

تأثیر فلز کبالت بر سینتیک و ساختار آنزیم تایروزیناز قارچ خوراکی

نعمت ا... غیبی*^۱، مجید سیرتی ثابت^۲

۱- استادیار بیوفیزیک، گروه بیوشیمی- بیوفیزیک و ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین
۲- استادیار بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی-بیوفیزیک و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

Email:gheibi_n@yahoo.com

* نویسنده مسئول:

چکیده

مقدمه و هدف: تایروزیناز به عنوان یک آنزیم مؤثر در سطوح متفاوت حیات نشان داده شده است. این اهمیت هم از نظر عملکرد و هم از نظر ساختار و پایداری آنزیم مهم است. تنوع سوبسترای آنزیم، امکان بررسی لیگاندهای متفاوت روی سینتیک آنزیم در هر دو فعالیت کاتکولازی و کرزولازی را فراهم می‌کند. عملکرد سینتیکی پیچیده آنزیم و نیز فعالیت ساختار آن در این دو واکنش پی‌درپی از نظر مکانیسمی هنوز به خوبی شناخته نشده است.

هدف: تعیین تأثیر فلز کبالت بر سینتیک و ساختار آنزیم تایروزیناز قارچ خوراکی مواد و روش کار: در این مطالعه، ساختار آنزیم با استفاده از تکنیک‌های دو رنگ‌نمایی حلقوی (CD) و فلورسانس و نیز فعالیت سینتیکی آن با استفاده از سوبسترای طبیعی کافئیک اسید در حضور یون فلزی Co^{2+} با غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌مولار و در pH برابر ۶، ۷، ۸ و ۹ بررسی شد. ثابت‌های α و β که تأثیر فعال‌کننده بر روی آنزیم و تمایل آن به سوبسترا را نشان می‌دهند با ترسیم منحنی‌های ثانویه لاینووربرک برای آنزیم و Co^{2+} به دست آمدند.

نتایج: سینتیک فعال‌سازی آنزیم تایروزیناز برای یون فلزی فوق از الگوی فعال‌کننده غیرضروری پیروی کرد. مقادیر α ($\alpha < 1$) نشان می‌دهد، پیوند لیگاند فلزی با آنزیم باعث افزایش تمایل سوبسترا به آن می‌شود. مقادیر β ($\beta > 1$) نیز نشان می‌دهد، پیوند سوبسترا به آنزیم می‌تواند تسریع حداکثر سرعت آنزیم را از طریق افزایش ثابت کاتالیتیکی آنزیم (K_{cat}) به دنبال داشته باشد. بیشترین فعالیت آنزیم در عدم حضور یون Co^{2+} در pH برابر هفت به دست آمد. بررسی ساختاری آنزیم با تکنیک‌های فلورسانس و بیضی‌واری حلقوی نشان داد، در pH برابر ۹، Co^{2+} چه از نظر ساختار دوم و چه ساختار سوم پایداری آنزیم را به دنبال دارد.

نتیجه‌گیری: به طور خلاصه، نتایج حاصل از مطالعات سینتیکی و ساختاری آنزیم، الگوی فعال‌سازی غیرضروری آنزیم را توسط لیگاند فلزی Co^{2+} نشان داد. پیوند احتمالی این لیگاند در نزدیکی موضع فعال، فعال‌سازی آنزیم را از طریق اثر آلوستریکی به دنبال خواهد داشت. از طرفی لزوماً شرایط مناسب فعالیت آنزیم همان شرایط مناسب پایداری آنزیم نخواهد بود.

واژگان کلیدی: تایروزیناز قارچی، کبالت، سینتیک، ساختار

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هفدهم- شماره ۸۶
اردیبهشت ۱۳۸۹

وصول: ۸۸/۶/۳۱

آخرین اصلاحات: ۸۹/۳/۱۱

پذیرش: ۸۹/۳/۱۵

مقدمه

آنزیم تایروزیناز (پلی فنل اکسیداز: EC 1.14.18.1) آنزیم کلیدی تولید رنگدانه‌های ملانین در پوست و مو است که در سطوح متفاوت حیات از سطوح پایین تا موجودات عالی تر دیده می‌شود (۲۱). نوع متداول این آنزیم و برای مطالعات مرتبط، از قارچ خوراکی گونه *Agaricus bisporus* با وزن ملکولی ۱۱۰ تا ۱۳۰ کیلو دالتون است (۲). این آنزیم یک پروتئین تترامر مرکب از دو زیرواحد یکسان کاتالیتیکی ۳۲ کیلو دالتونی است. در دهه ۱۹۷۰، ساختمان تترامریک آن حاوی دو زیرواحد ۴۳ کیلو دالتونی (H) و دو واحد ۱۳ کیلو دالتونی (L) بیان شد (۳). ساختار چهارم آنزیم به صورت تترامریک H_2L_2 با وزن ملکولی تقریباً ۱۱۰ کیلو دالتون و حاوی چهار اتم مس است (۴).

میان‌کنش پروتئین با یون فلزی از نظر بیوشیمیایی و پاتولوژیک مورد توجه قرار دارد. مطالعه اندرکنش یون‌های فلزی و پروتئین با توجه به پایداری ترمودینامیکی و سینتیکی آن‌ها دارای اهمیت است (۵) و (۶). چنین مطالعاتی می‌توانند در خصوص فعالیت آنزیمی تحت شرایط سمیت و تحمل ناشی از حضور فلزات راه‌گشا باشند (۷). بررسی مطالعات انجام‌شده در مورد اثر یون‌های فلزی روی فرآیند ساخته شدن ملانین از نقطه نظر غیرآنزیماتیک نشان می‌دهد، این کاتیون‌ها خواص ملانین‌ها را تغییر می‌دهند (۸ و ۹). یون‌های فلزی باعث دستکاری ساختاری ملانین شده (۱۰)، هم‌چنین روی تجمع و تولید دوپاکروم نیز تأثیرگذار هستند (۱۱). یک خصوصیت قابل توجه بافت‌های حاوی ملانین، حضور مشخص یون‌های فلزات سنگین از جمله یون‌های روی، مس و آهن در آن‌ها است (۱۲). به‌عنوان نمونه، سطح بالایی از این یون‌های فلزی در کورویید چشم (۱۳ و ۱۴)، موی سیاه (۱۵)، نقاط پیگمانتاسیونی (۱۶) و ملانوزوم‌های جداشده از اسب و ملانوم‌های

انسانی یافت شده است (۱۷). اگرچه استفاده از لیگاندهای فلزی روی فرایند ساخته شدن ملانین مطالعات متفاوتی را به خود اختصاص داده، اما مطالعه تأثیر مستقیم آن‌ها روی فعالیت آنزیم و به خصوص پایداری آنزیم انجام نشده است. قابل ذکر است، این آنزیم در بافت‌هایی وجود دارد که این یون‌های فلزی جزئی از محیط فیزیولوژیک آن هستند و وجود آن‌ها به خصوص در شرایط سمیت فلزی می‌تواند بر آنزیم تأثیرگذار باشد. نقش فلز مس به دلیل وجود آن در ساختار موضع فعال آنزیم و یک فلز واسطه انتقالی با قابلیت کئوردینانس و اتصال متنوع و نیز فلز نیکل به‌عنوان یک فلز نزدیک به مس برای مقایسه، روی فعالیت، پایداری و ساختار آنزیم در مطالعات قبلی محققان مورد بررسی قرار گرفته است (۱۸). در این مطالعه، اثر فلز انتقالی کبالت که در جدول تناوبی از نظر ظرفیت و نیز قابلیت کئوردینانس و پیوند، نزدیک به دو فلز مس و نیکل است، روی فعالیت و ساختار آنزیم تایروزیناز مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

تایروزیناز قارچ خوراکی با کد آنزیمی ۱. ۱۸. ۱۴. ۱ و با وزن مولکولی ۱۲۰ کیلودالتون و فعالیت ویژه ۳۴۰۰ واحد بر میلی‌گرم پروتئین از شرکت سیگما (T-۷۷۵۵)، دی‌هیدروکسی کافنیک اسید، Na_2HPO_4 ، NaH_2PO_4 و $CoSO_4$ شرکت مرک از منابع معتبر خریداری شدند.

سنجش فعالیت آنزیم

تایروزیناز دو عملکرد متوالی هیدروکسیلازی فنل‌ها به دی‌فنل‌ها و اکسیدازی دی‌فنل‌ها به کینون‌های مربوطه را کاتالیز می‌کند. سنجش‌های سینتیکی این دو فعالیت در حضور سوبستراهای منوفنلی و دی‌فنلی متنوع انجام

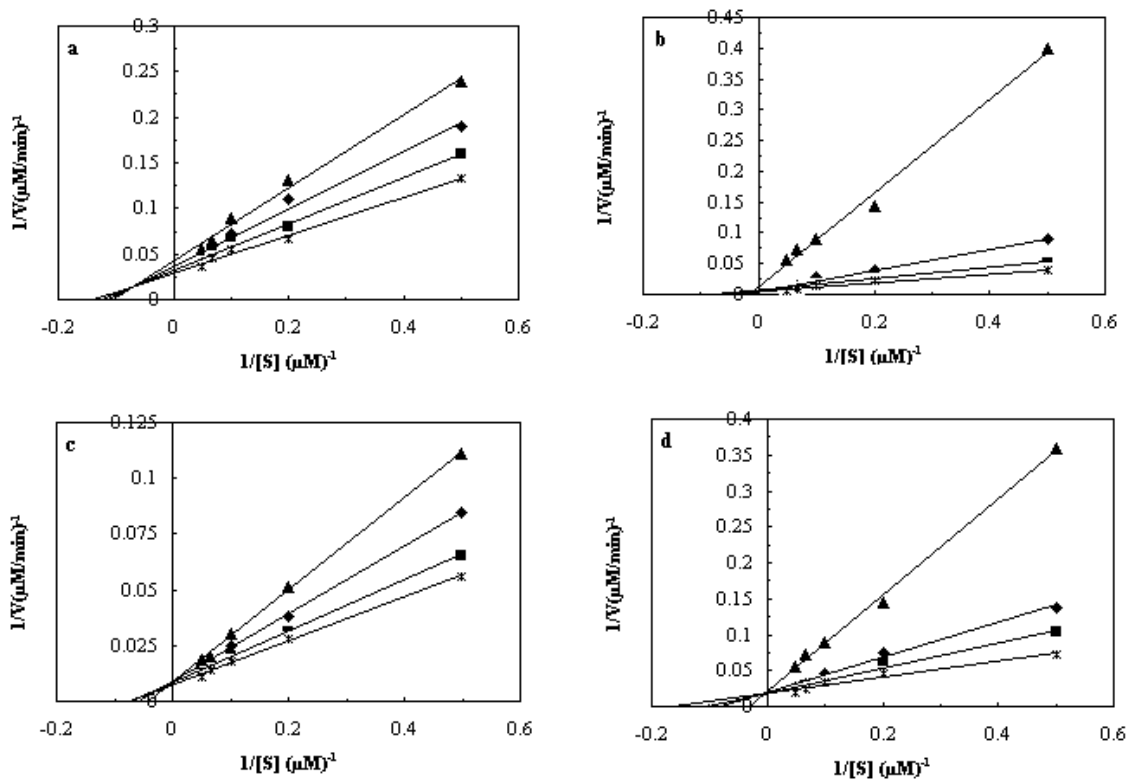
در بافر فسفات ده میلی‌مولار و pH برابر ۶/۸ انجام گرفت. طیف‌های به دست آمده با سه بار تکرار و تصحیح در برابر بافر به‌عنوان شاهد، با نرم‌افزار مخصوص کاهش نویز از طریق تبدیل فوریه کاملاً صاف شدند. نتایج حاصل برحسب بیضی‌واری ($[\theta] = (100 \times MRW \times \theta_{obs}/cl)$)، براساس متوسط وزن هر آمینواسید (MRW) ۱۲۵ دالتون و برای تایرونیناز قارچ خوراکی با وزن مولکولی ۱۲۰ کیلو دالتون بیان شدند (۹). بیضی‌واری مولی با استفاده از رابطه $[\theta] = (100 \times MRW \times \theta_{obs}/cl)$ محاسبه شد که θ_{obs} بیضی‌واری مشاهده‌شده در یک طول موج خاص، C غلظت پروتئین برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و l طول ضخامت عبور نور برحسب سانتی‌متر است. آزمایش‌ها در حضور غلظت ۰/۲ میلی‌مولار یون Co^{2+} و در pHهای ۶، ۷، ۸ و ۹ صورت گرفت. داده‌های مربوط به کمک نرم‌افزار آنالیز طیف‌های بیضی‌واری (CD spectra deconvolution) برای محاسبه درصد ساختارها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

مطالعات فلئورسانس ذاتی

برای بررسی ساختار سوم تایرونیناز قارچ خوراکی در شرایط متفاوت از روش فلئورسانس ذاتی استفاده شد. اندازه‌گیری شدت فلئورسانس ذاتی با دستگاه اسپکتروفلوریمتر هیتاچی مدل MPF-4، حاوی کووت قابل تنظیم حرارت صورت گرفت. آنزیم با غلظت ۰/۱۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات ده میلی‌مولار با pH برابر ۶/۸ تهیه شد. شدت فلئورسانس محلول آنزیمی در حضور غلظت ۰/۲ میلی‌مولار یون Co^{2+} و در pHهای ۶، ۷، ۸ و ۹ بررسی شد. طول موج تحریک آنزیم ۲۸۰ نانومتر بود و داده‌ها در طول موج نشری ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر جمع‌آوری شدند.

می‌گیرد. سنجش سینتیکی واکنش‌های کاتکولازی در آزمایش‌ها به کمک اسپکتروفتومتری کری مدل Bio 100 صورت گرفت. در آزمایش‌ها از غلظت‌های تازه سوپسترا و آنزیم استفاده شد. تمام واکنش‌های آنزیمی در بافر فسفات ده میلی‌مولار در pH برابر ۶/۸ در کووت‌های یک سی‌سی کوارتز و به کمک سیستم تنظیم حرارتی در دمای بیست درجه سانتی‌گراد انجام شد. تعداد واحد آنزیم در هر واکنش کاتکولازی چهل است. مطابق بیان یک واحد آنزیماتیک معادل با تغییر جذب ۰/۰۰۱ اسکورییک اسید در دقیقه در طول موج ۲۶۵ نانومتر در سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی سوپسترای ال-دوپا و یا کاتکول است. در سنجش آنزیم از روش البیومی و فریدن (۱۹) و نیز مطالعات قبلی محققان استفاده شد (۲۱-۲۰ و ۱۸). واکنش‌های کاتکولازی برداشت سوپسترای دی‌فنلی یعنی کافنیک‌اسید در غلظت‌های ۲، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار با ماکزیمم طول موج آن ۳۱۱ نانومتر در نظر گرفته شد. این ماده به ارتوکینون مربوطه تبدیل می‌شود و از پلیمریزاسیون کینون‌ها در یک فرآیند غیر آنزیمی رنگیزه‌های ملانین به وجود می‌آید. برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف یون Co^{2+} (صفر، ۰/۲، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌مولار) در pH مختلف (۶، ۷، ۸ و ۹) فعالیت آنزیم در واکنش کاتکولازی با غلظت آنزیم ۱۱/۸ میکرومولار که معادل یا چهل واحد در میلی‌لیتر بود در زمان دو دقیقه بررسی شد.

مطالعه طیف‌سنجی به روش دورنگ‌نمایی حلقوی (CD) مطالعه دورنگ‌نمایی حلقوی در ناحیه فرابنفش دور (Far-UV-CD) در محدوده طول موج ۱۹۰ تا ۲۶۰ نانومتر که مطابق با جذب پیوندهای پپتیدی است، با اسپکتروپلاریمتر انجام شد. برای به دست آوردن مقادیر ساختار دوم منظم تایرونیناز قارچ خوراکی این طیف‌سنجی در غلظت ۰/۲۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنزیم



شکل ۱. منحنی‌های جفت معکوس لاینوربرک برای فعالیت کاتکولاز تایروزیناز در غلظت‌های ثابت یون Co^{2+} در هر سری سوبسترا ترسیم شده است. غلظت‌های ثابت یون Co^{2+} در نمودارها عبارت از صفر (\blacktriangle)، 0.2 (\blacklozenge)، 0.6 (\blacksquare) و 0.9 (\times) میلی‌مولار است. نمودارهای a, b, c, و d به ترتیب در pH برابر ۶، ۷، ۸ و ۹ ترسیم شده‌اند.

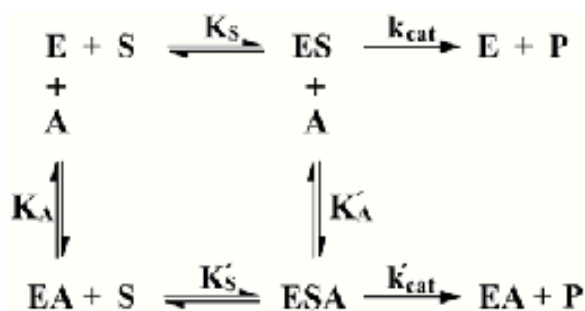
نتایج

به کار گرفت. در این مدل مقدار $V_{\max}' = V_{\max} (1 + \beta)$ و $K_s' = K_s (1 + [A]/K_A + [A]/\alpha K_A) / (1 + [A]/\alpha K_A)$ است که K_s ثابت تفکیک سوبسترا از آنزیم و K_A ثابت تفکیک فعال‌کننده از آنزیم و α و β ثابت‌هایی هستند که تأثیر فعال‌کننده روی آنزیم در تمایل آن به سوبسترا را نشان می‌دهند. مقادیر این پارامترها با ترسیم منحنی‌های ثانویه فعال‌سازی غیرضرور (شکل‌های ۳ و ۴) به دست آمده و در جدول ۱ ارائه شده‌اند. مقادیر V_{\max} و K_s که به ترتیب از عرض و طول از مبدأ منحنی‌های جفت معکوس لاینوربرک در عدم حضور فعال‌کننده به دست می‌آیند نیز در جدول ۱ ارائه شده‌اند.

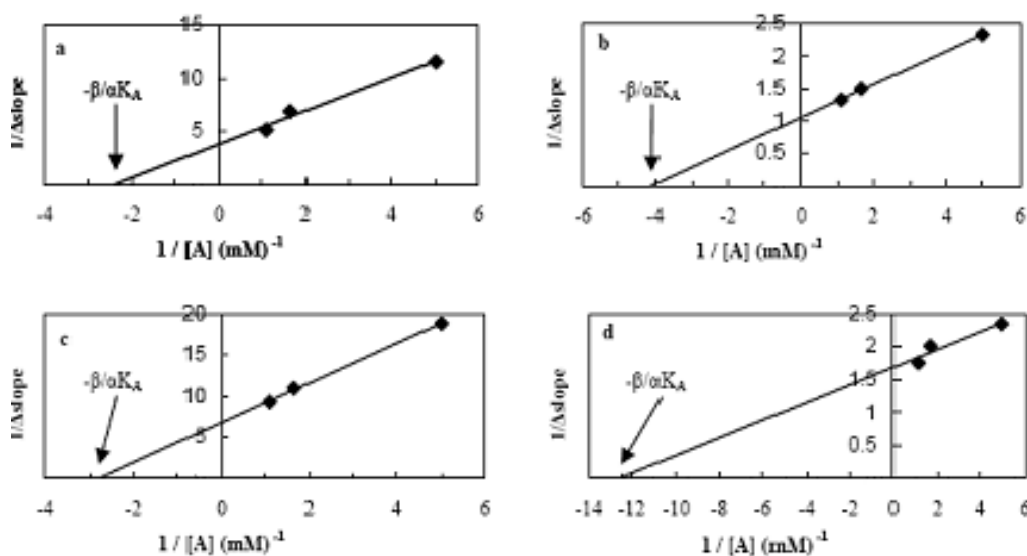
سنجش فعالیت کاتکولازی آنزیم تایروزیناز به کمک سوبسترای کافئیک‌اسید در غلظت‌های متفاوت Co^{2+} انجام شد. حضور یون Co^{2+} افزایش فعالیت آنزیم را به دنبال داشت و با استفاده از داده‌های به دست آمده، منحنی‌های لاینوربرک رسم شد (شکل ۱). با استفاده از این منحنی‌ها، می‌توان مقادیر سرعت ماکزیمم ظاهری (V_{\max}') و ثابت تفکیک ظاهری سوبسترا (K_s') را در غلظت‌های ثابت یون فلزی به ترتیب از مقادیر عرض از مبدأ و طول از مبدأ به دست آورد. مدل تعادل سریع را می‌توان در حالت فعال‌کنندگی غیرضرور یک آنزیم در حضور یک فعال‌کننده (A) مطابق شکل ۲

فلوئورسانس ذاتی وضعیت ساختار سوم پروتئین در عدم حضور لیگاند و در حضور Co^{2+} در pH برابر ۶، ۷، ۸ و ۹ بررسی شد (شکل ۵).

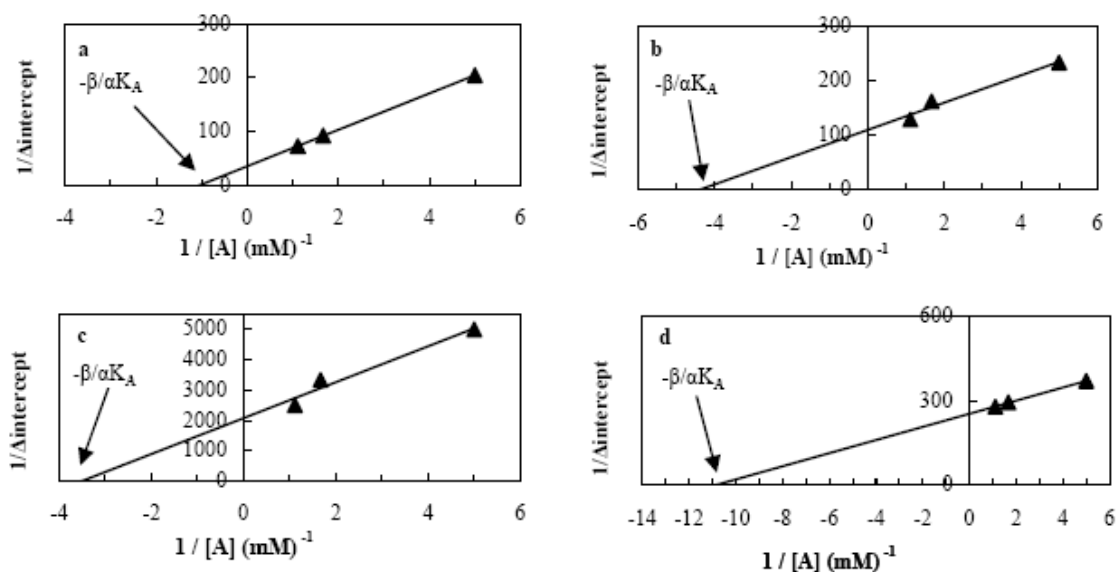
برای شناخت اثر یون فلزی Co^{2+} روی ساختار دوم آنزیم از روش Far-UV-CD استفاده شد. پس از به دست آوردن نمودارهای مربوطه و نیز آنالیز آن‌ها با کمک نرم‌افزار مخصوص CD، داده‌های مربوط به ساختار دوم آنزیم در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. با استفاده از روش



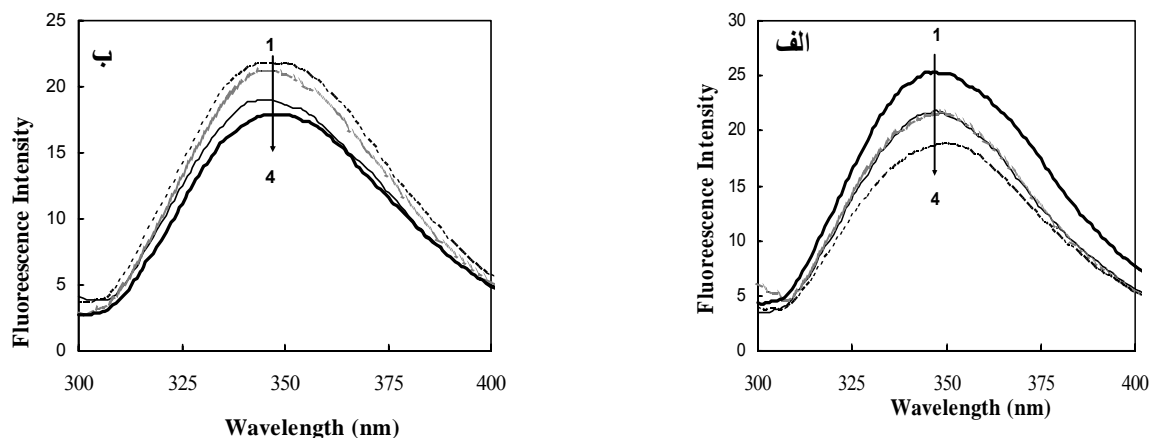
شکل ۲. الگوی میان‌کنش آنزیم-سوبسترا و فعال‌کننده که از مدل فعال‌کننده غیرضرور پیروی می‌کند.



شکل ۳. منحنی‌های ثانویه معکوس تفاوت شیب نمودارهای ترسیم‌شده در شکل ۱ را در برابر غلظت‌های ثابت یون Co^{2+} به عنوان فعال‌کننده (A) نشان می‌دهند. عرض از مبدأ این منحنی‌ها $-\beta/\alpha K_A$ را نشان می‌دهد. α و β ثابت‌هایی هستند که تأثیر فعال‌کننده روی آنزیم در تمایل آن به سوبسترا را نشان می‌دهند. K_A ثابت تفکیک فعال‌کننده و فاکتور میان‌کنش بین سوبسترا و فعال‌کننده است. نمودارهای a, b, c, و d به ترتیب در pH برابر ۶، ۷، ۸ و ۹ ترسیم شده‌اند.



شکل ۴: منحنی‌های ثانویه معکوس تفاوت عرض از مبدأ نمودارهای ترسیم‌شده در شکل ۱ را در برابر غلظت‌های ثابت یون Co^{2+} به عنوان فعال‌کننده (A) نشان می‌دهند. عرض از مبدأ این منحنی‌ها $-\beta/\alpha K_A$ را نشان می‌دهد. α و β ثابت‌هایی هستند که تأثیر فعال‌کننده روی آنزیم در تمایل آن به سویسترا را نشان می‌دهند. K_A ثابت تفکیک فعال‌کننده و فاکتور اندرکنش بین سویسترا و فعال‌کننده است. نمودارهای a, b, c, d به ترتیب در pH برابر ۶، ۷، ۸ و ۹ ترسیم شده‌اند.



شکل ۵: نمودارهای مربوط به بررسی ساختار سوم آنزیم به روش فلوروسانس ذاتی پروتئین. نمودار الف. مربوط به آنزیم به تنهایی در pH های ۹ (1)، ۷ (2)، ۶ (3) و ۸ (4) و نمودار ب. مربوط به آنزیم در حضور یون فلزی Co^{2+} در pH های ۸ (1)، ۷ (2)، ۶ (3) و ۹ (4) است.

بحث و نتیجه‌گیری

فعال‌کننده غیرضروری پیروی می‌کند. الگوی این نمودارها که خطوط راستی را نشان می‌دهند در سمت چپ محور عمودی تلاقی می‌کند، الگوی فعال‌کننده غیرضروری را روشن می‌سازد. کنفورماسیون پروتئین و ساختارهای

در این مطالعه با توجه به فعالیت آنزیم تایروزیناز در pH برابر ۶، ۷، ۸ و ۹ و غلظت‌های مختلف Co^{2+} (صفر، ۰/۲، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌مولار) مشخص شد آنزیم از مدل

K_s آنزیم در pH برابر هفت بوده که همان pH فعالیت مناسب آنزیم است.

در آنزیم‌شناسی، فعال‌کننده‌ها مولکول‌هایی هستند که سرعت یک واکنش وابسته به آنزیم را با اتصال بازگشت‌پذیر به آن تسریع می‌کنند. در فعال‌سازی غیرضرور واکنش می‌تواند هم در حضور و هم در عدم حضور فعال‌کننده رخ دهد. در حالی که در یک فعال‌سازی ضروری واکنش در عدم حضور فعال‌کننده رخ نمی‌دهد. با ترسیم نمودارهای ثانویه که معکوس تفاوت شیب ($\Delta slope$) و تفاوت عرض از مبدأ ($\Delta intercept$) در مقابل معکوس غلظت فعال‌کننده (A) هستند، می‌توان اطلاعاتی در مورد برخی از متغیرها به دست آورد. عرض از مبدأ این نمودارهای ثانویه βV_{max} ($\beta - 1$) و طول از مبدأ آن‌ها $K_A - \beta/\alpha$ است. K_S ثابت تفکیک سوبسترا از آنزیم و K_A ثابت تفکیک فعال‌کننده از آنزیم، α و β ثابت‌هایی هستند که تأثیر فعال‌کننده روی آنزیم در تمایل آن به سوبسترا را نشان می‌دهند. مقادیر ارائه شده برای α ($\alpha < 1$) نشان می‌دهد، پیوند لیگاندهای فلزی با آنزیم باعث افزایش تمایل سوبسترا به آن می‌شود. مقادیر β ($\beta > 1$) نیز نشان می‌دهند که پیوند فعال‌کننده سوبسترا به آنزیم می‌تواند تسریع حداکثر سرعت آنزیم را از طریق افزایش ثابت کاتالیتیکی آنزیم (K_{cat}) به دنبال داشته باشد. پیوند فلز به‌عنوان یک فعال‌کننده نه تنها تمایل پیوند آنزیم و سوبسترا را افزایش می‌دهد، بلکه باعث افزایش ثابت کاتالیتیک ($\beta > 1$) آنزیم تائروزیناز نیز می‌شود. چنانچه از نمودارهای فعال‌کنندگی غیرضرور مشاهده می‌شود، این افزایش فعالیت آنزیم وابسته به غلظت است.

دوم و سوم که با روش‌های دو رنگ‌نمایی حلقوی (CD) بررسی شدند و فلئورسانس ذاتی پروتئین بیان‌گر اثر یون Co^{2+} در ایجاد ساختارهای ثانویه منظم بیشتر و فشرده شدن ساختار آنزیم به خصوص در pH برابر ۹ را نشان می‌دهد.

مطالعات Palumbo و همکاران وی روی اثر برخی یون‌های فلزی روی فعالیت سنتیکی تائروزیناز *Sepia officinalis* نتایج جالب توجهی را نشان داد. Fe^{2+} فعالیت آنزیم را افزایش داده، اما Cu^{2+} و Mn^{2+} آن را مهار کرد. اما در حضور Co^{2+} ، Zn^{2+} ، Ni^{2+} یا Cd^{2+} تغییری در فعالیت مشاهده نشد. اگرچه آن‌ها توضیحی درخصوص اثر مهاری Cu^{2+} و Mn^{2+} ارائه نداده‌اند، فعال شدن آنزیم در حضور Fe^{2+} را به قابلیت احیاکنندگی آن مربوط دانستند (۲۲). در مطالعه دیگری افزایش فعالیت دوبا اکسیداز آنزیم تائروزیناز جدا شده از سلول‌های پیگمانتاسیونی بافت کبد *Rana Esculenta L.* در یک الگوی وابسته به غلظت در حضور یون مس، به انتقال یون‌های مس به آپوآنزیم ربط داده شده است (۲۳). در تحقیق دیگری روی مت‌آپوتائروزیناز، Strothkamp و همکاران وی گزارش کردند علی‌رغم برخی مواضع پیوندی ضعیف تائروزیناز قارچ خوراکی برای Co^{2+} یا Zn^{2+} ، فعالیت‌های کاتالیتیکی آنزیم طبیعی یا بازیافت‌شده توسط این یون‌ها متأثر نمی‌شود (۲۴). در این مطالعه از آنزیم تائروزیناز خالص‌شده از قارچ خوراکی (*Agaricus bisporus*) استفاده شد. این گونه آنزیم در مطالعات آنزیم تائروزیناز به‌عنوان بهترین و پرکاربردترین مدل در بررسی‌های مکانیسم و ساختار این آنزیم است. در مطالعه حاضر، فعالیت آنزیم به تنهایی در pH برابر ۶، ۷، ۸ و ۹ نشان می‌دهد، بیشترین

جدول ۱. پارامترهای مربوط به فعال کننده Co^{2+} بر آنزیم تایروزیناز در pH های متفاوت

| pH | Co^{2+} | | | | Enzyme | |
|----|-----------|---------|----------------------------|------------|--------------------------|------------------|
| | α | β | K_a (M) ⁻¹ | K_A (mM) | V_{max} (μ M/min) | K_s (μ M) |
| ۶ | ۰/۴۲ | ۳/۰۴ | $1/33 \times 10^{-3}$ | ۰/۷۴ | ۲۳/۳ | ۹/۳ |
| ۷ | ۰/۸۸ - | ۳/۰۴ | $-1/33 \times 10^{-3}$ | -۰/۷۵ | ۷۹/۴ | ۶۰/۴ |
| ۹ | ۰/۲۳ | ۱/۰۵ | $1/25 \times 10^{-2}$ | ۰/۰۸ | ۹۹ | ۱۸/۶ |
| ۹ | ۰/۱۵ | ۱/۲۳ | $6/66 \times 10^{-2}$ | ۰/۰۱۵ | ۴۶/۷ | ۳۱/۳ |

جدول ۲. مقایسه مقادیر ساختارهای ثانویه تایروزیناز محاسبه شده از داده‌های Far-UV-CD در pH های متفاوت در

حضور و عدم حضور Co^{2+}

| Structure \ pH | Enzyme | | | | Co^{2+} | | | |
|-----------------|--------|------|------|------|-----------|------|------|------|
| | ۶ | ۷ | ۸ | ۹ | ۶ | ۷ | ۸ | ۹ |
| α -Helix | ۷۱/۳ | ۶۵/۳ | ۷۴/۴ | ۶۹/۰ | ۷۱/۳ | ۶۸/۵ | ۶۷/۶ | ۷۷/۳ |
| β -Sheet | ۵/۱ | ۶/۸ | ۴/۴ | ۶/۳ | ۵/۱ | ۶/۰ | ۶/۶ | ۳/۷ |
| β -Turn | ۱۱/۴ | ۱۲/۴ | ۱۰/۸ | ۱۲/۸ | ۱۱/۵ | ۱۲/۳ | ۱۲/۹ | ۱۰/۲ |
| Random Coil | ۱۲/۲ | ۱۲/۵ | ۱۰/۴ | ۱۱/۷ | ۱۲/۳ | ۱۳/۲ | ۱۲/۹ | ۸/۸ |

در نتیجه پایدارترین حالت آن در حضور یون کبالت و در pH برابر ۹ مشاهده می‌شود. برای مطالعه ساختار سوم از روش فلئورسانس استفاده شد. فلئورسانس ذاتی آنزیم در حضور و عدم حضور یون فلزی نشان می‌دهد، اثر Co^{2+} روی ساختار سوم آنزیم در pH برابر ۹ در جهت فشرده شدن و پایداری است، اما در مقابل بدون حضور کبالت در همین pH آنزیم بیشترین بازشدگی را در ساختار سومش نشان می‌دهد. در مطالعه ذوالقدری و همکاران، ترکیب تیوفنل روی دو مکان متفاوت آنزیم تایروزیناز با توجه به pH محیط و غلظت قرار گرفته و در نتیجه به دو اثر فعال‌سازی و یا بازدارندگی منجر شد. اولین موضع ممکن است نزدیک به مرکز هسته فعال آنزیم (دو یون مس موضع فعال)

مسئله پایداری پروتئین و ارتباط آن با میان‌کنش‌های درون مولکولی شکل‌دهنده ساختار پروتئین‌ها و نقش آن در ارزیابی ارزش پروتئین‌ها از مسائل مورد بحث در بیوفیزیک بوده است. بررسی پایداری ترمودینامیکی یا کنفورماسیونی دربرگیرنده تغییرات ساختار سوم بدون تغییر در ساختار اول بوده و در شرایط برگشت‌پذیر مطالعه می‌شود. قابل ذکر است که الگوهای حاصل از کریستالوگرافی نمی‌تواند مرز مشخصی را بین حالت‌های طبیعی و غیرطبیعی پروتئین ارائه دهند (۲۵). در این مطالعه، بررسی نتایج کنفورماسیون پروتئین و ساختارهای دوم و سوم با روش‌های دو رنگ‌نمایی حلقوی (CD) و فلئورسانس ذاتی پروتئین نشان می‌دهد، در تمام این موارد بیشترین ساختار دوم و سوم آنزیم و

مناسب به این اثر آلوستریکی و هم‌چنین تعاونی بین زیرواحدهای آنزیم بیان کرده‌اند (۱۸).

به‌طور خلاصه، نتایج حاصل از مطالعات سینتیکی و ساختاری آنزیم تایروزیناز در عدم‌حضور و حضور لیگاند فلزی Co^{2+} نشان داد، لزوماً شرایط مناسب فعالیت آنزیم همان شرایط مناسب پایداری ساختاری آنزیم نخواهد بود. در خصوص pH نیز فعالیت بهینه آنزیم در pH برابر ۷ و بیشترین تغییرات ساختاری آن در جهت پایداری pH برابر ۸ مشاهده شد. حضور یون کبالت نیز بیشترین تغییرات ساختاری را روی آنزیم در pH برابر ۹ نشان داد.

تشکر و قدردانی

قسمتی از نتایج این پژوهش مربوط به طرح تحقیقاتی مصوب مرکز توسعه تحقیقات علوم پایه پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین است. به این‌وسیله از حوزه معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین برای حمایت مالی از این طرح پژوهشی سپاسگزاری می‌شود. همچنین از همکاری آزمایشگاه بیوشیمی فیزیک مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

باشد که باعث اثر آلوستریکی روی پیوند آنزیم سوبسترا می‌شود و بازدارندگی ترکیب ممکن است ناشی از رقابت آن با سوبسترا در جهت دستیابی به موضع فعال آنزیم باشد (۲۶). نتایج مطالعه حاضر نیز اثر تغییر pH روی میزان فعال‌سازی آنزیم تایروزیناز در غلظت‌های متفاوت لیگاند فلزی را نشان داد. اما از آنجا که این لیگاند از نظر ساختار مانند تیوفنل مشابهت ساختاری با سوبسترا ندارد، بنابراین اثر مهارتی روی آنزیم نشان نداد. بحث اثر آلوستریک به‌عنوان اثر مولکول‌های غیرمشابه با سوبسترا روی فعالیت آنزیم در سال ۱۹۶۳ از سوی Monod و همکاران ارائه شد (۲۷). این مولکول‌ها برخلاف سوبستراها و ترکیبات مشابه سوبسترا باعث اثر تعاونی (مشارکتی) در زیرواحدهای آنزیم می‌شوند. برای یک آنزیم مانند تایروزیناز که سوبستراهای متنوعی دارد به نظر می‌رسد، برخورد تنه سوبسترا با مناطق آب‌گریز اطراف موضع فعال آنزیم به هدایت مناسب آن به سمت دو یون مس موجود در موضع فعال آنزیم منجر می‌شود. پس حضور یک لیگاند دوم در کنار سوبسترا می‌تواند باعث القاء افزایش فعالیت آنزیم از طریق این اثر آلوستریک شود که در خصوص لیگاند فلزی کبالت در این مطالعه نیز ممکن است همین اثر عامل فعال‌سازی باشد. مطالعات قبلی نیز به خوبی نقش متفاوت فعال‌کننده‌ها و مهارکننده‌های آنزیم را با نگاه

منابع

- 1- Lerch, K., Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine -monooxygenase, in Metal ions in biological systems, H. Sigel, Editor. 1981, Marcel Dekker Inc., New York, NY. p. 143–186.
- 2- Van Gelder, C.W.G., W.H. Flurkey, and H.J. Wichers, Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 1997. 45(7): p. 1309-1323.
- 3- Bouchilloux, S., P. McMahill, and H.S. Mason, The multiple forms of mushroom tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1963. 238: p. 1699–1707.
- 4- Jolley, R.L., D.A. Robb, and H.S. Mason, The multiple forms of mushroom tyrosinase. *J. biol. Chem*, 1969. 244(1593-1599): p. 79.
- 5- Strothkamp, K.G., R.L. Jolley, and H.S. Mason, Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochemical and biophysical research communications*, 1976. 70(2): p. 519.
- 6- Wichers, H.J., et al., Enzymology and molecular biology of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Mushroom Sci.*, 1995. 2: p. 723-728.
- 7- Jackman, M.P., A. Hajnal, and K. Lerch, Albino mutants of *Streptomyces glaucescens* tyrosinase. *Biochemical Journal*, 1991. 274(Pt 3): p. 707.
- 8- Ahmad, Z., et al., Effects of salts of alkali earth metals and calcium chloride on the stability of cytochrome c and myoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1996. 1294(1): p. 63-71.
- 9- Berthon, G., *Handbook of Metal-ligand Interactions in Biological Fluids: Bioinorganic Chemistry*. Vol. 1. 1995, New York: Marcel Dekker.
- 10- Suresh, K. and C. Subramanyam, Polyphenols are involved in copper binding to cell walls of *Neurospora crassa*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1998. 69(4): p. 209-215.
- 11- White, L.P., *Melanin: a naturally occurring cation exchange material*. 1958.
- 12- Sarna, T., et al., in *In Pigment Cell*, M. Seiji, Editor. 1981, University of Tokyo Press: Tokyo. p. 23-29.
- 13- Palumbo, A., et al., Effect of metal ions on the rearrangement of dopachrome. *Biochimica et biophysica acta*, 1987. 925(2): p. 203.
- 14- Palumbo, A., et al., Structural modifications on biosynthetic melanins induced by metal ions. *Biochimica et biophysica acta*, 1988. 964(2): 193-199.
- 15- Flesch, P. *The role of copper in mammalian pigmentation*. 1949.
- 16- Bowness, J.M. and R.A. Morton, The association of zinc and other metals with melanin and a melanin-protein complex. *Biochemical J.*, 1953. 53: p. 620-626.
- 17- Bowness, J.M., et al., Distribution of copper and zinc in mammalian eyes. Occurrence of metals in melanin fractions from eye tissues. *Biochemical J.*, 1952. 51(4): p. 521-530.
- 18- Gheibi, N., Saboury, A.A. and Haghbeen, K. Substrate Construes the Copper and Nickel Ions Impacts on the mushroom tyrosinase activities. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2006. 27(5): p. 642.
- 19- El- Bayoumi, M.A., Frieden, E.A. Spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase and some of its applications. *J Am Chem Soc* 1957;79: 4854–4858.
- 20- Gheibi, N., Saboury A. A., Mansuri-Torshizi, H., Haghbeen, K. and Moosavi-Movahedi, A. A. The inhibition effect of some n-alkyl dithiocarbamates on mushroom tyrosinase; *J Enz. Inh Med Chem* 2005. 20: 393–399.
- 21- Gheibi, N., Saboury, A. A., Haghbeen, K. and Moosavi-Movahedi, A.A. Activity and structural changes of mushroom tyrosinase induced by n-alkyl sulfates; *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2005. 45: 104–107.
- 22- Palumbo, A., et al., Effect of metal ions on the kinetics of tyrosine oxidation catalysed by tyrosinase. *Biochemical Journal*, 1985. 228(3): 647-651.
- 23- Cicero, R., et al., Effects of copper on the tyrosinase of liver pigment cells from *Rana esculenta* L. *Comparative biochemistry and physiology. B. Comparative biochemistry*, 1990. 96(2): p. 393-397.
- 24- Kuttner, R. and H. Wagueich, Some inhibitors of mushroom catecholase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1953. 43(1): p. 80.
- 25- Cooper, A., *Thermodynamic fluctuations in protein molecules*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976. 73(8): p. 2740-2741.
- 26- Zolghadri, S. and A.A. Saboury, Two Different Behaviours of Mushroom Tyrosinase on the Impact of Different Concentrations of Thiophenol in Acidic Medium. *Asian J. of Chemistry*, 2007. 19(7): p. 5587.
- 27- Monod, J., J.P. Changeux, and F. Jacob, Allosteric proteins and cellular control systems. *Journal of molecular biology*, 1963. 6: p. 306.

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
Seventeenth Year,
No.86
April, May
2010*

Received: 22/8/2009

Last revised: 1/6/2010

Accepted: 5/6/2010

The effect of cobalt on the kinetic and structure of mushroom tyrosinase

Nematollah Gheibi^{*1}, Majid Sirati-Sabet²

1- Assistant Professor of Biophysics- Department of Biochemistry, Biophysics and Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin.

2- Assistant Professor of Clinical Biochemistry- Department of Biochemistry, Biophysics and Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin.

E-mail: gheibi_n@yahoo.com

Abstract

Background & Objective: Tyrosinase is a widespread enzyme with great promising capabilities. Its outstanding role has to be addressed with considering kinetic, structure and stability issues. Comprehensive kinetics studies on both cresolase and catecholase activities of mushroom tyrosinase (MT) resulted in elucidation of complicated enzyme kinetics. Yet some important aspects of the enzyme structure, mechanism, and behavior have been unresolved. The aim of this study was To determine the effect of cobalt on the kinetic and structure of mushroom tyrosinase.

Materials and Methods: This study devoted to explore the MT structure through circular dichroism (CD) and spectrofluorimetric techniques. Its true kinetics assessed in the presence of caffeic as substrate and Co^{2+} in different pHs 6, 7, 8 and 9.

Results: Kinetic of MT activation with this metal ion was obeyed from non-essential activation of an enzyme by an activator molecule. Then, the slope and Y-intercept changes in the Lineweaver-Burk plot due to the presence of metal at different concentration are obtained and replotted their inverse vs. inverse concentration of the activator as the secondary plot to find α , β and K_A values. The α value ($\alpha < 1$) obtained herein suggests that the binding of the ion to the enzyme can increase the binding affinity of the substrate. The β value ($\beta > 1$) obtained also suggests that the binding of metal ion to the enzyme can increase the maximum velocity of the enzyme due to the increase of the enzyme catalytic constant (k_{cat}). The optimum activity of the enzyme without the presence of metal ions was carried out in pH=7.

Conclusion: Conformational changes of the enzyme through the measurements of its secondary and tertiary structures by CD and fluorescence spectroscopic studies, respectively showed enzyme stability due to the structural changes for Co^{2+} in pH 9. It is concluded that with this transitional metal ion kinetic pathway of activation follows the general non-essential activation system and its binding may be close enough to the binuclear centre to interact allosterically with the substrate binding site. Besides, the enzyme optimum activity not occurred in its optimum stability.

Key words: Mushroom Tyrosinase, Cobalt, Kinetic, Structure