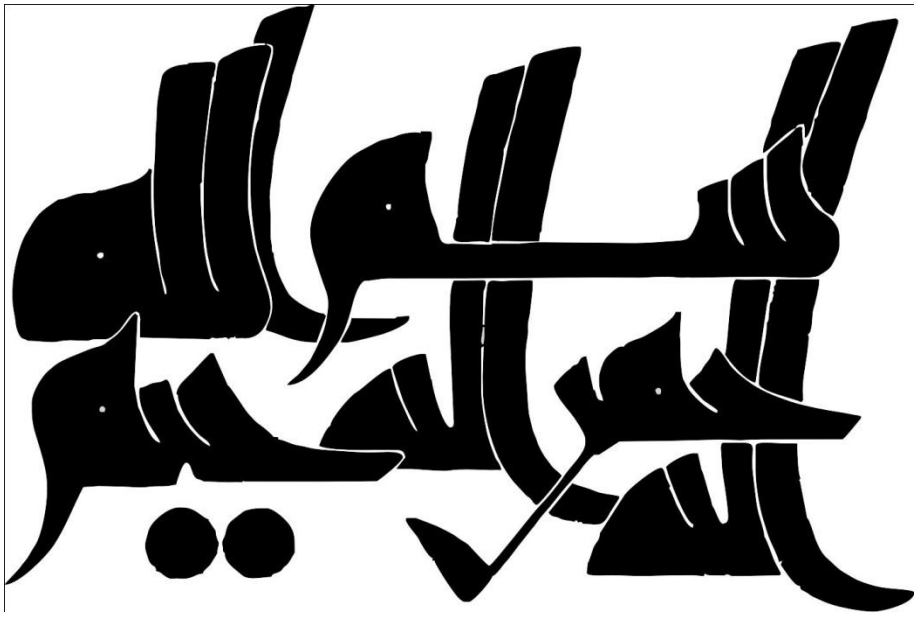


وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه
گاوازنگ – زنجان

مطالعه اثر مهارکنندگی کربامویل و تیوکربامویل فسفینات-ها بر روی آمینوپپتیداز و تلاش جهت سنتز آنالوگ تیو فسفاتی آدنین

پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد

ثریا احمدی

استاد راهنما: دکتر بابک کبودین

استاد مشاور: دکتر سعید عمادی

شهریور ۱۳۹۱

تقدیم به پدر و مادر مهربانم

تشکر و قدردانی

زبانم پر از سپاس و بند بند استخوانم تسبیح گوی تو باد، به نعمت‌های بیکرانت ای سلسله جنبان آفرینش و ای مهربان پروردگارم.

شایسته است

از خانواده عزیزم به خصوص پدر و مادر مهربانم

از استاد گرامی و ارجمندم جناب دکتر بابک کبودین و همچنین استاد بزرگوارم جناب دکتر سعید عمادی برای کمک‌ها و راهنمایی‌های ارجمندشان

از تمام اساتید بزرگواری که از آغاز زندگی تحصیلی افتخار شاگردی ایشان را داشته‌ام

از دوستان خوبم که خاطرات زیبای بودن در کنارشان را، هرگز از یاد نخواهم برد،

مراتب تشکر و قدردانی را به جای آورم.

چکیده

ترکیبات ارگانوفسفر به میزان زیادی در زمینه‌های کشاورزی و صنعت استفاده می‌شوند. هم‌چنین می‌توانند به عنوان عوامل درمانی نیز کاربرد داشته باشند از جمله‌ی این ترکیبات آدفوویردی پیوکسیل است که برای درمان هپاتیت B مزمن به کار می‌رود. ترکیبات ارگانوفسفر به دلیل استفاده‌های زیاد و ناپایداری شیمیایی در محیط از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند و مطالعات زیادی برای سنتز این ترکیبات در حال انجام است.

در بخش اول این پروژه، اثر مهارکنندگی ترکیبات کربامویل و تیوکربامویل فسفینات‌های سنتز شده بر روی آمینوپپتیداز بررسی شده است. نتایج حاصل از بررسی‌های تجربی نشان داده است که این ترکیبات اثر مهارکنندگی بسیار ضعیفی روی آنزیم لوسین آمینوپپتیداز میکروزومی کلیه خوک (آمینوپپتیدازN) دارند. نتایج حاصل از مدل سازی مولکولی نشان داده است که دسته‌ایی از این ترکیبات سنتز شده تمایل نسبتاً خوبی به جایگاه فعال آنزیم لوکوترینA_4 هیدرولاز دارند. اما برهمکنش آن‌ها با جایگاه فعال آنزیم لوسین آمینوپپتیداز به نسبت کمتر از آنزیم لوکوترینA_4 هیدرولاز می‌باشد. در مورد آمینوپپتیدازN باکتری اشریشیاکلی این برهمکنش‌ها بسیار ضعیف بود.

در بخش دوم این پروژه، سنتز مشتق تیوفسفاتی آدنین با استفاده از دی اتیل آمونیوم تیوفسفات و یا دی اتیل لیتیم تیوفسفات مورد بررسی قرار گرفت اما تلاش برای جداسازی محصول به‌دست آمده از واکنش، بدون نتیجه باقی ماند.

فهرست

عنوان صفحه

بخش اول VIII

بررسی اثر مهارکنندگی تریبات کربامویل و تیوکربامویل فسفینات‌ها بر روی آمینوپپتیداز..... VIII

فصل اول..... ۱

مقدمه و تاریخچه..... ۱

۱.۱ آنزیم ۱

۲.۱.۱ طبقه‌بندی آنزیم‌ها ۲

۲.۱ پروتئازها ۲

۳.۱ آمینوپپتیدازها..... ۳

۱.۳.۱ طبقه‌بندی آمینوپپتیدازها..... ۳

۴.۱ آمینوپپتیدازN ۴

۵.۱ آمینوپپتیدازN انسانی ۴

۱.۵.۱ ساختار مولکولی آمینوپپتیدازN انسانی ۵

۲.۵.۱ مکانیسم عمل آمینوپپتیدازN انسانی ۶

۶.۱ آمینوپپتیدازN باکتری اشریشیاکلی (E. Coli) ۷

۱.۶.۱ ساختار مولکولی آمینوپپتیدازN اشریشیاکلی..... ۷

۲.۶.۱ مکانیسم عمل آمینوپپتیدازN باکتری اشریشیاکلی..... ۸

۳.۶.۱ بررسی برهمکنش آمینوپپتیدازN باکتری اشریشیاکلی با بستاتین ۱۰

۷.۱ لوسین آمینوپپتیداز ۱۰
۱.۷.۱ ساختار مولکولی لوسین آمینوپپتیداز ۱۰
۲.۷.۱ مکانیسم عمل لوسین آمینوپپتیداز ۱۲
۸.۱ ساختار مولکولی لوکوترینA_4 هیدرولاز(LTA_4H) ۱۳
۱.۸.۱ مکانیسم عمل لوکوترینA_4 هیدرولاز ۱۴
۹.۱ بررسی مهار وابسته به زمان ۱۵
۱۰.۱ مهارکننده‌های آنزیمی ۱۶
۱.۱۰.۱ مهار کننده‌های قابل برگشت ۱۶
۲.۱۰.۱ مهارکننده‌های غیر قابل برگشت ۱۷
۱۱.۱ پارامتر IC_{50} ۱۷
۱۲.۱ ضریب هیل ۱۷
۱۳.۱ مهارکننده‌های متالوآمینوپپتیدازها ۱۸
۱.۱۳.۱ کربامویل و تیوکربامویل فسفینات‌ها ۱۸
۱۴.۱ سنجش فعالیت آنزیم آمینوپپتیدازN ۲۰
۱۵.۱ مدل سازی مولکولی ۲۱
۱.۱۵.۱ اتصال ۲۲
۲.۱۵.۱ نرم افزار AutoDock ۲۲
۳.۱۵.۱ اتصال کور ۲۳
۱۶.۱ هدف تحقیق ۲۴
فصل دوم ۲۵
روش کار ۲۵

۱.۲ کلیات مواد، دستگاه‌ها و روش‌های مورد استفاده ۲۵
۲.۲ روش کار عمومی تهیه کربامویل و تیوکربامویل فسفینیک اسیدها ۲۵
۳.۲ بررسی اثر مهارکنندگی کربامویل و تیوکربامویل فسفینات‌ها بر روی آنزیم آمینوپپتیدازN با استفاده از طیف سنجی مرئی-فرابنفش ۲۶
۱.۳.۲ تهیه محلول‌ها ۲۶
۲.۳.۲ اندازه گیری میزان مهارکنندگی کربامویل و تیو کربامویل فسفینات‌ها ۲۶
۳.۳.۲ محاسبه پارامتر IC_{50} و ضریب هیل (H) ۲۸
۴.۲ مدل سازی مولکولی با استفاده از نرم افزار AutoDock4 ..... ۳۳
فصل سوم ۳۴
بحث و نتیجه گیری ۳۴
۱.۳ کربامویل و تیوکربامویل فسفینات‌ها ۳۴
۲.۳ بررسی اثر مهارکنندگی کربامویل و تیوکربامویل فسفینات‌ها بر روی آنزیم آمینوپپتیدازN با استفاده از طیف سنجی مرئی-فرابنفش ۳۷
۳.۳ مقادیر ضریب هیل و IC_{50} کربامویل و تیوکربامویل فسفینات‌ها ۴۰
۴.۳ نتایج مربوط به مدل سازی مولکولی ۴۴
۱.۴.۳ آمینوپپتیدازN باکتری اشریشیاکلی ۴۵
۲.۴.۳ لوسین آمینوپپتیداز ۴۶
۳.۴.۳ لوکوترینA_4 هیدرولاز ۴۸
۵.۳ نتیجه گیری ۵۱
۶.۳ آینده نگری ۵۲
پیوست بخش اول ۵۳

نمودارهای Fractional Activity بر حسب لگاریتم غلظت (میکرومولار) ۵۳
منابع بخش اول ۵۸
بخش دوم ۶۱
تلاش جهت سنتز مشتق تیوفسفات آدنینی ۶۱
فصل اول ۶۲
مقدمه و تاریخچه ۶۲
۱.۱ مقدمه ۶۲
۲.۱ اسید نوکلئیک ۶۳
۳.۱ آنالوگ‌های نوکلئوزیدی ۶۵
۱.۳.۱ مقدمه و تاریخچه ۶۵
۲.۳.۱ روشهای سنتز آنالوگ‌های نوکلئوزیدی ۶۷
۱.۲.۳.۱ آسیکلوویر ۶۷
۲.۲.۳.۱ گانسیکلویر ۷۲
۳.۲.۳.۱ معرفی آنالوگ‌های نوکلئوزیدی دارای زنجیر غیر حلقوی جانبی متفاوت ۷۹
۴.۱ آنالوگ‌های نوکلئوتیدی ۸۲
۱.۴.۱ مقدمه و تاریخچه ۸۲
۲.۴.۱ روش‌های سنتز آنالوگ‌های نوکلئوتیدی ۸۵
۵.۱ نقش کمپلکس‌های یونی فلزی نوکلئوتیدهای طبیعی و آنالوگ‌های نوکلئوتیدی ۹۶
۶.۱ مقاومت دارویی ۹۸
۷.۱ هدف تحقیق ۹۸

فصل دوم ۹۹
روش کار ۹۹
۱.۲ کلیات مواد، دستگاه‌ها و روش‌های مورد استفاده ۹۹
۲.۲ آماده سازی حلال برای واکنش ۱۰۰
۱.۲.۲ حلال استونیتریل ۱۰۰
۲.۲.۲ حلال دی کلرو متان ۱۰۰
۳.۲ روش تهیه نمک دی اتیل آمونیوم تیوفسفات ۱۰۰
۴.۲ روش تهیه نمک تیوفسفات فلزی ۱۰۱
۵.۲ روش تهیه هیدروکسی اتیل آدنین ۱۰۲
۶.۲ روش تهیه کلرو اتیل آدنین ۱۰۳
۷.۲ روش تهیه دی اتیلن گلیکول مونوتاسیلات ۱۰۴
۸.۲ روش تهیه مشتق آدنینی تیوفسفات ۱۰۵
فصل سوم ۱۰۶
بحث و نتیجه گیری ۱۰۶
۱.۳ مقدمه ۱۰۶
۳.۲ نتیجه‌گیری ۱۱۷
پیوست بخش دوم ۱۱۸
منابع بخش دوم ۱۲۶

جداول و طیف‌ها

جدول۳-۱ (بخش اول) ترکیبات کربامویل وتیوکربامویل تیو فسفینات‌های سنتز شده..... ۳۵
جدول۳-۲ (بخش اول) اثر مهارکنندگی کربامویل وتیوکربامویل فسفینات‌ها بر روی فعالیت آمینوپپتیدازN ... ۳۹
جدول ۳-۳ (بخش اول) IC_{50} و ضریب هیل ترکیبات سنتز شده دارای اثر مهارکنندگی بهتر در مقایسه با سایر ترکیبات ٤۰
جدول ۳-٤ (بخش اول) انرژی اتصال آنزیم‌های آمینوپپتیدازN باکتری اشریشیاکلی، لوسین آمینوپپتیداز و لوکوترینA_4 هیدرولاز با ترکیبات متصل شده به جایگاه فعال آنزیم..... ۵۱
جدول۳-۱ (بخش دوم) واکنش بین دی اتیل آمونیوم تیو فسفات و اتیلن کربنات ۱۰۹
جدول۳-۲ (بخش دوم) واکنش دی اتیلن گلایکول مونوتاسیله با آدنین ۱۱۳
جدول۳-۳ (بخش دوم) واکنش ۹-هیدروکسی اتیل آدنین با پارا تولوئن سولفونیک اسید ۱۱٤
جدول۳-٤ (بخش دوم) واکنش کلرو اتیل آدنین با دی اتیل آمونیوم تیو فسفات ۱۱٦
طیف ^1H NMR ترکیب دی اتیل (آمونیوم) تیو فسفات در حلال DMSO ۱۱۹
طیف ^{13}C NMR ترکیب دی اتیل (آمونیوم) تیو فسفات در حلال DMSO ۱۱۹
طیف ^{31}P NMR ترکیب دی اتیل (آمونیوم) تیو فسفات در حلال DMSO ۱۲۰
طیف ^1H NMR ترکیب دی اتیل (لیتیم) تیو فسفات در حلال $CDCl_3$ ۱۲۰
طیف ^{13}C NMR ترکیب دی اتیل (لیتیم) تیو فسفات در حلال $CDCl_3$ ۱۲۱
طیف ^{31}P NMR ترکیب دی اتیل (لیتیم) تیو فسفات در حلال $CDCl_3$ ۱۲۱
طیف ^1H NMR ترکیب ۹- (۲- هیدروکسی اتیل) آدنین در حلال D_2O ۱۲۲
طیف ^{13}C NMR ترکیب ۹- (۲- هیدروکسی اتیل) آدنین در حلال D_2O ۱۲۲
طیف ^1H NMR ترکیب ۹- (۲- کلرو اتیل) آدنین در حلال DMSO ۱۲۳
طیف ^{13}C NMR ترکیب ۹- (۲- کلرو اتیل) آدنین در حلال DMSO ۱۲۳
طیف ^1H NMR ترکیب ۲- (۲- هیدروکسی اتوکسی) اتیل ٤- متیل بنزن سولفونات در حلال $CDCl_3$ ۱۲٤
طیف ^{13}C NMR ترکیب ۲- (۲- هیدروکسی اتوکسی) اتیل ٤- متیل بنزن سولفونات در حلال $CDCl_3$ ... ۱۲٤
طیف ^1H NMR ترکیب S-۲- (۶- آمینو-H۹- پورین-۹- ایل) اتیل O,O- دی اتیل فسفروتیوات در حلال $CDCl_3$ ۱۲۵
طیف ^{31}P NMR ترکیب S-۲- (۶- آمینو-H۹- پورین-۹- ایل) اتیل O,O- دی اتیل فسفروتیوات در حلال$CDCl_3$ ۱۲۵

بخش اول

بررسی اثر مهارکنندگی تریبات کرباموئیل و تیوکرباموئیل فسفینات‌ها بر روی آمینوپپتیداز

فصل اول

مقدمه و تاریخچه

۱.۱ آنزیم

دو شرط اساسی برای حیات این است که موجود زنده باید بتواند خود را همانندسازی نماید و هم‌چنین بتواند واکنش‌های شیمیایی را به طور کارآمد و انتخابی کاتالیز نماید.

آنزیم‌ها برجسته‌ترین و اختصاصی‌ترین پروتئین‌ها هستند که دارای قدرت کاتالیزوری فوق‌العاده بوده و اغلب فراتر از کاتالیزورهای سنتزی یا آلی عمل می‌کنند. آنزیم‌ها واکنش‌های شیمیایی را به میزان خیلی زیادی تسریع می‌کنند و در محلول‌های آبی و تحت شرایط ملایم درجه حرارت عمل می‌کنند.

مطالعه آنزیم‌ها دارای اهمیت علمی بسیار است. در بعضی از بیماری‌ها، ناهنجاری‌های ژنتیکی ارثی، ممکن است کمبود یا عدم وجود کامل یک یا چند آنزیم وجود داشته باشد. در موارد دیگر علت بیماری، ممکن است از افزایش فعالیت یک آنزیم باشد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها در پلاسما، گلبول‌های قرمز، یا نمونه‌های بافتی در تشخیص بعضی از بیماری‌ها دارای اهمیت است. بسیاری از داروها اثر خود را از طریق انجام واکنش با آنزیم‌ها اعمال می‌نمایند. آنزیم‌ها ابزار علمی مهمی در پزشکی و هم‌چنین در صنعت شیمی، پردازش مواد غذایی و کشاورزی می‌باشند [۱].

۲.۱.۱ طبقه‌بندی آنزیم‌ها

در مبحث آنزیم شناسی، آنزیم‌ها را از نظر فعالیت کاتالیزوری به ۶ گروه اصلی تقسیم می‌کنند:

۱. اکسیدوردوکتازها: واکنش‌های اکسید و احیا (اکسایش-کاهش) را کاتالیز می‌کند.

۲. ترانسفرازها: انتقال عوامل ویژه‌ای مانند آمین، فسفات و غیره را از مولکولی به مولکول دیگر به عهده دارند.

۳. هیدرولازها: واکنش‌های آبکافتی را کاتالیز می‌کنند. مانند پروتئازها یا پپتیدازها که موجب شکسته شدن پیوند پپتیدی (پیوند آمیدی) می‌شوند.

۴. لیازها: موجب برداشت گروه ویژه‌ای از مولکول می‌شوند. مانند دکربوکسیلازها که برداشت دی اکسید کربن را برعهده دارند.

۵. ایزومرازها: واکنش‌های تشکیل ایزومری را کاتالیز می‌کنند.

۶. لیگازها: آنزیم‌هایی هستند که باعث اتصال دو مولکول به یکدیگر و ایجاد پیوند کووالانسی بین آن‌ها می‌شوند [۲].

۲.۱ پروتئازها

پروتئازها یا پپتیدازها آنزیم‌هایی هستند که باعث تجزیه پروتئین‌ها می‌شوند. پروتئازها شامل سرین پروتئازها، متالوپروتئازها، آسپارتیک پروتئازها، سیستئین پروتئازها و ترئونین پروتئازها، می‌باشند. هم‌چنین پپتیدازها را از نظر جایگاه برش پیوند پپتیدی به ۲ گروه اصلی تقسیم می‌کنند. اگزوپپتیدازها دسته‌ای از پپتیدازها می‌باشند که با شکستن پیوند پپتیدی باقی مانده‌های پایانی زنجیره پپتیدی، باعث تجریه پروتئین می‌شوند. اندوپپتیدازها دسته‌ای از پپتیدازها می‌باشند که با شکستن پیوند پپتیدی باقی مانده‌های غیر پایانی زنجیره پپتیدی، باعث تجزیه پروتئین می‌شوند [۳].

۳.۱ آمینوپپتیدازها

آمینوپپتیدازها (EC[1] 3.4.11- هیدرولازها/ پپتیدازها/ آمینوپپتیدازها مطابق با طبقه‌بندی اتحادیه بین المللی بیوشیمی و سلولی مولکولی) آنزیم‌های پروتئولیتیکی هستند که پیوندهای پپتیدی را از انتهای آمینی (انتهایN) زنجیره‌های پلی پپتیدی هیدرولیز می‌کنند. آن‌ها در هر دو نوع سلول پروکاریوتی[2] و یوکاریوتی[3] وجود دارند و در سلسله‌های گیاهی و جانوری به طور گسترده‌ای فعالیت دارند [۴]. در بسیاری از اجزای سازنده سلولی، سیتوپلاسم و به عنوان اجزاء غشایی یافت می‌شوند. آمینوپپتیدازهای متعددی اعمال حیاتی سلول را انجام می-دهند، تعدادی، از این آمینوپپتیدازها روی‌متالوپروتئازهایی هستند، که برای انجام اعمال کاتالیزوری خودشان از حضور یک یا دو یون روی در جایگاه فعال‌شان بهره می‌گیرند. بسیاری از لیگاندها بدون تشکیل پیوند کوالان، بلکه از طریق تشکیل کمپلکس‌هایی با این یون‌ها، به آنزیم متصل می‌شوند [۵].

آمینوپپتیدازها نقش بیولوژیکی بسیار مهمی را در فرایندهای مختلف بدن بازی می‌کنند. تعدادی از این فعالیت-های بیولوژیکی عبارت‌اند از: رگ‌زایی، حضور آنتی بادی‌ها، فرایندهای پردازش هورمون‌ها و نوروپپتیدها، بارداری، بازیابی پروتئین‌ها، حافظه و التهاب [۶].

این آنزیم‌ها در بیماری‌هایی مثل سرطان [۷]، آلزایمر [۸]، فشار خون [۹]، دیابت [۱۰]، مالاریا [۱۱] و هم‌چنین آلودگی به ویروس [۱۲] دخالت دارند، و به همین دلیل در علم پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و از سال ۱۹۹۰ تا سال ۲۰۱۰ بالغ بر ۵۰۰۰ مقاله در مورد آمینوپپتیدازها به چاپ رسیده است.

۱.۳.۱ طبقه‌بندی آمینوپپتیدازها

۱. بر اساس تعداد آمینواسیدی که از انتهای آمینی سوبستراها جدا می‌کنند، آن‌ها را به سه دسته مونوآمینوپپتیدازها، دی آمینوپپتیدازها و تری آمینوپپتیدازها تقسیم می‌کنند.

۲. با در نظر گرفتن اینکه کدام اسید آمینه از انتهای آمینی برداشته می‌شود طبقه بندی بصورت لوسین آمینوپپتیداز، متیونین آمینوپپتیداز، سرین آمینوپپتیداز و آمینوپپتیدازN می‌باشد.

[1] Enzyme Commission
[2] Prokaryote
[3] Prokaryote

۳. با توجه به موقعیت آمینوپپتیدازها. که بر مبنای این نوع طبقه بندی آنزیم‌های حل شده در داخل میکروزوم‌ها، آنزیم‌های متصل شده به غشا و آنزیم‌های سیتوسولی[1] قرار دارند. آمینوپپتیدازهای دیگری در اندامک[2]های سلولی از قبیل لیزوزوم[3]، هستک[4] و میتوکندری[5] یافت می‌شوند.

۴. حساسیت مهار توسط بستاتین[6].

۵. بر اساس محتوی یون فلزی و یا اسید آمینه‌هایی که به یون فلزی متصل می‌شوند.

۶. مطابق با pH بهینه، که بیشترین فعالیت آنزیم در آن مشاهده می‌شود. بر این اساس، آنزیم‌ها اسیدی، بازی و خنثی نامیده می‌شوند [۱۳].

۴.۱ آمینوپپتیدازN

این آنزیم در گونه‌های مختلف پستانداران، حشرات، گیاهان و باکتری‌ها بسیار حفاظت شده است.

۵.۱ آمینوپپتیدازN انسانی

آمینوپپتیدازN انسانی(APN) هم‌چنین به عنوان ANPEP، CD[7]13، GP[8]150، LAP1، P150، PEPN، آلانین آمینوپپتیداز، آمینوپپتیداز میکروزومال و آمینوپپتیداز M نیز شناخته می‌شود. آمینوپپتیدازN انسانی (EC 3.4.11.2) یک اگزوپپتیداز غشایی خنثی و یا بازی است که در بسیاری از بافت‌های بدن و انواع سلول‌ها (اندوتلیال، اپیتلیال، فیبروبلاست، لوکوسیت) حضور دارد. اسید آمینه آلانین و یا آسید آمینه‌های خنثی و بازی توسط این آنزیم از انتهای آمینی پپتیدها برداشته می‌شود [۱٤]. سوبستراهای طبیعی این آنزیم بسیاری از هورمون‌ها و نوروپپتیدها هستند. به عنوان گیرنده برای ویروس انسانی کورونا E229 و ویروس سیتومگالو،

[1] Cytosolic
[2] Organelles
[3] Lysosome
[4] Nucleolus
[5] Mitochondria
[6] Bestatin
[7] Cluster of Differentiation
[8] Glycoprotein

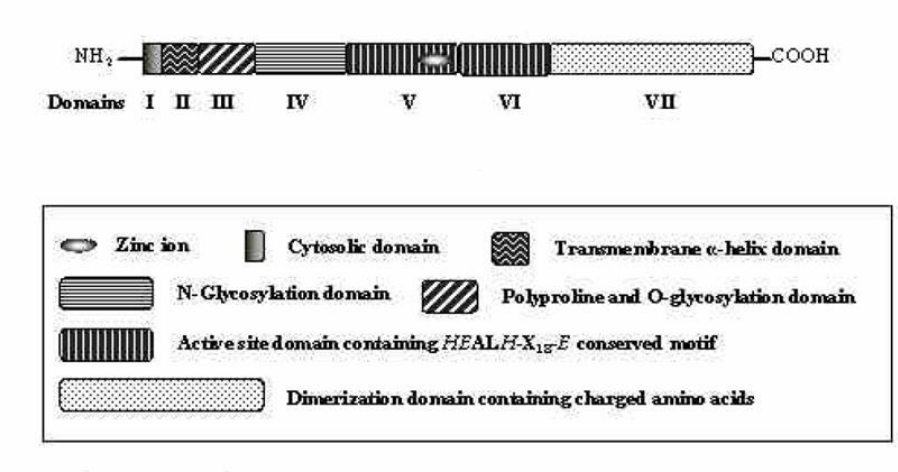
میانجی در التهاب و تقسیم سلولی، تنظیم کننده فشار خون و بیماری فشار خون، تنظیم کننده بی حسی نسبت به درد از طریق متابولیسم اندورفین[1]ها و انکفالین[2]ها، مارکر شناسایی آسیب‌های کلیوی و کبدی عمل می‌کند. علاوه بر این، این آنزیم هم‌چنین در دسترس پذیری فاکتور IL-8 را در اندومتریوم[3] تنظیم می‌کند و بنابراین ممکن است با پدیده رگ‌زایی در ارتباط باشد. هم‌چنین این آنزیم نقش کلیدی را در فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی، از قبیل جنین‌زایی، پاسخ‌های ایمنی، رگ‌زایی، هجوم سلول‌های توموری و متاستاز و بالاخره آلزایمر ایفا می‌کند [٦].

۱.۵.۱ ساختار مولکولی آمینوپپتیدازN انسانی

توالی کد کننده این آنزیم بر روی کروموزوم $15q_{25}$-q_{26} قرار گرفته که شامل ۲۰ اگزون است و یک پروتئین ۹٦۳–۹٦۷ اسید آمینه را بسته به گونه، کد می‌کند.

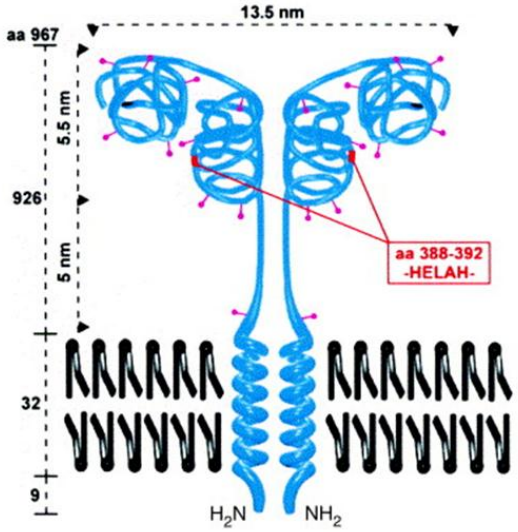
این آنزیم از هفت دمین تشکیل شده است، دمین اول یک بخش سیتوسولی نه تا ده آمینواسیدی در انتهای آمینی آنزیم است و فعالیت خاصی برای این دمین تعریف نشده است. دمین دوم، بخش ۲۳–۲٤ آمینو اسیدی که احتمالاً از یک مارپیچ آلفا تشکیل شده و از عرض غشا سلولی عبور کرده و این بخش در بین آمینوپپتیدازN در گونه‌های مختلف حفاظت شده است. دمین سوم، یک بخش پلی پرولینی بین اسید آمینه‌های ٤۰–۷۰ است و محل O-گلایکوزیلیشن پروتئین است. دمین چهارم، بین اسید آمینه‌های ۷۰–۲۵۲ است و محل N-گلایکوزیلیشن پروتئین می‌باشد. دمین پنجم و ششم ساختار سه بعدی احتمالی این آنزیم حاکی از این است که این بخش حاوی جایگاه اتصال آنیونی، پاکت آب‌گریز[4] S_1 در سمت چپ یون روی و S'_1 و S'_2 در سمت راست آن می‌باشد. این بخش حاوی جایگاه فعال آنزیم و توالی‌های حفاظت شده HEXXH(X_{18})E (محل اتصال آنزیم به یون روی) وGXMEN است. دمین هفتم، انتهای کربوکسیلی (انتهایC) پروتئین(۵۸۱–۹۶۷)، غنی از باقی‌مانده‌های باردار است و مسئول دایمر شدن آنزیم است. در جایگاه فعال این آنزیم تنها یک یون روی وجود دارد. یون روی در جایگاه فعال با سه باقی‌مانده His^{383}، His^{387} و Glu^{406} برهمکنش دارد (شکل۱–۱).

[1] Endorphin
[2] Enkephalin
[3] Endometrium
[4] Hydrophobe



(شکل ۱-۱) [۱٦]

شکل فعال این آنزیم به صورت دیمر می‌باشد (شکل ۱-۲)[۱۵]،[۱٦].

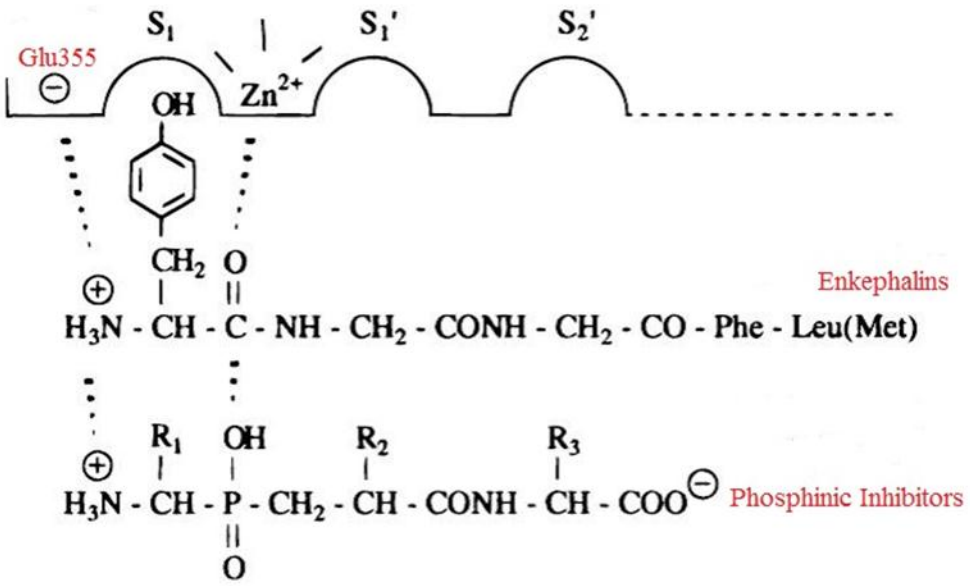


(شکل ۱-۲) شکل فعال آمینوپپتیدازN انسانی [۱۵]

۲.۵.۱ مکانیسم عمل آمینوپپتیدازN انسانی

باقی‌مانده Glu^{355} که دارای بار منفی است در تشخیص انتهای آمینی سوبسترا (دارای بار مثبت) و با پایدار نگه داشتن سوبسترا در جایگاه فعال نقش مهمی را ایفا می‌کند. pk_a آب توسط قطبش حاصل از یون Zn و Glu^{384} کاهش یافته و براحتی به یون هیدروژن و هیدروکسیل تجزیه شده، که Glu^{384} به عنوان کاتالیست بازی عمل کرده و پذیرنده یون هیدروژن است. یون هیدروکسیل حاصل از تجزیه آب به پیوند پپتیدی مستعد به برش

حمله کرده و یک حدواسط بوجود می‌آید. و در آخر Tyr^{469} به عنوان یک اسید عمل کرده و به نیتروژن پیوند پپتیدی در حال برش پروتون داده و پیوند پپتیدی شکسته می‌شود. Glu^{384} به عنوان کاتالیست بازی عمل نموده و پذیرنده یون هیدروژن است (شکل۱-۳) [۱۷]،[۱۸].



(شکل۱-۳) نحوه اتصال سوبسترا (انکفالین) و مهارکننده‌های فسفینیکی به جایگاه فعال آمینوپپتیدازN [۱۸]

۶.۱ آمینوپپتیدازN باکتری اشریشیاکلی (E. Coli)

آمینوپپتیدازN باکتری اشریشیاکلی برای اولین بار از *E. Coli K12* در سال ۱۹۸۲ جدا و خالص سازی شد. توالی نوکلئوتیدی کد کننده آن ژن (pepN) توسط فوگلینو[1] و همکارانش مشخص شد که این توالی یک پروتئین ۸۷۰ آمینواسیدی سیتوسولی را کد می‌کند. این آنزیم وزن مولکولی ۹۹ کیلو دالتونی دارد.

۱.٦.۱ ساختار مولکولی آمینوپپتیدازN اشریشیاکلی

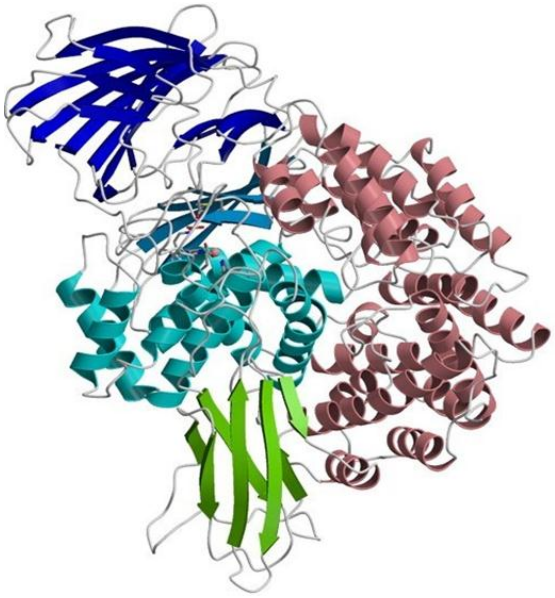
آنزیم از ٤ دمین تشکیل شده است: دمین بتای انتهای آمینی (Met^{1}-Asp^{193})، دمین کاتالیتیکی -(Phe^{194} Gly^{444})، دمین بتای میانی (Thr^{445}-Trp^{546})، دمین آلفای انتهای کربوکسیلی (Ser^{547}-Ala^{870}) (شکل۱-٤). آمینوپپتیدازN باکتری اشریشیاکلی با آمینوپپتیدازN انسانی ۱۳/٦٪ تشابه توالی دارد. دمین کاتالیتیکی دارای توالی‌های حفاظت شده $HEXXH(X_{18})E$ و GXMEN می‌باشد. His^{297}، His^{301}، Glu^{320} و یک مولکول

[1] Foglino

آب کئوردینانسیون چهار وجهی تشکیل می‌دهند که یون روی در مرکز آن قرار می‌گیرد.

Met^{260} در آمینوپپتیدازN گونه‌های مختلف باکتری‌ها از جمله آمینوپپتیدازN باکتری اشریشیاکلی حفاظت شده است اما این باقی مانده در آمینوپپتیدازN انسانی حفاظت شده نیست و باقی مانده متناظر آن Ala^{351} می‌باشد. به نظر می‌رسد در ترجیح دادن سوبسترا برای آنزیم اهمیت داشته باشد.

Glu^{264} در آمینوپپتیدازN باکتری اشریشیاکلی متناظر با Glu^{355} در آمینوپپتیدازN انسانی است که، این باقی مانده در تشخیص انتهای آمینی سوبسترا نقش مهمی را بازی می‌کند.



(شکل۱-٤) ساختار آمینوپپتیدازN باکتریایی [۱۹]

۲.٦.۱ مکانیسم عمل آمینوپپتیدازN باکتری اشریشیاکلی

مکانیسم عمل آمینوپپتیدازN باکتری اشریشیاکلی در شکل۱-۵ آورده شده است. مولکول آب که با یون روی کئوردیناسیون تشکیل می‌دهد یک عامل نوکلئوفیل است. خاصیت نوکلئوفیلی مولکول آب توسط یون روی و پیوند هیدروژنی با Glu^{298} به شدت فعال شده است. واکنش هیدرولیز با حمله نوکلئوفیلی مولکول آب به کربن کربونیل سوبسترا شروع می‌شود. گلوتامات به عنوان باز عمل می‌کند. به نظر می‌رسد که Glu^{298} قبل از متصل شدن به سوبسترا در یک محیط آب‌گریز متشکل از باقی مانده‌های Phe^{271} و Val^{294} احاطه شده است.