



نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر، ماه ۱۳۸۳

تعیین پارامترهای ترمودینامیکی برهم کنش پاراکسون و اتیل پاراتیون با آنزیم کولین اکسیداز با استفاده از اسپکتروسکپی فلورسانس

حسن توکلی^{۱*}، هدایت الله قورچیان^۱، علی اکبر صبوری^۱

۱. دانشگاه تهران - مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک - تهران - ایران.

۲. دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله - دانشکده پزشکی - گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک.

چکیده

کاربرد آنزیم کولین اکسیداز در بیوسنسورهای آنزیمی به منظور آشکارسازی ارگانوفسفره ها باعث شده تا مطالعات زیادی بر روی برهم کنش این آنزیم با ارگانوفسفره ها انجام پذیرد. در این مقاله اثر دو ارگانوفسفره پاراکسون و اتیل پاراتیون بر روی ساختمان آنزیم کولین اکسیداز مورد بررسی قرار گرفته است. به همین منظور سه پارامتر ترمودینامیکی آنتالپی، انرژی آزاد گیبس و انتروپی برهم کنش عوامل فوق با کولین اکسیداز به روش اسپکتروفتومتری نشر فلورسانس اندازه گیری شده و سپس مقایسه گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که هر دو این عوامل بر روی ساختار آنزیم اثر داناتوره کنندگی دارند. اما پاراکسون در مقایسه با اتیل پاراتیون، دارای اثر هیدروفوبیک بیشتری بوده و شدیدتر ساختار آنزیم را تحت تاثیر خود قرار می دهد و انتروپی بیشتر آن ناشی از همین واقعیت است.

کلمات کلیدی: پارامترهای ترمودینامیکی، بیوسنسورهای آنزیمی، کولین اکسیداز، پاراکسون، اتیل

پاراتیون

مقدمه

کاربرد بسیار وسیع ارگانوفسفره ها در کشاورزی (به عنوان آفت کش) [۱ و ۲]، در پزشکی (به عنوان مهارکننده های استیل کولین استراز) [۳] و حتی در تهاجم های نظامی (آن گونه که در جنگ تحمیلی و بویژه در حلبچه بوقوع پیوست) [۴]، آشکارسازی این عوامل را از نقطه نظر زیست محیطی، پزشکی و نظامی بسیار حائز اهمیت ساخته است. کولین اکسیداز (ChOx) آنزیمی است که به همراه استیل کولین استراز بر سطح الکترودهای مناسب تثبیت می شود [۵]. چنین ساختاری، بیوسنسور آنزیمی نامیده شده و برای آشکارسازی (مطالعه کیفی) [۵] و اندازه گیری غلظت ارگانوفسفره ها (مطالعه کمی) [۶] مورد استفاده قرار می گیرد. آگاهی از مکانیزم تاثیر آنالیت ها (ترکیباتی که مورد آشکارسازی قرار می گیرند) بر ساختار طبیعی آنزیم هایی که در بیوسنسورها مورد استفاده قرار می گیرند، امکان ساخت بیوسنسورهای با کارایی بیشتر را فراهم می آورد. علی رغم کاربرد زیاد کولین اکسیداز در ساخت بیوسنسورهای آنزیمی، اطلاعات زیادی در مورد تاثیر ارگانوفسفره ها بر ساختار طبیعی آن در دسترس نمی باشد. در این مقاله بر هم کنش دو ارگانوفسفره پاراکسون (POX) و اتیل پاراتیون (EPA) با آنزیم ChOx مورد بررسی قرار گرفته است.

ChOx مانند همه پروتئین ها، برای انجام نقش های ساختاری و یا کاتالیتیکی (آنزیمی) خود، بر اساس رابطه منطقی ساختار - عملکرد (Conformation-Function) به ساختار طبیعی (Native) خود وابسته است [۷] [و مطالعه شایداری آن در مقابل عوامل فیزیکی (مانند دما و فشار) و یا عوامل شیمیایی (مانند انواع دناتورده کننده ها) مورد توجه پژوهش گران متعددی قرار گرفته است [۸]. پارامترهای ترمودینامیکی مانند انتالپی، انرژی آزاد گیبس و انتروپی برهم کنش، برای ارزیابی پایداری پروتئین ها در مقابل عوامل دناتورده کننده فیزیکی و یا شیمیایی، شاخص های قابل قبولی به شمار می آیند [۹ و ۱۰]. در پژوهش انجام شده برای بررسی برهم کنش POX و EPA با آنزیم ChOx به منظور تعیین میزان پایداری آنزیم در مقابل این ارگانوفسفره ها، از اندازه گیری پارامترهای ترمودینامیکی مذکور به روش اسپکتروسکوپی نشر فلورسانس استفاده شده است

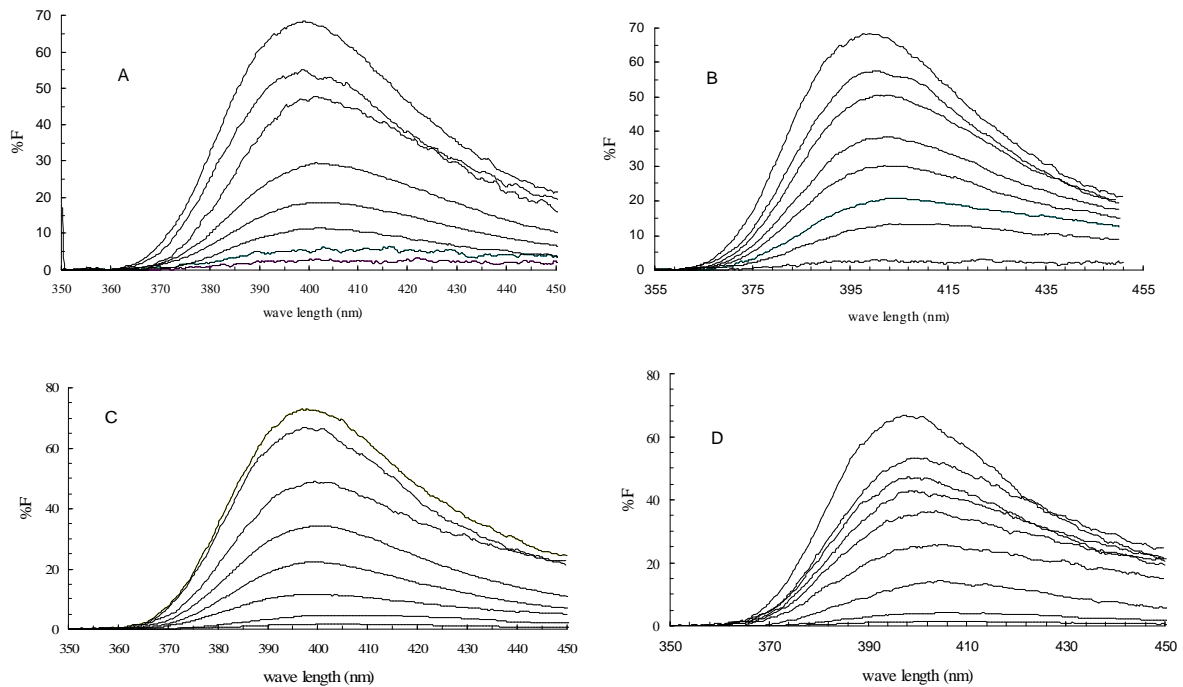
مواد و روش ها

کولین اکسیداز، پاراکسون و اتیل پاراتیون از شرکت سیگما تهیه گردید. برای تهیه بافر از پتاسیم فسفات (K_2HPO_4 , KH_2PO_4) محصول شرکت مرک و در همه آزمایش ها از آب دو بار تقطیر برای تهیه محلول های مورد نیاز، استفاده شد.

برای اندازه گیری ماکزیم نشر فلورسانس، محلول آنزیمی ChOx در بافر پتاسیم فسفات با pH ۸ تهیه گردید. سپس برای تهیه کمپلکس های ChOx-POX و ChOx-EPA غلظت های مختلفی از POX و یا EPA به محلول آنزیمی اضافه شد. حجم محلول ها در درون سل فلورسانس ۱ ml و غلظت آنزیم درون آن $2/32 \mu M$ بود. برای انجام آزمایش فلورسانس، دستگاه اسپکتروسکوپی فلورسانس Hitachi مدل MPF-4 که مجهز به سیستم کنترل دما Protherma مدل NTB-4 بود، مورد استفاده قرار گرفت.

بحث و نتیجه گیری

طیف نشر فلورسانس ChOx نشان داد (شکل ۱ A تا D) که با تحریک این آنزیم با طول موج ۲۸۰ nm، که در واقع طول موج تحریک تریپتوفان است [۱۱]، ماکزیمم نشر آن در طول موج ۴۰۵ nm اتفاق می افتد.



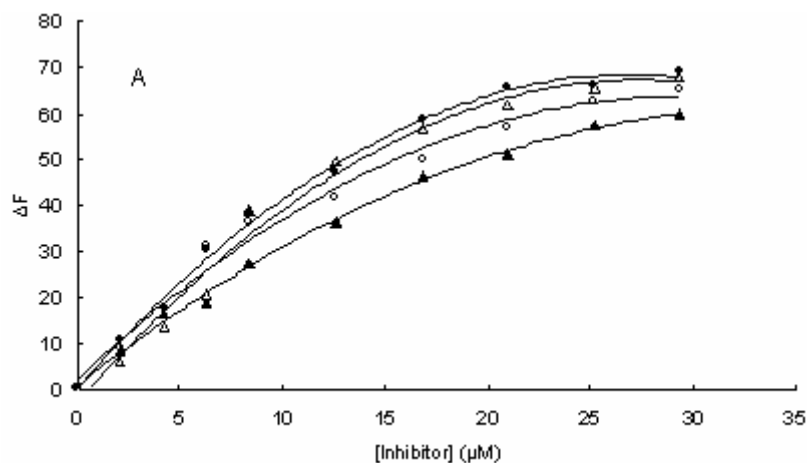
شکل ۱- نشر فلورسانس کولین اکسیداز. محلول آنزیمی با غلظت ۲/۳۲ میکرومولار در بافر پتاسیم فسفات، با غلظت های ۰، ۴/۲، ۸/۴، ۱۲/۶، ۱۶/۸، ۲۰، ۲۸/۴ و ۳۶/۸ میکرومولار پاراکسون (POX) و اتیل پاراتیون (EPA) در دو دمای ۲۵ (گراف های A, C) و ۳۷ (گراف های B, D) درجه سانتیگراد انکوبه شده است. گراف های A و B مربوط به پاراکسون و C و D مربوط به اتیل پاراتیون است. بیشترین نشر فلورسانس برای آنزیم طبیعی و کمترین آن برای آنزیم کاملاً باز شده اتفاق می افتد.

مطالعه طیف نشر فلورسانس پروتئین ها امکان تمایز و مطالعه ساختارهای طبیعی (Native) و باز شده (Unfold) پروتئین ها را فراهم می آورد [۱۲]. مطالعاتی که تا کنون بر روی طیف فلورسانس پروتئین ها انجام شده، این واقعیت را بیان می کند که بیشترین شدت نشر فلورسانس مربوط به حالت طبیعی و خاموشی (Quenching) نشر فلورسانس حالت باز شده گی (Unfold) آنها را نشان می دهد [۱۲]. شکل ۱ (A تا D). کاهش شدت نشر فلورسانس ChOx را با افزایش غلظت ارگانوفسفره های POX یا EPA نشان می دهد. در این شکل طیف های a مربوط به حالت طبیعی و طیف های d مربوط به حالت باز شده گی کامل ChOx است. اگر چه گزارش هایی وجود دارد که حاکی از جابجایی قرمز و یا آبی طیف نشر فلورسانس در این شکل طیف های a مربوط به حالت طبیعی و طیف های d مربوط به حالت باز شده گی کامل ChOx است. اگر چه گزارش هایی وجود دارد که حاکی از جابجایی قرمز و یا آبی طیف نشر فلورسانس بعضی از پروتئین های باز

شده نسبت به حالت طبیعی آنها است، ولی در این پژوهش در اثر انکوباسیون ChOx با ارگانوفسفره های مذکور، چنین جابجایی هایی دیده نشده است و از این نظر ChOx به پروتئین هایی همانند Lectin شبیه است [۱۱].

اصولا نشر فلورسانس پروتئین ها از جمله ChOx مربوط به اسید آمینه های تریپتوفان است [۱۱]. این اسید آمینه در زمره اسید آمینه های آروماتیک بوده که به دلیل دارا بودن دنباله هیدروفوب، در حالت طبیعی در درون ChOx و به دور از دسترس حلال (آب) مدفون است. به همین دلیل در پروتئین طبیعی در نشر فلورسانس اسید آمینه تریپتوفان حالت تعاونی وجود دارد [۱۳] و در نتیجه بیشترین شدت نشر فلورسانس در این حالت در پروتئین ها دیده می شود. با افزودن عوامل ارگانوفسفره (POX یا EPA) به محیط آنزیمی، ساختار طبیعی آب به علت هیدروفوب بودن این عوامل به هم می ریزد و چون آب در حفظ ساختار طبیعی آنزیم دارای نقش اساسی است، به همین دلیل به هم ریختن ساختار آن موجب می شود تا باز شدن ChOx آغاز شده و نشر فلورسانس شروع به کاهش نماید (طیف های b تا d). در غلظت های زیاد ارگانوفسفره ها، ChOx کاملا باز شده و اثر تعاونی نشر فلورسانس توسط تریپتوفان از بین می رود و در نتیجه کاهش شدید نشر فلورسانس ناشی از همین امر می باشد.

بر هم کنش هیدروفوبیک بین POX و EPA با ChOx با پارامترهای ترمودینامیکی سیستم کاملا در ارتباط هستند [۱۴] و به همین دلیل می توانند در کمی سازی این بر هم کنش و مقایسه قدرت هیدروفوبیسیته آنها مورد استفاده قرار گیرند. اطلاعات بدست آمده از آزمایش های فلورسانس در غلظت های مختلف این عوامل در دو دمای متفاوت می توانند در تعیین پارامترهای ترمودینامیکی مورد استفاده قرار گیرند (شکل ۱ A تا D). در شکل (۲) کاهش شدت فلورسانس در دو دمای مذکور نسبت به غلظت های مختلف EPA و POX ترسیم گردید.



شکل ۲- تغییر نشر فلورسانس کولین اکسیداز نسبت به تغییر غلظت ارگانوفسفره ها. تغییر نشر فلورسانس کولین اکسیداز انکوبه شده با غلظت های متفاوت پاراکسون در دمای ۲۵ (●) و ۳۷ (○) درجه سانتیگراد. در شکل نشان داده شده است. انکوباسیون آنزیم با اتیل پاراتیون در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با Δ و در دمای

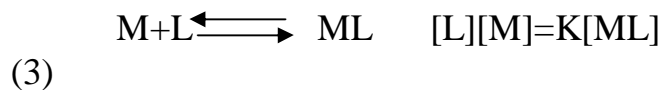
۳۷ درجه سانتیگراد با ▲ مشخص شده است. ΔF در هر غلظتی از ارگانوفسفره با استفاده از شکل (۱) تعیین گردید. (برای توضیح بیشتر به متن مراجعه شود). محور قائم این شکل یعنی ΔF در واقع بیان گر اختلاف شدت فلورسانس در طول موج ۴۰۵ nm است که از رابطه زیر قابل محاسبه است:

$$\Delta F = F_0 - F \quad (1)$$

در این رابطه F_0 شدت طیف فلورسانس حالت طبیعی و F مربوط به حالت باز شده ChOx است. طیف فلورسانس ChOx (شکل ۱) نشان می دهد که باز شدن این آنزیم با افزایش غلظت ارگانوفسفره ها به طور تدریجی اتفاق می افتد. در این صورت چنانچه F' مربوط به باز شده گی کامل آنزیم در بیشترین غلظت ارگانوفسفره ها باشد (طیف در شکل ۱، می توان نوشت:

$$\Delta F_{\max} = F_0 - F' \quad (2)$$

برای برهم کنش بین آنزیم (M) و ارگانوفسفره ها (L) داریم:



با توجه به این واقعیت که در ماکزیمم غلظت ارگانوفسفره ها تمام ChOx، تشکیل کمپلکس (ML) داده و به صورت (ChOx-POX یا ChOx-EPA) هستند، بنابراین در بیشترین غلظت ارگانوفسفره ها که باز شده گی کامل آنزیم اتفاق می افتد، غلظت کمپلکس ها با غلظت اولیه آنزیم برابر است. به عبارت دیگر آنزیم آزاد وجود ندارد. یعنی داریم:

$$[ML]_{\text{total}} = [M]_{\text{total}}$$

همچنین با توجه به تعریف ΔF و ΔF_{\max} تعیین غلظت کمپلکس ها با استفاده از شکل (۲) و رابطه زیر امکان پذیر می گردد:

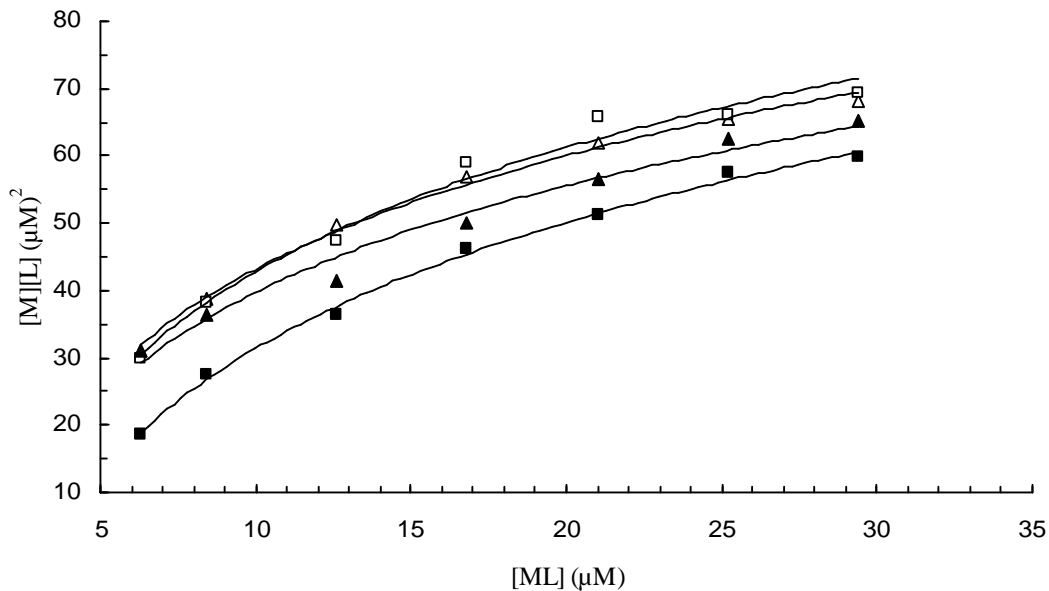
$$[ML] = [ML]_{\text{total}} \Delta F / \Delta F_{\max}$$

در غلظت های کم ارگانوفسفره ها که باز شده گی جزئی (Partial Unfolding) وجود دارد همواره بخشی از ارگانوفسفره ها به صورت کمپلکس با ChOx و بخش دیگر به صورت آزاد هستند. بنابراین برای غلظت ارگانوفسفره آزاد و یا آنزیم آزاد به ترتیب داریم:

$$[L]=[L]_{total}-[ML] \quad (2)$$

$$[M]=[M]_{total}-[ML] \quad (3)$$

در شکل (۳) حاصل ضرب غلظت های ارگانوفسفره های آزاد (L) و آنزیم آزاد (M) نسبت به غلظت کمپلکس ها (ML) ترسیم شده است.



شکل ۳- تغییرات حاصل ضرب آنزیم آزاد در ارگانوفسفره های آزاد نسبت به غلظت کمپلکس ها. این تغییرات برای پاراکسون با (□) در دمای ۲۵ و با (■) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نشان داده شده است. همچنین در این شکل برای اتیل پاراتیون با (Δ) در دمای ۲۵ و با (▲) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نشان داده شده است.

بر اساس رابطه (۱) شیب خطوطی که در شکل (۳) در دو دمای ۲۵ °C و ۳۵ °C ترسیم شده است، مقادیر K را به دست می دهد. با داشتن مقادیر K، انتالپی، انتروپی و انرژی آزاد گیبس با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند [۱۵]:

$$\ln(K_2/K_1) = [\Delta H(1/T_1 - 1/T_2)]/R \quad \text{Van't Hoff Equation}$$

$$\Delta G = \Delta G_{308} - \Delta G_{298} = -R(T_2 \ln K_2 - T_1 \ln K) \quad \text{Gibbs Free Energy Equation}$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T \quad (5)$$

کلیه پارامترهای ترمودینامیکی محاسبه شده در جدول (۱) گرد آوری شده اند.

جدول ۱- پارامترهای ترمودینامیکی بر هم کنش بین پاراکسون (POX) و اتیل پاراتیون (EPA) با آنزیم کولین اکسیداز (ChOx). آنترپیی بر هم کنش در دمای ۳۷ °C محاسبه شده است.

[L]	$\Delta H(\text{kJ/mol})$	$\Delta G(\text{kJ/mol})$	$\Delta S(\text{kJ/mol K})$
POX	۷۹/۳	۳/۲۸	۰/۲۴
EPA	۴۲	۳/۲۶	۰/۱۲

مثبت بودن تغییرات آنتروپی محاسبه شده بیانگر بر هم کنش هیدروفوبیک بین POX و EPA با اسید آمینه های سطح ChOx می باشد. علاوه بر این بزرگتر بودن مقدار آنتروپی محاسبه شده برای بر هم کنش بین POX و ChOx نسبت به EPA و ChOx بیانگر این واقعیت است که این ارگانوفسفره نسبت به POX دارای اثر هیدروفوبیسیته شدیدتری بر ChOx بوده و بنابراین به طور موثرتری ساختار طبیعی ChOx را تحت تاثیر خود قرار می دهد.

منابع و مراجع

1. Food and Agricultural Organization of United Nations, Roma. FAO Prod. Yearb. (1989).
2. United States Department of Agriculture. In: Agriculture Statistics., Washington, DC: U.S. Government Printing Office; p 395 (1992).
3. Fillit H, Hill J. The economic benefits of acetylcholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer disease and associated dementias. Alzheimer Dis Assoc Disord. (2004).
4. Paddle, B.M. Biosensors for chemical and biological agents of defense interest. Biosensors & Bioelectronics. (1996).
5. Doretta L, Ferrara D, Lora S, Schiavon F, Veronese FM. Acetylcholine biosensor involving entrapment of acetylcholinesterase and poly(ethylene glycol)-modified choline oxidase in a poly(vinyl alcohol) cryogel membrane. Enzyme Microb Technol. (2000).
6. KoK, N.K., Bozoglo, F., Hasirci, V. Construction of an acetylcholinesterase-Choline oxidase biosensor for aldicarb determination. Biosensors & Bioelectronics. (2002).
7. Mulchndani, A., Mulchndani, P., Chen, W. Enzyme biosensor for determination of organophosphates. Field Analytical Chemistry and Technology. (1998).
8. Mitkevich VA, Schulga AA, Ermolyuk YS, Lobachov VM, Chekhov VO, Yakovlev GI, Hartley RW, Nick Pace C, Kirpichnikov MP, Makarov AA. Thermodynamics of denaturation of complexes of barnase and binase with barstar. Biophysical Chemistry. (2003).
9. Pace, C.N., Shaw, K.L. Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. Proteins: structure, function and genetics. (2000).
10. Liu, C., Chu, D., Wideman, R.D., Houlston, R.S., Wong, H.J., Meiering, E.M. Thermodynamics of denaturation of Hisactophilin, A β -Trefoil protein. Biochemistry. (2001).
11. Komath, S.S., Swamy, M.J. Fluorescence quenching, time resolved fluorescence and chemical modification studies on the tryptophan residues of snake gourd seed Lectin. Journal of Photochemistry and Photobiology. (1999).
12. Eftink, M.R. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. Biophysical Journal. (1994).
13. Sultan, N.A., Swamy, M.J. Thermodynamic analysis of binding of 4-methylumbelliferyl- α and β -D-galactopyranosides to Momordica charantia Lectin. Current Science. (2003).
14. Cui, F.L., Fan, J., Li, W., Fan, Y.C. and Hu, Z.D. Interaction between 1-benzoyl-4-p-chlorophenyl thio serine carbazide and serum albumin: investigation by fluorescence spectroscopy. J. Pharm. Biomed. Anal. J. Pharm. Biomed. Anal. (2004).
15. - Tinoco, I, Sauer, K. and Wang, J.C. Physical Chemistry (Prentice Hall, London). (1995).