دانشگاه تهران

دانشکده داروسازی

پایان نامه :

برای دریافت درجه دکترا

موضوع

# بررسی مکانیسم مهارشوندگی آنزیم ترانس کیتولاز مهارشوندگی با آنالوگ سوبسترای آنزیمی ملح پتاسیم - ( متانیتروفنیل ) ۲- کتو ۳- بوتنوئیک اسید ( MNPB )

استاد راهنما :

استاد ارجمند جناب آقای دکتر بیژن فرزامی

نگارش

سهیلا اصغری

سال تحصیلی ۶۶- ۶۵ شماره پایان نامه : ۲۴۷۰

۱۰۴۷۵

## تشکر و قدردانی

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر بیژن فرزامی

که در تهیه و تنظیم این رساله مرا راهنمائی

فرموده و کمکهای بیدریغ خودرا نثارم نمودند

بسیار سپاسگزارم .کمکها و محبتهای ایشان را

هرگز فراموش نخواهم کرد.

۱۰۶۷۸

تقـــدیـــم بـــه :

مـا دروپـدرعـزیـزم کـه درکشـا کـش دهـرعمـرعـزیز

خویـش را وقـف فـرزنـدا ن خـودکـردنـدودرهمـــه

مـراحـل زنـدگـی یـا رویـا ورم بـودنـد .

تقديم به :

" همسر مهربانم "

## " فهـــرســت مطـــالـــــب "


| عنـــــــوان | صفحـــه |
|---|---|
| ۱ـ مقـــدمـــــه | ۱ |
| ۲ـ۱ـ موارد شناخته شده دربارهساختمان ومکانیسم واکنش آنزیم ترانس کیتولاز | ۲ |
| ۳ـ۱ـ مکانیسم وشرایط تبدیل مونومربه دیمر | ۳ |
| ۴ـ۱ـ کوآنزیم ترانس کیتولاز | ۴ |
| ۵ـ۱ـ ساختمان جایگاه فعال آنزیم ترانس کیتولاز | ۵ |
| ۶ـ۱ـ نقش هیستیدین درجایگاه فعال ترانس کیتولاز | ۷ |
| ۷ـ۱ـ نقش گروه کربوکسیل درجایگاهفعال ترانس کیتولاز | ۸ |
| ۸ـ۱ـ نقش آرژینین درجایگاه فعال ترانس کیتولاز | ۸ |
| ۹ـ۱ـ مهارشوندگی آنزیم ترانس کیتولاز ومقایسهآن با پیروات دکربوکسیلاز | ۱۲ |
| ۱۰ـ۱ـ نقش ترانس کیتولاز درمتابولیسم هوازی قندهـــا ( دوره پنتوزفسفات ) | ۱۴ |
| ۱۱ـ۱ـ اهمیت شناسائی آنزیم ترانس کیتولاز ازنظرکلینیکی | ۱۷ |
| ۲ـ کـارهـای عملـــــی | ۱۸ |
| ۱ـ۲ـ بررسی پیوندآنزیم ترانس کیتولازبا مهارکنندهبـــه روش مستقیم | ۱۸ |

" فهرست مطالب "


| عنوان | صفحه |
|---|---|
| ۱-۱-۲- اصول کار، دستگاهها و مواد | ۱۸ |
| ۲-۱-۱-۲- اصول | ۱۸ |
| ۲-۱-۱-۲- دستگاههای آزمایشگاهی مورد استفاده | ۱۹ |
| ۳-۱-۱-۲- مواد | ۲۱ |
| ۴-۱-۱-۲- روش کار | ۲۱ |
| ۲-۲-۱-۲- تهیه محلولها | ۲۲ |
| ۳-۲-۱-۲- شرح آزمایش | ۲۲ |
| ۲-۲- بررسی پیوند آنزیم با مهارکننده با استفاده از واکنش های جفت شونده | ۲۴ |
| ۱-۲-۲- اصول کار، دستگاهها و مواد | ۲۴ |
| ۱-۱-۲-۲- اصول کار | ۲۴ |
| ۲-۱-۲-۲- مواد | ۲۴ |
| ۲-۲-۲- روش کار | ۲۷ |
| ۱-۲-۲-۲- تهیه محلولها | ۲۷ |
| ۲-۲-۲-۲- شرح آزمایش | ۲۸ |
| ۱-۲-۲-۲-۲- اندازه‌گیری باقیمانده فعالیت آنزیم پس از ترکیب با مهارکننده آنزیمی درحضورتیامین پیروفسفات ومنیزیم | ۲۸ |

" فهـــرســـت مطـــا لـــــب "


| عنـــــــوان | صفحـــه |
|---|---|
| الف ـ تهیه نمودار استاندارد | ۲۸ |
| ب ـ اندازه‌گیری تغییرات سرعت اولیه آنزیم در زمانهای مختلف واکنش آنزیم ومهارکننده | ۳۰ |
| ۳ـ۲ـ۲ـ۲ـ۲ـ اندازه‌گیری باقیمانده فعالیت آنزیم پس از ترکیب با مهارکننده آنزیمی در غیاب کوفاکتورهای آنزیم (منیزیـــم وتیامین پیروفسفات ) | ۳۱ |
| الف ـ تهیه منحنی استاندارد | ۳۱ |
| ب ـ اندازه‌گیری تغییرات سرعت اولیه آنزیم در زمانهای متفاوت واکنش آنزیم ومهارکننده | ۳۲ |
| ۲ـ۲ـ۲ـ۲ـ نمونه محاسبه شیب خط برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ترانس کیتولاز | ۳۴ |
| ۳ـ۲ـ الکتروفورزروی ژل پلی اکریل آمیدجهت شناسایـی اثرمهارکنندگی برساختمان کواترنری آنزیمـی | ۳۵ |
| ۱ـ۳ـ۲ـ اصول کاردستگاه ومواد | ۳۵ |
| ۱ـ۱ـ۳ـ۲ـ اصـــول | ۳۵ |
| ۲ـ۱ـ۳ـ۲ـ مواد ولوازم | ۳۶ |
| ۲ـ۳ـ۲ـ روش کـــار | ۳۸ |
| ۲ـ۲ـ۳ـ۲ـ تهیه محلولها | ۳۸ |

" فهرست مطالب "


| عنوان | صفحه |
|---|---|
| ۲-۲-۳-۲- تهیه ژل | ۴۱ |
| ۲-۳-۳- شرح آزمایش | ۴۳ |
| الف- الکتروفورزلوله‌ای | ۴۳ |
| ب- الکتروفورز صفحه‌ایی | ۴۴ |
| ۳- نتایج | ۴۷ |
| ۳-۱- بررسی پیوندآنزیم ترانس کیتولاز با مهارکننده به روش مستقیم | ۴۷ |
| ۳-۲- بررسی پیوندآنزیم ترانس کیتولاز با مهارکننده با استفاده ازواکنش جفت شونده (Coupled reaction) | ۵۳ |
| ۳-۳- الکتروفورز روی ژل پلی اکریل آمیدجهت شناسائی اثرمهارکنندگی برساختمان کواترنزآنزیمی | ۷۲ |
| ۴- تفسیرنتایج وبحث | ۷۴ |
| ۵- خلاصه | ۸۱ |
| ۶- منابع | ۸۳ |

## "فهرست اشکال"


| عنوان | صفحه |
|---|---|
| شکل ۱ـ نمونه‌ای از نمودار تغییرات جذب نوری واکنش برحسب زمان | ۳۴ |
| شکل ۲ـ قالب ژل صفحه‌ای | ۴۵ |
| شکل ۳ـ شمای تانک الکتروفورز صفحه‌ای (Slab electrophoresis) | ۴۵ |
| شکل ۴ـ شمای تانک الکتروفورز لوله‌ای (Tube electrophoresis) | ۴۶ |
| شکل ۵ـ مقایسه واکنش‌های پیوند مستقیم آنزیم و مهارکننده برحسب زمان در با فرفسفات و بی کربنات | ۴۹ |
| شکل ۶ـ نمودار ($A_{\infty}$ - At) log در مقابل زمان در واکنش آنزیم و مهارکننده در با فرفسفات و بی کربنات | ۵۲ |
| شکل ۷ـ درصد فعالیت آنزیم ترانس کیتولاز در زمانهای مختلف با زاء مقادیر متفاوت مهارکننده در حضور تیامین پیروفسفات و منیزیم | ۵۸ |
| شکل ۸ـ تغییرات لگاریتم درصد فعالیت آنزیم باقیمانده در زمانهای مختلف با زاء غلظتهای متفاوت مهارکننده در حضور تیامین پیروفسفات و منیزیم | ۶۲ |
| شکل ۹ـ تغییرات لگاریتم K در مقابل لگاریتم غلظت مهارکننده | ۶۳ |
| شکل ۱۰ـ درصد فعالیت آنزیم ترانس کیتولاز در زمانهای مختلف با زاء مقادیر متفاوت مهارکننده در غیاب تیامین پیروفسفات و منیزیم | ۶۶ |

## "فهرست اشکال"


| عنوان | صفحه |
|---|---|
| شکل ۱۱- تغییرات لگاریتم درصدفعالیت آنزیم باقیمانده در زمانهای مختلف باز اء غلظتهای متفاوت مهارکننده‌در غیاب تیامین پیروفسفات ومنیزیم | ۷۰ |
| شکل ۱۲- تغییرات لگاریتم $K$ درمقابل لگاریتم‌مهارکننده | ۷۱ |
| شکل ۱۳- الکتروفورز ژل پلی اکریل آمیدترانس کیتولازهمراه باکوفاکتورها ومهارکننده | |

## "فهرست جداول"


| عنوان | صفحه |
|---|---|
| ۱ـ حجم محلولهای مورد آزمایش وبلانک درآزمایش بررسی پیوند آنزیم ترانس کیتولاز با مهارکننده به‌روش مستقیم | ۲۳ |
| ۲ـ حجم محلولهای مختلف جهت تهیه نمونه آزمایش الکتروفورز | ۴۱ |
| ۳ـ مقادیرتغییرات جذبی ولگاریتم مربوطه نسبت به‌زمان در واکنش مستقیم آنزیم ومهارکننده دربافربی کربنات | ۵۰ |
| ۴ـ مقادیرتغییرات جذبی ولگاریتم مربوطه نسبت به زمان در واکنش مستقیم آنزیم ومهارکننده دربافرفسفات | ۵۱ |
| ۵ـ تغییرات درصد فعالیت آنزیم باقیمانده درزمانهای مختلف لگاریتم آن بازاء غلظتهای متفاوت مهارکننده درحضور تیامین پیروفسفات ومنیزیم | ۵۷ و ۵۶ |
| ۶ـ مقادیردرصد فعالیت آنزیم باقیمانده درزمانهای مختلف ( تا ۳۰ دقیقه ) ولگاریتم آنها بازاء غلظتهای متفاوت مهارکننده درحضورتیامین پیروفسفات ومنیزیم | ۶۰ و ۵۹ |
| ۷ـ مقادیرثابت پیوندی ولگاریتم آن بازاء غلظتهای متفاوت مهارکننده درحضور تیامین پیروفسفات ومنیزیم | ۶۵ و ۶۴ |
| ۸ـ تغییرات درصد فعالیت آنزیم باقیمانده درزمانهای مختلف ولگاریتم آن بازاء غلظتهای متفاوت مهارکننده درغیاب تیامین پیروفسفات ومنیزیم | |
| ۹ـ درصد فعالیت آنزیم باقیمانده درزمانهای مختلف (تا ۳۰دقیقه ) ولگاریتم آنها به‌ازاء غلظتهای متفاوت مهارکننده درغیاب | |

## "فهـــرســـت جـــــدا ول "


| عنـــــوا ن | صفحـه |
| --- | --- |
| تیا مین پیروفسفا ت ومنیزیم | ۶۷ و۶۸ |
| ۱۰ـ مقا دیرثا بت پیوندی ولگا ریتم آ ن با زاء غلظتهـــا ی متفا وت مها رکننده درغیا ب تیا مین پیروفسفا ت ومنیزیم | ۶۹ |

## ۱ـ مقدمه

آنزیم ترانس کیتولاز ( TK ) ازمنابع مختلف ( انسان ، کبدخوک، کبدموش صحرایی و مخمرنانوایی ( Bakers yeast ) .....)بدست آمده است .

ساختمان این آنزیم تا بحال بطوردقیق شناخته نشده است .با آنکه مطالعات زیادی برروی این آنزیم صورت گرفته، اما مکانیسم آنزیمی کاملا" روشن نیست .با اینحال عمل آنزیم TK درواکنشهای متابولیسم واسط درسیکل پنتوز فسفات شناسائی شده است .آنزیم TK قادراست دومرحله ازواکنش سیکل پنتوزفسفات یعنی تبدیل گزیللوز۵ـ فسفات به سدوهپتولوز۷ـ فسفات وتبدیل فرو کتوز۶ـ فسفات به تتروز۴ـ فسفات را انجام دهد . دراین واکنشها آنزیم برای فعالیت احتیاج به تیامین پیروفسفات ( TPP ) و $Mg^{2+}$ دارد .

بعضی ازمهارکننده‌ها قادرهستندبطوراختصاصی با قسمتهایی ازجایگاه ـ فعال آنزیمی ترکیب شوند .تغییراتی که درخواص شیمیائی وفیزیکی آنزیم بدنبال این پیوندایجاد می گردد ، می توانند برای شناسائی عمل آنزیمی ونیزساختمان جایگاه فعال بکاررود .

ترکیب متانیتروفنیل کتوبوتنوئیک اسیدبعنوان مهارکننده‌واکنش آنزیمی پیروات دکربوکسیلاز ( PDC ) که برای واکنش آنزیمی خوداحتیاج به‌تیامین پیروفسفات دارد ،با نتایج بسیارخوب بکاررفته‌است . (۱و۲)

بنابراین بنظرمی رسدکه این مهارکننده‌را میتوان برای شناسائی مکانیسم واحیانا مطالعه ساختمان جایگاه فعال آنزیم TK بکاربرد.

## جنبه موارد شناخته شده درباره ساختمان ومکانیسم واکنش آنزیم ترانس کیتولاز

آنزیم ترانس کیتولازبدست آمده ازمخمرنانوایی ( Bakers yeast) دارای وزن مولکولی ۱۵۹۰۰۰ دالتون میباشد.این آنزیم ازدوواحدتشکیل یافته‌که‌هریک ازاین دوواحدآنزیمی دارای وزن مولکولی حدود ۸۰۰۰۰ دالتون است.(۳)

آنزیم TK بدست آمده ازکبدخوک دارای وزن مولکولی ۱۳۸۰۰۰دالتون است. این آنزیم به صورت یک تترامر ازنمونه $\alpha_2$ و $\beta_2$ میباشد. وزن مولکولی واحدهای $\alpha$ و $\beta$ بوسیله ژل پلی آکریل آمیددرحضور SDS بدست آمده، برابر ۵۶۰۰۰ - ۵۲۰۰۰ و ۲۹۰۰۰-۲۷۰۰۰ است.(۴)

pH اپتیما برای واکنش آنزیمی TK بین ۷/۸ تا ۸/۲ است. (۴a)

درآنزیم TK گروه فسفات سوبسترا برای پیوند با هولو TK ضروری است.(۵)

درساختمان TK بدست آمده ازکبدموش صحرائی واحدمونومرآنزیم فعال بوده‌واختلافی درفعالیت مخصوص آن وفرم دیمرآنزیم وجودندارد.تشکیل دیمرازواحدمونومر TK درکبدموش صحرائی نشان داده نشده است وحدس زده می شودکه درشرایط invivo واحد مونومرآزاد TK به‌حالت آزادوجودندارد‌که دیمرتشکیل دهدبلکه‌فورا " پس ازکامل شدن زنجیره

پلی پپتیدی درحضورتیامین پیروفسفات دیمرتشکیل می شود.(۶)

۲-۱- مکانیسم وشرایط تبدیل مونومربه‌دیمر: دومکانیسم برای دیمریزاسیون TK پیشنها دشده‌است.

$$2(E)\ (Mg^{2+}\text{-TPP}) \rightleftharpoons (Mg^{2+}\text{-TPP})(E)(E)(Mg^{2+}\text{-TPP}) \xrightarrow{Slow} (Mg^{2+}\text{-TPP})(E')(E')(Mg^{2+}\text{-TPP})$$

مکانیسم ۱

$$2(E)(Mg^{2+}\text{-TPP}) \xrightleftharpoons{Slow} (Mg^{2+}\text{-TPP})\ (E)(E)(Mg^{2+}\text{-TPP})$$

مکانیسم ۲

درمدل اول متعاقب پیوندآنزیم با TPP و $Mg^{2+}$ هولوآنزیم به‌شکل فعالترایزومریزه شده‌وتشکیل دیمرمی دهد.

مدل دوم توضیح یک دیمریزاسیون ازکمپلکس کوآنزیم و $Mg^{2+}$ با مونومربا فعالیت کم یا غیرفعال است. دیمریزاسیون به‌غلظت تیامین - پیروفسفات بستگی ندارد بلکه به‌غلظت آنزیم بستگی دارد.که بیانگر آنست که استفاده ازگزیللوز۵- فسفات درجهت تبدیل مقدارکمی مونومر به دیمرموثراست. Kochetov اینطوراظهارنظرکرده‌است، که مونومرو دیمرفعالیت یکسان دارند.(۷) Sable and Egan نشان دادندکه‌فعالیت مونومرازدیمر کمتروحتی کاملا" غیرفعال است.(۸)تبدیل مونومربه دیمرارتباط با درجه‌حرارت و pH دارد هرچه‌درجه حرارت کاهش یابد