دانشگاه کردستان
دانشکده علوم پایه
گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی

عنوان:

جستجوی مهارکننده‌های آنزیم تیروزیناز در عصاره‌ی هگزانی برخی از گیاهان استان کردستان

پژوهشگر:
فریده هاشمی

استاد راهنما:
دکتر محمدعلی زارعی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی علوم سلولی و مولکولی

شهریورماه ۱۳۹۳

کلیه حقوق مادی و معنوی مترتب بر نتایــج مطالعات،

ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع

این پایان‌نامه (رســاله) متعلق به دانشــگاه کردستان است.

سپاس بی‌پایان پروردگار دانایی که حمد و سپاس بیکران شایسته ذات احدیت اوست. خداوندا تو را شکر می‌گویم که به من توفیق کسب علم و دانش را عطا فرمودی، اگر چه این قطره‌ای است از دریای بیکران علم، ولی نعمتی بزرگ است. در طی این راه که گاه دشوار می‌نمود،

خاطره همراهی اساتید و دوستانم شیرین‌ترین حاصل بود که امیدوارم سپاس من بیانگر گوشه‌ای از ارادت و احترام من به ایشان باشد.

بانهایت عشق و احترام تقدیم به روشنایی بخشان قلبم، یگانه های زندگیم

پدر و مادر عزیزم

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است.
به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید.
و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.

تقدیم به
خواهران و برادران مهربانم، مشوقان راهم،پشتیبانان همیشگیم با کهکشانی از عشق،
گرمای وجودشان زندگی من است.

و دوستان نازنینم به پاس تعابیر عظیمشان از کلمه
دوستی

با سپاس فروان از:
استاد گرانقدر، جناب آقای دکتر محمدعلی زارعی که با نصایح دلسوزانه و راهنماییهای استادانهشان، دشواری راه را بر من آسان نمودند.

با سپاس فراوان از:
اساتید بزرگوار سرکار خانم دکتر فرنوش خسروبخش و جناب آقای دکتر مراحم آشنگرف به خاطر نظرات ارزشمندشان در کامل تر شدن این پایان نامه.

چکیده

تیروزیناز به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز ملانین و همچنین در تعیین رنگ پوست و موی پستانداران شناخته شده است. آنزیم تیروزیناز دارای دو مکانیسم مهم در بیوسنتز ملانین می‌باشد؛ با فعالیت مونوفنولازی باعث هیدروکسیله کردن سوبسترا شده و با فعالیت دی‌فنولازی باعث اکسید کردن سوبسترا می‌شود. بیماری‌های پوستی مختلفی مانند: ملازما، لکه‌های پوستی و اگزما از تجمع سطح بالایی از رنگدانه‌های اپیدرمی (ملانین) به‌وجود می‌آیند. از طرفی گیاهان و عصاره آن‌ها منبع غنی و ارزانی از ترکیبات فعال هستند، که می‌توان از آن‌ها برای مهار تیروزیناز و درمان بیماری‌های پوستی وابسته به تجمع رنگدانه‌ی ملانین استفاده کرد. در این پژوهش جهت یافتن فعالیت مهارکنندگی تیروزیناز در محصولات طبیعی، از ۷۰ گیاه بومی مناطق مرکزی استان کردستان استفاده شده و اثر مهاری عصاره‌ی هگزانی قسمت‌های هوایی گیاهان بر روی فعالیت تیروزیناز آزمایش شد. تمام عصاره‌ها برای فعالیت مهاری تیروزیناز در چهار غلظت ۰/۱، ۰/۰۱، /۰۰۱ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد سنجش قرار گرفتند. روش سنجش براساس مطالعات اسپکتروفتومتری با استفاده از میکروپلیت و قرائت جذب در طول موج ۴۹۲ نانومتر بود و از اسید کوجیک به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در میان عصاره‌های هگزانی سنجش شده، تنها ۱۰ عصاره‌ی گیاهی فعالیت مهاری بالاتر از ۵۰ درصد را نشان دادند؛ شامل عصاره گیاهان:

Gundelia Tourneforti (L.), *Astragalus vegetus* Bunge, *Vicia hyrcanica* Fisch.& C. A. Mey, *Campanula involucrate* Auch.ex DC, *Isatis cappadocica Desv*, *Sanguisorba minor subsp.lasiocarpa* (Boiss&Hausskn) Nordborg, *Eremostachys laevigata* Bunge, *Ballota nigra* L. subsp. Kurdica P.H.Davis, *Astragalus caryolobus Bge*, *Aristolochia bottae* Jaub.

در این میان *Gundelia Tourneforti*(L.)، درصد مهار قابل توجهی (۷۵/۹۲٪) را نشان داد و IC50 آن ۰/۱۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در فاز دوم مطالعه سه عصاره‌ی، *Gundelia Tourneforti* (L.), *Astragalus vegetus* Bunge, *Campanula involucrate* Auch .ex DC، برای آزمایشات سینتیکی انتخاب شدند. مطالعات سینتیکی در مورد سه عصاره نشان داد که، عصاره *Gundelia Tourneforti*(L.) در چهار غلظت ذکر شده، به‌ترتیب با رفتاری رقابتی، رقابتی، نارقابتی و مرکب آنزیم را مهار می‌کند، در حالیکه عصاره *Astragalus vegetus* Bunge با رفتاری نارقابتی و عصاره *Campanula involucrate* Auch .ex DC با رفتاری غیررقابتی، رقابتی، مرکب و غیررقابتی آنزیم را مهار می‌کنند.

به‌نظر می‌رسد، عصاره‌ی گیاهانی که بیشترین تاثیر را دارند، به خصوص گیاه *Gundelia Tourneforti*(L.)، می‌توانند موضوع تحقیقات بیشتری با هدف بدست آوردن مهارکننده‌های تیروزیناز جدید با کاربردهای وسیعی از جمله متوقف کردن تجمع رنگدانه‌های پوستی ناخواسته انسان باشند.

کلید واژه: تیروزیناز، عصاره‌ی هگزانی، مهارکننده‌ی‌گیاهی، IC50

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول ۱

پیشینه‌ی تحقیق و مفاهیم علمی ۱

۱-۱- نقش تیروزیناز در بیوسنتز ملانین ۲

۱-۲- نگاهی اجمالی به آنزیم تیروزیناز ۳

۱-۳- طبقه‌بندی و خصوصیات بیوشیمیایی تیروزیناز ۴

۱-۴- ساختار تیروزیناز ۵

۱-۴-۱- توالی آمینواسیدی و قلمروهای ساختمانی تیروزیناز ۶

۱-۵- ساختار جایگاه فعال ۷

۱-۶- مکانیسم عمل تیروزیناز ۱۰

۱-۷- مسیر سیگنالی ۱۱

۱-۸- مهار بیوسنتز ملانین ۱۲

۱-۸-۱- مهارکننده‌های تیروزیناز ۱۳

۱-۸-۲- پلی‌فنول‌ها ۱۳

۱-۸-۳- آلدئیدها و سایر ترکیبات از گیاهان رده بالا ۱۶

۱-۸-۴- متابولیت‌های قارچی ۱۶

۱-۸-۵- دست‌ورزی ترکیبات طبیعی ۱۷

۱-۸-۶- مهارکننده‌های مصنوعی ۱۷

۱-۹- پیشینه و هدف پژوهش ۱۸

فصل دوم ۲۱

مواد و روش‌های تحقیق ۲۱

۲-۱- مواد ۲۲

۲-۲- دستگاه‌ها ۲۲

۲-۳- وسایل ۲۲

۲-۴- نرم افزار مورد استفاده ۲۲

۲-۵- روش کار ۲۲

۲-۵-۱- جمع آوری گیاهان از مناطق مختلف استان کردستان و شناسایی تاکسونومیک آن‌ها ۲۲

۲-۵-۲- خشک نمودن گیاهان در محیط دور از نور آفتاب و دمای اتاق ۲۶

۲-۵-۳- تهیه‌ی پودر کامل از نمونه‌ها ۲۶

۲-۵-۴- استخراج مواد موثر از پودر نمونه‌ها با استفاده از حلال هگزان ۲۶
۲-۵-۵- تغلیظ عصاره با استفاده از دستگاه Rotary evaporator ۲۷
۲-۶- تهیه‌ی محلول‌های مورد نیاز ۲۷
۲-۶-۱- طرز تهیه‌ی محلول بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=6/5 ..... ۲۷
۲-۶-۲- تهیه‌ی محلول آنزیم تیروزیناز در بافر فسفات (۲۵U/ml) ۲۸
۲-۶-۳- تهیه سوبسترای ال- دوپا با غلظت ۲۴ میلی‌مولار ۲۸
۲-۶-۴- تهیه‌ی محلول‌های اسید کوجیک به عنوان کنترل مثبت ۲۸
۲-۶-۵- تهیه‌ی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی هگزانی گیاه ۲۸
۲-۷- سنجش اثرات مهاری عصاره‌های هگزانی بر روی آنزیم با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر ۲۸
۲-۸- روش محاسبات ۳۰
۲-۹- بررسی سینتیکی آنزیم تیروزیناز در حضور عصاره‌های گیاهی با بالاترین درصد مهار ۳۱
فصل سوم ۳۲
نتایج ۳۲
۳-۱- نتایج فعالیت مهاری کوجیک اسید ۳۳
۳-۲- دسته‌بندی گیاهان براساس درصد مهار ۳۹
۳-۳- نتایج تعیین IC50 ..... ۴۲
۳-۴- نتایج بررسی سینتیکی آنزیم تیروزیناز ۴۳
۳-۴-۱- نتایج بررسی سینتیکی آنزیم تیروزیناز در حضور عصاره‌ی گیاهی *Gundeli Tourneforti* ۴۳
۳-۴-۲- نتایج بررسی سینتیکی آنزیم تیروزیناز در حضور عصاره‌ی گیاهی *Astragalus vegetus* Bunge ۴۶
۳-۴-۳- نتایج بررسی سینتیکی آنزیم تیروزیناز در حضور عصاره‌ی گیاهی *Campanula involucrata* ۴۸
فصل چهارم ۵۱
بحث ۵۱
پیشنهادات ۵۷
منابع ۵۸

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱: اسامی علمی و نام خانواده گیاهان جمع‌آوری شده ۲۳

جدول۲-۲ : محتویات چاهک‌های آزمایش در میکروپلیت ۲۹

جدول ۳-۲: درصد مهار تیروزیناز به وسیله‌ی اسید کوجیک ۳۳

جدول۳-۱: درصد مهار فعالیت تیروزیناز توسط عصاره ۳۴

جدول ۳-۳: فهرست گیاهان دارای فعالیت مهاری قوی ۳۹

جدول ۳-۴: فراوانی و درصد فراوانی چهار غلظت عصاره‌های هگزانی در سه گروه مهاری ۴۰

جدول۳-۵: نتایج محاسبه‌ی IC50 برای عصاره هگزانی گیاهان دارای فعالیت مهاری قوی ۴۲

جدول ۳-۷: نتایج محاسبه‌ی پارامترهای سینتیکی مهار در حضور عصاره‌ی *Gundelia Tourneforti*. ۴۴

جدول ۳-۷: نتایج محاسبه‌ی پارامترهای سینتیکی مهار در حضور عصاره‌ی *Astragalus vegetus* Bunge ۴۶

جدول ۳-۸: نتایج محاسبه‌ی پارامترهای سینتیکی مهار در حضور عصاره‌ی *Campanula involucrata* ۴۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱: مسیر بیوسنتز ملانین ۳

شکل۱-۲: چرخه‌ی کاتالیتیکی هیدروکسیلاسیون مونوفنول و اکسیداسیون دی‌فنول..... ۵

شکل۱- ۳: توالی آمینواسیدی تیروزینازهای *آگاریکوس بیس‌پروس* و ساختار دوم ppo_3 ..... ۷

شکل۱- ۴: نمایش جایگاه فعال با دو هسته مس ۹

شکل۱-۵: ساختار جایگاه فعال آنزیم..... ۹

شکل۱-۶: چرخه‌ی کاتالیتیکی هیدروکسیلاسیون مونوفنول‌ها و اکسیداسیون دی‌فنول‌ها به کوینون‌ها ۱۱

شکل۱-۷: مسیر سیگنالی رایج در تنظیم ملانوژنز ۱۲

شکل ۱-۸: ساختار شیمیایی مهارکننده‌های تیروزیناز متعلق به برخی از انواع استاندارد ۱۵

شکل ۱-۹: ساختار شیمیایی اسیدگالیک ۱۶

شکل ۱-۱۰: ساختار شیمیایی مهارکننده‌های تیروزیناز از منابع طبیعی ۱۷

شکل ۱-۱۱: ساختار شیمیایی برخی از مهارکننده‌های تیروزیناز از منابع مصنوعی..... ۱۸

شکل۲-۱: تغلیظ عصاره با استفاده از دستگاه Rotary evaporator..... ۲۷

شکل۲-۲: دستگاه میکروپلیت‌ریدر ۳۰

شکل ۲-۳: میکروپلیت حاوی عصاره پس از انجام واکنش ۳۰

شکل۳-۱: نمودار تعیین IC50، کنترل مثبت..... ۳۳

شکل ۳-۲: نمودار مقایسه‌ی درصد مهارعصاره‌های گیاهی با فعالیت مهاری قوی ۴۰

شکل ۳-۳: نمودار مقایسه‌ی درصد مهارعصاره‌های گیاهی با فعالیت مهاری متوسط ۴۱

شکل ۳-۴: نمودار مقایسه‌ی درصد مهارعصاره‌های گیاهی با فعالیت مهاری ضعیف..... ۴۱

شکل۳-۵: نمودار مقایسه‌ی IC50 عصاره‌های گیاهی با فعالیت مهاری قوی..... ۴۳

شکل۳-۶: نمودار [V]/1 بر علیه [S]/1 عصاره‌ی *Gundelia Tourneforti* L. در غلظت ۱ µg/ml..... ۴۴

شکل۳-۷: نمودار [V]/1 بر علیه [S]/1 عصاره‌ی *Gundelia Tourneforti* L. در غلظت ۰/۱ µg/ml ۴۵

شکل۳-۸: نمودار [V]/1 بر علیه [S]/1 عصاره‌ی *Gundelia Tourneforti* L. در غلظت ۰/۰۱ µg/ml ۴۵

شکل۳-۹: نمودار [V]/1 بر علیه [S]/1 عصاره‌ی *Gundelia Tourneforti* L. در غلظت ۰/۰۰۱ µg/ml..... ۴۶

شکل۳-۱۰: نمودار [V]/1 بر علیه [S]/1 عصاره‌ی *Astragalus vegetus* Bunge در غلظت ۱ µg/ml ۴۷

شکل۳-۱۱: نمودار [V]/1 بر علیه [S]/1 عصاره‌ی *Astragalus vegetus* Bunge در غلظت ۰/۱ µg/ml ۴۷

شکل۳-۱۲: نمودار [V]/1 بر علیه [S]/1 عصاره‌ی *Astragalus vegetus* Bunge در غلظت ۰/۰۱ µg/ml..... ۴۷

شکل۳-۱۳: نمودار [V]/1 بر علیه [S]/1 عصاره‌ی *Astragalus vegetus* Bunge در غلظت ۰/۰۰۱ µg/ml..... ۴۸

شکل۳-۱۴: نمودار [V]/1 بر علیه [S]/1 عصاره‌ی *Campanula involucrata* در غلظت ۱ µg/ml ۴۹

شکل۳-۱۵: نمودار [V]/1 بر علیه [S]/1 عصاره‌ی *Campanula involucrata* در غلظت ۰/۱ µg/ml..... ۴۹

شکل۳-۱۶: نمودار 1/[V] بر علیه 1/[S] عصاره‌ی *Campanula involucrata* در غلظت ۰/۰۱ µg/ml ۵۰
شکل۳-۱۷: نمودار 1/[V] بر علیه 1/[S] عصاره‌ی *Campanula involucratae* در غلظت ۰/۰۰۱ µg/ml ۵۰

فصل اول

پیشینه‌ی تحقیق و مفاهیم علمی

آنزیم تیروزیناز[1] یا مونوفنول مونواکسیژناز (EC.۱،۱۴،۱۸،۱) یک متالوآنزیم است، که برای فعالیتش به اتم مس و مولکول اکسیژن نیاز دارد [۱]. عملکرد این آنزیم در سلول‌های اپیدرمی جانوران سبب ایجاد رنگ پوست، مو و چشم‌ها می‌شود و در گیاهان نقش دفاعی علیه پاتوژن‌ها و حشرات را برعهده دارد و در حشرات نیز در فرآیندهای پوست‌اندازی و اسکلت‌سازی نقش دارد [۲،۳]. فعالیت زیاد این آنزیم در پستانداران سبب ایجاد بیماری‌های پوستی و در میوه و سبزیجات نیز سبب سیاه شدن آن‌ها در مجاورت هوا می‌شود، که این امر منجر به کاهش کیفیت مواد غذایی می‌گردد [۴]. به همین علت مهار آنزیم تیروزیناز می‌تواند مانع بروز چنین مشکلاتی شود. جهت آشنایی بیشتر با ساختار و عملکرد آنزیم تیروزیناز، ابتدا به معرفی مختصر آن می‌پردازیم.

۱-۱- نقش تیروزیناز در بیوسنتز ملانین

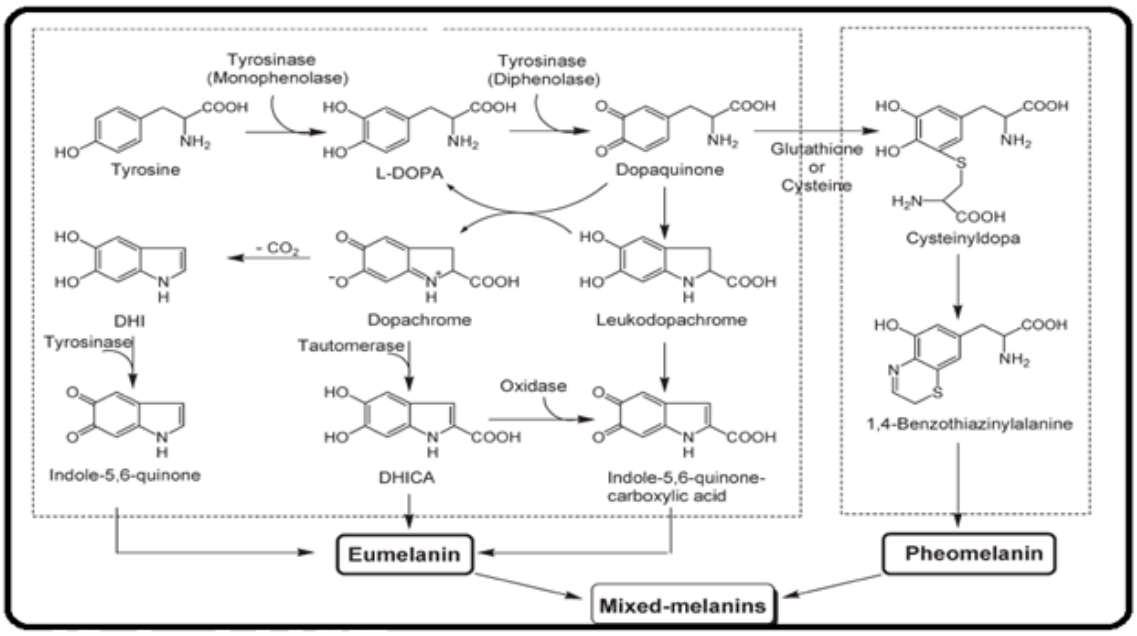
پوست یک سد محافظتی عالی در برابر محیط خارجی است، که به تنظیم دما، توازن مایعات، مراقبت در برابر میکروب‌های مضر و محافظت در برابر نور خورشید (اشعه‌ی ماورای‌بنفش) کمک می‌کند. در واقع یکی از فاکتورهای محافظتی در برابر نور خورشید و اشعه‌ی ماورای‌بنفش، رنگدانه‌ی ملانین[2] است [۵]. ملانین یکی از بیشترین رنگدانه‌های موجود در باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و جانوران است، که یک بیوپلیمر[3] سیاه رنگ می‌باشد [۶]. این رنگدانه در جانوران از لایه بازال[4]، ۱۰ درصد از سلول‌های اپیدرمی شامل؛ سلول‌های ملانوسیتی پوست، فولیکول مو، مشیمیه چشم و اپیتلیوم چشم ترشح می‌شود، که میزان بیان این رنگدانه در سلول‌های مختلف، متفاوت است [۵،۷،۸].

اگر چه رنگ پوست و موی پستانداران توسط عوامل مختلفی از جمله: کارتنوئید[5] ، هموگلوبین[6] ، اکسی هموگلوبین[7] و ملانین تعیین می‌شود، با این وجود مهمترین عامل، میزان و نحوه پراکندگی تولید ملانین می‌باشد [۹،۱۰].

به طور کلی دو نوع ملانین در پستانداران وجود دارد؛ یوملانین[8] و فئوملانین[9] که هر دو نوع به واسطه ترکیبی از واکنش‌های آنزیمی و شیمیایی به وجود می‌آیند [۱۰،۱۱]. دو مرحله اول مسیر بیوسنتز ملانین شامل هیدروکسیلاسیون مونوفنول به ئو- دی‌فنول[10] (فعالیت مونوفنولازی یا کرزولازی) و اکسیداسیون ئو- دی‌فنول به ئو-کوینون[11] (فعالیت دی‌فنولازی یا کته‌کولازی) با استفاده از اکسیژن مولکولی و به کمک آنزیم تیروزیناز صورت می‌گیرد [۱۲]. این مسیر به وسیله واکنش‌های غیر آنزیمی تا سنتز ملانین ادامه می‌یابد (شکل۱-۱). تولید غیر عادی ملانین در انسان با مشکلات جدی زیبایی

[1] Tyrosinase
[2] Melanin
[3] Biopolymer
[4] Basal Layer
[5] Carotenoid
[6] Hemoglobin
[7] Oxy hemoglobin
[8] Eumelanin
[9] Pheomelanin
[10] O-diphenol
[11] O-quinone

همراه است. به‌گونه‌ای که برخی از بیماری‌های پوستی ناشی از افزایش سطح پیگمنتاسیون[1] اپیدرمی می‌باشند؛ از جمله این بیماری‌ها می‌توان به ملازما[2] ، لکه‌های پوستی و اگزما اشاره کرد [۴،۱۳].



شکل۱-۱: مسیر بیوسنتز ملانین: تیروزین به وسیله‌ی آنزیم تیروزیناز به دوپاکوئینون تبدیل شده و این ترکیب از طریق واکنش‌های اکسیداسیون به یوملانین و فئوملانین تبدیل می‌شود [۱۴].

۱-۲- نگاهی اجمالی به آنزیم تیروزیناز

سنتز ملانین در گیاهان، میکروارگانیسم‌ها، قارچ‌ها، جانوران و پستانداران، برعهده آنزیم تیروزیناز است [۷]. آنزیم تیروزیناز (مونوفنول مونواکسیژناز) یک متالوآنزیم وابسته به مس است، که عملکرد این آنزیم در سلول‌های اپیدرمی جانوران سبب ایجاد رنگ پوست، مو و چشم‌ها می‌شود [۱،۱۵].

آنزیم تیروزیناز دو واکنش مجزای سنتز ملانین را کاتالیز می‌کند؛ با فعالیت مونوفنولازی باعث هیدروکسیله شدن تیروزین[3] شده و با فعالیت دی‌فنولازی باعث اکسید کردن ۳و۴- دی هیدروکسی فنیل آلانین[4] به ئو- دوپاکینون می‌شود [۵،۱۶].

ئو- دوپاکینون[5] در محلول آبی ناپایدار است و به سرعت در اثر یک واکنش غیر آنزیمی به لکودوپاکروم[6] تبدیل می‌شود، که این ماده نیز دوباره به صورت غیر آنزیمی توسط مولکول دیگر ئو- دوپاکینون اکسید می‌شود و یک دوپاکروم و یک مولکول ال- دوپای دیگر تشکیل می‌دهد. این آنزیم بر روی فرم ال- تیروزین یا ال- دوپا عمل می‌کند [۱۶]. تیروزیناز به طور گسترده در گیاهان و جانوران وجود دارد و در تشکیل رنگدانه‌های ملانین نقش دارد. این آنزیم در گیاهان، بر روی ترکیبات فنولی

[1] Pigmentation
[2] Melasma
[3] Tyrosine
[4] L-DOPA
[5] O-dopaquinone
[6] Leukodopachrome

عمل می‌کند و سبب تشکیل کینون‌ها[1] می‌شود و مسئول رنگی شدن آنزیمی میوه‌ها و سبزیجات می‌باشد. تیروزیناز در عملکردهای دفاعی گیاهان در مقابل حشرات نیز نقش مهمی را ایفا می‌کند. فعالیت بالای تیروزیناز در گیاهان سبب ایجاد لکه‌های قهوه‌ای می‌شود؛ لذا در صنایع غذایی، در کنترل کیفی و اقتصادی میوه‌ها و سبزیجات نقش مهمی را ایفا می‌کند. این آنزیم در تولید ملانین، التیام زخم‌ها، اسکلت‌سازی و پوست‌اندازی حشرات نیز شرکت دارد [۱،۵]. به همین علت از مهارکننده‌های تیروزیناز به عنوان یک راه‌حل در کنترل آفت استفاده می‌شود. علاوه بر این از مهارکننده‌های آنزیم تیروزیناز در صنایع آرایشی، دارویی و پزشکی برای جلوگیری یا درمان مشکلات پیگمنتاسیون بهره می‌گیرند [۱۴،۱۷]. در میکروارگانیسم‌ها، تعداد زیادی از مونوفنول‌ها و دی‌فنول‌ها با ساختارهای متفاوت به‌عنوان سوبستراهای تیروزیناز به کار می‌روند.

اولین بررسی‌های بیوشیمیایی در سال ۱۹۸۵ بر روی قارچ، *راسولا نیگریکانس*[2] صورت گرفت که با آسیب‌دیدگی ساقه‌اش در معرض هوا، رنگ آن به قرمز و سپس سیاه تغییر می‌کند [۱۸].

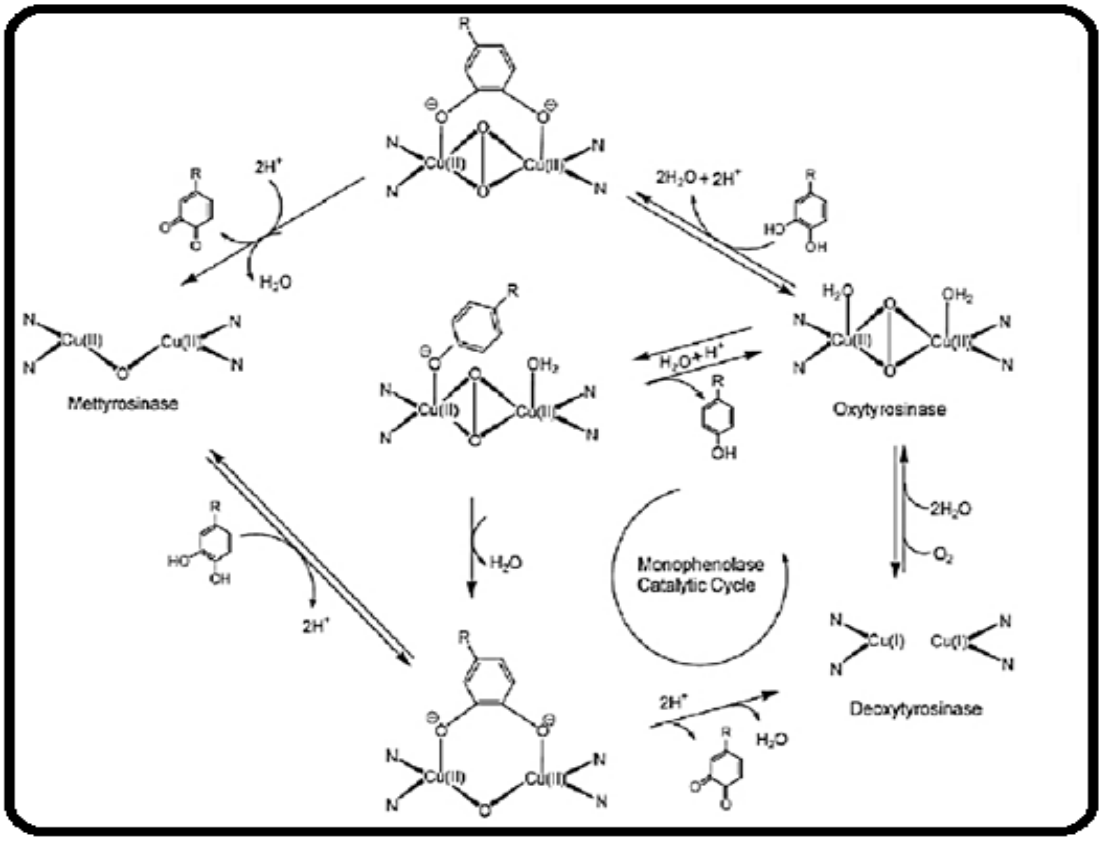
بسیاری از تیروزینازها از جمله تیروزیناز انسانی، تیروزیناز قارچ خوراکی و *نوروسپورا کراسا*[3] تعیین توالی شده‌اند اما بیشتر مطالعات انجام گرفته بر روی تیروزیناز، در دو قارچ *آگاریکوس بیس‌پروس*[4] و *نوروسپوراکراسا* صورت گرفته است [۱۸]. به دلیل اینکه استخراج تیروزیناز پستانداران پرهزینه و با مشکلات زیادی روبه‌رو است و آنزیم تیروزیناز در پستانداران از جهاتی مشابه تیروزیناز قارچ خوراکی می‌باشد، بیشتر مطالعات بر روی تیروزیناز استخراج شده از قارچ خوراکی صورت می‌گیرد. همچنین طبق تحقیقات انجام شده، تیروزیناز قارچ خوراکی تمایل زیادی برای سوبستراهای مختلف دارد.

۱-۳- طبقه‌بندی و خصوصیات بیوشیمیایی تیروزیناز

تیروزیناز نقش‌های فیزیولوژیک متعددی را در موجودات مختلف بر عهده دارد. این آنزیم از منابع مختلف، مخصوصا از منابع گیاهی و جانوری استخراج شده است، اما خصوصیات تعداد محدودی از آن‌ها شناخته شده است. بسیاری از این آنزیم‌ها مانند مورد *نوروسپوراکراسا* و نوع انسانی آن توالی‌یابی شده‌اند. برخلاف تیروزینازهای قارچی که سیتوزولی است، تیروزینازهای انسانی یک گلیکوپروتئین متصل به غشا می‌باشد که در ساختمان آن ۱۳درصد کربوهیدرات وجود دارد [۱۸]. جهش‌های مختلف در ژن تیروزیناز انسانی به نوعی بیماری اتوزومال به نام آلبینیسم[5] منجر می‌شود [۴].

برای تیروزیناز در گیاهان رده بالا و قارچ‌ها، سه ایزوفرم (نابالغ، بالغ نهفته و فعال) در نظر می‌گیرند. ارتباط بین این ایزوفرم‌ها هنوز به طور کامل شناخته نشده است. جایگاه فعال تیروزیناز دارای دو اتم مس و سه حالت مختلف از نظر درجه اکسیداسیون می‌باشد (شکل۱-۲)[۱۸]

[1] Quinone
[2] *Russula nigricans*
[3] *Neuraspora crassa*
[4] *Agaricus bisporus*
[5] Albinism



شکل۱-۲: چرخه‌ی کاتالیتیکی هیدروکسیلاسیون مونوفنول و اکسیداسیون دی فنول: شکل اکسی تیروزیناز، تبدیل مونوفنول به ئو- کوئینون را از طریق تشکیل دی‌فنول کاتالیز می‌کند. شکل اکسی و مت تیروزیناز می‌توانند تبدیل دی‌فنول به ئو- کوئینون را کاتالیز کنند [۱۸].

۱-۴- ساختار تیروزیناز

طبق مطالعات انجام شده بر روی تیروزیناز قارچ خوراکی *آگاریکوس بیس‌پروس* نشان داده شد، که این آنزیم دارای وزن مولکولی ۱۱۰ تا ۱۳۰ هزار دالتون می‌باشد. همچنین به‌عنوان یک پروتئین تترامر شناخته می‌شود، که از زیرواحدهای یکسان کاتالیتیکی ۳۲ هزار دالتونی ساخته شده است. ساختار چهارم آنزیم به صورت تترامر $H2L2$ و دارای دو اتم مس می‌باشد. برخی از ساختارهای شناخته شده تیروزیناز مانند گونه آگاریکوس[1] به صورت یک هتروتترامر شامل دو زنجیره سنگین (H) و دو زنجیره سبک (L) و با وزن مولکولی ۱۱۰ کیلو دالتون می‌باشند [۱۸،۲۰]. دو نوع زنجیره سنگین H_α و H_β نیز برای ایزوزیم‌های $H2L2_\alpha$ و $H2L2_\beta$، توسط راب[2] و گوتریج[3] شناسایی شدند که به ترتیب الفا و بتا نامیده می‌شوند. این دو ایزوفرم از قارچ خوراکی استخراج شده است. ساختار کریستالوگرافی تیروزیناز نیز شناسایی شده است.

[1] Agaricus
[2] Robb
[3] Gutteridge

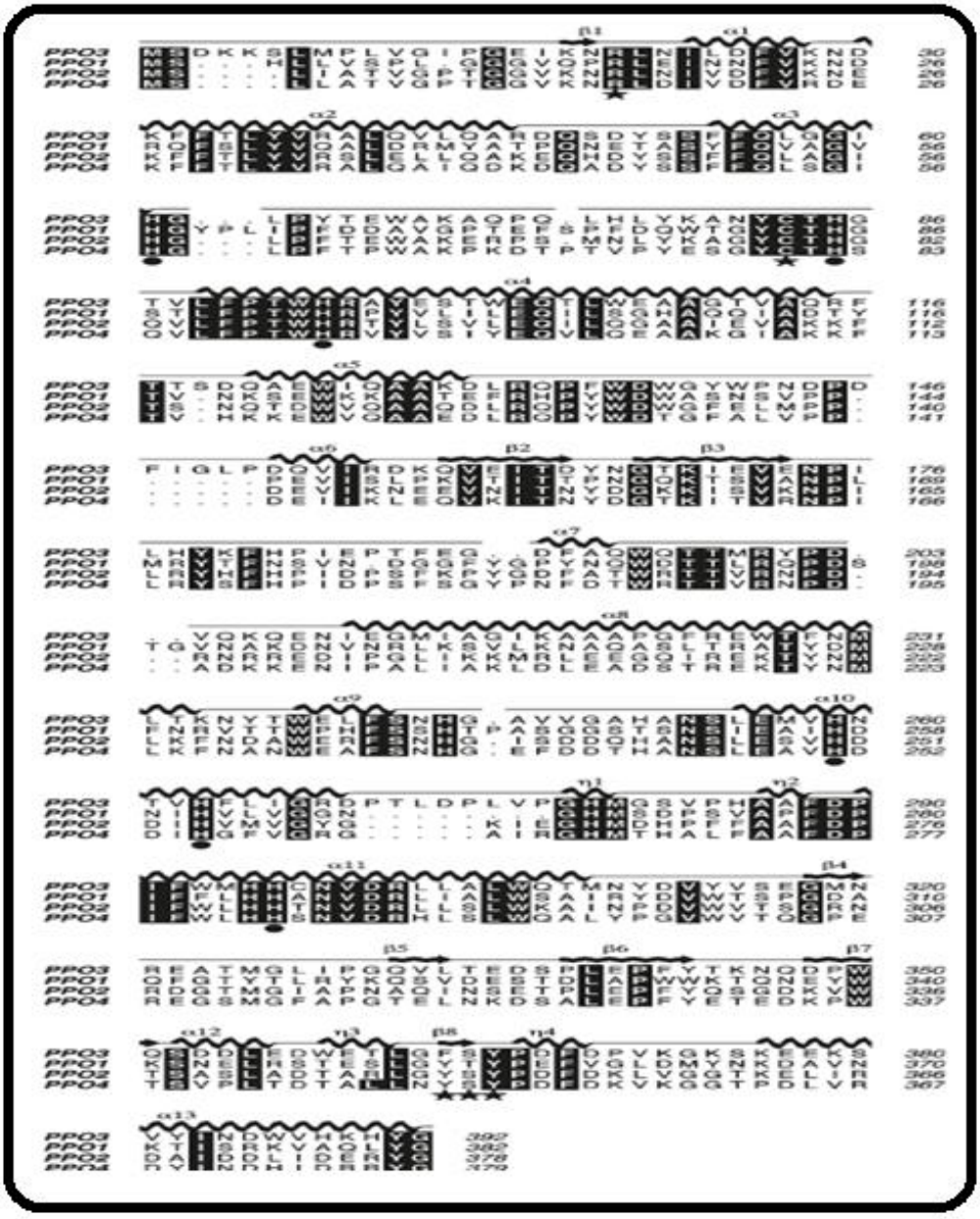
۱-۴-۱- توالی اسیدآمینه‌ای و قلمروهای ساختمانی[1] تیروزیناز

تاکنون بیست توالی اسیدآمینه‌ای از تیروزینازهای مختلف (انواع پروکاریوتی تا گونه‌های انسانی) شناخته شده است. در توالی آمینواسیدی تیروزینازها شباهت و همسانی فراوانی دیده می‌شود و می‌توان در هر گروه قلمروهای حفاظت شده‌ای را مشاهده کرد، که این نشان دهنده‌ی شباهت‌های ساختاری می‌باشد.

تیروزیناز را به‌طور کلی به سه قلمرو تقسیم می‌کنند، که بخش‌های متصل به مس همان قلمرو مرکزی می‌باشد. چندین ناحیه حفاظت شده را با مقایسه توالی اسیدآمینه‌ای تیروزینازها در ناحیه پیوندی مس می‌توان مشاهده کرد، برخی از آن‌ها در همه تیروزینازها دیده می‌شود ولی بقیه تنها در گروه خاصی دیده می‌شوند. نواحی متصل به مس در ساختار تیروزینازها از نظر ترکیب آمینواسیدی با هموسیانین[2] شباهت زیادی دارند. قلمرو دیگر در تیروزیناز گیاهان عالی‌تر، قلمرو ان- ترمینال است که دارای سیگنال پپتیدهای[3] عبوری از غشا می‌باشد و بعد از ترجمه، پروتئین را به سمت غشای شبکه‌ی آندوپلاسمی جهت انتقال بعدی هدایت می‌کنند. در قلمرو ان- ترمینال، مستقیما بعد از سیگنال پپتید یک ناحیه کوچک غنی از سیستئین[4] قرار می‌گیرد که در تیروزیناز گیاهی و جانوری حفاظت شده است. تیروزیناز *آگاریکوس بیس‌پروس* یک آنزیم محلول سیتوزولی می‌باشد، در حالی که تیروزیناز در گیاهان عالی‌تر و پستانداران، در بافت‌های جوان یافت می‌شود و عمدتا غشایی است. تیروزیناز پستانداران پروتئین‌های غشایی ملانوزومی می‌باشند که یک هلیکس منفرد توسعه یافته در غشا و حاوی یک انتهای کربوکسیلیک جهت‌گیری شده به سمت سیتوپلاسم می‌باشد. بخش عمده پروتئین در درون ملانوزوم[5] جای می‌گیرد [۱۸].

تاکنون چهار ژن کدکننده آنزیم تیروزیناز (ppo_1، ppo_2، ppo_3، ppo_4) در *آگاریکوس بیس‌پروس* شناسایی شده است، که ترتیب توالی اسیدآمینه‌ای کد شونده توسط آن‌ها دارای تشابهات فراوانی می‌باشد (شکل۱-۳)[۲۰].

[1] Domain
[2] Hemocyanin
[3] Signal peptide
[4] Cysteine Rich
[5] Melanosome



شکل۱- ۳: توالی اسیدآمینه‌ای تیروزینازهای *آگاریکوس بیس‌پروس* (ppo_1، ppo_2، ppo_3، ppo_4) و ساختار دوم ppo_3 [۲۰].

۱-۵- ساختار جایگاه فعال

در فرآیند تشکیل شدن رنگدانه ملانین، سه نوع تیروزیناز (مت[۱] ، اکسی[۲] و داکسی[۳] تیروزیناز) با ساختار دو مسی جایگاه فعال مختلف، نقش دارند. مت تیروزیناز، فرم استراحتی تیروزیناز شامل دو یون مس تتراگونال[۴] می‌باشد، که به‌صورت آنتی‌فرومگنیتیکالی[۵] توسط یک پل داخلی[۶] به هم متصل شده‌اند.

[1] Met tyrosinase
[2] Oxy tyrosinase
[3] Deoxytyrosinase
[4] Tetragonal
[5] Antiferromagentically
[6] Endogenous

در مت- تیروزیناز هیچ اسیدآمینه‌ای در نزدیکی جایگاه مس نمی‌تواند پل ایجاد کند، بنابراین لیگاند پل زننده باید عامل هیدروکسیلی از آب باشد. علاوه بر این، موقعیت سیستئین نقش مهمی در تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی ایفا می‌کند، که سبب پایداری ساختار پروتئین می‌شود. تعداد سیستئین‌ها از موجودی به موجود دیگر متفاوت است. فرم داکسی تیروزیناز، آنالوگ داکسی هموسیانین می‌باشد. با اضافه شدن پراکسید، مت تیروزیناز به اکسی تیروزیناز تبدیل می‌شود، فرم استراحتی تیروزیناز شامل ۸۵ درصد مت و ۱۵ درصد اکسی می‌باشد. اکسی تیروزیناز با کاهش دو الکترونی داکسی تیروزیناز نیز می‌تواند تولید شود، که با اتصال برگشت‌پذیر دی‌اکسیژن همراه است و با سوبسترای مونوفنول به خوبی سوبسترای دی‌فنول واکنش می‌دهد. اکسی تیروزیناز از دو اتم مس تتراگونال Cu(II) تشکیل شده است. دو اتم مس با یک محور ضعیف عمودی و دو محور محکم افقی با نیتروژن هیستیدین پیوند برقرار کرده‌اند. مولکول اکسیژن به صورت پراکسید متصل می‌شود و بین دو اتم مس یک پل برقرار می‌کند [۱۸،۲۱]. برای بررسی میزان دسترسی لیگاند به جایگاه فعال آنزیم مطالعات سینتیکی به کمک چندین ترکیب مختلف صورت گرفت و مشخص شد که لیگاندهای بزرگتر در مقایسه با لیگاندهای کوچکتر تمایل بیشتری نسبت به جایگاه فعال نشان می‌دهند. با توجه به وجود این سه حالت مس در جایگاه فعال آنزیم یک مدل ساختاری برای مکانیسم واکنش تیروزیناز شامل ئو- هیدروکسیله شدن مونوفنول‌ها و اکسید شدن ئو- دی‌فنول‌های تولید شده در نظر گرفته می‌شود (شکل۱-۴ و شکل۱-۵)[۱۸].