





دانشگاه الزهراء (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته بیوشیمی

عنوان

بررسی کینتیکی اثر پلی آمین ها و دی آمین ها بر فعالیت و ساختار RNaseA

استاد راهنما

دکتر سیده زهرا موسوی نژاد

دانشجو

منا عموری

اسفند ماه ۱۳۹۰

کلیه دستاوردهای ناشی از این تحقیق
متعلق به دانشگاه الزهراء (س) است.

تقدیم به:

روح پاک پدرم که عالمانه به
من آموخت که چگونه در عرصه‌ی
زندگی ایستادگی را تجربه کنم
و به مادرم دریای بیکران
فداکاری و عشق که وجودم
برایش همه رنج بود و وجودش
برایم همه مهر.

سپاس خداوند را که نخستین
موجود است و پیش از او هیچ
نبود و آخرین موجود است و پس
از او هیچ نباشد.

سپاس فراوان تقدیم به استاد گرامی خانم
دکتر سیده زهرا موسوی نژاد که راهنمایی این
پروژه را بر عهده داشتند.

و نیز آقای دکتر مصطفی رضایی طاویرانی و
خانم دکتر پریچهر حناچی که زحمت داوری این
پایان نامه را عهده دار شدند.

و سپاس فراوان تقدیم به همه‌ی دوستان عزیزم
که در این طریق مرا یاری رساندند.

چکیده

ریبونوکلئاز A هم به عنوان آنزیم هم به عنوان پروتئین مدلی عالی برای مطالعات بیوفیزیکی می باشد. این آنزیم کوچک است و فرم بالغ آن که از سلول های پانکراس گاو ترشح می شود فقط ۱۲۴ اسید آمینه دارد. در این آنزیم اسید آمینه های تریپتوفان وجود ندارد اما دارای ۶ باقیمانده تیروزین است. از سوی دیگر آمین ها ترکیبات نیتروژنی آلیفاتیک هستند که در pH فیزیولوژیک بار مثبت دارند. این ویژگی به پلی آمین ها اجازه می دهد که با بار منفی ماکرومولکول های مانند DNA، RNA، پروتئین ها و فسفولیپیدها میان کنش بدهند و به این ترتیب در تنظیم ویژگی های فیزیکی و شیمیایی غشاها، ساختار و عملکرد نوکلئیک اسیدها و تنظیم فعالیت آنزیم ها دخالت داشته باشند. به این ترتیب پلی آمین ها در دامنه وسیعی از فرآیندهای تنظیمی مانند تحریک رشد، تقسیم سلول، تکثیر DNA و تمایز سلولی شرکت دارند. دی آمین پوترسین (Put)، تری آمین اسپرمیدین (Spd) و تترا آمین اسپرمین (Spm) پلی آمین های اصلی هستند که در سلول های زنده یافت شده اند.

در این پایان نامه اثر دی آمین ها و پلی آمین ها بر ساختار و فعالیت آنزیم RNaseA بررسی گردیده است. برای بررسی اثر آن ها بر فعالیت این آنزیم از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد و برای بررسی اثر آمین ها بر ساختار از روش اسپکتروفتومتری و هم چنین بررسی نمودار فلورسانس آنزیم استفاده گردید. نتایج نشان داد که به جز پوترسین، هیچ یک از دی آمین ها و پلی آمین ها در دامنه غلظتی به کار برده شده (صفر تا ۱۰۰ میلی مولار) تأثیر چشمگیری بر فعالیت آنزیم ندارد و در این میان فقط پوترسین است که به میزان بسیار زیادی فعالیت آنزیم را کاهش می دهد. هم چنین بررسی با روش اسپکتروفتومتری نشان داد که هیچ یک از این ترکیبات در همان دامنه غلظتی استفاده شده، بر ساختار آنزیم تأثیر قابل توجهی ندارند. اما بررسی طیف فلورسانس آنزیم در حضور آمین ها گویای این مطلب است که پوترسین تا حد زیاد و اسپرمیدین به میزان کمتر شدت فلورسانس آنزیم را کاهش می دهند.

به طور کلی هیچ یک از ترکیبات آمین دار به کار برده شده بر فعالیت و ساختار آنزیم ریبونوکلئاز A اثر زیادی ندارند به جز پوترسین که فعالیت آنزیم را شدیداً کاهش می دهد و این اثر، ناشی از میان کنش آن با آنزیم است و با سوبسترای آنزیم میان کنشی ندارد.

کلمات کلیدی: پلی آمین، دی آمین، ریبونوکلئاز A، ساختار، فعالیت.

فصل اول – مقدمه

۲	۱-مقدمه
۲	۱-۱-ریبونوکلئاز A
۲	۱-۱-۱-معرفی آنزیم ریبونوکلئاز A
۳	۱-۱-۲-آنزیم‌های همولوگ RNase A در انسان
۴	۱-۱-۳-ساختار آنزیم RNase A
۶	۱-۱-۴-ریبونوکلئاز S
۷	۱-۱-۵-پارامترهای مارپیچی (هلیکال)
۸	۱-۱-۶- α -متیل آمینواسیدها
۹	۱-۱-۷-پایداری و تاخوردگی (Folding) آنزیم
۱۰	۱-۱-۸-تأثیر ساختارهای Turn معکوس بر آنزیم
۱۱	۱-۱-۹-اتصال آنزیم به RNA
۱۱	۱-۱-۱۰-زیرجایگاه‌های آنزیم
۱۲	۱-۱-۱۱-سوبسترا ویژگی
۱۲	۱-۱-۱۲-انتشار تک بعدی
۱۲	۱-۱-۱۳-Processive catalysis
۱۲	۱-۱-۱۴-مکانیسم عمل آنزیم
۱۴	۱-۱-۱۵-Reaction energetic

- ۱۴-۱-۱-۱۶- ترانس فسفریلاسیون در مقابل هیدرولیز
- ۱۴-۱-۱-۱۷- بهبود در سرعت واکنش
- ۱۵-۱-۱-۱۸- فعال کننده‌های RNase A
- ۱۵-۱-۱-۱۹- مهارکننده‌های آنزیم
- ۱۶-۱-۱-۱۹-۱- مهارکننده‌های طبیعی RNase
- ۱۶-۱-۱-۱۹-۲- مهارکننده‌های RNase های وابسته به RNase A پانکراس
- ۱۷-۱-۱-۱۹-۳- Nucleotide Based RNase Inhibitors
- ۱۸-۱-۱-۱۹-۴- مهارکننده‌های غیرنوکلئوتیدی
- ۱۹-۱-۱-۲۰- تأثیر دما و گوانیدین هیدروکلرید بر فعالیت آنزیم
- ۲۱-۱-۱-۲۱- کاربرد RNase ها
- ۲۲-۱-۲- پلی آمین‌ها
- ۲۲-۱-۲-۱- معرفی پلی آمین‌ها
- ۲۳-۱-۲-۲- پلی آمین‌ها در گیاهان
- ۲۳-۱-۲-۳- پلی آمین‌ها و استرس در گیاهان
- ۲۴-۱-۳-۲-۱- استرس اکسیداتیو
- ۲۴-۱-۳-۲-۲- تغذیه معدنی
- ۲۴-۱-۳-۳-۲-۱- استرس نمکی
- ۲۴-۱-۳-۴-۲-۱- استرس سرما
- ۲۵-۱-۳-۵-۲-۱- آسیب مکانیکی

۲۵	۱-۲-۳-۶-اشعه‌ی UV
۲۶	۱-۲-۳-۷-استرس فلزات
۲۶	۱-۲-۳-۸-استرس اوزون
۲۶	۱-۲-۳-۹-پاراکوات
۲۷	۱-۲-۴-پلی آمین‌ها و نقش آن‌ها در بیماری‌ها
۲۷	۱-۲-۵-پلی آمین‌ها و سرطان
۲۸	۱-۲-۶-منابع تأمین پلی آمین‌ها در پستانداران

فصل دوم - مواد و روش‌ها

۳۱	۲-۱-مواد
۳۱	۲-۱-۱-مواد مورد استفاده برای تولید بافر
۳۱	۲-۱-۲-مواد به کاررفته در سنجش‌های آنزیمی
۳۲	۲-۲-دستگاه‌های مورد استفاده
۳۲	۲-۳-روش‌ها
۳۲	۲-۳-۱-تعیین اختلاف جذب سوپسترا و محصول در طول موج‌های مختلف
۳۳	۲-۳-۲-محاسبه‌ی اپسیلین سوپسترا و محصول
۳۳	۲-۳-۳-تعیین نمودار اشباع آنزیم
۳۳	۲-۳-۴-بررسی اثر دی و پلی آمین‌ها بر فعالیت آنزیم
۳۴	۲-۳-۵-بررسی اثر دی و پلی آمین‌ها بر ساختار آنزیم
۳۴	۲-۳-۶-بررسی اثر دی و پلی آمین‌ها بر طیف فلورسانس آنزیم

۳۵ ۷-۳-۲- بررسی اثر دی‌آمین‌ها بر سوبسترا

فصل سوم - نتایج و بحث

۳۷ ۱-۳- تعیین اختلاف جذب سوبسترا و محصول در طول موج‌های مختلف

۳۹ ۲-۳- محاسبه‌ی اپسیلین سوبسترا و محصول

۴۲ ۳-۳- تعیین نمودار اشباع آنزیم

۴۷ ۴-۳- بررسی اثر دی و پلی‌آمین‌ها بر فعالیت آنزیم

۵۱ ۵-۳- بررسی اثر دی و پلی‌آمین‌ها بر ساختار آنزیم

۵۵ ۶-۳- بررسی تغییرات اسپکترام آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف پوترسین

۶۰ ۷-۳- بررسی اثر دی و پلی‌آمین‌ها بر طیف فلورسانس آنزیم

۶۳ ۸-۳- بررسی اثر دی‌آمین‌ها بر سوبسترا

۷۳ نتیجه‌گیری

۷۴ پیشنهادها

فصل چهارم - منابع

۷۵ فهرست منابع و مآخذ

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱- ساختار آنزیم ریبونوکلئاز A ۵
- شکل ۱-۲- تأثیر پیوندهای دی‌سولفید در تغییر UV spectroscopy و Differential Scanning Calorimetry آنزیم طی افزایش دما ۶
- شکل ۱-۳- تغییر در نواحی مجاز ψ و ϕ به علت جایگزین کردن α -پروتون یک اسید آمینه با یک گروه متیل ۹
- شکل ۱-۴- مکانیسم عمل آنزیم RNase A ۱۳
- شکل ۱-۵- تأثیر دما و گوانیدین هیدروکلرید بر فعالیت آنزیم RNase A ۲۰
- شکل ۱-۶- محل‌های برش آنزیم RNase A توسط پروتئیناز K ۲۱
- شکل ۳-۱- طیف جذبی سوپسترا در غلظت $0/3$ میلی‌مولار ۳۷
- شکل ۳-۲- طیف جذبی محصول ۳۸
- شکل ۳-۳- اختلاف جذب سوپسترا $0/8$ میلی‌مولار و محصول آن در محدوده‌ی طول موج 275 تا 300 نانومتر ۳۸
- شکل ۳-۴- نمودار جذب حاصل از غلظت‌های صفر تا دو میلی‌مولار سوپسترا در طول موج 284 نانومتر ۴۰
- شکل ۳-۵- نمودار جذب حاصل از غلظت‌های صفر تا دو میلی‌مولار سوپسترا در طول موج 284 نانومتر ۴۰
- شکل ۳-۶- نمودار جذب حاصل از غلظت‌های صفر تا دو میلی‌مولار محصول در طول موج 284 نانومتر ۴۱
- شکل ۳-۷- نمودار جذب حاصل از غلظت‌های صفر تا دو میلی‌مولار محصول ۴۲

در طول موج ۲۸۴ نانومتر

- ۴۳ شکل ۳-۸- نمودار فعالیت آنزیم در محدوده‌ی غلظتی صفر تا یک میلی‌مولار سوبسترا
- ۴۴ شکل ۳-۹- نمودار لاینویور-برک آنزیم در محدوده‌ی غلظتی صفر تا یک میلی‌مولار سوبسترا
- ۴۵ شکل ۳-۱۰- نمودار Eadie-Hofstee آنزیم در محدوده‌ی غلظتی صفر تا یک میلی‌مولار سوبسترا
- ۴۵ شکل ۳-۱۱- نمودار Schatchard آنزیم در محدوده‌ی غلظتی صفر تا یک میلی‌مولار سوبسترا
- ۴۶ شکل ۳-۱۲- نمودار Hill حاصل از فعالیت آنزیم در محدوده‌ی غلظتی صفر تا ۰/۲۵ میلی‌مولار سوبسترا مربوط به فاز I
- ۴۷ شکل ۳-۱۳- نمودار فعالیت آنزیم RNase A در حضور غلظت‌های مختلف ۱ و ۳-دی آمینوپروپان
- ۴۸ شکل ۳-۱۴- نمودار فعالیت آنزیم RNase A در حضور غلظت‌های مختلف پوترسین
- ۴۹ شکل ۳-۱۵- نمودار فعالیت آنزیم RNase A در حضور غلظت‌های مختلف کاداورین
- ۵۰ شکل ۳-۱۶- نمودار فعالیت آنزیم RNase A در حضور غلظت‌های مختلف اسپرمیدین
- ۵۰ شکل ۳-۱۷- نمودار فعالیت آنزیم RNase A در حضور غلظت‌های مختلف اسپرمین
- ۵۲ شکل ۳-۱۸- درصد تغییرات جذب ۲۷۸ نانومتر RNase A بر اثر تیتراسیون

با ۳۱- دی آمینوپروپان

- ۵۳ شکل ۳-۱۹- درصد تغییرات جذب ۲۷۸ نانومتر RNase A بر اثر تیتراسیون با پوترسین
- ۵۳ شکل ۳-۲۰- درصد تغییرات جذب ۲۷۸ نانومتر RNase A بر اثر تیتراسیون با کاداورین
- ۵۴ شکل ۳-۲۱- درصد تغییرات جذب ۲۷۸ نانومتر RNase A بر اثر تیتراسیون با اسپرمیدین
- ۵۵ شکل ۳-۲۲- درصد تغییرات جذب ۲۷۸ نانومتر RNase A بر اثر تیتراسیون با اسپرمین
- ۵۶ شکل ۳-۲۳- تغییرات در طیف جذبی آنزیم ریبونوکلئاز A ناشی از تیتراسیون با پوترسین
- ۵۷ شکل ۳-۲۴- اختلاف طیف جذبی آنزیم RNase A در غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار پوترسین
- ۵۸ شکل ۳-۲۵- اثر غلظت‌های متفاوت پوترسین بر تغییر جذب آنزیم در طول موج ۲۹۵ نانومتر
- ۵۸ شکل ۳-۲۶- اثر غلظت‌های متفاوت پوترسین بر تغییر جذب آنزیم در طول موج ۲۷۶ نانومتر
- ۵۹ شکل ۳-۲۷- اثر غلظت‌های متفاوت پوترسین بر تغییر جذب آنزیم در طول موج ۲۸۰ نانومتر
- ۶۰ شکل ۳-۲۸- تغییر در طول موج ماکزیمم جذب آنزیم RNase A
- ۶۱ شکل ۳-۲۹- نمونه‌ای از طیف نشری طبیعی RNase A و طیف نشری کاهش یافته‌ی آن توسط پوترسین ۱۰۰ میلی مولار

- شکل ۳-۳۰- اثر آمین‌ها بر طیف نشری فلورسانس آنزیم RNase A ۶۲
- شکل ۳-۳۱- درصد تغییرات جذب ۲۸۴ نانومتر ناشی از اثر تیتراسیون سوبسترا با او۳-دی آمینوپروپان ۶۴
- شکل ۳-۳۲- درصد تغییرات جذب ۲۸۴ نانومتر ناشی از اثر تیتراسیون سوبسترا با پوترسین ۶۴
- شکل ۳-۳۳- درصد تغییرات جذب ۲۸۴ نانومتر ناشی از اثر تیتراسیون سوبسترا با کاداورین ۶۵
- شکل ۳-۳۴- درصد تغییرات جذب ۲۸۴ نانومتر ناشی از اثر تیتراسیون سوبسترا با اسپرمیدین ۶۵
- شکل ۳-۳۵- درصد تغییرات جذب ۲۸۴ نانومتر ناشی از اثر تیتراسیون سوبسترا با اسپرمین ۶۶
- شکل ۳-۳۶- مقایسه‌ی درصد تغییرات جذب ۲۸۴ نانومتر ناشی از اثر دی و پلی‌آمین‌ها بر سوبسترا ۶۶

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

اطلاعات زیستی توسط DNA ذخیره شده و توسط پروتئین‌ها نمود می‌یابند. در این میان RNA مثل یک مجرا عمل می‌کند. فرآیند تجزیه و سنتز RNA توسط دو دسته از آنزیم‌ها کنترل می‌شود. سنتز RNA به وسیله‌ی RNA پلیمرازها و تجزیه‌ی آن به وسیله‌ی RNA دپلیمرازها (که اغلب ریبونوکلئاز نامیده می‌شوند) صورت می‌گیرد. فعالیت ریبونوکلئازی در پانکراس پستانداران نشخوارکننده بالاست که این مسئله شاید به خاطر تجزیه‌ی RNA حاصل از میکروارگانیسم‌های معده‌ی آنها است. این فعالیت بالا منجر به کشف ویژگی‌های جزئی ریبونوکلئاز A پانکراس گاو گردیده‌است (Raines, 1998).

۱-۴- ریبونوکلئاز A

۱-۱-۱- معرفی آنزیم ریبونوکلئاز A

ریبونوکلئاز A پانکراس (EC 3.1.27.5) شاید بهترین آنزیم مطالعه‌شده در قرن بیستم باشد. این آنزیم توسط Rene Dubos جداسازی و توسط Moses Kunitz کریستاله و توسط William Stein و Stanford Moore تعیین سکانس گردیده‌است. ریبونوکلئاز A هم به عنوان آنزیم هم به عنوان پروتئین یک مدل عالی برای مطالعات بیوفیزیکی می‌باشد (Marshall et al., 2007).

A مربوط به شکل غالب آنزیم در پانکراس Bos Taurus می‌باشد. RNase A به صورت modify نشده‌است در حالی که RNase B مخلوطی از گلیکوفرم‌هایی است که در آن به نیتروژن زنجیره‌ی جانبی Asn34 گروه Man5-9 GlcNAc2 وصل می‌شود. RNase C و RNase D در پانکراس گاو فراوانی کمتری دارند و در گلیکوزیلاسیون ناهمگن تر هستند. RNase A یک پلی پپتید تک زنجیره‌ای است. این آنزیم بسیار مقاوم است. pH مطلوب برای فعالیت آن ۷/۶ است (محدوده‌ی فعالیت آن در ۱۰-۶ pH است) (Raines, 1998).

تعدادی از آنزیم‌ها که هم در توالی و هم در عملکرد مشابه RNase A پانکراس هستند توسط Rosenberg و Dyer بررسی گردیده‌اند. ریبونوکلئازهای همولوگ با ریبونوکلئاز A تاکنون فقط در پستانداران، خزندگان، پرندگان و دوزیستان دیده‌شده‌است. در انسان همه‌ی ۸ ژن همولوگ

این آنزیم روی کروموزوم ۱۴ قرار گرفته است. هر یک از این آنزیم‌های همولوگ دارای یک توالی با سه اسید آمینه‌ی ثابت شامل دو هیستیدین (که در دو انتهای پروتئین قرار گرفته) و یک لیزین (که در یک موتیف حفظ شده یعنی CKXXNTF قرار گرفته) می‌باشد. این توالی در واقع Secretory signal این آنزیم‌ها است. همه‌ی این آنزیم‌های همولوگ دارای ۴ پیوند دی سولفید هستند به جز RNase 5 (آنژیوزنین) که دارای سه پیوند دی سولفید است (Marshall et al., 2007).

۱-۱-۲- آنزیم‌های همولوگ RNase A در انسان

RNase1 در پانکراس، RNase4 در کبد، آنژیوزنین در پلازما، RNase2 در لوکوسیت‌های ائوزینوفیل که نوروتوکسیک هستند و نیز RNase3 که خاصیت ضدانگلی و ضدباکتریایی دارد و در ائوزینوفیل‌ها دیده می‌شود از جمله آنزیم‌های همولوگ RNase A در انسان می‌باشند. فعالیت ریبونوکلئازی برای خاصیت ضدانگلی و ضدباکتریایی این آنزیم ضروری نیست (Raines, 1998).

تغییر در بازهای یک پروتئین و آنالیز نتیجه‌ی این تغییرات یک روش خوب برای جستجوی نقش گروه‌های عملکردی ویژه در پروتئین‌ها است. اگرچه این تغییرات می‌تواند با روش‌های نیمه‌سنتزی یا سنتز کامل انجام شود اما جهش‌زایی مستقیم یک ژن که در میزبان هترولوگوس (غیر مشابه) بیان می‌شود آسان‌تر است. البته تولید RNase A به این روش مشکلاتی هم داشته است از جمله:

الف: cDNA این آنزیم به سختی کلون می‌شود چون RNA آن باید کاملاً سالم و دست نخورده از پانکراس استخراج شود.

ب: RNase A وقتی unfold می‌شود مستعد پروتئولیز می‌گردد.

ج: میزان بالای RNase A کشنده‌ی سلول است.

بیان این آنزیم در E.coli به صورت ادغام شده با β -گالاکتوزیداز صورت می‌گیرد و سپس β -گالاکتوزیداز از آن حذف می‌شود. آنزیم تولیدشده به پری پلاسم ترشح می‌شود. با این روش می‌توان پنج میلی‌گرم در لیتر RNase A محلول از محیط کشت باکتری تخلیص نمود. سیستم pET روش دیگری برای تولید RNase A می‌باشد که در آن از پرموتر RNA پلیمراز ویروس T7 برای بیان ژن‌های کلون شده استفاده می‌کنند. آنزیم حاصل به مقدار زیاد تولید

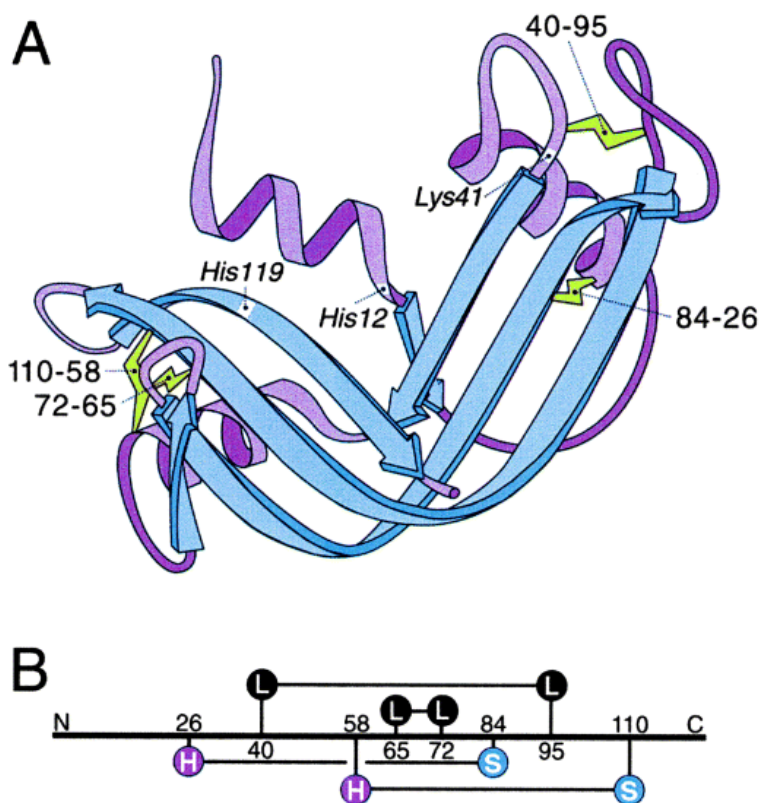
می‌شود و در Inclusion body تجمع می‌یابد. تشکیل Inclusion body به دلایل زیر مشکلی ایجاد نمی‌کند:

- ۱- RNase A به راحتی به صورت محلول در می‌آید و refold می‌شود.
 - ۲- Inclusion body ها به آسانی جدا می‌شوند و حاوی محصول خالص تری هستند.
 - ۳- چون RNase A در Inclusion body ها به صورت unfold است سیتوتوکسیسیتی ندارد.
- بنابراین تخلیص آنزیم از pET نسبت به استخراج آن از پانکراس گاو بیشتر است و معادل ۵۰ میلی‌گرم در لیتر است. روش دیگر برای تولید این آنزیم استفاده از سیگنال پپتید فسفاتاز قلیایی در E.coli و پروموتور λ PR (PR λ) می‌باشد که ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر محصول می‌دهد. سیستم pET و PR λ بیشترین محصول را می‌دهند و در آن‌ها هیچ اسید آمینه‌ای جایگزین اسید آمینه‌های محصول نشده است (Raines, 1998).

۱-۳- ساختار آنزیم RNaseA

RNase A اولین آنزیم و سومین پروتئین (بعد از انسولین و هموگلوبین) است که توالی اسید آمینه‌ی آن تعیین شده است و سومین آنزیم و چهارمین پروتئین (بعد از میوگلوبین و لیزوزیم و کربوکسی پپتیداز A) می‌باشد که ساختار سه بعدی آن با X-Ray diffraction مشخص شده است (Marshall et al., 2007). این آنزیم کوچک است و فرم بالغ آن که از سلول‌های پانکراس گاو ترشح می‌شود فقط ۱۲۴ اسید آمینه دارد. در این آنزیم اسید آمینه‌ی تریپتوفان وجود ندارد اما دارای ۶ باقیمانده‌ی تیروزین است شامل Tyr25, 73, 76, 92, 97, 115. تیروزین‌های ۲۵ و ۹۲ و ۱۱۵ در بخش‌های درونی ساختار سه بعدی آنزیم قرار می‌گیرند اما تیروزین‌های ۷۳ و ۷۶ و ۱۱۵ در بخش‌های سطحی و بیرونی آنزیم هستند. توانایی جذب امواج توسط آنزیم به‌طور عمده به خاطر اسیدآمینه‌های تیروزین و پیوندهای دی سولفید است. فرمول مولکولی آنزیم بدون بار و طبیعی $C_{575}H_{907}N_{171}O_{192}S_{12}$ می‌باشد و وزنی معادل ۱۳۶۸۶ دالتون دارد. ساختار دوم آنزیم شامل ۴ صفحه‌ی β -آنتی پارالل و ۳ عدد α -هلیکس کوتاه می‌باشد و نیز دارای ۴ پیوند دی‌سولفید می‌باشد. این پیوندها بین Cys (65, 72), Cys (26, 84), Cys (58, 110), Cys (40, 95) تشکیل می‌گردد و تقریباً تا همه‌ی این پیوندهای دی‌سولفید شکل نگیرد آنزیم fold نمی‌شود. پیوندهای پپتیدی در ۲ تا ۴ باقیمانده‌ی پرولین به صورت سیس می‌باشد. ساختار این آنزیم با NMR و X-ray تعیین شده است (Raines, 1998). مطالعات نشان داده که دو پیوند دی سولفید انتهایی در زنجیره‌ی اسیدآمینه‌ی آنزیم یعنی

Cys (26, 84) و Cys (58-110) در پایداری ساختار آنزیم بسیار مهم هستند و دو پیوند دی سولفید دیگر در فعالیت کاتالیتیکی آنزیم نقش دارند. این نتایج از مطالعاتی به دست آمده که طی آن با جایگزین کردن دو آلانین به جای هر دو سیستئینی که با هم پیوند دی سولفید می دهند اثر هر یک از این پیوندها را در پایداری ساختار و فعالیت آنزیم بررسی کرده اند. واریانت های آنزیمی حاصل از این جایگزینی ها دارای K_{cat}/K_m ای هستند که ۲ تا ۴۰ برابر کمتر از آنزیم وحشی است (در محاسبه K_{cat}/K_m ، اثر این واریانت ها بر RNA پلی سیتیدین بررسی گردیده است) (Klink, 2000).

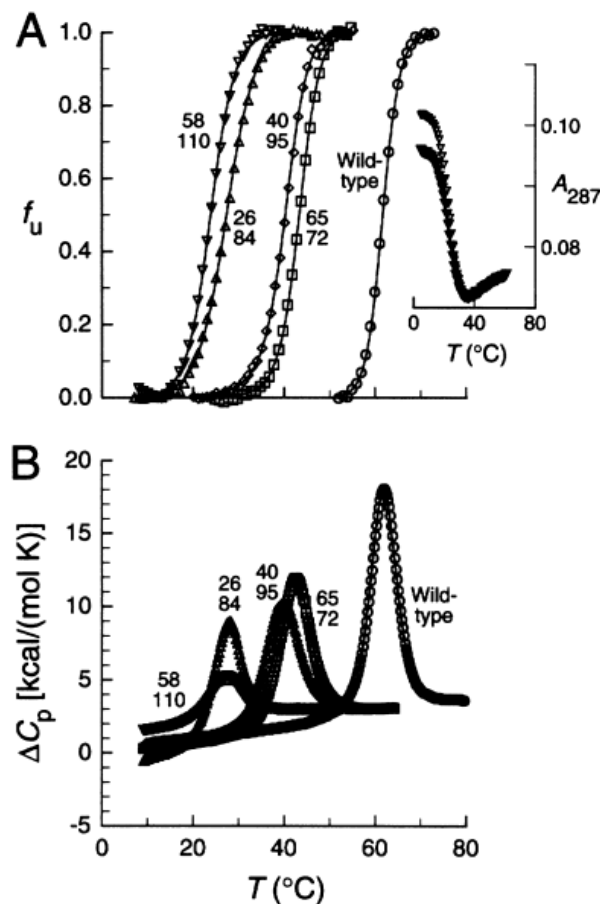


شکل ۱-۱- (Klink, 2000). A: موقعیت پیوندهای دی سولفید در ساختار سه بعدی آنزیم ریبونوکلئاز A. B: موقعیت پیوندهای دی سولفید در زنجیره ی اسید آمینه ی آنزیم (ساختار اول آنزیم). H و L و S نشان دهنده ی موتیف های ساختاری هستند (H= Half cystein و L= α -helix و S= Surface loop or β -sheet).

نمودار unfold شدن آنزیم در هر یک از واریانت های حاصل نیز توسط Ultraviolet spectroscopy (شکل A) و Differential Scanning Calorimetry (شکل B) تعیین گردیده است (شکل ۱-۲).

۱-۱-۴-ریبونوکلئاز S

Fred Richards دریافت که این آنزیم توسط پروتئولیتیک سوبتیلیزین دچار شکست بین اسیدآمینه‌های ۲۰ و ۲۱ می‌شود و دو قطعه ایجاد می‌کند. یک قطعه شامل باقیمانده‌های ۱ تا ۲۰ که S-پپتید و قطعه‌ی دیگر شامل باقیمانده‌های ۲۱ تا ۱۲۴ که S-پروتئین نامیده می‌شود. این دو قطعه با هم کمپلکس RNase S را می‌سازند که کاملاً فعال است. جدا شدن این دو قطعه فعالیت RNase را از بین می‌برد و مخلوط شدن مجدد آن‌ها سبب فعالیت دوباره‌ی آنزیم می‌شود. S-پروتئین خاصیت آنتی‌ژنیک دارد اما S-پپتید خیر. S-پپتید و S-پروتئین به عنوان یک سیستم مدل ایده‌آل برای تعیین نیازهای مولکولی و ترمودینامیکی جایگاه فعال جهت شناسایی سوسترها توسعه یافته‌اند.



شکل ۱-۲- (Klink, 2000). A: این نمودار تأثیر هر یک از پیوندهای دی‌سولفید را در تغییر UV spectroscopy آنزیم طی افزایش دما نشان می‌دهد. B: این نمودار تأثیر هر یک از پیوندهای دی‌سولفید را در تغییر Differential Scanning Calorimetry آنزیم طی افزایش دما نشان می‌دهد.