

خالص سازی آنزیم کاتپسین D از لوکوسیت های انسان و بررسی آن

فخرالملوک رضوی *

دکتر ناصر ملک نیا *

دکتر بیژن فرزانی *

آنزیم کاتپسین (Ec 3. 4. 4. 23 D) یک آنزیم پروتئاز لیزوزومی و از دسته آسپارتیک پروتئازهاست. تاکنون چندان مورد توجه محققین نبوده، اما به علت اثرات فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی آن، از جمله هضم داخل سلولی پروتئین ها توسط ماکروفاژ، شکستن ماتریکس خارج سلولی غضروف و تجمع در سلولهای انتهایی و بخصوص افزایش میزان فعالیت آن در سرطان پستان، از اهمیت بسزایی برخوردار است. هدف از این تحقیق، جداسازی این آنزیم در طی سه مرحله از لوکوسیت های انسان است که با عمل کروماتوگرافی تعویض یون با DE-52 جداسازی اسید پروتئازها، انجام شد و بعد از زل کروماتوگرافی با سفادکس G-200 جداسازی کامل گردید و یک تک باند به روی زل پلی اکریل آمید و یک پیک تک شارپ در ناحیه ۲۸۰ nm و مهار کامل فعالیت آن توسط مهارکننده اختصاصی کاتپسین D، نشان دهنده جداسازی کامل این آنزیم بود.

واژه های کلیدی: آنزیم کاتپسین D؛ لوکوسیت های انسان؛ خالص سازی.

*- کارشناس ارشد بیوشیمی و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

*- فوق دکترای بیوشیمی و استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران

*- دکترای بیوشیمی و استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

تاکنون محققین تحقیقات فراوانی را در مورد خالص سازی بسیاری از آنزیم ها انجام داده اند اما در این میان، بررسی بر روی گروهی از آنزیم ها، مانند آنزیم کاتپسین D با توجه به ارزش های کلینیکی آن چندان مورد توجه نبوده است.

آنزیم کاتپسین D، یک آنزیم پروتئاز لیزوزومی است که ابتدا به فرم پیش ساز¹ یا پروکاتپسین D سنتز شده و این فرم پیش ساز، بعد از اسیدی شدن محیط، از فرم غیرفعال پروکاتپسین D به شکل فعال کاتپسین D تبدیل شده و باعث هضم داخل سلولی پروتئین ها توسط ماکروفاژ، شکستن ماتریکس خارج سلولی غضروف می شود. بر اساس نتایجی که اخیراً بوسیله محققین بدست آمده است، آزاد شدن پروتئازها به محیط خارج سلولی توسط سلولهای بدخیم، بیشتر از میزان آنها توسط سلولهای طبیعی است. در این زمینه آنزیم کاتپسین D را در سلولهای تومری بررسی کرده اند و افزایش میزان آن را در سرطان پستان و همچنین در آرتريت روماتوئید و سندرم نفروتیک نیز تأیید کرده اند. آنزیم کاتپسین D (EC) نماینده آنزیم های Carboxyl dependent class of endopeptidase است. و از کاتپسین D طحال خوک، 6 ایزوآنزیم بدست آمده است و 5 ایزوآنزیم آن (V تا I) دارای وزن ملکولی $Mr = 50000$ دالتون و یک ایزوآنزیم آن (HMW) دارای وزن ملکولی 100000 دالتون است که ایزوآنزیم ها از I تا IV)، هر کدام دارای دو زنجیره پلی پپتیدی هستند:

۱ - یک زنجیره سنگین با $Mr = 350000$

۲ - یک زنجیره سبک با $Mr = 150000$

آنزیم کاتپسین D، توسط مهارکننده هایی مانند دی آزاوستیل و نورولوسین مهار می شود. اما علاوه بر آن، دارای مهارکننده اختصاصی به نام Pepstatin است؛ به طوری که Pepstatin در غلظت $M = 10^{-7} \times 5$ به طور کامل (۱۰۰ درصد) کاتپسین D را مهار می کند. با توجه به هزینه زیاد جهت تهیه این آنزیم و ارزش کلینیکی آن، می توان به اهمیت خالص سازی آن پی برد.

روش پژوهش

جداسازی آنزیم کاتپسین D، از لوکوسیت های خون انسان طی سه مرحله صورت گرفت؛ در مرحله اول با اضافه کردن ۳/۵ میلی لیتر دکستران ۷ gr/ml به ازای هر میلی لیتر خون، بعد از ۶۰ دقیقه، گلبولهای سفید در فاز پلاسمایی جدا شده و بعد از عمل سانتریفوژ گلبولهای سفید رسوب کردند و عمل هموژنیزاسیون (900 u/min در ۵ نوبت در پریود زمانی ۱ دقیقه) انجام شد و سپس طی دو مرحله سانتریفوژ افتراقی، گرانولها از سایر اجزاء هسته جدا شدند و بعد از جدا کردن رسوب، ۳ میلی لیتر بافر تریس کلراید ۵۰ میلی مولار ($PH = 7/8$) حاوی Tritonx-100 یک درصد، جهت پاره کردن دیواره گرانولها اضافه گردید و سپس با استن سرد ۷۵ v/v درصد و سانتریفوژ به مدت ۴ دقیقه پروتئین ها رسوب کرد و عمل دیالیز محلول آنزیمی بر علیه EDTA Tris Hclbuffer به مدت ۲۴ ساعت و سپس بر علیه Tris Hdbuffer به مدت ۲۴ ساعت انجام شد و مرحله دوم کروماتوگرافی تعویض یون با استفاده DEAE-52 بر روی ستون کروماتوگرافی به ابعاد (۳۰*۱) mi/hv و Flow rate = ۱/۸ و فراکسیون های ۴ ml انجام شد و در هر مرحله جداسازی با استفاده از گرادیان پله ای با افزایش غلظت نمک طعام انجام گردید.

با افزایش قدرت یونی بوسیله افزایش غلظت نمک در حلال بافر تریس کلراید ($PH = 7/8$)، باعث سست شدن اتصالات و خروج مرحله ای مواد از ستون گردید که در مرحله اول با غلظت ۳۵ میلی مولار neutral protease جدا شد و پس از غلظت

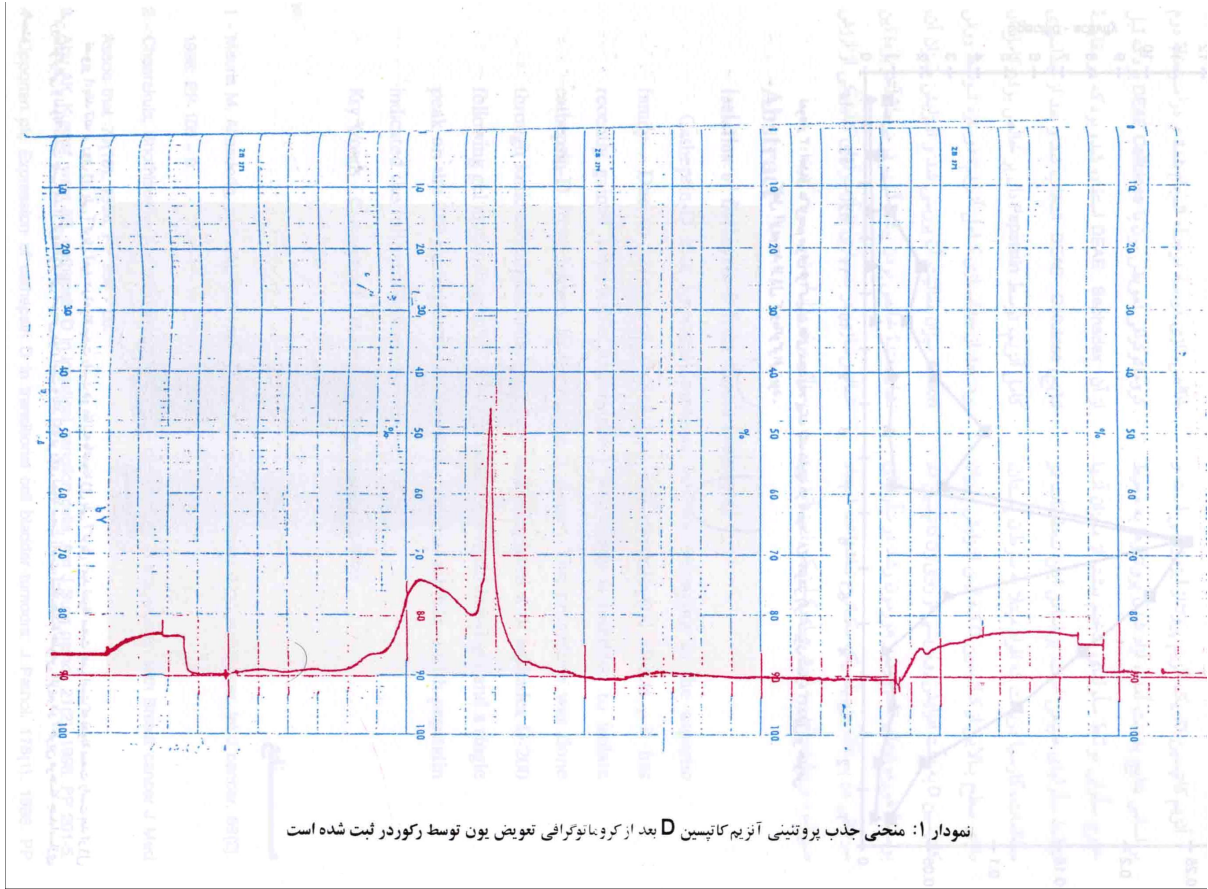
1 - Zymogen

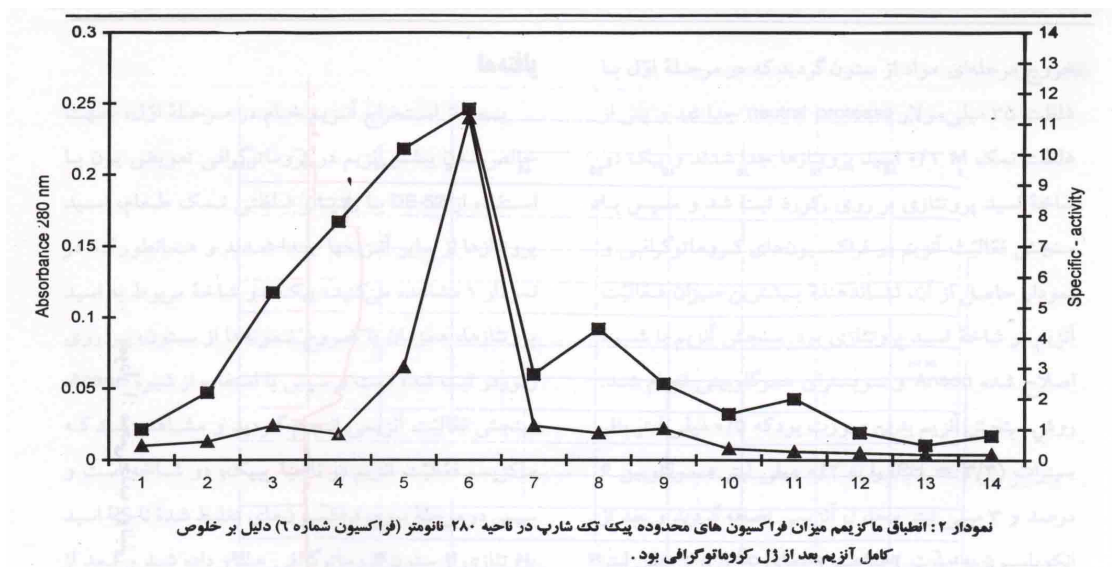
نمک M ۰/۱ اسید پروتئازها جدا شدند و پیک دو شاخه اسید پروتئازی بر روی رکورد ثبت شد و سپس با سنجش فعالیت آنزیم در فراکسیون های کروماتوگرافی و نمودار حاصل از آن، نشان دهنده بیشترین میزان فعالیت آنزیم در شاخه اسید پروتئازی بود. سنجش آنزیم با شیوه اصلاح شده Anson و سوبسترای هموگلوبین انجام شد. روش سنجش آنزیم بدین صورت بود که ۰/۵ میلی لیتر بافر سترات (PH=۳/۳) را به ۰/۲ میلی لیتر هموگلوبین ۶ درصد و ۳ میلی لیتر محلول آنزیمی اضافه گردید و بعد از انکوباسیون به مدت ۲ ساعت و دمای °C ۳۸، ۲ میلی لیتر کلرواستیک اسید سرد ۰/۳ N را مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی را جدا کردیم و بعد از تهیه بلانک، اختلاف جذب نوری محلول ۲۸۰ nm و بلانک بعنوان فعالیت پروتئازی مشخص کرده و سپس میزان فعالیت آنزیمی را بر mg/ml پروتئین که (توسط روش لوری اندازه گیری شد) تقسیم نمودیم و فعالیت مخصوص را بدست آوردیم.

سپس در مرحله سوم کروماتوگرافی بسیار حساس تری با سفادکس G-۲۰۰ بر روی ستون به ابعاد (۶۰ × ۱۰۶ cm) و Flowrate = ۱/۸ ml/hr در فراکسیون های ۲ میلی لیتری به مدت ۴۸ ساعت انجام شد و سپس با انطباق فراکسیون های محدوده پیک تک شارپ در ناحیه ۲۸۰ نانومتری که با پیک تک آنزیمی دال بر جداسازی کامل آنزیم بود و همراه با آن، مشاهده باند تک بر روی ژل پلی اکریل آمید و مهار کامل توسط Pepstatin دال بر جداسازی کامل آنزیم بود.

یافته ها

بعد از استخراج آنزیم خام در مرحله اول، جهت خالص شدن بیشتر آنزیم در کروماتوگرافی تعویض یون با استفاده از DE-۵۲ با رادیان غلظتی نمک طعام، اسید پروتئازها از سایر آنزیمها جدا شدند و همانطور که در تصویر (۱) مشاهده می کنید، پیک، دو شاخه مربوط به اسید پروتئازها، همزمان با خروج نمونه ها از ستون، بر روی رکورد ثبت شده است و سپس با استفاده از شیوه Anson، سنجش فعالیت آنزیمی انجام گردید و مشاهده شد که ماکزیم فعالیت آنزیم در ناحیه پیک دو شاخه است و سپس در مرحله سوم، فراکسیون های تغلیظ شده ناحیه اسید پروتئازی از ستون کروماتوگرافی عبور داده شد و بعد از عمل کروماتوگرافی با Sephadex G-۲۰۰ به مدت ۴۸ ساعت، پیک تک آنزیمی حاصل از جمع آوری فراکسیون ها (تصویر ۲) و قرائت جذب پروتئین آنها در ناحیه ۲۸۰ nm، سنجش فعالیت آنزیم با استفاده از شیوه Anson انجام شد و پیک تک فعالیت آنزیمی در ناحیه فراکسیونهای پیک، دال بر خلوص آنزیم بود. علاوه بر آن، با استفاده از شیوه DAVIS، مشاهده باند تک بر روی ژل پلی اکریل آمید و مهار آنزیم توسط Pepstatin، دلیل خلوص کامل آنزیم بود (تصویر ۳).





تصویر ۱: باند تک بر روی ژل پلی آکریل آمید در نمونه سمت راست در مقایسه با نمونه ژل پلی آکریل آمید نمونه سمت چپ است که نمونه سمت راست بعد از ژل کروماتوگرافی و نمونه سمت چپ، بعد از کروماتوگرافی تعویض یون است و باند تک بر روی نمونه سمت راست، نشان دهنده خلوص آنزیم در آخرین مرحله جداسازی است.

بحث

آنزیم کاتپسین D، یک آنزیم پروتئاز لیزوزومی است و بر اساس نتایج بدست آمده، آزاد شدن پروتئازها به محیط خارج سلولی توسط سلولهای بدخیم بیشتر از میزان آنها توسط سلولهای طبیعی است. بر اساس این تحقیقات در مطالعات، گارسیا دریافت که افراد مبتلا به سرطان پستان، دارای سطح بالایی از کاتپسین D که این افزایش میزان کاتپسین D به علت افزایش رونویسی از روی ژن کاتپسین D، بوسیله هورمون های استروژن و هورمون رشد در سلولهای سرطانی در پستان، بوسیله یک مکانیزم ناشناخته ایجاد می شود و با توجه به ارزش های کلینیکی این آنزیم، خالص سازی آن از اهمیت بسزایی برخوردار است. این خالص سازی در سه مرحله انجام شد و در مرحله دوم کروماتوگرافی تعویض یون با DEAE Cellulose بود که قبل از آن DEAE Sephadex استفاده شده بود که در مقایسه نتایج، DEAE Cellulose انتخاب شد و بعد از جداسازی کامل آنزیم، توسط Pepstatin دال بر خالص بودن کامل آن بود. بعد از جداسازی کامل آنزیم، دوباره توسط روش Anson میزان فعالیت آن بررسی شد و افزایش میزان آن، نشان دهنده خالص بودن بیشتر آنزیم در مرحله آخر بود؛ این خالص سازی در بسیاری از آزمونهای کلینیکی از ارزش بسزائی برخوردار است.

Abstract***Isolation of Cathepsin-D from Human Leukocytes***

Cathepsin-D is a lysosomal protease enzyme belonging to the aspartic family . Due to its serious pathological and physiological effects , it has recently gained remarkable importance . This study is intended to isolate cathepsin-D from human leukocytes in 3 steps . The procedure was done through ionic exchange chromatography and completed with sephadex G-200 following gel chromatography . A single bond on polyacrilamid gel and a single peak on the 280 nm region were observed . Its total inhibition with pepstatin indicated the full purification of cathepsin-D .

Key Words : *Cathepsin-D ; Human Leukocytes ; Purification .*

منابع

- 1- Mauriz M, Almadorig, cadonig. Cathepsin D concentration in primary larngeal cancer. Int J cancer. 69(2). 1996. PP 105 - 9.
- 2 - Chearskuls, Bhothisuwan K, Tunsuphasiri V. Cytosol cathepsin D in thai woman with Breast cancer J Med Assoc thai. 79(10). 1996. PP 954 - 60.
- 3 - Abu AK, Kuansf, west AB, cathepsin D in intestinal ganglion cells. Am J Surg pathol. 21(2). 1996. PP 201 - 5.
- 4 - Lipponen pk, Expression of cathepsin D in transitional cell bladder tumours. J Pathol. 178(1). 1996. PP 59 - 64.
- 5 - Andre J, Hasilik E, F. Neufeld The journal of Biological chemistry. 10(2). 1980. PP 946 - 950.
- 6 - T. N. Akopyan, N. H. Barchudaryan, A. Arutungan. Journal of Neuroscience Research. (4). 1979. PP 365 - 370.
- 7 - Garcia M, Platet N, Liaudet E, Biological and clinical significant of cathepsin D in Breast cancer stem - cells. 14(6). 1996. PP 642 - 50.
- 8 - Rochefort H, liaudet E, Garicia M Alteration and role of human cathepsin D in cancer metastasis. Enzyme-protein. 49(1-3). 1996. PP 106 - 116.
- 9 - Chamarch A, ReisfeldR, Wyckoff M, zaccari Analytical Biochemistry. (20). 1967. PP 150 - 154.
- 10 - Gohring uJ, scharl A, thelen u, prognostic value of cathepsin D in breast - Cancer J. Clin. Pathol. 49 (1). 1996. PP 57 - 64.
- 11 - Asculai E, Gopsj, coheny cathepsin D as a prognostic marker in Breast cancer Harefuah. 130(11). 1996. PP 787 - 90.
- 12 - Westly BR, Mayfe, cathepsin D and Breast cancer Eur J cancer. 32A(1). 1996. PP 15-24.