

اثر اتیلن دی آمین بر فعالیت و ساختار آنزیم تیروزیناز قارچ خوراکی

مهدی علی جانیان زاده^{۱*}، علی اکبر صبوری^۲، محمد رضا گنجعلی^۳

۱. دانشجوی دکتری بیوفیزیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران

۲. استاد بیوفیزیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. استاد شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مکان انجام پژوهش: مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران

مسئول مکاتبات: مهدی علی جانیان زاده، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران، پست الکترونیکی: alijanian@iauvaramin.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۱

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۱

چکیده

اثر اتیلن دی آمین بر ساختار و فعالیت آنزیم تیروزیناز قارچ خوراکی بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد که این لیگاند در غلظت بسیار پایین (۱۲-۱۰ مولار) فعالیت کروزولازی را فعال و زمان تاخیر آن را کوتاه می کند، اما در غلظت بالا (۱۰ میکرومولار) این فعالیت را کاملاً مهار می سازد. همچنین این لیگاند در غلظت بسیار پایین (۱۲-۱۰ مولار) فعالیت کته کولازی را نیز فعال می کند، اما در غلظت بالا (۱۰ میکرومولار) این فعالیت را کاملاً مهار می کند. همچنین مشخص شد که این لیگاند در غلظت ۱۲-۱۰ مولار سرعت ماکزیمم فعالیت کته کولازی را مهار می سازد. در قسمت دیگری از مطالعه حاضر، اثر این لیگاند بر ساختار آنزیم به دو صورت آزمایشگاهی و تئوری بررسی شد. این آزمایش در قسمت آزمایشگاهی، با فلورسانس و دورنگ نمایی حلقوی (CD) و در قسمت تئوری، با استفاده از نرم افزار HEX انجام شد که نتایج نشان داد این لیگاند هم به آنزیم متصل شده و هم در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته است.

واژه های کلیدی: تیروزیناز قارچ خوراکی، اتیلن دی آمین، کروزولازی، کته کولازی

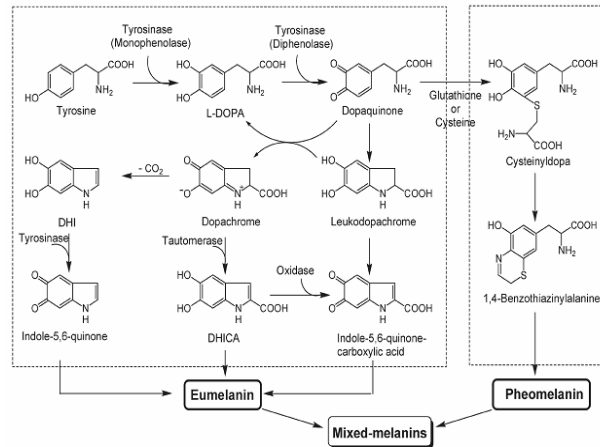
مقدمه

سبزیجات است. در حشرات، نقش مهمی در عمل تدافعی و اسکلت سازی آن ها ایفا می کند (۱، ۲). ملانین یکی از بیشترین رنگدانه های موجود در باکتری ها، قارچ ها، گیاهان و جانوران است که بیوپلیمری شبیه به رنگ مشکی است (۱). رنگ پوست و موی پستانداران توسط تعدادی فاکتور تعیین می شود که مهم ترین آنها میزان و نحوه پراکندگی تولید ملانین است. ملانین توسط سلول های ملانوسیت پراکنده در لایه بازال پوست، ترشح می شود (۲). بسیاری از بیماری های پوستی، نتیجه سطح بالای عمل تولید رنگدانه پوستی است (۳).

تیروزیناز (EC 1.14.18.1) یک آنزیم حاوی مس است که دو واکنش مختلف سنتز ملانین را کاتالیز می کند که شامل هیدروکسیله شدن تیروزین توسط عمل مونوفنلازی آنزیم و اکسید شدن ۳ و ۴ دی هیدروکسی فنیل آلانین (L-DOPA) به *o*-دوپاکینون توسط عمل دی فنلازی هستند. این آنزیم به میزان زیاد در میکروارگانیسم ها، گیاهان، حیوانات و قارچ یافت می شود و عامل بیوسنتز ملانین و ترکیبات پلی فنلیک است. در پستانداران، تیروزیناز عامل تشکیل رنگدانه های پوست، مو و چشم است. در گیاهان، اهمیت کلیدی تیروزیناز در فرآیندهایی نظیر پیگمانتاسیون و سیاه شدگی آنزیمی میوه ها و

فنل به *O*-کونینون (فعالیت دی فنلازی یا کته کولازی) با استفاده از اکسیژن ملکولی و به کمک آنزیم تیروزیناز صورت می‌گیرد. این مسیر به وسیله واکنش‌های غیرآنزیمی تا سنتز ملانین ادامه می‌یابد (تصویر ۱) (۵). تولید غیرعادی ملانین در انسان، همراه با مشکلات جدی زیبایی است (۵).

به طور کلی دو نوع ملانین در پستانداران وجود دارد: که شامل اوملانین و فتوملانین می‌باشند (۳، ۴) هر دو گروه ملانین به واسطه ترکیبی از واکنش‌های آنزیمی و شیمیایی به وجود می‌آیند. دو مرحله اول مسیر بیوسنتز ملانین شامل هیدروکسیلاسیون مونوفنل به *O*-دی فنل (فعالیت مونوفنلازی یا کرزولازی) و اکسیداسیون *O*-دی

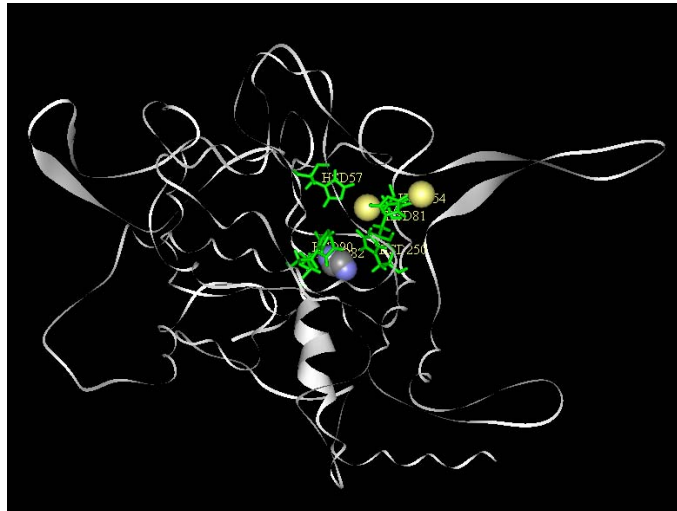


تصویر ۱- مسیر بیوسنتز ملانین (۱).

تیروزیناز (مونوفنل، *O*-دی فنل: اکسیژن اکسیدوردوکتاز، EC.1.14.18.1) آنزیمی حامل مس و عامل تشکیل رنگدانه‌های پوست، مو و چشم است (۶). این آنزیم به میزان زیاد در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان، حیوانات و قارچ یافت می‌شود (۷). این آنزیم، دو واکنش مجزای سنتز ملانین را کاتالیز می‌کند: هیدروکسیله‌شدن تیروزین با استفاده از فعالیت مونوفنلازی و اکسید کردن *O*-دوپاکینون توسط فعالیت دی فنلازی. با این حال اگر چه *L*-DOPA یک کوفاکتور فعال می‌باشد، تشکیل آن به عنوان یک حدواسط در طی تشکیل *O*-دوپاکینون هنوز مورد بحث است. *O*-دوپاکینون در محلول آبی، ناپایدار است و به سرعت در اثر واکنش غیرآنزیمی به leukodopachrome تبدیل می‌شود که این ماده هم دوباره به صورت غیرآنزیمی توسط مولکول دیگر *O*-دوپاکینون اکسید شده و یک مولکول دوپاکروم و دوباره یک مولکول *L*-DOPA ایجاد می‌کند (۷).

تیروزیناز، به طور گسترده‌ای در جانوران و گیاهان وجود دارد و در تشکیل رنگدانه‌های ملانین نقش دارد (۸). در صنایع غذایی، تیروزیناز در کنترل کیفی و اقتصادی میوه‌ها و سبزیجات نقش مهمی دارد (۸). تیروزیناز اکسیدشدن ترکیبات فنلی را به کینون‌ها کاتالیز می‌کند و همچنین مسئول رنگی‌شدن آنزیمی میوه‌ها و سبزیجات است. تیروزیناز در عملکردهای دفاعی در مقابل حشرات، نقش مهمی بازی می‌کند. تیروزیناز در تولید ملانین، بهبود زخم‌ها و تولید اسکلت در حشرات نقش دارد (۹). گسترش مهارکننده‌های تیروزیناز به عنوان یک راه در کنترل آفت‌ها استفاده می‌شود. علاوه بر این، مهارکننده‌های تیروزیناز در پزشکی و صنایع آرایشی برای جلوگیری یا درمان مشکلات پیگمنتاسیون مورد استفاده قرار می‌گیرند (۹). در میکروارگانیسم‌ها، تعداد زیادی مونوفنل و دی فنل با ساختارهای متفاوت به عنوان سوبستراهای تیروزیناز به کار می‌روند (۵). اولین بررسی‌های بیوشیمیایی در سال ۱۹۸۵ بر روی قارچ *Russula nigricans*

(۶). در چرخه مونوفنلازی، مونوفنل می‌تواند فقط با فرم اکسی واکنش دهد و به موقعیت عمودی یکی از مس‌ها در این فرم متصل شود. *O*-دی فنل می‌تواند با فرم مت واکنش دهد. در چرخه دی‌فنلازی، هر دو فرم اکسی و مت می‌توانند با *O*-دی فنل واکنش دهند و آن را به *O*-کینون اکسید کنند (تصویر ۲).



تصویر ۲- اتصال اتیلن دی آمین به جایگاه فعال آنزیم (حاصل docking)

صورت گرفت که با آسیب‌دیدگی ساقه‌اش در معرض هوا، رنگ آن به قرمز و سپس سیاه تغییر کرد. یک مکانیسم مولکولی برای فعالیت‌های مونوفنلازی و دی‌فنلازی تیروزیناز در نظر گرفته شده است. مکانیسم فعالیت مونوفنلازی تیروزیناز بر پایه سه فرم آنزیم به طور گسترده مطالعه شده است

است که چون می‌تواند با مس کمپلکس تشکیل دهد و حالت اکسید احیای آن را تغییر دهد، برای مطالعه مکانیسم از آن استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد

تیروزیناز قارچ خوراکی خریداری شده از سیگما، اتیلن دی آمین خریداری شده از سیگما، *L*-Dopa خریداری شده از سیگما، Na_2HPO_4 و NaH_2PO_4 خریداری شده از مرک برای تهیه بافر فسفات ۱۰ میلی مولار، $\text{pH} = 6$.

روش‌ها

به منظور مطالعه سینتیکی آنزیم تیروزیناز برای دو واکنش کروزولازی و کته‌کولازی، به ترتیب از سوبسترای *L*-tyrosine و *L*-Dopa استفاده شده است. کاربرد این سوبستراها مشکلی در تداخل جذب بین محصولات، حد واسط‌ها و مهارکننده‌ها با جذب سوبسترا ایجاد نمی‌کند.

با این حال، مونوفنل می‌تواند با *O*-دی فنل برای اتصال به جایگاه فرم مت رقابت کند و کاهش یافتن آن را مهار سازد. مقایسه ثابت‌های سینتیکی برای سوبستراهای مونوفنلی در مقابل سوبستراهای *O*-دی فنلی نشان می‌دهد که جایگزینی‌های زیاد روی حلقه این سوبستراها، فعالیت مونوفنلازی را کاهش می‌دهد، ولی فعالیت دی‌فنلازی تغییری نمی‌کند (۱۰). این امر نشان می‌دهد، در حالی که سوبستراهای مونوفنلی نیاز به تغییر آرایش جایگاه مس از حالت عمودی به افقی برای *O*-هیدروکسیله شدن دارند، سوبستراهای *O*-دی فنلی نیاز به این تغییر آرایش جایگاه مس برای انتقال الکترون ساده ندارند. مطالعات حالت سینتیکی این مسیر نشان می‌دهد که بازده کاتالیتیکی تیروزیناز روی مونو فنل، کمتر از دی‌فنل است. ویژگی فعالیت مونوفنلازی، وجود فاز تأخیر (lag period) است که بستگی به عامل‌هایی مانند غلظت آنزیم سوبسترا و وجود یک عامل‌دهنده هیدروژن دارد. ما در این قسمت می‌خواهیم اثر اتیلن دی آمین را بر فعالیت و ساختار آنزیم تیروزیناز قارچ خوراکی بررسی کنیم. هدف از انتخاب این لیگاند آن

آزمایش‌های انجام شده در غیاب و حضور لیگاند صورت گرفت، ضمن این که این لیگاندها به مدت حداقل ۴ دقیقه با آنزیم انکوبه شده‌اند. نتایج بر حسب (mdeg) ارائه شده است.

مطالعه فلورسانس ذاتی

برای اندازه‌گیری شدت نشر فلورسانس ذاتی تیروزیناز به منظور مطالعه تأثیر لیگاندها بر ساختار تیروزیناز، از غلظت 0.17 mg/ml تیروزیناز استفاده شد. طول موج تحریک، 280 nm بوده است. آزمایش‌ها در غلظت‌های مختلف لیگاندها (در مطالعه سینتیک مهارکنندگی) انجام شد.

نتایج

در ابتدا اثر اتیلن دی آمین بر دو فعالیت کرزولازی و کته‌کولازی در غلظت‌های مختلف بررسی شد. در این مطالعه مشخص گردید که این لیگاند در غلظت بسیار پایین (10^{-12} مولار)، فعالیت کرزولازی را فعال می‌کند و زمان تاخیر این فعالیت را کوتاه می‌کند (نمودار ۱)، اما در غلظت بالا (10^{-10} میکرومولار) این فعالیت را کاملاً مهار می‌سازد (نتایج نشان داده نشده است).

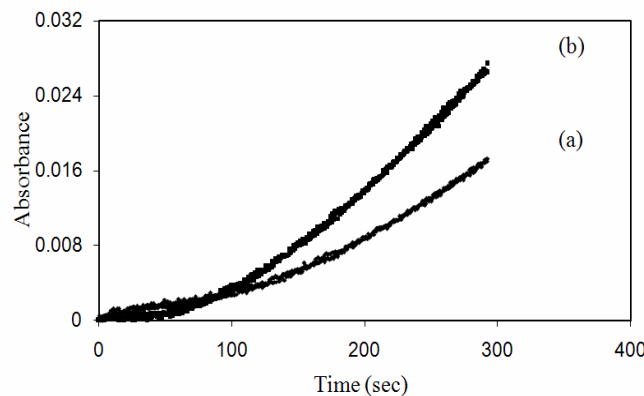
سنجش فعالیت‌های کته‌کولازی و کرزولازی، به ترتیب، به مدت ۱ و ۲ دقیقه صورت گرفته است. غلظت آنزیم مورد استفاده $11/11 \text{ } \mu\text{g/ml}$ و $112/68 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ، به ترتیب برای فعالیت کته‌کولازی و کرزولازی است.

هر دو فعالیت کته‌کولازی و کرزولازی در $\lambda_{\text{max}} = 475 \text{ nm}$ اندازه‌گیری شده است. تمام مواد به کار رفته در آزمایش‌های مذکور از قبیل آنزیم، سوبسترا و لیگاند (تصویر ۱) به صورت محلول‌های تازه تهیه شده مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

واکنش‌های آنزیمی در بافر فسفات 10 میلی‌مولار و در $\text{pH} = 6/8$ و دمای 20 درجه سانتی‌گراد در سل کوارتز انجام شده است. اضافه کردن سوبسترا پس از انکوباسیون آنزیم با لیگاند صورت گرفته است.

مطالعه طیف دو رنگ‌نمایی حلقوی

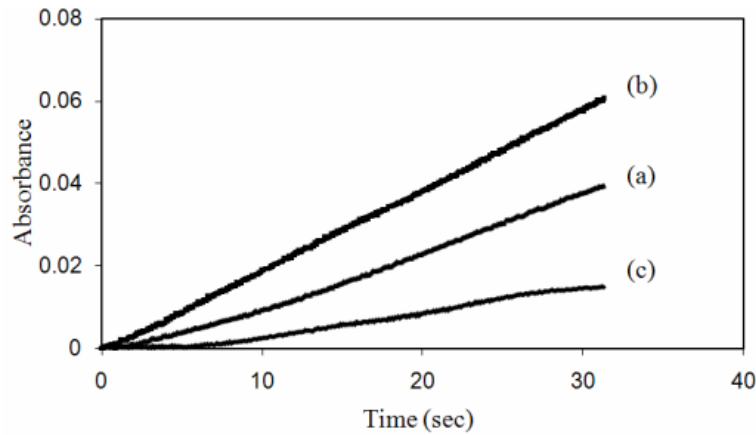
طیف‌های در ناحیه فرابنفش دور ($190-260$) که منطبق بر جذب پیوندهای پپتیدی است به وسیله دستگاه اسپکتروپلاریومتر مدل 215 بدست آمده است. محلول‌های پروتئینی، در بافر فسفات تهیه شده‌اند. از غلظت محلول پروتئینی mg/ml $0/2$ و دو غلظت صفر و 12 میکرومولار لیگاند استفاده شد.



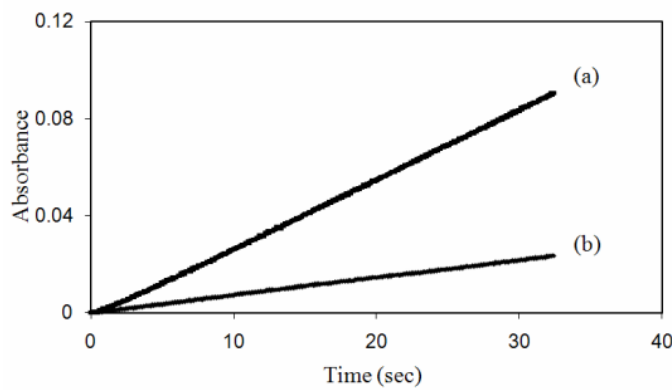
نمودار ۱- اثر اتیلن دی آمین بر فعالیت کرزولازی. (a) در غیاب اتیلن دی آمین. (b) در حضور اتیلن دی آمین با غلظت 10^{-12} مولار.

در قسمت دیگر، اثر غلظت کم اتیلن دی آمین بر سرعت ماکزیمم کته‌کولازی بررسی شد و نتایج نشان می‌دهد که سرعت ماکزیمم، کاهش می‌یابد (نمودار ۳).

همچنین اثر اتیلن دی آمین در دو غلظت بسیار کم 10^{-12} مولار و زیاد 10^{-10} میکرومولار بر فعالیت کته‌کولازی بررسی شد. در غلظت کم، این فعالیت زیاد شد، اما در غلظت زیاد، مهار گردید (نمودار ۲).



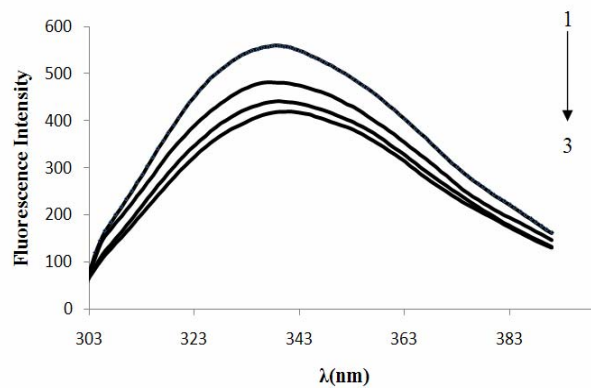
نمودار ۲- اثر اتیلن دی آمین بر فعالیت کته کولازی. (a) در غیاب لیگاند. (b) در غلظت 10^{-12} مولار لیگاند. (c) در غلظت 10^{-10} میکرومولار لیگاند.



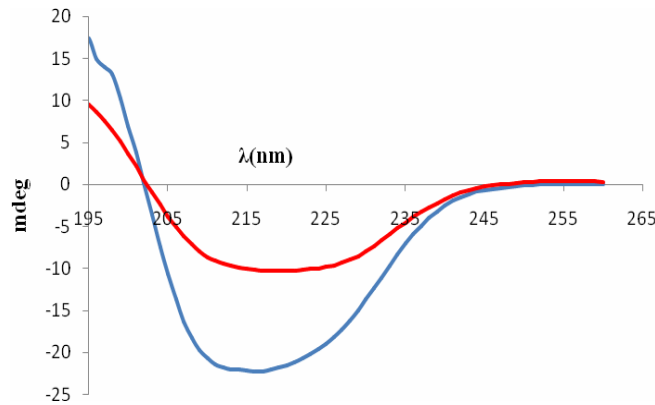
نمودار ۳- اثر غلظت کم اتیلن دی آمین بر سرعت ماکزیمم کته کولازی. (a) در غیاب لیگاند. (b) در حضور غلظت کم لیگاند.

است. تصویر ۲ نشان می‌دهد که این لیگاند به جایگاه فعال متصل شده است و نمودارهای ۴ و ۵ نشان می‌دهند که بر اثر اتصال لیگاند، در ساختار سوم و چهارم، تغییر ایجاد شده است.

برای به دست آوردن اطلاعات بیشتر در مورد اتصال لیگاند به آنزیم، مطالعات docking، فلورسانس و CD انجام شد که نتایج این مطالعات به ترتیب در تصویر ۲ و نمودارهای ۴ و ۵ مشخص شده



نمودار ۴- طیف نشری تیروزیناز در غیاب و حضور اتیلن دی آمین در غلظت‌های مختلف (۱۲، ۲۴ و ۳۰ میکرومولار (به ترتیب از ۱ تا ۳)).



نمودار ۵- طیف CD تیروزیناز در غیاب (آبی) و حضور اتیلن دی آمین با غلظت ۱۲ میکرومولار (قرمز).

بحث

به خاطر ممانعت فضایی، انتظار داریم که تمایل اتیلن دی آمین به فرم مت، بیشتر از فرم اکسی آنزیم باشد. از طرف دیگر، فرم مت ماکزیمم فرم آنزیم در محلول است (۱۱). این نتایج انتظار ما را اثبات می-کند، زیرا می-توانیم به این صورت نتیجه بگیریم که اتیلن دی آمین در غلظت پایین، به فرم مت متصل می-شود و به تیروزین اجازه نمی-دهد که به فرم مت متصل شود و در نتیجه، تیروزین به فرم اکسی آنزیم متصل می-شود و بدین ترتیب فاز تاخیری کاهش می-یابد. اما در غلظت‌های بالا، این لیگاند به هر دو فرم متصل می-شود و بنابراین، آنزیم مهار می-شود. دی فنل‌ها با فرم مت تیروزیناز، سریع‌تر از فرم اکسی، واکنش می-دهند (۱۲)، اما بر اساس این نتایج، سرعت فعالیت کته‌کولازی در این قسمت پایین است و سرعت آن در فرم اکسی آنزیم بیشتر،

اما تمایل برای اتصال، پایین است که این، برخلاف نتایج گفته شده در قبل است (۱۲). بنابراین، اثر اتیلن دی آمین در غلظت پایین بر سرعت ماکزیمم فعالیت کته‌کولازی بررسی شد و نشان داده شد که فعالیت آنزیم مهار گردید و این نتیجه، پیش فرض ما را تایید می-کند.

مطالعات docking، فلورسانس و CD نیز نشان می-دهند که اتیلن دی آمین هم به آنزیم متصل می-شود و هم به جایگاه فعال می-چسبد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران به‌واسطهٔ تامین تجهیزات لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می-گردد.

منابع مورد استفاده

1. Prota, G., 1988. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med Res Rev* 8: 525-556.
2. Spritz, R. A., Hearing, V. J. Jr., 1994. Genetic disorders of pigmentation. *Adv Hum Genet* 22: 1-45.
3. Kim, Y. J., Uyama, H., 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* 62: 1707-1723.
4. Neste, D. V., Tobin, D. J., 2004. Hair cycle and hair pigmentation. *Micron* 35: 193-200.
5. Graham, D. G., Jeffes, P. W., 1977. The role of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine in melanin biosynthesis. *J Biol Chem* 252: 5729-5734.
6. Nosanchuk, J. D., Valadon, P., Feldmesser, M., Casadevall, A., 1999. Melanization of *Cryptococcus neoformans* in murine infection. *Mol Cell Biol* 19: 745-750.
7. Nurudeen, T. A., Ahearn, D. G., 1979. Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 10: 724-729.

8. Nyhus, K. J., Wilborn, A. T., Jacobson, E. S., 1997. Ferric iron reduction by *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 65: 434–438.
9. Old, K. M., Robertson, W. M., 1970. Effects of lytic enzymes and natural soil on the fine structure of conidia of *Cochliobolus sativus*. Trans Br Mycol Soc 54: 343–350.
10. Page, W. J., Shivprasad, S., 1995. Iron binding to *Azotobacter salinestrus* melanin, iron mobilization and uptake mediated by siderophores. BioMetals 8: 59–64.
11. Lerch, K., 1981. In: Metal Ions in Biological Systems, ed. Sigel, H., Marcel Dekker, New York, p. 146.
12. Fenoll, L. G., Rodriguez-López, J. N., Garcia-Sevilla, F., 2001. Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenolase and diphenols generating highly unstable o-quinones. Biochim Biophys Acta 1548: 1–22.