

عوامل تاثیرگذار بر انتخاب سابستريت آنزيم‌های تايروزيناز و لاکيز

فاطمه ميرعزیزی^۱، مهدي بکاولی^۲، کمال‌الدین حق‌بین^{۳*}، محمود ابراهیمی^۱

^۱ گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

^۲ دانشکده شیمی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۳ پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۱/۲۹

تاریخ تصحیح: ۰۰/۰۷/۰۲

تاریخ پذیرش: ۰۰/۰۷/۲۴

چکیده

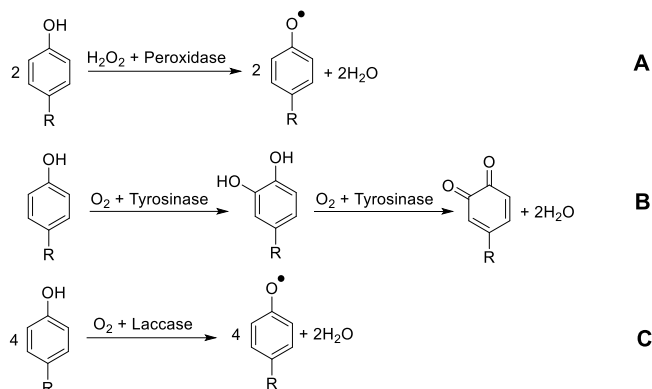
تثبیت هم‌زمان آنزیم‌هایی که دامنه‌های مختلفی از ترکیبات آلاینده را می‌توانند اکسید کنند، کارآئی سامانه‌های آنزیمی را برای مقابله با آلاینده‌های محیط زیست افزایش می‌دهد. در این راستا بکارگیری ۲ آنزیم لاکیز و تايروزيناز که برای اکسایش ترکیبات آلی فقط به اکسیژن مولکولی نیاز دارند، از اهمیت بالائی برخوردار است. بنابراین، در این تحقیق ابتدا، با استفاده از یک اسکلت ساختمانی مشترک، مشتقات ترکیبات دی‌آزو دارای گروه‌های استخلافی الکترون دهنده و الکترون کشنده ساخته شدند. سپس فعالیت اکسیدازی تايروزيناز (استخراج شده از قارچ خوراکی) و لاکیز (استخراج شده از قارچ نیورسپورا کراسا) در حضور این ترکیبات دی‌آزو تحت شرایط یکسان به روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. به استناد نتایج حاصل از اکسایش ترکیبات دی‌آزوی فنلی، کتکولی، گوآیکولی و آنیلینی که از یک اسکلت ساختمانی مشترک ساخته شده بودند، طیف سابستريتی دو آنزیم تايروزيناز و لاکیز به دست آمد و دلایل مختلف موثر بر دامنه سابستريتی این دو آنزیم به کمک داکینگ مولکولی مورد تحقیق و بحث قرار گرفت. بر این مبناء، تثبیت هم‌زمان این دو آنزیم می‌تواند دامنه اکسایش ترکیبات فنلی (منوفنلی، دی‌فنلی و گوآیکولی) را پوشش دهد اما این سامانه فاقد کارآئی لازم برای اکسایش ترکیبات آنیلینی خواهد بود.

کلمات کلیدی: آلاینده‌های فنلی، ترکیبات دی‌آزو، سامانه‌های چند آنزیمی، آگاریکوس بیسپروس، نیورسپورا کراسا.

۱- مقدمه

تحقیقات مقایسه‌ای بر روی قدرت ۳ آنزیم اکسایشی مهم (پراکسیداز، تايروزيناز، و لاکیز) برای اضمحلال آلاینده‌های فنلی و آنیلینی دلالت بر برتری پراکسیداز در تخریب ترکیبات رنگی در محیط آبی تحت شرایط متعارف دارد [۱]. اما پراکسیداز برای انجام واکنش اکسایشی نیاز به هیدروژن پراکساید دارد (شکل ۱-A)، در حالی که دو آنزیم لاکیز و تايروزيناز اکسایش ترکیبات آلی را در حضور اکسیژن مولکولی موجود در هوا کاتالیز می‌کنند [۱]. از طرفی، نوع سابستريت‌هایی که لاکیز و تايروزيناز می‌پذیرند با هم متفاوت است [۲]. بنابراین، از لحاظ شیمی عمل کرد این دو آنزیم و بکارگیری آنها در فرآیندهای زیست‌فناوری آنزیمی اهمیت ویژه‌ای دارند و این دو آنزیم تا حدودی می‌توانند مکمل عملیاتی هم باشند. چنانچه با واکاوی نتایج اکسایش ترکیبات رنگی دی‌آزو فنلی، گوآیکولی، کتکولی، و آنیلینی، عوامل تاثیرگذار بر قدرت این دو آنزیم در انتخاب سابستريت‌های

مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار خواهد گرفت و نتایج این بررسی شاید بتواند پاسخ‌گوی این سؤال مهم باشد که آیا تثبیت هم‌زمان دو آنزیم لاکیز و تایروزیناز می‌تواند منجر به تولید سامانه زیست‌کاتالیزوری موثرتری برای تیمار زیستی منابع آب آلوده به ترکیبات فنلی و آنیلینی شود. البته در گذشته [۵-۳]، برای هر آنزیم بطور مجزا، کارهایی صورت گرفته است.



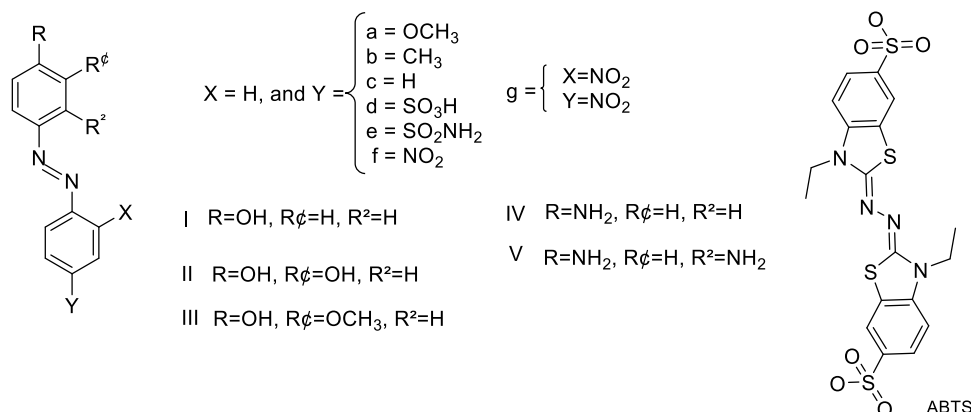
شکل ۱- معادلات استوکیومتری واکنش‌های پراکسیداز، تایروزیناز و لاکیز با ترکیبات فنلی

باید توجه داشت که کوفاکتور پراکسیداز (EC 1.11.1.7) یک گروه هم است در حالی که تایروزیناز (EC 1.14.18.1) و لاکیز (EC 1.10.3.2) هر دو متعلق به پروتئین‌های مس‌دار هستند. در جایگاه فعال تایروزیناز، دو یون مس در فاصله آنتی‌فرومغناطیسی از هم قرار گرفته‌اند که هر یک توسط ۳ باز هیستیدینی در ساختمان تراگونالی کئوردینه شده‌اند. به همین دلیل جایگاه فعال تایروزیناز در بین مراکز مس نوع ۳ طبقه بندی می‌شود [۶]. تایروزیناز مسئول بیوسنتز ملانین می‌باشد. این آنزیم ترکیبات فنلی را با استفاده از اکسیژن مولکولی، با دو سازوکار متفاوت اما پی‌درپی اکسید می‌کند. ابتداء طی یک فعالیت اکسیژنازی، ترکیب فنلی را در موقعیت اورتو، هیدروکسیله می‌کند (شکل ۱- B). این فعالیت تایروزیناز به واکنش کروزلازی مشهور است. ترکیب حاصل که یک اُرتو دی‌هیدروکسی است از جایگاه فعال آنزیم خارج نشده و توسط آنزیم طی یک فعالیت اکسیدازی به یک اُرتو کوئینون تبدیل می‌شود. این واکنش با نام کتولازی شناخته می‌شود که چندین برابر سریعتر از واکنش کروزلازی است [۷]. جایگاه فعال لاکیز چند هسته‌ای است و در آن ۴ یون مس وجود دارد که در ۳ آرایش متفاوت (یک اتم مس نوع ۱ و یک شبکه سه هسته‌ای از مس‌های نوع ۲ و ۳) قرار گرفته‌اند. به دلیل حضور یون‌های مس نوع ۳، این آنزیم نیز مانند تایروزیناز به رنگ آبی می‌باشد [۸ و ۱]. هر مولکول لاکیز (پارا-دی فنل اکسیداز، دی اکسیژن اکسیدوردوکتاز) به شکل تک الکترونی ۴ مولکول احیاءکننده را اکسید می‌کند تا در نهایت یک مولکول اکسیژن به ۲ مولکول آب احیاء شود (شکل ۱- C). به عبارتی آنزیم لاکیز، مانند یک باطری عمل می‌کند که الکترون‌های هر واکنش اکسایش را درون خود ذخیره و سپس از آنها برای احیاء مولکول اکسیژن استفاده می‌کند [۹]. تایروزیناز به طور گسترده در جانداران مختلف یافت می‌شود اما غالباً از تایروزیناز بدست آمده از قارچ خوراکی (آگاریکوس بیسپروس)، به دلیل در دسترس بودن و قیمت پائین، در موارد تحقیقاتی استفاده می‌شود [۱۰ و ۱۱].

در مقابل، لاکیزها غالباً در گیاهان، قارچها، برخی از حشرات و معدودی از باکتریها مشاهده شدهاند. قارچها از بهترین تولید کنندگان لاکیز به شمار می‌آیند [۱۲ و ۱].

۲- مواد و روشها

تمام مواد شیمیایی و حلالهای مورد نیاز برای تهیه ترکیبات دی آزو و انجام واکنشهای آنزیمی از نمایندگی شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. رنگهای دی آزو فنلی، گوآیکولی و کتکولی (شکل ۲)، طبق روشهای شرح داده شده در مقاله [۱۳]، رنگهای دی آزو آنیلینی (شکل ۲)، نیز طبق روش گزارش شده [۳] تهیه و خالصسازی شدند. آنزیم تایروزیناز از آگاریکوس بیسپروس (MT) با روش [۱۴]، آنزیم لاکیزاز نیوروسپورا کراسا (NcL) نیز با روش [۴]، استخراج و خالصسازی شدند. اندازهگیریهای اسپکتروفتومتری به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر Analytic Jena-specord 210 (Germany) مجهز به وسایل کنترل دمایی انجام شد. واکنشهای آنزیمی در محلول بافر فسفات (۰/۰۵ M، pH ۷) در دمای ۲۰°C انجام شد.



شکل ۲- ساختار شیمیائی مشتقات دی آزو فنلی I، کتکولی II، گوآیکولی III، آنیلینی IV، و متا فنیل دی آمینی V

۲-۱- تهیه محلولهای رنگی و آنزیمی

به علت حلالیت پایین این رنگها در آب، ابتدا محلولهای ذخیره‌ای ترکیبات رنگی دی آزو، با حل کردن (۵ mg) از هر رنگ در (۵ mL) ایزوپروپانل تهیه شد. با رقیق کردن محلولهای رنگی با محلول بافر فسفات (pH ۷، ۰/۰۵ M) در دمای ۲۰°C، غلظت مناسب آنها به عنوان سبستریت، برای واکنشهای آنزیمی بدست آمد. پایداری محلولهای رنگی تهیه شده، با استفاده از طیف UV-Visible و تغییرات جذب آنها در λ_{max} هر رنگ در ۶۰ دقیقه، در دمای ۲۰°C، اندازه گیری شد، که هیچ تغییری در اثر اکسیدشدن خودبخودی یا رسوب رنگ مشاهده نشد. در این تحقیق از محلول تازه تهیه شده (۴ mg) MT در بافر فسفات (۴ mL) (۱) و (۵ mg) NcL در بافر فسفات (۱ mL)، استفاده شد. فعالیت آنزیم MT طبق روش [۵]، و فعالیت آنزیم NcL نیز طبق روش [۴]، به طریق اسپکتروفتومتری انجام شد.

۲-۲- واکنش‌های آنزیمی

تمام واکنش‌های آنزیمی MT و NcL در سل‌های متداول کوارتز UV-Visible در حجم کلی (۳ mL) در بافر فسفات (pH ۷)، ۰/۰۵ M و دمای ۲۰°C در حضور مقدار ثابت ترکیبات دی‌آزو (۵۰ μM)، و مقدار ثابت آنزیم (۱۰۰ μL) از محلول ذخیره‌ای آنها انجام شد. بررسی اثر آنزیم MT و NcL بر روی تمام محلول‌های رنگی دی‌آزو فنلی، گوآیکولی، کتکولی، آنیلینی و متا فنیل دی‌آمیننی از طریق اسپکتروفوتومتری به روش‌های فوق‌الذکر و تغییرات جذب آنها در محدوده طول موج (۸۰۰-۲۲۰ nm) اندازه‌گیری شد. سرعت لحظه‌ای (-dA/sec) کلیه واکنش‌های آنزیمی از روی منحنی‌های سرعت و در شرایط (Steady state) بدست آمد.

۲-۳- مطالعات داکینگ مولکولی

برای مطالعات داکینگ از یکی از زنجیره‌های سنگین (حامل جایگاه فعال) ساختمان کریستالی MT به شماره (PDB ID: 2Y9W) استفاده شد [۱۵]. ساختمان ۳ بعدی لیگاندها در برنامه ChemDraw Professional 16.0 ساخته و بهینه‌سازی شدند. آزمایشات داکینگ هر لیگاند با نرم افزار Molegro Virtual Docker [۱۶]، و استفاده از تنظیمات (x = 4.49, y = 28.99, z = 92.68 Å,) استفاده از تنظیمات (radius= 8 and the number of runs = 100) صورت گرفت. لیگاندهای مورد استفاده در این پروژه شامل ۳ سابسטרیت دی‌آزو IVb و IIIb بودند. داکینگ با روش امتیازدهی MolDock score و الگوریتم MolDock optimizer algorithm انجام شد. آنالیز نتایج داکینگ نیز توسط برنامه UCSF Chimera 1.12 صورت گرفت [۱۷].

۳- بحث و بررسی

۳-۱- طراحی تحقیق

برای این که عوامل تاثیرگذار بر دامنه سابسטרیتی این دو آنزیم MT و NcL به خوبی مشخص شوند، از اسکلت ترکیبات آروماتیک دی‌آزو (شکل ۲) برای ساختن سابسטרیت‌های مختلف استفاده شد که دارای مزایای زیر بود:

الف: ترکیبات آروماتیک دی‌آزو را می‌توان هم بر پایه مشتقات آنیلینی و هم مشتقات فنلی سنتز کرد.

ب: این ترکیبات را براحتی می‌توان استخلاف‌دار کرد.

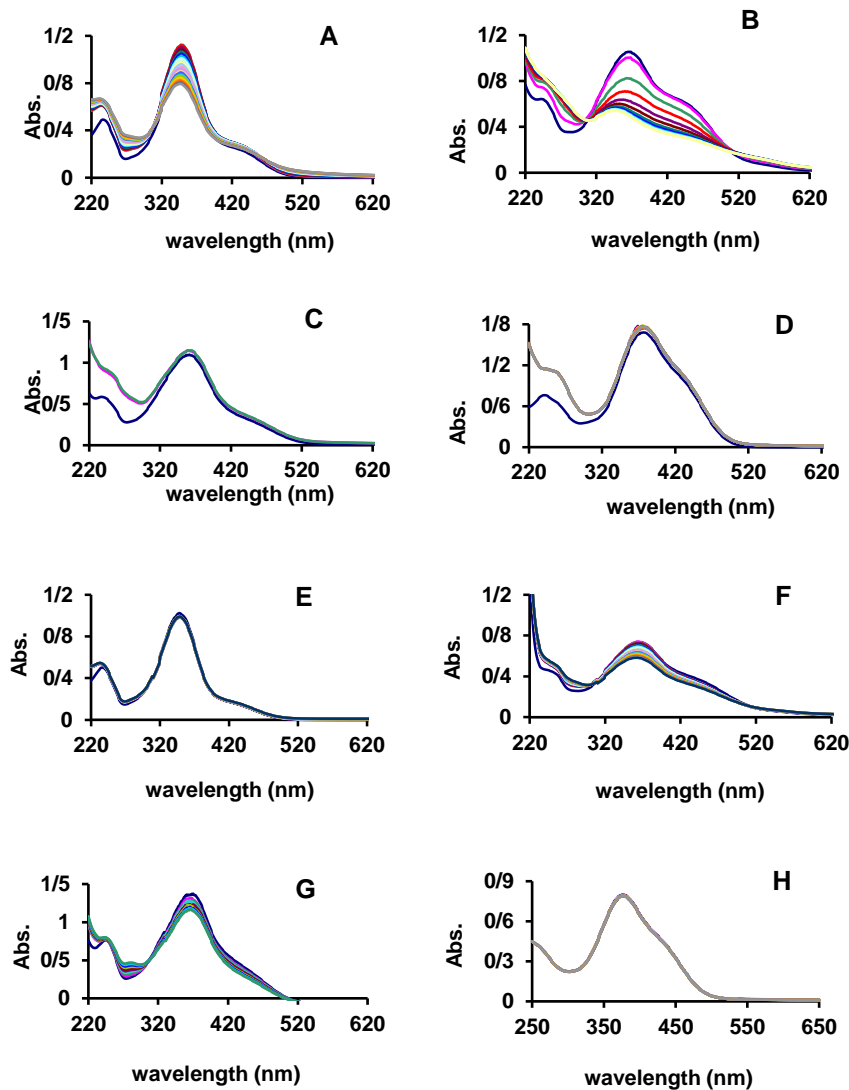
ج: چگالی ابر الکترونی بر ترمینال فنلی یا آنیلینی را می‌توان با قرار دادن گروه‌های الکترون‌دهنده یا الکترون‌کشنده در موقعیت پارای ترمینال فنلی/ آنیلینی تغییر داد.

د: حلالیت این ترکیبات را نیز می‌توان با قرار دادن گروه‌های آب‌دوست یا آب‌گریز بر روی حلقه‌های آروماتیک تنظیم کرد.

ه: سنتز این ترکیبات ارزان و بازده واکنش‌های تولید معمولاً بالاست.

و: اکسایش ترکیبات دی‌آزو، از هم پاشیدن سیستم کونژوگه کروموفور را به همراه دارد. در نتیجه با پیشرفت واکنش، کاهش جذب در طول موج بیشینه سابس‌تریت رنگی رخ خواهد داد و بالطبع، سرعت کاهش جذب به طور مستقیم نماینده سرعت واکنش اکسایشی است (شکل ۳) [۱۸ و ۵].

با توجه به نکات فوق‌الذکر، این امکان وجود داشت که با حفظ اسکلت اصلی سابس‌تریت‌ها، پس از ایجاد تغییرات ساختمانی هدفمند، تاثیر آن را در واکنش آنزیمی مشاهده و اندازه‌گیری کرد. نکته مهم دیگری که در خصوص ترکیبات رنگی دی‌آزو قابل ذکر است این است که به علت ماهیت رنگی، ویژگی‌های خاص رنگ‌های آزو و قیمت مناسب هنوز طیف وسیعی از آنها در صنایع گوناگون غذایی و منسوجات مورد استفاده قرار می‌گیرند. بنابراین، رنگ زدایی آنزیمی این ترکیبات ارزش زیست محیطی بالایی دارد [۱۹].



شکل ۳- مطالعه واکنش‌های آنزیمی تایرویناز با مشتقات دی‌آزو (A) Ic، (B) IIc، (C) IIIc، (D) IVc و واکنش‌های لاکیز با مشتقات دی‌آزو (E) Ic، (F) IIc، (G) IIIc، (H) IVc در PBS (۰/۰۵ M، pH ۷) در دمای ۲۰ °C به روش اسپکتروفوتومتری.

۳-۲- تاثیر ماهیت مکانیزمی اکسایش آنزیمی بر گزینش سابستریته

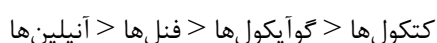
جدول ۱ نتایج نسبی واکنش‌های MT و NcL را با مشتقات مختلف دی‌آزو تحت شرایط یکسان نشان می‌دهد. با توجه به این که pH بهینه هر دو آنزیم نزدیک ۷ بود و ساختمان سابستریتهای بر اساس آنچه که در قسمت قبل بیان شد، برای سنجش مقایسه‌ای ساخته شده بودند، با نسبی‌سازی سرعت واکنش‌ها (بر حسب %) که در شرایط (Steady state) اندازه‌گیری شدند، می‌توان نتایج زیر را از جدول ۱ برداشت نمود:

جدول ۱: سرعت‌های نرمالیز شده واکنش‌های MT و NcL با مشتقات دی‌آزو (شکل ۲).
* بالاترین سرعت مشاهده شده به عنوان واحد (۱۰۰) در نظر گرفته شده است.

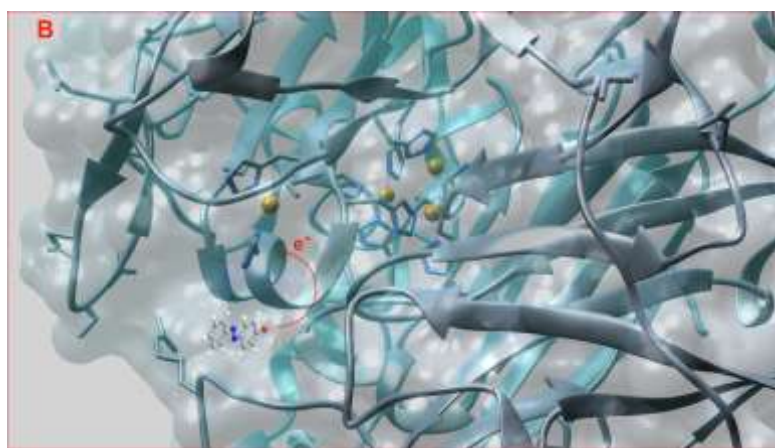
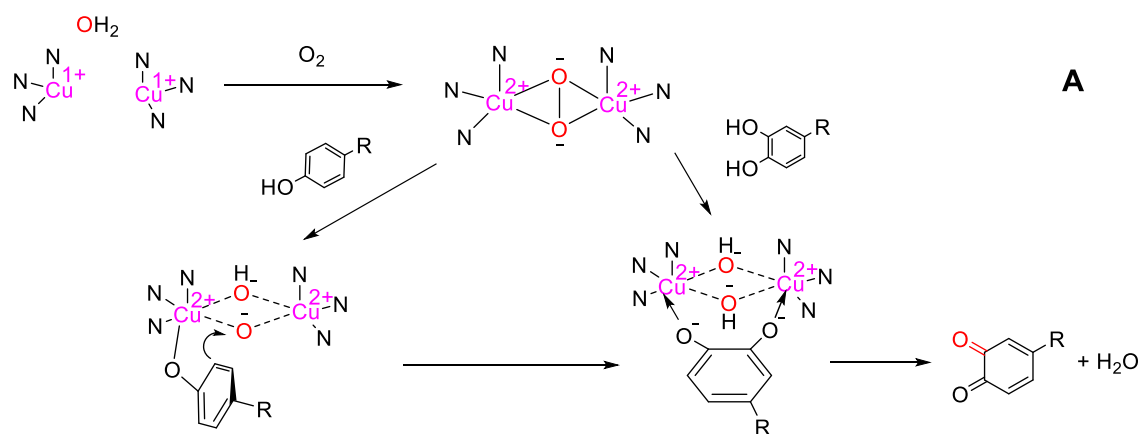
NcL (dA/min)%	MT (dA/min)%	سابستریته
۰	۱۰/۰۴	Ib
۰	۶/۴۵	Ic
۰	بسیار ناچیز	If
۱/۹۱	*۱۰۰	IIIb
۰/۹۵	۸۱/۵۲	IIc
۰/۵۹	۴۷/۳۶	IIIf
۳/۸۱	۰	IIIb
۳/۰۸	۰	IIIc
۰/۹۵	۰	IIIIf
۰	۰	IVb
۰	۰	IVc
۰	۰	IVf
۰	۰	Vb
۰	۰	Vc
۰	۰	Vf

- سرعت واکنش‌های NcL از واکنش‌های MT حداقل ۱۰ مرتبه آهسته‌تر است. در واقع، سرعت واکنش‌های NcL بیشتر به سرعت کروزلازی MT شباهت دارد.
- MT نمی‌تواند ترکیبات گوآیکولی (اورتو متوکسی فنل‌ها) را اکسید کند در حالی که NcL می‌تواند بشرط آن که گروه‌های الکترون کشنده بسیار قوی روی آنها نباشد.
- NcL نمی‌تواند ترکیبات فنلی را اکسید کند در حالی که MT می‌تواند اما به مانند NcL، با وجود گروه‌های الکترون کشنده بر روی سابستریته فنلی سرعت واکنش آن کاهش می‌یابد.
- وجه مشترک فعالیت NcL و MT، تاثیر آنها بر ترکیبات کتکولی است اما MT حداقل ۱۰ برابر سریعتر عمل می‌کند.
- هیچ کدام از NcL و MT بر ترکیبات آنیلینی موثر نیستند.

برای درک این نتایج، ابتداء باید به مکانیزم عملکرد این دو آنزیم توجه کرد. در اولین واکنش MT که در واقع یک فعالیت منواکسیژنازی است، پس از تضعیف پیوند بین دو اتم در اکسیژن ملکولی، یک اکسیژن از طریق حمله الکتروفیلی در موقعیت اورتو سابسטרیت فنلی قرار می‌گیرد (شکل ۴-A). بنابراین اتصال ترمینال فنلی (یا آنیلینی) به یون مس موجود در جایگاه فعال الزامی است [۲۰ و ۹]. برای این منظور، بدیهی است که سابسטרیت باید وارد پاکت جایگاه فعال شده و در موضع کئوردینانسیونی مناسب پیوند با یون مس قرار گیرد تا واکنش صورت پذیرد. در مقابل واکنش آنزیمی NcL از یک انتقال تک الکترونی از سابسטרیت الکترون دهنده به اولین یون مس در دهانه جایگاه فعال آنزیم آغاز می‌شود (شکل ۴-B). انتقال این تک الکترون می‌تواند هم از طریق اتصال کئوردینانسیونی الکترون دهنده (مثلا ترکیب فنلی) به یون مس صورت گیرد و هم از طریق پرش الکترون از روی مولکول الکترون دهنده به یون مس پس از نزدیک شدن الکترون دهنده به یون مس صورت گیرد. این دو مکانیزم به ترتیب (inner sphere electron transfer) و (outer sphere electron transfer) نامیده می‌شوند [۲۱-۲۰ و ۱]. این بدین معناست که اکسایش تک الکترونی سابسטרیت توسط لاکیز به دلیل اختلاف پتانسیل بین سابسטרیت (به عنوان الکترون دهنده) و اولین یون مس لاکیز صورت می‌گیرد. بنابراین، در واکنش لاکیز با سابسטרیت‌هایش، ملاحظات ساختمانی زیاد اهمیت ندارند بلکه اختلاف پتانسیل اهمیت دارد. به همین دلیل است که ABTS که هیچ گونه گروه عاملی فنلی یا آنیلینی ندارد (شکل ۲) نیز براحتی توسط لاکیز اکسید می‌شود [۱]. نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که NcL بر مشتقات فنلی و آنیلینی موثر نبوده و صرفا بر روی مشتقات کتکولی و گوآیکولی اثر داشته است (شکل ۳). ترکیبات گوآیکولی که گروه‌های الکترون کشنده قوی داشته‌اند نیز توسط NcL اکسید نشده‌اند. این نتایج با توجه به پتانسیل اکسایش این ترکیبات که از ردیف زیر تبعیت می‌کند، هم‌خوانی دارد [۱۸]:



پتانسیل اکسیداسیون ترکیبات کتکولی نسبت به الکتروود هیدروژن نرمال (NHE) 0.42 V است. گوآیکولی (0.53 V)، فنلی (0.60 V) و آنیلین (1.05 V) است. پس مشتقات آنیلینی احیاء کننده بسیار ضعیفی است و کتکول نسبت به دو ترکیب فنل و گوآیکول احیاء کننده بهتری است و بهتر اکسید می‌شود [۱۳].



شکل ۴- (A) واسطه‌های پیشنهادی در طی یک چرخه کامل کاتالیزوری تايروزيناز و (B) مکانيزم outer sphere انتقال الکترون در پاکت جایگاه فعال یک لاکيز.

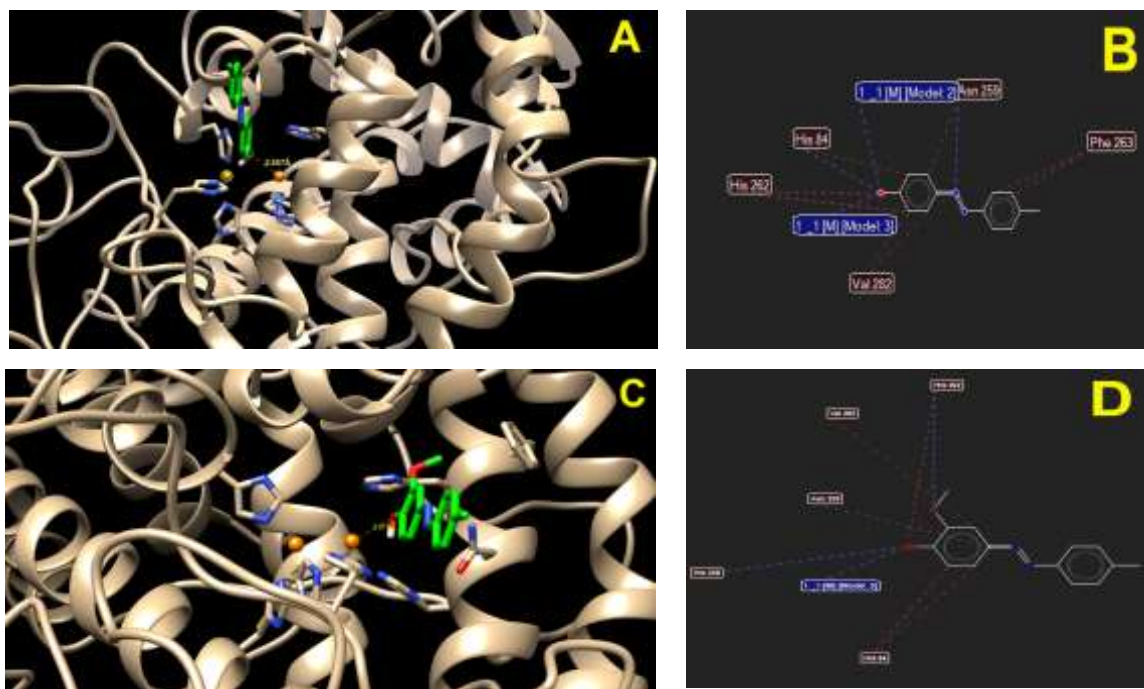
نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که برخلاف لاکيز، تايروزيناز بر ترکیبات گوآیکولی بی‌تاثیر بوده است. اما بر ترکیبات فنلی و کاتکولی موثر بوده است. تايروزيناز بر مشتقات آنیلینی نیز بی‌تاثیر بوده است. با توجه به این که مشخصات ساختمانی سابستريت در واکنش با تايروزيناز از اهمیت بالائی برخوردار است، سؤال این است که کدام مشخصات ساختمانی بر واکنش تايروزيناز با گوآیکول‌ها و آنیلین‌ها تاثیر منفی داشته است؟

۳-۳- تاثیر ازدحام فضائی بر گزینش سابستريت

مشتقات گوآیکول سابستريت‌های خوبی برای لاکيز هستند اما با وجود این که این ترکیبات هنوز یک موقعیت اورتو آزاد دارند توسط تايروزيناز اکسید نمی‌شوند. با توجه به شباهت ساختمانی بالای موجود در ترکیبات این تحقیق، این سؤال پیش می‌آید که آیا وجود یک گروه متوکسی در یکی از موقعیت‌های اورتو ترکیبات گوآیکولی سبب از بین رفتن فعالیت کروزالزی تايروزيناز می‌شود؟

آن چنان که ذکر شد، برای واکنش تايروزيناز سابستريت باید وارد پاکت جایگاه فعال آنزیم شده و در موضع کئوردینانسیونی مناسب پیوند با یون مس قرار گیرد تا واکنش صورت پذیرد (شکل ۴- A). بنابراین، دو ملکول Ib و IIIb (شکل ۲) بر روی یکی

از زنجیره‌های حاوی جایگاه فعال MT داک شدند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد (شکل ۵-A) که ترمینال فنوکسی Ib در بین دو یون مس قرار گرفته و با یکی از مس‌ها در حدود ۲/۵ آنگستروم فاصله دارد. یعنی کاملاً در محیط کئوردینانسیونی آن یون مس قرار گرفته به طوری که یکی از پیوندهای کربن-هیدروژن موقعیت اورتو نیز در آن حدود قرار گرفته است. این هندسه برای اکسیژنی که بین دو مس می‌نشیند امکان واکنش هیدروکسیلاسیون روی حلقه (آنهم در موقعیت اورتو) را فراهم می‌آورد. این موقعیت فضائی Ib از طریق پیوندهای هیدروژنی با His84، Asn259 و His262 و هم چنین اندرکنش‌های هیدروفوب با His84، Phe263 و Val282 پایدار (Moldockscore = ۴۹/۴۷) شده است (شکل ۵-B). اما شکل ۵-C نشان می‌دهد که ترمینال فنوکسی IIIb نیز در فضای کئوردینانسیونی یکی از دو یون مس قرار دارد (البته قدری دورتر در حدود ۲/۹ آنگستروم) با این تفاوت که اندرکنش استخلاف متوکسی با سایر دنباله‌های آمینواسیدی موجود در جایگاه فعال سبب چرخش حلقه آروماتیک شده به طوری که پیوند کربن-هیدروژن واقع در موقعیت اورتوی دیگر را از محوطه کئوردینانسیونی مس‌ها خارج کرده (بیش از ۵ آنگستروم) است. به این ترتیب این جایگاه در اختیار اکسیژن‌ها برای هیدروکسیلاسیون قرار نمی‌گیرد. اما در هر صورت IIIb توانسته به دلیل شباهت ساختمانی بالا با Ib وارد جایگاه فعال شده و در موقعیت فضائی پایداری (Moldockscore = -۶۳/۶۸) از طریق اندرکنش با دنباله‌های آمینواسیدی His262، Val282، His258، و His84 قرار بگیرد (شکل ۵-B). این جهت‌گیری پایدار پیشنهاد می‌کند که IIIb را می‌توان یک آنالوگ Ib در نظر گرفت و انتظار میرود که IIIb به عنوان یک مهارکننده رقابتی قوی برای MT عمل کند و نه سابستریت آن. این نتیجه‌گیری موافق نتایج سنتیکی جدول ۱ نیز می‌باشد.



شکل ۵- (A) موقعیت فضائی پایدار Ib پس از داک بر روی MT و (B) اندرکنش‌های آن با دنباله‌های آمینواسیدی پاکت جایگاه فعال آنزیم. (C) موقعیت فضائی پایدار IIIb پس از داک بر روی MT و (D) اندرکنش‌های آن با دنباله‌های آمینواسیدی پاکت جایگاه فعال آنزیم.

۳-۴- تاثیر اسیددیده بر گزینش سابستریته

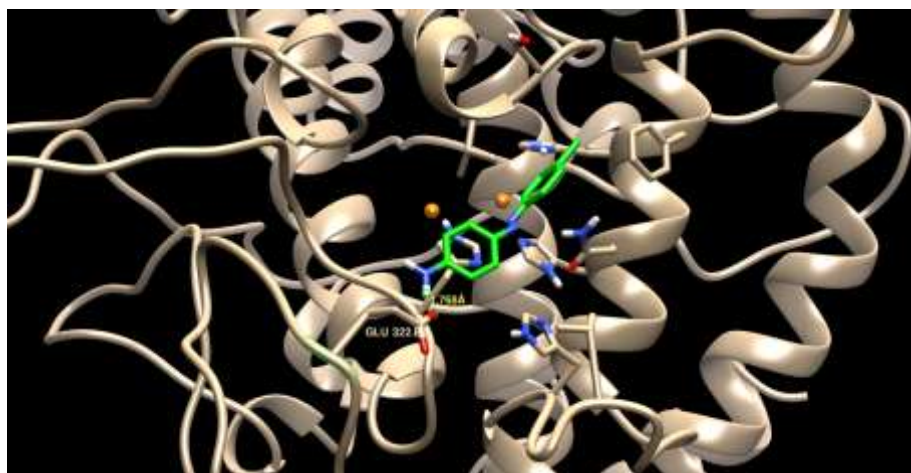
عدم توانایی NcL در اکسایش ترکیبات آنیلینی به اختلاف پتانسیل مس I در این آنزیم با ترکیبات آنیلینی برمیگردد که قبلاً توضیح داده شد. اما برای درک عدم توانایی MT در اکسایش مشتقات آنیلینی باید به نکته مهمی در خصوص واکنش تایروزیناز با سابستریتهایش اشاره کرد. آن چنان که ذکر شد در واکنش تایروزیناز با سابستریتهایش، ابتداء سابستریته باید به یون مس کئوردینه گردد. بنابراین سابستریته فنلی باید پروتون از دست داده تا به شکل یون فنلات با مس کئوردینه شود. بر اساس محاسبهٔ تئوری هوکل، یونیزاسیون گروه هیدروکسیل فنلی، مرحلهٔ بسیار مهمی در برهمکنش با کاتیون مس جایگاه فعال است [۲۲]. از این رو، هر چه سابستریته بتواند راحتتر پروتون از دست داده و یونیزه شود، بهتر می‌تواند با یون‌های مس تشکیل پیوند دهد. گروه فنلی دارای $pK_a=9/89$ و گروه آمین آروماتیک $pK_a=14$ است [۲۳] و انرژی تفکیک پیوند (O-H) در ترکیبات فنلی (kJ mol⁻¹) ۳۶۳ است که کمتر از انرژی تفکیک پیوند آنیلین (N-H) ترکیبات آنیلینی (kJ mol⁻¹) ۳۶۹ است، پس پیوند O-H ضعیف‌تر از پیوند N-H می‌باشد [۲۴]. بنابراین، چون اسیددیده پروتون‌های آنیلینی نسبت به فنلی بسیار کمتر است تشکیل پیوند با یون مس برای ترکیبات فنلی و کتکولی آسان‌تر است و بهتر توسط تایروزیناز اکسید می‌شوند. از طرفی، اختلاف الکترونگاتیویته بین اکسیژن و یون‌های مس را نسبت به اختلاف الکترونگاتیویته نیتروژن نباید از یاد برد که کار را برای ترکیبات فنلی نسبت به مشتقات آنیلینی راحت‌تر می‌کند.

این پدیده از دیدگاه اسید و باز لوئیس نیز قابل تامل است. افزایش دانسیته الکترونی در اکسیژن‌های فنلی باعث تشکیل بازهای لوئیس نرم‌تری می‌شود. مس موجود در جایگاه فعال تایروزیناز، می‌تواند به عنوان یک اسید لوئیس نرم در مقایسه با گروه ۱۳ یا گروه‌های فلزات واسطهٔ ضعیفتر جدول تناوبی در نظر گرفته شود. چنانچه انرژی فعال‌سازی تشکیل پیوند بین یک باز نرم و یک اسید نرم کمتر از انرژی فعال‌سازی تشکیل پیوند بین یک باز سخت و یک اسید نرم است، بنابراین ترکیبات کتکولی با تشدید قدرت نوکلئوفیلی، کشش بیشتری نسبت به جایگاه فعال تایروزیناز از خود نشان می‌دهند و با مس برهمکنش بیشتری خواهند داشت [۲۵]، اما ترکیبات آنیلینی به علت کاهش دانسیته الکترونی، به عنوان یک باز سخت نمی‌توانند به شرایط سخت‌تری برای واکنش با مس احتیاج دارند.

۳-۵- تاثیر اندرکنش‌های نابجا بر گزینش سابستریته

هدف از داکینگ مولکولی، پیش‌بینی جایگاه اتصال مناسب یک ترکیب به مولکول دیگر با ساختار سه بعدی شناخته شده است که به طور موثر جهت‌گیری مناسب مولکول در ترکیب و شدت پیوند بین دو مولکول را پیش‌بینی می‌کند. میل ترکیبی، فعالیت و جهت‌گیری مناسب هم از نظر انرژی و هم از نظر هندسی در این اتصال موثر هستند [۲۶]. در نتیجه داکینگ مولکولی IVb که یک مشتق آنیلینی از همان ساختمان عمومی معرفی شده در شکل ۲ می‌باشد بر روی MT در شکل ۶ نشان داده شده است.

این نتیجه نشان می‌دهد که علیرغم شباهت بالای ساختمانی این ترکیب آنیلینی با همتای فنلی و کاتکولی، IVb نتوانسته است وارد پاکت جایگاه فعال شود و در نتیجه هیچ جهت‌یابی درستی به طرف یون‌های مس ندارد. البته شکل ۶ پایدارترین کانفورمر IVb بر MT نشان می‌دهد (Moldockscore = -۶۶/۹۲) و لازم به ذکر است که سایر پاسخ‌های حاصل از داکینگ نیز وضعیت‌های نامناسب‌تری از IVb را نسبت به جایگاه فعال MT پیشنهاد می‌کردند.



شکل ۶- پایدارترین موقعیت پیوندی IVb با MT حاصل از مطالعات داکینگ مولکولی.

شکل ۶ نشان می‌دهد که به دلیل توانایی گروه آمین، IVb پیوند هیدروژنی قوی را با Glu322 برقرار کرده که جهت‌گیری فضایی آن را در مقابل پاکت (و نه در داخل آن) تثبیت کرده است. بنابراین، شاید بتوان در طبیعت و یا از طریق مهندسی آنزیم به لاکیز(ها)ی رسید که اختلاف پتانسیل مناسب برای اکسید کردن ترکیبات آنیلینی را داشته باشند. اما اکسایش این ترکیبات توسط یک تایروزیناز، اضافه بر مشکل دپروتونه شدن ترکیب آنیلینی، مزاحمت اندرکنش‌های نابجا با سایر دنباله‌های آمینواسیدی ساختمان آنزیم را نیز دارد که مسیر رسیدن مشتق آنیلینی به جایگاه فعال تایروزیناز را سخت‌تر (اما نه غیر ممکن) می‌کند.

۴- نتیجه‌گیری

گرچه لاکیز و تایروزیناز هر دو آنزیم‌های فنلازی محسوب می‌شوند اما به دلیل مکانیزم‌های متفاوت برای اکسایش ترکیبات آروماتیک، طیف سابسטרیتی آنها با هم متفاوت است. به نظر می‌رسد تثبیت هم‌زمان این دو آنزیم طیف وسیع‌تری از ترکیبات را برای اکسایش آنزیمی هدف بگیرد اما این خطر وجود دارد که سابسטרیت‌های گوآیکولی لاکیز، تایروزیناز را مهار کنند. بنابراین، با قطعیت نمی‌توان گفت که یک سامانه آنزیمی حاصل از تثبیت هم‌زمان این دو آنزیم توانایی بالاتری نیز خواهد داشت مگر اطلاعات شیمیایی مناسبی از نوع آلاینده‌های محیط آبی در دست باشد. هم‌چنین اگر اکسایش ترکیبات آنیلینی هم‌مد نظر باشند، باید اطمینان حاصل کرد که لاکیزی استفاده شود که اختلاف پتانسیل لازم برای این نوع اکسایش را داشته باشد.

۵- تقدیر و تشکر

این مقاله با همکاری ارزنده واحد بیوانفورماتیک پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری کامل شد و به استاد گران‌قدر مرحوم دکتر مهدی بکاولی تقدیم می‌شود.

۶- مراجع

- [1] K. Haghbeen and D. Schlosser, *Laccases in Bioremediation and Waste Valorisation*, ed., Springer, (2020) pp. 239.
- [2] S. M. Moshtaghioun, M. Dadkhah, K. Bahremandjo, K Haghbeen, S. Aminzadeh and R. L. Legge, *Biocatalysis and Biotrans.* **35** (2017) 1.
- [3] F. Mirazizi, A. Bahrami, K. Haghbeen, H. Shahbani Zahiri, M. Bakavoli and R. L. Legge, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **31** (2015) 1162.
- [4] S. M. Moshtaghioun, K. Haghbeen, A. Sahebghadam, R.L. Legge, R. Khoshneviszadeh and S. Farhadi, *Anal. Chem.* **83** (2011) 4200.
- [5] K. Haghbeen and E. W. Tan, *Anal. Biochem.* **312** (2003) 23.
- [6] E. Solem, F. Tucek, and H. Decker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **55** (2016) 2884.
- [7] T. Pillaiyar, M. Manickam and V. Namasivayam, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32** (2017) 403.
- [8] X. Yuan, G. Tian, Y. Zhao, L. Zhao, H. Wang and T. Bun Ng, *Molecules*, **21** (2016) 203.
- [9] E. I. Solomon, D. E. Heppner, E. M. Johnston, J. W. Ginsbach, J. Cirera, M. Qayyum, M. T. Kieber-Emmons, C. H. Kjaergaard, R. G. Hadt, and L. Tian, *Chem. Rev.* **114** (2014) 3659.
- [10] S. Y. Seo, V. K. Sharma and N. Sharma, *J. Agric. Food Chem.* **51**(2003) 2837.
- [11] S. Halaouli, M. Asther, J-C. Sigoillot, M. Hamdi and A. Lomascolo, *J. Appl. Microbiol.* **100** (2006) 219.
- [12] S. Ba and V. V. Kumar, *Critical Reviews in Biotechnology*, **22** (2017) 1.
- [13] K. Haghbeen and E. W. Tan, *J.Org. Chem.* **63** (1998) 4503.
- [14] K. Haghbeen, S. Shareefi Borojerdi, F. Rastgar Jazii and A. A. Karkhane, *Iran. J. Biotechnol.* **2** (2004) 189.
- [15] W. T. Ismaya, H. J. Rozeboom, A. Weijn, J. J. Mes, F. Fusetti, H. J. Wichers and B. W. Dijkstra, *Biochemistry*, **50** (2011) 5477.
- [16] R. Thomsen and M. H. Christensen, *J. Med. Chem.*, **49** (2006) 3315.
- [17] S. Maki-Yonekura and K. Yonekura, *Micros. Microanal.* **14** (2008) 362.
- [18] F. Mirazizi, A. Bahrami, S. Soleimani Asl, A. Zaribafan, K. Haghbeen and S. Aminzadeh, *International Journal of Environmental Science and Technology*, **15** (2018) 1679.
- [19] G. McMullan, C. Meehan, A. Conneely, N. Kirby, T. Robinson and P. Nigam, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56** (2001) 81.
- [20] J. Yoon, S. Fujii and E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106** (2009) 6585.

-
- [21] S.M. Jones and E.I. Solomon, *Cell. Mol. Life Sci.* **72** (2015) 869.
- [22] S. Shareefi Borojerdi, K. Haghbeen, A. A. Karkhane, M. Fazli and A. Saboury, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **314** (2004) 925.
- [23] R. C. Weast, *Handbook of Chemistry and Physics*. 56th ed, Ohio: Cleveland, CRC Press. (1970) pp. 2390.
- [24] M. Michalík, A. Vagánek and P. Poliak, *Acta. Chimica. Slovaca*, **7** (2014) 123.
- [25] Y. Matoba, S. Kihara, N. Bando, H. Yoshitsu, M. Sakaguchi, K. Kayama, S. Yanagisawa, T. Ogura and M. Sugiyama, *PLOS Biology*, **16** (2018) 1.
- [26] M. Salehi, M. Kubickib, M. Jafari, M. Galini and F. Soleimaniand, *J. Appl. Chem.* **13** (2019) 103.

