مجله علمی – پژوهشی زیست شناسی جانوری تجربی

سال اول، شماره اول، بهار ۱۳۹۱(۳۴ – ۲۷)

مطالعه پایداری ساختمانی آنزیم پپسین درحضور اوره

محبوبه کوهیان[1*]، بهزاد شارقی[2]،فریده کوهیان[3]

۱. کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور ۲. دانشیار، دانشگاه شهرکرد
۳. کارشناس ارشد فیزیک پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۲۳ ، تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/٤/۲۱)

چکیده

آنزیم پپسین(E.C.3.4.23.1) نوعی آسپارتیک پروتئیناز شیره معده است که در شرایط بسیار اسیدی عمل می‌کند. این آنزیم به طبقه هیدرولازها تعلق دارد و ساختمان منومر شامل دو لوب کروی بوده که از نظر اندازه و فولدینگ زنجیر پلی پپتیدی بسیار نزدیک هستند. این آنزیم واجد یک رشته پلی پپتیدی با وزن مولکولی ۳۴۶۴۴ دالتون و۳۲۷ اسیدآمینه است. آنالیز ساختاری آن نشان می دهد که۱/۲ درصد اسیدآمینه های آن بازی، ۱۳/۱درصد اسیدی، ۴۶/۵ درصد اسیدآمینه های قطبی و۳۹/۲درصد اسیدآمینه های هیدروفوبیک هستند.پایداری ساختاری این آنزیم با استفاده از تکنیکهای اسپکتروفتومتری در ناحیه ماوراء بنفش واسپکتروفلوریمتری درحضور تاثیر دگرگون کننده اوره بررسی شد. مطالعه فوق بااستفاده از بافر۰/۰۲ مولار سدیم فسفات با pH=۲ و در دامنه دمایی ۳۰ تا۱۰۰درجه سانتیگراد انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که: ۱)پایداری قابل توجه آنزیم پپسین(T_m)بالا نسبت به سایرهیدرولازها) ۲) کاهش پایداری حرارتی آنزیم پپسین(T_m آنزیم) درحضور اوره و pH=۲ ۳)کاهش مقادیر پارامترهای ترمودینامیکی ΔS°_m و ΔH°_m درحضوراوره ۴)افزایش شدت فلوئورسانس وماکزیمم طول موج نشر آنزیم پپسین در حضور اوره .

واژه های کلیدی: پپسین، اوره، پایداری ساختاری، دگرگون شدن

* نویسنده مسئول: محبوبه کوهیان

Email: m_kouhiyan@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

پپسین(E.C.3.4.23.1) نوعی آسپارتیک پروتئیناز شیره معده است (Fluhrer & Haass, 2009) که واجد یک رشته پلی پپتیدی با ۳۲۷ باقیمانده آمینواسیدی می باشد(Cho& Northrop,1998). وزن مولکولی آن ۳۴۶۴۴ دالتون است .پپسین در طبقه سوم یعنی هیدرولازها قرار دارد (Haldar&Chattopadhyay,2010). ساختار این آنزیم منومر شامل دو لوب کروی بوده که از نظراندازه وفولدینگ زنجیرپلی پپتیدی بسیار نزدیک هستند. در میان این دو لوب شکاف بزرگی وجود دارد که جایگاه اتصال سوبسترا و جایگاه فعال آنزیم در آن قرار دارند (Marciniszyn, & Huang, 1998). با تغییر محیط فیزیکی یا شیمیائی یک پروتئین امکان دگرگون شدن آن وجود دارد که معمولاً روشهای دگرگون کردن عبارتند از: حرارت دادن، افزودن یک دگرگون کننده شیمیایی ما نندDTAB، تغییر pH به حالت اسیدی یا قلیایی و عمل کردن در فشار بالا. هدف اصلی ازمطالعات دگرگون سازی پروتئینها به دست آوردن اطلاعات اضافی درمورد ساختمان، خواص و عملکرد پروتئینها می باشد. مطالعات در زمینه غیرطبیعی کردن پروتئینها در محلولهای آبی انجام می شود و بنابراین در درک عملکرد پروتئینها تحت شرایط فیزیولوژیک مفید واقع می شود. فرایند دگرگون سازی پروتئینها برای مطالعه نیروهای تعیین کننده ساختمان سوم حائز اهمیت است (Ano Bom,Monica, Freitas, & Silva,2010). استفاده دیگر ازمطالعات دگرگون سازی، مطالعه نیروهای موثر ونقش انواع پروتئینها میان کنش ها در جایگاه فعال آنزیم می باشد. با توجه به توضیحات کلی ارائه شده درمورد فولدینگ پروتئینها و دناتوره شدن آنها باید گفت که جزئیات کمی درمورد ساختارهای حالت دگرگون شده آنزیم های پروتئاز به ویژه پپسین وجود دارد (Schellman,2002) که در مطالعه حاضر تاثیر دگرگون کننده اوره بر ساختار آنزیم پپسین بررسی می شود.

مواد وروش ها

آنزیم پپسین با منشا پورسین و همچنین اوره از شرکت مرک خریداری شد. اندازه گیری طیفی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر فارما سیا مدل۴۰۰۰ مجهز به سیستم کنترل الکترونیکی دما در دامنه حرارتی ۳۰ تا ۱۰۰ درجه سانتیگراد انجام شد.اندازه گیریهای فلوریمتری به کمک دستگاه اسپکتروفلوریمتر فارما سیا مدل RF-5301 مجهز به حمام آب گرم صورت گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

روش ها

۱- بررسی پایداری حرارتی آنزیم پپسین در حضوراوره در pH=۲ و دامنه حرارتی C° ۱۰۰ – ۳۰: بافرفسفات سدیم با pH=۲ در غلظت M ۰/۰۲ و محلول اوره با غلظت ۸ مولار و در pH=۲ تهیه شد. منحنی های دگرگون سازی در حضوراوره در طول موج ۲۸۰ نانومتر با استفاده از محلولهای پپسین با غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمده است.

۲-بررسی اسپکتروفلوریمتری آنزیم پپسین در حضور اوره در pH=۲ و دماهای گوناگون: بافر فسفات سدیم با pH=۲ در غلظت M ۰/۰۲ و محلول اوره هم با غلظت ۸ مولار در pH=۲ تهیه شد. غلظت نمونه آنزیم پپسین ۳ میلی گرم بر میلی لیتر است. بررسیهای فلوریمتری در pH مورد بررسی در هشت غلظت مختلف (صفر تا هفت مولار) و در دماهای گوناگون انجام شد.

نتایج و بحث

شکل ۱ نشان دهنده تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده درمقابل دما برای غلظتهای مختلف اوره در pH=۲ است. همانطور که مشاهده می شود در غیاب اوره، مقدار F_d تا دمای K ۳۳۸ صفر است. کسر پروتئین دگرگون شده با پذیرفتن مکانیسم دو حالته و با استفاده از رابطه۱ محاسبه شده است.

$$F_d = \frac{Y - Y_N}{Y_D - Y_N} \quad (۱)$$

در این رابطه Y_N و Y_D به ترتیب مقادیر جذب نوری مولکولهای طبیعی و دگرگون شده در حالتی میباشد کهY مورد اندازه گیری واقع شده است(۱۳). در مورد pH=۲ با افزایش غلظت اوره، منحنی های دگرگون سازی به سمت چپ جابه جا می شوند. به عبارت دیگر حضور اوره سبب کاهش پایداری آنزیم پپسین در pH=۲ می شود. برای محاسبه تغییردر انرژی آزاد حالتهای طبیعی و دگرگون شده ، ΔG°_D، میتوان از رابطه ۲ استفاده کرد (Pace, Shirley ,1989)

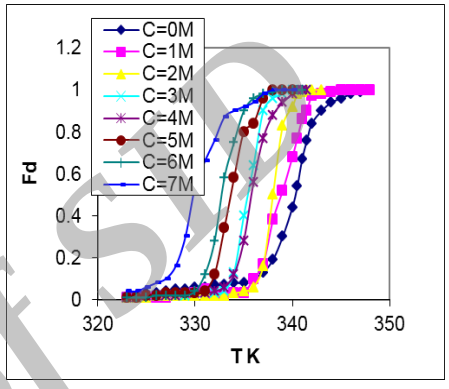
$$\Delta G^{\circ}_D = -RT\ln [F_d / (1-F_d)] = -RT\ln [(Y_N - Y_{obs}) / (Y_N - Y_D)] \quad (۲)$$

در این رابطه، R ثابت گازها و T دما بر حسب کلوین است. دمای ذوب پروتئین(T_m)، دمایی است که مقدار ΔG°_D درآن دما برابر صفر است. منحنی تغییرات ΔG°_D بر حسب دما در شکل ۳، ارائه شده است. با افزایش غلظت اوره، منحنی های فوق به سمت چپ انتقال می یابند و بنابر این T_m آنزیم کاهش می یابد. مقدار T_m برای آنزیم پپسین K ۳۴۰ است. تاثیر اوره بر مقدار T_m درجدول ۱ ارائه شده است. چنانچه ملاحظه می شود حضور اوره سبب کاهش T_m آنزیم می شود. با

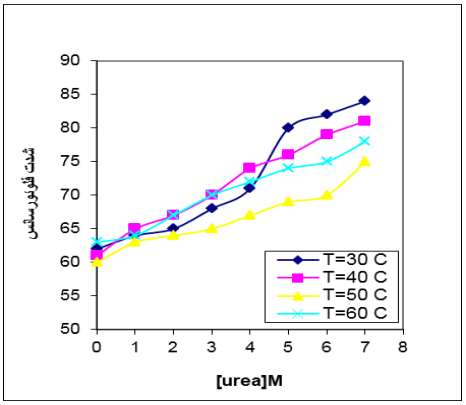
Archive of SID

www.SID.ir

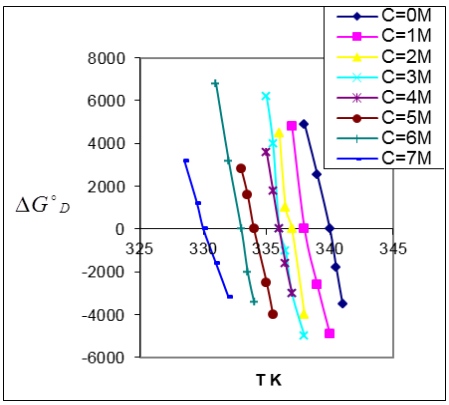
افزایش غلظت اوره از یک تا هفت مولار، T_m آنزیم کاهش می یابد به طوریکه در غلظت هفت مولار به ۳۳۰K میرسد. شیب منحنی ΔG°_D بر حسب دما در نقطه T_m برابر ΔS°_m است.



شکل۱- منحنی تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل حرارت در غلظتهای مختلف اوره و بافر۰/۰۲ مولار سدیم فسفات و pH=۲



شکل۲- تغییرات شدت فلوئورسانس آنزیم پپسین در حضور اوره در بافر ۰/۰۲مولار سدیم فسفات و pH=۲



شکل۳- منحنی تغییرات ΔG°_D در مقابل دما در حضورغلظتهای مختلف اوره و بافر۰/۰۲مولارسدیم فسفات و pH=۲

برای محاسبه ΔH°_m، با در نظر گرفتن مقدار صفر برای ΔG°_D می توان از رابطه ۳ استفاده کرد.

$$\Delta H^\circ_m = T_m \ \Delta S^\circ_m \quad (۳)$$

ΔS°_m و ΔH°_m به ترتیب تغییر انتروپی و آنتالپی در دمای T_m می باشند. جدول ۱ نشان دهنده مقادیر پارامترهای فوق می باشد. مقادیر ΔS°_m و ΔH°_m با افزایش غلظت اوره کاهش می یابد. کاهش مقادیر این دو پارامتر به منزله بازتر شدن شکل طبیعی آنزیم و افزایش کسر پروتئین دگرگون شده میباشد. توابع ترمودینامیکی ΔS°_m و ΔH°_m را می توان به صورت زیر بیان کرد: (Pace , Shirley ,1989)

$$\Delta H^\circ_m = H^\circ_m(D) - H^\circ_m(N) \quad (۴)$$

$$\Delta S^\circ_m = S^\circ_m(D) = S^\circ_m(N) \quad (۵)$$

Archive of SID

www.SID.ir

در این روابط، D نمایانگر حالت دگرگون شده و N نمایانگر حالت طبیعی پروتئین است. با توجه به اینکه حالت دگرگون شده به صورت پیچه منظم در نظر گرفته می شود، کاهش مقادیر ΔS°_{m} و ΔH°_{m} مبین باز شدن شکل طبیعی آنزیم می باشد. با توجه به شکل ۲ که تغییرات شدت فلوئورسانس آنزیم پپسین را درحضور غلظتهای مختلف اوره و دردامنه دمایی ۳۰ تا ۶۰ ^{o}C در pH=۲ نشان می دهد، مشخص است که با افزایش غلظت اوره شدت فلوئورسانس افزایش می یابد، به این مفهوم که آنزیم بازتر شده است پس پایداری پپسین درحضور اوره و pH=۲ کاهش یافته است. در شکل ۴، تغییرات ماکزیمم طول موج نشر آنزیم پپسین در حضور غلظتهای مختلف اوره در pH=۲ و دامنه دمایی ۳۰ تا ۶۰^{o}C آمده است، همانطورکه مشاهده می شود با افزایش غلظت اوره، ماکزیمم طول موج نشر آنزیم افزایش می یابد. نتایج فوق در تطابق کامل با نتایج حاصل از مطالعات اسپکتروفتومتری بوده و مویدکاهش پایداری آنزیم پپسین در حضور اوره می باشد.

جدول۱- پارامترهای ترمودینامیکی بر هم کنش آنزیم پپسین و اوره

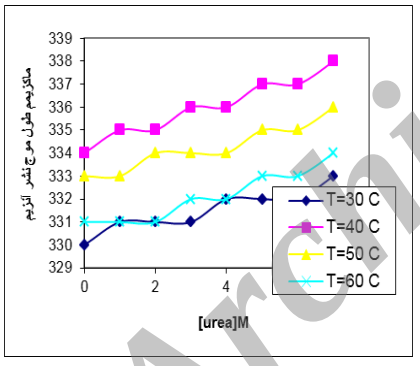
ΔH°_{m} $kJmol^{-1}$	T_m K	ΔS°_{m} $Jmol^{-1}K^{-1}$	M $[urea]$
۲۷۲۰	۳٤۰	۸۰۰۰	۰
۱۵۷۷/۱۰۸	۳۳۸	٤٦٦٦	۱
۱۵۵۰/۰۰۲	۳۳۷	٤٦۰۰	۲
۱۳٤۰	۳۳٦	٤۰۰۰	۳
۱۳٤٤	۳۳٦	٤۰۰۰	٤
۱۰٦۸/۰۰۸	۳۳٤	۳۲۰۰	٥
۸۸۸/۱۰۰	۳۳۳	۲٦٦٦/۷	٦
٦٦۰	۳۳۰	۲۰۰۰	۷

در خصوص دگرگون سازی اوره بر پروتئین ها، دو مکانیسم، توجیه گر توانایی اوره در ناپایدار سازی حالت طبیعی پروتئین های کروی می باشد. در مکانیزم اول اوره با گروههای عاملی زنجیره پلی پپتیدی بر هم کنش داده و ایجاد اتصالات هیدروژنی می نماید (Kraulis,1991). در مکانیسم دوم اوره سبب حلالیت زنجیره های جانبی غیر قطبی مدفون شده در بخشهای داخلی پروتئین با اعمال افزایش اثرات هیدروفوبیک می شود (Smith,2005). اوره سبب کاهش ثابت دی الکتریک حلال شده و به این ترتیب با کاهش میزان قطبیت حلال، تمایل زنجیره های جانبی غیر قطبی مدفون شده، به اینکه در معرض واکنش قرار گیرند، افزایش می یابد و به این ترتیب ساختار پروتئین دچار دگرگونی می شود

Archive of SID

www.SID.ir

(Tobi,Elber&Thirumalia,2003). مطالعات انجام گرفته در مورد بر هم کنش اوره با ترکیبات مدل مانند دی کتو پیپر آزین نمایانگر وجود بر هم کنشهای هیدروژنی بین اوره و گروههای پپتیدی ترکیبات مدل وپروتئینها در محیطهای آبی می باشد (Mcphie, 1998). نتایج حاصل از مطالعات گوناگون بر آنزیم لیزوزیم نمایانگر دگرگون سازی آنزیم فوق در حضور اوره به واسطه هر دو مکانیسم یاد شده می باشد (Antos, Spooner& Ploegh,2009) مطالعه انجام شده در مورد آنزیم پپسین درحضور اوره نشان دهنده کاهش T_m آنزیم است، به این مفهوم که اوره ساختار آنزیم پپسین را ناپایدار کرده است. در pH=۲، T_m آنزیم طبیعی که ۶۷ °C است با افزایش غلظت اوره کاهش می یابد. در غلظت یک مولار اوره به ۶۵ °C، در غلظت دو مولار به ۶۴ °C، در غلظت سه مولار به ۶۳ °C، در غلظت چهارمولار به ۶۳°C، در غلظت پنج مولار به ۶۱°C و در غلظت شش و هفت مولار به ترتیب به ۶۰ و ۵۷ درجه سانتیگراد می رسد. مقادیر ΔS°_m و ΔH°_m برای آنزیم پپسین در غیاب اوره به ترتیب برابر ۲۷۲۰ $kJmol^{-1}$ و ۸۰۰۰ $Jmol^{-1}K^{-1}$ می باشد. با افزایش غلظت اوره، مقادیرفوق کاهش یافته و نهایتاً در غلظت ۷ مولار اوره این مقادیر به ترتیب ۶۶۰ $kJmol^{-1}$ و ۲۰۰۰ $Jmol^{-1}K^{-1}$ خواهد بود. کاهش مقادیر پارامترهای ترمودینامیکی فوق به منزله باز شدن شکل طبیعی آنزیم و کاهش پایداری آن می باشد (Skashi,2006) . با افزایش باز شدگی ساختار آنزیم گروههای آروماتیک نظیر Phe، Trp و Tyr بیشتر در معرض واکنش قرار گرفته و در نتیجه شدت فلوئورسانس افزایش می‌یابد (Nubinstein& Sherman,1997)



شکل۴- تغییرات ماکزیمم طول موج نشر آنزیم پپسین در حضور اوره در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم فسفات و pH=۲

و با توجه به کاهش اختلاف سطح انرژی بین حالتهای پایه و برانگیخته در حضور اوره شاهد افزایش طول موج نشر خواهیم بود. (Huang &Steven,1998) در مجموع می توان عنوان نمود که اوره از یک طرف سبب

Archive of SID

www.SID.ir

کاهش پلاریته حلال و ثابت دی الکتریک آن می شود و از طرف دیگر هم به اتصالات پپتیدی در سطح پپسین متصل می شود (Haq, Gianni & Jemth,2010) و ساختار آنزیم را باز می کند که در نهایت موجب کاهش پایداری آنزیم می شود.

سپاسگزاری

محققین مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی افرادی که در این مطالعه همکاری داشتند اعلام می دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES:

Ana, Paula D. Ano Bom, Monica S. Freitas, and Jerson L. Silva.(2010)The p53 Core Domain Is A Molten Globule at Low pH: J. Biol. Chem285: 2857-2866.

Antos,John M. Eric Spooner, and Hidde L. Ploegh,A(2009) Straight Path to Circular Proteins J. Biol. Chem. 284: 16028-16036.

Cho, Y. K. and Northrop, D.B (1998) Transpeptidation by porcine pepsin catalysed by a noncovalent intermediate unigue to isomechanism .J. Bio. Chem. 273. 24305- 24308.

Fluhrer Regina and Haass Christian (2009) Intramembrane Proteolysis by Signal Peptide Peptidases: A Comparative Discussion of GXGD-type Aspartyl Proteases. J. Biol. Chem. 284: 13975-13979.

Haldar ,Shubhasis and Krishnananda Chattopadhyay(2010). Role of Protein Stabilizers on the Conformation of the olded State of Cytochrome c and Its Early Folding Kinetics: Investigation at single molecular resolution J. Biol. Chem. 285: 25314-25323.

Haq ,S. Raza, Stefano Gianni and Per Jemth,(2010) The Plastic Energy Landscape of Protein Folding: a triangular folding mechanism with an equilibrium intermediate for a small protein J. Biol. Chem. 285: 18051-18059.

Huang Xin, and Steven T. Olson,(2008) Kinetic Characterization of the Protein Z-dependent Protease Inhibitor Reaction with Blood Coagulation Factor Xa J. Biol. Chem. 283: 29770-29783.

Kraulis, P. J. MOLSCRIPT: (1991) A program to produce both detailed and schematic plots of Protein structure. J. Appl. Crystallogr. 24. 946- 950.

Marciniszyn, J.,and Huang, W.T.(1998) Primary structure of porcine pepsin .Journal of Biol .Chem .250, 13. 5076- 5081.

Mcphie, P. A. (1998) spectrophotometric investigation of pepsinogen-pepsin conversion .J. Biol. Chem. 247. 4272- 4281.

Nubinstein, A., Sherman, S. (2004) Influence of the solvent structure on the electrostatic Interactions in proteins. Biophysical Journal. 873. 1544-1557.

Pace, C.N. Shirley, B. A. (1989) Protein Structure: A practical Approch (Creighton, T. E. ed.) 311,120-126.

Schellman, J. A. (2006). Fifty years of solvent denaturation.Biophys.Chem,96, 91-101

Skashi,M.(2006).Probing the Structure of the Infectious Amyloid Form of the Prion-forming Domain of HET-s Using High Resolution Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Mass Spectrometry J. Biol. Chem. 280: 13220-13228.

Smith, f. (2005) Specific Inhibition and Stabilization of Aspergilloglutamic Peptidase by the Propeptide:indentification of critical sequences and residues in the propepeptid J. Biol. Chem. 280: 999-1006.

Tobi,D.,R.Elber and D. Thirumalia, (2003).Water and protein: A love-hate relationship. Biopolymers, 68, 359-369.

Archive of SID

www.SID.ir

Structural study on pepsin stability in the presence of urea

M. Kouhiyan[1*], B.Shareghi[2], F. Kouhiyan[3]

1. MSc of Biochemistry, payam Noor University
2. Associated Professor., shahrekord University
3. MSc of Medical Physic,Isfahan University of Medical Sciences

(Received: Mar. 13, 2012; Accepted: Jul. 11, 2012)

ABSTRACT

Pepsin (E.C.3.4.23.1) is a juice gastric aspartic proteinase. It belongs to hydrolyses family. Its monomeris structure is consisting of two lobes that they are similar in size and folding. It consists of a single polypeptide chain of molecular weight 34644 Daltone and 327 aminoacid. Structural analysis shows that pepsin contains 1.2% basic residues, 13.1% acidic residues, 46.5% polar residues and 39.2% hydrophobic residues. Structural stability of pepsin was investigated by UV-VIS spectrophotometer and spectrophlorimetry. Spectral measurements were made by sodium phosphate buffer .02M at pH: 2 and temperatures between 30 and 100 º C. It was observed that (1) high considerable enzyme stability, (2) enzyme stability decreases in the presence of urea at pH: 2. (3) thermodynamic parameters decline in the presence of urea. (4) Florescence intensity increase in the presence of urea.

Keywords : Denaturation, Pepsin, Urea, Structural stability

Archive of SID

* Corresponding author: Mahbobeh Kouhiyan, Email: m_kouhiyan@yahoo.com

www.SID.ir