

بررسی شرایط اکسیدی ایجاد شده در باکتری گرمادوست *Thermus GH5* بعد از شوک

سرمایی

معصومه یوسفی نژاد^۱، حسین نادری منش^{۲*} و خسرو خواجه^۱

^۱تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

^۲تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک

تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۱۸

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۱۳

چکیده

گرمادوستها موجوداتی هستند که در دمای بالاتر از ۴۵ درجه رشد می کنند و از نظر احتیاجات حیاتی به ترکیبات گوگردی احیاء و محیط های گرم نیاز دارند. اکثر ارگانیزم های گرمادوست از خاکها و آب های حاوی عنصر گوگردی جداسازی شده اند که در اثر فعالیتهای طبیعی زمین گرم هستند. این ارگانیزمها دارای آنزیمها و مسیرهای متابولیکی خاصی هستند که کاربرد وسیعی در بیوتکنولوژی دارند، بنابراین مطالعه بر روی چگونگی زندگی این موجودات ضروری به نظر می رسد. در این مطالعه با استفاده از روش پروتئومیکس محتوای پروتئینهای باکتری ترموس GH5 (جداسازی شده از چشمه های آب گرم زیست بوم ایران (اردبیل در شمال غربی ایران) در شرایط طبیعی (رشد در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد) و شوک سرمایی (رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد) مورد مقایسه قرار گرفت. با توجه به افزایش بیان پروتئینهای آنتی اکسیدانت و درگیر در سم زدایی اکسیداتیو، پدیدار شدن شرایط اکسیداتیو حدود ۸ ساعت پس از شوک سرمایی مشخص گردید. با توجه به کاربرد آنزیمهای آنتی اکسیدانت به عنوان نشانگرهای درمانی و مارکر پروتئینهای و پایداری پروتئینهای ارگانیزمهای ترموفیل، شناسایی و استخراج پروتئینهای شناسایی شده در این مطالعه ضروری به نظر می رسد.

اژگان کلیدی: اکسیداسیون، گرمادوست، شوک سرمایی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۲۸۸۴۴۵۴ پست الکترونیکی: naderman@modares.ac.ir

مقدمه

یوبی کینون را بر عهده دارد. به علت اینکه الکترونهای منتقل شده در زنجیره انتقال الکترون تک ظرفیتی (singlet) هستند، ایجاد اکسیژن فعال در جریان تنفس سلولی یک فرآیند اجتناب ناپذیر است. از طرف دیگر اتواکسیداسیون بین اکسیژنهای مولکولی و فلاوینها نیز منجر به ایجاد رادیکالهای سوپراکسید و هیدروژن پراکسید می گردد (واکنش شماره ۱ و ۲)، این واکنشها در خارج از کمپلکس سیتوکروم اکسیداز صورت می پذیرند (۱۵).



باکتریهای هوازی انرژی مورد نیاز خود را از طریق فسفریلاسیون اکسیداتیو به دست می آورند، بنابراین حضور اکسیژن برای حیات آنها ضروری به نظر می رسد. فرآیند تولید انرژی و فسفریلاسیون اکسیداتیو توأم با احیاء مولکول اکسیژن و تبدیل آن به آب است. این فرآیند با انتقال ۴ الکترون در زنجیره انتقال الکترون همراه می باشد. این جریان الکترونی با انتقال پروتونها (H^+) از طریق غشاء توأم است که منجر به تولید ATP می گردد (۱۸).

سیتوکروم اکسیداز آخرین کمپلکس آنزیمی در زنجیره انتقال الکترون است که نقش احیاء اکسیژن و اکسیداسیون

گرمادوست GH5 (جداسازی شده از چشمه‌های آب گرم اردبیل در شمال غربی ایران)، ۸ ساعت پس از شوک سرمایی با استفاده از روش پروتئومیکس می‌پردازد.

مواد و روشها

مواد: تمامی نوارهای IPG و بافر IPG از شرکت Bio-Rad (از کشور فرانسه) و سایر ترکیبات شیمیایی و معرفها از شرکت سیگما-آلدریچ (از کشور انگلستان) و شرکت مرک (از کشور آلمان) تهیه شده‌اند.

شرایط کشت باکتری و القای شوک سرمایی: باکتری ترموس GH5

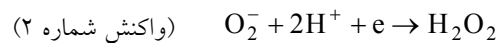
([115521851][DQ973297.1][gb|115521850]gi) از چشمه‌های آب گرم زیست بوم ایران (اردبیل در شمال غربی ایران جداسازی شده و به طور طبیعی قادر به رشد در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد می‌باشد.

در ابتدا یک تک کلونی از پلیت حاوی باکتری ترموس GH5 برداشته و در ۵۰ ml محیط کشت مایع ترموس و در انکوباتور با دمای ۷۵ درجه سانتی گراد و با تکان ۲۰۰ rpm منتقل گردید.

(ترکیبات محیط کشت ترموس عبارتند از ۱۰۰ ml محلول نمکی شماره ۱ و ۱۰ ml محلول نمکی شماره ۲، ۱ gr تریپتون، ۱ gr عصاره مخمر، ۱۷ mM FeCl₃ × 6H₂O، pH محلول فوق بر روی ۷/۸ تنظیم شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو گردید.

محلول نمکی شماره یک: 1 gr (C₆H₉NO₆), 0.6 gr CaSO₄ × 2H₂O, 1 gr MgSO₄ × 7H₂O, 0.08 gr NaCl, 1.03 gr KNO₃, 6.89 gr NaNO₃, 1.11 gr Na₂HPO₄, حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر.

محلول نمکی شماره دو: 0.22 gr MnSO₄ × H₂O, 0.05 gr ZnSO₄ × 7H₂O, 0.05 gr H₃BO₃, 0.0025 gr CuSO₄ × 5H₂O, 0.0025 gr Na₂MoO₄ × 2H₂O, 0.0046 gr CoCl₂ × 6H₂O در حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر)



همچنین هیدروژن پراکسید نیز با یونهای فلزی واکنش داده و باعث ایجاد رادیکالهای هیدروکسیل می‌شود (۱۱).

(واکنش شماره ۳)

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^+ / \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ \rightarrow \text{OH}^\circ + \text{H}_2\text{O} + \text{Cu}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$
رادیکالهای هیدروکسیل بسیار فعال‌تر از اکسیژنهای فعال هستند (۲). ترکیباتی نظیر H₂O₂، O₂⁻ و OH[°] که دارای اکسیژن فعال هستند (ROS) و در نتیجه تنفس هوازی و متابولیسم ایجاد می‌شوند را اکسیدانت درون‌زا (endogenous oxidant) می‌نامند (۱۰). اگر سلول قادر به ایجاد تعادل بین میزان تولید ROS (Reactive Oxygen Species) و سم زدایی و حذف ROS نباشد سلول وارد شوک اکسیداتیو می‌گردد.

رادیکالهای سوپراکسید موجب تخریب محل قرارگیری فلز در آنزیمهای حاوی فلز و به خصوص آنزیمهای دارای کلاستر آهن می‌گردند و یا با یک مرتبه اکسید کردن فلز باعث غیر فعال کردن آنزیم می‌گردند (۶). همچنین ROS در پروتئینهای فاقد فلز با اکسیداسیون گروه تیول و ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی باعث تخریب و غیر فعال شدن آنها می‌گردد. رادیکالهای هیدروکسیل همچنین باعث شکست DNA دو رشته‌ای نیز می‌شوند (۱۲). از طرف دیگر اتصال فلزات گروههای واسطه به پروتئینهایی نظیر فریتین - ترانسفرین - آلبومین از مکانیزمهای حفاظتی در برابر ROS است (۱۶)، آنتی اکسیدانهایی با وزن مولکولی پایین نظیر آلفاتوکوفرول (ویتامین E) آسکوربیک اسید (ویتامین C) و اسیداوریک از شکست رشته‌ها و تخریب آنها جلوگیری می‌کنند (۹). در نهایت باکتری در پاسخ به ROS درون‌زا (endogenous ROS) اقدام به بیان آنزیمهایی نظیر سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز، آنزیمهای سیستم تیوردکسین، آلکیل هیدروپراکسیدردوکتاز می‌کند که موجب سم زدایی و حذف ROS از محیط می‌گردد. مطالعه حاضر به بررسی تغییر بیان آنزیمهای آنتی اکسیدانت باکتری

ترکیبات ناخواسته بود دور ریخته و رسوب پروتئینهای برای مرحله بعد جداسازی شد. در مرحله بعدی هم حجم یا کمی بیشتر محلول استون سرد حاوی DTT ۰/۱ درصد به رسوب پروتئینهای افزوده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد و سپس با دور ۱۵۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مجدداً به رسوب حاصل هم حجم استون سرد افزوده پیتاژ کرده، سوسپانسیون ایجاد شده در دمای ۲۰- به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و به دنبال آن به مدت ۳۰ دقیقه به دور ۱۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شد و در نهایت برای آخرین بار به رسوب حاصل هم حجم محلول استون سرد حاوی DTT ۰/۱ درصد افزوده و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد با دور ۱۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شد، محلول رویی کاملاً جداسازی شده و به رسوب پروتئینهای لیز بافر افزوده و دوباره حل گردید. محتوای لیز بافر عبارت است از: ۷ مولار اوره، ۲ مولار تیوره، ۴ درصد چپس، ۱ درصد ۱۰-۱۳ IPG buffer pH، ۵۰ میلی مولار DTT.

محتوای پروتئینهای نمونه های حاصل شامل نمونه های مربوط به گروه کنترل و شوک سرمایی با روش بردفورد محاسبه شد.

الکتروفورز دوبعدی: به منظور باز آبدهی و ایزوالکتروفوکوسینگ برای استریپ ۱۷ سانتیمتری با pH 4-7، 4-7 mg ۱/۵ از نمونه را با بافر باز آبدهی (2 M urea, 7 M thiourea, 4% CHAPS, 1% IPG buffer pH 4-7, 50 mM DTT) به حجم ۳۵۰ μ l رسانده و استریپ ۱۷ Cm با شیب pH 4-7 در آن خیسانده و پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق به دستگاه ایزوالکتروفوکوسینگ منتقل شد.

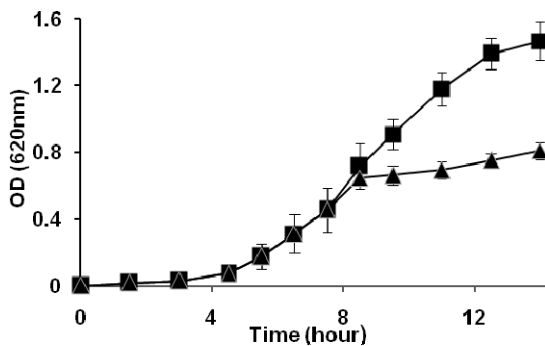
پس از اتمام IEF، نوارهای استریپ ابتدا در بافر تعادل ۱ شامل: ۶ میلی لیتر بافر پایه (تریس ۱/۵ مولار pH=۸/۸، اوره ۶ مولار، SDS ۲ درصد، گلیسرول ۲۰ درصد، ۱۰۰ میلی لیتر آب میلی کیو) و ۱۲۰ میلی گرم DTT و سپس در

بعد از ۱۶ ساعت و رسیدن OD₆₂₀ nm به ۰/۶، یک میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی به هر یک از ۶ فلاسک ۱۰۰ میلی لیتری محیط کشت ترموس افزوده شد. فلاسکهای مذکور به دو گروه سه تایی کنترل و شوک سرمایی نامگذاری و در انکوباتور با تکان ۲۰۰ rpm نگهداری شدند و هر ۱/۵ ساعت یکبار OD فلاسکها توسط اسپکتروفنومتر ثبت شد. پس از رسیدن OD₆₂₀ nm به حدود ۰/۶ سه فلاسک گروه کنترل به منظور رسوب گیری باکتریهای محتوی آنها جداسازی و سایر فلاسکها به حمام آب با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد با تکان ۲۰۰ rpm منتقل گردید. فلاسکهای مذکور ۸ ساعت بعد از انکوبه شدن در شرایط فوق به منظور رسوب گیری باکتریهای محتوی آنها جداسازی و با دور ۴۰۰۰g به مدت ۲۰ و ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. رسوبهای باکتریایی حاصل از سانتریفیوژ محیطهای کشت سه مرتبه با محلول بافر TE شامل: ۱۰ mM تریس، ۰/۱ mM EDTA، ۱ mM PMSF و سوکروز ۲۵۰ mM با pH: ۷-۸ شسته شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند.

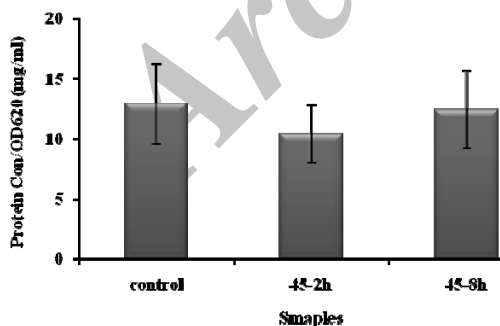
لیز سلولی و تهیه محتوای سلولی: به رسوبات باکتریایی حاصل از مراحل فوق با حجم مساوی تریس ۲۰mM، ۰/۱ mM PMSF افزوده شد و به مدت ۵ دقیقه به فاصله ۳۰ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی گراد تحت سونیکاسیون قرار گرفتند. به محتوای سلولی حاصل Dnase 70 u/ml و Rnase H 50 u/ml افزوده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت محتوای سلولی حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۵۰۰۰ g سانتریفیوژ و سوپ رویی جداسازی شد.

به محتوای سلولی جداسازی شده TCA ۱۰ درصد و DTT ۰/۱ درصد افزوده و به مدت یک شب در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت نیم ساعت با دور ۱۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. محلول رویی که حاوی اسیدهای نوکلئیک، نمکها و سایر

شوک سرمایی نیز به طور مرتب میزان جذب فلاسکها ثبت شد و بدین ترتیب نمودار رشد باکتریها در حالت رشد در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد و شوک سرمایی (۴۵ درجه سانتی گراد) رسم گردید (شکل ۱).



شکل ۱- نمودار رشد باکتریها در حالت رشد در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد (■) و بعد از شوک سرمایی ۴۵ درجه سانتی گراد (▲) محتوای پروتئینهای هر یک از گروههای کنترل و شوک سرمایی (۸ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد) استخراج و تعیین غلظت شدند. نمودار مربوط به متوسط غلظت نمونه‌های فوق در شکل ۲ نمایش داده شده است. با توجه به شکل ۲ میزان غلظت پروتئینها و در نتیجه میزان بیان پروتئینها در نمونه شوک زود هنگام نسبت به گروه کنترل کاهش یافته، در حالی که در حالت شوک دیر هنگام (۸ ساعت پس از شوک سرمایی) تفاوتی با نمونه کنترل مشاهده نمی‌شود.



شکل ۲- نمودار مربوط به متوسط غلظت پروتئینها در نمونه‌های گروههای کنترل (۷۵ درجه سانتی گراد) و شوک سرمایی (۲h و ۸h) انکوبه در ۴۵ درجه سانتی گراد) برای شروع IEF به منظور افزایش وضوح و جداسازی بهتر پروتئینها از ژل ۱۷ سانتیمتری و pH با شیب غیر خطی ۴

بافر تعادل ۲ شامل: ۶ میلی لیتر بافر پایه و ۱۵۰ میلی گرم یدواستامید، هر کدام به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. پس از اتمام مرحله تعادل سازی، نوارهای استریپ بر روی ژل آکریل آمید ۱۵ درصد قرار گرفت.

پس از تکمیل الکتروفورز بعد دوم، ژلها تحت رنگ آمیزی با کوماسی بریلیانت بلو G250 قرار گرفتند.

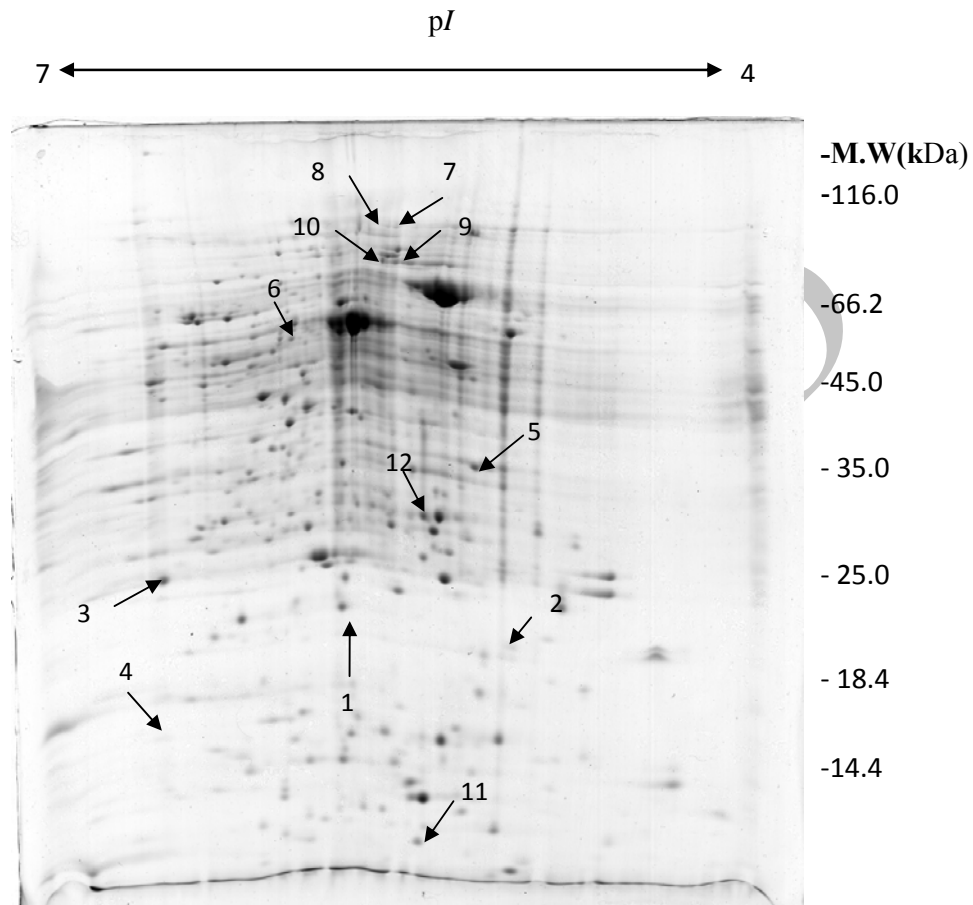
از ژلها توسط اسکنر GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad, USA) با بالاترین کیفیت و تصویر با فرمت tif و تفکیک پذیری 600 dpi تصویر برداری شد. با استفاده از تصاویر ژلها و نرم افزار Progenesis PG240 طی مراحل Spot detection, Filtering, Editing و Matching آنالیز ژلها صورت پذیرفت و نرم افزار از نقطه‌هایی که دچار تغییر بیان شده بودند گزارش تهیه کرد. با توجه به داده‌های نرم افزار نقطه‌هایی با $p < 0.05$ که بیان آنها بیش از دو برابر کاهش یا افزایش یافته بود شناسایی و جداسازی شده و برای طیف سنجی جرمی (tandem mass spectroscopy, MALDI TOF/TOF) ارسال شدند. اطلاعات حاصل از PMF و MS/MS به طور خودکار با استفاده از نرم افزار Mascot و اتصال به موتور جستجوی NCBI بررسی و پروتئینها شناسایی شدند. بررسی جرم پپتیدها با استفاده از Mascot و با خطای ۱/۲ دالتون در وزن مولکولی برای هر یون و ۰/۵ دالتون برای قطعات یونی انجام شد.

نتایج حاصل از طیف سنجی جرمی با کمک پایگاههای اطلاع رسانی EMBL, GenBank, DDBJ, Uniport, PIR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

در ابتدا باکتری به محیطهای کشت مایع ترموس در دو گروه کنترل و شوک سرمایی منتقل و در انکوباتور با دمای ۷۵ درجه سانتی گراد منتقل و هر ۱/۵ ساعت یکبار OD فلاسکها توسط اسپکتروفتومتر ثبت شد. همچنین پس از

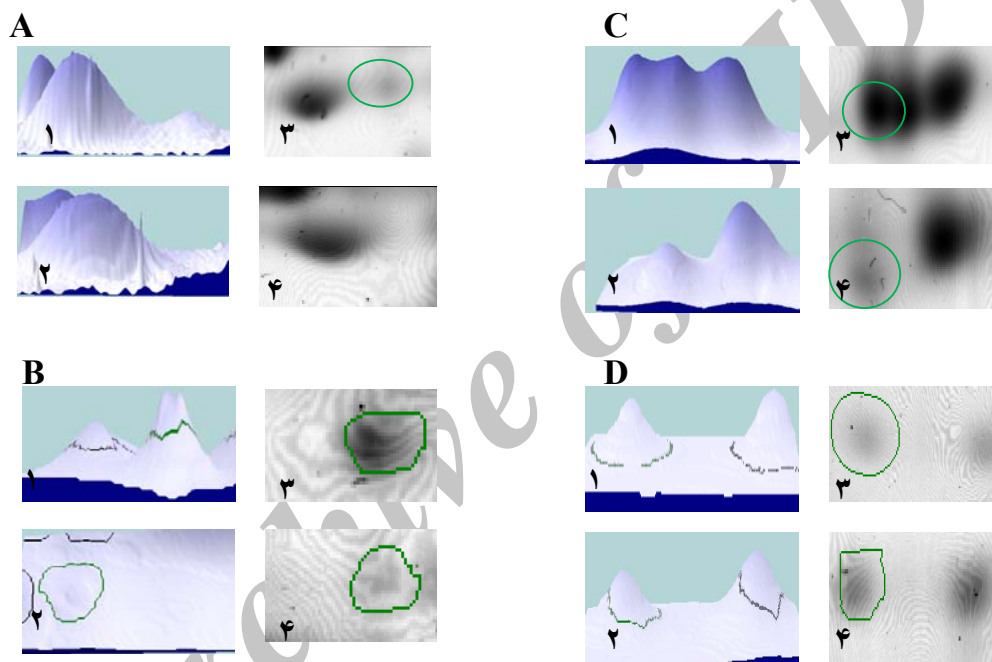
تا ۷ استفاده شد. شکل ۳ ژل الکتروفورز دوبعدی میانگین از نمونه‌های شوک سرمایی مورد بررسی با استفاده از نوار استریپ ۱۷ سانتیمتری و pH 4-7 با استفاده از رنگ آمیزی کوماسی بلو را نشان می‌دهد.



شکل ۳- ژل الکتروفورز دوبعدی میانگین از نمونه‌های شوک سرمایی، پیکانها لکه‌هایی را که نسبت به ژل کنترل افزایش بیان داشتند را نشان می‌دهند
جدول ۱- اطلاعات مربوط به لکه‌های شناسایی، جداسازی و تعیین هویت شده از نمونه شوک سرمایی

Description	Accession No.	Protein Score %	Sequence coverage %	Fold-change	Theoretical MW/pI	
1	MOSC domain	gi 53803397	52.2	54.5	2.25±0.2	23.22/6.25
2	thioredoxin	gi 46198532	99.41	14.89	2.05±0.16	21.36/5.13
3	Superoxide dismutase	gi 22135439	100	79.21	2.42±1.1	20.23/6.42
4	Alkyl hydroperoxide reductase	gi 218295122	99.58	24.20	2.294	17.54/5.97
5	Thioesterase superfamily protein	gi 218294714	100	40.8	3.53±0.9	13.32/6.75
6	Phenylacetate- CoA ligase	gi 218295392	100	44.72	2.27±0.2	49.46/5.69

7	DNA gyrase subunit A	gi 46198565	95.99	16.18	4.37±1.8	92.48/5.89
8	ATP-dependent Chaperone ClpB	gi 218297177	99.99	22.7	3.36±1.6	95.95/5.69
9	Chaperone protein dnaK	gi 46199429	100	56.26	2.82±0.41	66.81/5.3
10	Heat shock protein 68	gi 34420084	63.3	45.32	3.12	69.12/5.7
11	10 kDa chaperonin	gi 50514047	100	79.20	5.73± 1.4	10.99/5.27
12	Chain A ribose-5phosphate isomeraseA	gi 51247841	100	62.99	2.62±0.91	24.04/5.06



شکل ۴- تفاوت بیان پروتئینهای (A) OSMC، (B) تیوردکسین، (C) سوپراکسید دیسموتاز و (D) آلکیل هیدروپراکسیداز در دو گروه کنترل (۷۵ درجه سانتی گراد) و نمونه (۴۵ درجه سانتی گراد). ۱ و ۲ بترتیب تصویر سه بعدی لکه‌های پروتئینهای را در دو ژل نمونه (۸h) و ۱ کنترل ۲ نشان می‌دهد. ۳ و ۴ مقایسه لکه‌های پروتئینهای در دو ژل نمونه (۸h) و ۳ کنترل را به نمایش می‌گذارد.

عنوان ژل مرجع انتخاب شد. پروتئینهای موجود در نمونه با پروتئینهای حاضر در ژل مرجع مطابقت داده شدند. در انتها از ژل‌های نمونه و کنترل به طور جداگانه، میانگین گرفته شد، به طوری که کلیه نقاط حاضر در ژل‌های نمونه و کنترل به طور میانگین منظور شدند. به طور متوسط ۱۱۴۱ لکه پروتئینهای در ژل‌های میانگین گروه‌های کنترل و ۷۰۹ لکه پروتئینهای در گروه ۸ h شناسایی شد. بررسیهای آماری شامل انحراف معیار و t -test ($p \leq 0.05$) بر روی داده

آنالیز نرم‌افزاری: بررسی تغییرات رخ داده در بیان پروتئینها توسط نرم افزار PG 240 و با استفاده از تصاویر حاصله از ژلها صورت پذیرفت. نمونه‌های کنترل و ۸ ساعت مورد مقایسه قرار گرفته و مراحل تصفیه (filtering) و ویرایش (editing) لکه‌های پروتئینهای پس از شناسایی تمامی نقاط پروتئینهای نمایان بر روی ژلها انجام شد (از هر نمونه سه ژل مورد آنالیز قرار گرفت). نقاط شماره‌گذاری شده و کاملترین ژل‌ها با بیشترین نقاط پروتئینهای در هر گروه با

در سلول جلوگیری کند. در هر حال اگر میزان تولید ROS در سلول بیشتر از سم زدایی و حذف این ترکیبات در سلول باشد سلول وارد شوک اکسیداتیو می‌شود (۸). از جمله پروتئینهای آنتی اکسیداتی که در این مطالعه در اثر شوک سرمایی افزایش بیان نشان دادند می‌توان سوپراکسید دیسموتاز را نام برد. این آنزیم واکنش تبدیل رادیکالهای سوپراکسید به پراکسید هیدروژن را کاتالیز می‌کند که در ادامه کاتالاز نیز تبدیل پراکسید هیدروژن به آب را کاتالیز می‌نماید و بدین ترتیب یونهای مضر سوپراکسید و هیدروکسیل از محیط حذف می‌شوند (۱، ۱۳). تیوردکسین از دیگر پروتئینهای شناسایی شده است که عضوی از سیستم تیوردکسین است. تیوردکسین و تیوردکسین رودکناز سیستم تیوردکسین را تشکیل می‌دهند که با استفاده از الکترونهای NADPH باعث احیای پلهای دی سولفیدی ایجاد شده در اثر شرایط اکسیداتیو در پروتئینها می‌شود. تیوردکسین‌ها نه تنها در احیای پروتئینهای سیتوپلاسمی درگیر هستند بلکه مستقیماً H_2O_2 را نیز احیاء می‌کنند (۱۳، ۱۷). تیوردکسین‌ها همچنین به عنوان خاموش کننده اکسیژنهای منفرد (singlet oxygen) و پاک کننده‌های محیط از رادیکالهای هیدروکسیل (۵) و دهنده گروه هیدروکسیل به پراکسیدها عمل می‌کنند (۳) که از مهم ترین عملکرد آنها در شوک اکسیداتیو است. سایر پروتئینهای درگیر در پاسخهای شوک اکسیداتیو نظیر سوپراکسید دیسموتاز، هیدروژن پراکسیداز I و آلکیل هیدروپراکسید ردوکتاز که در تنظیم پاسخهای شوک اکسیداتیو نقش کلیدی دارند همگی به نوعی با تیوردکسین در ارتباطند (۱۴).

آلکیل هیدروپراکسیدردوکتاز (Ahp) از دیگر پروتئینهایی است که در شوک سرمایی افزایش بیان نشان می‌دهد. این آنزیم یک دی سولفید اکسیدردوکتاز است که قادر به سم‌زدایی هیدروپراکسیدهای آلی و تبدیل آلکیل هیدروپراکسیدها به الکلها می‌باشد. مربوطه است

$$(ROOH + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O)$$

های مربوط به پس زمینه و مقادیر نرمال (Normal volume) هر نقطه پروتئینهای در ژلهای میانگین انجام گرفت. در مجموع ۱۲ لکه پروتئینهای از میان پروتئینهایی که تغییرات بیانی معنادار داشتند انتخاب و جداسازی شدند که در شکل ۳ و جدول ۱ گزارش شده‌اند.

از جمله پروتئینهایی که در این شرایط افزایش بیان نشان دادند می‌توان سوپراکسیددیسموتاز، تیوردکسین، آلکیل-هیدروپراکسیدردوکتاز و MOSC را نام برد. این پروتئینها آنتی اکسیدانت‌هایی هستند که در کنترل شرایط اکسیداتیو نقش دارند. شکل ۴ تفاوت بیان این پروتئینها را در دو گروه کنترل (۷۵ درجه سانتی گراد) و نمونه (۴۵ درجه سانتی گراد) نشان می‌دهد.

بحث

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که با کاهش ناگهانی دما از ۷۵ به ۴۵ درجه سانتی گراد و مواجه شدن باکتری با شوک سرمایی در ساعات اولیه شوک سرمایی، رشد باکتری متوقف می‌شود. اما با گذشت زمان به تدریج بر سرعت رشد باکتری افزوده می‌گردد به طوری که ۸ ساعت پس از شوک سرمایی، رشد باکتری سیر صعودی به خود می‌گیرد و باکتری از فاز رشد تأخیری وارد فاز رشد لگاریتمی می‌شود. مقایسه پروتئوم باکتری در این شرایط با پروتئوم گروه کنترل یعنی باکتری که در بهینه درجه حرارت رشد خود یعنی ۷۵ درجه سانتی گراد قرار دارد، افزایش بیان پروتئینهای آنتی اکسیدانت در گروه نمونه (۴۵ درجه سانتی گراد) را نشان می‌دهد. این خود بیانگر ایجاد شرایط اکسیداتیو در حالت سازگاری با شوک سرمایی است. مشاهدات نشان می‌دهد که با ورود باکتری از فاز سکون به فاز رشد میزان ترکیبات با اکسیژن فعال (ROS) از جمله پراکسید هیدروژن ۱۰-۵ برابر افزایش می‌یابد (۷) و باکتری به منظور کنترل شرایط اکسیداتیو اقدام به بیان پروتئینهایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، تیوردکسین و آلکیل هیدروپراکسیداز می‌کند تا از تجمع ترکیبات مضر

ورود سلول به شوک اکسیداتیو می‌گردد. در همین راستا سلول به منظور حفظ حیات خود با تولید آنتی‌اکسیدانها اقدام به سم زدایی و حذف ROS از محیط می‌نماید. با توجه به کاربرد آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت به عنوان نشانگرهای درمانی و مارکر پروتئینهای و پایداری پروتئینهای ارگانیزمهای ترموفیل شناسایی و استخراج پروتئینهای شناسایی شده در این مطالعه ضروری به نظر می‌رسد.

Ahp کاتالاز نیست اما توانایی حذف کلیه پراکسیدهای تولید شده در سلولها دارد. این آنزیم فرم پروکاریوتی گلوکاتیون پراکسیداز پستانداران است (۴).

با توجه به توضیحات بالا می‌توان نتیجه گرفت که در شرایط شوک سرمایی که بیشتر تمرکز سلول بر تولید انرژی و متابولیسم پایه و در نتیجه فعال شدن هر چه بیشتر زنجیره انتقال الکترون است تجمع هر چه بیشتر ترکیبات با اکسیژن فعال ROS در سلول مشاهده می‌گردد که باعث

منابع

- شبان، لایلا. احسان‌پور، علی اکبر. (۱۳۸۸) القاء آنزیمهای آنتی-اکسیدان، ترکیبات فنولیک و فلاونوئید در کشت در شیشه شیرین pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *Faseb J* 3: 2574-2582
- Brumaghim, J.L. Li, Y. Henle, E. and Linn, S. (2003) Effects of hydrogen peroxide upon nicotinamide nucleotide metabolism in *Escherichia coli*: changes in enzyme level and nicotinamide nucleotide pools and studies of the oxidation of NAD(P)H by Fe(III). *J Biol Chem* 278: 42495-42504
- Chae, H.Z. Chung, S.J. Rhee, S.G. (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 269:27670-27678
- Costa Seaver, L. and Imlay, J.A. (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 7173-7181
- Das, K.C. & Das, C.K. (2000) Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions. *Biochem Biophys Res Commun* 277:443-447
- Flint, D.H. Tuminello, J.F. and Emptage, M.H. (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* 268: 22369-22376.
- Gonzalez-Flecha, B. and Demple, B. (1995) Metabolic Sources of Hydrogen Peroxide in Aerobically Growing *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 270, 13681-13687
- Gonzalez-Flecha, B. and Demple, B. (1997) Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 179, 382-388.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford
- Hassett, D.J. and Cohen, M.S. (1989) Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for
- شبان، لایلا. احسان‌پور، علی اکبر. (۱۳۸۸) القاء آنزیمهای آنتی-اکسیدان، ترکیبات فنولیک و فلاونوئید در کشت در شیشه شیرین
- Imlay, J.A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57: 395-418
- Imlay, J.A. Chin, S.M. and Linn, S. (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science* 240: 640-642.
- Kang, S.W. Chae, H.Z. Seo, M.S. Kim, K. Baines, I.C. Rhee, S.G. (1998) Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 273:6297-6302
- Kumar, J.K. Tabor, S. Richardson, C.C. (2004) Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3759-3764
- Messner, K.R. and Imlay, J.A. (1999) The Identification of Primary Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation in the Aerobic Respiratory Chain and Sulfite Reductase Complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274: 10119-10128.
- Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense *Eur. J. Biochem*, 215, 213-219
- Spector, A. Yan, G.Z. Huang, R.R. Mc Dermott, M.J. Gascoyne, P.R. Pigiet, V (1988) The effect of H₂O₂ upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells. *J Biol Chem* 263:4984-4990
- Storey, K. B. (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29, 1715-1733.

Investigation of oxidative condition after cold shock stress on thermophilic bacterium, *Thermus* sp. GH5

Yousefi-Nejad M.¹, Naderi- Manesh H.² and Khajeh Kh.¹

¹ Biochemistry Dept., Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

² Biophysics Dept., Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Thermophiles are a group of microorganisms that optimally grow at temperatures above 45 °C. Reduced sulfur and warm condition are essential for their life and have been found in both terrestrial and marine environments which are heated by geothermal activities. Thermophiles have special enzymes and metabolic characteristics that are used in biotechnology. Since thermophiles live in stressful environments it will be very useful to study their survival mechanisms. In this study cell extract from bacteria (*Thermus* sp. GH5, that is isolated from Ardabil (North West of Iran)) in normal condition (growth at 75 °C) and cold shock condition (growth at 45 °C) were compared. Up-regulated antioxidant proteins and the proteins involved in detoxification showed the creation of oxidative condition about 8 hour after cold shock on thermophilic bacterium. It is possible to extract and use of these stable proteins as diagnostic indicators or protein markers in physiological condition or use in the industrial applications.

Keywords: Cold Shock, Oxidation, thermophil.