بسم الله الرحمن الرحيم

پردیس بین الملل

زیست شناسی (ژنتیک)

عنوان:

بررسی نقش اسیدآمینه های ویژه در فعالیت و پایداری آ نزیم کندروئیتیناز ABC I با استفاده از جهش زایی هدفمند

از

شیما حاتم زاده

استاد راهنما :

دکتر خسرو خواجه

دکتر مجید صادقی زاده

استاد مشاور :

دکتر ابوالفضل گلستانی

اسفند ۹۱

تقدیم به پدر و مادر مهربانم

که بهره مند از محبت و حمایت بی دریغشان بوده ام.....

تقدیر وتشکر

در پایان این پایان نامه لازم می دانم که از زحمات بی شائبه استاد راهنمای عزیزم، جناب آقای دکتر خواجه که در راستای تکمیل این پایان نامه از هیچ کوششی فروگذار نکردند و با راهنمایی هایشان مسیر انجام پژوهش را هموار ساختند بسیار تشکر و قدردانی کنم. به علاوه از زحمات صمیمانه و بیدریغ جناب آقای دکتر صادقی زاده و دکتر گلستانی که در این پروژه مرا راهنمایی کردند بسیار ممنون هستم.

همچنین از آقای دکتر مشایخی و خانم دکتر صالحی به خاطر پذیرفتن مسئولیت مطالعه وتصحیح این پایان نامه کمال سپاسگذاری را می کنم.

بعلاوه جا دارد دارد از تمامی سروران و دوستان عزیزم که در مدت تهیه این پایان نامه مرا یاری نمودند صمیمانه تشکر نمایم.

و سپاس وستایش فراوان نثار پدر ومادر گرامی ام و برادر های عزیزم که بدون حمایت های بیدریغ شان هرگز قادر به رسیدن به این مرحله نبودم

فهرست مطالب

چکیده ..... ط
فصل اول: مقدمه ۲
۱-۱ گلیکوزآمینوگلیکان ها ۲
۱-۱-۱ پروتئوگلیکان(ساختارهای محتوی گلیکوزآمینوگلیکان) ۳
۱-۱-۲-هپارین و هپاران سو لفات ۵
۱-۱-۳ کراتین سولفات ۶
۱-۱-۴ کندرئیتین و درماتان سولفات ۷
۱-۱-۵ هیالورونیک اسید ۸
۱-۲ آنزیم های شکننده گلیکوزآمینوگلیکان ها ۹
۱-۲-۱ هپارینازها ۱۰
۱-۲-۲ هپاران سولفات لیازها ۱۲
۱-۲-۳ هیالورونیداز ۱۲
۱-۲-۴ کندروئیتینازها ۱۳
۱-۲-۴-۱ کندروئیتیناز AC ۱۵
۱-۲-۴-۲ کندروئیتیناز B ۱۶
۱-۲-۴-۳ کندروئیتیناز C ۱۷
۱-۲-۴-۴ کندروئیتیناز ABC II در باکتری پروتئوس ولگاریس ۱۷
۱-۲-۴-۵ کندروئیتیناز ABC در باکتری *thetaiotaomicron* WAL2926 ..... ۱۸
۱-۲-۴-۶ کندروئیتیناز ABC I در باکتری پروتئوس ولگاریس ۱۹
۱-۲-۴-۶-۱ جایگاه فعال کندروئیتیناز ABC I ۲۰
۱-۲-۴-۶-۲ کریستالی گرافی کندروئیتیناز ABC I ۲۱
۱-۲-۴-۶-۳ جهش های ایجاد شده در آنزیم کندروئیتیناز ABC I ۲۳
۱-۲-۵ مکانیسم فعالیت ۲۳
۱-۴ ساختار و اهمیت کندرئیتین سولفات پروتئوگلیکان ها ۲۴
۱-۵ کاربردهای آنزیم کندروئیتیناز ABC ۲۶
۱-۵-۱ ضایعات نخاعی ۲۷
۱-۵-۲ کاربرد آنزیم در مهندسی غضروف ۲۹
۱-۶ هدف تحقیق ۲۹
فصل دوم: مواد و روش ها ۳۲
۲-۱ مواد شیمیایی ۳۲
۲-۲ باکتری مورد استفاده در پژوهش ۳۲
۲-۲-۱ سویه های *E. coli* ۳۲
۲-۳ پلاسمید مورد استفاده در پژوهش ۳۳
۲-۳-۱ پلاسمید pET-28a (+) ۳۳
۲-۴ محیط کشت ۳۴

۲-۴-۱ محیط کشت LB مایع ۳۴
۲-۴-۲ محیط کشت LB جامد ۳۴
۲-۵ روش های الکتروفورزی ۳۵
۲-۵-۱ الکتروفوزر DNA بر روی ژل آگاروز ۳۵
۲-۵-۲ الکتروفورز پروتئین ها به روش SDS-PAGE ۳۷
۲-۵-۲-۱ محلول ها و رنگ های مورد نیاز برای انجام SDS-PAGE ۳۷
۲-۵-۲-۲ روش انجام SDS-PAGE..... ۳۹
۲-۶ مراحل انجام پژوهش..... ۳۹
۲-۶- ۱ دست ورزی (Manipulation) مولکول DNA (روش جهش زایی هدفمند) ۳۹
۲-۶-۲ اصول روش QuikChange ۳۹
۲-۶-۳ طراحی پرایمرهای جهش ۴۱
۲-۶-۴ واکنش PCR برای تولید پلاسمید حاوی جهش ۴۲
۲-۶-۵ هضم محصول PCR با *DpnI* ۴۳
۲-۶-۶ انتقال محصول هضم آنزیمی به میزبان *E. coli* سویه DH5α ۴۴
۲-۶-۷ تأیید ایجاد جهش مورد نظر در پلاسمید ۴۶
۲-۷ فرایند بیان آنزیم کندروئیتیناز نوع وحشی و انواع جهش یافته های ایجاد شده ۴۶
۲-۷-۱ انتقال پلاسمید نوترکیب حاوی ژن مورد نظر به باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) ۴۶
۲-۷-۲ القاء باکتری و بیان پروتئین نوترکیب ۴۷
۲-۸ تخلیص کندروئیتیناز وحشی و انواع جهش یافته ها ۴۸
۲-۸-۱ بافر های مورد نیاز تخلیص پروتئین نوترکیب ۴۸
۲-۸-۲ روش تخلیص پروتئین نوترکیب ۵۰
۲-۸-۳ بررسی میزان خلوص هر یک از خروجی ها ۵۱
۲-۹ تعیین غظت پروتئین ۵۱
۲-۱۰ مطالعات آنزیم شناسی ۵۲
۲-۱۰-۱ تعیین فعالیت آنزیمی ۵۲
۲-۱۰-۲ تعیین پارامترهای سینتیکی ۵۲
۲-۱۰-۳ پایداری حرارتی آنزیم ۵۲
۲-۱۱ مطالعات ساختاری ۵۳
۲-۱۱-۱ مطالعات دو رنگ نمایی دورانی(Circular Dichroism) ۵۳
۲-۱۱-۲ مطالعات فلورسانس ذاتی ۵۳
فصل سوم: نتایج..... ۵۵
۳-۱ مطالعات جهش زایی..... ۵۵
۳-۱-۱ طراحی جهش ۵۵
۳-۱-۳ تعیین ترادف قطعه ژن و اثبات ایجاد جهش های مورد نظر پس از انجام Quik change PCR.. ۵۸
۳-۲ بیان و خالص سازی آنزیم کندروئیتیناز ABCI..... ۵۹
۳-۳ مطالعات آنزیم شناسی جهش یافته pro486Ala ۶۰

۳-۳-۱ تعیین فعالیت آنزیمی و محاسبهی پارامترهای سینتیکی ۶۰
۳-۳-۲ مطالعات پایداری حرارتی جهش یافته pro486Ala ۶۲
۳-۴ مطالعات ساختاری ۶۴
۳-۴-۱ فلورسانس ذاتی ۶۴
۳-۴-۲ مطالعات ساختار دوم با استفاده از دو رنگ نمایی دورانی(CD) ۶۴
فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری ۶۷
۴-۱ اهمیت و کاربرد آنزیم کندروئیتیناز ABC ۶۷
۴-۲ هدف تحقیق حاضر ۶۸
۴-۲-۱ مطالعات جهش زایی ۶۹
۴-۲-۲ نتایج ایجاد جهش ۷۰
۴-۳ فعالیت آنزیمی و پارامترهای سینتیکی ۷۱
۴-۴ مطالعه پایداری دمایی آنزیم وحشی و جهش یافته ۷۱
۴-۵ مطالعات ساختاری ۷۲
۴-۶ پیشنهادات ۷۴
فهرست منابع ۷۶

فهرست جداول

جدول ۱- ۱- خلاصه ای از ساختار گلیکوزآمینوگلیکان ها ۲
جدول ۲- ۱- مواد لازم برای محیط کشت LB مایع ۳۴
جدول ۲- ۲- مواد لازم برای محیط کشت LB جامد ۳۴
جدول ۲- ۳- مواد لازم برای تهیه محلول ها loading buffer و ethidium bromide..... ۳۵
جدول ۲- ۴- مواد لازم برای تهیه بافر TAE ۳۶
جدول ۲- ۵- مواد لازم برای تهیه بافر TBE 10X ۳۶
جدول ۲- ۶- مواد لازم برای تهیه محلول ها و رنگ های مورد نیاز برای انجام SDS-PAGE ۳۸
جدول ۲- ۷- ترادف پرایمرهای طراحی شده برای انجام جهش ۴۱
جدول ۲- ۸- مخلوط واکنش برای انجامPCR..... ۴۲
جدول ۲- ۹- برنامه انجامPCR..... ۴۳
جدول ۲- ۱۰- مخلوط واکنش برای انجام PCR..... ۴۳
جدول ۲- ۱۱- مخلوط واکنش برای انجامPCR ۴۹
جدول ۳- ۱- پارامترهای سینتیکی جهش یافته Pro486ALa..... ۶۱
جدول ۳- ۲- آنالیز ساختار دوم جهش یافتهPro486Ala..... ۶۵

فهرست شکل ها

شکل ۱- ۱. مکان آنزیم های سنتز کننده پروتئوگلیکان های مختلف در شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی ۴

شکل ۱- ۲. ساختار هپارین و هپاران سولفات. ۵

شکل ۱- ۳. انواع واحدهای دی ساکاریدی موجود در کندرئیتین سولفات و درماتان سولفات. ۷

شکل ۱- ۴. ساختار اسید هیالورونیک. ۹

شکل ۱- ۵. شکست اتصالات اولیه گلیکوزیدی توسط هپارین لیازها. ۱۱

شکل ۱- ۶. کلیواژ پیوند گلیکوزیدی توسط کندرئیتین لیاز. ۱۴

شکل ۱- ۷. ساختارکریستالی گرافی آنزیم کندروئیتیناز ABC I. ۲۲

شکل ۱- ۸. مکانیسم کلیواژ حذفی در آنزیم های شکننده گلیکوزآمینوگلیکان ها. ۲۴

شکل ۱- ۹. فرایند تشکیل گلیال اسکار. ۲۸

شکل ۱- ۱۰. شکست زنجیرهای گلیکوزآمینوگلیکان توسط آنزیم کندروئیتیناز ABC I ۲۸

شکل ۲- ۱. نمای شماتیک از وکتور پلاسمید pET-28A (+) ۳۳

شکل ۲- ۲. شمایی کلی از تکنیک جهش زایی هدفمند با روش Quick-change..... ۴۰

شکل ۳- ۱. مقایسه ترادف اسیدآمینه آنزیم کندرونیناز ABC I با کد 1HNO با سایر آنزیم های مشابه..... ۵۶

شکل ۳- ۲. محصولQuick-change PCR..... ۵۷

شکل ۳- ۳محصول استخراج پلاسمید..... ۵۷

شکل ۳- ۴. الکترو فروگرام نمونه های جهش یافته. ۵۹

شکل ۳- ۵. بیان پروتئین در عصاره سلولی قبل و پس از القا بر روی ژل SDS-PAGE..... ۶۰

شکل ۳- ۶. آنزیم های خالص شده بر روی ژل SDS-PAGE. ۶۰

شکل ۳- ۷. نمودار میکائیلیس آنزیم کندروتیتاز ABC I با استفاده از نرم افزارprism ۷۲

شکل ۳- ۸. نمودار پایداری حرارتی آنزیم ۶۳

شکل ۳- ۹. آنالیز تغییرات ساختاری آنزیم کندروئیتیناز طبیعی وجهش یافته با استفاده از فلورسانس ذاتی. ۶۴

شکل ۳- ۱۰. آنالیز تغییرات ساختار دوم آنزیم کندروئیتیناز طبیعی و جهش یافته با استفاده از دو رنگ نمایی دورانی در ناحیه UV دور. ۶۵

شکل ۴- ۱. موقعیت اسیدآمینه های Pro486 وPro485..... ۷۰

چکیده

بررسی نقش اسید آمینه های ویژه در فعالیت و پایداری آنزیم کندروئیتیناز ABC I با استفاده از جهش زایی هدفمند

شیما حاتم زاده

آنزیم کندروئیتیناز ABC I یک آنزیم باکتریایی با وزن مولکولی در حدود kDa ۱۱۲.۵ و ۹۹۷ اسیدآمینه است و به خانواده کندروئیتیناز ها تعلق دارد. این آنزیم قادر است GalAG ها (گالاکتوزآمینوگلیکان) را بشکند و ویژگی سوبسترایی وسیعی دارد ودر بین سوبستراهای گلیکوزآمینوگلیکان، کندرئیتین ۴-سولفات، کندرئیتین ۶-سولفات، درماتان سولفات و هیالورونیک اسید را با مکانیسم حذف β می شکند. در مطالعات قبلی، کلونینگ و بیان آنزیم با موفقیت درون باکتری BL21 انجام شده است. بررسی ساختار سه بعدی توسط X-ray کریستالی گرافی مشخص نموده که این آنزیم دارای سه دمین اصلی می باشد. آنزیم کندروئیتیناز ABC I کاربردهای درمانی فراوانی دارد. این آنزیم با حذف زنجیره های گلیکوزآمینوگلیکان اثر مهاری کندرئیتین سولفات پروتئوگلیکان را کاهش داده و باعث بهبود بازیابی در سیستم عصبی مرکزی می شود. علی رغم اهمیت کلینیکی، کاربرد آن در *in-vivo* به دلیل ناپایداری حرارتی محدود شده است. از روش های مختلفی از جمله تغییرات شبمیایی، بکار بردن افزودنی های پایدار کننده، تثبیت کردن و جهش زایی برای ایجاد پایداری در آنزیم ها استفاده می شود. در این تحقیق، اثر مهندسی پروتئین بر روی پایداری آنزیم کندروئیتیناز ABC I مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور طراحی جهش انجام پذیرفت و اسیدآمینه هایPro485 و Pro486 جایگزین شدند. سپس مطالعات پایداری آنزیم کندروئیتیناز ABC I در سه دمایC ˚۲۰- ، ˚C۴ و˚C ۴۰ صورت گرفت. همانگونه که پیش بینی شده بود، در جهش یافته Pro486Ala پایداری بیشتری نسبت به نمونه وحشی مشاهده گردید. در این پژوهش همچنین ویژگی های سینیتیکی و ساختاری آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. فقط خصوصیات یکی از جهش یافته ها تعیین شد و در سه جهش یافته دیگر فعالیت مشاهده نشد. پارامتر های سینیتیکی نشان داد که فعالیت و تمایل به سوبسترا در جهش یافته Pro486Ala افزایش یافته است. تغییرات ساختاری نیز در این جهش یافته به کمک روش های فلورسانس و دو رنگ نمایی حلقوی (CD) مورد مطالعه قرار گرفت. در نتیجه جهش یافته Pro486Ala از فعالیت و پایداری بیشتری نسبت به نمونه وحشی برخوردار است.

کلمات کلیدی:پایداری، جهش زایی هدفمند، فعالیت، کندروئیتیناز ABC I

ABSTRACT

Probing Crucial amino acids role in Chondroitinase ABCI enzyme activity and stability by site-directed mutagenesis
Shima Hatamzadeh

Chondroitinase ABC I is an112.5 kDa bacterial enzyme with 997 amino acid that belongs to chondroitinase family. This enzyme is a GalAG (galactosaminoglycan) depolymerizing lyase with a broad-specificity and depolymerizes a variety of GAG substrates, including C4S (chondroitin 4-sulphate), DS (dermatan sulphate), C6S (chondroitin 6-sulphate) and hyaluronic acid by β-elimination reaction. In Previous studies cloning and expression of the enzyme have been done successfully in BL-21. Three Dimensional structure analysis with x-ray crystallography suggested that the enzyme has three major domains. cABC I enzyme promote neural system regeneration by degrading GAG chains followed by decreasing CSPGs inhibitory effect so there is a wide range of application of the enzyme in medicine. Despite clinical importance of cABC I, *in-vivo* application of this enzyme has been limited by its thermal sensitivity as reported previously. Several approaches have been employed to increase the stability of enzymes, including chemical modification, utilization of stabilizing additives, mutagenesis and immobilization of the enzyme. In order to investigate the effect of protein engineering on cABC I stabilization, the present study was conducted. The mutations were designed and Pro486 and Pro485 residues were subsituted. Thermal stability studies were carried out in three temperatures; -20 C˚, 4 C˚ and 40 C˚. Pro486Ala showed more thermal stability, as predicted before. We also investigated kinetic and structural characteristics of the enzyme. Only one of Mutations, Pro486Ala was characterized because other mutations were failed to produce a transformant with meaningful activity. The activity was increased in Pro486Ala as kinetic parameters showed. This mutated enzyme also revealed more substrate affinity. Structural studies were carried out through fluorescence and circular dichroism. Finally we find out that Pro486Ala had more activity and stability in comparison with the native enzyme.

Key words: stability, site-directed mutagenesis, activity , Chondroitinase ABC I

فصل اول

مقدمه

فصل اول: مقدمه

۱-۱ گلیکوزآمینوگلیکان ها

گلیکوزآمینوگلیکان ها (GAG) یک خانواده پلی ساکاریدی خطی هستند که در گذشته به آنها موکوپلی ساکارید گفته می شد. گلیکوزآمینوگلیکان ها رزیدوهای اسکلتی مشابه ای دارند و بدین طریق از پلی ساکارید های دیگر تشخیص داده می شوند. تغییرات رزیدوهای این اسکلت ها حتی در میان گلیکوزآمینوگلیکان هایی که به یک خانواده تعلق دارند بسیار متنوع است. این تغییرات شامل ایزومرشدن، سولفاته شدن و استیله شدن در زنجیره گلیکوزآمینوگلیکان است که ویژگی شیمیایی آنها را تعیین می کند. زنجیره های گلیکوزآمینوگلیکان مختلف وزن های مولکولی متفاوت و ترکیبات متفاوت نیز دارند. این ساختارها پلیمرهایی از واحدهای دی ساکاریدی محسوب می شوندکه واحدهای دی ساکاریدی آنها در درون زنجیره تکرار شده اند. این واحدهای دی ساکاریدی از اورونیک اسید(U) و هگزوزآمین (H) تشکیل شده اند. وجود اورونیک اسید در شاخه جانبی وشدت سولفاته بودن موجب شده که این پلیمرها جزء بیو پلیمر هایی با بیشترین بار منفی باشند. واحدهای دی ساکاریدی تکراری انواع مختلف داشته و بر همین اساس گلیکوزآمینوگلیکان ها به چهار دسته اصلی هپا رین HP یا هپاران سولفات HS، کندرئیتین سولفات CS، هیالورنیک اسید و کراتان سولفات تقسیم می شو ند که در جدول۱-۱به خصوصیات آنها اشاره شده است. بیوسنتز همه گلیکوزآمینوگلیکان ها در درون دستگاه گلژی صورت می گیرد و بیو سنتز همه به جز هیالورونیک اسید از یک پروتئین مرکزی آغاز می شود. گلیکوزآمینوگلیکان ها از طریق اکسیژنی که در ترادف پیوندی انتهای احیایی قرار گرفته به سرین متصل می شوند و ساختارهایی به نام پروتئوگلیکان را ایجاد می کنند. هر چند برای کراتین سولفات نواحی پیوندی متناوبی امکان پذیر است(Ernest et al., 1995; Fawcett and Asher, 1999).

جدول ۱- ۱- خلاصه ای از ساختار گلیکوزآمینوگلیکان ها

Glycosaminoglycan	Basic Disaccharide	Potential Modifications
Chondroitin sulfate	-GlcA-β(1,3)-Gal Nac- β(1,4)	4-O or 6-O sulfation
Dermatan sulfate	-IdoA-α(1,3)-Gal Nac- β(1,4)-or -GlcA-β(1,3)-Gal Nac- β(1,4)	2-O, 4-O, and 6-O sulfation
Heparin	-IdoA-α(1,4)-Gal Nac-α(1,4)-	N-deacetylation / N-sulfation, C5 epimerization, 2-O, 3-O, and 6-O sulfation
Heparan sulfate	-GlcA-β(1,4)-Gal Nac- α(1,4)- or -IdoA- α(1,4)-Gal Nac- α(1,4)-	N-deacetylation / N-sulfation, C5 epimerization, 2-O, 3-O, and 6-O sulfation
Hyaluronic acid	GlcA-β(1,3)-Gal Nac- β(1,4)-	No modifications
Keratan sulfate	-Gal-β(1,4)-Gal Nac- β(1,3)-	6-O sulfation

گلیکوزآمینوگلیکان ها در همه موجودات از *Caenorhabditis elegans* تا انسان دیده می شوند. ترکیبات شیمیایی آنها در بافت های مختلف به شدت متنوع است. آنها در ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه ساختار های داربستی را ایجاد می کنند. گلیکوزآمینوگلیکان ها در ماتریکس خارج سلولی نقش پیچیده ای دارند و نه تنها به عنوان ترکیبات محلول و پلی الکترولیت حضور دارند بلکه با فاکتور های رشد و دیگر ترکیبات گذرای ماتریکس خارج سلولی پیوند های اختصاصی نیز بر قرار می کنند(Ernest et al., 1995).

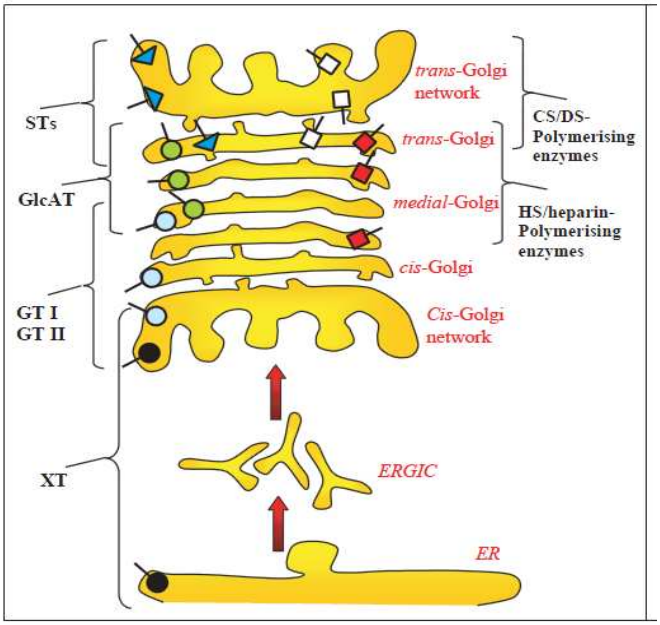
۱-۱-۱ پروتئوگلیکان(ساختارهای محتوی گلیکوزآمینوگلیکان)

پروتئوگلیکان ها از یک پروتئین مرکزی و یک یا چند زنجیره گلیکوزآمینوگلیکان که به طور کوالانی به پروتئین مرکزی متصل شده اند تشکیل شده است. بعضی از این پروتئوگلیکان ها مانند دکورین[1] فقط دارای یک زنجیره گلیکوزآمینوگلیکان هستند، در حالی که بعضی دیگر مانند آگریکن[2] دارای بیش از ۱۰۰ زنجیره گلیکوزآمینوگلیکانی می باشند. این زنجیره های گلیکوزآمینوگلیکان ممکن است از یک یا چند خانواده متفاوت باشند. در بین پروتئوگلیگان ها تنوع ساختاری فراوانی دیده می شود که این تنوع به عوامل متعددی وابسته است. پرو تئوگلیکان هایی که بیش از یک زنجیره گلیکوزآمینوگلیکان دارند دارای انواعی از زنجیره های چسبنده می باشند(Silbert and Sugumaran, 1995). به عنوان مثال سیندیکان-۱[3] دارای پنج محل اتصال برای گلیکوزآمینوگلیکان است اما ازهمه محل ها به طور یکسان استفاده نمی شود. بعضی محتوی کندرئیتین سولفات یا درماتان سولفات هستند. کندرئیتین یا درماتان سولفات پروتئوگلیکان را تشکیل می دهند که اهمیت آنها در ادامه بیان خواهد شد. طول زنجیره و آرایش رزیدو های سولفاته نیز در طول زنجیره متفاوت است(Varki et al., 1999). در واقع سلول های همه پستانداران پروتئوگلیکان ها را تولید می کنند که محل سنتز آنها عمدتا دردستگاه گلژی می باشد(شکل۱-۱). این سلول ها پس از سنتز پروتئوگلیکان ها آن را به درون ماتریکس خارج سلولی یا به درون غشای پلاسمایی ترشح می کنند یا در دانه های ترشحی ذخیره می کنند(Perrimon and Bernfield, 2001). پروتئوگلیکان های ماتریکس ژل هیدراته فراهم می کنند تا درمقابل نیروی فشار مقاومت کند. پروتئوگلیکان ماتریکس شامل پروتئوگلیکان های بین سلولی کوچک(دکورین، بیگلیکن[4]، فیبرومودلین[5])، پروتئوگلیکان نوع IX کلاژن و یک یا چند عضو از خانواده

[1] decorin
[2] aggrecan
[3] Syndecan-1
[4] biglycan
[5] foibromodulin

آگریکن می باشند. عمدتا گلیکوزآمینوگلیکان های کندرئیتین سولفات یا درماتان سولفات در ساختارپروتئوگلیکان ماتریکس بکار رفته اند. البته استثناهایی وجود دارد.

در غشای پایه پرلیکن[6] و آگارین (هپاران سولفات پروتئوگلیکان) گونه های عمده هستند. سلول ها همچنین از یک گروه متنوع پروتئوگلیکان های غشایی تشکیل شده اند. پروتئوگلیکان های غشایی (مانند گلیپیکن[7]) تمایل به داشتن گلیکوزآمینوگلیکان هپاران سولفات دارند، اما ممکن است (مانند سیندیکان و بتا گلیکن[8]) ساختار آنها هیبریدی از گلیکوزآمینوگلیکان هپاران سولفات و کندرئیتین سولفات را داشته باشد. چندین پروتئین غشایی شناخته شده اند که تنها حاوی گلیکوزآمینوگلیکان کندرئیتین سولفات هستند. در نهایت سلول های دارای گرانول های ذخیره ای، پرو تئوگلیکان ها را همراه با محصو لات ترشحی دیگر نگهداری می کنند.



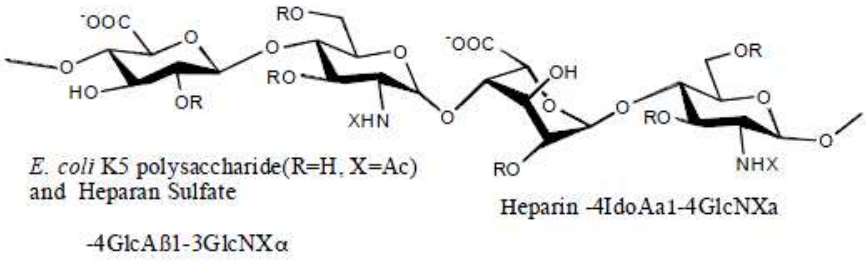
شکل ۱- ۱. مکان آنزیم های سنتز کننده پروتئوگلیکان های مختلف در شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی (Prydz and Dalen, 2000).

XT=Xylosyl Transferase,
GT=GAlactosyl Transferase,
GlcAT=GlucoronicAcidTransferase,
ST=Sulphotransferase

[6] perlecan
[7] glypican
[8] betaglycan

۱-۱-۲-هپارین و هپاران سو لفات[9]

هپارین و هپاران سولفات دسته ای از گلیکوزآمینوگلیکان ها هستند که به طور وسیعی در سلوهای ماست تولید می شوند. این دسته از گلیکوزآمینوگلیکان ها از واحد های دی ساکاریدیGlcNAcα1-4GlcAβ1-4 تشکیل شده اند و گلوکوزآمین در آن ها از طریق کربن ۱و ۴ در انتهای احیایی و غیر احیایی خود به اورونیک اسید متصل شده است (Varki et al., 1999). وزن مولکولی آن ها در حدود kDa ۵۰ تا ۱۰۰می باشد. هر چند در طی چرخه زندگی وزن مولکولی آن ها به متوسط kDa ۱۳کاهش می یابد. این دسته از گلیکوزآمینوگلیکان ها از لحاظ ساختاری در بین گلیکوزآمینوگلیکان ها، بیشترین تنوع را دارند. این تنوع با سولفاته شدن اکسیژن و نیتروژن و همچنین ایزومراسیون اورونیک اسید ایجاد می شود (Ernest et al., 1995). درجه تغییرات رزیدوهای قندی در هپارین متفاوت از هپاران سولفات است. هپارین در مناطق O-۲و O-۶ و در موقعیت نیتروژن بسیار سولفاته است و بیشتر محتوی رزیدو IdoA می باشد اما هپاران سولفات به میزان کمتری در موقعیت O-۲ و بر روی نیتروژن، سولفاته است و بیشتر محتوی رزیدو GlcA می باشد(شکل۱-۲). این تغییرات توسط حداقل چهار خانواده از سولفوترانسفرازها و یک اپیمراز کاتالیز می شوند. تغییرات به صورت خوشه ای در طول زنجیره اتفاق می افتد و همواره مناطقی هستند که بدون سولفات باقی می مانند. عموما تغییرات در طول زنجیره ادامه پیدا می کند اما کامل نمی شود و به همین دلیل یک هتروژنی شیمیایی در ناحیه تغییر یافته ایجاد می شود. آرایش ویژه رزیدو های سولفاته و اپیمر های اورونیک اسید در هپارین و هپاران سولفات، ویژگی ترادف اتصالی به لیگاند را افزایش می دهد (Varki et al., 1999). ساختار دوم هپارین و هپاران سولفات نیز در جهت گیری گروه های عملکردی در ترادف های اختصاصی تعیین کننده است (Ernest et al., 1995).



شکل ۱- ۲. ساختار هپارین و هپاران سولفات.

هپارین در مناطق O-۲و O-۶ و در موقعیت نیتروژن بسیار سولفاته است و بیشتر محتوی رزیدو IdoA می باشد اما هپاران سولفات به میزان کمتری در موقعیت ۲-o و بر روی نیتروژن، سولفاته است و بیشتر محتوی رزیدو GlcA می باشد(Avci et al., 2007).

[9] Heparin and Heparan sulfate

در اثر اتصال زنجیره های هپاران سولفات به انواع پروتئین های مرکزی ساختارهایی به نام هپاران سولفات پروتئوگلیکان ها ایجاد می شوند که در سطح همه سلول های انسانی حضور دارند. تعداد زنجیره های هپاران سولفات در هپاران سولفات پروتئو گلیکان در غشای پایه و در سلول های فیبروبلاست متفاوت است. هپاران سولفات پروتئوگلیکان ها وقایع سیگنالی از جمله تکثیر، تمایز، چسبندگی، مهاجرت و آپوپتوز را تنظیم می کنند.

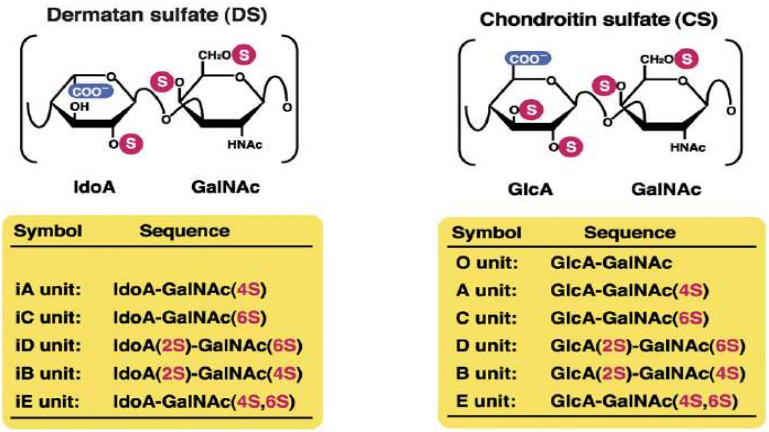
۱-۱-۳ کراتین سولفات

کراتین سولفات یک عضو دیگر از خانواده گلیکوزآمینوگلیکان ها محسوب می شود. این گلیکوزآمینوگلیکان یک زنجیره پلی اکتوزآمین سولفاته است و شبیه گلیکو پروتئین های معمول و موسین ها می باشد(Varki et al., 1999). رزیدوی اصلی کراتین سولفات $Glc_{NAc}-(\beta1,3)-Gal(\beta1,4)$ است که در طول زنجیره تکرار شده است. تقریبا همه گلوکوزآمین ها و بعضی واحد های گالاکتوز، ۶- سو لفاته هستند به جز بعضی کراتین سولفات های مر بوط به سطوح اریتروسیت ها که تنها حاوی مقدار کمی سولفات می باشند. کراتین سولفات ها، اورونیک اسید ندارند و به همین دلیل شکست حذفی در آن صورت نمی گیرد. وزن مولکولی آن معمولاً بین ۲ kDa تا ۲۰ است و بیشتر تمایل دارند که زنجیره های کوچکی را تشکیل دهند. مکانیسمی وجود دارد که از طویل شدن زنجیره جلوگیری می کند(Ernest et al., 1995). در بیوسنتز پلی اکتوز آمین حداقل دو سولفوترانسفراز دخالت می کند که واکنش سولفاته کردن را کاتالیز می کنند.

دو نو ع کراتین سولفات بر اساس ناحیه پیوندی به پروتئین وجود دارد هر دو شاخه دار هستند و از نواحی پیوندی گلیکوزآمینوگلیکان های دیگر متفاوت هستند.کراتین سولفات نوع یک در قرنیه وجود دارد. این پلی اکتوزآمین ممکن است طویل باشد (۵۰ دی ساکارید ۲۰-۲۵ kDa) و محتوی مخلوطی از دی ساکارید های غیر سولفاته، مونوسولفاته و دی سولفاته باشد. کراتین سولفات نوع دو در ساختار پروتئوگلیکان های غضروف بکار رفته است و عملکرد آن به درستی شناخته نشده است(Varki et al., 1999).

۱-۱-۴ کندرئیتین و درماتان سولفات[10]

کندرئیتین سولفات یک دسته دیگر از گلیکوزآمینوگلیکان ها می باشد که زنجیره های پلی ساکاریدی طویلی را تشکیل می دهند. اندازه هر زنجیره در حدود ۲۰ kDa (~۴۰ دی ساکارید) بوده و از واحد های دی ساکاریدی GalNAc-GlcA تشکیل شده است که درطول زنجیره تکرار شده اند (Varki et al., 1999). کندرئیتین و درماتان سولفات از پیش ماده مشابهی منشا می گیرند و درماتان سولفات با داشتن GalNAc در واقع یک نوعی کندرئیتین سولفات محسوب می شود و کندرئیتین سو لفات B نامیده می شود. درماتان سولفات شامل درجات مختلف ایدرونیک اسید است در حالی که همه اورونیک اسید در کندرئیتین سولفات گلوکورونیک اسید می باشد(شکل ۱-۳). اما حضور ایدرو نیک اسید(IdoA) در درماتان سولفات آنها را از کندرئیتین سولفات A وC متمایز می کند. این امر موجب ایجاد تشابه با هپاران و هپاران سولفات از لحاظ وجود این رزیدو می شود. IdoA باعث ویژگی ناحیه اتصال در درماتان سولفات می شود (Trowbridge and Gallo, 2002; Ernest et al, 1995). پیش ماده در اثر یکسری تغییرات پی در پی ایجاد می شود. این تغییرات عمدتا بوسیله پنج آنزیم مختلف کاتالیز می شود. این آنزیم ها شامل سه ترانسفراز و دو سولفوترانسفراز می باشند. آنزیم های دیگری هم هستند که موجب اپیمریزاسیون GlcA به IdoA در ساختار درماتان سولفات، یا سولفاسیونC2 در اورونیک اسید و یا باعث ایجاد مدل های سولفاته دیگر در انواع مختلف کندرئیتین می شوند. بنابراین کندرئیتین سولفات هایی که از منابع مختلف گرفته شده اند در موقعیت سولفات با هم تفاوت دارند. بررسی این امر به آسانی بوسیله کندروئیتینازهای باکتریایی که زنجیره ها را به دی ساکارید می شکنند، انجام شده است. جداسازی محصولات نشان می دهد که در طبیعت انواع مختلف کندرئیتین سولفات ها وجود دارد، ولی بیشتر زنجیره ها به صورت هیبرید بوده و بیشتر از یک نوع دی ساکارید را شامل می شوند (Varki et al., 1999).



شکل ۱- ۳. انواع واحدهای دی ساکاریدی موجود در کندرئیتین سولفات و درماتان سولفات.
واحدهای دی ساکاریدی درکندرئیتین سولفات شاملGalNAc-GlcA و در درماتان سولفات -GalNAc IdoA می باشد (Sugahara and Mikami, 2007).

[10] Chondroitin and Dermatan sulfate

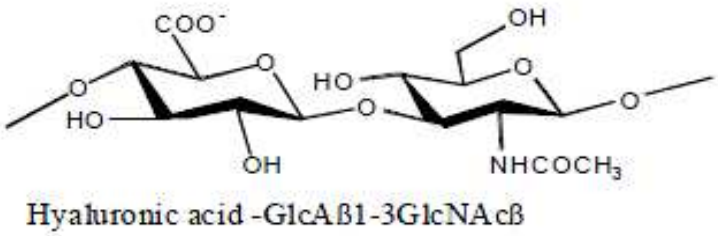
کندرئیتین سولفات در ساختار پروتئوگلیکان های بزرگ با ۲۰ تا ۱۰۰ زنجیره گلیکوزآمینوگلیکان دیده می شود. کندرئیتین سولفات می تواند بر روی همه پروتئوگلیکان ها قرار گیرد و این امر بستگی به سلولی دارد که پروتئین مرکزی پروتئوگلیکان در آن بیان می شود(Ernest et al., 1995). درماتان سولفات غالبا در پروتئوگلیکان های کوچک با ۲ تا ۸ زنجیره جانبی دیده می شود. درماتان سولفات در اثر اتصال به پروتئین های مرکزی مختلف در نمو های اختصاصی و شرایط فیزیولوژیک متفاوت تحت تاثیر قرار می گیرد. بنابراین جهت دریافت اهمیت درماتان سولفات باید ساختار گلیکوزآمینوگلیکان و پروتئین مرکزی که درماتان سولفات پروتئوگلیکان را تشکیل می دهد مورد توجه قرار گیرد. گوناگونی طول پلی ساکارید در درماتان سولفات، تنوع قرار گیری IdoA، تنوع سولفاته شدن و تنوع پرو تئین مرکزی پیچیدگی درماتان سولفات و پروتئوگلیکان محتوی درماتان سولفات را نشان می دهد. تنوع زنجیره، ترکیب دی سا کاریدی و سولفاته بودن گلیکوزآمینوگلیکان بر روی تمایل اتصال پروتئین به گلیکوزآمینوگلیکان تاثیر می گذارد(Trowbridge and Gallo, 2002).

۱-۱-۵ هیالورونیک اسید

هیالورونیک اسید یک گلیکوزآمینوگلیکان است و به طور قابل توجهی بزرگتر از گلیکوزآمینوگلیکان های دیگر است. طول زنجیره آن از ۵۰۰ تا چندین هزار دی ساکارید تشکیل شده است و هردی ساکارید عبارت ازGlcNAcβ1-3GlcAβ1-4 می باشد(شکل۱-۴). هیالورونیک اسید درمحلول ها کشیدگی بیشتری پیدا می کند و طویلتر می شود(Fransson, 1985). هیالورونیک اسید سولفاته نیست و یکنواختی درساختار اولیه آن به چشم می خورد. منوساکارید های آن مشابه منوساکارید های موجود در هپارین تغییر نیافته است. هر چند پیوند های گلیکوزیدی، مشابه کندرئیتین سولفات دارد. هیالورونیک اسید به طور وسیعی در طبیعت به ویژه در بافت موجودات بی مهره و مهره دار یافت می شود. این ترکیبات در کپسول استرپتوکوکوس نیز یافت می شود. هیالورونیک اسید در پوست پستانداران فراوان است و در بافت های اسکلتی،پرده زجاجی چشم، طناب نافی، مایع سینویال نیز دیده می شود. غلظت بالای آن در بعضی بافت ها موجب سختی آنها می شود.

ویژگی هیالورونیک اسید مشابه چربی های زیستی است در طی حرکت اصطکاک را کاهش می دهد و در شرایط استاتیک حالت ارتجاعی پیدا می کند. هیالورونیک اسید بر خلاف گلیکوزآمینوگلیکان های دیگر به صورت کوالانی به پروتئین متصل نمی شود. بنابراین هیچ مرکز پروتئینی اولیه وجود ندارد که به عنوان نقطه آغازین سنتز عمل کند. سنتز آن درغشای پلاسمایی سلول رخ داده و پلیمرآن از انتهای احیایی ساخته شده و از سطح سلول خارج می شود، بر خلاف قاعده گلیکوزاسیون که عموما در دستگاه گلژی اتفاق می افتد و بر خلاف کندرئیتین سو لفات سنتز آن توسط داروهای مهارکننده

سنتز پروتئین(پیرومایسین) مهار نمی شود یا یون های آن تحت تاثیر عبور از غشای دستگاه گلژی قرار نمی گیرد. ساختار کلی هیالورو نیک اسید قادر است وا کنش های بیولوژیکی اختصاصی برقرار کند(Varki et al., 1999).



شکل ۱- ۴. ساختار اسید هیالورونیک.

هیالورونیک اسید از واحدهای از GlcNAcβ1-3GlcAβ1-4 تشکیل شده است (Avci et al., 2007).

۱-۲ آنزیم های شکننده گلیکوزآمینوگلیکان ها

آنزیم های شکننده گلیکوزآمینوگلیکان ها (GAG[11])، دسته ای از آنزیم های غشایی هستند که در۸-۶ pH فعالیت می کنند. این آنزیم ها غالباً از باکتری خاکی به نام فلاووباکتریوم هپارنیوم[12] که تقریبا در همه جا موجود می باشد، استخراج می شوند (Ernest et al., 1995). آنزیم ها ی شکننده گلیکوزآمینوگلیکان قادر به شناسایی ترادف های خاص در زنجیره گلیکوزآمینوگلیکان ها بوده و مدل های مناسبی برای بررسی پیوند های اختصاصی بین گلیکوزآمینوگلیکان ها و پروتئین ها می باشند. امروزه کلونینگ، بیان نوترکیب، خالص سازی و شناسایی ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم های شکننده گلیکوزآمینوگلیکان ها، کاربرد آنها را به عنوان ابزاری جهت شناسایی عملکرد و ساختار گلیکوزآمینوگلیکان ها افزایش داده است. مطالعات بیوشیمیایی که در مورد DNA و پروتئین در گذشته انجام می گرفت، در رابطه با گلیکوزآمینوگلیکان ها امکان پذیر نبود. گلیکوزآمینوگلیکان ها دارای ساختارهای پیچیده بوده و به علت حضور کربوکسیل و سولفاته بودن دارای طبیعت بسیار برداری می باشند. از اینرو علیرغم پیشرفت علوم زیستی در زمینه شناخت گلیکوزآمینوگلیکان ها، ارتباط ساختار و عملکرد آن ها ناشناخته مانده بود.

[11] glycosaminoglycan
[12] Flavobacterium heparinum