

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

حسین رحمانی^۱، سید محسن اصغری^{۲*}، سانا ز ابراهیمی^۱، افسانه صدر ممتاز^۱، مجید تقذیر^۱

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، 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 آن‌ها با محدودیت‌هایی از قبیل ناپایداری به سبب اتوالیز مواجه است. در تحقیق حاضر خصوصیات بیوشیمیابی یک متالوپروتئاز (الاستاز) حاصل از باکتری سودوموناس آئروجینوزا پس از خالص سازی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: با استفاده از کروماتوگرافی تمايلی پروتئین نوترکیب 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 غیرفعال سازی حرارتی برگشت ناپذیر شبیغیرفعال سازی، $t_{\text{inactivation}} = 49^{-1}$ و پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال سازی تعیین گردید.

یافته‌ها: دمای بهینه در هر سه غلظت ۰، ۵ و ۱۰ میلی مolar کلرید کلسیم برابر با ۶۰ درجه سانتی گراد تعیین گردید و pH بهینه $8/5$ بدست آمد. شبیغیرفعال سازی حرارتی برگشت ناپذیر در دماهای ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵ و ۸۰ درجه سانتی گراد با افزایش دما افزایش یافت. در دماهای مذکور $t_{\text{inactivation}} = 112, 112, 47, 32, 18, 8$ و 4 دقیقه محاسبه گردید. مقادیر $\Delta G^\#$ ، $\Delta H^\#$ ، $\Delta S^\#$ و $k_{\text{inactivation}}$ بدست آمد.

نتیجه گیری: از نظر وابستگی به دما الاستاز سودوموناس آئروجینوزا یک آنزیم با خصوصیات مابین مزووفیل‌ها و ترموفیل‌ها می‌باشد. کلسیم در میزان دمای بهینه بی‌تأثیر است، و این پیشنهاد می‌کند پایداری آنزیم مذکور غیروابسته به کلسیم است.

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

مقدمه

پروتئین، کاربردهای صنعتی، دارویی و غذایی دارند (۶). سایر کاربردهای این آنزیم‌ها وابسته به ماهیت فعالیت کاتالیتیک در ارتباط با محیط واکنش دهنده است که منجر به طبقه‌بندی پروتئازها در گروه‌های اسیدی، خنثی و بازی می‌شود (۲). الاستاز یکی از آنزیم‌های خارج سلولی تولید شده توسط سودوموناس آئروجینوزا است که یک باکتری پاتوژن فرصت طلب بوده و در بسیاری از عفونت‌های مزمن نقش دارد و احتمالاً مسئول تخریب بافتی مشاهده شده در طی عفونت‌های ریوی و قرنیه‌ای توسط این پاتوژن است (۱). نقش الاستاز به عنوان یک فاکتور ویرون‌لنس است که روی سوبستراهایی شامل الاستین، برخی از کلائز، ها، ایمونوگلوبولین‌های انسانی G و

پروتئازها از مهم‌ترین کاتالیزورهای زیستی از دیدگاه صنعتی هستند و اتصالات پپتیدی را در پروتئین‌ها در محیط آبی هیدرولیز کرده و بنابراین در خانواده‌ی هیدرولازها قرار می‌گیرند (۱۲). در محیط‌های آلی، به علت تغییر در معادله‌ی ترمودینامیکی سنتز اتصالات پپتیدی صورت می‌گیرد (۱۳). پروتئاز‌ها کاربردهای زیادی از جمله در سنتز پپتید،

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

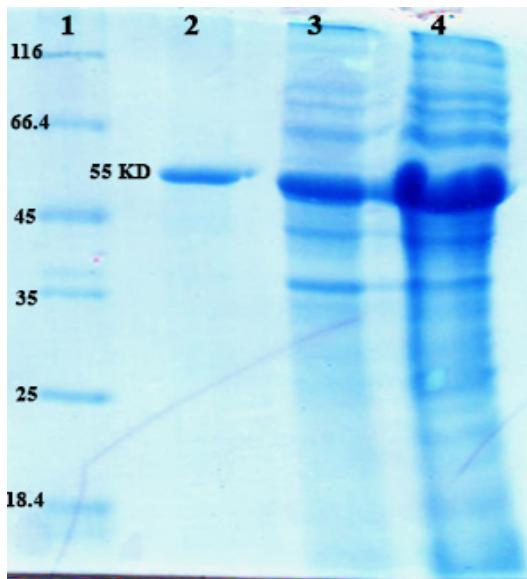
Email: sm_asghari@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۳

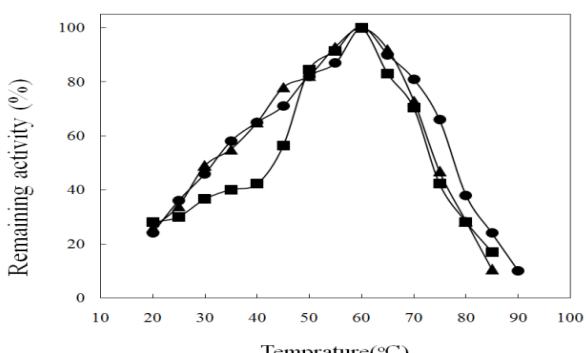
یافته ها

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.

تأثیر 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 سانتی گراد می باشد و آنزیم در محدوده دمایی ۴۵-۶۰ درجه 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 سانتی گراد الاستاز ۲۵ درصد فعالیت و در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد کمتر از ۱۰ درصد فعالیت دارد.



شکل ۲- اثر دما بر فعالیت الاستاز در غلظت های ۰، ۵ (△)، ۱۰ (●) و ۵۰ (■) میلیمولار کلسیم. میزان خطای استاندارد پس از سه تکرار کمتر از ۵٪ بوده است.

A، مهارکننده α -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 (۴، ۸، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۴). در تحقیق حاضر خصوصیات بیوشیمیابی این آنزیم از نقطه نظر اثر دما بر فعالیت و پایداری سینتیکی آنزیم مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

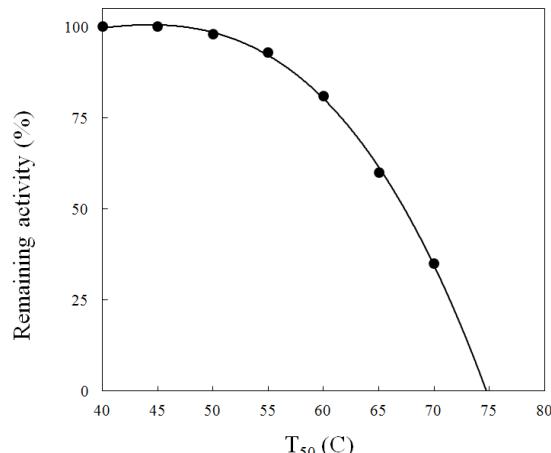
ژن الاستاز از *Pseudomonas aeruginosa* در pET21a⁺ در کلون و در سویه ی PTCC1430 از *E.coli* بیان گردید. برای رسیدن به بهترین شرایط بیان، دماهای مختلف و زمان های مختلف بررسی شدند. به منظور خالص سازی آنزیم از ستون کروماتوگرافی تمایلی استفاده شد و سپس خلوص پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE تایید گردید. نمونه های خالص جهت تعیین وابستگی فعالیت به دما و بررسی غیر فعال سازی حرارتی و محاسبه ی پارامترهای ترمودینامیکی استفاده شد. به منظور تعیین پایداری سینتیکی، غیر فعال سازی حرارتی برگشت ناپذیر، نیمه عمر غیر فعال سازی و T_{50} آنزیم خالص شده در دماهای ۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵، ۸۰ 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 ۹۰-۲۵ °C تعیین شد. محلول آنزیمی در بافر ۲۰ mM تریس با pH=۸ و کازئین ۱/۵ درصد (W/V) به مدت ۳۰ دقیقه در هر ۱۰ TCA درست و اکنش با افزودن ۲۵۰ میکرولیتر محلول کازئین ۱٪ نیز با بافر تریس مقطر تهیی 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

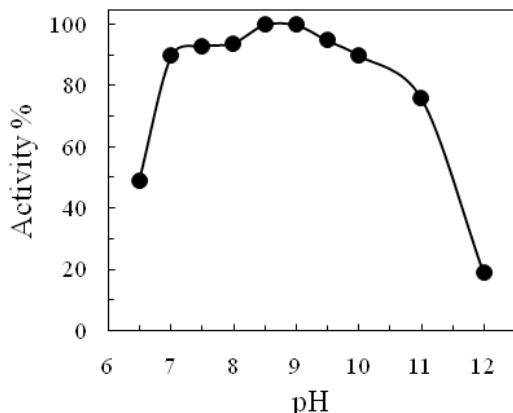
یکی دیگر از پارامترهایی که میزان پایداری یک پروتئاز را نشان می دهد پارامتر T_{50} است (۳). پارامتر T_{50} الاستاز معادل ۶۵ درجه سانتی گراد به دست آمد (شکل ۵).



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 بررسد T_{50} در نظر گرفته می شود. میزان خطای استاندارد پس از سه تکرار کمتر از ۵٪ بوده است.

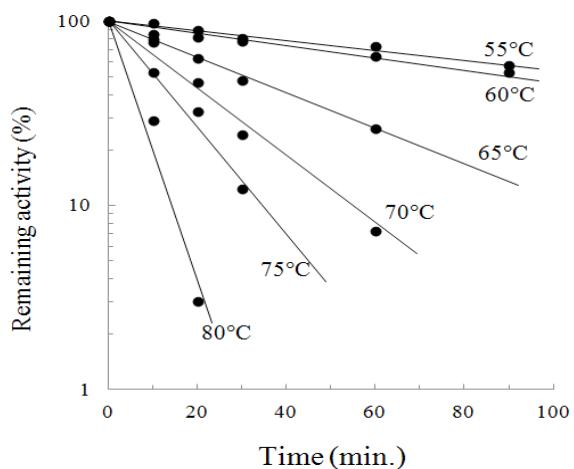
نمودار آرنیوس غیر فعال سازی حرارتی با در دست داشتن سرعت غیر فعال سازی ($k_{inactivation}$) در دماهای ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵ و ۸۰ درجه سانتی گراد برای آنزیم رسم شد. شبیه خطوط در منحنی آرنیوس بیانگر انرژی فعال سازی (E_a) واکنش دناتوراسیون است (۵). از روی پارامتر E_a میزان $\Delta H^\#$ (آنالپی) فعال سازی واکنش دناتوراسیون تعیین می گردد. همچنین واکنش دناتوراسیون با استفاده از مقدار $k_{inactivation}$ در دمای $\Delta G^\#$ واکنش دناتوراسیون با استفاده از مقادیر $\Delta H^\#$ - $T\Delta S^\#$ تعیین می گردد. با در اختیار داشتن $\Delta G^\#$ 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 ۷۵ درجه سانتی گراد و در غلظت ۱۰ میلی مolar CaCl_2 مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴).



شکل ۴- غیر فعال سازی حرارتی آنزیم در دماهای ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰ و ۷۵، ۸۰، 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 $k_{inactivation}$ (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 خصوصیاتی مابین آنزیم های مزوفیل و تروفیل دارد (دماهی 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 Ca^{+2} جایگاه فعال آنزیم تحت تاثیر این محدوده از غلظت pH دستخوش تغییر نشده است. pH بهینه آنزیم قابل مقایسه با سایر آنزیم های این خانواده از جمله ترمولیزین و سایر متالوپروتئاز های باکتریایی بوده و تا حدی قلیایی است، اما محدوده وابستگی فعالیت به pH طیف گسترده ای از pH ها از حدود 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 غیرفعال سازی تسريع شده و به دنبال آن $t_{1/2}$ کاهش می یابد. این نتیجه با افزایش میزان اтолیز در دماهای بالاتر قابل توضیح است یعنی هر چه دما افزایش می یابد میزان اтолیز نیز بیشتر می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندها 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 Reveiew, *Bioresource Technol.* 1998; 64: 175-183.
- (3)Asghari SM, Pazhang M, Ehtesham S, Karbalaei-Heidari HR, Taghdir M, Sadeghzadeh 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)Eijsink 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 *Pseudomonase aeruginosa* at 1.5-Å Resolution. *J Biol Chem*, 1991; 266: 2864-2871.