# تثبیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در بنای فضایی فعال

زهرا سالمی [۱*] (M.Sc)، محسن نعمت گرگانی [۲] (Ph.D)، فرج‌اله مُهَنّازاده [۳] (Ph.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی سمنان - دانشکده پزشکی - بخش بیوشیمی
۲- دانشگاه تهران - مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک
۳- دانشگاه مازندران، بابلسر - مرکز تحقیقات شیمی

## خلاصه

سابقه و هدف: آنزیم‌های آلوستریک، علاوه بر مرکز فعال، دارای جایگاه اتصال برای افکتورهای مثبت و منفی، جهت تنظیم فعالیت خود می‌باشند. یکی از آنزیم‌های آلوستریک، آنزیم گلوتامات دهیدروژناز است. مطالعات قبلی نشان داده است که تثبیت آنزیم مذکور به هگزادسیل فراکتوزیل سبب می شود که آنزیم تثبیت شده علاوه بر حفظ فعالیت کاتالیتیکی، خواص آلوستریک خود را نیز حفظ نموده و به افکتورهای مختلف پاسخ دهد. هدف این مطالعه، بررسی تثبیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز بر بسترهای مختلف و نیز تاثیر تغییر pH بر فعالیت آنزیم تثبیت شده بود.

مواد و روش‌ها: بسترهایی حاوی لیگاندهای مختلف مانند اِل - لوسین، دی - لوسین و اِل - آلانین سنتز شد و بر تثبیت آنزیم بر آنها مورد بررسی قرار گرفت. در ضمن اثر تغییر pH بر فعالیت آنزیم تثبیت شده بر بستر در حضور لوسین و در غیاب آن مقایسه شد.

یافته ها: نتایج حاصله نشان می‌دهد که تثبیت آنزیم در یک بنای فضایی فعال در حضور افکتور مثبت آنزیم های صورت گرفت. در همه pHهای مورد آزمایش، یک فعالیت بالاتر با استفاده از آنزیم تثبیت شده بر بستر حاوی گروه استخلاف شده با اِل - لوسین در مقایسه با گروه آلکیل فاقد استخلاف به دست آمد.

نتیجه گیری: نتایج فوق حاکی از این است که تثبیت آنزیم در یک بنای فضایی فعال در حضور افکتور مثبت آنزیم انجام می گیرد و آنزیم تثبیت شده علاوه بر حفظ فعالیت کاتالیتیکی، خواص آلوستریک خود را نیز حفظ نموده و به افکتورهای مختلف پاسخ دهد.

**واژه‌های کلیدی:** تثبیت؛ گلوتاماتِ دهیدروژناز؛ آلوستریک؛ آنزیم؛ افکتور

## مقدمه

مطالعات فراوانی در زمینه تثبیت پروتئین‌ها بر بسترهایی که حاوی لیگاندهای هیدروفوبیک متفاوت بوده‌اند، انجام شده است. در مطالعات مذکور آنزیم گلوتامات دهیدروژناز بعنوان مدلی از آنزیم‌های آلوستریک در نظر گرفته شده و تثبیت آن بر بسترهای غیریونی از طریق واکنش‌های متقابل هیدروفوبیک از صورت گرفته است [۱،۲،۳،۴،۵]. جمله بسترهای فوق

* نویسندهٔ مسئول. تلفن: ۳-۳۱۵۵۲، فاکس: ۳۱۵۵۱



[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05 ]

می‌توان به فراکتوزیل لیپید اشاره کرد، اتصال آنزیم به بستر فوق به حضور گروههای فعال شیمیایی نیازی نداشته و عمل تثبیت به راحتی و با افزودن محلول آنزیمی به ماده جاذب صورت می‌گیرد. از میان ۲۸ پروتئینی که مورد بررسی قرار گرفته‌اند، ۲۲ پروتئین به صورت ۱۰۰٪ تثبیت شد، که در میان آنها می‌توان به گلوتامات دهیدروژناز اشاره کرد که ۱۰۰٪ بر دانه‌های ریز فراکتوزیل لیپید می‌نشیند و گراف‌های هیل (Hill) حاکی از واکنش متقابل با تعاونی مثبت در غلظت بالای پروتئین است.

گلوتامات دهیدروژناز آنزیمی آلوستریک است و توسط ADP و GTP و تعدادی دیگر از نوکلئوتیدها و هورمونها تنظیم می‌شود. آنزیم گلوتامات دهیدروژناز تثبیت شده در دو فرم سوسپانسیون و ستون بررسی شده و نتایج نشان داده است که آنزیم علاوه بر حفظ فعالیت کاتالیتیکی به افکتورهای آلوستریک از جمله اِل لوسین جوابگو است.[۱،۲،۳،۵].

در مطالعه حاضر استفاده از هگزادسیل فراکتوزیل واجد اِل - لوسین برای تثبیت این آنزیم آلوستریک همراه با افزایش فعالیت کاتالیتیکی توصیف شده است نتایج حاصله نشان دهندهٔ امکان تثبیت آنزیم با افزایش فعالیت کاتالیتیکی به واسطه قراردادن افکتورهای مناسب در بستر انتخابی است. همچنین روش‌های بهینه‌ای جهت تثبیت آنزیم در جهت بکارگیری آن به فرم Continuous Operation مورد مطالعه قرار گرفت.

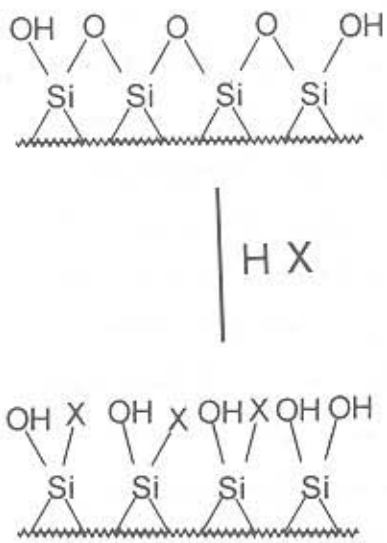
## مواد و روش‌ها

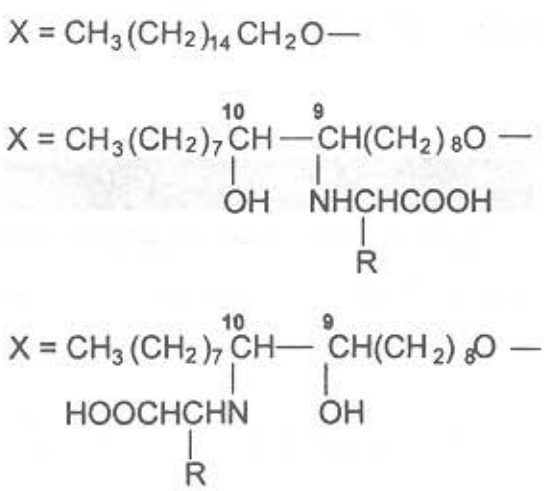
مواد. فراکتوزیل ۵۰۰ و همه مواد شیمیایی با بالاترین خلوص از شرکت مرک خریداری شده است و همه مواد بیوشیمیایی از شرکت سیگما تهیه شده است.

روش سنتز اکتادکانوئیل واجد اِل ـ لوسین. ابتدا اُلئیل الکل با استفاده از روش Swern [۸] به مشتق اپوکسید آن یعنی ۹،۱۰ - اپوکسی اکتا دکانول تبدیل شد. ۴ گرم (۰/۰۱۳ مول) از این ماده با ۱/۷۵ گرم (۰/۰۱۳ مول) اِل - لوسین در حضور اتوکسید سدیم در اتانول طبق روش sidelkovskaya وارد واکنش می‌شود[۷]. مخلوط به مدت ۳ ساعت رفلاکس شد و سپس به آن ۵۰۰ میلی لیتر آب یخ افزوده شد. ترکیب (۱۰)۹-لوسین-(۹)۱۰-هیدروکسی اکتادکان (۱)-اُل به صورت رسوب سفید رنگ ظاهر شد که توسط اتانول ۷۲ درصد نو بلور شد. همین روش جهت بدست آوردن مشتقات دی ـ لوسین یا اِل - آلانین هنگامیکه در وسط زنجیر آلکیل مستقر می‌شدند بکار برده شد.

روش تهیه فراکتوزیل مشتق‌دار. این عمل طبق روشی که قبلاً توصیف شده بود[۵] انجام شد. زنجیر آلکیل همراه با افکتور آلوستریک یا بدون آن برای تهیه ماتریکس‌های هیدروفوب بکار رفت.

**Scheme 1**






[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05 ]

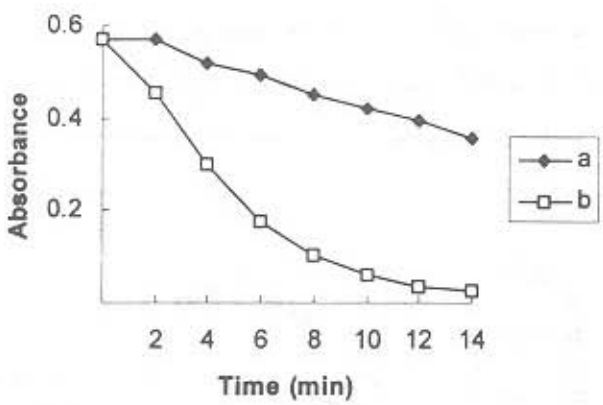
**روش تعیین فعالیت کاتالیتیکی گلوتامات دهیدروژناز.** گلوتامات دهیدروژناز آزاد توسط روشی که قبلاً توصیف شد[۱] سنجیده می‌شود. جهت تعیین فعالیت آنزیم تثبیت شده، ماتریکس مورد نیاز دوبار با بافر ۰/۱ مولار فسفات حاوی EDTA به غلظت ۰/۲m با pH=۸ شسته شد و با مقداری از آنزیم گلوتامات دهیدروژناز رقیق شده در همان بافر مخلوط شد. پس از مخلوط کردن به مدت ۳۰ دقیقه عمل شستن دو یا سه بار جهت تعیین فعالیت آنزیم تثبیت نشده انجام شد. سپس سوسپانسیون به ۲۰ میلی لیتر از مخلوط سنجش گلوتامات دهیدروژناز [توصیف شده در منبع شماره ۶] در یک بشر کوچک که روی بهم‌زن مغناطیسی قرار داشت منتقل شد همراه با مخلوط کردن مداوم، هر ۳۰ ثانیه یک بار، ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون مذکور به مدت یک دقیقه در یک کووت ۱ میلی لیتر سانتریفوژ شد و جذب محلول شفاف رویی در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد. در مقایسه با سایر متدها، این روش ساده و تکرار پذیر است. جهت مقایسه فعالیت کاتالیتیکی آنزیم تثبیت شده بر بستر اکتادسیل فراکتوزیل و اکتادسیل فراکتوزیل حاوی اِل - لوسین، ۰/۱۲۵ گرم از ماتریکس و ۱۰۰ میلی گرم از آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. پس از اتصال آنزیم، فعالیتی در محلول شفاف رویی حاصل از شستشو مشاهده نشد. این امر حاکی از آن است که همه آنزیم تثبیت شده است و هر دو سطح جذب کننده حاوی میزان یکسانی از بیوکاتالیست مورد نظر هستند.

**روش عمل کاتالیتیکی مداوم با گلوتامات دهیدروژناز تثبیت شده.** بدین منظور، ستون کوچکی با قطرداخلی ۰/۷ سانتیمتر مورد استفاده قرار گرفت و ۰/۱۲۵ گرم از ماده جاذب به آن افزوده شد. البته قبل از تثبیت آنزیم، بستر به طور کامل توسط بافر ۰/۱ مولار فسفات با pH=۸ شسته شد.

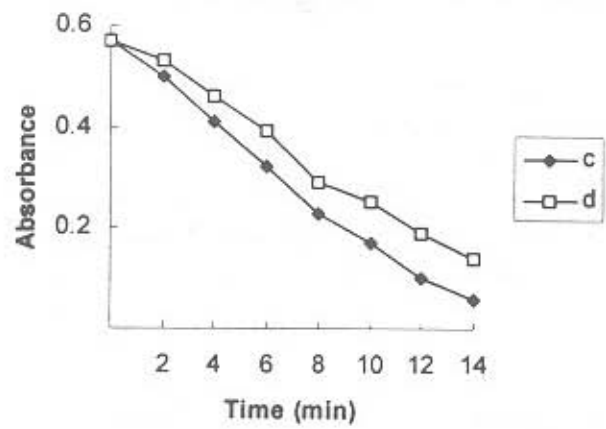
## نتایج

**الف - استفاده از گروه‌های اکتادسیل حاوی اِل - لوسین.** اکتادسیل فراکتوزیل حاوی اِل ـ لوسین در وسط زنجیر آلکیل جهت تثبیت گلوتامات دهیدروژناز مورد استفاده قرار گرفت و در یک تجربه موازی آنزیم بر روی اکتادسیل فراکتوزیل فاقد اِل ـ لوسین تثبیت شد. نتایج این تجربه در تصویر ۱ نشان داده شده است. همانطورکه نشان داده شده افزایش در فعالیت کاتالیتیکی پروتئین آلوستریک تثبیت شده بر ماتریکس هیدروفوبیک شامل اِل - لوسین، ناشی از میانکنش افکتور با پروتئین در جایگاه آلوستریک آن می‌باشد.

**ب ـ استفاده از گروههای اکتادسیل فراکتوزیل حاوی دی ـ لوسین.** آزمایش بالا تنها با این اختلاف




شکل ۱. فعالیت کاتالیتیکی گلوتامات دهیدروژناز تثبیت شده بر اکتادسیل فراکتوزیل(a) و اکتادسیل فراکتوزیل واجد اِل ـ لوسین در وسط زنجیر آلکیل(b). ۰/۲۵ گرم از ماتریکس و ۵۰۰ میلی گرم از آنزیم مورد استفاده قرار گرفته است جزئیات بیشتر تحت عنوان مواد و روشها توصیف شده است.



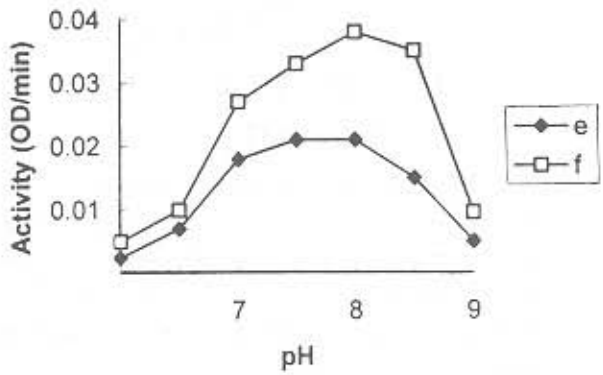

شکل ۲. فعالیت کاتالیتیکی گلوتامات دهیدروژناز تثبیت شده بر اکتادسیل فراکتوزیل حاوی D - لوسین (d) و اِل - لوسین (C) قرار گرفته در وسط زنجیر آلکیل. جزئیات بیشتر در زیر نویس تصویر ۱ و همچنین در بخش مواد و روش‌ها توصیف شده است.



[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05 ]

که ماتریکس به جای‌دی - لوسین حاوی اِل - لوسین بود تکرار شد و همانطورکه در تصویر ۲ نشان داده شده است فعالیت کمتری در این حالت حاصل شد. در یک تجربه موازی دو فرم انانتومریک از اسیدهای آمینه با استفاده از آنزیم آزاد مورد بررسی قرار گرفت. اختلافاتی در تأثیر این ایزومرها بعنوان فعال کننده با نتایج بدست آمده با استفاده از آنزیم تثبیت شده قابل مقایسه است.

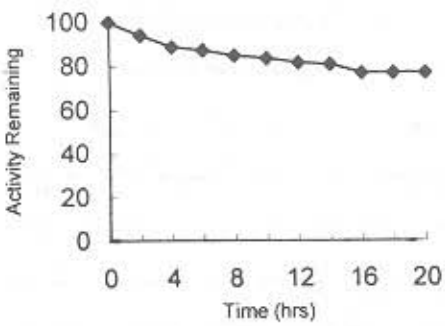
ج - اثر pH. فعالیت کاتالیتیکی گلوتامات دهیدروژناز تثبیت شده بر ماتریکس حاوی اِل - لوسین در pHهای مختلف بررسی شد (تصویر۳). در همه pHهای مورد آزمایش، یک فعالیت بالاتر با استفاده از آنزیم تثبیت شده بر بستر حاوی گروه آلکیل استخلاف شده با اِل - لوسین در مقایسه با گروه آلکیل فاقد استخلاف بدست آمد. بعلاوه شکل نهایی هر دو منحنی کاملاً یکسان است.




شکل ۳. اثر PH بر فعالیت گلوتامات دهیدروژناز تثبیت شده بر اکتادسیل فراکتوزیل (e) اکتادسیل فراکتوزیل حاوی اِل - لوسین (f) وسط زنجیر آلکیل. ۰/۲۵ گرم از ماتریکس و ۴۰ میلی گرم از گلوتامات دهیدروژناز استفاده شده است. مخلوط بافر شامل ۰/۰۴ مولار pipes و tris و همه اجزاء لازم برای فعالیت آنزیم است. برای اطلاعات بیشتر به بخش مواد و روش‌ها رجوع شود.

د- استفاده از اِل آلانین بجای اِل - لوسین. در یک آزمایش کنترل دیگر اِل - آلانین در وسط زنجیر آلکیل قرار داده شد و لیگاند استخلاف دار جهت تهیه ماتریکس هیدروفوب مورد استفاده قرار گرفت. همانطور که انتظار می‌رفت هیچگونه افزایشی در فعالیت آنزیم مشاهده نشد.

هـ عمل کاتالیتیکی مداوم با استفاده از آنزیم تثبیت شده. تصویر۴ نشان دهنده استفاده از گلوتامات دهیدروژناز تثبیت شده بر اکتادسیل فراکتوزیل حاوی اِل - لوسین در وسط زنجیر آلکیل است. همانطورکه نشان داده شده، آنزیم تثبیت شده قادر است بدون از دست دادن فعالیت مقدار متنابهی از مواد اولیه را به محصولات تبدیل کند. نتایج مشابهی با استفاده از ماتریکس هیدروفوبیک فاقد افکتور آلوستریک بدست آمده است.




شکل ۴. عمل کاتالیتیکی مداوم در ۴ درجه سانتیگراد با استفاده از گلوتامات دهیدروژناز تثبیت شده بر اکتادسیل فراکتوزیل واجد اِل - لوسین در وسط زنجیر آلکیل. ۰/۱۲۵ گرم از ماتریکس و ۱۰ میلی گرم از آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. ستون با جریان ثابت بسرعت $\frac{ml}{min}$ ۰/۱۳ شسته شد. جزئیات بیشتر در بخش مواد و روش‌ها آمده است.

## بحث

در ادامه فعالیت‌های قبلی [۱،۲،۳،۴، ۵] در زمینه تثبیت پروتئین بر بسترهایی که حاوی لیگاندهای متفاوت هیدروفوبیک (مثل گروه‌های پالمیتیل، ترایتون، کلسترول و غیره) بوده‌اند آنزیم گلوتامات دهیدروژناز به عنوان مدلی از آنزیم‌های آلوستریک انتخاب شد و تثبیت آن بر بسترهای غیر یونی از طریق اینتراکشن‌های هیدروفوبیک صورت گرفت. از جمله بسترهای فوق می‌توان به بستر هگزادسیل‌فراکتوزیل اشاره کرد که اتصال آنزیم به این بستر نیازی به گروه‌های فعال شیمیایی نداشته و به راحتی با افزودن محلول آنزیمی به ماده جاذب صورت می‌گیرد.



[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05 ]

آنزیم در حین تثبیت خواص آلوستریک خود را حفظ می‌کند و نتایج نشان می‌دهد که تمامی افکتورها باعث مهار یا فعال کردن آنزیم در فرم تثبیت شده می‌شود درست مثل رفتاری که با آنزیم آزاد دارند.لذا همانندآنزیم آزاد، آنزیم تثبیت شده ترانزیشن‌های کنفورماسیونی آلوستریک هتروتروپیک که باعث تغییر در فعالیت کاتالیتیکی می‌شود را انجام می‌دهد و می‌توان نتیجه گرفت که تثبیت آنزیم به گونه‌ای صورت می‌گیرد که مکان های آلوستریک برای اتصال افکتور در دسترس می‌باشند.

با توجه به این نتایج، این ایده مطرح می‌شود که آیا می‌توان بستری سنتز کرد که حاوی گروه‌های فعال شیمیایی (افکتور مثبت آنزیم) باشد به نحوی که بتوان آنزیم را در یک کنفورماسیون فعال‌تر تثبیت نمود و شرایطی را یافت که آنزیم هرچه محکم‌تر متصل شود به طوری که بتوان به طور مداوم از آن استفاده کرد و حجم هرچه بیشتری از سوبسترا را به محصول واکنش تبدیل نمود. لذا بسترهای مناسب هیدروفوبیک حاوی افکتورهای مثبت آنزیمی ساخته و تثبیت آنزیم بر آن بررسی شد.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که اِل ـلوسین مستقر در وسط زنجیر آلکیل با آنزیم آلوستریک در حین تثبیت وارد میانکنش شده و موجب افزایش فعالیت کاتالیتیکی آنزیم می‌شود. دی ـ لوسین فقط تا حدودی مؤثر است و در مقایسه با اثر آن بر آنزیم آزاد، موجب محدود شدن فعالیت آنزیم می‌شود و اِل ـ آلانین ـ یک اسید آمینهٔ غیر مربوط ـ به طور کلی بی‌اثر است. این مشاهدات در ادامه یافته‌های قبلی که در بالا بدان اشاره شد نشانگر این است که افزایش مشهود درفعالیت به میانکنش آنزیم با افکتور آلوستریک مثبت ویژه بستگی دارد. همچنین نتایج حاکی از این است که امکان تثبیت یک پروتئین آلوستریک در یک بنای فضایی فعال وجود دارد و این روش جهت استفاده مداوم کاتالیتیکی از آنزیم همراه با افزایش فعالیت مورد استفاده قرار می‌گیرد.

## منابع


[1] Nemat-Gorgani, M. and Karimain, K., Synthesis, characterization, and properties of hexadexyl silica, Eur. J. Biochem., 123 (1982) 601- 610.

[2] Nemat-Gorgani, M. and Karimain, K., Enzyme immobilization on palmityl sepharose, Biotechnol. Bioeng., 25 (1983) 2617-2629.

[3] Nemat-Gorgani, M., Karimian, K. Interaction of proteins with triton X-100 substituted sepharose 4B, Biotecnol. Bioeng., 26 (1984) 565-572.

[4] Nemat-Gorgani, M., Karimian, K. and Mohanazadeh, F., Non-ionic adsorptive immobilization of proteins to palmityl substituted sepharose 4B. J. Am. Chem. Soc., 107 (1985) 4756-4759.

[5] Nemat-Gorgani, M. and Karimian, K., Use of hexadecyl fractosil as a hydrophobic carrier for adsorptive immobilization of proteins, Biotechno. Bioeng., 28 (1986) 1037-1043.

[6] Nemat-Gorgani, M. and Doodd, G., Glutamate dehydrogenase. Eur.J. Biochem., 74 (1977) 129-137.

[7] Sidelkovskaya, F.P., Raspovina, N.A. and Ignaten, K.A.V., Ponomaren, K.V.A., Synthesis of matrix, Izu. Akad. Nauk SSSR. Ser khim 2 (1920) 428-431.

[8] Swern, D., Findly, T.W. and Scanlan, J.T., A novel hydrophobic matrix, J. Am. Chem. Soc., 66 (1944) 1925-1927.


[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05 ]

# Adsoptive immobilization of glutamate dehydrogenase in allosterically-activated conformation

Z. Salemi [*1] (M.Sc), M. Nemat-Gorgani [2] (Ph.D) , F. Mohannazadeh [3] (Ph.D)

[1]Departement of Biochemistry, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
[2]Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran.
[3]Institute of Chemistry,Mazandran University, Babolsar, Iran.

***Intoduction.*** Allosteric enzymes, in addittion to their active site, contain sites for the binding of positive and negative effector molecules which regulate the enzyme's activity.

In this research, the enzyme glutamate dehydrogenase (GDH) taken from bovine liver, has been chosen as an allosteric model. In previous studies this enzyme was immobilized on hexadecyl fractosil while not only maintaining its catalytic activity but also capable of responding to various effectors. The aims of this study were to examine the immobilization of GDH on different matrixes and the effect of PH on the activity of the free and immobilized enzyme.

***Material and Methods.*** Matrixes carrying a variety of ligands such as L-leucine, D-leucine L-alanine were synthesized where upon the immobilization of GDH was investigated. Meanwhile the effect of PH on the activity of the free and immobilized enzyme (in the presence and absence of L-leucine was studied.

***Results.*** The enzyme was immobilized in an active conformation and in the presence of a positive effector. In all the pH values tested, a higher acitvity was obtained using preparations containing palmityl grioups substituted with L-leucine.

***Conclusion.*** It is cincluded that the allosteric enzyme is immobilized with the effector interacting at its allosteric site. The immobilized preparation may be used in continuos catalytic transformations.

***Key words:*** Immobilization; Glutamate dehydrogenase; Allosteric regulation; Effectors

* Corresponding authour:Fax: 0231- 31551; Tel:0231-32080

[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05 ]