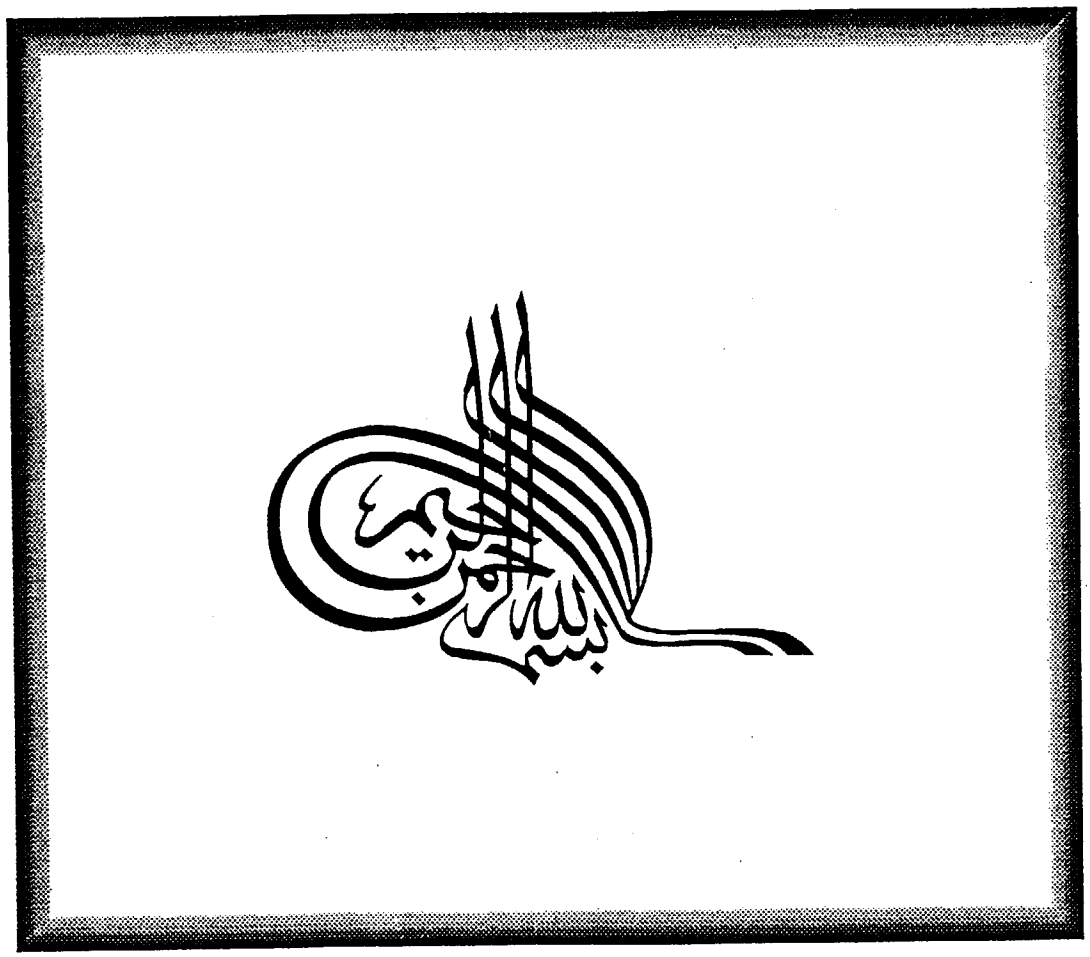

٢٤٩٩٠

دانشگاه تهران

مطالعه ترمودینامیکی برهم‌کنش آلبومین سرم انسانی با ۲و۲′-بی پیریدین گلایسینتو پالادیم(II) کلراید

توسط : علی اصغر شمسایی

استاد راهنما: جناب آقای دکتر علی اکبر صبوری

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد

در

بیوفیزیک

مرکز تحقیقات بیوشیمی – بیوفیزیک

3885/۲

اردیبهشت ۱۳۷۸

۲۶۹۹۰

********** خداوندا...

********** سپاس بی‌شمار تو را که قطره ناچیزی

********** از اقیانوس بیکران علم و اندیشه را

********** بر من بی‌مقدار ارزانی داشتی.

********** براستی که حمد و ثنا فقط تو را سزاست.

****

تقدیم به پدر بزرگوارم و مادر مهربانم

که هر چه دارم، از ثمره زحمت و تلاش آنهاست.

تقدیم به برادران عزیز و خواهر گرامی‌ام.

****

سپاس فراوان و بی‌نهایت از استاد ارجمندم:

جناب آقای **دکتر علی اکبر صبوری** که جهت تحقق این

پایان نامه از هیچ راهنمایی و کوششی فروگذار نبوده

و همواره از توجهات بی‌دریغ و راهنمایی‌های بی‌شمار

ایشان هم از نظر علمی و هم از نظر اخلاقی برخوردار بوده‌ام.

تشکر بسیار از استاد مشاور محترم:

جناب آقای **دکتر علی اکبر موسوی موحدی** استاد و ریاست

محترم مرکز که در این مدت از راهنمایی‌های بی‌دریغ ایشان

بهره‌مند شدم و نکات بسیاری از ایشان آموختم.

****

و با تشکر از استاد محترم:

جناب آقای **دکتر بیژن رنجبر** استاد محترم دانشگاه تربیت مدرس

که زحمت مطالعه و تصحیح و داوری این پایان‌نامه را برعهده گرفتند.

با سپاس فراوان از:

کلیه دوستان و همکاران آزمایشگاه بیوشیمی-فیزیک که در طول مدت کار در آزمایشگاه با فراهم نمودن محیطی صمیمانه و دوستانه، سختی‌های انجام کار را آسان نمودند و کمک بسیاری در پیشرفت انجام پایان نامه کردند.

****

وبا تشکر از:

اساتید و کادر محترم هیات علمی مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک دانشگاه تهران، همچنین کلیه پرسنل محترم این مرکز: مسوولین آموزش، مسوولین دبیرخانه و امور دانشجویی، مسوولین کتابخانه، عکاسی، زیراکس، کادر محترم فنی و تمامی عزیزانی که به‌نوعی، من را در انجام این پایان نامه یاری رسانده‌اند.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

خلاصه فارسی ..... الف

فصل اوّل- مقدمه ۱

۱- غیرطبیعی کردن پروتئین‌ها ۲

۱-۱- بررسی پایداری پروتئین‌ها ۲

۱-۲- روشهای غیرطبیعی نمودن پروتئین‌ها ۶

۱-۲-۱- غیرطبیعی شدن حرارتی ۷

۱-۲-۲- غیرطبیعی شدن سرمایی ۸

۱-۲-۳- غیرطبیعی شدن با تغییر pH ۸

۱-۲-۴- غیرطبیعی شدن پروتئین‌ها با گوانیدین هیدروکلراید و اوره ۹

۱-۲-۵- غیرطبیعی شدن پروتئین‌ها در مجاورت حلال‌های آلی ۹

۱-۲-۶- غیرطبیعی شدن پروتئین‌ها توسط نمک‌های غیرآلی ۹

۱-۲-۷- غیرطبیعی شدن پروتئین‌ها با مواد فعال سطحی ۹

۱-۲-۸- غیرطبیعی شدن توسط فشار ۱۳

۱-۳- ترمودینامیک برهم‌کنش لیگاند با ماکرومولکول ۱۳

۱-۳-۱- اتصال به یک مجموعه جایگاه مستقل و یکسان ۱۴

۱-۳-۲- اتصال به بیش از یک مجموعه جایگاه مستقل و یکسان ۱۴

۱-۳-۳- اتصال به مجموعه‌ای از جایگاههای یکسان و غیرمستقل ۱۵

۲- شیمی سرم آلبومین ۱۷
۲-۱ - منابع آلبومین ۱۸
۲-۲ - اهمیت زیستی سرم آلبومین ۱۸
۲-۳- ساختمان سرم آلبومین ۱۹
۲-۴- انعطاف پذیری کنفورماسیونی با تغییرات pH ۳۰
۲-۴-۱- انتقال N-F ۳۱
۲-۴-۱- انتقال F-E ۳۳
۲-۴-۱- انتقال N-B ۳۳
۲-۵- بررسی اثر حرارت بر ساختمان آلبومین ۳۴
۲-۶- بررسی خواص پیوند لیگاند ۳۶
۲-۶-۱- جایگاههای اول و دوم برای ترکیبات آلی کوچک ۳۷
۲-۶-۲- جایگاههای سوم و چهارم برای اسیدهای چرب با زنجیره‌های طویل ۴۴
۲-۶-۳- جایگاههای پنج و شش برای یون‌های فلزی ۴۹
۲-۷- غیرطبیعی شدن سرم آلبومین توسط عوامل شیمیایی ۵۲
۳-بررسی هدف و زمینه تحقیق ۵۵
فصل دوم- مواد و روشها ۵۹
۱- مواد مورد استفاده در این تحقیق ۶۰
۲- دستگاهها و تجهیزات به‌کار رفته ۶۰
۳- روشها ۶۱
فصل سوم- بحث و نتایج ۶۵
منابع- ۹۱
خلاصه انگلیسی

چکیده فارسی

برهم‌کنش بین سرم آلبومین انسان (HSA) و ۲و ۲′- بی‌پیریدین گلایسینتو پالادیم(II)کلراید، کمپلکس جدیدی با برخی خواص ضدسرطانی، توسط اسپکتروفوتومتری، دیالیز تعادلی، میکروکالریمتری تیتراسیونی همدما، در pH=7.0 (بافر فسفات 50 mM)، در دو دمای 300 و 310 K مورد تحقیق قرار گرفت. پیوند لیگاند در یک مجموعه جایگاه پیوندی و با تعاونی مثبت واقع می‌شود. مشخص شد که تعداد جایگاههای پیوندی (g)، معیار تعاونی پیوند (n_H) و ثابت ظاهری تجمعی پیوند (K_{app}) با بالا رفتن دما از 300 K به 310 K افزایش می‌یابند. آنتالپی پیوند لیگاند با استفاده از داده‌های پیوندی به‌دست آمده از دیالیز تعادلی، براساس تئوری پتانسیل پیوندی وایمن و معادله وانت‌هوف، محاسبه شد. آنتالپی مربوط به بازشدن ساختار آلبومین سرم انسانی با تفریق آنتالپی پیوند از آنتالپی اندازه‌گیری شده با میکروکالریمتری تیتراسیونی همدما (مجموع آنتالپی پیوند و بازشدگی پروتئین) تعیین شد. آنتالپی بازشدن در اثر پیوند ۲و ۲′- بی‌پیریدین گلایسینتو پالادیم(II)کلراید، $491.43\ kJ.mol^{-1}$ به‌دست آمد. مقادیر بزرگ و مثبت آنتروپی و آنتالپی مشاهده شده برای کمپلکس دارو-پروتئین، بیان می‌دارد که در دمای 300 K و pH=7.0 میانکنشهای بین دو ملکول، بیشتر از نوع نیروهای آب‌گریز هست تا الکتروستاتیک. حداکثر تغییر بنای فضایی ساختار HSA در دو دمای 300 و 310 K به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۱۹ و ۰/۱۴ میلی‌مولار دارو اتفاق می‌افتد.

منحنی تفکیک یون هیدروژن مربوط به HSA در حضور دارو، افزایش تعداد گروههای تیترشونده را در محدوده pH بین ۳/۵ تا هشت نشان می‌دهد که ممکن است ناشی از انتقال N-F در دومین‌های I و II سرم آلبومین باشد.

Research Publication:

1) A. A. Shamsaei, A. A. Saboury, A. A. Moosavi-Movahedi and H. Mansuri-Torshizi, "Human serum albumin binding studies of 2,2′ –bipyridineglycinato palladium (II) chloride", *43rd Annual Meeting of Biophysical Society*, Hall C, Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland, USA (13-17 Feb. 1999). *Biophysical Journal* **76**(1999), A101 (Su-Pos 408).

2) A. A. Saboury, A. A. Shamsaei, A. A. Moosavi-Movahedi and H. Mansori-Torshizi, "Thermodynamics of binding 2,2′–bipyridineglycinato palladium (II) chloride on human serum albumin", *Journal of the Chinese chemical Society*, submitted (1999).

3) A. A. Saboury, A. A. Shamsaei, H. Mansuri-Torshizi and A. A. Moosavi-Movahedi, "Thermodynamic studies of the interaction of human serum albumin with 2,2′–bipyridineglycinato palladium (II) chloride", *37th IUPAC Congress: Molecular Basis of the Life Sciences*, Berlin, Germany (Aug. 14-19, 1999).

4) A. A. Shamsaei, A. A. Saboury and H. Mansuri-Torshizi, "The effects of binding 2,2 '–bipyridineglycinato palladium (II) chloride on the structure of human serum albumin", *Third Iranian Biophysical Chemistry Seminar*, University of Tehran, Tehran (Feb. 23-25, 1999).

فصل اوّل
مقدمه

۱) غیرطبیعی کردن پروتئین‌ها

پروتئین‌ها یکی از اجزای مهم تشکیل‌دهندهٔ موجودات زنده محسوب می‌شوند. از نظر مولکولی، آنها دارای چندین نوع ساختمان هستند. ساختمان اول پروتئین‌ها مبتنی بر پیوندهای پپتیدی کوالانسی بین اسیدهای آمینهٔ مجاور هم است. در تشکیل ساختمان دوم، پیوندهای هیدروژنی نقش عمده و اصلی را دارند. فعالیت طبیعی و شکل فضایی (Conformation) در پروتئین‌هااز ساختمان سوم منشأ می‌گیرند که در ایجاد آن، انواع میانکنش‌های ضعیف مانند نیروهای آب‌گریز (Hydrophobic)، پل نمکی و پیوند هیدروژنی، شرکت می‌کنند. پروتئین‌های حاوی بیش از یک زیرواحد (Subunit)، دارای ساختمان چهارم هستند (۱).

عملکرد و فعالیت یک پروتئین و یا آنزیم به شرایط محیطی و وضعیت آنها بستگی دارد. به‌طوری که، با تغییر در برخی شرایط محیطی مانند دما، قدرت یونی، فشار و pH، فعالیت و عملکرد آنها، در پی تغییر شکل فضایی و ساختار، دچار دگرگونی می‌شود. پس بین عملکرد و ساختمان پروتئین‌ها باید رابطه اساسی موجود باشد. یکی از راههای شناخت این ارتباط، غیرطبیعی نمودن (Denaturation) پروتئین‌ها، با روشهای گوناگون است. غیرطبیعی شدن، فرآیندی است که بویژه در محیط‌های آبی انجام می‌شود و در طی آن، ساختمان فضایی به‌هم می‌ریزد، بدون این که در پیوندهای کوالانس ساختمان اول تغییری ایجاد شود (۲). غیرطبیعی شدن پروتئین‌ها می‌تواند به‌صورت برگشت‌پذیر یا برگشت‌ناپذیر باشد. در نوع برگشت‌پذیر، با حذف عوامل برهم‌زننده ساختار پروتئین یا اعمال شرایط محیطی طبیعی پروتئین‌ها، آنها می‌توانند ساختار و عملکرد طبیعی خود رابدست آورند. در نوع برگشت‌ناپذیر، عوامل غیرطبیعی کنندهٔ پروتئین منجر به تغییر شیمیایی و تغییر ساختارهای کوالانس می‌شوند، به‌طوری که پروتئین نمی‌تواند به ساختار و فعالیت اولیهٔ خود برگردد. غیرطبیعی شدن می‌تواند شدید یا ملایم باشد. همچنین، از قانون همه یا هیچ پیروی می‌کند و در طی آن آنتالپی شدیدا" افزایش می‌یابد (۳).

۱-۱) بررسی پایداری پروتئین‌ها

پایداری (Stability) یک پروتئین، یعنی ارزش آن به‌عنوان مولکول فعال زیستی، به شرایط ویژه‌ای که بر آن اعمال می‌شود، بستگی دارد. از دید مولکولی، دو تعریف متمایز از ثبات پروتئین‌ها وجود دارد.

پایداری کنفورماسیونی یا ترمودینامیکی که به مقاومت کنفورماسیونی پروتئین بسته شده (Folded)، در برابر شرایط غیرطبیعی کننده، مربوط می‌شود. پایداری طولانی-مدت یا سینتیکی که به بررسی مقاومت پروتئین بسته شده در برابر شرایط غیرفعال شدن برگشت‌ناپذیر می‌پردازد. ارتباط آنها به‌صورت زیر است :

$$N \underset{}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} U \xrightarrow{k} I \qquad (۱-۱)$$

در رابطهٔ فوق N حالت طبیعی، U حالت غیرطبیعی یا باز شده و I حالت غیرفعال شده برگشت‌ناپذیر را نشان می‌دهد. k ثابت سرعت برای فرآیند برگشت‌ناپذیر و K ثابت تعادل برای فرآیند برگشت‌پذیر است که به‌ترتیب با پایداری سینتیکی و ترمودینامیکی در ارتباط هستند (۴). بازشدن خیلی از پروتئین‌های کروی کوچک، به مکانیسم بسته شدن دوحالته (Two-State)، نزدیک است، یعنی از رابطهٔ زیر پیروی می‌کند :

$$N \rightleftharpoons D \quad ، \quad K = [D]/[N] \qquad (۱-۲)$$

البته در برخی از پروتئین‌های چنددومینی (Multi-domain) که دومین‌ها مستقل از هم باز می‌شوند، فرآیند غیرطبیعی شدن از مکانیسم فوق پیروی نمی‌کند. با پذیرفتن الگوی دوحالته در غیرطبیعی شدن پروتئین‌های کروی، می‌توان آن را یک فرآیند شدیداً متعاون (Cooperative) در نظر گرفت که با کل مولکول در ارتباط است. در این الگو فقط غلظت‌های کنفورماسیون طبیعی و غیرطبیعی شده، محسوس و برجسته هستند و از گونه‌های حد واسط می‌توان صرف‌نظر کرد. پس کسر پروتئین غیرطبیعی شده از رابطهٔ زیر محاسبه می‌شود :

$$F_d = (Y_N - Y_{obs})/(Y_N - Y_D) \qquad (۱-۳)$$

در این رابطه Y_{obs} شاخص قابل اندازه‌گیری پروتئین‌ها مانند شدت فلوئورسانس، Y_N و Y_D مقادیر همان شاخص در پروتئین طبیعی و غیرطبیعی شده است. اختلاف انرژی آزاد بین کنفورماسیونی پروتئین بسته و باز شده، از رابطهٔ زیر بدست می‌آید :

$$\Delta G = -RT \ln [F_d/(1 - F_d)] = -RT \ln [(Y_N - Y_{obs})/(Y_{obs} - Y_D)] \qquad (۴-۱)$$

در رابطهٔ فوق R و T به‌ترتیب ثابت عمومی گازها و دمای مطلق هستند. اغلب، تغییرات انرژی آزاد با غلظت غیرطبیعی کننده، به‌صورت خطی است (۵). از آنجایی که ثابت تعادل مؤثر (K^{eff}) با دما، فشار و فعالیت یونی تغییر می‌کند، سایر پارامترهای ترمودینامیکی را می‌توان حساب نمود (۳) :

$$K^{eff} = \frac{Y_{obs} - Y_N}{Y_D - Y_{obs}} \qquad \text{ثابت تعادل:} \qquad (۵-۱)$$

$$\Delta G^{eff} = -RT \ln K^{eff} \qquad \text{تغییر انرژی آزاد:} \qquad (۶-۱)$$

$$\Delta H^{eff} = RT^2 \frac{d \ln K^{eff}}{dT} \qquad \text{تغییر آنتالپی:} \qquad (۷-۱)$$

$$\Delta V^{eff} = -RT \frac{d \ln K^{eff}}{dP} \qquad \text{تغییر حجم:} \qquad (۸-۱)$$

$$\Delta \bar{v}^{eff} = \frac{d \ln K^{eff}}{d \ln a_i} \qquad \text{مقدار لیگاند پیوند شده:} \qquad (۹-۱)$$

پایداری پروتئین‌ها نتیجهٔ انواع مختلف میانکنش‌های درون پروتئینی است. دخالت هر کدام به‌صورت اختلاف انرژی آزاد بین حالت‌های طبیعی و غیرطبیعی شده بیان می‌شود. تغییر انرژی آزاد کل برای غیرطبیعی شدن پروتئین‌ها طبق رابطهٔ تنفورد (Tanford)، به‌صورت زیر است :