

مطالعه خصوصیات بیوشیمی الاستاز حاصل از باکتری سودوموناس آئروجینوزا سویه ی PTCC1430

حسین رحمانی^۱، سید محسن اصغری^{۲*}، ساناز ابراهیمی^۱، افسانه صدر ممتاز^۱، مجید تقدیر^۲

۱ کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران
۲ استادیار بیوشیمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران
۳ استادیار بیوفیزیک گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: متالوپروتئازها کاربردهای فراوانی در صنعت از جمله در سنتز پپتید و آسپارتام دارند. با این وجود استفاده از آن ها با محدودیت هایی از قبیل ناپایداری به سبب اتولیز مواجه است. در تحقیق حاضر خصوصیات بیوشیمیایی یک متالوپروتئاز (الاستاز) حاصل از باکتری سودوموناس آئروجینوزا پس از خالص سازی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی پروتئین نو ترکیب از *E. coli* خالص گردید. با رسم منحنی فعالیت آنزیم در دماهای مختلف وابستگی فعالیت به دما بررسی و دمای بهینه تعیین گردید. با استفاده از بافر میکس pH بهینه و با غیر فعال سازی حرارتی برگشت ناپذیر شیب غیرفعال سازی، $t_{1/2}$ و پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال سازی تعیین گردید.

یافته ها: دمای بهینه در هر سه غلظت ۰، ۵ و ۱۰ میلی مولار کلرید کلسیم برابر با ۶۰ درجه سانتی گراد تعیین گردید و pH بهینه ۸/۵ بدست آمد. شیب غیر فعال سازی حرارتی برگشت ناپذیر در دماهای ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵ و ۸۰ درجه سانتی گراد با افزایش دما افزایش یافت. در دماهای مذکور $t_{1/2}$ بترتیب ۱۵۰، ۱۱۲، ۴۷، ۳۲، ۱۸، ۸، ۴ دقیقه محاسبه گردید. مقادیر E_a ، ΔH^\ddagger ، ΔS^\ddagger و ΔG^\ddagger بترتیب ۳۷/۷، ۳۷/۰۲ و ۲۳/۶۱ کیلوکالری بر مول و مقدار $k_{inactivation}$ برابر با $4 \times 10^{-2} \times 49^{-1}$ بدست آمد.

نتیجه گیری: از نظر وابستگی به دما الاستاز سودوموناس آئروجینوزا یک آنزیم با خصیوصیات مابین مزوفیل ها و ترموفیل ها می باشد. کلسیم در میزان دمای بهینه بی تاثیر است، و این پیشنهاد می کند پایداری آنزیم مذکور غیر وابسته به کلسیم است.

کلمات کلیدی: الاستاز، پایداری حرارتی، پایداری سینتیکی، pH.

مقدمه

پروتئین، کاربردهای صنعتی، دارویی و غذایی دارند (۶). سایر کاربردهای این آنزیم ها وابسته به ماهیت فعالیت کاتالیتیک در ارتباط با محیط واکنش دهنده است که منجر به طبقه بندی پروتئازها در گروه های اسیدی، خنثی و بازی می شود (۲). الاستاز یکی از آنزیم های خارج سلولی تولید شده توسط سودوموناس آئروجینوزا است که یک باکتری پاتوژن فرصت طلب بوده و در بسیاری از عفونت های مزمن نقش دارد و احتمالاً مسئول تخریب بافتی مشاهده شده در طی عفونت های ریوی و قرنیه ای توسط این پاتوژن است (۱). نقش الاستاز به عنوان یک فاکتور ویروانس است که روی سوبستراهایی شامل الاستین، برخی از کلاژن ها، ایمونوگلوبولین های انسانی G و

پروتئازها از مهم ترین کاتالیزورهای زیستی از دیدگاه صنعتی هستند و اتصالات پپتیدی را در پروتئین ها در محیط آبی هیدرولیز کرده و بنابراین در خانواده ی هیدرولازها قرار می گیرند (۱۲). در محیط های آلی، به علت تغییر در معادله ی ترمودینامیکی سنتز اتصالات پپتیدی صورت می گیرد (۱۳). پروتئازها کاربردهای زیادی از جمله در سنتز پپتید،

پژوهنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

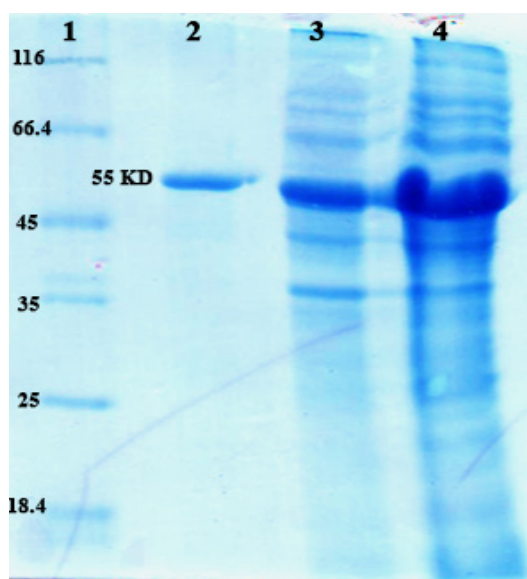
Email: sm_asghari@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۳

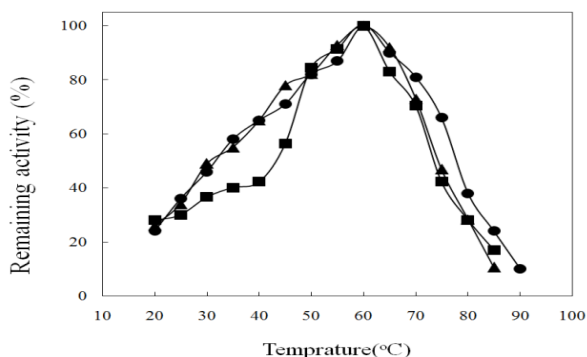
یافته ها

آنزیم با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی تخلیص و نتایج با استفاده از ژل SDS-PAGE (شکل ۱) و زایموگرام تایید شدند.



شکل ۱- تخلیص آنزیم الاستاز، (۱) مارکر (۲) نمونه خالص سازی شده با ستون نیکل سفارز (۳) عصاره سلولی (۴) رسوب سلولی.

تاثیر دما روی فعالیت الاستاز در شکل ۲ نشان داده شده است. فعالیت بهینه آنزیم الاستاز در غلظت های ۰، ۵ و ۱۰ میلی مولار کلسیم ۶۰ درجه ی سانتی گراد می باشد و آنزیم در محدوده‌ی دمایی ۴۵-۶۰ درجه ی سانتی گراد بالای ۷۰ درصد فعالیت دارد و در دماهای بیش از ۶۵ فعالیت آنزیم به طور چشمگیری کاهش می یابد. در تمامی غلظت های کلسیم در دمای ۲۰ درجه ی سانتی گراد الاستاز ۲۵ درصد فعالیت و در دمای ۹۰ درجه ی سانتی گراد کمتر از ۱۰ درصد فعالیت دارد.



شکل ۲- اثر دما بر فعالیت الاستاز در غلظتهای ۰ (Δ)، ۵ (■) و ۱۰ (●) میلیمولار کلسیم. میزان خطای استاندارد پس از سه تکرار کمتر از ۵٪ بوده است.

A، مهارکننده ی α_1 -پروتئیناز سرم اثر دارد (۶). این آنزیم یک روی متالوپروتئاز خنثی است که فعالیت بالای الاستولیتیکی و پروتئولیتیکی را در حضور یون کلسیم و روی نشان داده است (۸،۹،۱۰،۴،۱۲،۱۴). در تحقیق حاضر خصوصیات بیوشیمیایی این آنزیم از نقطه نظر اثر دما بر فعالیت و پایداری سینتیک آنزیم مورد بررسی قرار گرفته است.

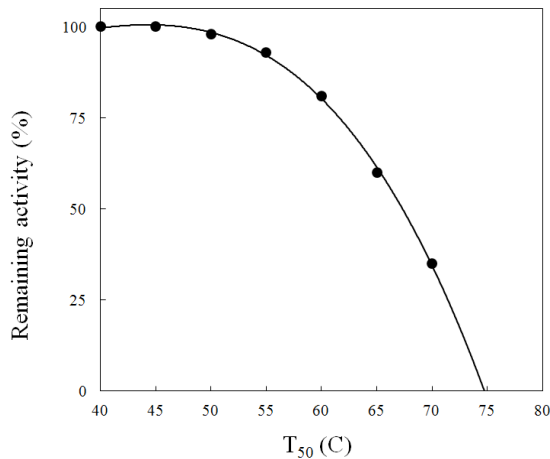
مواد و روش ها

ژن الاستاز از *Pseudomonas aeruginosa* در pET21a⁺ کلون و در سویه ی PTCC1430 از *E. coli* بیان گردید. برای رسیدن به بهترین شرایط بیان، دماهای مختلف و زمان های مختلف بررسی شدند. به منظور خالص سازی آنزیم از ستون کروماتوگرافی تمایلی استفاده شد و سپس خلوص پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE تایید گردید. نمونه های خالص جهت تعیین وابستگی فعالیت به دما و بررسی غیر فعال سازی حرارتی و محاسبه ی پارامترهای ترمودینامیکی استفاده شد. به منظور تعیین پایداری سینتیک، غیر فعال سازی حرارتی برگشت ناپذیر، نیمه عمر غیر فعال سازی و T_{50} آنزیم خالص شده در دماهای ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵ و ۸۰ درجه سانتی گراد در بازه ی زمانی ۰-۱۲۰ دقیقه انکوبه شد. منحنی لگاریتم فعالیت باقیمانده علیه زمان به صورت خطی بدست آمد. ثابت سرعت ($k_{inactivation}$) برای محاسبه ی انرژی فعال سازی توسط معادله ی آرنیوس استفاده شد. فعالیت آنزیم در محدوده دمایی ۲۵-۹۰ °C تعیین شد. محلول آنزیمی در بافر ۲۰mM تریس با pH=۸ و کازئین ۱/۵ درصد (W/V) به مدت ۳۰ دقیقه در هر دما انکوبه و واکنش با افزودن ۲۵۰ میکرولیتر محلول TCA ۱۰ درصد متوقف می گردید. سپس با رسم منحنی فعالیت علیه دما وابستگی هر یک از واریانت ها به دما و دمای بهینه تعیین شد. فعالیت نسبی آنزیم در pH های مختلف (دما ۶۰ °C) تعیین شد. ابتدا بافر ۵۰mM فسفات-گلیسین تهیه و با استفاده از محلول NaOH و یا HCl در pH های مختلف (۶ تا ۱۲) تنظیم شد. کازئین ۱٪ نیز با بافر تریس مقطر تهیه شد. سپس آنزیم در بافر فوق با pH های مختلف سنجش گردید.

به منظور بیان کمی میزان پایداری حرارتی آنزیم ها پارامتر حرارتی آنزیم ها پارامتر $t_{1/2}$ (نیمه عمر غیر فعال سازی) در دماهای مختلف بر اساس داده های شکل ۴ فوق تعیین شد (جدول ۱).

جدول ۱- نیمه عمر غیر فعال سازی ($t_{1/2}$) در دماهای مختلف. میزان خطای استاندارد پس از سه تکرار کمتر از ۵٪ بوده است.							
دما	۵۵	۶۰	۶۵	۷۰	۷۵	۸۰	۸۵
$t_{1/2}$	۱۵۰	۱۱۲	۴۷	۳۲	۱۸	۸	۴

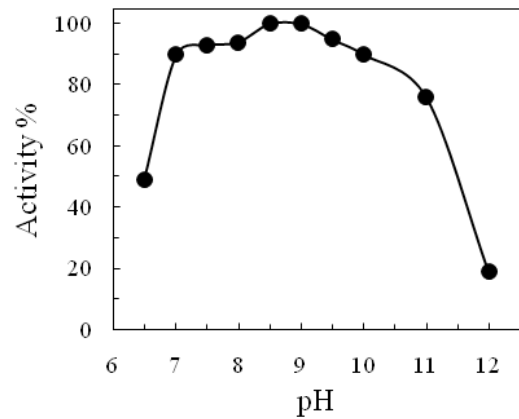
یکی دیگر از پارامترهایی که میزان پایداری یک پروتئاز را نشان می دهد پارامتر T_{50} است (۳). پارامتر T_{50} الاستاز معادل ۶۵ درجه سانتی گراد به دست آمد (شکل ۵).



شکل ۵- در این منحنی فعالیت باقیمانده در دماهای مختلف پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون محاسبه شده است. دمایی که در آن فعالیت پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون به ۵۰ درصد فعالیت اولیه برسد T_{50} در نظر گرفته می شود. میزان خطای استاندارد پس از سه تکرار کمتر از ۵٪ بوده است.

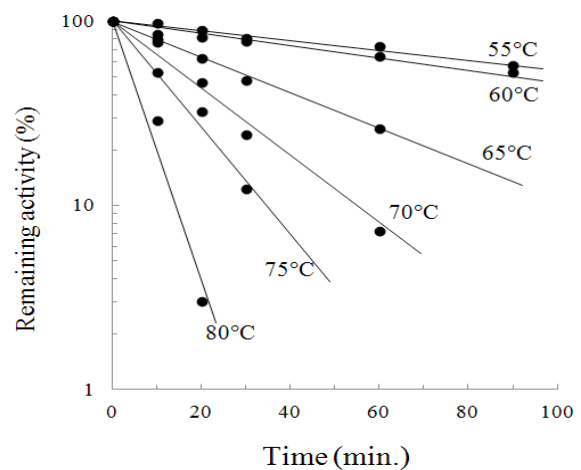
نمودار آرنیوس غیر فعال سازی حرارتی با در دست داشتن سرعت غیر فعال سازی ($k_{inactivation}$) در دماهای ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵، ۸۰ و ۸۵ درجه سانتی گراد برای آنزیم رسم شد. شیب خطوط در منحنی آرنیوس بیانگر انرژی فعال سازی (E_a) واکنش دانتوراسیون است (۵). از روی پارامتر E_a میزان $\Delta H^\#$ (آنتالپی فعال سازی واکنش دانتوراسیون) تعیین می گردد. همچنین $\Delta G^\#$ واکنش دانتوراسیون با استفاده از مقدار $k_{inactivation}$ در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد محاسبه گردید. با در اختیار داشتن $\Delta G^\#$ و $\Delta H^\#$ و با استفاده از رابطه $\Delta G^\# = \Delta H^\# - T\Delta S^\#$ میزان $\Delta S^\#$ نیز تعیین شد (جدول ۲).

اثر pH روی فعالیت الاستاز در شکل ۳ آمده است. الاستاز در محدوده وسیعی از pH فعال است و pH بهینه آن ۸/۵ است. همان طور که در شکل نیز مشخص است، فعالیت آنزیم طیف گسترده ای از pH ها از حدود pH ۶ تا ۹ را شامل می گردد بطوری که در این محدوده بیش از ۹۰٪ فعالیت آنزیم حفظ می شود اما در pH های بالاتر فعالیت آنزیم افت شدیدی را نشان می دهد.



شکل ۳- اثر pH بر فعالیت الاستاز. میزان انحراف نقاط پس از سه تکرار کمتر از ۶٪ بوده است.

غیر فعال سازی حرارتی آنزیم در دماهای ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی گراد و در غلظت ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴).



شکل ۴- غیر فعال سازی حرارتی آنزیم در دماهای ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی گراد. میزان خطای استاندارد پس از سه تکرار کمتر از ۵٪ بوده است.

جدول ۲- پارامتر های ترمودینامیکی غیر فعال سازی حرارتی آنزیم وحشی و کایمر در دماهای ۷۰ درجه سانتی گراد. $k_{inactivation}$ بر حسب $(s^{-1} \times 10^3)$ و سایر مقادیر بر حسب (kcal/mol) است.				
E_a	$k_{inactivation}$	$\Delta G^\#$	$\Delta H^\#$	$\Delta S^\#$
۳۷/۷	۴/۵	۲۳/۶	۳۷	۳۹/۱

بحث

در تحقیق حاضر آنزیم الاستاز حاصل از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* پروتئین نوترکیب خالص و سپس خصوصیات بیوشیمیایی آن تعیین گردید. بررسی وابستگی فعالیت به دما نشان داد الاستاز خصوصیتی مابین آنزیم های مزوفیل و تروفیل دارد (دمای بهینه ۶۰ درجه سانتی گراد). از سوی دیگر در حضور غلظت های مختلف Ca^{+2} الگوی وابستگی فعالیت به دما چندان دستخوش تغییر نشده است (شکل ۲). بنابراین ساختمان جایگاه فعال آنزیم تحت تاثیر این محدوده از غلظت Ca^{+2} دستخوش تغییر نشده است. pH بهینه آنزیم قابل مقایسه با سایر آنزیم های این خانواده از جمله ترمولیزین و سایر متالوپروتئازهای باکتریایی بوده و تا حدی قلیایی است، اما محدوده وابستگی فعالیت به pH طیف گسترده ای از pH ها از حدود pH ۶ تا ۹ را شامل می گردد. مطالعات غیرفعال سازی حرارتی آنزیم در محدوده دماهای ۵۵ تا ۸۰ درجه سانتی گراد نشان می دهد که با افزایش دما میزان غیر فعال سازی تسریع شده و به دنبال آن $t_{1/2}$ کاهش می یابد. این نتیجه با افزایش میزان اتولیز در دماهای بالاتر قابل توضیح است یعنی هر چه دما افزایش می یابد میزان اتولیز نیز بیشتر می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان ابراز می دارند.

منابع

- (1) Adekoya OA, Sylte I. The Thermolysin Family (M4) of Enzymes: Therapeutic and Biotechnological Potential. *Chem Biol Drug*, 2009; 73: 7-16.
- (2) Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline Protease: A Review, *Bioresource Technol*. 1998; 64: 175-183.
- (3) Asghari SM, Pazhang M, Ehtesham S, Karbalaeei-Heidari HR, Taghdir M, Sadeghizadeh M, Naderi-Manesh H, Khajeh K. Remarkable Improvements of a Neutral Protease Activity and Stability Share The Same Structural Origins. *Protein Eng Des Sel*, 2010; 23: 599-606.
- (4) Braun P, Ockhuijsen C, Eppens E, Koster M, Bitter W, Tommassen J. Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* Elastase. *J Biol Chem*, 2001; 276: 26030-26035
- (5) Eijssink VGH, Van den Burg B, Vriend G, Berendsen HJC, Venema G. Thermostability of *Bacillus Subtilis* Neutral Protease. *Biochem Internat*, 1991; 517-525.
- (6) Gupta A, Roy I, Khare SK, Gupta MN. Purification and Characterization of a Solvent Stable Protease From *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *J Chromatography A*, 2005; 1069: 155-161.
- (7) Guzzo J, Murgier M, Fillux A, Lazdunski A. Structural Analysis of Zinc Substitutions The Active Site of Thermolysin. *Prot Sci*, 1995; 4: 1955-1965.
- (8) Kessler E, Kennah HE, Brown SI. *Pseudomonas* Protease Purification, Partial Characterization, and Its Effect on Collagen, Proteoglycan, and Rabbit Corneas. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 1977; 16: 488-498.
- (9) Kessler E, Safrin M. Partial Purification and Characterization of an Inactive Precursor of *Pseudomonas aeruginosa* Elastase. *J Bacteriol*, 1988; 170: 1215-1219.
- (10) Kessler E, Safrin M. Synthesis, Processing, and Transport of *Pseudomonas aeruginosa* Elastase. *J Bacteriol*, 1988; 180: 5241-5247.
- (11) Kessler E, Safrin M. The propeptide of *Pseudomonas aeruginosa* Elastase acts as an elastase Inhibitor. *J Biol Chem*, 1994; 269: 22726-22731.
- (12) Leatherbarrow RJ, Fersht AR. Protein Engineering. *Protein Engin*. 1986; 1: 7-16.
- (13) Ogino H, Yokoo J, Watanabe F, Ishikawa H. Cloning and Sequencing of a Gene of Organic Solvent-Stable Protease Secreted From *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 and Its Expression in *Escherichia coli*. *Biochemical Eng J*, 2000; 5: 191-200.
- (14) Thayer M, Flaherty KM, McKay DB. Three-Dimensional Structure of The Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5-Å Resolution. *J Biol Chem*, 1991; 266: 2864-2871.