

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۱۰

وب سایت نشریه: <https://jab.alzahra.ac.ir>

doi 10.22051/JAB.2021.34174.1395

بررسی موقعیت اسیدهای آمینه آروماتیک آنزیم پراکسیداز تربکوهی واسرشته شده با فلز روی؛ آنالیز مشتق مرتبه دوم گراف‌های طیف سنجی^۱

محمد رضا رجبی^۱، نجمه هادی‌زاده شیرازی^{۲*}

چکیده

در تحقیق حاضر موقعیت اسیدهای آمینه آروماتیک به عنوان عناصر مهم در تشکیل و پایداری ساختار سوم آنزیم پراکسیداز تربکوهی دناتوره شده با فلز روی، با کمک آنالیز گراف‌های مشتق مرتبه دوم داده‌های طیف سنجی مورد بررسی قرار گرفته است. برای این منظور، مشتق مرتبه دوم گراف‌های جذبی و نشری با ۱۰ تکرار در محدوده ماوراء بنفش مرئی از طیف سنجی دورنگنمایی دورانی و فلورسانس برای آنزیم در حضور ۵۰۰-۱۰۰ میکرومولار کلرید روی با کمک نرم افزار متلب تهیه و مطالعه شده است. نتایج نشان می‌دهد که یون روی فشردگی میکروساختارهای اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک را بویژه برای تریپتوفان کاهش داده است با اینحال حتی با غلظت ۵۰۰ میکرو مولار روی، تریپتوفان مستقیماً در معرض حلال آبدوست قرار نمی‌گیرد. بطور کلی به نظر می‌رسد که در واسرشته‌گی آنزیم توسط فلز روی، تریپتوفان اهمیت بیشتری نسبت به سایر اسیدهای آمینه آروماتیک دارد.

واژه‌های کلیدی: تریپتوفان، ساختار سوم پروتئین، واسرشته‌گی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

* (نویسنده مسئول: nhadizade@riau.ac.ir)

۱- این مقاله بخشی از پایان نامه دانشجوی محمد رضا رجبی با راهنمایی دکتر نجمه هادی‌زاده شیرازی عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن بوده است.

مقدمه

پراکسیداز ترب کوهی (Horseradish peroxidase (HRP) (EC 1.11.1.7) عضو مهمی از گروه پراکسیدازهای گیاهی است که اکسیداسیون و پراکسیداسیون انواع ترکیبات آلی و غیرآلی را کاتالیز میکند. چندین ایزوآنزیم اسیدی، خنثی و قلیایی برای HRP شناسایی و طبقه بندی شده‌اند که در میان آنها HRP-C شناخته شده‌ترین و پرکاربردترین ایزو آنزیم از نظر صنعتی و تحقیقاتی است (Thomas *et al.*, 2010). این ایزوآنزیم یک گلیکوپروتئین مونومر با وزن مولکولی ۴۴۰۰۰ دالتون است که به صورت غیر کووالان به هشت زنجیره‌ی کربوهیدرات و یک گروه هم متصل می شود (Lopez *et al.*, 2014). گروه هم که به عنوان گروه پروستتیک آنزیم نیز شناخته می شود از یک گروه پورفیرین همراه با یک یون آهن سه ظرفیتی تشکیل شده و در فعالیت اکسیداسیون و احیا دخالت می کند. به صورتی که تغییر قدرت پیوندهای موجود در حلقه‌های پورفیرین و یا اتصالات بین یون آهن و پورفیرین منجر به تغییر فعالیت آنزیم می شود (Sun *et al.*, 2010, Vlasits *et al.*, 2010). تحقیقات نشان داده اند که وجود سایر عناصر واسطه در محیط اطراف پروتئین، فعالیت آنزیم را به شدت تحت تاثیر قرار می دهد. وجود یونهای مس با غلظت یک میکرومولار منجر به کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم پراکسیداز در تربچه (Raphanus sativus) می شود (Chen *et al.*, 2002). همچنین این نتیجه برای اثرات مهارکنندگی فلزاتی مانند کبالت، سرب، نیکل، آلومینیوم و مولیبدن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز دو گونه‌ی *Rosmarinus officinalis* و *Eruca sativ* تایید شده است (Atrooz *et al.*, 2016).

با توجه به نقش آنزیمهای پراکسیداز در تنفس سلولی، مطالعه‌ی تاخوردگی و واسرشتگی این آنزیمها در حضور مهارکننده‌ها از اهمیت فراوانی برخوردار است (Khan *et al.*, 2014). بر اساس نظریات تاخوردگی پروتئین، اسیدهای آمینه آروماتیک و به ویژه تریپتوفان نقش اصلی را در تشکیل هسته مرکزی ساختار سه بعدی پروتئین دارند (Sanchez *et al.*, 2008). به منظور بررسی فشردگی هسته مرکزی تاخوردگی، تغییرات ساختاری به کمک اندازه‌گیری فلورسانس ذاتی و یا فلورسانس القایی با کمک ۸- آنیلینو-۱- نفتالن سولفونیک اسید (ANS) توسط دانشمندان مختلف انجام شده است (Saud *et al.*, 2019, Sáez-Jiménez *et al.*, 2016). با این حال به دلیل وجود تنها یک اسید آمینه تریپتوفان در توالی اسید آمینه HRP (۱۱۷ W) شدت نشر فلورسانس این آنزیم در محدوده‌ی ۳۰۰-۴۰۰ نانومتر نسبت به سایر پروتئینها بسیار کمتر است (Ohlsson *et al.*, 1986). بعلاوه گروه پروستتیک هم در ساختار این آنزیم به عنوان یک خاموشگر عمل می کند و شدت نشر فلورسانس ذاتی را برای این آنزیم به صورت قابل توجهی کاهش می دهد (Lasagna *et al.*, 1999).

ساختار کریستالوگرافی HRP نشان دهنده‌ی آن است که فاصله تقریبی اسید آمینه تریپتوفان با جایگاه فعال و گروه هم ۱۸-۱۲ آنگستروم است (Das & Mazumdar, 1995). بنابراین ردیابی موقعیت قرارگیری میکرومحیط های اطراف تریپتوفان می تواند شاخصی از وضعیت واسرشتگی و یا تغییر فعالیت آنزیم در شرایط مختلف باشد (Lasagna *et al.*, 1999). علاوه بر طیف سنجی فلورسانس، تکنیک‌های دیگری مانند دورنگ نمایی دورانی (Circular Dichroism) CD نیز تغییرات ساختار پروتئین

در محل اسیدهای آمینه آروماتیک را نشان می دهد. بر این اساس برای حل محدودیت های طیف سنجی فلورسانس در مطالعه تغییرات ساختار سوم HRP می توان از مشتقات درجه دوم طیف جذب CD آنزیم نیز در محدوده طول موجی ۲۵۰-۳۲۰ نانومتر استفاده کرد (Chudzik *et al.*, 2017). در این روش، تغییرات جذب هر سه اسید آمینه تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین به صورت مجزا و با کمک تجزیه طیف جذبی امکان پذیر است (Ohlsson *et al.*, 1986). از آنجایی که شکل و مقدار مشتقات طیفها نه تنها به مقدار جذب بلکه به شکل طیف اولیه نیز بستگی دارد، روش آنالیز طیفهای جذبی ماکرومولکولها حساسیت و دقت بالاتری نسبت به آنالیز سنتی طیفهای جذبی خواهد داشت (Kendrick *et al.*, 2020). طیف جذب پروتئین مجموع جذب فیزیکی و پراکندگی نور توسط کروموفورها است در حالی که مشتق دوم به طور موثری نویزهای حاصل از پراکندگی نور و سهم طیفی پیوندهای دی سولفید را از بین می برد (Dinh *et al.*, 2014). به همین دلیل در این روش، طیفها و پیکهای تداخل یافته در طیف اصلی طی فرایند مشتق گیری از یکدیگر جدا می شوند و گراف حاصل قله های بیشتری نسبت به طیف اولیه خواهد داشت. استفاده از گرافهای مشتق مرتبه دوم برای طیف سنجی فلورسانس نیز مانند CD، موجب تفکیک پیک های نشری حاصل از اسیدهای آمینه آروماتیک می شود (Abbas *et al.*, 2013).

مطالعات گذشته نشان داده است که یون روی، فعالیت آنزیم HRP را به صورت قابل توجهی کاهش می دهد (Shirazi *et al.*, 2017). بعلاوه، این فلز همزمان موجب بروز تغییرات ساختاری در محل گروه پروستتیک هم و کاهش پایداری دمایی آنزیم می شود (Shirazi, 2019). با توجه به اهمیت اسیدهای آمینه آروماتیک بویژه تریپتوفان در ردیابی تغییرات ساختاری آنزیم HRP و نیز اثر مهارکنندگی فلز روی، این تحقیق با هدف درک تغییرات ساختاری محیط اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک در HRP مهار شده با فلز روی، صورت گرفت و نیز تأثیر غلظتهای مختلف کلرید روی بر مقدار جذب پرتوهای ماوراء بنفش در محدوده ۲۵۰-۳۲۰ نانومتر توسط اسیدهای آمینه آروماتیک با کمک طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی اندازه گیری شده و تغییرات هیدروفوبیسیته و فشردگی میکرومحیطهای اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک با استفاده از آنالیز تهیهی گراف مشتق درجه دوم از طیفهای جذبی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد: پودر لیوفیلیزه آنزیم پراکسیداز ترب کوهی، فسفات پتاسیم و کلرید روی از شرکت سیگما خریداری شد. HRP با غلظت ۱ mg/ml در بافر فسفات پتاسیم (pH ۶/۷) حل شد و برای مطالعه های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به هم دار بودن آنزیم، به منظور تعیین درجه خلوص آنزیم از اندازه گیری Rz (Reinheitszahl) استفاده شده است. برای این منظور نسبت جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر (جذب ماکزیمم هم) به جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر (جذب پروتئین) بررسی شده است. مقدار پارامتر برای محلول آنزیمی فوق بیشتر از ۳ بوده است که به معنی خلوص قابل قبول آنزیم میباشد.

نمک کلرید روی با درجه خلوص ۹۹/۹ درصد با غلظت ۰/۱ مولار در آب دیونیزه حل و برای مطالعات ساختاری غلظت‌های ۵۰۰-۰ میکرومولار از محلول اولیه تهیه شد.

طیف سنجی فلورسانس: طیف‌های فلورسانس در ۲۵ درجه سانتی‌گراد با کووت‌های کوارتز ۱ سانتی متر ثبت شد. طیف‌های فلورسانس در دستگاه طیف‌سنج فلورسانس PERKIN ELMER (ژاپن) ثبت شد. به منظور تحریک اسید آمینه تریپتوفان، آنزیم در طول موج ۲۹۵ نانومتر تهییج و طیف‌نشی در محدوده ۴۰۰-۳۰۰ نانومتر ثبت شد. شکاف‌های تحریک و انتشار به ترتیب در ۵ و ۱۰ نانومتر تنظیم شد.

به منظور افزایش دقت در تهیه گراف‌های مشتق درجه دوم، طیف فلورسانس HRP در حضور غلظت‌های مختلف روی، ۱۰ مرتبه تکرار و قبل از مشتق‌گیری، نرمالیزه شدند. برای این منظور مقدار Z score برای تمامی داده‌ها محاسبه و به داده‌ی اصلی اضافه شد به این ترتیب گراف نرمالیزه شده تهیه شده است (Abbas et al., 2013). نرمالیزه کردن داده‌ها و تهیه گراف مشتق دوم فلورسانس با استفاده از نرم افزار متلب (Mathworks Matlab R2020b v9.9) و با کمک الگوریتم Savitzky و Golay محاسبه شده است.

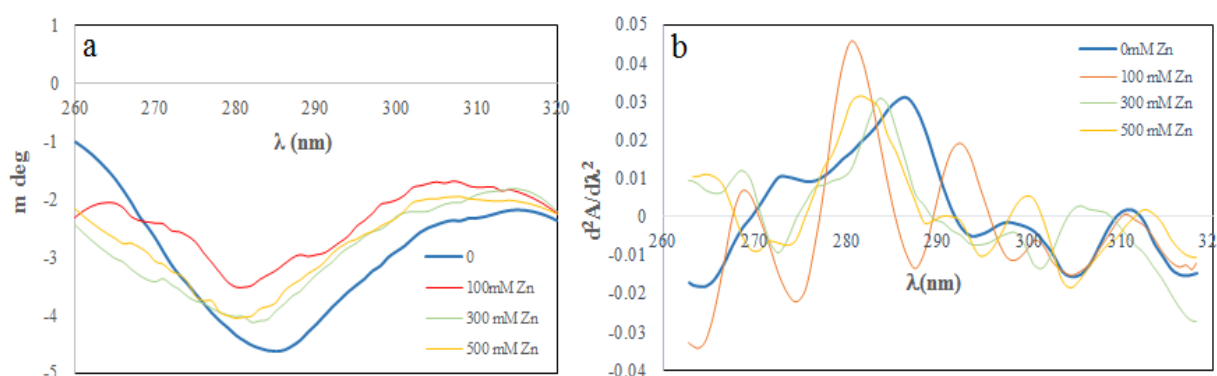
طیف سنجی دورنگ‌نمایی دورانی: در این تحقیق طیف CD توسط اسپکتروپلاریومتر Jasco-J-715 (ژاپن) و با کمک کووت ۱ میلی‌متری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ثبت گردید. تمامی داده‌ها به صورت پیوسته و با سرعت اسکن ۲۰ نانومتر بر دقیقه در محدوده طول موجی ۳۲۰-۲۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شده‌اند. غلظت پروتئین استفاده شده ۲ mg/ml در ۱۰۰ میلی مولار بافر پتاسیم فسفات و گراف CD بافر در هر تست از گراف نمونه کم شده است. به منظور افزایش دقت محاسبات، برای هر گراف ۱۰ تکرار تهیه و پس از میانگین‌گیری و نرمالیزه کردن، با کمک نرم افزار متلب مشتق‌گیری شده است.

نتایج

گراف دو رنگ‌نمایی دورانی در محدوده نور ماوراءبنفش نزدیک برای تغییرات ساختار سوم پروتئین پراکسیداز در نتیجه میانکنش با غلظت‌های مختلف کلرید روی در تصویر ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داده‌اند که غلظت ۱۰۰ میلی مولار کلرید روی به صورت قابل توجهی ساختار سوم آنزیم را کاهش داده است با این حال این روند برای سایر غلظت‌ها ادامه دار نبوده است و در غلظت‌های ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی مولار ساختار آنزیم جذب بیشتری را در محل اسیدهای آمینه آروماتیک از خود نشان می‌دهد (تصویر 1a). همچنین آنزیم HRP در محدوده نور ۳۲۰-۲۵۰ نانومتر دارای یک قله در محدوده‌های ۳۱۰-۲۶۰ نانومتر است که λ_{max} آن در میانکنش با فلز روی به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر شیف‌ت پیدا کرده است.

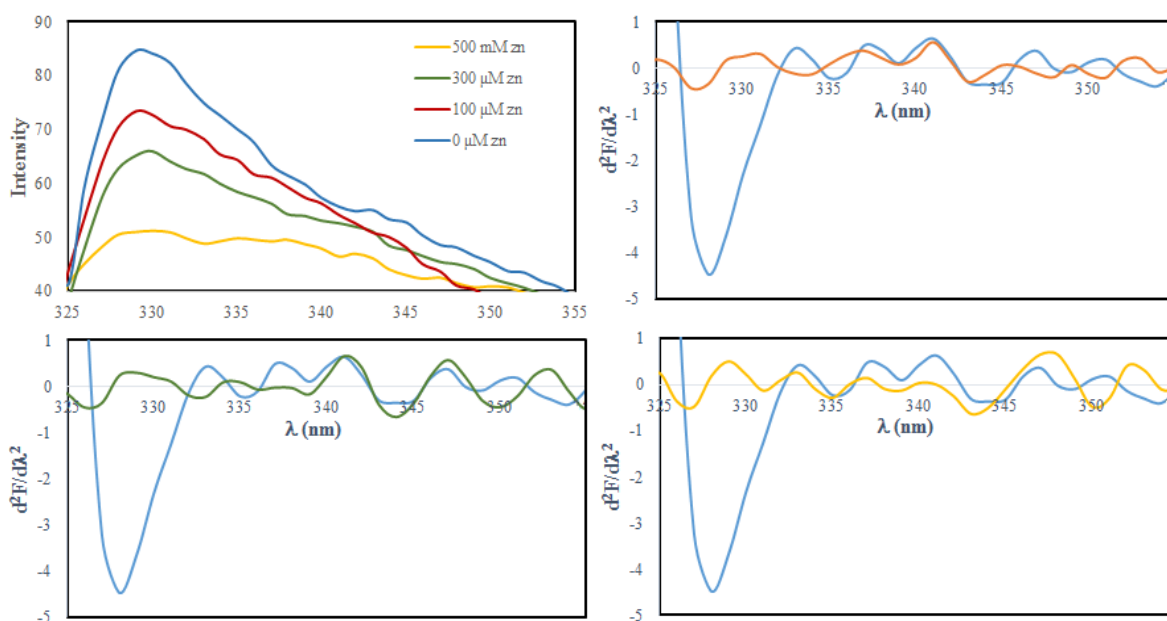
با توجه به دخالت سه اسید آمینه تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین در شکل‌گیری گراف ساختار سوم در طیف سنجی CD و تداخل طیف جذبی این سه اسید آمینه در گراف ساختار سوم و برای درک و بررسی نقش هرکدام از این اسیدهای آمینه

در تغییرات ساختاری آنزیم، مشتقات درجه دوم گراف ۱a تهیه و مورد بررسی شد. درحالی که گراف ۱a تنها یک قله را نشان می دهد، گرافهای مشتق درجه دوم آن طیف جذبی هر کدام از اسیدهای آمینه آروماتیک را از یکدیگر جدا می کند و منجر به تشکیل چهار قله در محدوده های ۲۶۰-۲۷۵ نانومتر، ۲۹۳-۲۷۶ نانومتر، ۳۰۳-۲۹۳ نانومتر و ۳۱۵-۳۰۳ نانومتر می شود (تصویر ۱b). بررسی گرافهای مشتق درجه دوم نشاندهنده آن است که بیشترین تغییرات در محدوده ۳۰۰-۳۱۵ نانومتر است و شدت جذب در محدوده ۳۰۰-۳۱۵ نانومتر کمترین تغییرات را دارد.

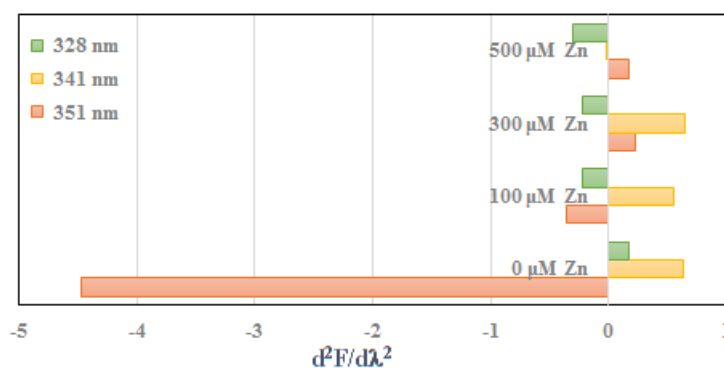


تصویر ۱: گراف دورنگنمایی دورانی ساختار آنزیم پراکسیداز در حضور غلظتهای مختلف یون روی. (a) گراف درجه اول دورنگنمایی دورانی. (b) گراف مشتق درجه دوم دورنگنمایی دورانی

تکنیک طیف سنجی فلورسانس یکی از اختصاصی ترین روشها برای مطالعه و آنالیز میکرومحیط اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک است. در طیف فلورسانس ذاتی اسید آمینه تریپتوفان آنزیم HRP، یک پیک در محدوده ۳۲۵-۳۵۰ نانومتر دیده می شود که با افزایش غلظت کلرید روی، شدت آن قویا کاهش پیدا می کند (تصویر ۲a). با کمک محاسبه مشتقات درجه دوم داده های فلورسانس ذاتی، گراف نشر تریپتوفان آنزیم تجزیه و به گرافی با یک مینیمم (۳۲۸ نانومتر) و چهار ماکزیمم (۳۳۳، ۳۳۷، ۳۴۱ و ۳۴۷ نانومتر) تبدیل شده است (تصاویر ۲b-d). شدت قله در ۳۲۸ نانومتر در تمامی غلظتهای کلرید روی کاهش قابل توجهی دارد درحالی که در سایر قله ها کاهش شدت نشر جزئی است با اینحال هیچکدام از پیکهای گراف در نتیجه دناتوراسیون با فلز روی حذف نشده اند (تصویر ۳). نگاهی دقیقتر به گرافهای مشتق درجه دوم گویای آن است که کاهش شدت نشر رابطه مستقیمی با غلظت کلرید روی داشته است و بعلاوه اندکی شیفت آبی نیز در گرافها دیده می شود.



تصویر ۲: (a) گراف فلورسانس ذاتی تغییرات ساختار سوم آنزیم پراکسیداز در حضور یون روی. گراف مشتق درجه دوم فلورسانس ذاتی آنزیم در حضور ۱۰۰ میلی مولار (b)، ۳۰۰ میلی مولار (c) و ۵۰۰ میلی مولار روی (d). در تمامی گرافها، گراف آبی رنگ مشخصه آنزیم بدون حضور فلز روی است.



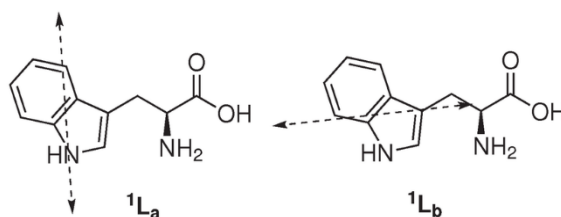
تصویر ۳: " تغییرات شدت نشر فلورسانس تغییرات ساختار سوم آنزیم HRP در حضور یون حاصل از گراف مشتق دوم در طول موج‌های ۳۲۸، ۳۴۱، ۳۵۱ نانومتر.

بحث

ایزوآنزیم C پراکسیداز ترکیبی آنزیمی با ۳۰۸ اسید آمینه است که ساختاری مشتق بر ۱۳ واحد هلیکس و یک صفحه کوتاه بتا را می‌سازد. در ساختار آنزیم ۴ پیوند دی سولفیدی، یک اسید آمینه تریپتوفان، ۲۰ اسید آمینه فنیل آلانین و پنج اسید آمینه تیروزین وجود دارد (Welinder *et al.*, 1979). علی‌رغم وجود تنها یک اسید آمینه تریپتوفان در توالی آنزیم، این اسید آمینه به عنوان پروب اصلی فلورسانس در مطالعات ساختار سوم HRP در نظر گرفته می‌شود (Kumar *et al.*, 2005).

با اینحال نمی‌توان اثر سایر اسیدهای آمینه آروماتیک را در شکل‌گیری گراف ساختار سوم و در دورنگنمایی دورانی و یا نشر فلورسانس نادیده گرفت. با کمک محاسبه مشتقات درجه دوم طیف جذبی می‌توان گراف جذبی هر کدام از اسیدهای آمینه آروماتیک را از یکدیگر جدا کرد. بطور کلی هرچه درجه مشتق‌گیری یک گراف نسبت به یک پارامتر مانند طول موج بیشتر شود به همان میزان رزولوشن گراف افزایش پیدا می‌کند. برای نمونه استفاده از مشتقات درجه دوم گرافهای جذبی پروتئینها در محدوده نور ماوراء بنفش نزدیک (۲۵۰-۳۲۰ نانومتر) می‌تواند جزئیات ساختاری فراوانی را برای محقق فراهم کند (Nayar *et al.*, 2002). این نوع از گرافها رزولوشن طیف‌های جذبی را بالا می‌برد به‌صورتی‌که در گراف مشتقات درجه دوم طیفهای جذبی ($d^2A/d\lambda^2$)، گرافهای فنیل آلانین بین ۲۷۰-۲۴۵ نانومتر، تیروزین در محدوده ۲۸۵-۲۶۵ نانومتر و تریپتوفان بین ۲۹۵-۲۶۵ به صورت قله‌های جدا از هم دیده می‌شوند (Lucas *et al.*, 2006). این درحالی‌است که رزولوشن گرافهای جذبی در گراف درجه صفر این اسیدهای آمینه تنها ۱-۲ نانومتر رزولوشن دارند. از این رو تغییرات جذب اسیدهای آمینه آروماتیک بویژه تریپتوفان با کمک گراف مشتقات درجه دوم به‌خوبی قابل مطالعه می‌شود. بعلاوه درحالی‌که گراف مشتق درجه یک ($dA/d\lambda$) تغییرات جذب را نسبت به تغییرات طول موج نشان می‌دهد، مشتق درجه دوم گرافهای جذبی، بیانگر سرعت این تغییرات خواهد بود. به همین دلیل این نوع از گرافها نسبت به تغییرات جزئی طیفهای جذبی نیز حساس است و شکل پر فراز و نشیب‌تری نسبت به گرافهای درجه صفر جذبی دارند (Chudzik *et al.*, 2017).

نتایج مطالعه دورنگنمایی دورانی HRP در حضور کلرید روی نشان می‌دهد که یون روی به خوبی می‌تواند ساختار سوم آنزیم را تحت تاثیر قرار دهد و از فشردگی آن بکاهد (تصویر ۱a). این امر با نتایج حاصل از مطالعات گذشته مبنی بر اثر مهارکنندگی فلز روی بر آنزیم HRP مطابقت دارد (Shirazi, 2018). بطور کلی حلقه اندولی اسید آمینه تریپتوفان دارای ممان دوقطبی قوی است که به شدت تحت تاثیر شرایط فیزیکی بویژه میزان آبدوستی میکرو محیط اطراف خود قرار می‌گیرد (Vivian *et al.*, 2001). بر اساس تصویر ۱b، تغییر فشردگی میکرومحیطهای اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک یکسان نیست و محیط اطراف اسید آمینه‌های آمینه تیروزین و تریپتوفان به ترتیب کمترین و بیشترین تغییر را از خود نشان داده‌اند. شکل طیف CD نور ماوراءبنفش نزدیک توسط تریپتوفان حاصل تداخل دو حالت ممان دوقطبی گذار L_a و L_b در گروه اندولی این اسید آمینه است (تصویر ۴) (Strickland, ۱۹۷۴).



تصویر ۴: حالت ممان دوقطبی گذار L_a و L_b در گروه اندولی اسید آمینه تریپتوفان

گروه آمین موجود در محور ممان گذار L_a ، ممان دو قطبی بزرگی را بر این حالت گذار اعمال می‌کند و به همین دلیل L_a به شدت به قطبیت محیط حساس است و پیک بزرگی (در محدوده ۲۸۰ نانومتر) را در طیف جذبی می‌سازد در حالی که گذار L_b (در محدوده ۲۹۰ نانومتر) حساسیت کمتری به قطبیت محیط دارد اما به سادگی تحت تاثیر تغییرات انرژی ارتعاشی محیط قرار می‌گیرد (Strickland, 1974). مطالعات نشان داده‌اند که گراف جذبی L_a و تیروزین با یکدیگر تداخل دارند اما این امر برای L_b صدق نمی‌کند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که طیف اختصاصی تیروزین بدون تغییر است و از این رو تغییرات طیف L_a عمدتاً به تغییر قطبیت محیط اطراف تریپتوفان مربوط می‌شود (Gasymov *et al.*, 2008, Gasymov *et al.*, 2014, Strickland, 1974). با توجه به اینکه طیف‌های جذبی در محدوده L_b تقریباً بدون تغییراند به نظر می‌رسد که در نتیجه واکنش HRP با یون روی، تنها قطبیت میکرومحیطها تغییر کرده و این میانکنش تاثیری بر انرژی‌های ارتعاشی نداشته است. تغییرات ممان دو قطبی تریپتوفان برای برخی پروتئین‌های هم‌دار دیگر مانند بتا لاکتوگلوبولین نیز در نتیجه دناتوراسیون دمایی گزارش شده است (Halder *et al.*, 2012). همچنین وجود شیفت قرمز در گراف L_a گویای آن است که قطبیت میکرومحیط اطراف اسیدهای آمینه تریپتوفان افزایش پیدا کرده است (Mozo-Villar, 2002). بر اساس مطالعه Ghisaidoobe و همکارانش (2014)، تغییرات سطوح انرژی و ممان دو قطبی تریپتوفان به شدت به حالت گذار L_a وابسته است و بخش بزرگی از تغییرات فلورسانس ذاتی این اسید آمینه به این دسته از تغییرات دینامیک مربوط می‌شود (Ghisaidoobe *et al.*, 2014). مطالعات گذشته نشان داده‌اند که در فرایند دناتوراسیون و کاهش ساختار HRP، تریپتوفان بیشتر از سایر اسیدهای آمینه آروماتیک دخالت دارد. به نظر می‌رسد که این امر به دلیل نزدیکی این اسید آمینه به گروه پروستتیک هم در آنزیم باشد (Khan *et al.*, 2014).

بررسی دقیق‌تر وضعیت اسید آمینه با کمک طیف سنجی فلورسانس ذاتی گویای آن است که نشر فلورسانس تحت تاثیر تمامی غلظت‌های یون روی به شدت کاهش پیدا می‌کند. مطالعه آنزیم‌ها یا تکنیک فلورسانس نسبت به تکنیک‌های جذبی مانند CD مزایای بیشتری دارد که از آن جمله می‌توان به نسبت سیگنال به نویز بالاتر و یا حساسیت بیشتر سیگنال‌های فلورسانس به ویژگی‌های فیزیکی میکرومحیط‌های اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک (تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین) اشاره کرد. با توجه به طبیعت آبریز اسیدهای آمینه آروماتیک، بویژه تریپتوفان، این اسیدهای آمینه در نواحی مرکزی‌تر پروتئین قرار می‌گیرد و موقعیت فضایی آن تا زمان دناتوراسیون پروتئین به همین صورت باقی می‌ماند. با کمک محاسبه مشتق درجه دوم، طیف نشری فلورسانس ناشی از تریپتوفان به سه دسته پیک تقسیم می‌شود که عبارتند از کلاس I (۳۳۰ نانومتر)، کلاس II (۳۴۰ نانومتر) و کلاس III (۳۵۰ نانومتر). پیک کلاس I به فشردگی میکرومحیط‌های اطراف بستگی دارد و زمانی بروز می‌کند که میکرومحیطها کاملاً فشرده باشند (Abbas *et al.*, 2013). میانکنش تریپتوفان با اسیدهای آمینه قطبی سطحی و آب در پیک کلاس II دیده می‌شود ولی هنگامی که تریپتوفان به صورت کامل در تماس با آب محیط قرار می‌گیرد پیک کلاس III با شدت

خود را نشان می‌دهد و نسبت به پروتئین طبیعی شیفت قرمز پیدا می‌کند (Sun et al., 2010). آنزیم HRP سه کلاس خود را در ۳۲۸ نانومتر، ۳۴۱ نانومتر و ۳۵۱ نانومتر نشان می‌دهد. همانطور که در گراف ۲ دیده می‌شود، شدت نشر در هر سه طول موج کاهش داشته است اما کاهش نشر در کلاس I قابل توجه تر از سایر طول موجها است. چنین تغییرات ساختاری برای دناتوراسیون آنزیم HRP در حضور پراکسید هیدروژن نیز گزارش شده است (Ke et al., 2016). بر اساس این تحقیق ساختار سوم در محل اسید آمینه تریپتوفان دچار واسرشتگی جزئی شده و پیک کلاس I در طول موج ۳۲۹ نانومتر بیشتر از سایرین دستخوش تغییر شده است. لازم به ذکر است که در صورت واسرشتگی کامل آنزیم، یک یا دو کلاس از پیکهای مشتق درجه دوم در گراف حذف خواهند شد (Abbas et al., 2013). بر اساس مطالعات Sun و همکاران (۲۰۱۰)، این فرایند کاهش و شیفت λ_{max} در نشر فلورسانس، ناشی از میانکنش تریپتوفان با حلال قطبی می‌باشد (Sun et al., 2010). بررسی تغییرات فلورسانس اسید آمینه تریپتوفان در میانکنش آنزیم HRP با ماتریکسهای سول-ژل نیز نتایج فوق را تایید می‌کند (Ferrer et al., 2003). به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که در میانکنش HRP با فلز روی، ساختار آنزیم به صورت کامل واسرشته نشده است و تنها از شدت فشردگی ساختار در محل اسید آمینه تریپتوفان کاسته می‌شود. این یافته‌ها با نتایج سایر تحقیقات مبنی بر واسرشتگی ناقص HRP در حضور ترکیبات شیمیایی مختلف همخوانی دارد. نتایج تحقیقات Putrugal و همکاران (۲۰۰۶) نشان داده است که در اولترافیلتراسیون غشائی آنزیم HRP، میانکنش ترکیبات غشایی با گروههای آهن و کلسیم موجود در آنزیم، منجر به تغییرات ساختاری در محل اسید آمینه تریپتوفان و به دنبال آن کاهش فعالیت آنزیم می‌شود (Purtugal et al., 2006).

نتیجه‌گیری

آنزیم HRP یکی از آنزیمهای کلیدی در تنفس سلولی است که فعالیت آن به شدت تحت تاثیر یونهای فلزی قرار می‌گیرد. با کمک تهیه گرافهای مشتق درجه دوم از گرافهای اصلی اسپکتروفوتومتری این آنزیم در حضور فلز روی، میانکنش اسیدهای آمینه آروماتیک و نیز تغییرات میکرومحیطهای اطراف اسید آمینه تریپتوفان مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این تحقیق نشان داده است که یون روی فشردگی ساختار سوم آنزیم در محل اسیدهای آمینه آروماتیک را کاهش می‌دهد و این امر برای اسید آمینه تریپتوفان از سایر اسیدهای آمینه آروماتیک بیشتر است. بعلاوه در نتیجه میانکنش آنزیم با فلز روی، فشردگی میکرومحیطهای اطراف تریپتوفان کاهش پیدا می‌کند اما حتی با غلظت ۵۰۰ میکرو مولار روی، اسید آمینه تریپتوفان مستقیماً در معرض حلال آبدوست قرار نمی‌گیرد و آنزیم به صورت جزئی واسرشته می‌شود.

- Abbas SA., Gaspar G., Sharma VK., Patapoff TW., Kalonia D. (2013). Application of second-derivative fluorescence spectroscopy to monitor subtle changes in a monoclonal antibody structure. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102: 52-61.
- Atrooz PO., Manar A., Ibrahim A. (2016). Heavy Metals Effect on the Activity and Kinetics of Peroxidase Enzyme in Crude Extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Eruca sativa*. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 15:1-8.
- Chen EL., Chen YA., Chen LM., Liu ZH. (2002). Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(5) 439-444.
- Chudzik M., Macia M., ek-Jurczyk Z., Pawełczak B., Sułkowska A. (2016). Spectroscopic Studies on the Molecular Ageing of Serum Albumin. *Molecules*, 2017: 22, 34.
- Das TK., Mazumdar S. (1995). pH-Induced conformational perturbation in horseradish peroxidase. Picosecond tryptophan fluorescence studies on native and cyanide-modified enzymes. *European Journal of Biochemistry*, 227:823– 828.
- Dinh NN., Winn BC., Arthur KK., Gabrielson JP. (2014). Quantitative spectral comparison by weighted spectral difference for protein higher order structure confirmation. *Analytical Biochemistry*, 464:60-62.
- Ferrer ML., del Monte F., Mateo CR (2003) Denaturation and Leaching Study of Horseradish Peroxidase Encapsulated in Sol-Gel Matrices. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 26:1169–1172.
- Gasymov OK., Abduragimov AR., Glasgow BJ. (2008). Site-Directed Circular Dichroism of Proteins: 1Lb Bands of Trp Resolve Position- Specific Features in Tear Lipocalin. *Analytical Biochemistry*, 374:386 395.
- Gasymov OK., Abduragimov AR., Glasgow BJ. (2014). Probing Tertiary Structure of Proteins Using Single Trp Mutations with Circular Dichroism at Low Temperature. *Journal of Physical Chemistry*, B118: 986-995.
- Ghisaidoobe AB., Chung SJ. (2014). Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *International journal of molecular sciences*, 15(12), 22518–22538.

- Halder UC., Chakraborty J., Das N., Bose S (2012) Tryptophan dynamics in the exploration of micro-conformational changes of refolded β -lactoglobulin after thermal exposure: A steady state and time-resolved fluorescence approach, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 109:50-57.
- Ke Z., Ma S., Li L., Huang Q (2016) A fluorescence approach to the unfolding thermodynamics of horseradish peroxidase based on heme degradation by hydrogen peroxide. *Chemical Physics Letters*, 657:49–52.
- Khan AA., Rahmani AH., Aldebasi YH., Aly SM. (2014). Biochemical and pathological studies on peroxidases -an updated review. *Global journal of health science*, 6(5), 87–98.
- Kendrick BS., Gabrielson JP., Solsberg CW., Ma E., Wang L. (2020). Determining Spectroscopic Quantitation Limits for Misfolded Structures. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109:933-936.
- Kumar V., Sharma VK., Kalonia DS. (2005). Second derivative tryptophan fluorescence spectroscopy as a tool to characterize partially unfolded intermediates of proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 294:193–199.
- Lasagna M., Gratton E., Jameson DM., Brunet JE. (1999). Apo horseradish Peroxidase Unfolding and Refolding: Intrinsic Tryptophan Fluorescence Studies. *Biophysical Journal*, 76:443–450.
- Lopez GR., Pinto DC. (2014). Silva Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. *RSC Advances*, 4: 37244-37265.
- Lucas LH., Erosy BA., Kueltzo LE., Joshi., SB., Brandau DT. (2006). Probing protein structure and dynamics by Second - derivative ultraviolet absorption analysis of cation–p interactions. *Protein Science*, 15:2228–22.
- Mozo-Villar´A. (2002). Second derivative fluorescence spectroscopy of tryptophan in proteins. *Journal of Biochemistry and Biophysics Methods*, 50: 163–178.
- Hadizadeh Shirazi N (2019). Inhibition kinetic and thermal inactivation of horseradish peroxidase in the presence of Zn^{2+} ion. *Journal of Food Biochemistry*, e12724
- Hadizadeh Shirazi N., Keihan AM., Sajjadi S. (2017). Evaluation of oxidative activity of horseradish peroxidase in the presence of zinc ion; spectroscopic and molecular docking study. *New cellular and Molecular. Biotechnology Journal*, 27:47-54.
- Nayar S., Brahma A., Mukherjee C (2002) Second derivatives fluorescence spectra of indole compounds. *Journal of Biochemistry*, 131:427-435.

- Ohlsson PI., Horie T., Vanderkooi JM., Paul KG (1986) Tryptophan in horseradish peroxidase. *Acta Chemica Scandinavica part B*,;40(4):257-61.
- Saud AM., Shahnawaz Khan M., Alhasan IM. (2019). An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: Stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2):301-307.
- Sález-Jiménez V., Rencoret J., Rodríguez-Carvajal MA. (2016). Role of surface tryptophan for peroxidase oxidation of nonphenolic lignin. *Biotechnology and Biofuels*, 9:198-203.
- Sanchez KM., Gable JE., Schlamadinger DE., Kim JE. (2008). Effects of tryptophan microenvironment, soluble domain, and vesicle size on the thermodynamics of membrane protein folding: lessons from the transmembrane protein OmpA. *Biochemistry*, 47(48):12844-12852.
- Strickland EH. (1974). Aromatic Contributions to Circular Dichroism Spectra of Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry*, 2: 113-175.
- Sun F., Zong W., Liu R., Chai J., Liu Y. (2010). Micro environmental influences on the fluorescence of tryptophan. *Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 76:142–145.
- Thomas L., Poulos L. (2010). Thirty years of heme peroxidase structural biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500: 3–12.
- Vivian JT., Callis PR (2001) Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins, *Biophysical Journal*, 80(5): 2093-2109.
- Vlasits J., Jakopitsch Ch., Bernroither M., Zamocky M., Furtmüller P G. (2010). Heme peroxidases, mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500:74–81.
- Welinder K. (1979) .Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase Amino and Carboxyl Termini, Cyanogen Bromide and Tryptic Fragments, the Complete Sequence, and Some Structural Characteristics of Horseradish Peroxidase C. *European Journal of Biochemistry*, Y6:483-502.

**Evaluation of the aromatic amino acids microenvironments of zinc-denatured horseradish peroxidase;
second- derivatives spectra analysis**

M. R. Rajabi¹, N. Hadizadeh Shirazi^{2*}

Received:2020.11.30

Accepted:2021.2.15

Abstract

In the present study, the position of aromatic amino acids as important elements in the formation and stability of the tertiary structure of zinc-denatured peroxidase has been investigated with the help of second-derivative graph analysis of spectroscopic data. For this purpose, the second- derivative of absorption and emission graphs with 10 replications in the visible UV range of circular dichroism and fluorescence spectroscopy for the enzyme in the presence of 500-100 μM zinc chloride was prepared and studied with the help of MATLAB software. The results show that zinc ions reduce the compaction of microstructures around aromatic amino acids, especially for tryptophan. However, even at a concentration of 500 μM zinc, tryptophan is not directly exposed to the hydrophilic solvent. In general, tryptophan seems to be more important than other aromatic amino acids in inhibiting the enzyme by zinc metal.

Keywords: *Tryptophan, Tertiary Structure, Unfolding*

1- MSc student, Department of biology, Roudehen branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

2- Assistant professor, Department of biology, Roudehen branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

*(Corresponding author: nhadizade@riau.ac.ir)