مقاله تحقیقی

مهار فعالیت کرزولازی آنزیم تیروزیناز قارچ خوراکی با استفاده از دی‌اکسان

مهدی علی‌جانیان‌زاده*[۱]، آتنا یساری مازندرانی[۲]، سمانه متو[۲]

۱. دانشجوی دکترای بیوفیزیک، دانشگاه آزاد اسلامی، باشگاه پژوهشگران جوان، واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران
۲. کارشناس زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، باشگاه پژوهشگران جوان، واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران

مکان انجام تحقیق: مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران، ایران
***مسؤول مکاتبات:** مهدی علی‌جانیان زاده، دانشکده علوم زیستی، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین، تهران، پست الکترونیکی: Alijanian@iauvaramin.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۲۸

چکیده

اثر دی‌اکسان بر ساختار و فعالیت کرزولازی آنزیم تیروزیتاز قارچ خوراکی بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد که این لیگاند می‌تواند آنزیم را به خوبی مهار کند و همـــچنین معلوم شد که این لیگاند مهار از نوع رقابتی دارد، یعنی در جایگاه فعال قرار می‌گیرد. در قســـمت دیگری از مطالعه، اثر این لیگاند بر ساختار آنزیـــم به صورت آزمایشگاهی بررسی شد که با فلورسانس و دو رنگ نمایی حلقوی (CD) این آزمایش انجام گرفت و مشخص شد که این لیگاند بر ساختار دوم و سوم آنزیم تاثیر می‌گذارد، زیرا نشر فلورسانس را کاهش داد. این امر نشان‌دهنده خاموشی نشر تریپتوفان است که می‌تواند به خاطر تغییر در ساختار آنزیم باشد.

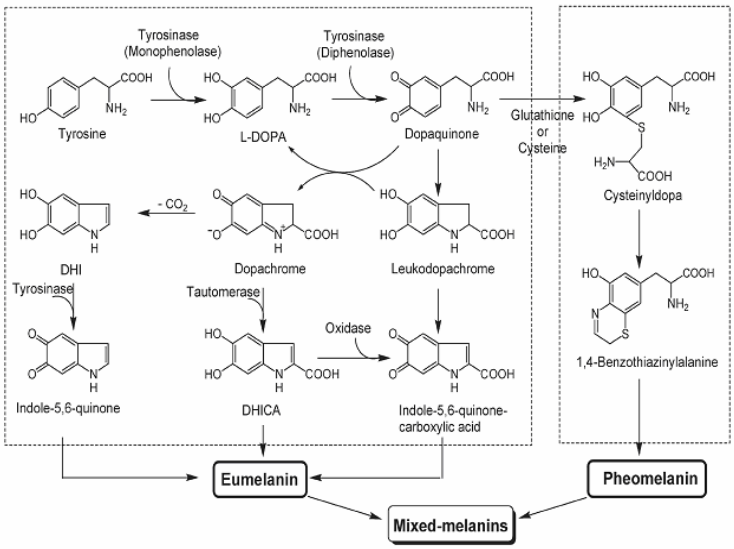
واژه‌های کلیدی: تیروزیناز قارچ خوراکی، دی اکسان، کرزولازی، کته کولازی

مقدمه

تیروزیناز (EC 1.14.18.1) یک آنزیم حاوی مس است که دو واکنش مختلف سنتز ملانین را کاتالیز می‌کند: هیدروکسیله شدن تیروزین توسط عمل مونوفنلازی آنزیم و اکسید شدن ۳ و۴ دی-هیدروکسی فنیل آلانین (L-DOPA) به *o*-دوپاکینون توسط عمل دی فنلازی. این آنزیم به میزان زیاد در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان، حیوانات و قارچ یافت می‌شود و عامل بیوسنتز ملانین و ترکیبات پلی‌فنلیک است. در پستانداران، تیروزیناز عامل تشکیل رنگدانه‌های پوست، مو و چشم است. در گیاهان، اهمیت کلیدی تیروزیناز در فرایندهایی نظیر پیگمانتاسیون و سیاه‌شدگی آنزیمی میوه‌ها و سبزیجات است. در حشرات، نقش مهمی در عمل تدافعی و اسکلت‌سازی ایفا می‌کند (۱،۲). ملانین یکی از بیشترین رنگدانه‌های موجود در باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و جانوران است که یک بیوپلیمر شبیه به مشکی است (۱). رنگ پوست و موی پستانداران توسط تعدادی فاکتور تعیین می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها میزان و نحوه پراکندگی تولید ملانین است. ملانین توسط سلول‌های ملانوسیت پراکنده در لایه بازال پوست ترشح می‌شود (۲). بسیاری از بیماری‌های پوستی نتیجه سطح بالای عمل تولید رنگدانه پوستی است (۳).

به‌طور کلی دو نوع ملانین در پستانداران وجود دارد: اوملانین و فئوملانین (۳،۴). هر دو گروه ملانین بواسطه ترکیبی از واکنش‌های آنزیمی و شیمیایی به‌وجود می‌آیند. دو مرحله اول مسیر بیوسنتز ملانین شامل هیدروکسیلاسیون مونوفنل به *o*- دی فنل (فعالیت مونوفنلازی یا کرزولازی) و اکسیداسیون *o* - دی فنل به *o*-کوینون (فعالیت دی فنلازی یا کته کولازی) با استفاده از اکسیژن ملکولی و به کمک آنزیم تیروزیناز صورت می‌گیرد. این مسیر به‌وسیله واکنش‌های غیرآنزیمی تا سنتز ملانین ادامه می‌یابد

(تصویر ۱) (۵). تولید غیرعادی ملانین در انسان، همراه با مشکلات جدی زیبایی است (۵).

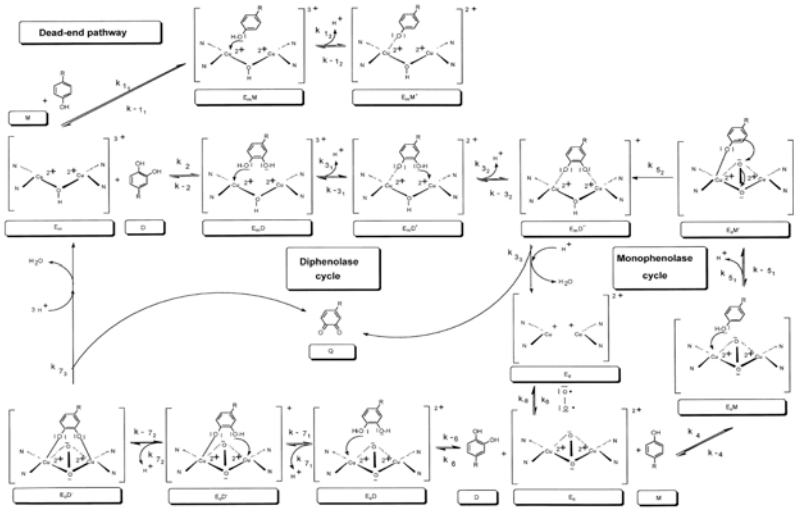


تصویر ۱- مسیر بیوسنتز ملانین (۱).

تیروزیناز (مونوفنل، *o*-دی فنل: اکسیژن اکسیدوردوکتاز، EC.1.14.18.1) یک آنزیم حامل مس است که عامل تشکیل رنگدانه‌های پوست، مو و چشم به شمار می‌آید (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: هیدروکسیله شدن تیروزین با استفاده از فعالیت مونوفنلازی و اکسید کردن ۳و۴- دی هیدروکسی فنیل آلانین (L-DOPA) به *o*-دوپاکینون توسط فعالیت دی فنلازی. با این حال اگر L-DOPA یک کوفاکتور فعال بدانیم، تشکیل آن به عنوان یک حد واسط در خلال تشکیل *o*-دوپاکینون هنوز مورد بحث است. *o*-دوپاکینون در محلول آبی ناپایدار است و به سرعت در اثر یک واکنش غیرآنزیمی، به leukodopachrome تبدیل می‌شود که این ماده هم دوباره به صورت غیرآنزیمی توسط مولکول دیگر *o*-دوپاکینون اکسید می‌شود و یک دوپاکروم و دوباره یک مولکول L-DOPA می‌دهد (۷).

تیروزیناز به طور گسترده در جانوران و گیاهان وجود دارد و در تشکیل رنگدانه‌های ملانین شرکت دارد (۸). در صنایع غذایی، تیروزیناز در کنترل کیفی و اقتصادی میوه‌ها و سبزیجات نقش مهمی دارد (۸). تیروزیناز، اکسید شدن ترکیبات فنلی را به کینون‌ها کاتالیز می‌کند و همچنین عامل رنگی شدن آنزیمی میوه‌ها و سبزیجات است. تیروزیناز در عملکردهای دفاعی در مقابل حشرات، نقش مهمی بازی می‌کند و در تولید ملانین، بهبود زخم‌ها و تولید اسکلت در حشرات نقش دارد (۹). از گسترش مهارکننده‌های تیروزیناز به عنوان یکی از راه‌های کنترل آفت‌ها استفاده می‌شود. علاوه بر این، مهارکننده‌های تیروزیناز، در پزشکی و صنایع آرایشی برای جلوگیری یا درمان مشکلات پیگمنتاسیون مورد استفاده قرار گیرند (۹). در میکروارگانیسم‌ها، تعداد زیادی از مونوفنل‌ها و دی فنل‌ها با ساختارهای متفاوت به‌عنوان سوبستراهای تیروزیناز به‌کار می‌روند (۵). اولین بررسی‌های بیوشیمیایی در سال ۱۹۸۵ بر روی قارچ Russula nigricans 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 (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 با *o*-دی فنل واکنش می‌دهند و آن را به *o*-کینون اکسید می‌کنند (تصویر ۲).



تصویر ۲- مکانیسم آنزیم تیروزیناز قارچ خوراکی (۷).

با این حال، مونوفنل می‌تواند با *o*-دی فنل برای اتصال به جایگاه فرم مت رقابت کند و کاهش یافتن آن را مهار کند. 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 می-دهد، ولی فعالیت دی فنلازی تغییری نمی‌کند (۱۰). این پدیده نشان می‌دهد، در حالی که سوبستراهای مونوفنلی، برای *o*-هیدروکسیله شدن نیاز به تغییر آرایش جایگاه مس از حالت عمودی به افقی دارند، سوبستراهای *o*-دی فنلی نیاز به این تغییر آرایش جایگاه مس برای یک انتقال الکترون ساده ندارند. مطالعات حالت سینتیکی این مسیر نشان می‌دهد که بازده کاتالیتیک تیروزیناز روی مونوفنل، کمتر از دی‌فنل است. ویژگی فعالیت مونوفنلازی، وجود فاز تأخیر (lag period) است که به فاکتورهایی مانند غلظت آنزیم سوبسترا و وجود یک دهنده هیدروژن بستگی 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 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، دی‌اکسان تهیه شده از سیگما، L-Dopa خریداری شده از سیگما، Na_2HPO_4 و NaH_2PO_4 تهیه شده از مرک برای تهیه بافر فسفات ۱۰ میلی مولار، $pH = 6$.

روش‌ها

برای مطالعه سینتیکی آنزیم تیروزیناز جهت واکنش کرزولازی، از سوبسترای L-tyrosine استفاده شده است. استفاده از این سوبستراها مشکلی در تداخل جذب بین محصولات، حد واسطها و مهارکننده‌با جذب سوبسترا ایجاد نمی‌کند. سنجش فعالیت‌کرزولازی، به مدت ۲ دقیقه صورت گرفته است. غلظت آنزیم مورد استفاده نیز μg/ml ۱۱۲/۶۸ است. فعالیت کرزولازی در $\lambda_{max} = 475$ nm اندازه‌گیری شده است. تمام مواد به‌کار رفته در آزمایش‌های فوق از قبیل آنزیم، سوبسترا و لیگاند، به‌صورت محلول‌های تازه تهیه شده، مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

واکنش‌های آنزیمی، در بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار، و در $pH = ۶/۸$، و دمای ۲۰ 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 (Circular **Dichroism Spectroscopy**)

طیف‌های در ناحیه فرابنفش دور (۲۶۰-۱۹۰) که منطبق بر جذب پیوندهای پپتیدی است، به‌وسیله دستگاه اسپکتروپلاریمتر مدل ۲۱۵ به‌دست آمده

است. محلول‌های پروتئینی در بافر فسفات تهیه شده‌اند. از غلظت محلول پروتئینی mg/ml ۰/۲ و دو غلظت صفر و ۱۲ میکرومولار لیگاند استفاده شد.

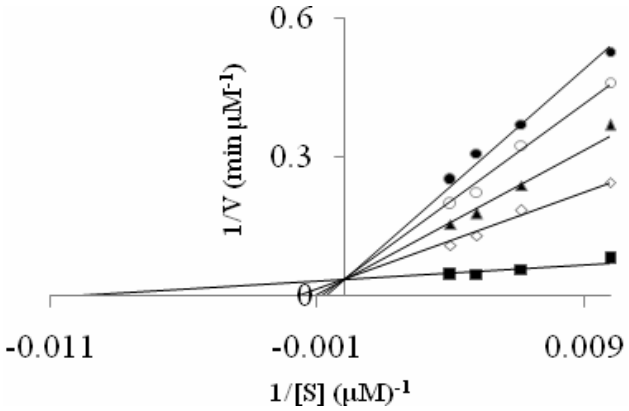
آزمایش‌های انجام شده در غیاب و حضور لیگاند صورت گرفت، ضمن این‌که این لیگاندها به مدت حداقل ۴ دقیقه با آنزیم انکوبه شده‌اند. نتایج بر حسب (mdeg) ارائه شده است.

مطالعه فلورسانس ذاتی

برای اندازه‌گیری شدت نشر فلورسانس ذاتی تیروزیناز به منظور مطالعه تأثیر لیگاند بر ساختار تیروزیناز، از غلظت mg/ml ۰/۱۷ تیروزیناز استفاده شد. طول موج تحریک، nm ۲۸۰ بوده است. آزمایش‌ها در غلظت‌های مختلف لیگاند (در مطالعه سینتیک مهارکنندگی) انجام شد.

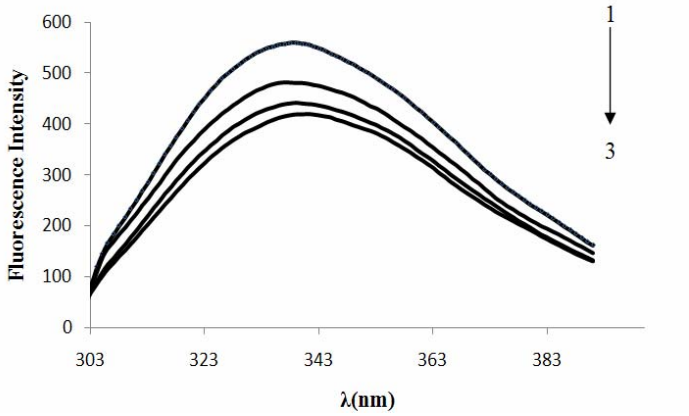
نتایج

در ابتدا اثر دی‌اکسان بر فعالیت کرزولازی و در غلظت‌های مختلف بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد که این لیگاند می‌تواند فعالیت کرزولازی را مهار کند. بر این اساس، نمودار Lineweaver Burk برای این فعالیت رسم شد که در نمودار ۱ مشخص شده است.

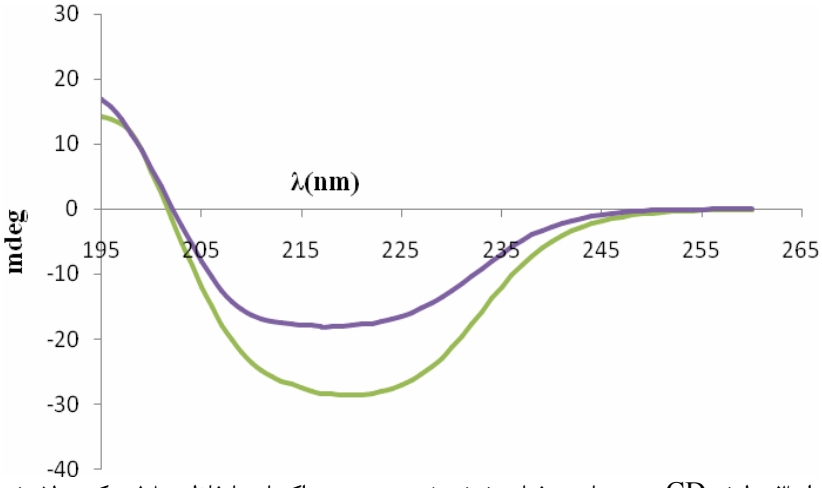


نمودار۱- نمودار Lineweaver Burk برای فعالیت کرزولازی در حضور دی اکسان (در غلظت‌های صفر، ۰/۷، ۰/۹، ۱/۱ و ۱/۳ میکرومولار).

در قسمت دیگری از این مطالعه، اثر دی‌اکسان بر ساختار دوم و سوم آنزیم تیروزیناز قارچ خوراکی مورد برررسی قرار گرفت. ساختار سوم، با استفاده از فلورسانس و ساختار دوم، با استفاده از CD مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به ترتیب در قالب نمودارهای ۲ و ۳ مشخص شده است.



نمودار ۲- طیف نشری تیروزیناز در غیاب و حضور دی‌اکسان در غلظت‌های مختلف (۱۸،۲۶و۱۰) میکرومولار (به ترتیب از ۱ تا ۳).



نمودار ۳- طیف CD تیروزیناز در غیاب (بنفش) و حضور دی اکسان با غلظت ۱۸ میکرومولار (سبز).

بحث

همان‌طور که تصویر ۲ نشان می‌دهد هر دو سویسترای کته‌کول و کرزول به مس‌های جایگاه فعال آنزیم متصل شده و با انجام واکنش اکسیداسیون احیا به محصولات مربوطه تبدیل می‌شوند. دی‌اکسان به خاطر داشتن دو گروه هیدروکسیل می‌تواند با مس‌های جایگاه فعال اتصال کئوردینانس ایجاد کند (۱۳). نمودار Lineweaver Burk نشان می‌دهد که مهار آنزیم تیروزیناز در فعالیت کرزولازی، به صورت رقابتی است، یعنی این لیگاند به جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شود. همچنین مطالعات فلورسانس نشان می‌دهد که با اتصال این لیگاند به آنزیم، ساختار سوم هم دچار تغییراتی می‌شود و نشر تریپتوفان خاموش می‌شود. زیرا نمودارها نشان می‌دهد که با افزایش غلظت لیگاند نشر تریپتوفان کم می‌شود. این پدیده ممکن است به خاطر این باشد که تریپتوفان به داخل آنزیم برود. همچنین مطالعات CD نشان می‌دهد که در اثر اتصال دی‌اکسان به آنزیم، ساختار دوم نیز دچار تغییرات می‌شود. که با توجه به نمودار ساختار هلیکس کم می‌شود که نشان می‌دهد پایداری آنزیم کاهش می‌یابد. اتصال دی‌اکسان به مس‌های جایگاه فعال از طریق گروه‌های هیدروکسیل باعث می‌شود که از یک طرف سوبسترا نتواند به جایگاه فعال وارد شود و از طرف دیگر دی‌اکسان با اتصال به مس در ابر الکترونی مس تغییرات ایجاد کرده و در انتقال الکترون مس اختلال ایجاد می‌کند در نتیجه مس موجود در جایگاه فعال دیگر نمی‌تواند با سوبسترا واکنش اکسیداسیون-احیا ایجاد کند و آنزیم مهار می‌شود. غیبی و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثرات ان-آلکیل سولفات‌ها و دی تیو کربوممات‌هار را بر روی این آنزیم مطالعه کردند (۱۵، ۱۴) که نتایج آنها نشان داد که این لیگاندها توانسته بودند آنزیم را به صورت رقابتی مهار کنند. آن‌ها ادعا کرده‌اند که اتم سولفور موجود در این ترکیبات توانسته بود که فلز مس را چلاته کند. همچنین علی‌جانیان زاده و همکاران در سال ۲۰۰۷ و صبوری و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۱۷-۱۵) با استفاده از آلکیل زانتات‌ها فلز مس جایگاه فعال را چلاته کردند و ادعا کرده‌اند که این لیگاندها با دو اندرکنش هیدروفوب و الکترواستاتیک توانسته بودند که به آنزیم متصل شده و آن را مهار کند همچنین این لیگاندها در ساختار آنزیم تغییر ایجاد کرده بود. آنها ادعا کرده‌اند که با افزایش دم هیدروفوب قدرت مهاری افزایش یافته است. همچنین در مقاله‌های دیگر این نتایج تکرار شده است (۱۹، ۱۸). وقتی نمودارها نشان می‌دهند، مهار از نوع رقابتی است احتمالا مکانیسم اتصال و مهار به همین صورت خواهد بود. حال می‌توان با الگو گرفتن از دی‌اکسان مهارکننده‌هایی طراحی کرد که شبیه به آن عمل کنند و قوی‌تر از مهارکننده‌های قبلی عمل کند. تفاوتی که آن مهارکننده با مهارکننده‌های قبلی دارد این است که در مهارکننده‌های قبلی از خصوصیت هیدروفوب بودن جایگاه فعال استفاده شده در صورتی که در این‌جا فقط از این خصوصیت استفاده شده که دی‌اکسان می‌تواند با قدرت زیاد و به صورت اختصاصی به مس‌ها متصل شود و هیچ اندرکنش هیدروفوبی در این مکانیسم وجود ندارد. همچنین از دی‌اکسان می‌توان در سفیدکننده‌ها در صنایع آرایشی استفاده کرد. واکنش کرزولازی مهم‌ترین واکنش آنزیم تیروزیناز

می‌باشد بنابراین مهار آن برای متوقف کردن تولید L-Dopa کافی می‌باشد. البته می‌توان با الهام گرفتن از ساختار دی‌اکسان، لیگاندهایی را طراحی کرد که با قدرت بیشتر و با اتصال اختصاصی به مس-های جایگاه فعال متصل شده و فعالیت آنزیم را مهار کرد همچنین می‌توان در مطالعات بعدی اثر این لیگاند را بر فعالیت کته‌کولازی بررسی کرد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از باشگاه پژوهشگران دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا به واسطهٔ تامین بودجه لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

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 salinestris* 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., Rodríguez-López, J. N., García-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.
13. Pei-Teng, Ch., Chia-Yuan, Ch., Jong-Liang, L., 2003. Adsorrption and geometry of 1,4-dioxane on Cu (1 0 0). Surface Science 524: 96-102.
14. Gheibi, N., Saboury, A. A., Haghbeen, K., Moosavi-Movahedi, A. A., 2005. Activity and structural changes of mushroom tyrosinase induced by n-alkyl sulfates. Coll Surf B: Biointerfaces 45: 104-107.
15. Gheibi, N., Saboury, A. A., Mansury-Torshizi, H., Haghbeen, K., Moosavi-movahedi, A. A., 2005. The inhibition effect of some n-alkyl dithiocarbamates on mushroom tyrosinase. J Enz Inhib Med Chem 20: 393-399.
16. Alijanianzadeh, M., Saboury, A. A., Mansuri-Torshizi, H., Haghbeen, K., Moosavi-Movahedi, A. A., 2007. The inhibitory effect of some new synthesized xanthates on mushroom tyrosinase activities. J Enzyme Inhib Med Chem 22: 239-246.
17. Saboury, A. A., Alijanianzadeh, M., Mansoori-Torshizi, H., 2007. The role of alkyl chain length in the inhibitory effect n-alkyl xanthates on mushroom tyrosinase activities. Acta Biochim Pol 54: 183-191.
18. Amin, E., Saboury, A. A., Mansoori-Torshizi, H., Moosavi-Movahedi, A. A., 2010. Potent inhibitory effects of benzyl and p-xylidine-bis dithiocarbamate sodium salts on activities of mushroom tyrosinase. J Enzyme Inhib Med Chem 25: 272-281.
19. Schallreuter, K. U., Kothari, S., Chavan, B., Spencer, J. D., 2008. Regulation of melanogenesis-controversies and new concepts. Exp Dermatol 17: 395-404.