مقاله تحقیقی

بررسی موقعیت هیستیدین های کوردینه کننده مس در ساختار دوم آنزیم تایروزیناز قارچ خوراکی

کمال الدین حق بین[1]، رابعه خوشنویس زاده[2،*]

۱. گروه بیوشیمی، پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

***مسئول مکاتبات:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین – پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین – پیشوا، ایران، آدرس الکترونیکی: r.khoshnevis@iauvaramin.ac.ir, biologybiophysics@gmail.com

محل انجام تحقیق: گروه بیوشیمی، پژوهشکده ملی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۸ تاریخ پذیرش:۹۵/۸/۱۱

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۰- شماره ۳- پاییز-۱۳۹۴

چکیده

درک نوع ساختار دوم باقیمانده های جایگاه فعال به توضیح مکانیسم آنزیم ها کمک می کند. آنزیم تایروزیناز قارچ خوراکی (MT) دارای دو اتم مس در جایگاه فعال است که توسط ۶ اسید آمینه هیستیدین کوردینه شده اند. با کمک روش های پیشگویی ساختار دوم و سوم و استفاده از اطلاعات ساختاری پروتئین های کریستالوگرافی شده هم خانواده با MT، پیشگویی نوع ساختار دوم هیستیدین ها به ترتیب زیر صورت پذیرفت. هیستیدین های مستقر در موقعیت های ۵۷، ۹۰،۲۵۴،۲۵۰ و ۲۸۲ دارای ساختار هلیکس بوده و ساختار کویل برای هیستیدین ۸۱ محتمل است.

واژه های کلیدی: تایروزیناز، قارچ خوراکی، پیشگویی ساختار، هیستیدین

مقدمه

تایروزیناز آنزیمی است که در تمام موجودات از باکتری‌ها تا جانداران عالی مثل انسان دیده می شود (۱). عملکرد مهم این آنزیم در ساخت ملانین است (۲) که با اکسایش ترکیبات فنلی به کوبینون اولین مرحله در مسیر تولید ملانین را تولید می کند. همین فرایند باعث سیاه شدگی میوه ها و محصولات کشاورزی می شود. از این رو کنترل فعالیت تایروزیناز از نظر اقتصادی اهمیت دارد (۶)، از نظر بالینی در بیماری هایی مثل ویتیلیگو و یا هایپرپیگمانتاسیون پوست از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۳). در مسیر شناسایی ویژگی های تایروزیناز از قارچ خوراکی بسیار استفاده شده است. مطالعات نشان داده است که این آنزیم در کنار آنزیم های کتکول اکسیداز و لاکیز در گروه پلی فنل اکسیدازها قرار می گیرد (۷). اطلاعات حاصل از مطالعات اسپکتروسکوپی رزونانس پارامغناطیس الکترونی، UV/Vis و رامان، تایروزیناز را به عنوان یک متالوآنزیم (۴) دارای اتم مس در مرکز جایگاه فعال، همانند هموسیانین بندپایان و نرمتنان معرفی می کند (۵) که قابل تیتراسیون در ولتاژ ثابت $E'_0 = ۰/۳۶$ V در pH =۷ است. تایروزیناز دو واکنش کرزولازی (فنلازی) و کتکولازی (پلی فنل اکسیدازی) را با انجام واکنش ارتوهیدروکسیلاسیون بر روی سوبسترای فنلی و سپس اکسیداسیون آن به مولکول کوبینون پیش می برد (۸). مطالعه بر روی وزن مولکولی و

تعداد زیرواحدهای تایروزیناز قارچ خوراکی نتایج مختلفی را نشان داده است (۹-۱۱).

در برخی مطالعات این آنزیم تک زیر واحد و در برخی دارای ۴ زیرواحد معرفی شده است. تا امروز ۵ ایزوزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) در قارچ خوراکی شناسایی شده است که ژن ایزوزیم PPO2 ، بیان کننده پروتئین تک زیرواحدی با جرم مولکولی 64000 دالتون، از طریق کلون کردن در سال ۲۰۰۳ توسط ویشر گزارش شد (۱۲). برای درک مکانیسم پروتئین ایزوزیم PPO2 (MT) در قارچ خوراکی به مطالعه ساختار جایگاه فعال، مخصوصا ۶ هیستیدین کوردینه کننده مس های موجود در جایگاه فعال، از طریق پروتئین های هم خانواده که ساختارشان معلوم شده است و همچنین بهره گیری از نرم افزارها و داده پایگاه های بیوانفورماتیکی پرداخته شد.

مواد و روش ها

در این مسیر از داده پایگاه اولیه UNIPROTKB برای دریافت مشخصات این پروتئین مثل اسید آمینه های کوردینه کننده مس ها استفاده شده است و از داده پایگاه های ثانویه PROSITE و BLOCK که به ارائه توالی های حفظ شده در طول تکامل می پردازد و ممکن است نقش ساختاری و یا عملکردی داشته باشد بهره گرفته شده است تا نواحی مهم MT پیدا شود. سپس از داده پایگاه های پیشگویی کننده ساختار دوم و یا سوم مثل ModBase, PHD، GOR، SOPMA و Hnn برای پیشگویی ساختار دوم توالی های مهم تایروزیناز استفاده شد. از پروتئین های هم خانواده با MT که ساختار آنها کریستالوگرافی شده بود نیز جهت پیشگویی ساختار بهره گرفته شد تا همه نتایج در کنار هم قرار گرفته و محتمل ترین ساختار دوم بدست اید. برای مشاهده ساختار سوم انواع پروتئین های کریستالوگرافی شده از نرم افزار PDBViewer استفاده شد.

نتایج

نتایج داده پایگاه UNIPROT

مشخصات این پروتئین در داده پایگاه UNIPROT (۱۴) با کد ۰۴۲۷۱۳ درج شده است. این پروتئین دارای ۵۵۶ اسید آمینه است که باقیمانده های هیستیدین ۵۷، ۸۱ و ۹۰ مس جایگاه Cu_A و باقیمانده های هیستیدین ۲۵۰ و۲۵۴ و ۲۸۲ یون مس جایگاه Cu_B را کوردینه می کنند.

نتایج داده پایگاه BLOCK

سایت BLOCK MAP (۱۵) چهار ناحیه همولوگ را در بین اعضای این خانواده نشان داد. در پروتئین ها بلاک ها مناطقی هستند که از نظر توالی آمینو اسیدی در طول تکامل بسیار حفظ شده اند. چهار بلاک A ,B ,C ,D در اعضای خانواده MT وجود دارد که بلاک A محل توالی جایگاه Cu_A و بلاک D محل جایگاه Cu_B می باشند.

(81) HGQVLFPTWHRTYLSVLE توالي بلاک A
(128) QPYWDW توالي بلاک B
(249) VHDDIHVMVGYG توالي بلاک C
(274) FDPIFWLHHTNVDRLLSLW توالي بلاک D

نتایج داده پایگاهINTERPRO

در داده پایگاه INTERPRO (۱۶) این خانواده با کد IPR002227 معرفی شده است. در اعضای این خانواده پروتئین های هموسیانین, پلی فنل اکسیداز و تایروزیناز قابل مشاهده است. در همین داده پایگاه MT در ابرخانواده ای که بر اساس شباهت قلمرو مرکزی دارای جایگاه Cu طبقه بندی شده, قرار گرفته است.ابر خانواده دارای قلمرو Cu با کد شناسایی IPR008922 است. لازم به ذکر است که اغلب اعضای یک خانواده از نظر توالی بیش از ۳۰٪ به هم شباهت داشته و رابطه تکاملی دارند. اما اعضای یک ابر خانواده علیرغم پایین بودن شباهت توالی, خصوصیات ساختاری و عملکردی منشا تکاملی مشترکی را برای آنها متصور می سازند

نتایج داده پایگاه PROSITE

در داده پایگاه PROSITE (۱۷) دو کد شناسایی برای MT معرفی شده است.

منطقه اول با کد شناسایی PR00497

H-X(4,5)-F-[L I V M F T P]-X-[F W]-H-R-X(2)-[L V M T]-X(3)-E

جایگاه دوم با کد شناسایی PR00498 به ترتب زیر است.

D-P-X-F-[L I V M F Y W]-X(2)-H-X(3)-D

نتایج داده پایگاه ModBase

در داده پایگاه ModBase (۱۸) بر اساس تشابه توالی بین پروتئین هایی که ساختار سوم آنها از طریق بلورنگاری معلوم شده با پروتئین هایی که ساختار سوم آنها مجهول است به پیشگویی ساختار سه بعدی می پردازد. ساختار سوم پیشگویی شده MT (شکل ۱) بر اساس الگوبرداری از پروتئین هموسیانین Rapana thomasiana است که تشابه توالی بین آنها ۲۴٪ بوده و توالی ۴-۳۰۱ هموسیانین را شامل می شود.

شکل ۱ - ساختار سوم پیشگویی شده MT توسط پایگاه بیوانفورماتیکی ModBase .

پیشگویی ساختار دوم بر اساس برنامه های مختلف

از طریق چندین الگوریتم ساختار دوم بلاک های تایروزیناز قارچ خوراکی پیشگویی شد تا ساختار دوم هیستیدین های کوردینه کننده مس ها که در این نواحی واقع شده اند آشکار شود. هر الگوریتم برای این هیستیدین ها پیشگویی داشته است که در جدول ۱ قابل مشاهده است (۱۹-۲۲).

از پروتئین های کریستالوگرافی شده و هم خانواده با تایروزیناز قارچ خوراکی مثل هموسیانین اختاپوس (جدول ۲)، آنزیم کتکول اکسیداز سیب زمینی (جدول ۳)، تایروزیناز استرپتومایسز (جدول ۴) و پروتئین حاصل از ایزوزیم PPO3 تایروزیناز قارچ خوراکی جهت بررسی ساختار دوم بلاک ها استفاده شد تا نوع ساختار دوم هیستیدین های کوردینه کننده مس ها در هر یک از آنها مشخص شود.

جدول ۱ - پیشگویی ساختار دوم ۴ بلاک MT توسط برنامه های Hnn، SOPMA، GOR4، ModBase و PHD

	باقیمانده ۵۷	بلاک A (۸۱-۹۸)	بلاک B (۱۳۳-128)	بلاک C (۲۴۹-۲۶۰)	بلاک D (۲۷۴-۲۹۲)
ترادف MT	H	**H**GQVLFPTW**H**RTYLSVLE	QPYWDW	V**H**DDI**H**VMVGYG	FDPIFWLHHTNVDRLLSLW
Hnn	C	**C**CCEECCCCC**C**CHHHHHHHH	CEEEEC	H**H**HHH**E**EEETCCC	CCCEEEEC**C**CCHHHHHHHH
SOPMA	C	**C**CCCCCHHHH**H**HHHHHHHH	CCCCHC	H**C**CCH**E**EEEECCC	HCHHHHHC**C**HHHHHHHHHH
GOR4	C	**C**CCEECCCCC**C**CHHHHHHH	CCCCCC	H**C**CC**E**EEEEECC	CCCHHHH C**C**CCCHHHHHHH
ModBase	E	**C**CCCHHHHHH**H**HHHHHHHH	CCCCCC	H**H**HHH**H**HHCCCC	CCCHHHHHH**H**HHHHHHHHH
PHD	C	**C**CCCCCHHHH**H**HHHHHHHH	CCCCCC	C**C**CHH**H**EECCCC	CCCCCCEH**H**HHHHHHHHHH

جدول ۲ - ساختار دوم بلاک های پروتئین کریستالوگرافی شده هموسیانین اختاپوس.

	بلاک A (۴۱-۵۸)	بلاک B (-۱۷۶ ۱۷۱)	باقیمانده ۱۷۷ (خارج از بلاک)	باقیمانده ۲۰۴ (خارج از بلاک)	بلاک C (۳۲۳-۳۳۴)	بلاک D (۳۵۶-۳۷۴)
ترادف هموسیانین	QPGAIFSCFHPDHLEEAR	AH**H**WHW	**H**	**H**	L**H**NWG**H**VTMARI	RDPIFYNW**H**RFIDNIFHEY
ساختار از برنامه DSSP	CCCCCCCCCCHHHHHHHH	HH**H**HHC	**H**	**H**	H**H**HHH**H**HHHCCC	CCCHHHHHH**H**HHHHHHHHH

خوشنویس زاده و حق بین

جدول ۳ - ساختار دوم بلاک های آنزیم کریستالوگرافی شده کتکول اکسیداز سیب زمینی.

	باقیمانده ۸۸ (خارج از بلاک)	بلاک A (۱۲۶-۱۰۹)	بلاک B (۱۴۵-۱۴۰)	بلاک C (۲۵۰-۲۳۹)	بلاک D (۲۸۴-۲۶۶)
کتکول اکسیداز ترادف	**H**	**H**NSWLFFPF**H**RWYLYFYE	LPFWNW	P**H**IPI**H**RWVGDP	RDIAFYCH**H**SNVDRMWTIW
ساختار از DSSP برنامه	H	EEECCHHHHHHHHHHHHH	CCCCCC	C**H**HH**H**HHHCCC	HCHHHHHH**H**HHHHHHHHH

جدول ۴ - ساختار دوم بلاک های پروتئین کریستالوگرافی شده تایروزیناز استرپتومایسز.

	باقیمانده38 (خارج از بلاک)	بلاک A (۷۵-۵۴)	بلاک B (۸۷-۸۳)	بلاک C (۱۹۸-۱۸۸)	بلاک D (۲۳۲-۲۰۹)
ترادف تایروزیناز استرپتومایسز	H	**H**RSPSFLPW**H**RRFLLDFE	LPYWDW	L**H**NRV**H**VWVGYG	NDPVFWLH**H**AYVDKLWAEW
ساختار ازDSSP	**H**	**C**CCCHHHHHH**H**HHHHHHHH	CCCCCC	C**H**HHH**H**HHHCCC	CCCHHHHHH**H**HHHHHHHHH

جدول ۵ - ساختار دوم بلاک های ایزوزیم PPO3 کریستالوگرافی شده قارچ خوراکی.

	باقیمانده ۶۱	بلاک A (85-102)	بلاک B (140- 145)	بلاک C (258-269)	بلاک D (288-306)
ترادفPPO3	H	**H**GTVLFPTW**H**RAYESTWE	QPFWDW	V**H**NTV**H**FLIGRD	FDPIFWMH**H**CNVDRLLALW
ساختار از برنامه DSSP	H	**C**CCCCHHHHH**H**HHHHHHHH	CCCCCC	H**H**HHHHH**H**HHCC	CCCCCHHH**H**HHHHHHHHH

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۰۱- شماره ۳- پاییز - ۱۳۹۴

بحث

در مطالعات پیشگویی ساختار جایگاه فعال، از داده پایگاه‌های مختلفی استفاده می شود که بر اساس الگوریتم-های ریاضی و نتایج مطالعات ساختار پروتئین های کریستالوگرافی شده و ترادف های اسید آمینه ای و یا اسید نوکلوئیکی به پیش بینی ساختار دوم و یا سوم ترادف های مجهول می پردازند. برخی از داده پایگاه ها با مقایسه انواع ترادف ها به قرابت ها و بخش های ساختاری و عملکردی مهم در ساختار پروتئین اشاره دارند.

داده پایگاه ثانویه BLOCK قسمت هایی از توالی MT که دارای همولوژی با دیگر پروتئین های موجود در داده پایگاه است، می پردازد یعنی از این طریق می توان پروتئین هایی را که دارای جد مشترک با MT است را شناسایی کرد. داده پایگاه BLOCK نشان داد که ۴ توالی در ترادف اسید آمینه ای MT وجود دارد که با بلاک های A تا D معرفی می‌شوند. موضوع قابل توجه آن است که از میان ۶ هیستیدین کوردینه کننده مس های جایگاه فعال ۵ تا آنها در بلاک ها قرار گرفته اند بدین ترتیب که هیستیدین های کوردینه کننده CuA موجود در موقعیت های ۸۱ و ۹۰ در بلاک A، هیستیدین ۲۴۹ و ۲۵۴ در بلاک C و هیستیدین ۲۸۲ در بلاک D هستند که سه هیستیدین اخری کوردینه کننده CuB می باشند. داده پایگاه PROSITE به ارائه توالی هایی از پروتئین می پردازد که نقش عملکردی داشته باشد مثل جایگاه فعال. برای MT دو ترادف که بیانگر دو منطقه ساختاری دارای عمکرد خاص است معرفی شده است ترادف اول مربوط به جایگاه CuA و ترادف دوم مربوط به CuB است این دو ناحیه منطبق با دو بلاک A و D هستند که ۳ هیستیدین کوردینه کننده مس ها را در بر دارند. این نتایج نشان می دهد بلاک های A و D دارای توالی حفظ شده و عملکردی هستند که در موقعیت جایگاه فعال قرار می گیرند. بقیه پروتئین های هم خانواده نیز همین ویژگی را دارند یعنی شباهت های توالی و ساختاری در آنها وجود دارد از این رو پروتئین های کریستالوگرافی شده در این خانواده راهنماهای خوبی برای پیشگویی ساختار دوم هیستیدین های کوردینه کننده هستند بطوریکه مطالعات Decker برای فعال سازی مصنوعی هموسیانین ها نشان داد که موقعیت اسید آمینه های اثرگذار در جایگاه فعال این خانواده پروتئینی شباهت زیادی به هم دارند (۱۳). بررسی ساختار دوم هیستیدین های کوردینه کننده پروتئین های کریستالوگرافی شده هموسیانین اختاپوس (Hc) ، کتکول اکسیداز سیب زمینی (IbCo) ، تایروزیناز استرپتومایسز(ST)، محصول ایزوزیم PPO3 تایروزیناز قارچ خوراکی(PPO3) که هم خانواده با MT هستند نشان داد (جداول ۵-۲) که شباهت ها و تفاوت هایی بین آنها وجود دارد که در زیر به آنها اشاره شده است:

۱) هر ۶ هیستیدین کوردینه کننده یون های مس MT همانند Hc، IbCO، ST و PPO3 در دمین مرکزی پروتئین قرار دارند.

۲) در MT همانند IbCO، PPO3 و ST اولین هیستیدین لیگاندی جایگاه Cu_A در خارج از بلاک ها قرار می گیرد. اما ۵ هیستیدین کوردینه ایی دیگر در داخل بلاک ها هستند.

۳) بلاک B پروتئین MT همانند PPO3، IbCO و ST فاقد هیستیدین لیگاندی است.

۴) دومین و سومین هیستیدین لیگاندی در هر چهار پروتئینPPO3 ، MT، IbCO و ST دقیقاً در مکان های ۲ و ۱۰ بلاک A و چهارمین و پنجمین هیستیدین مکان های ۲ و ۶ بلاک C قرار می گیرند.

۵) در بلاک های C و D پروتئین MT همانندPPO3، Hc، IbCO و ST بترتیب دو و یک هیستیدین لیگاندی قرار دارد. اما در Hc هر ۶ هیستیدین لیگاندی بر روی ساختمان های آلفا-هلیکسی قرار گرفته اند. در پروتئین هایPPO3، IbCO و ST نیز بجز یکی از هیستیدین های لیگاندی در جایگاه Cu_A که دارای ساختاری غیر از هلیکس است بقیه بر روی ساختمان آلفا-هلیکسی جای دارند.

در داده پایگاه Modbase پروتئین Rapana thomasiana بعنوان الگوی ساختاری مناسب جهت پیشگویی ساختار سوم MT قرار گرفته و ساختار سوم آن بازسازی شده است که بغیر از دو هیستیدین اول، نوع ساختار دوم هیستیدین های کوردینه کننده مس ها، هلیکس معرفی شده است.

از طریق داده پایگاه هایی که بر اساس الگوریتم های PHD، GOR، HNN و SOPMA به پیشگویی ساختار دوم پروتئین ها می پردازند توالی مناطق بلاک MT بررسی

شد که تقریبا در سه روش GOR، HNN و SOPMA بیشتر هیستیدین ها را در ساختار کویل پیش بینی کرده اند (جدول ۱)، اما در روش PHD که الگوریتم قوی تری است هیستیدین های سوم، پنجم و ششم را در ساختار هلیکس پیشگویی کرده است.

با کنار هم قرار دادن انواع پیش بینی ها درباره نوع ساختار دوم هیستیدین های کوردینه کننده مس ها می توان به این جمع بندی رسید که بر اساس شباهت های ساختاری بین پروتئین های هم خانواده به احتمال زیاد به غیر از دومین هیستیدین بقیه هیستیدین ها ساختار هلیکس داشته که هیستیدین های چهارم و پنجم بر روی یک هلیکس قرار گرفته اند این نتیجه به پیشگویی برنامه های PHD و ModBase نزدیک تر است و به نظر میرسد روش های قوی تر برای پیشگویی ساختار هستند.

تقدیر و تشکر

از پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری برای همکاری در انجام این تحقیق قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

1. Lerch, K., 1981. Copper monooxygenases: tyrosine and dopamine b-monooxygenase. Met Ions Biol Syst 13: 143-186.
2. Korner, A., Pawelek, J., 1982. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. Science 17: 1163-1165.
3. Vamos-Vigyazo, L., 1995. Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables: a review of principles and practice. Lee, C.Y., Whitaker, J.R (Eds.), Enzymatic Browning and its Prevention, ACS Symposium Series 600. American Chemical Society, Washington, DC, American chemical society 49–62.
4. Baharav, E., Merimski, O., Shoenfeld, Y., Zigelman, R., Gilbrud,B., Yecheskel, G., Youinou, P., Fishman, P., 1996. Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. Clin Exp Immunol 105: 84-88.
5. Mayer, A.M., 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. Phytochemistry 67 (21): 2318-2331.
6. Solomon, E. I., Michael, D. L., 1993. Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. Science 259: 1575-1581.
7. Lerch, K., 1987. Molecular and active site structure of tyrosinase. Life Chemistry Reports 5: 22-28.
8. Gregg, D. C., Nelson, J. M., 1940. The action of tyrosinase on hydroquionone. J Am Chem Soc 62: 2510-2521.
9. Kertész, D., Romano, Z., 1957. Polyphenoloxidase (Tyrosinase): Purification and Molecular Properties. Nature 179: 1017-1018.
10. Bouchilloux, S., Mcmahill, P., Mason, H. S., 1963. The multiple forms of mushroom tyrosinase. J Biol Chem 238(5):1699-1706.
11. Strothkamp, K. G., Jolley, R. L., Manson, H. S., 1976. Quaternary structure of mushroom tyrosinase. Biochem Biophys Res Comm 70(2): 519-530.
12. Wichers, H. J., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C. E. M., Biancone, G., Hoeberichts, F. A., Mooibroek, H., Soler-Rivas. C., 2003. Cloning, expression and characterization of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. Appl Microbiol Biotechnol 61: 336–341.
13. Decker, H., Tuczek, F., 2002. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. Trends Biochem Sci 25 (8): 392-397.
14. http://www.uniprot.org/
15. http://blocks.fhcrc.org
16. http://prosite.expasy.org/
17. http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/index.cgi
18. https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html
19. https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_phd.html
20. https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html
21. https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html