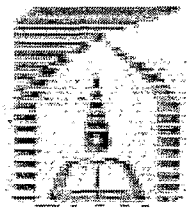
١٦٠٨
انجمن

بسم الله الرحمن الرحيم

١١٠٨٣٠

۸۷/۱/۱۰ ۹۲۶۴
۸۷-۱۲-۴



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پایه

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زیست شناسی (بیوفیزیک)

بیان، تخلیص و مطالعه ساختاری پروتئین ITPase با طیف سنجی دورنگ‌نمایی دورانی و تکنیک فلورسانس

نگارش
سعیده رنجبری بگلو

استاد راهنما
دکتر بیژن رنجبر

استاد مشاور
دکتر مهرداد بهمنش

۱۳۸۷/۱۱/۱۲

مهر ۱۳۸۷

۱۱۰۸۳۰

بسمه تعالی

دانشکده علوم پایه

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد

اعضای هیئت داوران نسخهٔ نهایی پایان‌نامه خانم سعیده رنجبری‌بگلو رشته زیست‌شناسی (بیوفیزیک) تحت عنوان: «بیان، تخلیص و مطالعه ساختاری پروتئین ITPase با طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی و تکنیک فلورسانس» از نظر فرم و محتوا بررسی نموده و آنرا برای اخذ درجهٔ کارشناسی‌ارشد مورد تائید قرار دادند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر بیژن رنجبر	دانشیار	
۲- استاد مشاور	دکتر مهرداد بهمنش	استادیار	
۳- استاد ناظر داخلی	دکتر مجید عرفانی‌مقدم	استادیار	
٤- استاد ناظر خارجی	دکتر مصطفی رضایی‌طاویرانی	دانشیار	
٥- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر مجید عرفانی‌مقدم	استادیار	

بسمه‌تعالی

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادّهٔ ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

مادّهٔ ۲ در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ ..... است که در سال ..... در دانشکدهٔ ..... دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر ..... ، مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر ..... و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر ..... از آن دفاع شده است.»

مادّهٔ ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّهٔ ۴ در صورت عدم رعایت مادّهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس، تأدیه کند.

مادّهٔ ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّهٔ ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّهٔ ۶ اینجانب سعیده رضیری پور دانشجوی رشته بیوشیمی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام‌خانوادگی: سعیده رضیری پور

تاریخ و امضاء

۸۷/۹/۱۰

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می‌شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

این پایان نامه را با تمام وجود به

مادر فداکار و دلسوزم

روح پدر بزرگوارم

و

برادر و خواهر مهربانم

تقدیم می نمایم.

تشکر و قدردانی

با سپاس بیکران از درگاه خداوند متعال، که جز با لطف بی‌پایانش این مهم به سرانجام نمی‌رسید؛

با تشکر از محضر امام عصر عج الله تعالی فرجه الشریف که عنایات حضرتش روشنای راه بود؛

با تشکر فراوان از جناب آقای دکتر بیژن رنجبر که راهنمایی این پایان‌نامه را عهده‌دار بودند؛

با سپاس از جناب آقای دکتر مهرداد بهمنش که مشاوره این کار را برعهده داشتند؛

از دوستان عزیز و گرامی در گروه‌های بیوفیزیک و بیوشیمی کمال تشکر و قدردانی را دارم؛

از سرکار خانم دکتر لیلا حسنی و سرکار خانم فدایی تشکر ویژه می‌نمایم؛

از اعضای خانواده گرامی‌ام نیز کمال تشکر را دارم که تمام دلگرمی‌ام در طول مسیر زندگی‌ام بوده‌اند.

چکیده

آنزیم اینوزین تری فسفات پیروفسفاتاز، hITPase، جزو ابرخانواده نوکلئوزید تری فسفوهیدرولازهاست که نقش آن هیدرولیز نوکلئوتیدهای غیر استاندارد اینوزین تری فسفات و گزانتین تری فسفات به نوکلئوتیدهای مونو فسفاته آن و پیروفسفات است. به دلیل اهمیت بالینی آن در راستای حذف این نوکلئوتیدها و ممانعت از بروز جهش در ژنوم و آثار سوء دیگر، مطالعه تحقیقاتی آن ضروری به نظر می-رسد.

در این مطالعه، از وکتور pET برای بیان بالای آنزیم نوترکیب استفاده گردید که با ستون کروماتوگرافی تمایلی تخلیص و با استفاده از آنزیم اینتروکیناز دنباله نشانمند آن برش خورده و خالص شد.

سپس به منظور درک بهتر مکانیسم عمل hITPase، مطالعه ساختاری این آنزیم با استفاده از طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی و فلورسانس انجام گردید. در این پژوهش ساختار دوم و سوم آنزیم در حضور و عدم حضور کاتیون‌های دو ظرفیتی منیزیم، منگنز و کلسیم با غلظت‌های مختلف و در سه pH مختلف اسیدی، بازی و فیزیولوژیک ثبت گردید.

نتایج نشان‌دهنده حفاظت ساختار دوم در حضور منیزیم بود، در حالیکه در منگنز و کلسیم باز شدگی ساختاردوم دیده شد. در ضمن، در حضور هر سه یون ساختار سوم hITPase در اطراف گروه‌های آروماتیک منعطف شدند و پاکت‌های آبگریز hITPase در دسترس قرار گرفتند؛ که نتایج دال بر بدام افتادن حالت حدواسط شبه مولتن گلوبول در حضور منیزیم و بازشدگی ساختاری در حضور منگنز و کلسیم است. در مورد اثر pH نیز در محیط اسیدی و قلیایی در مقایسه با محیط فیزیولوژیک، محتوای ساختار دوم آنزیم تغییر کرده و ساختار سوم آن هم منعطف‌تر شده است ولی در حالت اسیدی ساختار جمع‌تر شده است.

واژگان کلیدی: *hITPase، اینوزین تری فسفات، وکتور pET، دورنگ نمایی دورانی، فلورسانس، کاتیون‌های دوظرفیتی، حالت حدواسط شبه مولتن گلوبول*

فهرست مطالب

فصل اول ۱
مقدمه ۱
۱-۱- اشتقاق NTPase های خانه‌تکان ۴
۱-۱-۱- ابرخانواده Nudix ۷
۱-۱-۲- خانواده dUTPase های تریمری ۸
۱-۱-۳- NTP پیروفسفاتازهای تمام α ۱۰
۱-۱-۳-۱- dUTPase دیمری ۱۰
۱-۱-۳-۲- MazG ۱۲
۱-۱-۴- ابرخانواده ITPase ۱۴
۱-۱-۴-۱- Maf و YjjX- NTPase هایی برای نوکلئوتیدهای متیله شده(؟) ۱۴
۱-۱-۴-۲- ITP پیروفسفاتازها ۱۶
۱-۲- تاریخچه شناسایی و مطالعات ITPase ۱۶
۱-۳- مکانیسم عمل ITPase ها ۱۹
۱-۴- ساختار ITPase انسانی ۲۱
۱-۵- تظاهرات بالینی نقص ITPase ۲۴
۱-۶- اثر عوامل کمکی (کوفاکتور) فلزی بر پروتئین ۲۵
۱-۷- اثر pH بر پروتئین ۲۶
۱-۸- مطالعه بنای فضایی پروتئین ۲۸
۱-۹- هدف از انجام مطالعه ۲۹
فصل دوم ۳۰
مواد و روش‌ها ۳۰
۲-۱- فهرست مواد و دستگاه‌های مورد استفاده ۳۱
۲-۲- بهینه‌سازی بیان ژن ۳۳
۲-۲-۱- جدا کردن تک کلون‌های حاوی اینوزین تری فسفات پیرو فسفاتاز انسانی با بیان ژن بالا ... ۳۳
۲-۲-۲- وکتور pET-32a ۳۳
۲-۲-۳- بیان پروتئین ۳۵
۲-۲-۴- تهیه محتوای سلولی از باکتری‌ها ۳۵

۲-۲-۵- سونیکاسیون ۳۵
۲-۳- SDS-PAGE ۳۶
۲-۳-۱- تهیه محلول‌های لازم برای الکتروفورز ۳۶
۲-۳-۱-۱- محلول استوک اکریل آمید (۳۰/۸ درصد) ۳۶
۲-۳-۱-۲- بافر ژل پایین ۳۶
۲-۳-۱-۳- بافر ژل بالا ۳۷
۲-۳-۱-۴- بافر الکترود (بافر مخازن) ۳۷
۲-۳-۱-۵- بافر نمونه (۵X) ۳۷
۲-۳-۱-۶- پرسولفات آمونیوم (۱۰٪) ۳۷
۲-۳-۱-۷- TEMED (۱۰٪) ۳۷
۲-۳-۱-۸- استانداردهای وزن مولکولی ۳۷
۲-۳-۲- آماده سازی ژل و بارگذاری نمونه‌ها ۳۷
۲-۳-۳- رنگ آمیزی ژل ۳۹
۲-۴- تخلیص پروتئین ۳۹
۲-۵- سنجش غلظت پروتئین‌ها ۴۰
۲-۶- برش پروتئین فیوز شده توسط آنزیم اینتروکیناز نوترکیب گاوی ۴۱
۲-۷-تخلیص hITPase از ترکیب برش ۴۱
۲-۸- فعالیت آنزیم hITPase ۴۲
۲-۸-۱- مرحله اول ۴۲
۲-۸-۲- مرحله دوم ۴۲
۲-۸-۳- مرحله سوم ۴۳
۲-۹- مطالعه دو رنگ نمائی حلقوی (CD) ۴۳
۲-۱۰- مطالعات فلورسانس ۴۴
فصل سوم ۴۶
نتایج ۴۶
۳-۱- تخلیص پروتئین ۴۷
۳-۱-۱- تخلیص پروتئین Trx-hITPase ۴۷
۳-۱-۲- برش پروتئین Trx-hITPase با اینتروکیناز و تخلیص hITPase ۴۸
۳-۲- فعالیت آنزیم hITPase نوترکیب با استفاده از روش لومینسانس ۵۰

۳-۳- مطالعات ساختاری ۵۱
۳-۳-۱- مطالعات ساختاری به روش دورنگ نمایی دورانی (CD) ۵۱
۳-۳-۱-۱- دورنگ نمایی دورانی ناحیه فرابنفش دور ۵۱
۳-۳-۱-۲- دورنگ نمایی دورانی ناحیه فرابنفش نزدیک ۵۵
۳-۳-۲ مطالعه فلورسانس ۵۶
۳-۳-۲-۱- مطالعه فلورسانس ذاتی ۵۶
۳-۳-۲-۲- مطالعه فلورسانس اتصال ANS ۵۸
فصل چهارم ۶۲
بحث ۶۲
پیشنهادات ۷۲
منابع ۷۳

فهرست شکل‌ها

شکل(۱-۱) ساختار NTPs نامتعارف ۳
شکل(۱-۲) تشکیلات ساختاری و طرز اتصال سوبسترا در ابرخانواده‌های NTP پیروفسفاتازهای خانه-تکان مختلف. ۶
شکل(۱-۳) جایگاه فعال *E.coli* MutT در اتصال به 8-oxo-dGMP. ۸
شکل(۱-۴) جایگاه فعال *E.coli* dUTPase (تریمری) در اتصال با آنالوگ غیرقابل هیدرولیز dUTP. ۹
شکل(۱-۵) *C.jejuni* dUTPase (دیمری) در اتصال با آنالوگ غیرقابل هیدرولیز dUTP. ۱۲
شکل(۱-۶) *S.solfotaricus* MazG در اتصال با 2-oxo-dATP ۱۳
شکل(۱-۷) دیاگرام سطح دیمر پروتئین Mj0226. ..... ۲۰
شکل(۱-۸) *Thermotoga maritime* dITPase در اتصال با XTP ۲۱
شکل(۱-۹) ساختار دیمری hITPA. ۲۳
شکل(۱-۱۰) اتصال سوبسترا در hITPA. ۲۳
شکل(۱-۱۱) اندرکنش پاکت اتصال نوکلئوتیدی و بازهای پورینی. ۲۴

شکل(۱-۱۲) کوفاکتورهای مختلف و اندرکنش آنها با پروتئین‌ها. ۲۶
شکل(۱-۱۳) نمودار زنگوله‌ای فعالیت بر علیه pH. ۲۸
شکل(۲-۱) نقشه ژنی وکتور pET-32a. ۳۴
شکل(۳-۱) اتصال آنزیم hITPase دارای دنباله هیستیدینی به ستون نیکل- سفارز. ۴۷
شکل(۳-۲) نمایش بیان پروتئین pET قبل از القا (۱)، بعد از القا (۲)، آنزیم Trx-hITPase قبل از القا (۳)، بعد از القا (۴) و تخلیص آنزیم Trx-hITPase به وسیله ستون نیکل- سفارز (۵) بر ژل SDS-PAGE. ۴۸
شکل(۳-۳) برش Trx-hITPase با استفاده از اینتروکیناز بر روی SDS-PAGE. ۴۹
شکل(۳-۴) نمایش تخلیص آنزیم hITPase به وسیله ستون نیکل- سفارز بر ژل SDS-PAGE ۴۹
شکل(۳-۵) نمودار هیستوگرام پروتئین نوترکیب hITPase در حضور و عدم حضور سوبسترا در زمان ۵ دقیقه. ۵۰
شکل(۳-۶) طیف‌های CD ناحیه فرابنفش دور آنزیم hITPase در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف منیزیم کلرید (A)، منگنز کلرید (B) و کلسیم کلرید (C) ۵۲-۵۳
شکل(۳-۷) طیف‌های CD ناحیه فرابنفش دور آنزیم hITPase در سه pH فیزیولوژیک، بازی، ۱۰/۰، و اسیدی، ۴/۰، در دمای ۲۵°C. ۵۴
شکل(۳-۸) طیف‌های CD ناحیه فرابنفش نزدیک آنزیم hITPase در سه pH فیزیولوژیک، بازی، ۱۰/۰، و اسیدی، ۴/۰، در دمای ۲۵°C. ۵۵
شکل(۳-۹) طیف نشری ذاتی آنزیم hITPase در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف منیزیم کلرید. ۵۶
شکل(۳-۱۰) طیف نشری ذاتی آنزیم hITPase در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف منگنز کلرید. ۵۷
شکل(۳-۱۱) طیف نشری ذاتی آنزیم hITPase در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید. ۵۷
شکل(۳-۱۲) طیف نشری ذاتی آنزیم hITPase در سه pH فیزیولوژیک، بازی، ۱۰/۰، و اسیدی، ۴/۰، در دمای ۲۵°C. ۵۸

شکل(۳-۱۳) طیف نشری اتصال ANS آنزیم hITPase در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف منیزیم کلرید. ۵۹
شکل(۳-۱۴) طیف نشری اتصال ANS آنزیم hITPase در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف منگنز کلرید. ۶۰
شکل(۳-۱۵) طیف نشری اتصال ANS آنزیم hITPase در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید. ۶۰
شکل(۳-۱۶) طیف نشری اتصال ANS آنزیم hITPase در سه pH فیزیولوژیک، بازی، ۱۰/۰، و اسیدی، ۴/۰، در دمای ۲۵°C. ۶۱
شکل(۴-۱) نواحی در دسترس حلال بر روی سطح آنزیم hITPase و محل استقرار گروه‌های Trp بر روی آن (کد بانک اطلاعاتی پروتئین 2I5D). ۶۸
شکل(۴-۲) نواحی مجاور Trp90 بر روی سطح آنزیم hITPase. ۷۱
شکل(۴-۳) نواحی مجاور Trp151 بر روی سطح آنزیم hITPase. ۷۱

فهرست جداول

جدول(۱-۱) NTP پیروفسفاتازها و سوبستراهای آن. ۵
جدول(۱-۲) توزیع فیلوژنتیکی آنزیم‌های آنالوگ خانه‌تکان. ۱۱
جدول(۱-۳) گروه‌های قابل یونیزه که در خواص اسید-بازی پروتئین‌ها مشارکت می‌کنند، که مقادیر تقریبی pK_a نشان داده شده است. ۲۷
جدول(۳-۱) میزان شدت نور تولیدی بر حسب واحد نوری (RLU/s) در زمان ۵ دقیقه برای hITPase در حضور و عدم حضور سوبسترای ITP پس از افزودن کوکتل لوسیفرین/لوسیفراز. ۵۰
جدول(۳-۲) درصد ساختارهای دوم آنزیم در سه pH مختلف. ۵۴
جدول(۴-۱) لیست کاندیداهای مورد انتخاب برای خاموشی تریپتوفان. ۶۹

فصل اول

مقدمه

التیام وجودی بشر، بیشتر از آن‌که منوط به جسم دانسته شود، به روح وی منسوب می‌شود*. ولی در سطح سلولی، به خصوص موجودات تک سلولی، نبرد مستمری برای پاکسازی خود از هزاران ترکیب سمی پیرامون برای بقای حیات، امری ضروری است. سیستم سم زدایی درون سلولی، روش مهمی برای حفاظت در برابر سموم موجود، اعم از فلزات سمی، ترکیبات آرسنیک، رادیکال‌های آزاد اکسیژن و بسیاری دیگر می‌باشد (Galperin *et al.*, 2006).

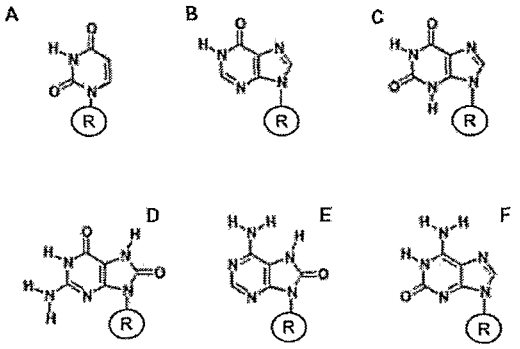
علاوه بر خطرات و مواد سمی موجود در محیط، ترکیبات سمی یا با قابلیت سمیت می‌توانند به عنوان محصولات متابولیسم طبیعی سلول تولید شوند. یکی از این ترکیبات با قابلیت سمی داشتن، نوکلئوزید تری فسفات‌های غیر متعارف[1] (NTPs) از قبیل داکسی یوریدین تری فسفات[2] (dUTP)، (داکسی) اینوزین تری فسفات[3] (d)ITP))، (داکسی) گزانتین تری فسفات[4] (d)XTP))، ۸-اکسو-داکسی گوانوزین تری فسفات[5] (8-oxo-dGTP) یا ۲-اکسو-داکسی گوانوزین تری فسفات[6] (2-oxo-dGTP) است (شکل ۱-۱) که از اکسیداسیون، دآمیناسیون یا تغییرات دیگر در نوکلئوتیدهای متعارف آدنینی، گوانینی، سیتوزینی، تیمینی و یوراسیلی بوجود می‌آیند (Kamiya, 2003). تجمع این NTPs غیر طبیعی در DNA تازه ساخته شده، باعث جفت شدگی اشتباه[7] می‌شود که به‌طور چشم‌گیری، میزان جهش را افزایش می-دهد. حذف NTPs غیرطبیعی از مخزن نوکلئوتیدی، با استفاده از دامنه آنزیمی وسیعی مثل ITPase،

---

* منسوب به بقراط، "Heal thyself"، قرن پنجم قبل از میلاد مسیح.

[1] Non-canonical nucleoside triphosphates
[2] Deoxy uridine triphosphate
[3] (Deoxy) inosine triphosphate
[4] (Deoxy) xathine triphosphate
[5] 8-oxo-deoxy guanosine triphophate
[6] 2-oxo-deoxy guanosine triphophate
[7] Mispairing

dUTPase، MutT/*شریشیا کولی*[1] (*E.coli*) و هیدرولازهای وابسته خانواده نوکلئوزید دی فسفات متصل به بخش X (Nudix)[2] (Koonin, 1993) می‌باشند؛ که توسط بسمان و دیگران به عنوان آنزیم‌های خانه-تکان[3] معرفی گردید. عملکرد آنها پاکسازی سلول از متابولیت‌های درونی مضر و تعدیل حدواسط‌های مسیرهای بیوشیمیایی است (Bessman *et al.*, 1996). تنوع زیادی در آنزیم‌های خانه‌تکان به علت تفاوت در ساختار و اختصاصی بودن سوبسترا وجود دارد.



شکل(۱-۱) ساختار NTPs نامتعارف؛ A: dUTP، B: dITP، C: dXTP، D: 8-oxo-dGTP، E: 8-oxo-dATP، F: 2-oxo-dATP. R در تمامی موارد داکسی ریبوز تری فسفات را نشان می‌دهد (Galperin *et al.*, 2006).

[1] *Escherichia coli*
[2] Nucleoside diphosphate linked to an X moiety
[3] House-cleaning enzyme

۱-۱- اشتقاق NTPase های خانه‌تکان

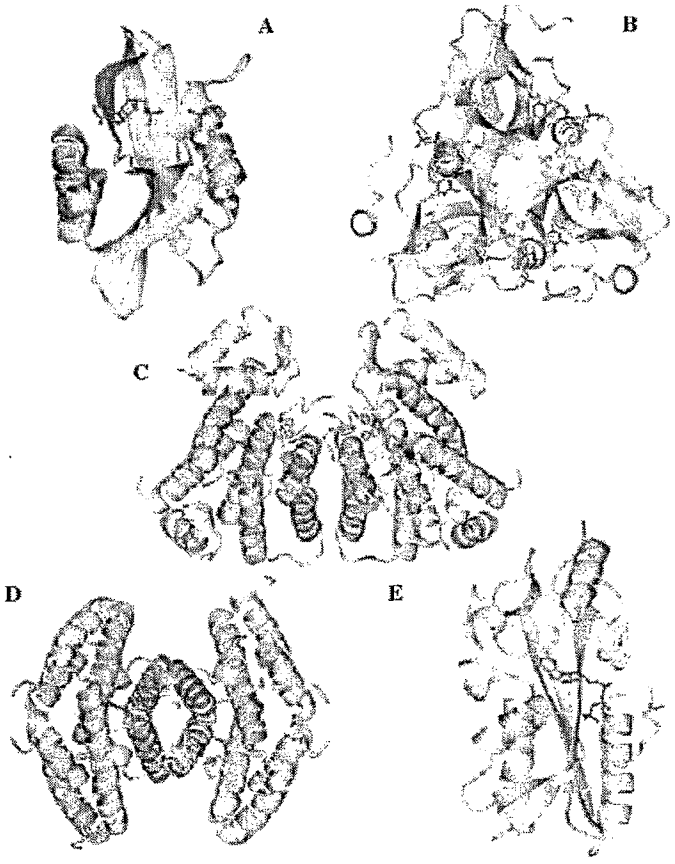
از تمامی پاکسازی‌هایی که در درون سلول صورت می‌گیرد، محافظت از تمامیت DNA ژنومی، مهمترین کار می‌باشد. انواع مختلف DNA پلیمرازها، که dATP، dGTP، dCTP و dTTP را درون DNA نوساز[1] قرار می‌دهند، در برابر ریبونوکلئوتیدها بسیار انتخابی هستند؛ ولی فقط انتخاب محدود به بازهای نیتروژنه است حتی در صورت جانشینی بنزیمیدازول‌ها به عنوان سوبسترا (Loeb and Kunkel, 1982; Kunkel and Bebenek, 1988; Kincaid *et al.*, 2005). برخلاف این‌که DNA پلیمرازها توانایی تمییز دادن برخی از نوکلئوتیدهای جهش‌زا را دارند، ولی بسیاری از نوکلئوتیدهای نامتعارف به احتمال زیاد وارد DNA ژنومی می‌شوند که باعث جفت شدگی اشتباه شده و به دنبال آن می‌تواند منجر به انواع جهش‌ها، مانند جابجایی‌ها[2] و وارونگی‌ها[3] شود (Hizi *et al.*, 1997; Hamid and Eckert, 2005). قطعه قطعه کردن و هیدرولیز dNTPs غیر استاندارد، یک راه جلوگیری از آسیب DNA است که به‌طور موثر کار ترمیم DNA را انجام دهد (Michaels and Miller, 1992). در جدول۱-۱ NTP پیروفسفاتازهای NTP-Ppase، خانه‌تکان و سوبسترای هریک نشان داده شده است. در ادامه، به چند ابرخانواده[4] NTPase های خانه‌تکان مختلف، اشاره شده است (شکل۱-۲).

[1] Nascent DNA
[2] Transitions
[3] Transversions
[4] Superfamily

جدول(۱-۱) NTP پیروفسفاتازها و سوبستراهای آن (Galperin *et al.*, 2006).

Enzyme	Non-canonical NTP[a] Name	Generated by	Pairs with	References
ITPase	dITP	IMP reduction, phosphorylation	A, C, T	Hwang *et al.* (1999); Chung *et al.* (2001)
	dXTP[b]	dGTP deamination	T, C	
Trimeric dUTPase	dUTP	dCTP deamination	A, G	Larsson *et al.* (1996a); Persson *et al.* (2001)
Dimeric dUTPase	dUTP	dCTP deamination	A, G	Harkiolaki *et al.* (2004); Moroz *et al.* (2004)
Escherichia coli MutT	8-oxo-dGTP	dGTP oxidation	A, C	Maki and Sekiguchi (1992); Saraswat *et al.* (2002)
Human MTH1	8-oxo-dGTP	dGTP oxidation	A, C	Fujikawa *et al.* (1999); Kamiya (2004)
	8-oxo-dATP	dATP oxidation, γ-irradiation	T, G, A	
	2-oxo-dATP	dATP oxidation	T, C, G, A	
	2-oxo-rATP	ATP oxidation	–	
UTPase	5-methyl-rUTP (rTTP)	RNA breakdown, phosphorylation	–	Xu *et al.* (2008)
MazG[c]	2-oxo-dATP[d]	dATP oxidation	T, G, C, A	Zhang *et al.* (2003); Moroz *et al.* (2005)

a. Pairing data are from Kamiya (2003) and original references.
b. Data with riboNTP substrate; no available data on dNTP hydrolysis.
c. Unconfirmed prediction for the *sulfolobus* enzyme.



شکل(۱-۲) اشکال ساختاری و طرز اتصال سوبسترا در ابرخانواده‌های NTP پیروفسفاتازهای خانه‌تکان مختلف؛ A: ابرخانواده Nudix، B: ابرخانواده dUTPase (تریمری)، C: ابرخانواده NTP-PPase تمام α: dUTPase دیمری، D: ابرخانواده NTP-PPase تمام α: پروتئین‌های وابسته به MazG، E: ابرخانواده ITP پیروفسفاتاز (Galperin *et al.*, 2006).

۱-۱-۱- ابرخانواده Nudix

E.coli MutT، یکی از آنزیم‌های این خانواده، اولین آنزیمی است که به عنوان خانه‌تکان شناخته شده است. به‌طورکلی این آنزیم تخصص‌یافتگی[1] پایینی برای هیدرولیز نوکلئوتید متعارف dGTP دارد (Bhatnagar and Bessman, 1988; Akiyama *et al.*, 1989). اما مطالعات دیگر نشان داد که 8-oxo-dGTP، سوبسترای مناسبتری برای این آنزیم است (Maki and Sekiguchi, 1992; Saraswat *et al.*, 2002). جایگاه فعال[2] MutT دارای چندین باقیمانده[3] اسیدآمینه‌ای است که کمک می‌کند آنزیم dGTP را از 8-oxo-dGTP تشخیص دهد. به جایگاه فعال MutT، "جعبه Nudix"[4] می‌گویند که حاوی باقیمانده‌های اسیدآمینه‌ای "$Gx_5Ex_5UxREUxEExGU$" (U اسیدآمینه آبگریز و x می‌تواند هر اسیدآمینه‌ای باشد) است، که تشکیل موتیف ساختاری[5] حلقه- پیچه-حلقه[6] می‌دهد که در حضور یون منیزیم واکنش را کاتالیز می‌کند (شکل۱-A۲) (Koonin, 1993). در ضمن دو باقیمانده Asn119 و Arg78 در تشخیص نوکلئوتید صحیح نقش کلیدی دارند (شکل۱-۳). ارتولوگ[7] انسانی این آنزیم، MTH1، علاوه بر هیدرولیز 8–oxo-dGTP، دو NTP اکسید دیگر، 2–oxo-dATP و 8–oxo-dATP را نیز به واسطه چند باقیمانده، به خصوص Asn33، شناسایی و هیدرولیز می‌کند (Mishima *et al.*, 2004). براساس مطالعات میلدوان و دیگران، آنزیم‌های ابرخانواده Nudix دامنه وسیعی از سوبستراها مثل دی نوکلئوزید پلی فسفات‌ها[8]، نوکلئوتید- قندها[9]، RNA کلاهک‌دار[10] و کوآنزیم‌های دی‌نوکلئوتیدی[11] را هیدرولیز می‌کنند (Mildvan *et al.*, 2005). پس با اینکه برخی از آنزیم‌های این ابرخانواده، مخزن نوکلئوتیدی[12] را متعادل می‌کنند،

---

[1] Specificity
[2] Active site
[3] Residue
[4] Nudix box
[5] Structural motif
[6] Loop- helix-loop
[7] Orthologue
[8] Dinucleoside polyphosphates
[9] Nucleotide-sugars
[10] Capped RNA
[11] Dinucleotide coenzymes
[12] Nucleotide pool