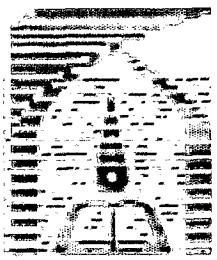
۳-۴۱

به نام خدا

۱۰۹۹۸۱

۸۷/۱/۱۰۸۷۷٤
۸۸/۲۱۵



دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پایه

رساله دوره دکتری بیوشیمی

بهبود فعالیت و پایداری پروتئاز باکتری بومی با روش جهش زایی هدفمند

سید محسن اصغری

۱۳۸۸ /۱/ ۱۷

استاد راهنما:

دکتر خسرو خواجه

اساتید مشاور:

دکتر حسین نادری منش

دکتر مجید صادقی زاده

دی ۸۷

۱۰۹۹۸۱

بسمه تعالی

دانشکده علوم پایه

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای **سیدمحسن اصغری** رساله واحدی خود را باعنوان: «**بهبود فعالیت و پایداری پروتئاز باکتری بومی با روش جهش‌زایی هدفمند**» در تاریخ ۸۷/۱۰/٤ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می کند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	آقای دکتر خسرو خواجه	دانشیار	
۲- استاد مشاور	آقای دکتر حسین نادری‌منش	استاد	
۳- استاد مشاور	آقای دکتر مجید صادقی‌زاده	دانشیار	
٤- استاد ناظر داخلی	آقای دکتر مجید عرفانی‌مقدم	استادیار	
٥- استاد ناظر داخلی	آقای دکتر سامان حسینخانی	دانشیار	
٦- استاد ناظر خارجی	آقای دکتر فریدون مهبودی	دانشیار	
۷- استاد ناظر خارجی	آقای دکتر ابوالفضل گلستانی	استادیار	
۸- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر سامان حسینخانی	دانشیار	

بسمه‌تعالی

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادّهٔ ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

مادّهٔ ۲ در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ بیوشیمی است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکدهٔ علوم پایه دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر خسرو خواجه، مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر حسین نادری منش و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر مجید صادری زاده از آن دفاع شده است.»

مادّهٔ ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهداکند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّهٔ ۴ در صورت عدم رعایت مادّهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس، تأدیه کند.

مادّهٔ ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّهٔ ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّهٔ ۶ اینجانب سید محسن اصغری دانشجوی رشته بیوشیمی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام‌خانوادگی: سید محسن اصغری

تاریخ و امضا:

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه:

با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت وکرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت‌علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان‌نامه/رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می‌باشد ولی حقوق معنوی پدیدآورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه / رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان‌نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می‌باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم‌افزار و یا آثار ویژه حاصل از نتایج پایان‌نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت‌رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱٥ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

تقدیم به همسرم

با سپاس از خداوند یکتا

که توفیق آموختن را به من ارزانی داشت

و با تشکر از

استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر خواجه

اساتید مشاور آقایان دکتر حسین نادری منش و دکتر مجید صادقی زاده

و تمام معلمان زندگیم که آموختن را به من آموختند.

چکیده

بهبود همزمان پایداری و فعالیت در آنزیم ها با دشواری های فراوانی روبرو است. فهم مکانیسم مناسبی برای بهبود همزمان این دو پارامتر از زمینه های مورد توجه در مطالعات بنیادی و کاربردی است. در این زمینه، مطالعات فراوان مهندسی پروتئین بر روی آنزیمهای خانواده ترمولیزین صورت گرفته است، زیرا این آنزیم ها از یک سو اهمیت فراوانی در صنعت دارند و از سوی دیگر مدل های ساختمانی مناسبی جهت مطالعات بنیادی بشمار می آیند. هدف از رساله حاضر بهبود همزمان فعالیت و پایداری در یک thermolysin-like protease حاصل از باکتری بومی *Salinovibrio proteolyticus* می باشد. بدین منظور هفت جهش نقطه ای با روش جهش زایی هدفمند طراحی شد و به انجام رسید. جهت دست یابی به بهترین واریانت، چهار جهش که موجب بهبود همزمان هر دو خصوصیت شدند، با یکدیگر ترکیب شدند. فعالیت آنزیم بدست آمده، در دمای بهینه عملکرد آنزیمی،باندازه ۵۰ برابر فعالیت آنزیم وحشی در دمای بهینه عملکرد آن بهبود یافت. همچنین در نتیجه افزایش تمایل جهش یافته چهارگانه به Ca^{2+} ساختاری، نیمه عمر غیر فعال سازی حرارتی ($t_{1/2}$) آنزیم بترتیب بمیزان ۲۰، ۲۴، ۶ و ۴ برابر در دماهای ۶۰، ۶۵، ۷۰ و ۷۵ درجه سانتیگراد افزایش یافت. مطالعات ساختاری انجام شده نشان دادند که جهش های صورت گرفته با تغییر در زاویه لولای مابین دمین های N- و C-ترمینال موجب تغییر فعالیت و پایداری آنزیمهای مهندسی شده می باشند. این نتایج امکان بهبود همزمان فعالیت و پایداری از یک منشأ ساختاری را به اثبات می رساند.

کلید واژه ها:

مهندسی پروتئین، جهش زایی هدفمند ،**پروتئاز** *Salinovibrio*، **بهبود فعالیت آنزیم**، **پایدارسازی آنزیم**، **منحنی آرنیوس**، hinge-bending.

فهرست

مقدمه ۱
مهندسی پروتئین ۲
۱-۱ استراتژی طراحی هدفمند ۳
۱-۲ جهش زایی هدفمند نقطه ای به کمک آنزیم DpnI ۵
۱-۳ Thermolysin-like proteases (TLPs) ۷
۱-۵ پایداری پروتئین ۱۰
۱-۵-۱ پایداری، فولدینگ و واسرشتگی پروتئین ها ۱۰
۱-۵-۲ مهندسی پایداری پروتئین ۱۶
۱-۵-۳ ارتباط مابین پایداری و فعالیت پروتئین ها: ۱۷
۱-۵-۴ بهبود همزمان پایداری و فعالیت پروتئین ۱۸
مواد و روش ها ۲۰
۲-۱ روش های مربوط به بیان ژن و تولید پروتئین نوترکیب ۲۱
۲-۱-۱ کلونینگ ژن پروتئاز ۲۱
۲-۱-۲ کشت باکتریهای *E. coli* حامل ژن ۲۱
۲-۱-۳ محیط کشت باکتری *E. coli* ۲۱
۲-۱-۴ ذخیره سازی طولانی مدت باکتری ها ۲۲
۲-۱-۵ تهیه سلول های مستعد به روش شیمیایی ۲۲
۲-۱-۶ انتقال پلاسمید به سلول مستعد ۲۴
۲-۲ مواد و روشهای استفاده شده در تخلیص پروتئاز ۲۵
۲-۲-۱ رزین مورد استفاده در تخلیص آنزیم ۲۵
۲-۲-۲ بافرهای لازم جهت دیالیز و تخلیص محلول آنزیمی ۲۵
۲-۲-۳ تغلیظ با استفاده از آمیکون ۲۵
۲-۲-۴ روش استفاده از رزین Q-Sepharose (HP) و تهیه ستون ۲۶
۲-۲-۵ سنجش پروتئین ۲۷
۲-۳ PCR و ایجاد جهش ۲۷
۲-۳-۱ پرایمرها ۲۷
۲-۳-۲ PCR ۲۹
۲-۳-۳ حذف DNA الگو حامل ژن وحشی ۲۹
۲-۳-۴ انتقال وکتور حامل ژن به *E. coli* ۲۹
۲-۳-۵ استخراج DNA پلاسمیدی ۳۰

۲-۳-۶ روش انجام الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز ۳۰
۲-۳-۷ تعیین ترادف ۳۱
۲-۴ مطالعات سینتیک آنزیمی ۳۱
۲-۴-۱ سنجش فعالیت ۳۱
۲-۴-۲ منحنی استاندارد ۳۲
۲-۴-۳ تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم ۳۳
۲-۵ منحنی وابستگی فعالیت به دما ۳۳
۲-۶ Double-mutant cycle analysis ۳۴
۲-۷ محاسبات ترمودینامیکی حالت گذار واکنش پروتئولیز ۳۵
۲-۸ بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر (Irreversible thermoinactivation) ۳۶
۲-۸-۱ محاسبه کمی پایداری حرارتی بصورت میزان فعالیت باقیمانده $t_{1/2}$ و T_{50} ۳۶
۲-۸-۲ محاسبه ثابت غیر فعال سازی ($k_{inactivation}$) ۳۷
۲-۹ محاسبات ترمودینامیکی حالت گذار واکنش دناتوراسیون ۳۷
۲-۱۰ مطالعه بر روی فعالیت و پایداری جهش یافته V۱۸۹P در حلالهای آلی ۳۸
۲-۱۰-۱ تعیین فعالیت آنزیم در حضور حلال های آلی ۳۸
۲-۱۰-۲ پایداری در حضور حلال های آلی ۳۸
۲-۱۱ پایداری pH ۳۹
نتـــایـــج ۴۰
۳-۱ مدل سازی مولکولی و طراحی جهش ها ۴۱
۳-۲ مطالعات سنیتیک آنزیمی ۴۷
۳-۳ Double-mutant cycle analysis ۵۲
۳-۴ وابستگی فعالیت ویژه به دما ۵۴
۳-۵ نمودار آرنیوس و حالت گذار واکنش پروتئولیز در واریانت های مختلف ۵۸
۳-۷ پایداری حرارتی واریانت های مختلف ۶۳
۳-۷-۱ غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم ها در دماهای مختلف ۶۴
۳-۷-۲ اهمیت کلسیم ساختاری در پایداری حرارتی واریانت ها ۶۷
۳-۸ تمایل (affinity) واریانت های پایدار به Ca^{2+} ۷۱
۳-۹ نمودار آرنیوس و ترمودینامیک فرایند غیر فعال شدن حرارتی ۷۳
۳-۱۰ اهمیت جهش V189P در لوپ در برگیرنده ی کلسیم بر پایداری و فعالیت در حضور حلال های آلی و پایداری در pH های مختلف ۷۶
۳-۱۰-۱ تاثیر جهش V189P بر فعالیت آنزیم در حلالهای آلی ۷۶
۳-۱۰-۲ تاثیر جهش V189P بر پایداری آنزیم در حلالهای آلی ۷۸
۳-۱۰-۳ تاثیر جهش V189P بر پایداری آنزیم در pH های مختلف ۷۹

بحث.. ۸۱
۴-۱ مطالعات سنیتیک آنزیمی ۸۲
۴-۱-۱ تاثیر جهش N143D در محل لولای ما بین دو دمین بر فعالیت آنزیم ۸۲
۴-۱-۲ تاثیر کلسیم بر سینتیک آنزیم ۸۳
۴-۱-۳ تعیین وابستگی موتاسیونها به یکدیگر ۸۵
۴-۱-۴ عوامل موثر بر افزایش فعالیت ۸۶
۴-۲ اثر جهش ها بر پایداری آنزیم ۹۱
۴-۲-۱ وابستگی فعالیت به دما ۹۱
۴-۲-۲ اهمیت جهش های ایجاد شده در پایدارسازی پروتئین ۹۲
۴-۲-۳ اهمیت جهش V189P در پایداری pH و در پایداری درحضور حلالهای آلی ۹۵
۴-۲-۴ بهبود همزمان فعالیت و پایداری آنزیم ۹۸
منابع ۱۰۱

۱

مقدمه

مهندسی پروتئین

مهندسی پروتئینی فناوری چند منظوره ای است که امکان دستورزی خصوصیات پروتئین ها را فراهم می سازد (۱). در سال های گذشته از این فناوری در مطالعات پایداری پروتئین، فولدینگ پروتئین و کاتالیز آنزیمی استفاده فراوانی شده است (۳و۲). آنزیمهای مهندسی شده در صنعت بسیار مورد توجه اند، زیرا با استفاده از فناوری مذکور آنزیم هایی با کارایی بالا[1] بدست می آیند که واجد خصوصیات مطلوبی از قبیل پایداری حرارتی، پایداری pH، کارایی کاتالتییک، ویژگی برای سوبسترا و ویژگی برای محصول می باشند (۴ و۵ و۶). در فرآیندهای صنعتی چندین مزیت دیگر هم برای آنزیمهای مهندسی شده وجود دارد. بعنوان نمونه، آنزیمهای پایدار این امکان را فراهم می سازند که واکنش ها در دماهای بالاتری صورت پذیرند که این خود موجب افزایش سرعت و راندمان واکنش، در مقایسه با دماهای پایین می گردد. همچنین این روش دانش ما را از ساختمان پروتئین ها افزایش داده است (۶ و ۷). بعنوان مثال این روش برای ما مکان هایی از ساختمان پروتئین که قابلیت ارتقای خصوصیت های کلیدی را دارند، آشکار می سازد. به منظور طراحی هدفمند، نیاز به دانش کافی پیرامون ساختمان و خصوصیات پروتئین داریم در ضمن روش جهش زایی هدفمند همیشه نتیجه مورد نظر را در پی ندارد. به همین جهت از روشهای کامپیوتری برای طراحی جهش ها بهر ه گیری می شود.

[1] High performance

۱-۱ استراتژی طراحی هدفمند[1]

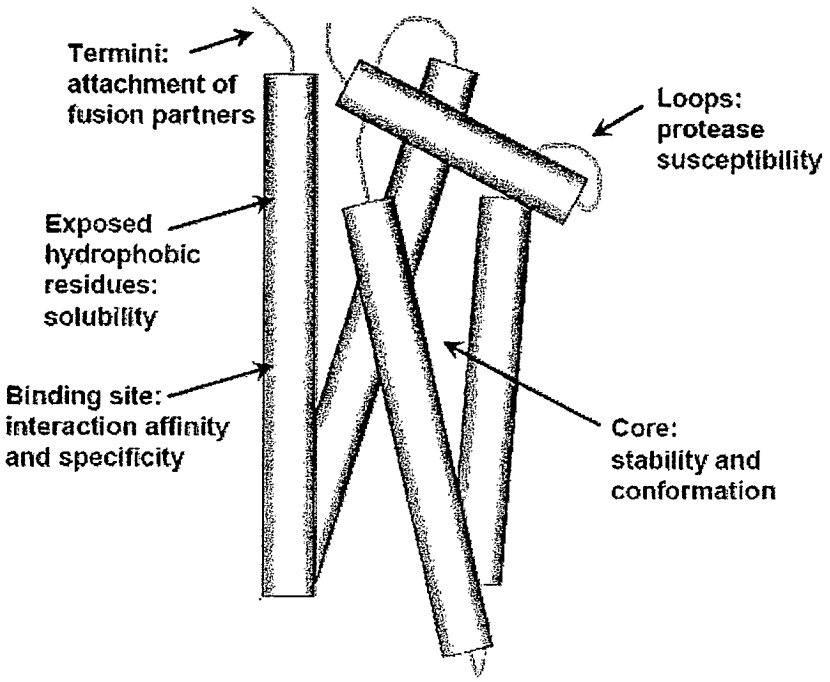
در این روش برای پیشگویی تغییرات مطلوب به اطلاعات دقیق پیرامون ساختمان و عملکرد پروتئین نیاز داریم. این تغییرات از طریق روش جهش زایی هدفمند نقطه ای[2] در پروتئین اعمال می گردد ساختمان های پروتئین تعیین شده و روش های کامپیوتری به تنهایی و یا باهم، به عنوان روشهای مکمل جهت طراحی جهش ها استفاده می گردد. اشکال اصلی در طراحی جهش ها پیشگویی اثرات گوناگون جهش ها بر ساختمان پروتئین، به ویژه اثرات مربوط به فواصل دور[3] است:

۱- انواع استراتژیها برای تغییر خصوصیات پروتئین از قبیل پایداری، ویژگی، حلالیت، وضعیت ساختاری، تمایل برای اتصال، وضعیت الیگومریزاسیون، انتخاب سوبسترا برای آنزیمها، حساسیت به پروتئازها، ایمنی زایی و فارماکوکینتیک مورد استفاده قرار می گیرند (شکل ۱-۱). مهمترین مکانیسم تغییر این خصوصیات دستورزی ساختمان اول (ترادف آمینواسیدی) و مودیفیکاسیون های شیمیایی هستند.

۲- نقطه ی آغاز برای طراحی هدفمند ساخت یک مدل مولکولی و یا ساختمان کریستالی است. سپس جهش ها در آزمایشگاه ایجاد شده و خصوصیات پروتئین طراحی شده بررسی می گردد. چنانچه نتایج آزمایشگاهی نامطلوب و یا با موفقیت جزئی توام گردید، دور جدید طراحی آغاز می گردد.

---

[1] Rational design
[2] Site-directed mutagenesis
[3] Long-range effects



شکل ۱-۱ انواع استراتژی هایی که جهت مهندسی پروتئین با هدفهای مختلف بکار می روند.

در صورت دسترسی به ساختمان سه بعدی و ترادف آمینو اسیدی پروتئین یکی از استراتژی های مورد استفاده به صورت ذیل معرفی می گردد.

۱- گردآوری اطلاعات موجود و بررسی دقیق پروتئین مورد نظر، پروتئین های مشابه و اعضای خانواده پروتئینی مورد نظر.

۲- جستجوی ترادف های مشابه و انجام multiple sequence alignment. لازم است به ساختمان دوم پروتئین توجه شود (برای یافتن بانک اطلاعاتی و روش های موجود می توانید به www.expasy.org رجوع کنید).

۳- ساختمان پروتئین مورد نظر را با انواع مشابه و اعضای خانواده پروتئینی مقایسه کنید، به دنبال خصوصیات جالب توجه باشید و ببینید که آیا

باقیمانده ها در شرایط بهینه ساختاری هستند یا خیر. همچنین بررسی کنید که آیا ساختمانهای مشابه از نظر خصوصیت (های) مورد نظر وضعیت بهتری دارند و اگر چنین است به دنبال خصوصیات ساختاری مسبب آن باشید.

۴- از برنامه های پیشگویی جهش ها استفاده کنید.می توانید بدین منظور از www.expasy.org/tools استفاده کنید.

۵- پروتئین را شبیه سازی کنید و نواحی هدف را در آن معین کنید. مثلا اگر هدف شما پایدار سازی پروتئین است، جهش هایی را طراحی کنید که فرایند های واسرشتگی را خنثی می کنند.

۶- جهش ها را مدل سازی کرده و اثرات مثبت و منفی آن ها را بر ساختمان بررسی کنید.

۷- جهش ها را در آزمایشگاه ایجاد نموده و خصوصیات آن ها را بررسی نمایید.

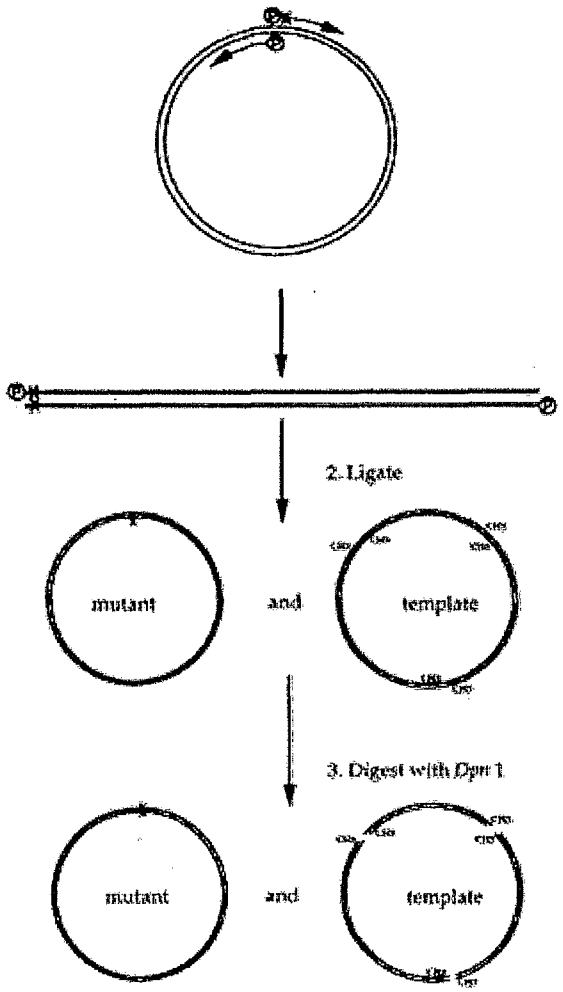
۸- جهش هایی که خصوصیات مطلوبی را در پی داشته اند با هم ترکیب کرده و این کار را تا دستیابی به بهترین خصوصیت ادامه دهید.

۱-۲ جهش زایی هدفمند نقطه ای[1] به کمک آنزیم DpnI

این روش توسط Weiner و همکاران در سال ۱۹۹۶ معرفی و به وسیله ی Fisher و همکاران در سال ۱۹۹۷ کامل تر شد (۸). در این روش در حالی جهش زایی صورت

[1] Site-directed mutagenesis

می گیرد که ژن در داخل وکتور جای دارد. این روش با وکتورهای بسیار متنوعی قابل انجام است. جهش زایی با استفاده از دو پرایمر و دریک PCR انجام می شود. با استفاده از این روش می توان کلونی های حامل جهش را در کمتر از ۴۸ ساعت و با راندمان ۸۰ درصد به دست آورد. آنزیم DNA پلیمراز مورد استفاده، *Pfu* و یا *Pwo* می باشد. حذف رشته های DNA الگو که در آنان جهش رخ نداده است (ژن وحشی) توسط آنزیم *Dpn*I صورت می گیرد. این آنزیم فقط DNA متیله را برش داده و حذف می کند. بدون استفاده از *Dpn*I میزان کارایی این روش به اندازه ۴۰ درصد کاهش می یابد.



شکل ۱-۲ مروری بر روش ایجاد جهش نقطه ای با استفاده از DpnI.

۳-۱ (TLPs) Thermolysin-like proteases

این دسته از پروتئازها متعلق به Zn Super family-متالوپروتئازها هستند. TLP ها یا Neutral پروتئازها توسط انواع باکتری ها تولید می شوند. عملکرد بهینه ی آنها در pH خنثی صورت می گیرد و دارای یک یون روی هستند که به جایگاه فعال آنزیم متصل بوده و برای فعالیت ضروری است. این خانواده از آنزیم ها در دو ناحیه در برگیرنده ی یون روی (Zn^{2+}) حفظ شده[1] هستند (۹). نخستین ناحیه، موتیف **HEXXH** و دومین ناحیه، GAXNEAFSD است. باقیمانده هایی که به صورت پر رنگ نشان داده شده اند و در شکل ۳ با اعداد ۱، ۵ و ۲۵ مشخص شده اند مکانهای حفظ شده ی متصل به اتم روی هستند.

NO.	1 5 25
Bacillus thermoproteolyticus (Thermolysin)	HELTHAVTDYTAGLIYQNESGAINEAISD
Bacillus stearothermophilus NP	HELTHAVTDYTAGLVYQMESGAINEAMSD
Bacillus cereus NP	HELTHAVTENSSNLIYQNESGALNEAISD
Bacillus subtilis NP	HEMTHGVTQETANLIYENQPGALNESFSD
Bacillus amyloliquefaciens NP	HEMTHGVTQETANLNYENQPGALNESFSD
Pseudomonas aeruginosa elastase	HEVSHGFTZQNSGLIYRGQSGGMNEAFSD
Legionella pneumophila protease	HZVSHGFTZQHSGLEYFGQSGGMNESFSD
Salinovibrio proteolyticus protease	HEVSHGFTEQNSGLVYRDMSGGINEAISD
Consensus	HEMTHGVTXXTAGLIYXNQSGAMHEAFSD

شکل ۳-۱ مقایسه ی محل اتصال کلسیم در اعضای خانواده ی ترمولیزین، ترادف های فوق همگی با موتیف HEXXH آغاز می شوند . باقیمانده های متصل به کلسیم با عدد مشخص شده و پر رنگ هستند. X و NP به ترتیب نشان دهنده ی باقیمانده های متغیر و Neutral Protease می باشند.

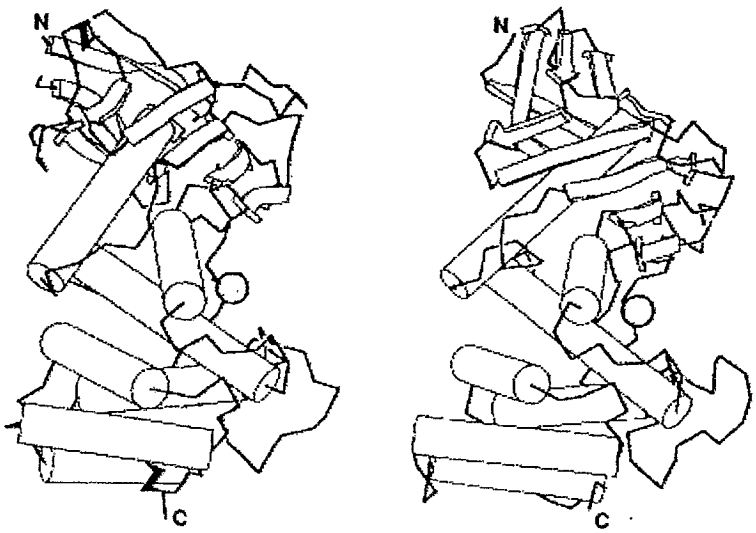
این خانواده از آنزیم ها تعداد متفاوتی کلسیم ساختاری دارند که در پایداری آنها حائز اهمیت است. انواع پایدارتر دارای ۴ یون کلسیم هستند (مانند ترمولیزین حاصل از باکتری

[1] Conserved

Bacillus thermoproteolytticus)، در حالیکه انواع ناپایدار تنها یک یون کلسیم ساختاری دارند (مانند الاستاز حاصل از *Pseudomonas aeruginosa* و پروتئاز مورد مطالعه در رساله ی حاضر). ترادف آمینو اسیدی و همچنین ساختار سه بعدی ترمولیزین در سال ۱۹۷۲ منتشر شد (۱۱و۱۰) و ساختار تعیین شده با اشعه X مربوط به TLP های حاصل از *Bacillus cereus* و *Pseudomonas aeruginosa* تعیین شده است (۱۵ و۱۴ و۱۳ و۱۲).

۱-۴ ناحیه hinge و اهمیت آن در فعالیت آنزیمهای خـانواده ترمولیزین

در آنزیم های خانواده ترمولیزین جایگاه فعال مابین دو دمین N-ترمینال و C-ترمینال واقع شده است. مقایسه ساختمان کریستالی الاستاز حاصل از *Pseudomonas aeruginosa* در دو قبل و بعد از اتصال به مهارکننده نشان داد که جایگاه فعال آنزیم در حالت غیر متصل "بازتر" از حالت متصل به مهار کننده می باشد. این تفاوت احتمال بروز تغییرات ساختاری طی فرایند کاتالیز را مطرح ساخت . از سوی تعیین ساختمان کریستالی پروتئاز حاصل از *B. cereus* آشکار ساخت که جایگاه فعال ترمولیزین بازتر است (۱۲ و۱۳ و ۱۴ و ۱۵). این جابجایی آشکار دمین ها نسبت به هم به hinge-bending موسوم است (۱۶ و ۱۷ و ۱۸). میزان hinge-bending در آنزیمهای مختلف خانواده ترمولیزین متفاوت است و بیشترین میزان آن باندازه ° ۱۶ مابین الاستاز و ترمولیزین مشاهده شده است (۱۶) (شکل ۱-۴).



شکل ۱-۴- مقایسه جایگاه فعال الاستاز (چپ) و ترمولیزین (راست). این شکل بخوبی آشکار می سازد که زاویه مابین دو دمین در ترمولیزین کمتر از الاستاز می باشد (شکل فوق از رفرنس ۱۳ اقتباس شده است.).

فرایند hinge-bending شامل چرخش یک دمین نسبت به دمین دیگر بوده و نتیجه "خم شدن" یک هلیکس بین دمینی می باشد (۱۹). این خمش بشکلی است که هلیکس مذکور در هنگام باز بودن "خم" و در حالت بسته "راست" می باشد. طی این تغییرات در الاستاز زنجیره جانبی ۵ آمینواسید در ناحیه مابین جایگاه فعال و هلیکس مذکور دچار تغییر ساختاری می شوند. Phe84 (مطابق با Phe91 در SVP)، Val104 (مطابق با Val111 در SVP)، Met120 (مطابق با Met127 در SVP)، Glu141 (مطابق با Glu148 در SVP) بمقدار زیاد و بمیزان کمتری در Val142 (مطابق با Val149 در SVP) دچار چرخش و یا جابجایی در محل خود می شوند. همچنین در باقیمانده های Met120، Glu143 و Leu144 در ترمولیزین تغییرات مشابهی را نشان داده اند (۱۹). در ساختمان بسته (متصل به سوبسترا)، Glu143 در ترمولیزین (مطابق با Glu141 الاستاز و Glu148 در SVP) با خم شدن امکان برقراری میانکنش با اتم نیتروژن گروه آمید و اکسیژن گروه کربونیل پیوند