DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.10.9

بررسی تأثیر مشتقات ۲-هیدروکسی ۱و۴- نفتوکوئینون بر روی ساختار و عملکرد آنزیم کاتالاز

سیمین خطایی[۱]، غلامرضا دهقان[۱*]، سمانه رشتبری[۱] و مهرداد ایرانشاهی[۲]

[۱] ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست شناسی جانوری

[۲] ایران، مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۱۲

چکیده

کاتالاز، به عنوان یک آنزیم آنتی اکسیدان مهم، سلولها را در مقابل اثرات مخرب پراکسید هیدروژن محافظت می‌کند. ۲-هیدروکسی ۱و۴-نفتوکوئینون یکی از مشتقات نفتوکوئینون‌هاست که دارای فعالیتهای بیولوژیکی و دارویی گسترده از جمله اثرات ضد سرطانی و ضد باکتریایی می‌باشد. در این مطالعه، میانکنش مشتقات ۲-هیدروکسی ۱و۴-نفتوکوئینون (ANQ و BNQ) با آنزیم کاتالاز کبد گاوی، به صورت تجربی و تئوری مورد بررسی قرار گرفت و اثرات این ترکیبات در ساختار و عملکرد آنزیم کاتالاز با استفاده از اسپکتروسکوپی مرئی-فرابنفش، فلورسانس، طیف سنجی مادون قرمز و شبیه سازی مولکولی مطالعه شد. داده‌های سینتیکی و پارامترهای ترمودینامیکی نشان دادند که این ترکیبات از طریق مهار مخلوط و رقابتی باعث کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شوند. نتایج مطالعات فلورسانس آنزیم در حضور غلظتهای مختلف ترکیبات نشان داد که فلورسانس ذاتی آنزیم در حضور این ترکیبات با مکانیسم استاتیک خاموش می‌شود. همچنین مطالعات شبیه سازی مولکولی در تأیید یافته‌های تئوری نشان داد که تنها یک جایگاه اتصال برای ترکیبات مورد نظر بر روی آنزیم کاتالاز وجود دارد. با توجه به اهمیت بیولوژیکی و نقش دوگانه آنزیم کاتالاز، مطالعه تأثیر ترکیبات مختلف بر روی فعالیت و ساختار آنزیم کاتالاز می‌تواند حائز اهمیت باشد. چرا که استفاده بیش از حد این ترکیبات در داروهای مختلف می‌تواند باعث ایجاد اثرات جانبی شده و تهدیدکننده سلامت انسان باشد.

واژهای کلیدی: کاتالاز کبد گاوی؛ نفتوکوئینون؛ مهار مخلوط؛ مهار رقابتی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۳۳۹۲۷۱۶ ، پست الکترونیکی: dehghan2001d@yahoo.com

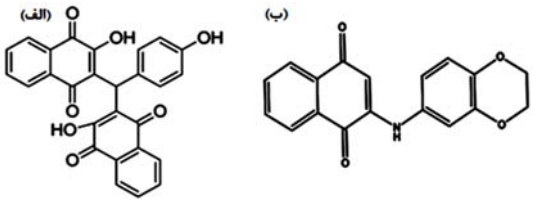
مقدمه

کاتالاز به عنوان مهم‌ترین آنزیم آنتی‌اکسیدانی نقش اساسی در کنترل غلظت هیدروژن پراکسید و دیگر مشتقات سمی اکسیژن دارد. این آنزیم به عنوان فاکتور مهم در پروسه‌های مختلف از جمله التهاب و جهش زایی نقش اساسی ایفاء می‌کند و کمبود آن منجر به بروز بیماریهایی چون دیابت، آلزایمرو بیماریهای مجاری ادراری می‌شود. در برخی از سرطانها مانند سرطان کبد کاهش آنزیم کاتالاز مشاهده می‌شود در حالی‌که در برخی دیگر، از جمله سرطان پستان، سلولهای سرطانی با افزایش بیان آنزیم کاتالاز از القای آپوپتوز در سلولهای بنیادی سرطان جلوگیری می‌کنند که بیانگر نقش دوگانه کاتالاز در این بیماری می‌باشد. مطالعات مختلف در رابطه با نقش آنزیم کاتالاز در سرطانهای مختلف بیانگر این می‌باشد که استفاده از مهارکننده‌های مختلف این آنزیم در درمان سرطانهای مختلف با افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن‌دار در سلولهای سرطانی و القای آپوپتوز در آنها از اهمیت بالایی

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.10.9

برخوردار است (۱۰). بنابراین معرفی ترکیباتی که تأثیر مهاری بر روی این آنزیم دارند در درمان این بیماریها می-توانند اهمیت داشته باشند. کبد به عنوان یک اندام بسیار مهم در بدن نقش بحرانی در سم‌زدایی و متابولیزه کردن ترکیبات مختلف دارد. لذا مطالعه تأثیر ترکیبات و داروهای مختلف بر روی ساختار و عملکرد فراوان‌ترین آنزیم این عضو، حائز اهمیت می‌باشد (۱۰ و ۱۳). کاتالاز کبد گاوی، به عنوان یک مدل آنتی‌اکسیدانی، در اکثر مطالعات برای بررسی تأثیر داروها و ترکیبات مختلف استفاده می‌شود.

هیدروکسی نفتو کوئینون مشتقی از خانواده نفتوکوئینون-هاست که با توجه به موقعیت گروه هیدروکسیل، ایزومرهای متفاوتی از جمله ۲-هیدروکسی ۱و۴-نفتوکوئینون ایجاد می‌شود. این ترکیبات دارای خاصیت آنتی اکسیدانی، ضد قارچی و ضد باکتریایی می‌باشد و لذا در درمان بعضی بیماریها مورد استفاده قرار می گیرد (۳ و ۵). با تغییر گروههای عاملی مشتقات مختلفی از این ترکیبات شناسایی و سنتز شده‌اند. در مطالعه حاضر تأثیر دو مشتق سنتزی 3,3′((4 hydroxyphenyl)methylene bis(2hydroxynaphthalene-1,4dion) و ((2,3 dihydrobenzo[1,4]dioxon-6)amino)naphthalene-1,4-dion که به ترتیب بیس نفتوکوئینون(BNQ) و آمینو نفتوکوئینون (ANQ) خوانده می شوند (۱۱) بر روی فعالیت و ساختار آنزیم کاتالاز مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۱ (الف و ب) ساختار شیمیایی BNQ و ANQ را نشان می‌دهند.



شکل ۱- ساختار شیمیایی (الف) BNQ و (ب) ANQ

با توجه به اینکه این ترکیبات در صنایع مختلف از جمله صنایع دارویی و غذایی دارای کاربردهای متنوعی می‌باشد، لذا مطالعه تأثیر این ترکیبات بر روی ماکرومولکولهای زیستی مهم مثل آنزیم کاتالاز که نقش کلیدی در فرآیندهای زیستی موجودات دارد، می‌تواند مفید باشد.

مواد و روشها

مطالعات سینتیک آنزیم: به منظور سنجش فعالیت کاتالاز از روش اسپکتروفوتومتری مرئی-فرابنفش استفاده شد. در این روش از طریق ثبت تغییرات جذب سوبسترا (H_2O_2) در واحد زمان، میزان فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. سرعت شکسته شدن و کاهش جذب H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر در واحد زمان به عنوان واحد فعالیت آنزیم کاتالاز در نظر گرفته شد (۱۲). آزمایش در کووتهایی با حجم ۳ میلی لیتر در حضور آنزیم کاتالاز کبد گاوی با غلظت ۴ نانومولار و غلظتهای افزایشی H_2O_2 انجام شد. تمامی سنجشهای مربوط در مطالعه حاضر در حضور بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷ اندازه‌گیری شدند. برای مطالعه تأثیر ترکیبات مورد نظر بر روی فعالیت کاتالاز، غلظت بهینه آنزیم (۴nM) با غلظتهای مختلف از این ترکیبات، BNQ (۰- ۷/۳ میکرومولار) و ANQ (۰- ۱۰/۸ میکرومولار) به صورت جداگانه برای مدت سه دقیقه انکوبه شد. برای شروع واکنش، غلظت بهینه پراکسید هیدروژن (۵۵/۵ mM) مورد استفاده قرار گرفت. در این مرحله با توجه به کاهش فعالیت آنزیم در حضور غلظتهای مختلف ترکیبات، مقدار IC_{50} برای هر سه ترکیب از روی معادله خط حاصل، محاسبه شد (۲۷).

مطالعه تغییرات ساختار آنزیم: برای بررسی تأثیر ترکیبات مورد نظر بر روی حداکثر نشر ذاتی و ساختار آنزیم کاتالاز از طیف سنجی فلوئورسانس در طول موج تحریکی ۲۸۰ نانومتر استفاده شد و تغییرات نشر آنزیم در دو دمای مختلف ۲۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در حضور غلظتهای مختلف ترکیبات در محدوده ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر بررسی شد (۲۶).

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.10.9

طیف سنجی مادون قرمز (ATR-FTIR) بر اساس جذب تابش و بررسی جهشهای ارتعاشی مولکولها صورت می-گیرد (۷). برای مطالعه تأثیر BNQ و ANQ بر روی ساختار دوم آنزیم کاتالاز کبد گاوی و ویژگی تعامل پروتئین-لیگاند ، طیف ATR-FTIR آنزیم در حضور و عدم حضور این ترکیبات در محدوده cm^{-1} ۱۲۰۰-۱۸۰۰ ثبت شد و تغییرات مربوط به پیوندهای آمیدی بررسی شد.

مطالعات تئوری: شبیه سازی داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار Autodock 4.2 جهت تعیین محل دقیق اتصال ترکیبات بر روی آنزیم کاتالاز کبد گاوی استفاده شد. برای این منظور ابتدا ساختار ورودی داکینگ شامل ساختار کریستالی آنزیم از بانک اطلاعاتی پروتئین - RCSB PDB (1TGU) دانلود و ذخیره شد. ساختار لیگاندها با استفاده از نرم افزار GaussView 3.0 رسم شد و بهینه سازی انرژی لیگاند انجام گرفت. داکینگ مولکولی با تمرکز بر روی محل اتصال اصلی، با Grid box و spacing مناسب، انجام گرفت. کمپلکسی که دارای کمترین انرژی اتصالی بود، برای مراحل بعدی شبیه سازی و مطالعه با نرم افزار Chimera انتخاب شد (۶، ۱۲ و ۱۴).

نتایج

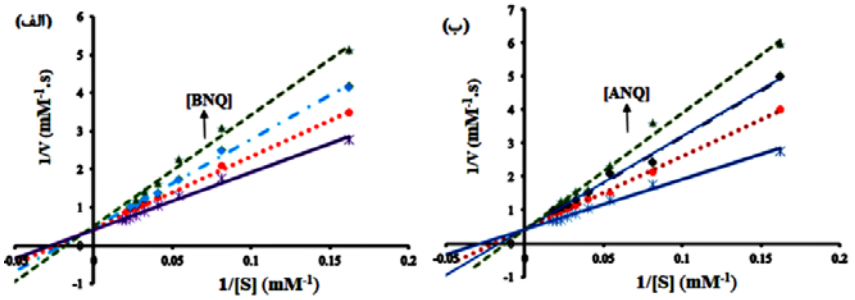
مطالعات سینتیکی: فعالیت آنزیم کاتالاز (۴ نانومولار) با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه-گیری شد و سرعت فعالیت آنزیم از روی شیب خط مماس بر منحنی تغییرات جذب سوبسترا در مقابل زمان محاسبه شد (۱۹). سپس نمودارهای میکائیلیس-منتن و لاینویور-برک رسم شد. نتایج نشان داد که به تدریج با افزایش غلظت سوبسترا، از غلظت ۵ تا ۵۵/۵ میلی مولار، فعالیت آنزیم کاتالاز به صورت خطی افزایش می‌یابد. اما در غلظتهای بالاتر از ۵۵/۵ میلی مولار، روند کاهشی برای فعالیت آنزیم مشاهده شدکه توجیه کننده پدیده مهار آنزیم توسط سوبسترا است (۱۲ و ۱۸). مطالعات نشان داده‌اند که پراکسید هیدروژن در غلظتهای بالا باعث مهار آنزیم از طریق تشکیل کمپلکس II (فرم غیر فعال کاتالاز) می‌شود (۱۴ و ۲۶). به منظور تعیین مقدار دقیق پارامترهای سینتیکی (K_m و V_{max})، از معادله (۱) و منحنی لاینویور-برک استفاده شد (۱۹).

$$\frac{1}{V_{\max}} = \frac{k_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \qquad (۱)$$

مقادیر K_m، V_{max} و برای آنزیم آزاد، به ترتیب ۳۵/۹ mM و ۲/۴ $mM^{-1}.S$ محاسبه شد. برای بررسی تأثیر BNQ و ANQ، بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز، ابتدا فعالیت آنزیم در حضور غلظتهای مختلف از این ترکیبات و غلظت بهینه‌ی پراکسید هیدروژن (۵۵/۵ میلی مولار) سنجش شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت ترکیبات، یک روند کاهشی در میزان فعالیت کاتالاز اتفاق می‌افتد و در نهایت باعث مهار فعالیت آنزیم می‌شود. با توجه به معادله خط حاصل از این نمودارها، مقادیر IC_{50} مربوط به آنزیم کاتالاز در حضور BNQ و ANQ به ترتیب ۵/۰۴μM و ۸/۴۵μM به دست آمد. IC_{50} غلظتی از مهارکننده می‌باشد که باعث مهار ۵۰ درصد از فعالیت آنزیم می‌شود. مهار برگشت پذیر به انواع رقابتی، نارقابتی، غیررقابتی و مخلوط تقسیم بندی می‌شود (۱۸). برای بررسی مکانیسم مهار آنزیم کاتالاز توسط BNQ و ANQ، نمودار لاینویور -برک فعالیت آنزیم در حضور غلظتهای ثابت این ترکیبات یعنی $1/2IC_{50}$، IC_{50} و $2IC_{50}$ و غلظتهای افزایشی سوبسترا، رسم شد (شکل ۲الف و ب) و پارامترهای سینتیکی برای هر ترکیب تعیین گردید. مقایسه مقادیر پارامترهای سینتیکی آنزیم تیمار نشده با پارامترهای سینتیکی به دست آمده از آنزیم در حضور ترکیبات مورد نظر، نوع مهار تعیین شد. با توجه به کاهش V_{max} و افزایش K_m در حضور غلظتهای افزایشی BNQ، این ترکیب به عنوان مهارکننده مخلوط آنزیم کاتالاز عمل می‌کند و می‌تواند به جایگاهی مجزا از جایگاه اتصال سوبسترا، به آنزیم آزاد و یا به کمپلکس آنزیم سوبسترا متصل شود (۱۷). ترکیب ANQ به عنوان مهار کننده رقابتی

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.10.9

آنزیم کاتالاز عمل می‌کند چرا که V_{max} آنزیم در حضور این ترکیب ثابت و K_m آن افزایش می‌یابد. لذا اتصال هرکدام از ترکیبات هیدروژن پراکسید و یا ANQ از اتصال دیگری جلوگیری خواهد کرد. ANQ برای مهار رقابتی کاتالاز باید به جایگاه اتصال سوبسترا یا جایگاهی نزدیک به جایگاه فعال آنزیم متصل شود و از اتصال سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم جلوگیری کند (۱۴).



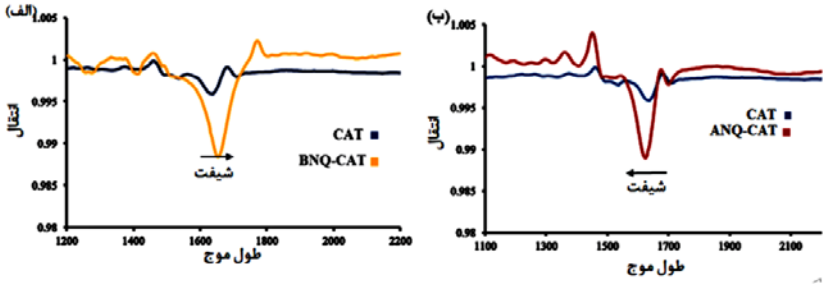
شکل ۲- (الف) نمودار لاینوویور-بورک کاتالاز درغیاب و حضور غلظتهای مختلف BNQ (۰، ۲/۵۲، ۵/۰۴ و ۱۰/۰۸ میکرومولار) و (ب) غلظتهای مختلف ANQ (۰، ۴/۲۲، ۸/۴۵ و ۱۶/۹ میکرومولار)

مطالعات ساختاری: تکنیک فلوئورسانس روشی رایج جهت بررسی تغییرات ساختار سوم پروتئینها در اثر اتصال به یک لیگاند می‌باشد. به دلیل وجود اسیدآمینه‌های آروماتیک در ساختار پروتئینها، این ترکیبات دارای فلوئورسانس ذاتی هستند (۴). در مطالعه حاضر، برای بررسی تغییرات در طیف نشری کاتالاز در حضور غلظتهای مختلف ترکیبات، از طول موج تحریکی ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. نتایج نشان داد که این ترکیبات با آنزیم میانکنش دارند و با افزایش غلظت هر دو ترکیب مورد نظر خاموش سازی فلوئورسانس اتفاق می‌افتد. فرآیند خاموش‌سازی از طریق دو مکانیسم استاتیک و یا دینامیک انجام می‌گیرد (۲۰ و ۲۱). خاموش سازی استاتیک با افزایش دما کارایی خود را از دست می‌دهد و ثابت خاموش سازی استاتیک کاهش می‌یابد، در حالی که در خاموش سازی دینامیک افزایش دما باعث افزایش برخوردهای خاموش ساز و فلوروفور می‌شود (۸ و ۲۸). با استفاده از معادله و منحنی استرن-ولمرمقادیر K_{sv} و K_q محاسبه شد(جدول ۱) و از روی تغییرات آن نوع خاموش سازی مشخص شد. با توجه به کاهش مقادیر K_{sv} یا K_q با افزایش دما، مکانسیم خاموش سازی آنزیم توسط ترکیبات از نوع استاتیک تعیین شد (۱۹).

طیف مادون قرمز پروتئینها با مشاهده پیکهای مربوط به گروههای آمیدی خصوصاً باند آمید I مطالعه می‌شود که معمولاً در محدوده $1600 cm^{-1}$ تا $1700 cm^{-1}$ ظاهر می‌شود. باند آمید I با ۸۰ درصد ارتعاشات کششی C=O که متصل به N-H خمشی داخل صفحه‌ای و کششی C-N می‌باشد، شناسایی می‌شود. پیک آمید II که ۶۰ درصد آن از گروههای خمشی N-H و ۴۰ درصد دیگر آن از گروههای کششی C-N تشکیل شده است و در ناحیه $1500 cm^{-1}$ تا $1600 cm^{-1}$ قرار می‌گیرد، با ساختمان دوم پروتئینها ارتباط دارد (۷). تغییر در پیک مربوط به آمید I در محدوده‌های عدد موجی $1645-1620 cm^{-1}$، $1645-1652 cm^{-1}$ ، $1652-1662 cm^{-1}$ و $1662-1690 cm^{-1}$ به ترتیب نشان‌دهنده تغییرات صفحات بتا، پیچه‌های نامنظم، مارپیچ آلفا و دوربرگردان (turn) می‌باشد (۸). بررسی طیف مادون قرمز آنزیم نشان داد که ساختار دوم آنزیم کاتالاز در حضور این ترکیبات تغییر می‌کند. همان طور که در شکل ۳ الف قابل مشاهده است، حضور BNQ (۵ میکرومولار) باعث می‌شود پیک FTIR آنزیم از ناحیه $1637/5 cm^{-1}$ به عدد

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.10.9

موج cm^{-1} ۱۶۶۰/۶ منتقل شود. این نتایج حاکی از آن است که در حضور BNQ تغییرات ساختاری آنزیم به صورتی است که بیشتر ساختار مارپیچ آلفا را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از طرفی BNQ باعث ایجاد تغییراتی در آمید II نیز می‌شود. ترکیب ANQ بیشترین تأثیر را بر روی ساختار صفحات بتا دارد. چرا که پیک FTIR کاتالاز از ناحیه cm^{-1} ۱۶۳۷/۵ به ناحیه cm^{-1} ۱۶۲۴/۰۱ منتقل می‌شود. با توجه به شکل ۳ب، ANQ نیز همانند BNQ در طیف ناحیه مربوط به آمید II تغییراتی ایجاد می‌کند. این نتایج نشان می‌دهد که BNQ و ANQ ، نه تنها ارتعاشات کششی گروه C=O در تنه اصلی پروتئین، بلکه ارتعاشات کششی N-C و ارتعاشات خمشی H- N را نیز تغییر می‌دهند (۷ و ۹ و ۲۹).



شکل ۳- طیف FTIR کاتالاز (الف) در حضور غلظتهای افزایشی ANQ، (ب) در حضور غلظتهای افزایشی ANQ

در مطالعات ترمودینامیکی برای محاسبه پارامترهای اتصال از جمله تعداد جایگاههای اتصال (n) و ثابت اتصال (K)، از معادله (۲) استفاده گردید (۱۶).

$$\log\frac{F_0 - F}{F} = \log K + n\log[Q] \qquad (۲)$$

در این معادله نمودار $\log\frac{F_0-F}{F}$ در مقابل $\log[Q]$ یک نمودار خطی می‌باشد که شیب آن نشان دهنده‌ی n (تعداد جایگاه اتصال) و عرض از مبدأ نیز نشان‌دهنده $\log K_a$ می‌باشد که از روی آن می‌توان K ، ثابت اتصال را محاسبه نمود (۲۶).

به‌طورکلی نیروهای برهمکنش ازجمله پیوند هیدروژنی، واندروالسی، تعاملات الکترواستاتیک و برهمکنشهای آب-گریز ممکن است بین لیگاندهای کوچک و ماکرومولکولهای زیستی وجود داشته باشد. پارامترهای ترمودینامیکی از جمله تغییرات آنتالپی (ΔH) ، تغییرات آنتروپی (ΔS) و تغییرات انرژی آزاد گیبس (ΔG) نقش مهمی در تعیین روشهای مختلف اتصال دارند. مقادیر این پارامترها با استفاده از فرمولهای ۳، ۴، ۵ قابل محاسبه می‌باشد (۴ و ۱۵).

$$\ln\frac{K_2}{K_1} = \frac{-\Delta H}{R}\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right) \qquad (۳)$$

$$\Delta G = -RT\ln K \qquad (۴)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (۵)$$

در این معادله‌ها K ثابت اتصال در دمای مربوطه و R ثابت عمومی گازها می‌باشد. نوع برهمکنش بین ماکرومولکول و لیگاند، با استفاده از علامت و مقدار پارامترهای ترودینامیکی مشخص می‌شود. به طوری که اگر $\Delta H > ۰$ و $\Delta S > ۰$ باشند، برهمکنشهای آبگریز نقش عمده‌ای در واکنش اتصال دارند، اگر $\Delta H < ۰$ و $\Delta S < ۰$ باشند، برهمکنشهای واندروالسی و پیوندهای هیدروژنی در میانکنش بین ماکرومولکول و لیگاند غالب خواهند بود و همچنین $\Delta H < ۰$ و $\Delta S > ۰$ نشان دهنده غالب بودن برهمکنشهای الکترواستاتیک می‌باشد (۲۱). نتایج (جدول ۱) نشان می‌دهد BNQ و ANQ تنها یک جایگاه اتصال بر

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.10.9

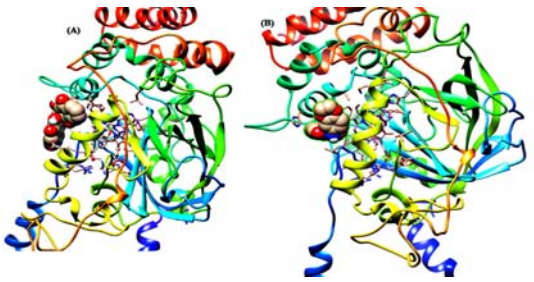
روی آنزیم کاتالاز دارند. مقادیر K و n برای کمپلکس آنزیم–BNQ با افزایش دما کاهش می‌یابند، که نشان می‌دهد در دماهای بالا کمپلکس ناپایداری تشکیل می‌شود که ممکن است به صورت جزئی از هم پاشیده شوند. با توجه به اینکه علامت ΔH و ΔS در حضور BNQ منفی می‌باشد، بنابراین در تشکیل کمپلکسهای آنزیم–BNQ برهمکنشهای واندروالسی و پیوندهای هیدروژنی بیشترین تأثیر را دارند (۱۸ و ۱۹). مطالعات ترمودینامیکی مربوط به کمپلکس ANQ–کاتالاز نشان داد که با افزایش دما مقادیر n و K نیز افزایش می‌یابد لذا با افزایش دما کمپلکس پایدار از آنزیم و ANQ تشکیل می‌شود. پارامترهای ترمودینامیکی (جدول ۱) نشان داند که برهمکنشهای آبگریز نقش عمده‌ای در تشکیل کمپلکس آنزیم–ANQ ایفاء می‌کند، چرا که علامت ΔH و ΔS هر دو مثبت می‌باشند. منفی بودن علامت ΔG نشان می‌دهد که تشکیل کمپلکس بین آنزیم–ANQ همانند BNQ خودخودی می‌باشد (۱۶). مثبت بودن علامت ΔH حاکی از گرماگیر بودن واکنش می‌باشد (۱۸).

جدول ۱– پارامترهای ترمودینامیکی و ثابتهای اتصال کمپلکس BNQ –کاتالاز و ANQ –کاتالاز در دو دمای مختلف.

ترکیب	دما(ºC)	N	K_{SV} ($\times10^5 M^{-1}$)	K_q ($\times10^{13} M^{-1} s^{-1}$)	K ($\times10^4 M^{-1}$)	ΔG ($kJmol^{-1}$)	ΔH ($kJmol^{-1}$)	ΔS ($JK^{-1}mol^{-1}$)
BNQ-CAT	۲۵	۱	۳/۸	۳/۸	۳۳/۶	−۳۱/۵۲	−۱۶۲/۴	−۴۳۹/۲
	۳۷	۰/۸	۳/۱	۳/۱	۲/۶	−۲۶/۲۵		
ANQ-CAT	۲۵	۰/۸	۲/۳	۲/۳	۳	−۲۵/۵۹	+۸۷/۲۳	+۳۷۸/۵۹
	۳۷	۰/۹	۱/۹	۱/۹	۱۲	−۳۰/۱۴		

مطالعات تئوری: شبیه سازی داکینگ مولکولی با پیش‌بینی اتمهای درگیر در برهمکنش و موقعیت اتصال لیگاند به ماکرومولکول، اطلاعاتی درباره مکانیسم اتصال ترکیبات مختلف فراهم می‌کند و از این رو می‌تواند نتایج به دست آمده از کارهای آزمایشگاهی را تأیید کند. شبیه سازی داکینگ مولکولی بر مبنای انرژی آزاد اتصال بین گیرنده و لیگاند انجام می‌شود و اتصالی که کمترین انرژی آزاد اتصال را داشته باشد به عنوان بهترین محل اتصال در نظر گرفته می‌شود (۲۶). نتایج به دست آمده از این روش برای کمپلکس آنزیم–BNQ نشان داند که تنها یک جایگاه فعال برای این ترکیب بر روی آنزیم کاتالاز وجود دارد. این اتصال در محلی تقریبا دورتر از جایگاه فعال و در حفره‌ای بین دومین آلفا هلیکس و دومین بسته بندی کننده قرار دارد(شکل ۴الف). بنابراین BNQ به محلی غیر از جایگاه اتصال سوبسترا متصل می‌شود که تأیید کننده مکانیسم مهار از نوع مخلوط می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده، پیوندهای مابین آنزیم و BNQ از نوع هیدروژنی و برهمکنشهای واندروالس می‌باشد. در این اتصال آمینواسیدهای Ala 157، Ala 356، Asp 359، Thr 360، Pro 161 و Val 72 درگیر هستند. نتایج مربوط به داکینگ مولکولی کمپلکس آنزیم–ANQ ، در تأیید نتایج تجربی، نشان داد که تنها یک جایگاه اتصال برای ANQ بر روی آنزیم کاتالاز در مجاورت گروه و جایگاه فعال آنزیم وجود دارد. (شکل ۴ب) که نشان می‌دهد آنزیم و سوبسترا برای اتصال به جایگاه فعال آنزیم با هم رقابت می‌کنند. اتصال بین آنزیم و ANQ در حفره ای مابین دومین مارپیچ آلفا، صفحات بتا و لوپ بسته بندی کننده و توسط برهمکنشهای آبگریز انجام می‌شود. در این اتصال آمینواسیدهای Ala 157، Ala 356، Leu 158، Ile 164، Pro 161 و Val 72 درگیر هستند. با توجه به اینکه آمینواسیدهای درگیر در پیوند بیشتر از نوع آبگریز هستند، بنابراین نتایج حاصل از مطالعات ترمودینامیکی در رابطه با غالب بودن پیوندهای هیدروفوب قابل تأیید می‌باشد (۱۲ و ۱۸).

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.10.9



شکل ۴- مدل داکینگ مولکولی برای اتصال الف) BNQ به آنزیم کاتالاز، (ب) ANQ به آنزیم کاتالاز.

بحث

در مطالعه حاضر، تأثیر غلظتهای مختلف BNQ و ANQ بر روی آنزیم کاتالاز کبد گاوی، به روشهای مختلف تجربی و تئوری مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات سینتیکی نشان دادند که دو ترکیب BNQ و ANQ به ترتیب با مکانیسم مخلوط و رقابتی باعث مهارکاتالاز می-شوند. نتایج حاصل از مطالعه برهمکنش آنزیم کاتالاز با سایمتیدین، به عنوان داروی مرتبط با دستگاه گوارشی، نشان داد که این ترکیب مهارکننده مخلوط آنزیم کاتالاز می‌باشد. با توجه به نتایج این مطالعه، مهارکننده مخلوط آنزیم، باعث کاهش V_{max} و افزایش K_m آنزیم می‌شود. بنابراین نتایج بررسی مکانیسم مهاری آنزیم کاتالاز در حضور BNQ، توسط این مطالعه قابل تأیید می‌باشد (۲۵). همچنین تأثیر ترکیب دفراسیروکس بر روی آنزیم کاتالاز به عنوان مهار کننده رقابتی تأیید کننده مطالعات حاضر می-باشد (۱۴). مقادیر IC_{50} محاسبه شده برای این ترکیبات نشان داد که قدرت مهار کنندگی BNQ بیشتر از ANQ می‌باشد. نتایج بررسیهای ساختاری نشان دادند که هر دو ترکیب ضمن برهمکنش با آنزیم کاتالاز، باعث ایجاد تغییراتی در ساختار دوم و سوم آن می‌شوند. نتایج مطالعات طیف سنجی مادون قرمز حاکی ازتغییرات ساختار دوم آنزیم کاتالاز در حضور ترکیبات مورد نظر می‌باشد. مطالعات ترمودینامیکی انجام شده بر روی برهمکنش کاتالاز با ۲ مرکاپتوبنزیمیدازول، با یافته‌های حاصل از برهمکنش آنزیم-BNQ همخوانی دارد. در این مطالعه نشان داده شده است که مقادیر منفی پارامترهای ترمودینامیکی حاکی از نقش اساسی پیوندهای هیدروژنی و برهمکنشهای واندروالس در ایجاد کمپلکس بین آنزیم-لیگاند می‌باشد (۲۳). مطالعات انجام شده بر روی برهمکنش آنزیم کاتالاز و کرستین نیز تأیید کننده برهمکنش آنزیم-ANQ می‌باشد. با توجه به اینکه علامت ΔH و ΔS در این مطالعات منفی به دست آمد، لذا پیوندهای هیدروفوبیک نقش اساسی را در تشکیل کمپلکس کاتالاز-کرستین ایفاء می‌کند (۱۸). مطالعات شبیه سازی مولکولی بهترین محل اتصال ترکیبات مورد نظر را بر روی آنزیم کاتالاز تعیین کرد. این نتایج، با نتایج به دست آمده از بررسیهای تجربی همپوشانی دارد (۱ و ۲). باتوجه به نقش حیاتی آنزیم کاتالاز در سم زدایی بدن، می-توان نتیجه گرفت که استفاده بیش از حد این ترکیبات در داروهای ضدمیکروبی می‌تواند عوارض جانبی به دنبال داشته باشد. نقص در فعالیت کاتالاز می‌تواند باعث به هم خوردن تعادل میان تولید رادیکالهای آزاد و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بدن شود (۲۲ و ۲۴). در سلولهای سرطانی نیز به علت بالا بودن سوخت و ساز گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن در سطح بالایی وجود دارند. برخی از مطالعات گزارش کرده‌اند که گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن می‌توانند باعث القای مرگ در سلولهای سرطانی از طریق آسیبهای ناشی از این گونه‌ها و نیز با القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از طریق مسیرهای پیام‌رسانی مرگ می‌شوند (۱۳ و ۲۴). لذا اثرات ضد سرطانی مشتقات نفتوکوئینون ها از جمله BNQ و ANQ از این جهت قابل توجیه است که این ترکیبات با مهار فعالیت آنزیم کاتالاز باعث می‌شوند که غلظت گونه‌های واکنش‌گر افزایش یابد و با القای آپوپتوز باعث مرگ سلولهای سرطانی شود.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.10.9

منابع

۱- جواهری مقدم مصطفی، آریاپور حسن، دهنوخلجی علی اکبر (۱۳۹۴). طراحی ترکیبات کرومنی جدید با فعالیت ضد سرطانی و بررسی چگونگی میانکنش آنها با توبولین به روش داکینگ مولکولی. مجله‌ی پژوهش‌های سلولی مولکولی. ۱۹۰-۱۷۸.

۲- داوری کامبیز، نوروزی جمیله، حسینی فرزانه ، اخوان سپهی عباس، میرزائی ساکو (۱۳۹۸). کشف مهارکننده علیه بتا لاکتاماز CTX-M-9 باکتری E.coli استفاده از مطالعات داکینگ ملکولی، MM/PBSA و دینامیک ملکولی. مجله‌ی پژوهش‌های سلولی مولکولی. ۴۶-۳۳.

3- Babula P, Adam V, Havel L, Kizek R. 2007. Naphthoquinones and their pharmacological properties. Ceska a Slovenska farmacie. casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti .56(3):114-20.

4- Bhogale A, Patel N, Mariam J, Dongre P, Miotello A ,Kothari D. 2014. Comprehensive studies on the interaction of copper nanoparticles with bovine serum albumin using various spectroscopies. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 113:276-84.

5- de Carvalho da Silva F, Francisco Ferreira V. 2016. Natural naphthoquinones with great importance in medicinal chemistry. Current Organic Synthesis.13(3):334-71.

6- Dong S, Li Z, Shi L, Huang G, Chen S, Huang T. 2014. The interaction of plant-growth regulators with serum albumin: Molecular modeling and spectroscopic methods. Food and chemical toxicology. 67:123-30.

7- Gallagher W. 2009. FTIR analysis of protein structure. Course manual Chem. 455.

8- Gholamian A, Divsalar A, Saiedifar M, Ghalandari B, Saboury AA, Koohshekan B. 2017. Generation of reactive oxygen species via inhibition of liver catalase by oxalli-palladium: A spectroscopic and docking study. Process Biochemistry. 52:165-73.

9- Glassford SE, Byrne B, Kazarian SG. 2013. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. 1834(12):2849-58.

10- Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. 2015. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. Free Radical Biology and Medicine. 87:84-97.

11- Janeczko M, Demchuk OM, Strzelecka D, Kubiński K, Masłyk M. 2016. New family of antimicrobial agents derived from 1, 4-naphthoquinone. European journal of medicinal chemistry. 124:25-1019.

12- Koohshekan, B, A Divsalar, M Saiedifar, AA Saboury, B Ghalandari, A Gholamian, and A Seyedarabi. 2016. 'Protective effects of aspirin on the function of bovine liver catalase: A spectroscopy and molecular docking study', Journal of Molecular Liquids, 218: 8-15.

13- Kurutas EB. 2015. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state', Nutrition journal. 15(1):71.

14- Moradi M, Divsalar A, Saboury A, Ghalandari B, Harifi A. 2015. Inhibitory effects of deferasirox on the structure and function of bovine liver catalase: a spectroscopic and theoretical study. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 33(10):2255-66.

15- Nair MS. 2015. Spectroscopic study on the interaction of resveratrol and pterostilbene with human serum albumin. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 149:67-58.

16- Nan Z, Hao C, Ye X, Feng Y, Sun R. 2019. Interaction of graphene oxide with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 210:348-54.

17- Park Y-D, Kim S-y, Lyou Y-J, Lee J-Y, Yang J-M. 2005. A new type of uncompetitive inhibition of tyrosinase induced by Cl–binding. Biochimie. 87(11):931-7.

18- Rashtbari S, Dehghan G, Yekta R, Jouyban A. 2017a. Investigation of the binding mechanism and inhibition of bovine liver catalase by quercetin: Multi-spectroscopic and computational study. Bioimpacts. BI.;7(3):147.

19- Rashtbari S, Dehghan G, Yekta R, Jouyban A, Iranshahi M. 2017b. Effects of Resveratrol on the Structure and Catalytic Function of Bovine Liver catalase (BLC): Spectroscopic and Theoretical Studies. Advanced pharmaceutical bulletin. 7(3):349.

20- Riahi MA, Ghaseminesab A. 2017. Study of the CuO nanoparticles interaction with human

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.10.9

serum albumin using fluorescence technique. journal of molecular and cellular research (Iranian journal of biology)

21- Shu Y, Xue W, Xu X, Jia Z, Yao X, Liu S, Liu L. 2015. Interaction of erucic acid with bovine serum albumin using a multi-spectroscopic method and molecular docking technique. Food chemistry. 173:31-7.

22- Sies H. 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. Redox biology.4:180-3.

23- Teng Y, Zou L, Huang M, Zong W. 2014. Molecular interaction of 2-mercaptobenzimidazole with catalase reveals a potentially toxic mechanism of the inhibitor. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 141:241-6.

24- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. international journal of biochemistry & cell biology.;39(1):44-84.

25- Yazdi F, Minai-Tehrani D, Jahngirvand M, Almasirad A, Mousavi Z, Masoud M, et al. 2015. Functional and structural changes of human erythrocyte catalase induced by cimetidine: proposed model of binding', Molecular and cellular biochemistry. 404(1-2):97-102.

26- Yekta R, Dehghan G, Rashtbari S, Sheibani N, Moosavi- Movahedi AA. 2017. Activation of catalase by pioglitazone: Multiple spectroscopic methods combined with molecular docking studies. Journal of Molecular Recognition. 30(12).

27- Yekta R, Dehghan G, Rashtbari S, Ghadari R, Moosavi-Movahedi AA. 2018. The inhibitory effect of farnesiferol C against catalase; Kinetics, interaction mechanism and molecular docking simulation. International journal of biological macromolecules.113:1258-65.

28- Yue Y, Liu J, Liu R, Sun Y, Li X, Fan J. 2014. The binding affinity of phthalate plasticizers-protein revealed by spectroscopic techniques and molecular modeling. Food and chemical toxicology. 71:244-53.

29- Zhang C, Luo S, Chen W. 2013. Activity of catalase adsorbed to carbon nanotubes: effects of carbon nanotube surface properties. Talanta. 113:142-7.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.10.9

The effect of 2-hydroxy-1-4-naphthoquinone derivatives on the structure and activity of catalase

khataee S.,[1] Dehghan Gh.R.,[1] Rashtbari S.[1] and Iranshahi M.[2]

[1] Dept. of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran.

[2] Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, I.R. of Iran.

Abstract

Catalase as an important antioxidative enzyme that plays major role in protecting cells and tissues from the toxic effects of hydrogen peroxide. 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone, as a naphthoquinone derivative, has been found to have a broad biological and pharmacological activities, including anti-cancer and anti-bacterial effects. In this study, the effect of two different derivatives of 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone derivatives (BNQ and ANQ) on the structure and function of bovine liver catalase (BLC), was studied using different spectroscopic and computational methods such as fluorescence and FTIR spectroscopy, and molecular docking studies. Kinetic studies showed that by adding gradual concentrations of BNQ and ANQ, catalase activity was significantly decreased through mixed and competitive inhibition mechanisms, respectively. The fluorescence spectroscopic results at different temperatures indicated that BNQ and ANQ can quench the intrinsic fluorescence emission of BLC through static quenching mechanism. Molecular docking data in agreement with experimental results, confirmed that there is only one binding site on the BLC structure for BNQ and ANQ. Study on effect of different compounds on the activity and structure of the catalase as a principal biological enzyme could be important. Excessive utilization of these compounds in various drugs can cause side effects and may threaten human health.

Key words*:* bovine liver catalase; naphtoquinone; mixed inhibition; competitive inhibition