاسخ می یافت. آموختن نحوه انجام یک کار تحقیقاتی مؤثر در کنار لذت بردن از کار گروهی بدون شناخت این بزرگواران امکان پذیر نبود و بی شک این آموخته ها در زندگی نیز بسیار به کارم خواهد آمد.

از اساتید بزرگوار خانم پروفسور ریحانه سریری که حمایت ها و محبت های ایشان همواره شامل حال من و دوستانم بوده و آقای دکتر محمودرضا آقامعالی که با وجود مشغله های فراوان، زحمت داوری و بازخوانی پایان نامه را تقبل کردند و همچنین آقای دکتر بهروز حیدری نماینده محترم تحصیلات تکمیلی دانشکده کمال تشکر را دارم.

بر خود لازم می دانم از زحمات دیگر اساتید فرهیخته و محترم گروه بیوشیمی جناب آقای دکتر رضا حسن ساجدی و جناب آقای دکتر حسین غفوری که افتخار شاگردی ایشان را داشتم و نیز کارشناسان محترم گروه زیست شناسی خانم ها هادوی و شایگان قدردانی کنم.

از همکار گرامی خانم عصاره به خاطر همکاری ها و بزرگواری هایشان کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از تمام همکلاسی ها و دوستان خوبم، خانم ها جمال زاده، ابراهیمی، صدر ممتاز، حقدوست، تراضی، محمدپور، ایرانی، وحدتی، تنکلو، قربانی، جهانگیری زاده، قلندری و آقایان وارسته، رحمانی، محسنی، رحیمی، بقری، جعفری پور، لقمان نیا و سایر دوستان که همچون خواهران و برادران مهربان همیشه یار و یاور من بودند کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

در پایان آرزوی طول عمر همراه با عزت، سعادت و سلامت برای همه این عزیزان از خداوند بزرگ مسئلت دارم.

محسن عیسی زاده

پاییز ۹۲

فهرست مطالب

چکیده فارسی ..... د

چکیده انگلیسی ..... ذ

فصل اول: مقدمه ۱

۱- ۱ آنزیم‌ها در حلال‌های آلی ۲

۱- ۱- ۱ فواید و مضرات استفاده از آنزیم‌ها در سیستم‌های حلال‌های آلی ۳

۱- ۲ پایداری پروتئین ٤

۱- ۲- ۱ پایداری، فولدینگ و واسرشتگی پروتئین‌ها ۵

۱- ۳ ارتباط مابین پایداری و فعالیت پروتئین‌ها ۷

۱- ٤ پروتئازها ۸

۱- ٤- ۱ متالوپروتئازها ۱۰

۱- ٤- ۱- ۱ خانواده ترمولیزین (TLPs) ۱۰

۱- ٤- ۱- ۱- ۱ اتصال کلسیم به پروتئازهای خانواده ترمولیزین ۱۱

۱- ٤- ۱- ۱- ۲ اهمیت کلسیم در پایداری آنزیم‌های خانواده ترمولیزین ۱٤

۱- ٤- ۱- ۱- ۳ ویژگی پپتیدازهای خانواده ترمولیزین ۱٤

۱- ٤- ۱- ۱- ٤ کاربردهای صنعتی آنزیم‌های خانواده ترمولیزین ۱۵

۱- ٤- ۱- ۱- ۵ ترمولیزین ۱۵

۱-٤-۱-۱-۵-۱ جایگاه کاتالیتیکی ترمولیزین و موتیف HEXXH ۱۸

۱-٤-۱-۱-۵-۲ مکانیسم واکنش ترمولیزین ۲۰

۱- ۵ هدف از تحقیق ۲۱

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۲۲

۲- ۱ تجهیزات مورد استفاده ۲۳

۲- ۲ مواد شیمیایی مورد استفاده ۲۳

۲- ۳ سنجش فعالیت کازئینولیتیک ۲۳

۲- ۳- ۱ منحنی استاندارد ۲۳

۲- ٤ سنجش فعالیت با استفاده از سوبسترای FAGLA ۲٤

۲- ۵ سنجش فعالیت در حضور و عدم حضور حلال‌های آلی ۲۵

۲- ٦ مطالعات سینتیک آنزیمی ۲۵

۲- ۷ بررسی غیرفعال‌سازی حرارتی برگشت‌ناپذیر (Irreversible thermoinactivation) ۲٦

۲- ۷- ۱ محاسبه کمی پایداری حرارتی به صورت میزان فعالیت باقیمانده و $t_{1/2}$ ۲۶
۲- ۷- ۲ محاسبات ترمودینامیکی حالت گذار واکنش دناتوراسیون ۲۶
۲- ۸ بررسی پایداری آنزیم در حضور دترجنت‌ها ۲۷
۲- ۹ بررسی پایداری آنزیم در حضور نمک ۲۷
۲- ۱۰ بررسی پایداری pH آنزیم ۲۷
۲- ۱۱ مطالعات فلورسانس ۲۷
۲- ۱۱- ۱ مطالعات فلورسانس ذاتی ۲۷
۲- ۱۱- ۲ مطالعات خاموش‌کنندگی دینامیک فلورسانس ۲۸
فصل سوم: نتایج **۲۹**
۳- ۱ بررسی فعالیت و پایداری ۳۰
۳- ۱- ۱ اثر کلسیم بر روی دمای بهینه و پایداری حرارتی ۳۰
۳- ۱- ۲ غیرفعال‌سازی حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم‌ها در حضور کلسیم در دماهای مختلف ۳۱
۳- ۱- ۲- ۱ نمودار آرنیوس و ترمودینامیک فرایند غیرفعال‌سازی حرارتی ۳۳
۳- ۱- ۳ بررسی پایداری pH آنزیم ۳۴
۳- ۱- ٤ بررسی پایداری در حضور دترجنت‌ها ۳۵
۳- ۱- ٥ بررسی پایداری آنزیم ترمولیزین در حضور غلظت‌های مختلف NaCl ۳۷
۳- ۱- ٦ اثر غلظت‌های مختلف حلال‌های آلی بر روی فعالیت ترمولیزین ۳۷
۳- ۱- ٦- ۱ فعالیت آنزیم ترمولیزین در حضور متانول ۳۸
۳- ۱- ٦- ۲ فعالیت آنزیم ترمولیزین در حضور اتانول ۳۹
۳- ۱- ٦- ۳ فعالیت آنزیم ترمولیزین در حضور ایزوپروپانول ٤۰
۳- ۱- ٦- ٤ فعالیت آنزیم ترمولیزین در حضور اتیلن گلیکول ٤۱
۳- ۱- ٦- ٥ فعالیت آنزیم ترمولیزین در حضور گلیسرول ٤۲
۳- ۱- ٦- ٦ فعالیت آنزیم ترمولیزین در حضور دیمتیلفرمامید ٤۳
۳- ۱- ۷ مطالعات سینتیکی آنزیمی در حضور و عدم حضور حلال‌های آلی مختلف ٤۳
۳- ۱- ۷- ۱ تعیین K_m و V_{max} در عدم حضور حلال آلی ٤٤
۳- ۱- ۷- ۲ تعیین K_m و V_{max} در حضور حلال آلی متانول ٤٥
۳- ۱- ۷- ۳ تعیین K_m و V_{max} در حضور حلال آلی اتانول ٤٦
۳- ۱- ۷- ٤ تعیین K_m و V_{max} در حضور حلال آلی ایزوپروپانول ٤۷
۳- ۱- ۷- ٥ تعیین K_m و V_{max} در حضور حلال آلی اتیلن گلیکول ٤۸

۳- ۱- ۷- ٦ تعیین K_m و V_{max} در حضور حلال آلی گلیسرول ٤۹
۳- ۱- ۷- ۷ تعیین K_m و V_{max} در حضور حلال آلی دی‌متیل‌فرمامید ۵۰
۳- ۱- ۷- ۸ تعیین غلظت آنزیم ۵۱
۳- ۱- ۸ تعیین K_m و V_{max} ترمولیزین در حضور و عدم حضور کلسیم با استفاده از سوبسترای FAGLA ۵۲
۳- ۲ مطالعات فلورسانس ذاتی ۵٤
۳- ۲- ۱ فلورسانس ذاتی ترمولیزین در غلظت‌های مختلف $CaCl_2$ ۵٤
۳- ۲- ۲ فلورسانس ذاتی ترمولیزین در غلظت‌های مختلف NaCl و در حضور و عدم حضور کلسیم ۵۵
۳- ۲- ۳ فلورسانس ذاتی ترمولیزین در غلظت‌های مختلف اوره و در حضور و عدم حضور $CaCl_2$ ۵۵
۳- ۲- ٤ فلورسانس ذاتی ترمولیزین در غلظت‌های مختلف SDS و در حضور و عدم حضور $CaCl_2$ ۵٦
۳- ۲- ۵ فلورسانس ذاتی ترمولیزین در pH های ۳ و ۷ و در حضور و عدم حضور $CaCl_2$ ۵٦
۳- ۳ مطالعات خاموش‌کنندگی فلورسانس توسط آکریلامید در حضور و عدم حضور NaCl و $CaCl_2$ ۵۷
فصل چهارم: بحث **۵۸**
٤- ۱ دمای بهینه و پایداری حرارتی ۵۹
٤- ۲ پایداری در برابر SDS ٦۰
٤- ۳ فعالیت و پایداری در برابر اوره ٦۰
٤- ٤ فعالیت و پایداری در برابر NaCl ٦۱
٤- ۵ پایداری در برابر pH اسیدی ٦۲
٤- ٦ پایداری در حلال‌های آلی ٦۲
٤- ۷ مطالعات سینتیکی آنزیم در حضور حلال‌های آلی ٦۲
٤- ۸ مطالعات سینتیکی آنزیم با استفاده از سوبسترای FAGLA ٦۳
٤- ۹ پیشنهادات ٦۳
منابع **٦٤**

فهرست اشکال

شکل ۱- ۱: ساختمان ترمولیزین به فرم روبان، دمین ۱ (آبی) و دمین ۲ (قرمز). کره آبی نشان‌دهنده یون روی جایگاه فعال است. ۱۱
شکل ۱- ۲: ساختمان ترمولیزین. جایگاه‌های اتصال کلسیم (Ca-binding site) ۱ تا ٤ با اعداد مربوطه نشان داده شده‌اند ۱۲
شکل ۱- ۳: یون‌های کلسیم ترمولیزین و لیگاندهای این یون‌ها. ۱۳
شکل ۱- ٤: نمایش شماتیک ویژگی سوبسترایی ترمولیزین و آنزیم های مشابه. ۱٤
شکل ۱- ۵: نمودارهای راماچاندران، انواع مطلوب زوایای چرخشی Φ و Ψ را برای جهت‌گیری آمینواسیدهای ترمولیزین (چپ) و دو هلیکس بزرگ اطراف جایگاه فعال (راست) نشان می‌دهند. ۱٦
شکل ۱- ٦: جایگاه کاتالیز، مولکول آب را در دو موقعیت نشان می‌دهد. ۱۷
شکل ۱- ۷: ساختار جایگاه فعال ترمولیزین که از داده‌های X-ray به دست آمده است. ۱۸
شکل ۱- ۸: مقایسه ساختاری تعدادی از Glu-zincin ها ۱۹
شکل ۱- ۹: الگوی فولدینگ موتیف HEXXH در فضای سه بعدی پروتئین ۲۰
شکل ۱- ۱۰: ساختمان جایگاه فعال ترمولیزین حاصل از داده‌های X-ray ۲۱
شکل ۲- ۱: منحنی استاندارد غلظت تیروزین. ۲٤
شکل ۳- ۱: محاسبه دمای بهینه در غلظت‌های صفر و ٤ میلی‌مولار $CaCl_2$ ۳۰
شکل ۳- ۲: غیرفعال‌سازی حرارتی آنزیم ترمولیزین در دماهای ۸۰ ، ۸۵ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد و در غلظت‌های صفر و ۲۰ میلی-مولار $CaCl_2$ ۳۲
شکل ۳- ۳: منحنی آرنیوس آنزیم ترمولیزین ۳٤
شکل ۳- ٤: اثر pH = ۳ بر روی فعالیت ترمولیزین در غلظت‌های صفر ، ۲ و ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ ۳۵
شکل ۳- ۵: اثر درصدهای مختلف SDS بر روی فعالیت ترمولیزین در غلظت های صفر و ۲۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ ۳٦
شکل ۳- ٦: اثر غلظت‌های مختلف اوره بر روی فعالیت ترمولیزین در غلظت‌های صفر و ۲۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ (سوبسترای کازئین) ۳٦
شکل ۳- ۷: اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر روی فعالیت ترمولیزین در غلظت های صفر و ۲۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ ۳۷
شکل ۳- ۸: درصد فعالیت باقیمانده در حضور متانول و در غلظت‌های صفر و ٤ میلی‌مولار $CaCl_2$ ۳۸
شکل ۳- ۹: درصد فعالیت باقیمانده در حضور اتانول و در غلظت‌های صفر و ٤ میلی‌مولار $CaCl_2$ ۳۹
شکل ۳- ۱۰: درصد فعالیت باقیمانده در حضور ایزوپروپانول و در غلظت‌های صفر و ٤ میلی‌مولار $CaCl_2$ ٤۰
شکل ۳- ۱۱: فعالیت باقیمانده در حضور اتیلن گلیکول و در غلظت‌های صفر و ٤ میلی‌مولار $CaCl_2$ ٤۱
شکل ۳- ۱۲: درصد فعالیت باقیمانده در حضور گلیسرول و در غلظت‌های صفر و ٤ میلی‌مولار $CaCl_2$ ٤۲
شکل ۳- ۱۳: درصد فعالیت باقیمانده در حضور DMF و در غلظت‌های صفر و ٤ میلی‌مولار $CaCl_2$ ٤۳
شکل ۳- ۱٤: منحنی مکائیلیس- منتن آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) ٤٤
شکل ۳- ۱۵: نمودار لینویور- برک آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) ٤٤
شکل ۳- ۱٦: منحنی مکائیلیس- منتن آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) و ۱۰٪ متانول ٤۵
شکل ۳- ۱۷: نمودار لینویور- برک آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) و ۱۰٪ متانول ٤۵
شکل ۳- ۱۸: منحنی مکائیلیس- منتن آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) و ۱۰٪ اتانول ٤٦
شکل ۳- ۱۹: نمودار لینویور- برک آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) و ۱۰٪ اتانول ٤٦
شکل ۳- ۲۰: منحنی مکائیلیس- منتن آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) و ۱۰٪ ایزوپروپانول ٤۷
شکل ۳- ۲۱: نمودار لینویور- برک آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) و ۱۰٪ ایزوپروپانول ٤۷
شکل ۳- ۲۲: منحنی مکائیلیس- منتن آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) و ۱۰٪ اتیلن گلیکول ٤۸

شکل ۳- ۲۳: نمودار لینویور- برک آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) و ۱۰٪ اتیلن گلیکول ٤٨
شکل ۳- ٢٤: منحنی مکائیلیس- منتن آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) و ۱۰٪ گلیسرول ٤٩
شکل ۳- ۲۵: نمودار لینویور- برک آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) و ۱۰٪ گلیسرول ٤٩
شکل ۳- ٢٦: منحنی مکائیلیس- منتن آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) و ۱۰٪ DMF ٥٠
شکل ۳- ۲۷: نمودار لینویور- برک آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف کازئین (W/V%) و ۱۰٪ DMF ٥٠
شکل ۳- ۲۸: منحنی مکائیلیس- منتن آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف FAGLA (mM) (بدون حضور $CaCl_2$) ٥٢
شکل ۳- ۲۹: نمودار لینویور- برک آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف FAGLA (mM) (بدون حضور $CaCl_2$) ٥٢
شکل ۳- ۳۰: منحنی مکائیلیس- منتن آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف FAGLA (mM) (در حضور $CaCl_2$) ٥٣
شکل ۳- ۳۱: نمودار لینویور- برک آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های مختلف FAGLA (mM) (در حضور $CaCl_2$) ٥٣
شکل ۳- ۳۲: طیف نشری آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های صفر و ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ ٥٤
شکل ۳- ۳۳: طیف نشری آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های صفر NaCl و $CaCl_2$، ۳ مولار NaCl و صفر $CaCl_2$، ۳ مولار NaCl و ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$، صفر NaCl و ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ ٥٥
شکل ۳- ٣٤: طیف نشری آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های صفر اوره و $CaCl_2$، ۳ مولار اوره و صفر $CaCl_2$، ۳ مولار اوره و ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$، صفراوره و ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ ٥٥
شکل ۳- ۳۵: طیف نشری آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های صفر SDS و $CaCl_2$، ۰/۱ درصد SDS و صفر $CaCl_2$، ۰/۱ درصد SDS و ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$، صفر SDS و ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ ٥٦
شکل ۳- ٣٦: طیف نشری آنزیم ترمولیزین در pH= ۳ و صفر $CaCl_2$، pH= ۷ و صفر $CaCl_2$، pH= ۳ و ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$، pH= ۷ و ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ ٥٦
شکل ۳- ۳۷: نمودار اشترن- ولمر برای خاموش‌کنندگی فلورسانس آنزیم ترمولیزین توسط آکریلامید ٥٧

فهرست جداول

جدول ۱- ۱: انواع فعالیت پپتیدازهای دودمان MA..... ۹
جدول ۱- ۲: فواصل کلسیم‌ها در ساختار ترمولیزین. اطلاعات از کد PDB، 1TLX به دست آمده است. ۱۳
جدول ۳- ۱: نیمه عمر غیرفعال‌سازی ($t_{1/2}$) آنزیم ترمولیزین در دماهای مختلف. ۳۳
جدول ۳- ۲: پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال سازی حرارتی آنزیم ترمولیزین در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد ۳٤
جدول ۳- ۳: پارامترهای سینتیکی در حضور و عدم حضور حلال‌های آلی ۵۱
جدول ۳- ٤: پارامترهای سینتیکی در حضور و عدم حضور $CaCl_2$ (سوبسترای FAGLA) ۵٤

فصل اول

مقدمه

۱- ۱ آنزیم‌ها در حلال‌های آلی

آب یکی از مهمترین ملکول‌ها برای حیات است و تنها در حضور آب زندگی می‌تواند وجود داشته باشد. همه ملکول‌های آلی ضروری برای حیات توسط فعالیت کاتالیتیک آنزیم‌ها در حضور آب تولید می‌شوند. آنزیم‌ها، که عملکردشان را به طور اساسی تحت شرایط ملایم به عنوان مثال دمای اتاق و فشار و حلال‌های طبیعی انجام می‌دهند، به شکل ویژه‌ای کاتالیز می‌کنند (۱). به علت ویژگی بالایشان، آنزیم‌ها برای استفاده در سنتز ترکیبات شیمیایی مخصوصا برای سنتز داروها، حدواسطهای کایرال و حدواسطهای بیوشیمیایی مطلوب‌اند. یکی از مهمترین ویژگی‌های مفید آنزیم‌ها این است که تحت شرایط آبی عمل می‌کنند. از نظر تجاری ترکیبات آلی مهم برخی اوقات در آب ناپایدارند و یا در آب غیر قابل حل‌اند. چنین ترکیبات آلی می-بایست در حلال‌های آلی سنتز شوند. به طور مشابهی، زمانی که سوبستراهای یک واکنش آنزیمی در آب غیر قابل حل‌اند انجام شدن واکنش در حضور حلال‌ها یا حلال آلی مطلوب است. سرعت واکنش به طور قابل ملاحظه‌ای توسط سوبستراهای حل شدنی افزایش یافته است. بنابراین آنزیم‌های هیدرولیتیک همچنین واکنش‌های سنتزی را کاتالیز می‌کنند، که معکوس واکنش‌های هیدرولیز و ترانس استریفیکاسیون در حضور حلال‌های آلی هستند (۲). زمانی که بخشی از آب در مخلوط واکنش توسط افزودن حلال آلی کاهش یافته است ممکن است معادله میانکنش برگشت پذیر بین هیدرولیز و سنتز به سمت سنتز پیش رود و تغییر یابد. آنزیم ها کونفورماسیونشان را از طریق میانکنش‌های بین ملکولی مانند میانکنش‌های آبگریز باقیمانده‌های آمینواسیدی حفظ می‌کنند. ملکول‌های آنزیم در محلول‌های آبی هر دو بخش آبدوست که در تماس با آب و دمین‌های آبگریز که در داخل ملکول فولد شده‌اند را دارا هستند. زمانی که قطبیت محیط اطراف ملکول‌های آنزیم توسط یک حلال آلی کاهش می‌یابد، دمین‌های آبگریز مستعد به در معرض قرارگیری شده، و در نتیجه منجر به واسرشته شدن آنزیم می-شود (۱, ۲).

کاربردهای صنعتی آنزیم‌ها می‌تواند به طور وسیعی به‌واسطه استفاده آنها در حلال‌های آلی نسبت به محیط آبی خنثی شان افزایش یابد. مطالعات ۱۵ سال اخیر نشان داده است که نه تنها این تغییرات در حلال‌های آلی ممکن است، بلکه همچنین به نظر می‌رسد در چنین محیط‌هایی آنها می‌توانند میانکنش‌هایی را که در محیط آبی کاتالیز آنها غیر ممکن است کاتالیز کرده و نیز پایدارتر شوند (۳). از جمله موارد ویژه در حلال‌های آلی می‌توان به انتخاب پذیری آنزیمی سوبسترا، گزینش پذیری

شیمیایی و فضایی، که می‌تواند به طور شاخصی تحت تاثیر قرار گیرد وحتی برخی اوقات توسط حلال‌های آلی برگردانده و معکوس می‌شود، اشاره کرد (٤, ٥). با تغییر محیط واکنش از آبی به آلی از بسیاری از واکنش‌های ناخواسته جلوگیری می‌شود. در اولین دیدگاه چنین جایگزینی غیر ممکن می‌آید. زیرا آنزیم‌ها و دیگر پروتئین‌ها ساختار طبیعی و فعالیت کاتالیتیک‌شان را در حلال‌های آلی از دست خواهند داد (٦)، اگرچه این آزمایشات در حضور محیط مخلوط آبی- آلی انجام می‌گیرد نه محیط صرفا آلی (٧)، زیرا آنزیم‌ها در فرم محیط فقط آلی دناتوره می‌شوند. آنزیم‌های موجود در محیط آلی نسبت به محیط آبی بیشتر محکم و تثبیت شده‌اند (٨). این استحکام می‌تواند نتیجه افزایش میانکنش‌های الکترواستاتیک و پیوند هیدروژنی میان باقیمانده‌های آمینواسیدی سطحی پروتئین در حلال‌های آلی باشد (٨, ٩). با وجود این استحکام و تثبیت، آنزیم‌ها در حلال-های آلی فعال باقی می‌مانند و این منجر به شمار کاربردهای فراوانی در صنایع شیمیایی، داروئی و پلیمر می‌شود. نظر به اینکه به علت استحکام ساختمان بیوکاتالیست‌ها، زمانی که در محیط حلال آلی قرار می‌گیرند ممکن است گزینش‌پذیری موقعیتشان در فضا (به عنوان مثال موقعیت انانتیومری و موقعیت ناحیه‌ای) تغییر یابد و افزایش فعالیت از طریق تیمار اولیه آنزیم با یک آنولوگ مهارکننده سوبسترا را به همراه داشته باشد (٨). این فرایند به عنوان نقش گذاری ملکولی[1] شناخته می‌شود. افزودن آب به مخلوط واکنش حلال آلی به طور موثری فعال کردن پدیده نقش گذاری آنزیم در محیط حلال آلی را پایین می‌آورد. زیرا هنگام افزودن آب یا آب دهی افزایش انعطاف پذیری آنزیم وجود دارد (١٠-١٣).

١- ١- ١ فواید و مضرات استفاده از آنزیم‌ها در سیستم‌های حلال‌های آلی

کاربرد سیستم‌های حلال‌های آلی برای واکنش‌های آنزیمی فواید بسیاری دارد (١٤)، اما مشکلات بسیاری نیز همچون غیر فعال سازی آنزیم‌ها را به دنبال دارد. از جمله فواید و مضرات استفاده از حلال‌های آلی در زیر آورده شده است.

فواید:

١) افزایش حلالیت سوبستراهای آبگریز

٢) محدوده وسیعی از واکنش‌های شیمیایی را کاتالیز می‌کند که در محیط آبی این امکان وجود ندارد و باعث می‌شود کـه معادله ترمودینامیکی سنتزشان مطلوبتر از هیدرولیز شود.

1. Molecular memory

۳) ممانعت از واکنش‌های زنجیره جانبی وابسته به آب

٤) تغییر ویژگی ناحیه‌ای و ویژگی فضایی سوبسترا

۵) برگرداندن و دوباره استفاده کردن از آنزیم‌ها حتی بدون تثبیت

٦) تغییر تفکیک سوبسترا و محصولات: مساعدت‌های جداسازی و بهبود محصولات اغلب پایداری دمایی را در سیستم-های آلی تقریبا بدون آب افزایش داده است.

۷) زدودن آلودگی‌های میکروبی

۸) عامل بالقوه‌ای برای آنزیم‌ها که بتوانند در فرایندهای شیمیایی به کار روند.

مضرات:

۱) غیر فعال سازی آنزیم‌ها

۲) آماده سازی پر هزینه و پر زحمت بیوکاتالیست‌ها در سیستم‌هایی که به شکل کوالان تغییر یافته‌اند.

۳) محدودیت انتقال جرم در مواردی که سیستم‌های غیریکنواخت و حلال‌های ویسکوز به کار می‌رود (مانند گلیسرول).

۱- ۲ پایداری پروتئین

سوال اساسی در تحقیقات پایداری پروتئین به دست آوردن اساس ترمودینامیک یا سینتیک افزایش مقاومت دمایی در دماهای بالا می‌باشد. اصطلاحاتی از قبیل پایداری حرارتی[1]، پایداری ترمودینامیکی[2] و پایداری سینتیکی[3] منجر به سوء تعبیر یا کاربرد غلط این اصطلاحات می‌شود. پایداری ترمودینامیکی، تفاوت انرژی آزاد ΔG حالت تاخورده و واسرشته در شرایط تعادلشان می‌باشد. فرض بر این است تبدیل حالت تاخورده/ واسرشته یک مدل دو حالته و برگشت پذیر است. پایداری سینتیکی وابسته به سرعت واسرشتگی و به صورت ثابت سرعت است که به سد انرژی حالت بین تاخورده/ واسرشته بستگی دارد (۱۵).

1. Thermostability
2. Thermodynamic stability
3. Kinetic.Stability

۱- ۲- ۱ پایداری، فولدینگ و واسرشتگی[1] پروتئین‌ها

تفاوت انرژی آزاد که تعیین کننده پایداری پروتئین‌هاست حدود ۵ تا ۱۵ کیلوکالری بر مول است. درحالیکه انرژی کل حالت‌های تاخورده و واسرشته در حدود چند میلیون کیلوکالری بر مول است (۱۶). تفاوت انرژی آزاد مابین پروتئین‌های تاخورده و واسرشته ناشی از مجموع تعداد زیادی از اندرکنش‌های ضعیف غیر کووالان در پروتئین تاخورده است. مهم‌ترین اندرکنش‌های پایدارکننده حالت تاخورده پروتئین‌ها عبارتند از تجمع مطلوب اندرکنش‌های آب گریز در داخل پروتئین، شبکه پیوندهای هیدروژنی و سایر اندرکنش‌های الکتروستاتیک. این نیروهای پایدارکننده در تعادل با نیروهای ناپایدارکننده هستند. مهم‌ترین عامل ناپایدار کننده حالت تا خورده، کاهش شدید آنتروپی ساختاری پروتئین به دنبال تاخوردگی است. تمام نیروهای مذکور تحت شرایط محیطی از قبیل دما و حلال هستند.

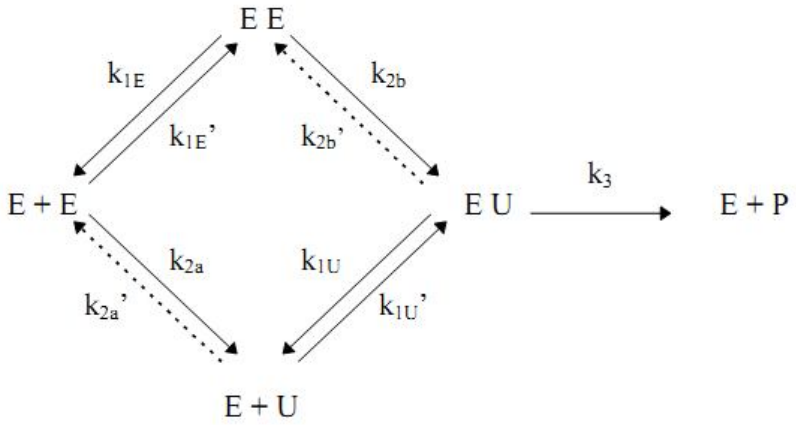
آشکار ساختن مکانیسم تاخورده و واسرشته شدن پروتئین‌ها در نتیجه آن پی بردن به ارتباط مابین ترادف آمینواسیدی، ساختمان و پایداری ازمهم‌ترین چالش‌ها در مطالعات ساختاری پروتئین‌ها است. یکی از مهم‌ترین مشکلات در مطالعه تاخوردگی و واسرشتگی پروتئین‌ها عدم اطلاع کافی از حالت‌های گذار[2] در مسیر واسرشتگی / تاخوردگی است که تنها توسط روش‌های غیر مستقیم قابل ردیابی و مطالعه‌اند.

پایداری پروتئین‌ها به معنی مقاومت آنها در برابر واسرشته شدن کامل[3] است. به مقاومت پروتئین‌ها در برابر واسرشته شدن[4] و دناتوراسیون[5] در دماهای بالا اصطلاحا پایداری حرارتی اطلاق می‌شود که هویتی ترمودینامیکی دارد.

به مقدار انرژی مورد نیاز برای القای "واسرشتگی تعاونی کامل"[6] پروتئین در شرایط برگشت پذیر پایداری ترمودینامیکی گفته می‌شود. بسیاری از پروتئین‌ها در دماهای بالا به سبب فرایندهایی از قبیل تجمع[7] به صورت برگشت پذیر واسرشته نمی-نمی‌گردند. اینگونه تصور می‌شود که فرایندهای واسرشتگی که موجب دناتوراسیون برگشت ناپذیر پروتئین‌ها می‌گردند اغلب ماهیتی نسبی (partial) و نه کلی (global) دارند و به صورت پایداری حرارتی بیان می‌گردند. پایداری حرارتی به صورت مقدار انرژی مورد نیاز برای القای برگشت ناپذیر ساختمان یا عملکرد پروتئین تعریف می‌گردد.

1. Unfolding
2. Transition state
3. Global unfolding
4. Unfolding
5. Denaturation
6. Cooperative global unfolding
7. Aggregation

در نتیجه فرایند اتولیز[1] رسم منحنی تاخوردگی/ واسرشتگی برای پروتئازهایی از قبیل خانواده ترمولیزین غیر ممکن است. این آنزیم‌ها در دماهای بالا به دنبال واسرشتگی نسبی اتولیز و به دنبال آن تجزیه می‌گردند. بنابراین در این آنزیم‌ها واسرشتگی کلی رخ نمی‌دهد. مکانیسم ملکولی غیر فعال شدن پروتئازهای خانواده ترمولیزین توسط Eijsink و همکاران (۱۷) بیان شده است. غیر فعال سازی عمومی پروتئازها در نتیجه اتولیز به صورت زیر رخ می‌دهد:



معادله ۱- ۱

در این رابطه E آنزیم طبیعی و فعال، U آنزیم واسرشته نسبی[2] و مستعد برای اتولیز، EE و EU کمپلکس آنزیمی هستند که یکی به عنوان سوبسترا عمل می‌کند و P آنزیم اتولیز و غیر فعال شده هستند. K_{IE} و K_{IU} به ترتیب سرعت اتصال / تجزیه‌ی EE و EU هستند و K_{2a} و K_{2b} به ترتیب سرعت واسرشتگی/ بازسرشتگی E و EE هستند. K_3 سرعت غیر فعال سازی آنزیم واسرشته است.

مطالعات صورت گرفته بر روی غیر فعال سازی حرارتی[3] پروتئازهای دارای "ویژگی عمل گسترده"[4] منجر به این نتیجه گیری شده است که غیر فعال سازی حرارتی پروتئازهای خانواده ترمولیزین (TLP ها) و سایر پروتئازها دارای ویژگی عمل گسترده، یک فرایند درجه اول است که طی آن فرآیندهای واسرشتگی موضعی درجه اول[5] (E→U) عامل محدود کننده سرعت[6] فرآیند است. مشاهداتی که این نتیجه گیری را در پی داشته‌اند عبارتند از:

1. Autolysis
2. Locally unfolded
3. Thermal inactivation
4. Broad specificity
5. First-order
6. Rate limiting

۱- E دچار برش آنزیمی نمی‌گردد بلکه فقط U بریده می‌شود.

۲- غیر فعال سازی مستقل از غلظت آنزیم صورت می‌گیرد.

۳- آزمایشات متعدد بر روی پروتئازها دارای ویژگی عمل گسترده نشان داده‌اند که سرعت غیر فعال سازی حرارتی مستقل از K_3 محدود کننده سرعت نیست.

همانگونه که اشاره شد تجزیه پروتئازها در نتیجه اتولیز در دماهای بالا یک واکنش درجه اول است که به صورت زیر می‌توان آن را نشان داد.

$$\frac{d[E]}{dt} = k_i[E]$$ معادله ۱- ۲

d[E] کاهش غلظت آنزیم، dt تغییرات زمان، k_i (معادل K_2 در معادله‌ی ۱) ثابت سرعت درجه اول کاهش غلظت E و [E] غلظت آنزیم فعال باقی‌مانده در هر لحظه از زمان است. معادله بالا نمایانگر اندازه گیری E_t بر علیه t و تایید کننده خصوصیت درجه‌ی اول فرایند غیر فعال سازی است. در مطالعات متعددی تایید شده است که غیر فعال سازی حرارتی پروتئازهای خانواده ترمولیزین و همچنین سایر پروتئازهای دارای "محدوده عمل وسیع" از نوع درجه اول می‌باشد (۱۷-۱۹).

۱- ۳ ارتباط مابین پایداری و فعالیت پروتئین‌ها

ارتباط توام ساختمان و عملکرد پروتئین تا حد زیاد به پایداری ترمودینامیکی آن وابسته است (۲۰). طی فرآیندهای تکاملی که می‌توانند بی اثر[1] یا تطابقی[2] باشند، موتاسیون‌هایی به دست می‌آیند که ممکن است بر عملکرد و / یا پایداری پروتئین اثر بگذارند. مثلا یک موتاسیون که عملکرد مطلوب جدیدی به پروتئین می دهد، اما پایداری پروتئین را به طور شدیدی کاهش می دهد، تثبیت نخواهد شد. ارتباط مابین اثر موتاسیون‌ها، عملکرد و پایداری پروتئین اثر بسیار زیادی بر دانش ما از روند تکامل و مهندسی پروتئین، طراحی و ایجاد آنزیم‌های جدید می‌گذارد.

معمولا رابطه معکوسی مابین بهبود عملکرد و پایداری آنزیم‌ها وجود دارد. مهمترین دلیل این مسئله آرایش باقیمانده‌های کاتالیتیک در جایگاه فعال آنزیم است. به چند دلیل استقرار باقیمانده‌های جایگاه فعال آنزیم از نقطه نظر پایداری پروتئین،

1. Neutral
2. Adaptive

نامطلوب است. باقیمانده‌های عملگر[1] که به طور معمول قطبی یا باردار هستند در شکاف‌های آبگریز پروتئین مدفون می‌باشند و حتی در مواردی بارهای همنام در مجاورت یکدیگر قرار گرفته‌اند. اغلب باقیمانده‌های کاتالیتیک دارای "زوایای نامطلوب در ستون فقرات"[2] می‌باشند. در نتیجه جایگزین نمودن زنجیره‌های جانبی کاتالیتیک می‌تواند به مقدار زیادی پایداری را بهبود بخشد. اما در عوض فعالیت آنزیمی را به شدت کاهش می‌دهد. برخی مشاهدات از قبیل یافتن باقیمانده‌هایی که بر هر دو بعد عملکرد و پایداری موثرند (۲۱-۲۳) و مواردی که طی آنها پایداری آنزیم بدون اثر نامطلوب بر فعالیت بهبود یافته، منجر به اصل مهمی تحت عنوان stability-function tradeoffs (رابطه ی معکوس مابین فعالیت و پایداری) شده است که بعدها به رابطه عکس مابین عملکرد جدید و پایداری تغییر یافت.

آنزیم‌ها توسط جهش‌هایی که ویژگی‌های سوبسترایی را تغییر می‌دهند به عملکرد جدیدی دست می‌یابند. این قابلیت به طور معمول با افزایش تمایل و سرعت واکنش بر علیه سوبسترا به‌دست می‌آید. این جهش‌ها در جایگاه فعال، اطراف آن یا حتی دومین و یا سومین لایه از باقیمانده‌های اطراف جایگاه فعال رخ داده و منجر به تغییر فعالیت آنزیم می‌گردند.

۱- ٤ پروتئازها

در سال ۱۹٤٦ Linus Pauling اولین شخصی بود که اصول پایه‌ای کاتالیز آنزیم را بیان کرد که چگونه یک آنزیم، سرعت واکنش شیمیایی را از طریق اتصال و پایدارسازی حالت گذار نسبت به حالت پایه سوبسترای اختصاصی افزایش می‌دهد (۲٤). حضور آنزیم‌ها می‌تواند سرعت واکنش زیستی را تا 10^{5} برابر افزایش دهد که این افزایش در محدوده 10^{9}-10^{3} برابر معمول‌تر است (۲۵). پروتئازها، گروه وسیعی از آنزیم‌های موجود در طبیعت هستند که دارای عملکردهای متنوعی می‌باشند. این آنزیم‌ها به طور اختصاصی هیدرولیز پیوندهای پپتیدی را کاتالیز می‌کنند. در ارگانیسم‌های پیشرفته‌تر، پروتئازها در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی مانند کنترل فشار خون، دفاع ایمنی، بهبود زخم و لخته‌شدن خون مشارکت می‌کنند (۲٤). پروتئازهای تعیین خصوصیت شده شامل خانواده‌های آسپارتیک پروتئازها، سیستئین‌پروتئازها، گلوتامیک‌پروتئازها، متالوپروتئازها، سرین-پروتئازها و ترئونین‌پروتئازها می‌باشند (۲٦). این کلاسبندی بر اساس ماهیت گروه عملکردی[3] موجود در جایگاه فعال است. همچنین پروتئازها براساس pH بهینه فعالیت خود، به سه گروه اسیدپروتئازها، پروتئازهای خنثی و آلکالین‌پروتئازها تقسیم

1. Functional
2. Unfavorable backbone angles
3. Functional group

می‌شوند. پروتئازها همچنین به دودمان‌های مختلفی نیز تقسیم‌بندی می‌شوند. یک دودمان[1] شامل پپتیدازهایی است که دارای منشأ تکاملی واحد می‌باشند. دودمان دربرگیرنده یک یا تعداد بیشتری خانواده است که دارای ارتباط تکاملی می‌باشند. این ارتباط می‌تواند به واسطه داشتن ساختارهای سوم مشابه، نوع باقیمانده‌های جایگاه فعال و یا توالی معمول موتیف‌های اطراف باقیمانده‌های کاتالیتیک باشد (۲۶). اکثر متالوپروتئازها دارای موتیف HEXXH متصل شونده به یون فلزی کاتالیتیک می‌باشند که در آنها X می‌تواند هر آمینواسیدی باشد. در آنزیم‌هایی که سومین لیگاند متصل به فلز، His، Glu یا Asp می‌باشد به عنوان دودمان MA طبقه‌بندی می‌گردند و همگی Zn متالوپروتئازها هستند. دودمان MA شامل انواع متالوپپتیدازهاست (جدول ۱– ۱). دودمان MA بزرگترین شاخه متالوپروتئازها می‌باشد که حاوی ۲۵ خانواده است. بعضی از این خانواده‌ها دارای اعضایی با موتیف متصل شونده به Zn، $\underline{H}EXX\underline{H}(X_n)\underline{E}$ می‌باشند، که n حداقل ۱٤ باقیمانده می‌باشد و باقیمانده‌هایی که زیر آنها خط کشیده شده است، لیگاندهای متصل شونده به روی می‌باشد. این پروتئازها به دلیل داشتن یک گلوتامیک اسید به عنوان لیگاند سوم، glu-zincin نیز خوانده می‌شوند. از آنزیم‌های معمول دارای موتیف متصل شونده به روی $HEXXH(X_n)E$ می‌توان به ترمولیزین (TLN) و متالوپروتئازهای باکتریایی مشابه (خانواده M4)، مایکولیزین (خانواده M5) کلاژناز *Clostridium* (خانواده M9)، هایکولیزین (خانواده M30) و فانکولیزین (خانواده M36) اشاره کرد. متالوپپتیدازهای خانواده M2، M4 و M13 بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.

جدول ۱– ۱: انواع فعالیت پپتیدازهای دودمان MA

آمینوپپتیداز A (M1, M61)
کربوکسی‌پپتیداز (M2, M32)
پپتیدیل دی‌پپتیداز (M2)
اولیگوپپتیداز (M3, M13)
اندوپپتیداز (M4, M10, M12 and others)

1. Clan

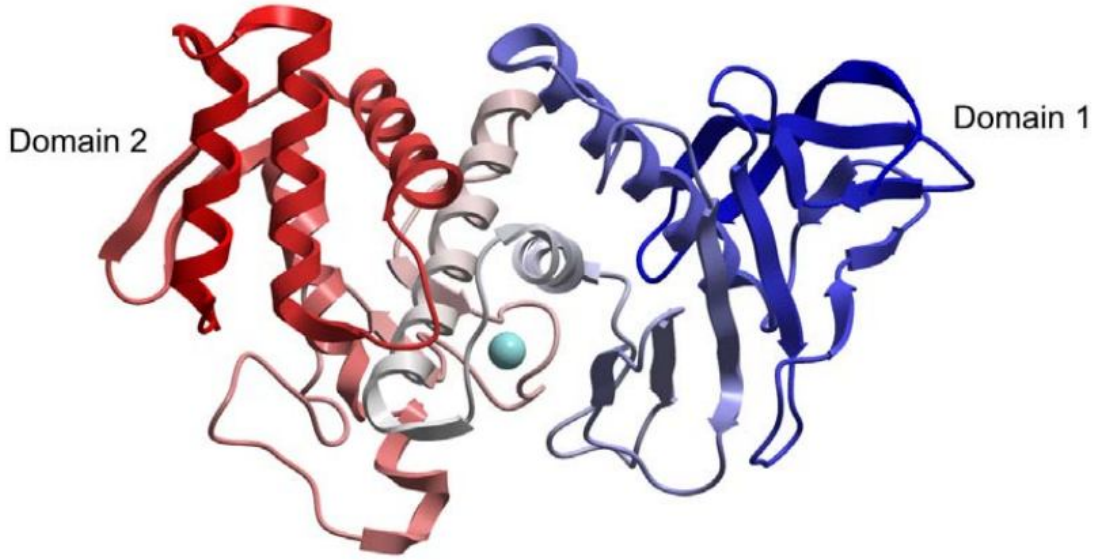
۱- ٤- ۱ متالوپروتئازها

متالوپروتئازهای دارای Zn^{2+}، فهرست وسیعی از پروتئازهای وابسطه به ساختار را تشکیل می‌دهند که به طور وسیعی در طبیعت وجود دارند. این آنزیم‌ها در واکنش‌های بیوشیمیایی بسیار مهم مانند گوارش (کربوکسی پپتیداز A، استاسین)، بازسازی بافت و تخریب ماتریکس خارج سلولی (متالوپروتئینازهای ماتریکسی، MMPها)، تنظیم فشار خون (نپریلیزین)، فرمیلاسیون[1] و دفرمیلاسیون[2] در سنتز پروتئین باکتریای (پپتید دفرمیلازها) و غیره مشارکت دارند (۲۷). در دهه‌های اخیر، پپتیدازهای حاوی روی که ساختار سه‌بعدی آنها شناخته شده است، توجهات زیادی را در زمینه طراحی دارو (۲۸, ۲۹) برای درمان یکسری از بیماری‌ها مانند بیماری‌های عفونی، فشار خون، حمله توموری، آرتروز و تخریب استخوان به خود جلب کرده‌اند. متالوپروتئازها بیشترین تنوع را در بین ۸ نوع اصلی پروتئازها، با ۷٦ خانواده شناسایی شده دارند (۲٦).

۱- ٤- ۱- ۱ خانواده ترمولیزین (TLPs)

خانواده‌ای است که از یکسری پپتیدازهای هومولوگ تشکیل شده است. پروتئین‌هایی که از نظر تکاملی از یک جد مشترک منشأ می‌گیرند، هومولوگ نامیده می‌شوند (۳۰). باوجوداینکه تشابه توالی آمینواسیدی در پروتئین‌های هومولوگ کمتر وجود دارد، ساختارهای سه‌بعدی این پروتئین‌ها در طی تکامل به طور قابل توجهی حفظ شده‌است، چونکه این ساختار مشترک، برای عمل اختصاصی پروتئین بسیار حیاتی است (۲٤). ترمولیزین به یک خانواده از متالوپروتئازها تعلق دارد که عمل شیمیایی آنها در pH خنثی انجام می‌گیرد (۳۱). این آنزیم یک اندوپپتیداز باکتریایی با وزن مولکولی ۳٤٦۰۰ است که دارای ۳۱٦ آمینواسید در تنها زنجیره پلی‌پپتیدی خود است (۳۲). ترمولیزین یک اندوپپتیداز است که این موضوع به طبیعت جایگاه فعال برمی‌گردد. در مقایسه با یک حفره عمیق در کربوکسی‌پپتیدازها ، ترمولیزین یک شکاف باز گسترده دارد که می‌تواند به زنجیره پلی‌پپتیدی سوبسترا متصل شود. این اتصال در هردوطرف پیوند پپتیدی که شکسته‌خواهدشد برقرار می‌شود (این پیوند، پیوند سیسیلی[3] نامیده می‌شود) (۳۲, ۳۳). این شکاف عریض، ترمولیزین را به دو دمین[4] بزرگ تقسیم می‌کند (شکل ۱- ۱).

1. Formylation
2. Deformylation
3. Scissile bond
4. Domain



شکل ۱- ۱: ساختمان ترمولیزین به فرم روبان، دمین ۱ (آبی) و دمین ۲ (قرمز). کره آبی نشان‌دهنده یون روی جایگاه فعال است.

خانواده ترمولیزین، خانواده پروتئاز M4 از دودمان MA متالوپروتئازهاست (۲۶). بقیه متالوپروتئازهای شبه ترمولیزین (TLPs) مانند نپریلیزین[1] (NEP) ، آنزیم مبدل آنژیوتنسین[2] (ACE) (۳۴) و آنزیم مبدل اندوتلین I[3] (ECE-I) (۳۵) سیستم قلبی‌عروقی در فیزیولوژی انسان را تنظیم می‌کنند. این آنزیم‌ها به خانواده M4 تعلق ندارند، اما شباهت مکانیکی و ساختاری زیادی با ترمولیزین و سایر متالوپروتئازها دارند. تعیین خصوصیت با سوبستراهای پپتیدی و HPLC نشان می‌دهد با وجود تنوع زیادی که در توالی آمینواسیدی اعضای این خانواده وجود دارد، خانواده M4 در مورد کاتالیز یک خانواده هوموژن[4] است (۳۶). بر اساس شباهت‌های جایگاه کاتالیتیکی که در بالا ذکر شد، ترمولیزین به عنوان یک آنزیم مورد آزمایش در شناخت میانکنش‌های مهارکننده با جایگاه فعال متالوپروتئازهای حاوی روی به کار می‌رود (۲۸, ۳۷).

۱- ٤- ۱- ۱- ۱ اتصال کلسیم به پروتئازهای خانواده ترمولیزین

به طور کلی باقیمانده‌هایی که در ترمولیزین به یون کلسیم متصل می‌شوند حفظ شده اند (۳۲). پیشنهاد می‌شود که همه TLPها حاوی دو جایگاه اتصال به کلسیم هستند (Ca1,Ca2). گونه‌های با پایداری حرارتی بالاتر احتمالا حاوی یک یا دو

1. Neprilysin
2. Angiotensin converting enzyme
3. Endothelin converting enzyme I
4. Homogeneous