



مطالعه ساختار و فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی در حضور داروی آلپورینول

محمود نجفیان، فرشید کفیل‌زاده* و سحر جانفشان

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست‌شناسی، جهرم، ایران

kafilzadeh@jia.ac.ir

چکیده

ریبونوکلئاز پانکراس گاوی نوع (A) یک آنزیم اندوریبونوکلئاز است و نقش آن شکستن پیوندهای شیمیایی فسفودی استر در ساختمان RNA تک- رشته‌ای طی یک واکنش دو مرحله‌ای می‌باشد. مرحله‌ی اول این واکنش آنزیمی یک واکنش ترانس‌فسفریلاسیون و مرحله‌ی دوم آن، یک واکنش هیدرولازی (آبکافت) است. آلپورینول ایزومر ساختاری هیپوگزانتین (یکی از پورین‌های طبیعی بدن) می‌باشد که با مهار آنزیم گزانتین اکسیداز تولید اسید اوریک را کاهش می‌دهد و یکی از داروهای پرمصرف در درمان نقرس است. این دارو به علت داشتن ساختار نوکلئوتیدی ممکن است بر روی ساختار و فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی مؤثر باشد. با توجه به اهمیت آنزیم‌های ریبونوکلئاز در تجزیه انواع مولکول‌های RNA برای حفظ تعادل سیستم سلولی، باید تأثیر انواع مولکول‌های زیستی و داروهای را که ممکن است بر روی فعالیت این آنزیم اثرگذار باشند بررسی کرد. بنا بر این در تحقیق حاضر تأثیر این آلپورینول در غلظت‌های مختلف بر روی ساختار و فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی بررسی می‌شود. در ابتدا منحنی اشباع آنزیم در حضور سوبسترای cCMP رسم شد. سپس اثر آلپورینول در محدوده غلظتی ۰-۵ و ۰-۱ میلی مولار بر روی سرعت بیشینه آنزیم بررسی شد و پس از آن منحنی اشباع آنزیم در حضور چند غلظت

از دارو رسم شد. نتایج نشان دادند که دارو در غلظت‌های استفاده شده باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. سپس بررسی ساختار آنزیم با استفاده از مطالعات اتصال لیگاند و دو رنگ‌نمایی دورانی انجام شد که نتایج نشان داد که آلپورینول باعث تغییر ساختار آنزیم نیز می‌شود. در مجموع می‌توان گفت این دارو به احتمال قوی اثر مهارکنندگی بر فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A دارد.

کلمات کلیدی: ریبونوکلئاز پانکراس گاوی، آلپورینول، cCMP

مقدمه

ریبونوکلئاز پانکراس گاوی نوع (A) یک اندوریبونوکلئاز با شماره آنزیمی EC 3.1.27.5 می‌باشد که از سلول‌های اگزوکرین پانکراس گاو ترشح می‌شود. این آنزیم بسیار شناخته شده است و بطور گسترده‌ای در مورد خواص فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی آن مطالعه شده است. ریبونوکلئاز A متشکل از یک زنجیره پلی‌پپتیدی با تعداد ۱۲۴ واحد اسید آمینه می‌باشد که حداکثر فعالیت آنزیمی و نقطه ایزوالکتریک آن به ترتیب در $pH=7-7.5$ و $pI=9.45$ گزارش شده است [۱۷-۱۶ و ۱۷]. شکل کلی آنزیم شبیه کلیه و یا لوبیای قرمز است. دارای دو لپ می‌باشد که بوسیله یک شکاف باردار مثبت (حاوی رزیدوهای کاتالیتیکی) که محل قرارگیری سوبسترای RNA است از یکدیگر جدا



مطالعه ساختار و فعالیت آنزیم...

می‌دهد. با کاهش غلظت سرمی و ادراری اسید اوریک، رسوب اورات کاهش می‌یابد و از بروز یا پیشرفت آرتریت نقرسی و نفروپاتی ناشی از اسید اوریک جلوگیری می‌شود. همچنین آلپورینول میزان هیپوگزانتین و گزانتین را که برای ساخت نوکلئوتید و اسیدنوکلیک از طریق مسیری که شامل آنزیم هیپوگزانتین گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز است، افزایش می‌دهد. آلپورینول یکی از داروهای پرمصرف در درمان نقرس است. از آلپورینول در مواردی همچون افزایش اسید اوریک خون و هنگام بروز سنگ‌های اگزالات کلسیمی نیز استفاده می‌شود. میزان مصرف این دارو در بیماری نقرس و در بزرگسالان ۲۰۰ تا ۶۰۰ میلی‌گرم است که مقدار آن با توجه به شدت بیماری توصیه می‌شود. همچنین این دارو در کودکان شش تا ده سال ۳۰۰ میلی‌گرم و در کودکان زیر شش سال، ۱۵۰ میلی‌گرم روزانه تجویز می‌شود [۱۴ و ۱۵]. با توجه به اهمیت آنزیم های ریبونوکلئاز در تجزیه انواع مولکول های RNA برای حفظ تعادل سیستم سلولی، باید تأثیر انواع مولکول های زیستی و داروهای را که ممکن است بر روی فعالیت این آنزیم اثرگذار باشند بررسی کرد. با توجه به این مطلب در این پروژه تأثیر این ترکیبات در غلظت های مختلف بر روی ساختار و فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاو بررسی می‌شود.

مواد و روش کار

۱) **سنجش فعالیت آنزیمی ریبونوکلئاز A:** در این پروژه مطالعات سینتیکی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش- مرئی مدل CECIL 9000 در طول موج ۲۸۴ nm [۱۴] و در دمای ۲۷°C انجام شده است. بافر مورد استفاده Tris-

می‌شوند. فرمول مولکولی و بی بار آنزیم بصورت C₅₇₅, H₉₀₇, N₁₇₁, O₁₉₂, S₁₂ می‌باشد. ساختار آنزیم دارای ۱۲۴ آمینواسید است که در بین آنها ۱۹ تا از ۲۰ اسید آمینه طبیعی دیده می‌شود و تنها اسید آمینه تربیتوفان در ساختار آن وجود ندارد. اسید آمینه های بازی در ساختار این پروتئین شامل ده لیزین، چهار آرژنین و چهار هیستیدین است در حالیکه اسید آمینه های اسیدی شامل پنج گلوتامیک اسید و پنج آسپارتیک اسید می‌باشد. بنابراین تعداد اسید آمینه های بازی بیش از اسید آمینه های اسیدی است و در نتیجه آنزیم در pH فیزیولوژیک بار مثبت پیدا کرده و به عنوان یک پروتئین کاتیونی شناخته می‌شود [۲۳، ۱۸، ۲۰-۹]. نقش آنزیم ریبونوکلئاز A شکستن پیوندهای شیمیایی فسفودی استر در ساختمان RNA تک رشته ای طی یک واکنش دو مرحله ای و در محل ۵' استر می‌باشد. مرحله اول این واکنش آنزیمی یک واکنش ترانس- فسفریلاسیون (ترانس استریفیکاسیون) است که منجر به تشکیل حد واسط ۲' و ۳' فسفات حلقوی (حدواسط فسفودی استر حلقوی) در یک سمت از پیوند شکسته شده و گروه آزاد 5'-OH در سمت مخالف آن می‌گردد. مرحله دوم این واکنش آنزیمی، یک واکنش هیدرولازی (آبکافت) است که منجر به تجزیه شیمیایی حدواسط فسفودی استر حلقوی و تشکیل انتهای مونواستری ۳' فسفات (۳' فسفو الیگو نوکلئوتید) می‌شود. مرحله ترانس فسفوریلاسیون بسیار سریع تر از مرحله هیدرولازی صورت می‌گیرد به همین دلیل در این پروژه تمام آزمایشات بر روی مرحله هیدرولازی آنزیم ریبونوکلئاز A انجام شده است [۱۹]. آلپورینول ایزومر ساختاری هیپوگزانتین (یکی از پورین های طبیعی بدن) است که با مهار آنزیم گزانتین اکسیداز تولید اسید اوریک را کاهش



فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی جانوری، سال دوم، شماره چهارم، تابستان ۸۹، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

ابتدا حجم و غلظت یکسانی از بافر و سوپسترا به دو محفظه شاهد و نمونه اضافه شد. سپس آنزیم به همراه غلظت مورد نظر داروی آلپورینول دو دقیقه آنکوبه شد و به محفظه نمونه مجموع آنزیم و دارو و به محفظه شاهد مجموع بافر و دارو افزوده گردید. ثبت سرعت آنزیم در محدوده غلظتی ۰-۲ mM سوپسترا و در هر غلظت از دارو با سه بار تکرار انجام گرفت. منحنی اشباع آنزیم نیز برای هر غلظت دارو به طور جداگانه پس از ثبت داده‌ها رسم شد (شکل ۷).

۴) مطالعه تأثیر لیگاند آلپورینول بر ساختار آنزیم ریبونوکلئاز A: این بررسی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری ماوراء بنفش مرئی مدل CECIL 9000، در طول موج ۲۸۰ nm و در بافر Tris-EDTA شامل EDTA ۲mM و Tris ۱۰۰mM با pH=۷/۵ انجام شده است. غلظت اولیه آنزیم (بدون تیتراسیون با آلپورینول) ۲۵ μM در نظر گرفته شد. ابتدا حجم یکسانی از بافر در هر دو محفظه شاهد و نمونه ریخته شد. سپس اختلاف جذب آنها در طول موج ۲۸۰ nm صفر گردید. به محفظه نمونه آنزیم و به محفظه شاهد هم حجم آنزیم بافر اضافه و جذب آنزیم در ۲۸۰ nm خوانده شد. در مرحله بعد، به هر دو محفظه با غلظت و حجم یکسان آلپورینول افزوده و پس از ۳ دقیقه آنکوباسیون در دمای محیط جذب در طول موج ۲۸۰ nm ثبت گردید. به این ترتیب تیتراسیون مرحله به مرحله انجام گرفت و در هر مرحله بعد از ۳ دقیقه آنکوباسیون جذب مربوط به هر نقطه تیتراسیون خوانده شد. هم زمان نمودار غلظت آلپورینول علیه جذب در طول موج ۲۸۰ nm رسم شد و تا به اشباع رسیدن منحنی، تیتراسیون ادامه داده شد. در اینجا غلظت لیگاند یعنی آلپورینول و

EDTA شامل EDTA ۲mM و Tris ۱۰۰mM با pH=۷/۵ بوده است [۱۸]. در بررسی های سینتیکی از غلظت ۵ μM آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی در حضور سوپسترای cCMP در محدوده غلظتی ۰-۲ mM استفاده شده است. ثبت سرعت آنزیم در هر غلظتی از سوپسترا با سه بار تکرار انجام گرفت و با استفاده از میانگین سرعت های ثبت شده منحنی اشباع آنزیمی ترسیم شد [۱۵ و ۱۲، ۳-۴].

۲) بررسی اثر داروی آلپورینول بر فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A: پس از رسم منحنی اشباع آنزیمی در غلظت های مناسب سوپسترا، در غلظت ۰/۸mM سوپسترا که سرعت آنزیم به بیشینه مقدار خود می رسد، بررسی اثر داروی آلپورینول بر فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A در محدوده غلظتی ۰-۱ mM و ۰-۵ mM انجام شد. به محفظه شاهد و نمونه که از جنس کوارتز با ضخامت یک سانتی متر بودند، با حجم و غلظت یکسان بافر و سوپسترا اضافه شد. سپس اختلاف جذب دو محفظه در ۲۸۴ nm صفر گردید. آنزیم به همراه غلظت مورد نظر دارو در محدوده های ذکر شده ۲ دقیقه آنکوبه شد و سپس به محفظه نمونه مجموع آنزیم و داروی مورد نظر و به محفظه شاهد مجموع بافر و دارو افزوده گردید تا غلظت محتویات هر دو یکسان باقی بماند. ثبت سرعت آنزیم در غلظت ۰/۸ mM سوپسترا و در هر غلظت دارو با دو بار تکرار انجام گرفت. در پایان نیز نمودار سرعت باقی مانده علیه غلظت های مختلف دارو رسم گردید (شکل ۵ و ۶).

۳) بررسی اثر داروی آلپورینول بر منحنی اشباع آنزیمی آنزیم ریبونوکلئاز A: بررسی اثر داروی آلپورینول بر منحنی اشباع آنزیمی در غلظت های ۱ mM و ۵/۰. آن انجام شده است. در این بررسی نیز



غلظت آنزیم در هر نقطه از تیتراسیون با استفاده از روابط زیر قابل محاسبه می‌باشد:

$$[E] = \frac{V_0}{(V + V_0)} \times [E_0]$$

$$[L] = \frac{V}{(V + V_0)} \times [Lst]$$

۵) بررسی ساختار دوم آنزیم ریبونوکلئاز A با استفاده از تکنیک دورنگ نمایی دورانی یا

Circular Dichroism (CD): طیف‌های CD

در ناحیه ماوراء بنفش دور (Far-UV CD

spectra) با استفاده از دستگاه طیف نور سنج

Jasco J-7.5 در غلظت ۲۵ μM آنزیم و

غلظت‌های ۱ mM و ۰/۵ آلپورینول پس از ۵

دقیقه آنکوباسیون در دمای ۲۷°C ثبت شد و نتایج

حاصله براساس واحد بیضی واری مولی (molar

ellipticity) یا (deg cm²dmol⁻¹) گزارش

شده است. در این رابطه از معادله

$$[\theta]_{\lambda} = (\theta_{obs} \times 100MRW) / C.L$$

که در آن C نشان‌دهنده غلظت پروتئین برحسب

میلی‌گرم در میلی‌لیتر، L نمایانگر طول مسیر عبوری

نور برحسب cm، MRW متوسط وزن مولکولی

یک اسید آمینه و θ مقدار اندازه‌گیری شده از بیضی-

واری برحسب درجه در یک طول موج خاص می‌باشد. دستگاه توسط ماده (+)-۱-

کافوراسیدسولفونیک و با توجه به مقدار گزارش

شده $[\theta]_{291} = 7820 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ کالیبره

شده است. حذف اغتشاشات موجود در منحنی‌های

ثبت شده نیز با استفاده از نرم‌افزار Aviv بدون تغییر

در شکل اصلی منحنی‌ها صورت گرفته است و برای

آنالیز طیف‌ها جهت تعیین میزان ساختارهای دوم از

نرم افزار CDNN استفاده شده است [۱۹].

نتایج

۱) سنجش فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A در حضور

سوبسترای cCMP: منحنی اشباع آنزیمی در

محدوده غلظتی ۰-۲mM سوبسترای cCMP و در

غلظت ۵ μM آنزیم در هر سنجش، رسم شده

است. شکل کلی منحنی به صورت غیرهایپربولیک

است که به نظر می‌رسد علت آن ظهور پدیده‌ای

همانند پدیده مهار سوبسترای می‌باشد. این پدیده

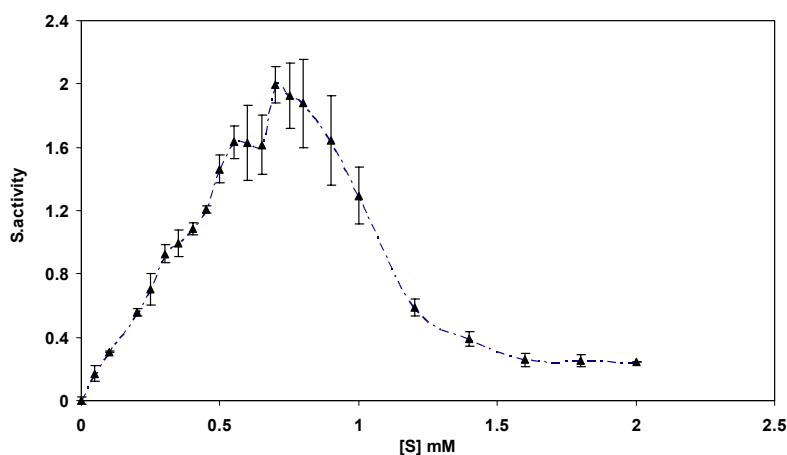
تقریباً از غلظت ۰/۸mM سوبسترا آغاز می‌شود و

کاهش فعالیت آنزیم را در غلظت‌های بالاتر سوبسترا

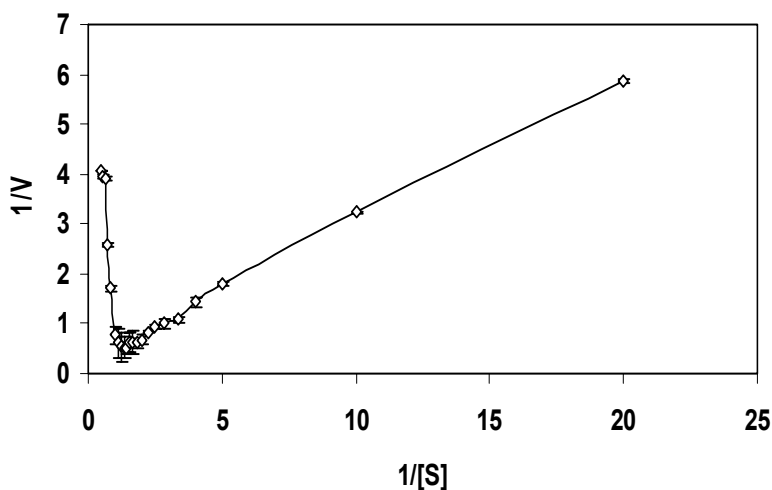
به دنبال دارد تا جایی که در غلظت ۲ mM

سوبسترا فعالیت آنزیم نزدیک صفر است (شکل ۱

و ۲).



شکل ۱) منحنی اشباع آنزیم در محدوده غلظتی ۰-۲ mM سوبسترای cCMP



شکل ۲) منحنی لاینویور-برک. بخشی از منحنی که از حالت خطی خارج شده و به سمت بالا منحرف شده است پدیده مهار سوبسترای را نشان می‌دهد.

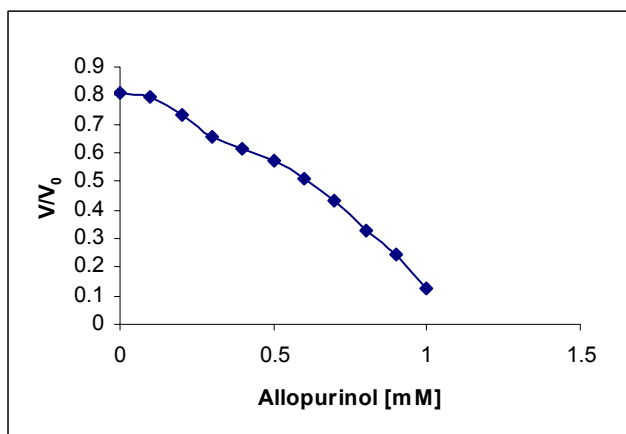
و ۴ مشاهده می‌شود، افزایش غلظت داروی آلپورینول تا ۱ mM منجر به کاهش سرعت آنزیم ریبونوکلئاز A می‌شود. وقتی غلظت آلپورینول تا ۵ mM افزایش می‌یابد سرعت آنزیم باز هم کاهش می‌یابد اما میزان تغییرات سرعت در محدوده ۱-۵ mM بسیار کمتر از محدوده ۰-۱ mM است. به

۲) بررسی اثر داروی آلپورینول بر فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A: در یک غلظت مشخص سوبسترا (غلظت ۰/۸ mM سوبسترا که سرعت آنزیم به حداکثر مقدار خود می‌رسد) اثر داروی آلپورینول در محدوده غلظتی ۰-۱ mM و ۰-۵ mM بر روی فعالیت آنزیم بررسی شد. همان طور که در شکل ۳

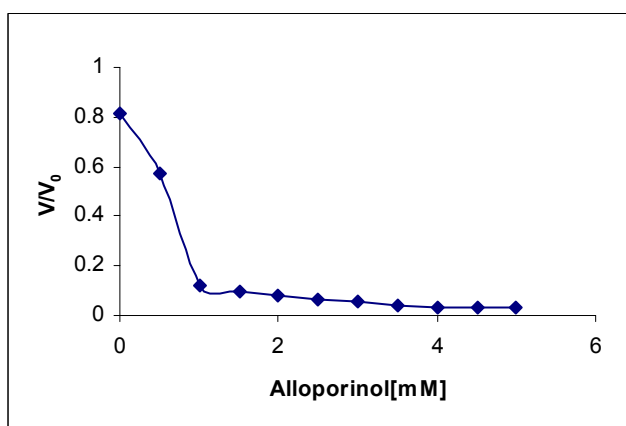


نتایج به دست آمده تا کنون می‌توان گفت این دارو به احتمال قوی اثر مهارکنندگی بر فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز A دارد.

همین دلیل به نظر می‌رسد که داروی آلوپورینول بیشترین اثر خود را بر میزان فعالیت آنزیم در محدوده ۱ mM - ۰ به جا می‌گذارد. با توجه به



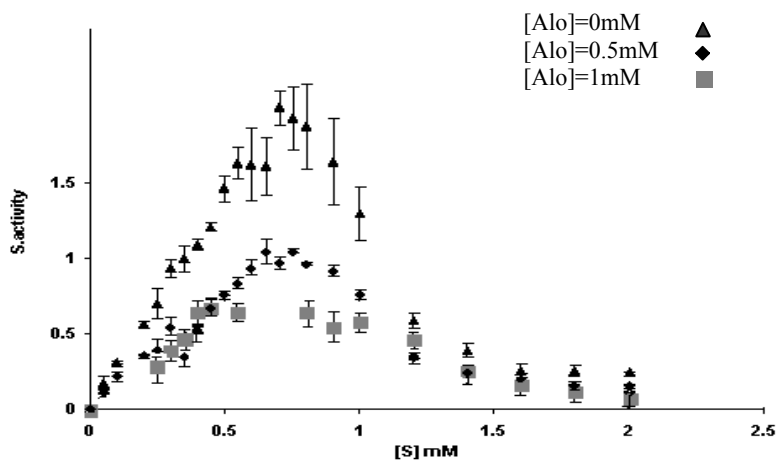
شکل ۳) تأثیر داروی آلوپورینول در محدوده غلظتی ۱-۰ mM بر روی سرعت آنزیم ریبونوکلئاز A



شکل ۴) تأثیر داروی آلوپورینول در محدوده غلظتی ۵-۰ mM بر روی سرعت آنزیم ریبونوکلئاز A

۰.۸mM سوبسترا (قله منحنی) می‌باشد، کاهش پیدا می‌کند. در سایر غلظت‌های سوبسترا نیز کاهش سرعت آنزیم وجود دارد اما در این غلظت محسوس‌تر است. با توجه به داده‌های بدست آمده می‌توان گفت که داروی آلوپورینول در غلظت‌های مشخصی اثر مهارتی بر روی فعالیت آنزیم دارد.

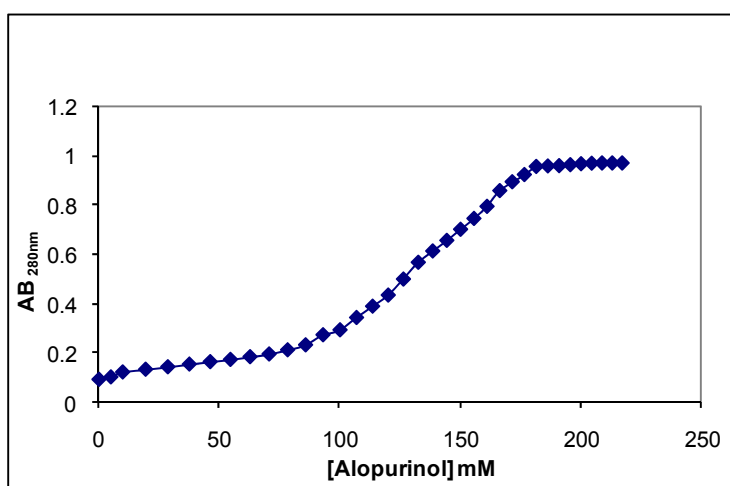
۳) بررسی اثر داروی آلوپورینول بر منحنی اشباع آنزیمی آنزیم ریبونوکلئاز A: بررسی اثر داروی آلوپورینول بر منحنی اشباع آنزیمی در غلظت‌های ۱ mM و ۰.۰۵/۰، آن انجام شده است. همان طور که در شکل ۵ مشخص است با افزایش غلظت داروی آلوپورینول سرعت بیشینه آنزیم که در غلظت



شکل ۵) منحنی اشباع آنزیم ریبونوکلاز A در محدوده غلظتی ۰-۲ mM سوبسترا و در حضور غلظت‌های ۱ mM و ۰/۵ از داروی آلپورینول.

به اشباع رسیدن کامل آنزیم از آلپورینول ادامه می‌یابد. در ناحیه اشباع آنزیم، افزایش میزان لیگاند تغییر محسوسی در میزان جذب کمپلکس آنزیم ریبونوکلاز A و لیگاند ایجاد نمی‌کند. تیتراسیون لیگاند منجر به افزایش منظم غلظت آن و از طرفی کاهش منظم غلظت آنزیم ریبونوکلاز A در محیط واکنش می‌شود.

۴) مطالعه تاثیر لیگاند آلپورینول بر ساختار آنزیم ریبونوکلاز A: در بررسی اتصال لیگاند آلپورینول به آنزیم ریبونوکلاز A همان طور که در شکل ۶ نشان داده شده است، تیتراسیون پی در پی این ترکیب در محلول حاوی آنزیم با غلظت $25 \mu\text{M}$ ، منجر به افزایش جذب کمپلکس آنزیم و لیگاند در طول موج 280 nm می‌شود. این افزایش جذب تا

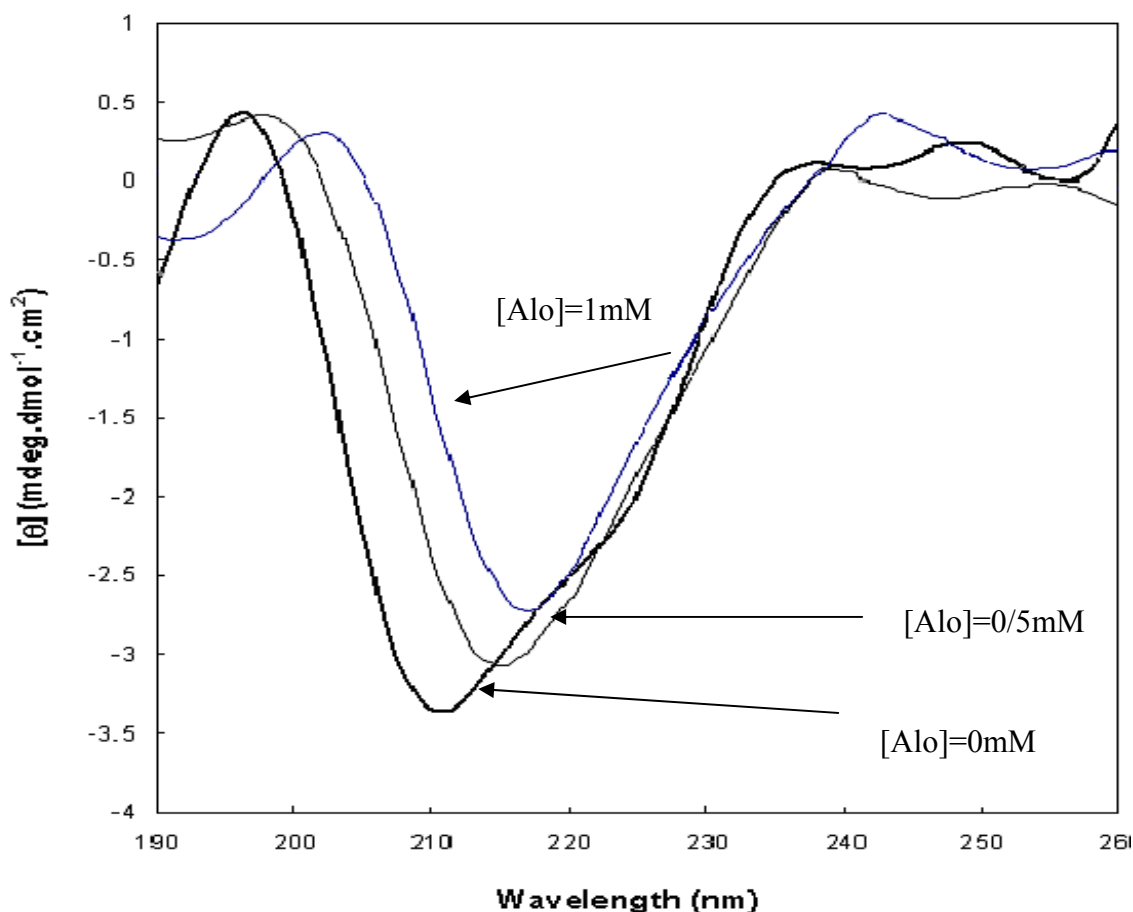


شکل ۶) منحنی اشباع آنزیم ریبونوکلاز A در حضور داروی آلپورینول



حضور غلظت‌های مختلف آلپورینول آنکوبه شده است، نشان می‌دهد. در این شکل افزایش غلظت آلپورینول تغییرات منظمی را در ساختار دوم آنزیم ایجاد می‌کند.

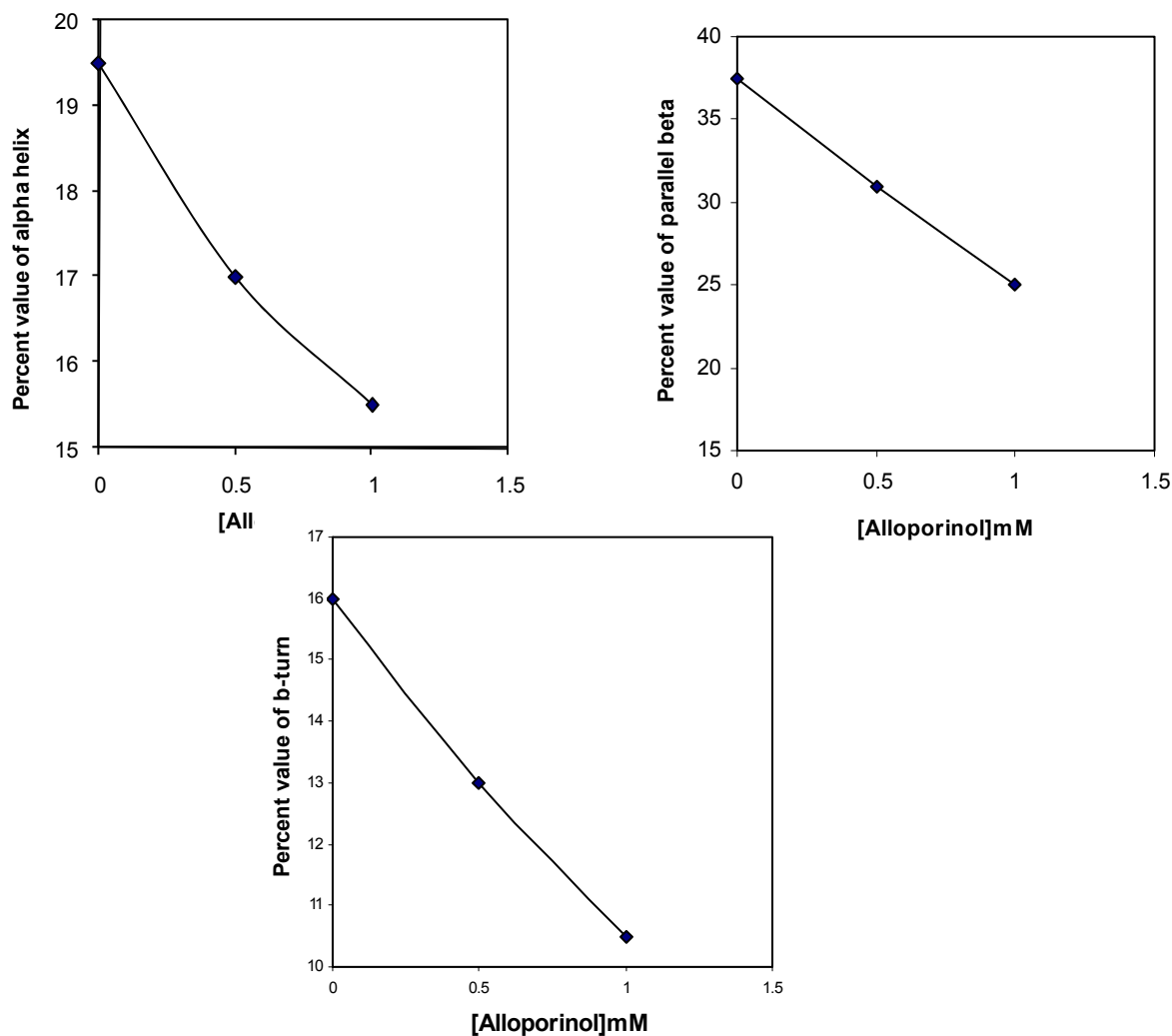
۵) بررسی ساختار دوم آنزیم ریونوکلئاز A با استفاده از تکنیک دورنگ نمایی دورانی یا **Circular Dichorism (CD)**: شکل ۷ مقایسه طیف ساختار دوم آنزیم طبیعی و آنزیمی را که در



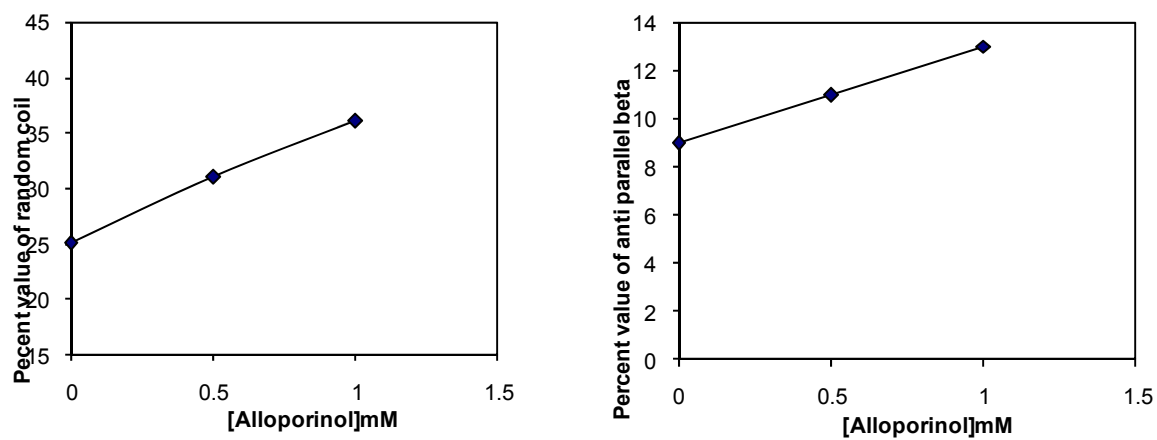
شکل ۷) بررسی تغییرات ساختار دوم آنزیم در حضور غلظت‌های ۱ mM و ۰.۵ آلپورینول با استفاده از تکنیک دو رنگ-نمایی دورانی (Circular Dichorism) در ناحیه ۱۹۰-۲۴۰ nm.

β parallel مشاهده شده است. به این ترتیب می‌توان از آلپورینول در غلظت‌های ذکر شده به عنوان عاملی در جهت به هم ریختگی ساختار دوم آنزیم ریونوکلئاز A نام برد.

همان طور که در شکل ۸ و ۹ نشان داده شده است در راستای افزایش غلظت آلپورینول کاهش درصد α -Helix و β -Turn Parallel β و β -Turn Anti و Random coil افزایش درصد



شکل ۸) کاهش درصد میزان β Parallel، α -Helix و β -Turn در پی افزایش غلظت داروی آلپورینول



شکل ۹) افزایش درصد میزان β Anti parallel و Random coil در پی افزایش غلظت داروی آلپورینول



بحث

منحنی اشباع آنزیم در محدوده غلظتی ۰-۲ میلی مولار سوبسترای cCMP، یک منحنی غیرهایپربولیک است. رفتار غیرهایپربولیک آنزیم را می‌توان به ظهور پدیده مهار سوبسترای نسبت داد. پس از تأثیرداری آلپورینول بر بیشینه سرعت آنزیم در محدوده غلظتی ۰-۱ و ۰-۵ میلی‌مولار مشخص شد که این لیگاند در محدوده غلظتی ۰-۱ میلی‌مولار بیشترین اثر را بر روی فعالیت آنزیم دارد و به طور قابل توجهی باعث کاهش بیشینه سرعت آنزیم می‌شود. پس از رسم منحنی اشباع آنزیم در محدوده غلظتی ۰-۲ میلی‌مولار سوبسترا و در حضور غلظت‌های ۱ و ۰,۰/۵ میلی‌مولار آلپورینول همان طور که در شکل ۵ مشخص است می‌توان به وضوح دید که در هر نقطه از منحنی اشباع افزایش غلظت دارو باعث کاهش فعالیت آنزیم در آن نقطه شده است. مطالعه اتصال لیگاند آلپورینول به آنزیم ریبونوکلئاز نشان می‌دهد که این اتصال منجر به تغییر جذب آنزیم در طول موج ۲۸۰ nm شده است که نشان از تغییر ساختار آنزیم در حضور داروی آلپورینول دارد. مطالعات ساختار دوم آنزیم ریبونوکلئاز A با استفاده از تکنیک دو رنگ نمایی دورانی یا Circular Dichroism (CD) نشان می‌دهد که در حضور این لیگاند درصد ساختارهای β -Turn, α -Helix, Parallel β کاهش و درصد Anti parallel β و Random coil افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایشات می‌توان گفت که داروی آلپورینول در غلظت‌های ذکر شده باعث تغییر ساختار آنزیم و به دنبال آن باعث تغییر فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی می‌گردد. ساختار آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی یک شکل لوبیایی دارد و دارای یک

هسته هیدروفوب متشکل از اسیدهای آمینه فنیل آلانین، آلانین، والین و لوسین می‌باشد و همچنین یک کانال با بار مثبت دارد که به عنوان جایگاه فعال آنزیم ریبونوکلئاز A در نظر گرفته می‌شود. تعداد ۱۲ اسید آمینه شناسایی شده‌اند که در میان زیرجایگاه‌های واقع در جایگاه فعال آنزیم واقع شده‌اند و در فرآیند کاتالیتیکی ریبونوکلئاز A، هر کدام نقش خاصی را ایفا می‌کنند. این اسیدهای آمینه عبارتند از: Thr₄₅، Lys₄₁، His₁₂، Gln₁₁، Arg₁₀، Lys₁₂₁، His₁₁₉، Glu₁₁₁، Asp₈₃، Asn₇₁ و Lys₆₆. از بین این اسیدهای آمینه برخی از مهمترین آنها His₁₁₉ و His₁₂ هستند. این دو اسید آمینه مهم و مؤثر در فرآیند کاتالیزور آنزیمی ریبونوکلئاز A محسوب می‌شوند. به استناد مطالعات تفرق اشعه X و همچنین NMR، این دو اسید آمینه در دو طرف شیار فعال آنزیم قرار گرفته‌اند. مطالعات جایگزینی شیمیایی نشان می‌دهد چنان چه گروه ایمیدازول His₁₂ حذف شود، تمایل آنزیم برای فرآیند شکستن سوبسترا حدود ۱۰^۴ بار کاسته می‌شود. Lys₄₁ نیز یکی از اسید آمینه‌های مهم دیگر در جایگاه فعال آنزیم است. مدیفیکاسیون شیمیایی ریبونوکلئاز A نشان می‌دهد که اسید آمینه Lys₄₁ در فرآیند کاتالیز آنزیمی مشارکت دارد. حال با توجه به ساختار آلپورینول که توانایی شرکت در باند هیدروژنی را از طریق گروه‌های آمین و اکسوی خود دارد و همچنین از طریق حلقه می‌تواند در اندرکنش‌های هیدروفوبی شرکت کند؛ بنابراین می‌توان گفت که این ترکیب از طریق اندرکنش با هسته هیدروفوب آنزیم می‌تواند ساختار آنزیم را تغییر دهد و همین طور از طریق اندرکنش‌های هیدروژنی با اسید آمینه‌های باردار موجود در جایگاه فعال آنزیم می‌تواند تمایل آنزیم به سوبسترا را کاهش داده



منابع

- 1- Cuchillo C.M., Vilanova M., Neguse M. V. (1997): Pancreatic ribonucleases. In Ribonucleases: Structures and Functions (G. D'Alessio, J.F. Riordan, eds.). Academic Press, New York, pp: 271-304.
- 2- Fedorov A. A., Mccarthy D. J., Fedorov E., Sirakova D., Graf I., Almo S.C. (1996): Ionic interaction in crystalline bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry*, 35: 15962-15979.
- 3- Gharanfoli M., Moosavi-Movahedi A.A., Safarian S., Chamani J. A. A. Saboury (2004): Calorimetric evidence for conformational transition of RNase A in the presence of cytidine 2',3'-cyclic phosphate. *Thermochimica Acta*, 411: 37-42.
- 4- Hatzopoulos G. N., Leonidas D. D., Kardakaris R., Kobe J., Oikonomakos N. G. (2005): The binding of IMP to Ribonuclease A., *FEBS Journal*, 272: 3988-4001.
- 5- Hitchings G. H. (1966): Effects of allopurinol in relation to purine biosynthesis" *Ann Rheum Dis.*, 25: 601-607
- 6- J.A. Biosca, C.M. Cuchillo (1980): Thermodynamic studies on the hydrolysis of cytidine 2', 3'-phosphate by bovine pancreatic ribonuclease A, *Biochem. J.*, 189: 655-657.
- 7- Kartha G., Bello J., Harker D. (1967): Tertiary structure of ribonuclease. *Nature*, 213: 862-865.
- 8- Kita Y., Arakawa T. (2002): Salts and glycine increase reversibility and decrease aggregation during thermal unfolding of ribonuclease A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66: 880-882.
- 9- Klink T. A., Woycechowsky K. J., Taylor K. M., Raines R.T. (2000): Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A, *Eur. J. Biochem.*, 267: 566-572.
- 10- Libonati M., Gotte G. (2004): Oligomerization of bovine ribonuclease A: structural and functional features of its multimers. *Biochem. J.*, 380: 311-327.
- 11- Markel A. (2005): Allopurinol-induced DRESS syndrome. *Med. Assoc. J.*, 7: 656-660.
- 12- McNaughton C.O., Wilt T. (2002): Allopurinol for chronic prostatitis" *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2: CD001041.
- 13- Moody T.P., Kingsbury J.S., Durant J. A., Wilson T. J., Chase S. F., Laue T. M. (2005): Valence and anion binding of bovine ribonuclease A between pH 6 and 8. *Analytical Biochemistry*, 336: 243-252.
- 14- Pacher P., Nivorozhkin A., Szabo C. (2006): Therapeutic affects of



- xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev.*, 58: 87-114.
- 15- Puig J. G., Mateos F. A., Diaz V.D. (1989): Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol: a therapeutic option for ischaemia induced pathological processes?. *Ann. Rheum. Dis.*, 48: 883-888.
- 16- Raines T.R. (1998): Ribonuclease A. *Chem. Rev.*, 98: 1045-1065.
- 17- Richard F.M. (1971): Bovine pancreatic ribonuclease. *Chem. Rev.*, 99: 1145-1149.
- 18- Rico M., M. Bruiz, J. Santoro, C. Gonza Lez, J.L. Neira, J.L. Nieto, J. Herranz, Sequential ¹H-NMR assignment and solution structure of bovine pancreatic ribonuclease A, *Eur. J. Biol. Chem.* 183 (1989): 623-638.
- 19- Safarian S., Moosavi-Movahedi A. A. (2000): Binding pattern and kinetic of RNase A interaction with RNA. *J. Protein. Chem.*, 19: 235-341.
- 20- Santoro J., Gonza Lez C., Bruiz M., Nieto J. L. (1993): High resolution three dimensional structure of ribonuclease A in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Mol. Biol.*, 229: 722-734.
- 21- Smith B. D., Soellner M. B., Raines R. T. (2003): Potent inhibition of ribonuclease A by oligo (vinylsulfonic Acid). *The Journal of Biological Chemistry*, 23: 20934-20938.
- 22- Wang M. H., Wang Z.X., Zhao K.Y. (1996): Kinetics of inactivation of bovine pancreatic ribonuclease A by bromopyruvic acid. *Biochem. J.*, 320: 187-192.
- 23- Yazdanparast R., Andrews P. C., Swith D. L., Dixon J. E. (1987): Assignment of disulfide bonds in proteins by fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, 262: 2507-2513.