

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ



دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش بیوشیمی

عنوان پایان نامه

مطالعه نظری اتصال تعدادی از مهار کننده های جدید آنزیم آدنوزین  
دآمیناز به این آنزیم

استاد راهنما: دکتر کریم مهنام

استاد مشاور: دکتر بهزاد شارقى بروجنى

پژوهشگر: سلیمه رئیسی

مهر ماه ۱۳۹۱

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات  
و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه  
متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

## چکیده

آدنوزین دامیناز (EC ۳.۵.۴.۴)، یک متالو آنزیم حاوی یون روی است. این آنزیم یک نقش کلیدی را در متابولیسم پورین و هیدرولیز غیر قابل برگشت آدنوزین و ۲'-دئوکسی آدنوزین به نوکلئوزید های اینوزین و آمونیاک، بازی می کند. درک برهمکنش آدنوزین دامیناز با مهارکننده هایش برای ایجاد و توسعه نسل های آینده عوامل دارویی ضروری است. شبیه سازی های رایانه ای می توانند این برهمکنش ها را نشان دهند. در بررسی اخیر برهمکنش های بین ۸ مهارکننده و آدنوزین دامیناز توسط محاسبه انرژی های آزاد اتصال آنها مورد مطالعه قرار گرفت. ما از روش داکینگ و شبیه سازی دینامیک مولکولی به منظور بررسی قدرت اتصال این مهارکننده ها به آدنوزین دامیناز استفاده کردیم. در مجموع ۸۰ نانو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی برای مهارکننده های آزاد و ۸۰ نانو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی برای کمپلکس های مهارکننده-آنزیم انجام شد. در پایان انرژی های آزاد اتصال مهارکننده های آدنوزین دامیناز با استفاده از روش انرژی برهمکنش خطی مورد محاسبه قرار گرفتند. نتایج ما به طور واضح نشان دادند که برهمکنش های غیر قطبی نقش چشمگیری را در تعیین انرژی آزاد اتصال بازی می کنند. نتایج همچنین نشان دادند که جایگاه اتصال این مهارکننده ها یک پاکت هیدروفوب است که کاملاً توسط ریشه های هیدروفوب احاطه شده است. ما همچنین دریافتیم که اتصال قویتر منجر به کاهش بیشتر سطح در دسترس حلال برای مهارکننده های قرار گرفته در کمپلکس مهارکننده-آنزیم می شود. همچنین مشخص شد که مهارکننده ۹-(بنزیلوکسی) متیل ۹-پورین-۶-آمین با کمترین انرژی آزاد اتصال و بیشترین تعداد پیوند هیدروژنی در میان این مهارکننده ها قدرت اتصال بیشتری به آنزیم آدنوزین دامیناز دارد و می تواند برای بررسی های دقیق تر مطالعات نظری و همچنین مطالعات تجربی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی:

آدنوزین دامیناز، مهارکننده، انرژی های آزاد اتصال، داکینگ، شبیه سازی دینامیک مولکولی.

## فهرست مطالب

شماره صفحه

عنوان

|    |  |
|----|--|
| ۸  | فصل اول - مقدمه .....  |
| ۱۲ | ۱-۱ ساختار و عملکرد آدنوزین دامیناز .....                                    |
| ۱۵ | ۱-۱-۱ مکانیسم عمل آدنوزین دامیناز .....                                      |
| ۱۹ | ۲-۱-۱ نقص و کمبود آدنوزین دامیناز .....                                      |
| ۲۰ | ۳-۱-۱ آنمی همولیتیک ناشی از افزایش فعالیت آدنوزین دامیناز .....              |
| ۲۱ | ۴-۱-۱ مکانیسم اختصاصی سمیت زایی آدنوزین و دئوکسی آدنوزین .....               |
| ۲۴ | ۵-۱-۱ ویژگی های برهمکنش آدنوزین دامیناز با مهارکننده ها .....                |
| ۲۴ | ۱-۵-۱-۱ مکانیسم اتصال مهارکننده های آدنوزین دامیناز .....                    |
| ۲۵ | ۲-۵-۱-۱ برهمکنش آدنوزین دامیناز با مهارکننده های حالت گذار .....             |
| ۲۹ | ۳-۵-۱-۱ برهمکنش آدنوزین دامیناز با مهارکننده های حالت پایه .....             |
| ۳۰ | ۴-۵-۱-۱ نقش گروه های عاملی مختلف مهارکننده در اتصال به آدنوزین دامیناز ..... |
| ۳۱ | ۲-۱ مدلسازی و شبیه سازی مولکولی .....  |
| ۳۱ | ۱-۲-۱ مدلسازی مولکولی .....  |
| ۳۱ | ۲-۲-۱ روش های شیمی محاسباتی .....  |
| ۳۲ | ۱-۲-۲-۱ مکانیک مولکولی .....   |
| ۳۶ | ۲-۲-۲-۱ دینامیک مولکولی .....  |
| ۳۹ | ۱-۲-۲-۲-۱ شرایط مرزی متناوب .....  |
| ۴۰ | ۲-۲-۲-۲-۱ برد نیروها در شبیه سازی .....                                      |
| ۴۲ | ۳-۲-۲-۲-۱ مدل های حلالیت در شبیه سازی .....                                  |
| ۴۴ | ۴-۲-۲-۲-۱ تجزیه و تحلیل خروجی یک شبیه سازی دینامیک مولکولی .....             |
| ۴۵ | ۳-۱ معرفی برنامه گرومکس .....  |
| ۴۸ | ۴-۱ روش های محاسبه قدرت اتصال لیگاند-رسپتور در کمپلکس های بیومولکولی .....   |
| ۴۹ | ۱-۴-۱ روش انرژی برهمکنش خطی .....  |
| ۵۲ | ۲-۴-۱ روش مکانیک مولکولی-سطح در دسترس پوآزی بولتزمن .....                    |
| ۵۴ | ۵-۱ مدل سازی داکینگ .....  |
| ۵۷ | ۶-۱ ضرورت انجام تحقیق .....  |

## فهرست مطالب

شماره صفحه

عنوان

|     |  |
|-----|--|
| ۵۸  | فصل دوم- مواد و روش ها   |
| ۶۰  | ۱-۲ انجام داکینگ   |
| ۶۰  | ۱-۱-۲ ترسیم و بهینه سازی ساختار مهارکننده ها   |
| ۶۲  | ۲-۱-۲ آماده سازی مهارکننده ها برای داکینگ  |
| ۶۲  | ۳-۱-۲ آماده سازی فایل مختصات آدنوزین دامیناز و محاسبات نقشه شبکه برای داکینگ                       |
| ۶۴  | ۲-۲ انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی  |
|     | ۱-۲-۲ آماده سازی ساختار شروع کمپلکس آدنوزین دامیناز-مهارکننده برای انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی |
| ۶۴  | ۲-۲-۲ در نظر گیری مدل پیوسته برای جایگاه فعال آدنوزین دامیناز و پارامتریزه کردن جایگاه فعال        |
| ۶۵  | ۳-۲-۲ بارهای جزئی جایگاه فعال  |
| ۶۶  | ۴-۲-۲ شبیه سازی دینامیک مولکولی مهارکننده های آزاد در آب   |
| ۶۸  | ۵-۲-۲ شبیه سازی دینامیک مولکولی کمپلکس های مهارکننده-آنزیم در آب                                   |
| ۶۹  | ۳-۲ انجام تابکاری شبیه سازی شده  |
| ۷۲  | ۴-۲ محاسبه سطح در دسترس حلال لیگاند  |
| ۷۳  | ۵-۲ محاسبه انرژی آزاد اتصال مهارکننده ها به آدنوزین دامیناز توسط روش انرژی برهمکنش خطی             |
| ۷۴  | ۶-۲ برنامه LIGPLOT   |
| ۷۵  | فصل سوم- نتایج   |
| ۷۶  | ۱-۳ نتایج حاصل از داکینگ مهارکننده ها به ساختار کریستالوگرافی آدنوزین دامیناز                      |
| ۷۶  | ۲-۳ نتایج شبیه سازی دینامیک مولکولی  |
| ۸۱  | ۱-۲-۳ نتایج RMSD در طول شبیه سازی دینامیک مولکولی  |
| ۸۱  | ۲-۲-۳ نتایج فاصله مرکز جرم مهارکننده ها از مرکز جرم پروتئین  |
| ۸۷  | ۳-۳ نتایج حاصل از بررسی خواص ترمودینامیکی در طول شبیه سازی دینامیک مولکولی                         |
| ۹۱  | ۱-۳-۳ بررسی انرژی و دما  |
| ۹۱  | ۲-۳-۳ محاسبه انرژی های آزاد اتصال توسط روش انرژی برهمکنش خطی و سطح در دسترس حلال                   |
| ۱۰۰ | ۳-۳-۳ بررسی پیوندهای هیدروژنی  |
| ۱۰۴ | ۴-۳ نتایج حاصل از نحوه برهمکنش میان مهارکننده ها و آدنوزین دامیناز                                 |

## فهرست مطالب

| شماره صفحه | عنوان  |
|------------|--|
| ۱۱۳        | فصل چهارم - بحث و نتیجه گیری .....                               |
| ۱۱۳        | ۱-۴ بررسی داکینگ مهارکننده ها .....                              |
| ۱۱۵        | ۲-۴ بررسی RMSD در طول شبیه سازی دینامیک مولکولی .....            |
| ۱۱۶        | ۳-۴ بررسی فاصله مرکز جرم مهارکننده ها از مرکز جرم پروتئین .....  |
| ۱۱۷        | ۴-۴ بررسی انرژی و دما در طول شبیه سازی دینامیک مولکولی .....     |
| ۱۱۸        | ۵-۴ بررسی انرژی های آزاد اتصال و سطح در دسترس حلال .....         |
| ۱۲۱        | ۶-۴ بررسی نحوه برهمکنش میان مهارکننده ها و آدنوزین دامیناز ..... |
| ۱۲۷        | نتیجه گیری .....   |
| ۱۲۹        | پیشنهادات .....  |
| ۱۳۰        | منابع .....  |

## فهرست شکل ها

شماره صفحه

عنوان

- شکل ۱-۱. دامیناسیون غیر قابل برگشت آدنوزین و ۲'-دئوکسی آدنوزین توسط آنزیم آدنوزین دامیناز . ۹
- شکل ۱-۲. ساختار سه بعدی آدنوزین دامیناز و نحوه قرارگیری یون روی در شکاف عمیق جایگاه فعال . ۱۲
- شکل ۱-۳. ساختار جایگاه فعال آدنوزین دامیناز و ارتباط یون روی با پنج اتم قرار گرفته در جایگاه فعال ..... ۱۳
- شکل ۱-۴. صورتبندی های باز و بسته جایگاه فعال آدنوزین دامیناز ..... ۱۴
- شکل ۱-۵. زیرواحدهای جایگاه فعال و تشکیل صورتبندی های مختلف جایگاه فعال ..... ۱۵
- شکل ۱-۶. واکنش کاتالیتیکی آدنوزین دامیناز و تشکیل کمپلکس میکائیلیس ..... ۱۶
- شکل ۱-۷. مکانیسم عمل آدنوزین دامیناز بر اساس واکنش حذف و اضافه ..... ۱۷
- شکل ۱-۸. مکانیسم واکنش آنزیمی آدنوزین دامیناز ..... ۱۸
- شکل ۱-۹. اثر آدنوزین و ۲'-دئوکسی آدنوزین بر روی هیدرولیز آدنوزیل هموسیستین ..... ۲۴
- شکل ۱-۱۰. برهمکنش ۶-هیدروکسی پورین ریبوزید با جایگاه فعال آدنوزین دامیناز ..... ۲۷
- شکل ۱-۱۱. ساختار فضایی یون روی و دئوکسی کوفورمایسین در جایگاه فعال آدنوزین دامیناز ..... ۲۸
- شکل ۱-۱۲. نمونه ای از توابع برهمکنش در میدان های نیرو ..... ۳۳
- شکل ۱-۱۳. کمپنه های محلی توسط سدهای انرژی از یکدیگر جدا می شوند ..... ۳۵
- شکل ۱-۱۴. اعمال شرایط مرزی متناوب در دو بعد ..... ۴۰
- شکل ۱-۱۵. شعاع قطع و پهنای ورله در دو بعد ..... ۴۲
- شکل ۱-۱۶. دستورات انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی توسط نرم افزار گرومکس ..... ۴۷
- شکل ۱-۱۷. تخمین انرژی آزاد اتصال با استفاده از روش انرژی برهمکنش خطی ..... ۵۰
- شکل ۱-۱۸. شبکه ترسیم شده مورد استفاده در برنامه اتوگرید ..... ۵۵
- شکل ۱-۲. خلاصه ای از مراحل انجام کار به منظور بررسی قدرت اتصال تعدادی از مهارکننده های آدنوزین دامیناز ..... ۵۹
- شکل ۲-۲. ساختار مهارکننده های مورد استفاده در این تحقیق ..... ۶۱
- شکل ۲-۳. ساختار کریستالوگرافی آدنوزین دامیناز با کد 1VFL ..... ۶۴
- شکل ۲-۴. بارهای جزئی مورد استفاده برای مدل جایگاه فعال ..... ۶۷
- شکل ۲-۵. جعبه شبیه سازی و کمپلکس آنزیم-مهارکننده واقع در آن ..... ۷۰
- شکل ۳-۱. ساختار سه بعدی و بهینه شده مهارکننده های مورد بررسی ..... ۷۷
- شکل ۳-۲. نتایج حاصل از داکینگ مهارکننده ها به ساختار کریستالی آدنوزین دامیناز ..... ۷۹
- شکل ۳-۳. RMSD اسکلت اصلی پروتئین نسبت به زمان برای آدنوزین دامیناز بدون مهارکننده ..... ۸۳
- شکل ۳-۴. RMSD جایگاه فعال پروتئین نسبت به زمان برای آدنوزین دامیناز بدون مهارکننده ..... ۸۳



## فهرست شکل ها

- شکل ۳-۵. RMSD اسکلت اصلی پروتئین نسبت به زمان برای کمپلکس کوفورمایسین-آدنوزین  
دآمیناز ..... ۸۴
- شکل ۳-۶. RMSD اسکلت اصلی پروتئین نسبت به زمان برای کمپلکس پنتواستاتین-آدنوزین دآمیناز ..... ۸۴
- شکل ۳-۷. RMSD اسکلت اصلی پروتئین نسبت به زمان برای کمپلکس مهارکننده ۱-آدنوزین دآمیناز ..... ۸۴
- شکل ۳-۸. RMSD اسکلت اصلی پروتئین نسبت به زمان برای کمپلکس مهارکننده ۲-آدنوزین دآمیناز ..... ۸۵
- شکل ۳-۹. RMSD اسکلت اصلی پروتئین نسبت به زمان برای کمپلکس مهارکننده ۳-آدنوزین دآمیناز ..... ۸۵
- شکل ۳-۱۰. RMSD اسکلت اصلی پروتئین نسبت به زمان برای کمپلکس مهارکننده ۴-آدنوزین  
دآمیناز ..... ۸۵
- شکل ۳-۱۱. RMSD اسکلت اصلی پروتئین نسبت به زمان برای کمپلکس مهارکننده ۵-آدنوزین  
دآمیناز ..... ۸۶
- شکل ۳-۱۲. RMSD اسکلت اصلی پروتئین نسبت به زمان برای کمپلکس مهارکننده ۶-آدنوزین  
دآمیناز ..... ۸۶
- شکل ۳-۱۳. تغییرات مرکز جرم کوفورمایسین از مرکز جرم آدنوزین دآمیناز نسبت به زمان ..... ۸۸
- شکل ۳-۱۴. تغییرات مرکز جرم پنتواستاتین از مرکز جرم آدنوزین دآمیناز نسبت به زمان ..... ۸۸
- شکل ۳-۱۵. تغییرات مرکز جرم مهارکننده ۱ از مرکز جرم آدنوزین دآمیناز نسبت به زمان ..... ۸۸
- شکل ۳-۱۶. تغییرات مرکز جرم مهارکننده ۲ از مرکز جرم آدنوزین دآمیناز نسبت به زمان ..... ۸۹
- شکل ۳-۱۷. تغییرات مرکز جرم مهارکننده ۳ از مرکز جرم آدنوزین دآمیناز نسبت به زمان ..... ۸۹
- شکل ۳-۱۸. تغییرات مرکز جرم مهارکننده ۴ از مرکز جرم آدنوزین دآمیناز نسبت به زمان ..... ۸۹
- شکل ۳-۱۹. تغییرات مرکز جرم مهارکننده ۵ از مرکز جرم آدنوزین دآمیناز نسبت به زمان ..... ۹۰
- شکل ۳-۲۰. تغییرات مرکز جرم مهارکننده ۶ از مرکز جرم آدنوزین دآمیناز نسبت به زمان ..... ۹۰
- شکل ۳-۲۱. تغییرات انرژی جنبشی برای کمپلکس آدنوزین دآمیناز-کوفورمایسین ..... ۹۲
- شکل ۳-۲۲. تغییرات انرژی جنبشی برای کمپلکس آدنوزین دآمیناز-پنتواستاتین ..... ۹۳
- شکل ۳-۲۳. تغییرات انرژی جنبشی برای کمپلکس آدنوزین دآمیناز-مهارکننده ۱ ..... ۹۳
- شکل ۳-۲۴. تغییرات انرژی جنبشی برای کمپلکس آدنوزین دآمیناز-مهارکننده ۲ ..... ۹۴
- شکل ۳-۲۵. تغییرات انرژی جنبشی برای کمپلکس آدنوزین دآمیناز-مهارکننده ۳ ..... ۹۴
- شکل ۳-۲۶. تغییرات انرژی جنبشی برای کمپلکس آدنوزین دآمیناز-مهارکننده ۴ ..... ۹۵
- شکل ۳-۲۷. تغییرات انرژی جنبشی برای کمپلکس آدنوزین دآمیناز-مهارکننده ۵ ..... ۹۵
- شکل ۳-۲۸. تغییرات انرژی جنبشی برای کمپلکس آدنوزین دآمیناز-مهارکننده ۶ ..... ۹۶

## فهرست شکل ها

شماره صفحه

عنوان

|     |   |
|-----|---|
| ۹۶  | ..... شکل ۳-۲۹. تغییرات انرژی پتانسیل برای کمپلکس آدنوزین دامیناز-کوفورمایسین                       |
| ۹۷  | ..... شکل ۳-۳۰. تغییرات انرژی پتانسیل برای کمپلکس آدنوزین دامیناز-پنتواستاتین                       |
| ۹۷  | ..... شکل ۳-۳۱. تغییرات انرژی پتانسیل برای کمپلکس آدنوزین دامیناز-مهارکننده ۱                       |
| ۹۸  | ..... شکل ۳-۳۲. تغییرات انرژی پتانسیل برای کمپلکس آدنوزین دامیناز-مهارکننده ۲                       |
| ۹۸  | ..... شکل ۳-۳۳. تغییرات انرژی پتانسیل برای کمپلکس آدنوزین دامیناز-مهارکننده ۳                       |
| ۹۹  | ..... شکل ۳-۳۴. تغییرات انرژی پتانسیل برای کمپلکس آدنوزین دامیناز-مهارکننده ۴                       |
| ۹۹  | ..... شکل ۳-۳۵. تغییرات انرژی پتانسیل برای کمپلکس آدنوزین دامیناز-مهارکننده ۵                       |
| ۱۰۰ | ..... شکل ۳-۳۶. تغییرات انرژی پتانسیل برای کمپلکس آدنوزین دامیناز-مهارکننده ۶                       |
| ۱۰۲ | ..... شکل ۳-۳۷. تغییرات انرژی واندروالس در مقابل انرژی آزاد اتصال پیشگویی شده                       |
| ۱۰۲ | ..... شکل ۳-۳۸. تغییرات انرژی الکترواستاتیک در مقابل انرژی آزاد اتصال پیشگویی شده                   |
| ۱۰۳ | ..... شکل ۳-۳۹. تغییرات سطح در دسترس حلال در مقابل انرژی آزاد اتصال پیشگویی شده                     |
| ۱۰۳ | ..... شکل ۳-۴۰. نمودار انرژی های آزاد اتصال پیش بینی شده از داکینگ در برابر روش انرژی برهمکنش خطی   |
| ۱۰۵ | ..... شکل ۳-۴۱. برهمکنش های میان کوفورمایسین و آدنوزین دامیناز                                      |
| ۱۰۶ | ..... شکل ۳-۴۲. برهمکنش های میان پنتواستاتین و آدنوزین دامیناز                                      |
| ۱۰۷ | ..... شکل ۳-۴۳. برهمکنش های میان مهارکننده ۱ و آدنوزین دامیناز                                      |
| ۱۰۸ | ..... شکل ۳-۴۴. برهمکنش های میان مهارکننده ۲ و آدنوزین دامیناز                                      |
| ۱۰۹ | ..... شکل ۳-۴۵. برهمکنش های میان مهارکننده ۳ و آدنوزین دامیناز                                      |
| ۱۱۰ | ..... شکل ۳-۴۶. برهمکنش های میان مهارکننده ۴ و آدنوزین دامیناز                                      |
| ۱۱۱ | ..... شکل ۳-۴۷. برهمکنش های میان مهارکننده ۵ و آدنوزین دامیناز                                      |
| ۱۱۲ | ..... شکل ۳-۴۸. برهمکنش های میان مهارکننده ۶ و آدنوزین دامیناز                                      |
| ۱۱۵ | ..... شکل ۴-۱. طرح روبانی ساختار کریستالی آدنوزین دامیناز و برهمکنش آن با کوفورمایسین و پنتواستاتین |

## فهرست جدول ها

شماره صفحه

عنوان

- جدول ۱-۲. پارامترهای طول پیوند و ثابت های نیروی پیوند میدان نیرو برای یون روی ..... ۶۵
- جدول ۲-۲. پارامترهای زاویه و ثابت های نیروی زاویه میدان نیرو برای یون روی ..... ۶۶
- جدول ۳-۲. بارهای جزئی یون روی و اتمهای متصل به آن در جایگاه فعال آدنوزین دامیناز ..... ۶۷
- جدول ۱-۳. انرژی های آزاد اتصال داکینگ مهارکننده ها به ساختار کریستالی آدنوزین دامیناز ..... ۸۰
- جدول ۲-۳. RMSD در ۳ نانو ثانیه آخر از ۱۰ نانو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی کمپلکس های مهارکننده-آدنوزین دامیناز ..... ۸۲
- جدول ۳-۳. فاصله مرکز جرم و میانگین فاصله بین مهارکننده و پروتئین در ۳ نانو ثانیه آخر از ۱۰ نانو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی کمپلکس های مهارکننده-آدنوزین دامیناز ..... ۸۷
- جدول ۴-۳. نسبت انحراف معیار انرژی کل به میانگین انرژی کل کمپلکس های مهارکننده-آدنوزین دامیناز در طول ۱۰ نانو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی ..... ۹۱
- جدول ۵-۳. مقادیر انرژی و دما برای ۳ نانو ثانیه آخر از ۱۰ نانو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی کمپلکس آدنوزین دامیناز-مهارکننده ..... ۹۲
- جدول ۶-۳. انرژی های واندروالس، الکترواستاتیک و سطح در دسترس حلال مهارکننده های آزاد در آب و مهارکننده های قرار گرفته در کمپلکس مهارکننده-پروتئین، برای ۳ نانو ثانیه آخر از ۱۰ نانو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی ..... ۱۰۱

## فصل اول

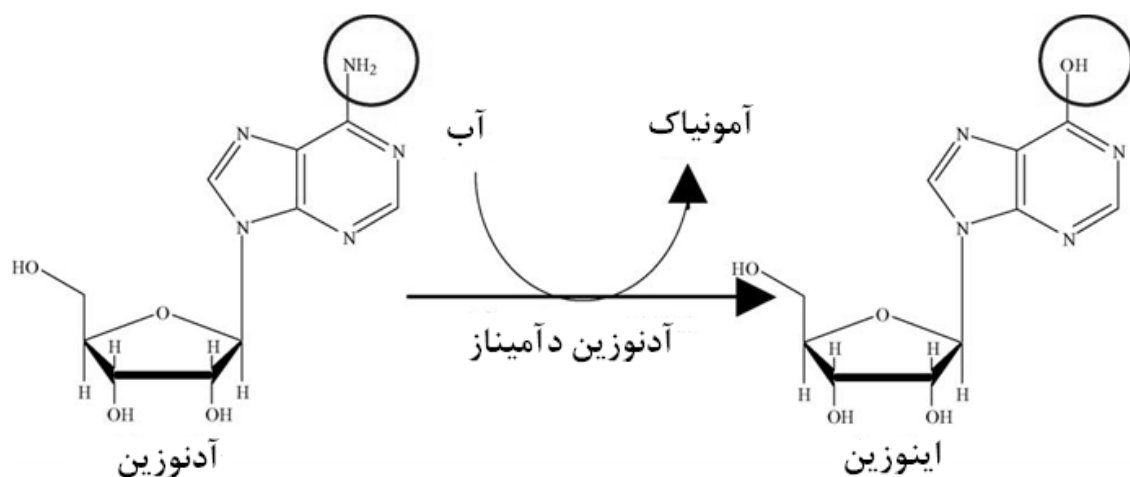
### مقدمه

آدنوزین دامیناز<sup>۱</sup> (EC ۳.۵.۴.۴) و یا آدنوزین آمینوهیدرولاز یک آنزیم کلیدی در متابولیسم پورین است که دامیناسیون هیدرولیتیک غیر قابل برگشت آدنوزین و یا ۲'-دئوکسی آدنوزین را کاتالیز کرده و سبب تولید متابولیت غیرفعال اینوزین و یا ۲'-دئوکسی اینوزین و آمونیاک می شود (شکل ۱-۱) (Saboury *et al.*, 2002). عدد اول در شماره آنزیمی این آنزیم بیانگر این است که این آنزیم از گروه هیدرولازها است. عدد دوم بیانگر هیدرولیز پیوندهای کربن-نیتروژن غیر پپتیدی توسط آنزیم است. اعداد سوم و چهارم نشان دهنده سوپستراهای این آنزیم هستند به طوری که عدد سوم نشان دهنده سوپسترای آمیدین های حلقوی است و عدد چهارم نشان دهنده سوپسترای اصلی آدنوزین می باشد (Pfrogner, 1967b). این آنزیم در تمامی سلول های بدن مهره داران وجود دارد و به اشکال مختلف مولکولی و ایزوآنزیمی شناخته شده است و همچنین توالی آمینو اسیدی این آنزیم کاملاً حفاظت شده هستند (Chang *et al.*, 1991; Saboury *et al.*, 2002).

---

<sup>۱</sup> ADA: Adenosine Deaminase

آدنوزین دامیناز یک آنزیم سیتوزولی است، اما تحقیقات زیادی نشان داده که آدنوزین دامیناز ممکن است روی سطح سلول هم دیده شود که به آن اکتو آدنوزین دامیناز<sup>۱</sup> گفته می شود. از لحاظ فعالیت کاتالیتیکی هیچ تفاوتی بین آدنوزین دامیناز سیتوزولی و اکتو آدنوزین دامیناز وجود ندارد. سه ایزوفرم مولکولی از آدنوزین دامیناز شناخته شده است: دو شکل آدنوزین دامیناز نوع یک، شکلی با وزن مولکولی پائین و دیگری با وزن مولکولی بالا همراه با یک پروتئین متصل شونده به آنزیم. ایزوفرم دیگر آدنوزین دامیناز نوع دو، آنزیمی با وزن مولکولی بالاست (Muraoka *et al.*, 1990; Gakis, 1996; Andreasyan *et al.*, 2005). این دو ایزوفرم از لحاظ pH بهینه، ثابت میکائیلیس و ویژگی های سوبسترا با هم متفاوت اند. آدنوزین دامیناز نوع یک تمایل بیشتری به ۲'-دئوکسی آدنوزین داشته و در تمام بافت ها یافت می شود، در حالیکه آدنوزین دامیناز نوع دو دارای ویژگی نسبت به آدنوزین بوده و در ماکروفاژها وجود دارد (Muraoka *et al.*, 1990; Andreasyan *et al.*, 2005).



شکل ۱-۱. دامیناسیون غیر قابل برگشت آدنوزین و ۲'-دئوکسی آدنوزین توسط آنزیم آدنوزین دامیناز (Paul *et al.*, 2005).

آدنوزین دامیناز به علت خصوصیات ویژه ای که دارد از جنبه های مختلف توجه محققین را به خود معطوف کرده است. این آنزیم علاوه بر اهمیتی که در فرآیندهای فیزیولوژیکی از نظر کنترل غلظت آدنوزین و دئوکسی آدنوزین دارد، در مطالعات کمپلکس های حالت گذار سوبسترا-آنزیم<sup>۲</sup> و مقایسه آن با کمپلکس های حالت پایه<sup>۳</sup>، نیز حائز اهمیت است.

<sup>1</sup> Ecto- adenosine deaminase

<sup>2</sup> Transition state complex

<sup>3</sup> Ground state complex

آدنوزین دامیناز با دارا بودن یون روی در مرکز جایگاه فعال خود جزء متالوآنزیم ها است و محققین بر اساس مطالعات ارتباط ساختار-فعالیت<sup>۱</sup> و با بررسی اثر آنالوگ های مختلف بر روی آنزیم به اطلاعات ارزشمندی درباره آمینواسیدهای درگیر در اتصال و فعالیت کاتالیتیکی آنزیم دست یافته اند (Wilson *et al.*, 1991). به طور کلی تعدادی از آنالوگ های آدنوزین، که دارای اهمیت بالقوه در شیمی درمانی سرطان، ایمنی شناسی و ویروس شناسی هستند، در واقع سوپسترای آدنوزین دامیناز بوده و بوسیله دامیناسیون بی اثر می گردند (Pfrogner, 1975; Agarwal *et al.*, 1967b). دامیناسیون موجب عدم فعالیت آنالوگ های آدنوزین شده و کاربرد این آنالوگ ها را در شیمی درمانی ضد ویروسی و سرطان محدود می کند. به همین منظور محققان اقدام به طراحی و ساخت مهارکننده های آدنوزین دامیناز کرده اند به طوری که مهارکننده های این آنزیم به عنوان دارو یا کمک دارو مورد استفاده قرار می گیرند (Harriman *et al.*, 1992; Cristalli *et al.*, 1994; Pragnacharyulu *et al.*, 1996).

لازم به ذکر است که بسیاری از داروهایی که خاصیت ضد سرطان، ضد ویروسی و آنتی متابولیت دارند توسط آدنوزین دامیناز دامینه شده و خاصیت اصلی خود را از دست می دهند (Ogilvie, 1982; Kinoshita *et al.*, 2005). با کاربرد مهارکننده های آدنوزین دامیناز همراه این داروها و به عنوان کمک دارو می توان از دامیناسیون این عوامل شیمی درمانی تا حدود زیادی جلوگیری کرد. به عنوان مثال پنتواستاتین یا ۲-دئوکسی کوفورمایسین یکی از فعال ترین مهارکننده های آدنوزین دامیناز است که دارای کاربردهای بالینی در اعمال ضد باکتریایی، ضد ویروسی، شیمی درمانی ضد توموری و به عنوان سرکوب کننده سیستم ایمنی در دفع پیوند است (Klohs and Kraker, 1992; Ibrahim *et al.*, 1995). پنتواستاتین تنها مهارکننده ی آدنوزین دامیناز است که دارای کاربرد بالینی دارد و تنها از طریق تزریق درون وریدی مورد استفاده قرار می گیرد و علاوه بر این در درمان های محدود بیماران دارای لوسمی نیز مورد استفاده قرار می گیرد (Terasaka *et al.*, 2005). همچنین جهت معالجه اختلالات تکثیر غیرعادی سلول های لنفاوی<sup>۲</sup> و درمان آنمی همولیتیک ناشی از افزایش فعالیت آدنوزین دامیناز نیز دارای کاربرد است (Harriman *et al.*, 1994). اهمیت دیگر مهارکننده های آدنوزین دامیناز نقش آنها در سنتز ترکیبات مشابه سوپسترا و بر پایه ارتباط ساختار-فعالیت<sup>۳</sup> است (Cristalli *et al.*, 1994; Da Settimo *et al.*, 2005). کاملاً مشخص است که گروه های عاملی معینی از آنزیم و سوپسترا مسئول تشکیل کمپلکس آنزیم-سوپسترا در یک واکنش آنزیمی هستند. بنابراین با بررسی جایگاه فعال آنزیم، امکان طراحی و سنتز مهارکننده های جدید وجود دارد.

<sup>1</sup> Structure- Activity relationship

<sup>2</sup> Lymphoproliferative

<sup>3</sup> Structure Activity Relationships

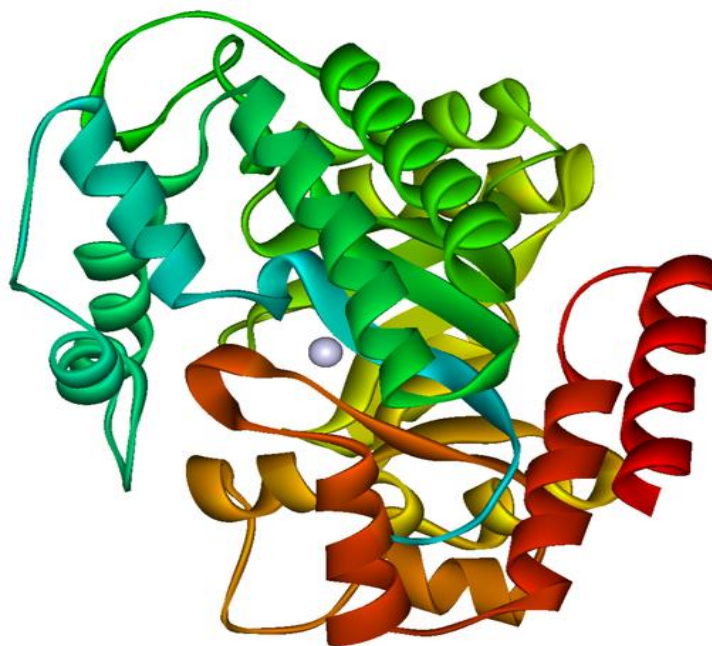
به منظور بررسی برهمکنش آدنوزین دآمیناز با مهارکننده هایش باید انرژی آزاد اتصال این آنزیم در زمان برهمکنش با مهارکننده ها محاسبه شود. تاکنون محققان بسیاری با استفاده از روش های تجربی اقدام به محاسبه انرژی آزاد اتصال و در نتیجه طراحی مهارکننده های جدید کرده اند. که از جمله این روش ها می توان به روش میکرو کالریمتری تیتراسیون هم دما<sup>5</sup>، اشاره کرد. برای تعیین ثابت اتصال مهارکننده به آنزیم، روش میکرو کالریمتری تیتراسیون هم دما، به سادگی و با دقت بالا می تواند مورد استفاده واقع شود (Saboury *et al.*, 2002; Saboury *et al.*, 2004). درک برهمکنش آدنوزین دآمیناز با سوبسترا، آنالوگ های سوبسترا و مهارکننده هایش در سطح مولکولی در توسعه نسل جدید عواملی که به عنوان مهارکننده یا سوبسترا عمل می کنند، مهم است. شبیه سازی های رایانه ای می تواند این برهمکنش ها را در سطح مولکولی امتحان کند و ویژگی های مهم برهمکنش آنزیم-سوبسترا و آنزیم-مهارکننده را توصیف کند (Marrone *et al.*, 1996; Andreasyan *et al.*, 2005). همچنین می توان گفت که، شبیه سازی دینامیک مولکولی و محاسبه انرژی های آزاد اتصال مهارکننده ها و کمپلکس آنها با آدنوزین دآمیناز می تواند برای درک ساختاری و دینامیکی رفتار این مولکول ها و کمک به درک تفاوت در قدرت اتصال این مهارکننده ها مورد استفاده قرار گیرد. به منظور درک برهمکنش آدنوزین دآمیناز با مهارکننده ها و طراحی و توسعه مهارکننده های جدید، بسیاری از محققین با بکارگیری روش های شیمی محاسباتی و انجام شبیه سازی های رایانه ای انرژی آزاد اتصال مهارکننده ها به این آنزیم را مورد بررسی قرار داده اند (Marrone *et al.*, 1996; Zarubin *et al.*, 2002a,b; Gleeson *et al.*, 2003; Coi *et al.*, 2006).

---

<sup>5</sup> ITC: Isothermal Titration Calorimetry

## ۱-۱ ساختار و عملکرد آدنوزین دامیناز

به منظور درک مکانیسم واکنش کاتالیز شده توسط آدنوزین دامیناز و سنتز محصولات دارویی موثر، آشکار شدن ساختار جایگاه فعال آنزیم و ریشه های آمینواسیدی مسئول برای عملکرد و اتصال به سوبسترا و مهارکننده ها ضروری است. آدنوزین دامیناز گلیکو پروتئینی با وزن تقریبی ۳۴/۵ کیلو دالتون است (Saboury *et al.*, 2004)، که از یک زنجیره ی پلی پپتیدی منفرد با ۳۱۱ آمینواسید تشکیل شده، که در سال ۱۹۸۴ توالی آن مورد بررسی قرار گرفته است. توالی های آمینواسیدی آدنوزین دامیناز در تمامی موجودات به شدت حفاظت شده هستند. مطالعات ساختار کریستالی آدنوزین دامیناز موش نشان داده است که، پروتئین از یک موتیف هشت رشته ای  $\alpha/\beta$  با پنج  $\alpha$  هلیکس اضافی تشکیل شده است و جایگاه فعال در انتهای C ترمینال بشکه بتا<sup>۱</sup> قرار گرفته است. ساختارهای کریستالی نشان داده است که آدنوزین دامیناز یک متالو آنزیم است که از یک مول یون روی به ازای هر مول پروتئین تشکیل شده است (شکل ۱-۲) (Caiolfa *et al.*, 1998; Coi *et al.*, 2006).



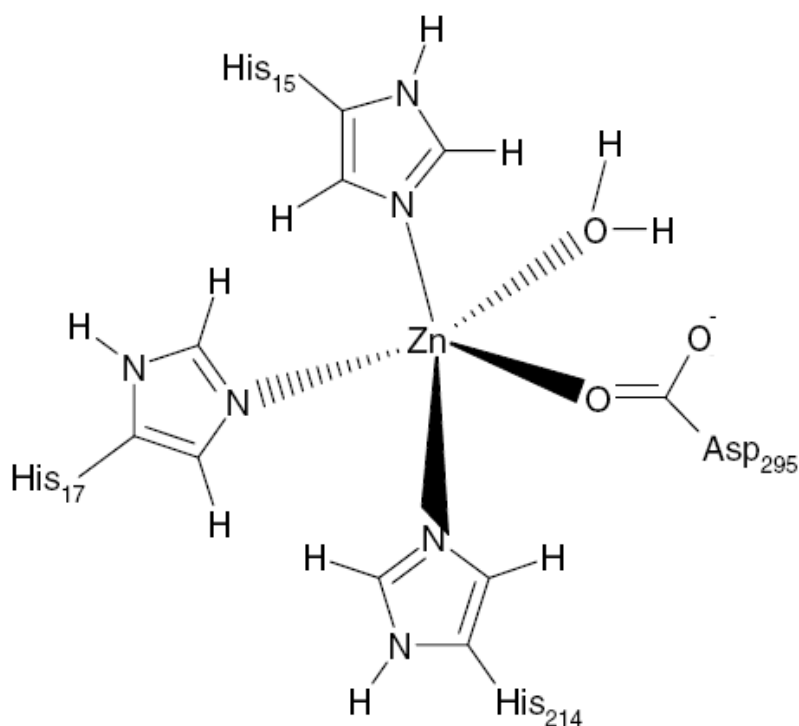
شکل ۱-۲. ساختار سه بعدی آدنوزین دامیناز با کد<sup>۲</sup> 1VFL و نحوه قرارگیری یون روی در شکاف عمیق جایگاه جایگاه فعال (Kinoshita *et al.*, 2005).

<sup>۱</sup>  $\beta$  barrel

<sup>۲</sup> PDB: Protein Data Bank

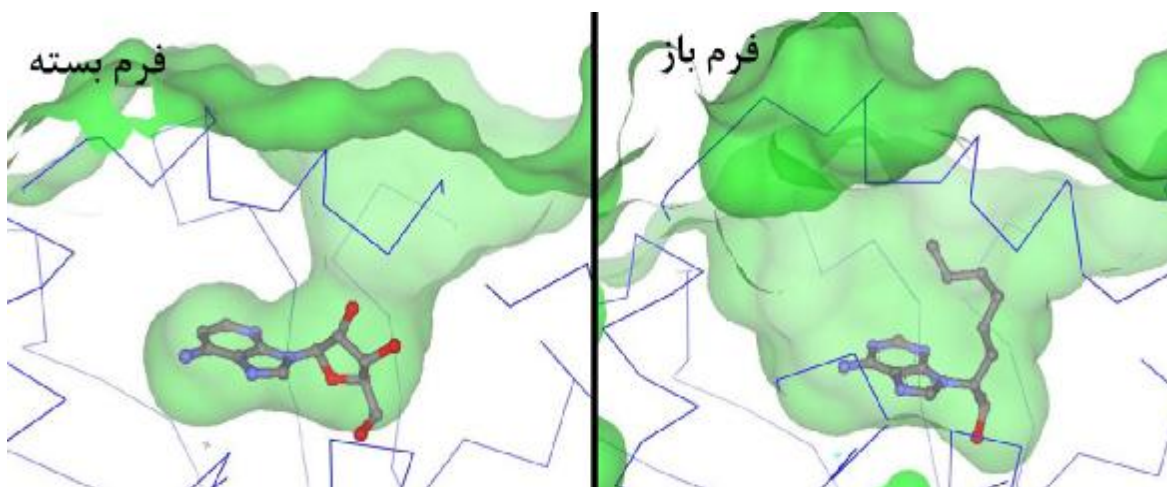


ساختار کریستالی آدنوزین دامیناز نشان می دهد که یون روی در شکاف عمیق، جایگاه اتصال سوبسترا قرار گرفته است و در یک هندسه چهار ضلعی با سه اتم NE2 از اسید آمینه های هیستیدین ۱۵، هیستیدین ۱۷، هیستیدین ۲۱۴ و همچنین OD2 از آسپاراتات ۲۹۵ و یک اتم اکسیژن از یک مولکول آب (شکل ۳-۱) متصل است (Coi et al., 2006).



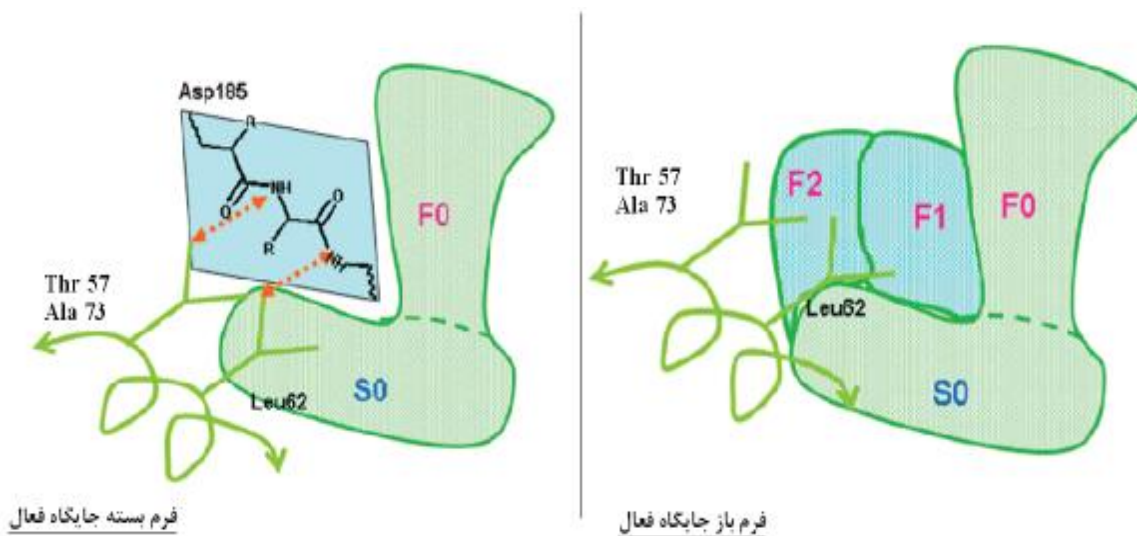
شکل ۳-۱. ساختار جایگاه فعال آدنوزین دامیناز و ارتباط یون روی با پنج اتم قرار گرفته در جایگاه فعال (Coi et al., 2006).

آدنوزین دامیناز دارای دو صورتبندی به نام حالت های باز و بسته است (شکل ۴-۱) (Kinoshita et al., 2008). در حالت صورتبندی بسته جایگاه فعال دارای دو زیر واحد هیدروفیل S0 و زیر واحد هیدروفوب F0 است. به نظر می رسد که سوبسترای این آنزیم به زیر واحد S0 متصل شده و گروه های ۲' و ۳' هیدروکسیل قند ریبوز به زیر واحد هیدروفوب F0 متصل می شوند.



شکل ۱-۴. صورتبندی های باز و بسته جایگاه فعال آدنوزین دامیناز (Kinoshita *et al.*, 2008).

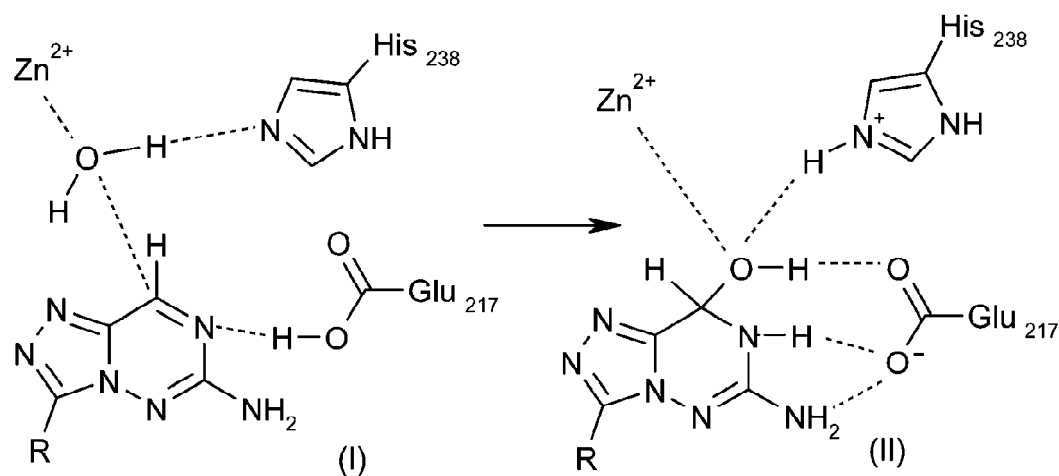
زیر واحد S0 دارای دریچه هایی است که شامل اسکلت اسیدهای آمینه لوسین ۱۸۲ تا آسپاراتات ۱۸۵ واقع در رشته های بتا و زنجیره های جانبی ترئونین ۵۷ و آلانین ۷۳ واقع در زنجیره های آلفا است. صورتبندی باز، جایگاه های F0 و S0 را بشدت حفاظت می کند. از طرفی این صورتبندی دارای جایگاه های هیدروفوب اضافی F1 و F2 در اطراف دریچه است. به طوری که پس از اتصال مهارکننده به جایگاه فعال دریچه بسته شده و آنزیم در حالت صورتبندی بسته قرار می گیرد (شکل ۱-۵) (Kinoshita *et al.*, 2008). در حالی که آدنوزین دامیناز دارای صورتبندی باز است، یک مولکول آب در انتهای جایگاه فعال قرار دارد و سوسترای آدنوزین با دخالت این مولکول آب به جایگاه فعال متصل می شوند. در نتیجه با حذف این مولکول آب، زنجیره ی جانبی فنیل آلانین ۶۵، واقع در آلفا هلیکس جایگاه فعال، سبب حرکت درپوش جایگاه فعال به روی پاکت جایگاه فعال می شود. بنابراین حرکت همراه با پیچش فنیل آلانین ۶۵ سبب تغییر از حالت صورتبندی باز به صورتبندی بسته و برهمکنش بین سوستر و آدنوزین دامیناز می شود. به علت محیط شدیداً هیدروفوب جایگاه فعال دو اسیدآمینه گلوتامات ۲۱۷ و آسپاراتات ۲۹۶ قرار گرفته در جایگاه فعال دارای pKa بزرگ بوده و برخلاف معمول پروتونه می باشند (Phelan *et al.*, 1970).



شکل ۱-۵. زیرواحدهای جایگاه فعال و تشکیل صورتبندی های مختلف جایگاه فعال (Kinoshita *et al.*, 2008).

### ۱-۱-۱ مکانیسم عمل آدنوزین دامیناز

مطالعات کریستالوگرافی آنزیم آدنوزین دامیناز نشان داده است که یون روی و همچنین ریشه های هیستیدین، گلیسین، گلوتامات و آسپاراتات در دامیناسیون آنزیمی شرکت می کنند. ضرورت وجود گلوتامات ۲۱۷ و هیستیدین ۲۳۸ برای کاتالیز آنزیمی و سیستئین ۲۶۲ برای صورتبندی فعال آنزیمی ثابت شده است و همچنین نقش ریشه های تریپتوفان در پایداری جایگاه فعال آدنوزین دامیناز مشخص شده است (Mardanyan *et al.*, 2002). همانطور که در شکل ۱-۶ نشان داده شده است، واکنش کاتالیتیکی آدنوزین دامیناز مستلزم تشکیل یک واسطه از سوبسترای پروتونه شده و حمله نوکلئوفیلی توسط یک مولکول آب فعال شده است (Gleeson *et al.*, 2003). در اینجا آب کاتالیتیک از طریق برهمکنش با یون روی قطبی شده و از طریق ایجاد پیوندهای هیدروژنی به هیستیدین ۲۳۸ و گلوتامات ۲۱۷ حمله می کند. هیستیدین ۲۳۸ پروتون را از مولکول آب کاتالیتیک دریافت کرده و گروه هیدروکسیلات به C6 سوبسترا حمله می کند. مکانیسم حمله نوکلئوفیلی با تشکیل حدواسط چهاروجهی همراه است. این مکانیسم عملکردی آنزیم توسط محققین بسیاری مورد تأیید قرار گرفته است (Frick *et al.*, 1986; Gleeson *et al.*, 2003). به طوری که طی این مطالعات فریک و همکارانش (Frick *et al.*, 1986)، مکانیسم جابجایی دوطرفه حذف و اضافه را برای عملکرد آدنوزین دامیناز رد کردند و مکانیسم نوکلئوفیلی توسط حمله مستقیم آب و نقش آدنوزین دامیناز به عنوان باز عمومی را تأیید کرده اند.



شکل ۱-۶. واکنش کاتالیتیکی آدنوزین دامیناز و تشکیل کمپلکس میکائیلیس (Gleeson *et al.*, 2003).

با مشخص شدن ساختمان اتمی آدنوزین دامیناز موش توسط ویلسون و همکارانش (Wilson *et al.*, 1988) و بر اساس برهمکنش بین این آنزیم و ۶-هیدروکسی پورین ریبوزید<sup>۱</sup>، دو مکانیسم برای عملکرد آنزیم پیشنهاد شده است (شکل ۱-۷):

۱. مکانیسم حذف و اضافه با تشکیل یک حدواسط چهاروجهی.
۲. مکانیسم SN2.

همانطور که در شکل ۱-۷ نشان داده شده است، آسپاراتات ۲۹۵ به عنوان باز عمومی عمل می کند و یون روی به عنوان یک الکتروفیل قوی ملکول آب را فعال نموده و همچنین هیستیدین ۲۳۸ به جهت گیری صحیح مولکول آب کمک کرده و سبب پایدار کردن بار هیدروکسید می شود (Wilson *et al.*, 1991). همچنین گلوتامات ۲۱۷ و یا به عبارت دیگر، هیدروژن مولکول آب که به آن متصل شده، به عنوان دهنده یک پروتون به گروه N-1 سوبسترا عمل می کند. مطالعات بر روی ۶-هیدروکسی پورین ریبوزید نشان داده است که نزدیک ترین منبع پروتون آسپاراتات ۲۹۵ است که کشنده پروتون از آب و هیستیدین ۲۳۸ می باشد. اگر هیستیدین ۲۳۸ به عنوان دهنده پروتون عمل کند، نزدیکی آن به باز عمومی آسپاراتات ۲۹۵ پروتونه شدن مجدد را تسهیل می کند. از آنجایی که گروه NH<sub>2</sub> محوری و یا گروه های قطبی ترک شونده در یک محیط هیدروفوب نامطلوب قرار دارند، حدواسط چهاروجهی عمر خیلی کوتاهی دارد. بنابراین مکانیسم SN2 که در آن اضافه شدن آب و حذف آمونیاک به طور همزمان صورت می گیرد، یک راه فرعی ترجیحی نسبت به مکانیسم حذف و اضافه است (Wilson *et al.*, 1991).

<sup>۱</sup> HDPR: 6-hydroxypurine riboside