

اثر کلسیم بر فعال‌سازی ترمولیزین توسط نمک کلرید سدیم

عبدالعلی وارسته^۱، سید محسن اصغری^{۱*}، مجید تقدیر^۲، محمود رضا آقا معالی^۱، محمد پاژنگ^۳ و فرامرز مهرنژاد^۴

^۱ رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه

^۲ تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی

^۳ تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه

^۴ تهران، دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فنون نوین

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۳۱



چکیده

ترمولیزین یک پروتئاز گرمادوست با کاربرد در سنتز پپتید بوده و از باکتری *باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس* به دست می‌آید. مطالعات قبلی نشان داده است که نمک کلرید سدیم باعث فعال‌سازی آنزیم می‌شود. پایداری حرارتی ترمولیزین به شدت وابسته به ۴ یون کلسیم بوده که به دمین‌های انتهایی آمینو و کربوکسیل متصل شده‌اند. در مطالعه حاضر، نقش کلسیم در فعال‌سازی آنزیم توسط نمک کلرید سدیم بررسی گردید. فعالیت آنزیم در حضور سوبسترای FAGLA در حضور نمک کلرید سدیم ۲ مولار و در حضور و عدم حضور کلرید کلسیم ۱۰ میلی‌مولار بررسی شد. به علاوه، طیف‌سنجی دورنگ نامایی دورانی در ناحیه دور و فلورسانس به منظور درک تغییرات ساختاری ترمولیزین در حضور نمک کلرید سدیم و حضور و عدم حضور کلرید کلسیم مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم در حضور FAGLA و کلرید کلسیم ۱۰ میلی‌مولار ۲/۵ برابر افزایش یافت. نتایج طیف‌سنجی دورنگ نامایی دورانی در ناحیه دور پیشنهاد نمود که ساختار کلی ترمولیزین طی فعال‌سازی نمک وابسته به کلسیم تغییر نکرده و مطالعات فلورسانس نشان داد که جایگاه فعال تحت تأثیر کلسیم دستخوش تغییر شده است. بنابراین نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، اتصال یونهای کلسیم می‌تواند بر میزان فعال‌سازی ترمولیزین توسط نمک کلرید سدیم مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: ترمولیزین، فعالیت آنزیمی، کلرید سدیم، کلسیم.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۳۳۳۳۳۶۴۷، پست الکترونیکی: sm_asghari@guilan.ac.ir

مقدمه

ترمولیزین هیدرولیز پیوندهای پپتیدی را به‌ویژه در محل باقی‌مانده‌های آب‌گریز کاتالیز می‌کند (۸) و به طور گسترده در تشکیل پیوند پپتیدی از طریق واکنش معکوس هیدرولیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰). این پروتئین از ۳۱۶ اسید آمینه تشکیل شده و از یک اتم روی برای فعالیت و چهار اتم کلسیم برای پایداری ساختاری تشکیل شده است (۷)، ۱۳، ۱۵ و ۱۶). چهار جایگاه اتصال کلسیم در ترمولیزین به ترتیب Ca_1 تا Ca_4 نام‌گذاری شده‌اند. کلسیم‌های متصل به ترمولیزین برخی دارای اتصال محکم و بعضی دارای اتصال

ترمولیزین [EC 3.4.24.27]، حاصل از باکتری *باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس*، کاربرد فراوانی در زیست‌فناوری و صنایعی همچون صنایع غذایی، داروسازی و سنتز پپتید داشته و از پایداری حرارتی بالایی برخوردار است (۱۰). ترمولیزین اولین آنزیم ترموفیل بوده که ساختار در حالت بلور آن در سال ۱۹۷۲ تعیین شده (۶) و به عنوان یک آنزیم مدل مورد مطالعه قرار گرفته است. این آنزیم در دمین‌های انتهایی آمینی غنی از صفحات بتا و در دمین‌های کربوکسی دارای مارپیچهای آلفا می‌باشد (۸ و ۹).

(۴۰۰ ماکرولیتر) شامل تریس ۵۰ میلی‌مولار، pH 7.5، CaCl_2 ۵ میلی‌مولار، تریتون X-100 ۰/۱ درصد و ۵۰ میکرولیتر FAGLA ۲۰ میلی‌مولار می‌باشد که در DMSO حل شده است. غلظت نهایی آنزیم ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. یک یونیت فعالیت آنزیمی برابر با مقدار آنزیم مورد نیاز برای شکستن یک میکرومول FAGLA در یک دقیقه و در دمای اتاق می‌باشد.

مطالعات فلورسانس ذاتی: فلورسانس ذاتی ترمولیزین در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار pH ۷/۵ اندازه‌گیری شد. غلظت نهایی آنزیم در مطالعات فلورسانس ذاتی ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. طول موج برانگیختگی ۲۹۵ نانومتر و طول موج نشر ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر بود. سرعت طیف‌گیری ۵۰۰، Slit برانگیختگی و نشر ۱۰ و دمای طیف‌گیری ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود.

دورنگ‌نمایی دورانی ناحیه دور: طیف دورنگ‌نمایی دورانی ناحیه دور جهت بررسی ساختار دوم ترمولیزین در حضور نمک و حضور و عدم حضور کلسیم، پس از انکوبه شدن به مدت ۱۰ دقیقه، توسط دستگاه اسپکترومتر JASCO J-715 ثبت گردید. نتایج به صورت بیضی‌واری مولی $[\theta]$ ($\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) و بر اساس رابطه $[\theta] = (\theta \times 100 \text{MRW}) / (c \times l)$ تعیین گردید که در آن C غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، l طول مسیر نور و θ بیضی‌واری اندازه‌گیری شده در دامنه طول موج فرابنفش دور می‌باشد (۱۴).

نتایج

دورنگ‌نمایی دورانی ناحیه دور: به منظور درک اینکه آیا فعالیت در حضور نمک با تغییراتی در ساختار ترمولیزین همراه می‌باشد، طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی ناحیه دور در حضور و عدم حضور کلرید کلسیم ۱۰ میلی‌مولار و در حضور کلرید سدیم ۲ مولار انجام شد. همان‌گونه که در

ضعیف می‌باشند. از بین چهار یون کلسیم مذکور، Ca_1 با تمایل بالا و Ca_3 با تمایل کم به آنزیم اتصال یافته‌اند اما در مورد تمایل آنزیم به اتصال به دو جایگاه دیگر شامل Ca_2 و Ca_4 اختلاف نظر وجود دارد.

مطالعاتی که تاکنون بر روی جایگاه‌های اتصال کلسیم در ترمولیزین صورت گرفته به طور عمده بر نقش آنها بر پایداری حرارتی آنزیم استوار بوده است. در مطالعات قبلی مشخص شده که افزایش کلرید سدیم تا غلظت چهار مولار باعث افزایش فعالیت تا حد ۶ الی ۷ برابر می‌شود (۱۱)، اما تاکنون اطلاعاتی پیرامون نقش یونهای کلسیم در فعال‌شدن آنزیم در دسترس نیست. هدف از تحقیق حاضر بررسی نقش یونهای کلسیم بر فعال‌سازی ترمولیزین توسط نمک است. بدین منظور فعال‌سازی آنزیم توسط نمک در عدم حضور و غلظت ۱۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در حضور و عدم حضور کلسیم تغییرات ساختاری آنزیم با استفاده از روشهای طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی ناحیه دور و فلورسانس ذاتی مورد بررسی قرار گرفت.

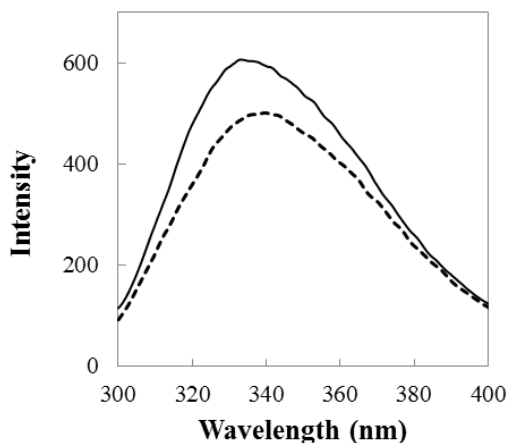
مواد و روشها

مواد: آنزیم ترمولیزین از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA) و FAGLA از شرکت Bachem خریداری شد. سایر مواد استفاده شده از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شد.

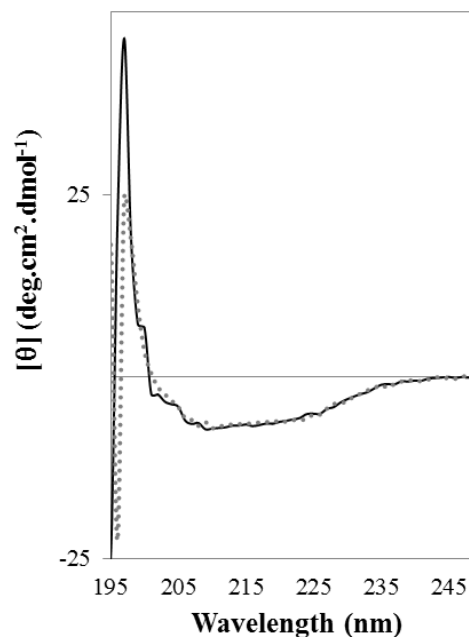
سنجش فعالیت با استفاده از سوبسترای FAGLA: فعالیت پروتئازی آنزیم با استفاده از FAGLA، که یک سوبسترای کروموزن برای خانواده ترمولیزین است، مورد بررسی قرار گرفت (۱۲). هیدرولیز FAGLA توسط ترمولیزین از طریق کاهش جذب در ۳۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان FAGLA هیدرولیز شده با استفاده از اختلاف جذب مولی ناشی از هیدرولیز ($\Delta \epsilon_{345} = -310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. مخلوط واکنش

شکل ۱ مشاهده می‌شود پیک ۱۹۷ نانومتر که مربوط به ساختار بتا می‌باشد اندکی کاهش پیدا کرده است.

FAGLA و در حضور نمک ۲ مولار و عدم حضور و حضور کلسیم ۱۰ میلی‌مولار بررسی شد.



شکل ۲- طیف نشری آنزیم ترمولیزین در حضور نمک ۲ مولار (خط پیوسته) و در حضور نمک ۲ مولار و کلسیم ۱۰ میلی‌مولار (خط چین).



شکل ۱- طیف دورنگ نمایی دورانی ناحیه دور آنزیم ترمولیزین در حضور نمک ۲ مولار (خط پیوسته) و در حضور نمک ۲ مولار و کلسیم ۱۰ میلی‌مولار (خط چین).

نتایج نشان داد که K_m آنزیم از ۰/۷۲ میلی‌مولار در عدم حضور کلسیم به ۰/۲۲ میلی‌مولار در حضور کلسیم ۱۰ میلی‌مولار کاهش یافته‌است. همچنین میزان k_{cat} آنزیم از ۰/۷۹ بر ثانیه در عدم حضور کلسیم به ۰/۵۶ در ثانیه در حضور ۱۰ میلی‌مولار کلسیم کاهش یافت. در مجموع، میزان کارایی کاتالیتیک (k_{cat}/K_m) آنزیم در حضور FAGLA حدوداً به میزان ۲/۵ برابر در کلسیم ۱۰ میلی‌مولار در مقایسه با عدم حضور کلسیم افزایش یافت (جدول ۱).

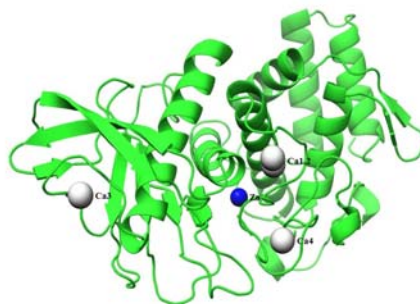
ساختار سه بعدی آنزیم ترمولیزین با کد ورودی ITLX در پایگاه داده www.rcsb.org در شکل ۳ نشان داده شده است.

طیف فلورسانس ذاتی: به علاوه، تغییرات ساختاری القاء شده توسط نمک در حضور و عدم حضور کلسیم در آنزیم از طریق فلورسانس ذاتی بررسی شد. با توجه به شکل ۲ مشاهده می‌شود که اضافه شدن کلسیم موجب شده نشر فلورسانس به مقدار قابل توجهی کاهش یابد، به طوری که حداکثر شدت فلورسانس در عدم حضور کلسیم ۵۹۴ و در حضور کلسیم ۴۹۷ می‌باشد.

فعالیت آنزیم: به منظور درک این نکته که فعال‌سازی آنزیم به وسیله نمک تحت تأثیر اتصال یونهای کلسیم به جایگاههای ضعیف قرار دارد، فعالیت آنزیم در حضور

جدول ۱- پارامترهای سستیکی ترمولیزین در حضور نمک ۲ مولار و عدم حضور و حضور کلسیم ۱۰ میلی‌مولار.

[CaCl ₂], mM	پارامترهای سستیکی		
	$K_m, (M^{-1} \times 10^{-3})$	$k_{cat} (sec^{-1})$	$k_{cat}/K_m (M^{-1} sec^{-1} \times 10^{-3})$
0	0.72 ± 0.04	0.79 ± 0.04	1.10 ± 0.01
10	0.22 ± 0.01	0.56 ± 0.02	2.54 ± 0.03



شکل ۳- ساختار در حالت بلور آنزیم ترمولیزین

کلسیم باعث افزایش فعالیت آنزیم می‌گردد (۱ و ۳). در تحقیقات قبلی اشاره کرده‌اند که کلسیم تأثیری بر فعالیت نداشته، با این حال، اصغری و همکاران نشان دادند که به دنبال اتصال یون کلسیم به یک جایگاه اتصال کلسیم مهندسی شده در یک Zn-متالوپروتئاز همولوگ، الاستاز حاصل از سودوموناس آئروجینوزا، خصوصیات سنتیکی آنزیم جهش یافته شامل هر دو پارامتر K_m و k_{cat} دست-خوش تغییر شده‌اند (۲). ترمولیزین در حین فرآیند کاتالیز آنزیمی دستخوش فرآیندی موسوم به hinge-bending می‌گردد (۱۵ و ۱۷). در این فرآیند جایگاه فعال آنزیم که بین دو دمین واقع است، به دنبال اتصال سوبسترا به آنزیم، متحمل ساختاری موسوم به "ساختار بسته" می‌شود. در مقابل وقتی جایگاه فعال خالی از سوبسترا است "ساختار باز" مشاهده می‌شود. تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که اتصال کلسیم به جایگاه (های) با تمایل اتصال کم موجب تغییر زاویه لولا شده و بر پارامترهای سنتیکی ترمولیزین مؤثر است (۴). داده‌های طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی ناحیه دور و فلورسانس نیز مؤید تغییرات ساختاری در پروتئین می‌باشد. همین توضیح در مورد اثر توأم کلرید کلسیم و کلرید سدیم بر فعالیت آنزیم قابل بیان می‌باشد. این زاویه بر تمایل آنزیم جهت اتصال به سوبسترا و همچنین بر دینامیک جایگاه فعال و در نتیجه ثابت سرعت واکنش کاتالیز (k_{cat}) مؤثر است (۵). بر این اساس، احتمالاً، تغییرات مشاهده شده در خصوصیات سنتیکی آنزیم، به دنبال اتصال کلسیم، می‌تواند به تغییر در ناحیه لولا مرتبط باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان به خاطر حمایت مالی و فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی، بسیار سپاسگزارند.

دورنگ نمایی دورانی ناحیه دور: مطالعات دورنگ نمایی دورانی ناحیه دور نشان داد که در پیک ۱۹۷ نانومتر، به دنبال اتصال کلسیم به ساختار، کاهش مشاهده گردید. این پیک مربوط به ساختمان بتا می‌باشد. از طرفی همان‌گونه که در مقدمه اشاره شد صفحات بتا در دمین انتهای آمینو قرار دارند، بنابراین احتمالاً در حضور کلرید کلسیم ۱۰ میلی-مولار، یون کلسیم به جایگاه Ca_3 ، که تمایل کمی به کلسیم دارد، متصل شده و موجب تغییر در انتهای آمینی می‌شود.

فلورسانس ذاتی: مطالعات صورت گرفته با کمک فلورسانس تأیید می‌نماید که ریزمحیط اطراف آمینوآسید-های تریپتوفان دست‌خوش تغییر شده است. ترمولیزین حاوی سه باقی‌مانده تریپتوفان می‌باشد که عبارتند از تریپتوفان ۵۵، ۱۱۵ و ۱۸۶. از این میان تریپتوفان ۵۵ در نزدیکی Ca_3 قرار گرفته است. با توجه به کاهش نشر فلورسانس در حضور کلسیم ۱۰ میلی‌مولار، به نظر می‌رسد که ریزمحیط تریپتوفان (ها) پس از اتصال به کلسیم قطبی‌تر شده، بدین معنی که احتمالاً حلقه ایندول تریپتوفان به دنبال اتصال کلسیم دستخوش جا به جایی شده و در ریزمحیط قطبی‌تری قرار گرفته است. البته این احتمال هم دور از ذهن نیست که همین اتفاق در ریزمحیط تریپتوفان ۱۸۶، که در مجاورت Ca_1 قرار دارد، رخ داده باشد.

بحث

بررسی فعالیت آنزیم در حضور نمک ۲ مولار و عدم حضور و حضور کلسیم ۱۰ میلی‌مولار نشان داد که حضور

منابع

- ۱- اسماعیل نژاد، م.، زین‌الدینی، م.، مقصودی، ن. ۱۳۹۴. مطالعه اهمیت و نقش اسیدهای آمینه آسپارژین ۲۸ و لیزین ۳۰ فوتوپروتئین اکورین در جذب کلسیم. *مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی*. دوره ۲۸. شماره ۴. ص ۴۶۸-۴۷۴.
- ۲- رحمانی، ح.، اصغری، س. م.، ابراهیمی، س.، صدرممتاز، ا.، تقدیر، م. ۱۳۹۱. مطالعه خصوصیات بیوشیمی‌الاستاز حاصل از باکتری *in the absorption spectrum of thermolysin*. *Journal of biochemistry*, 112(3), 335-340 .
- 12- Kawasaki, Y., Yasukawa, K., & Inouye, K. 2013. Effects of site-directed mutagenesis in the N-terminal domain of thermolysin on its stabilization. *Journal of biochemistry*, 153(1), 85-92 .
- 13- Latt, S. Holmquist. B., and Vallee, BL 1969. Thermolysin: A zinc metalloenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 37, 333-339 .
- 14- Ranjbar, B., & Gill, P. 2009. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses-A Review. *Chemical biology & drug design*, 74(2), 101-120 .
- 15- Tajima, M., Urabe, I., Yutani, K., & Okada, H. Role of calcium ions in the thermostability of thermolysin and *Bacillus subtilis* var. *amylosaccharolyticus* neutral protease. 1976. *Eur. J. Biochem*, 64, 243-247 .
- 16- Titani, K., Hermodson, M., Ericsson, L., Walsh, K., & Neurath, H. 1972. Amino-acid sequence of thermolysin. *Nature*, 238(80), 35-37 .
- 17- Veltman, O. R., Eijsink, V. G., Vriend, G., de Kreijl, A., Venema, G., & Van den Burg, B. 1998. Probing catalytic hinge bending motions in thermolysin-like proteases by glycine→alanine mutations. *Biochemistry*, 37(15), 5305-5311 .
- سودوموناس آنروجینوزا سویه ی PTCC1430. *مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی*. دوره ۲. شماره ۸. ص ۷۷-۷۳.
- ۳- صدر ممتاز، ا.، اصغری، س. م. ۱۳۹۴. مطالعات مقایسه‌ای مقاومت پروتئاز حاصل از سودوموناس آنروجینوزا در مقایسه با ترمولیزین حاصل از باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس در حلال‌های آلی. *مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی*. دوره ۲۸. شماره ۴. ص ۵۶۰-۵۶۷.
- 4- Asghari, S. M., Isazadeh, M., Taghdir, M. 2016. The relevance of low-affinity Ca-binding sites to the structure, stability and kinetic properties of thermolysin. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 1-8.
- 5- Asghari, S. M., Pazhang, M., Ehtesham, S., Karbalaee-Heidari, H. R., Taghdir, M., Sadeghizadeh, M., Khajeh, K. 2010. Remarkable improvements of a neutral protease activity and stability share the same structural origins. *Protein Engineering Design and Selection*, 23(8), 599-606 .
- 6- Colman, P., Jansonius, J., & Matthews, B. 1972. The structure of thermolysin: an electron density map at 2.3 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 70(3), 701-724 .
- 7- Feder, J., Garrett, L. R., & Wildi, B. S. 1971. Role of calcium in thermolysin. *Biochemistry*, 10(24), 4552-4556 .
- 8- Hangauer, D. G., Monzingo, A. F., & Matthews, B. W. 1984. An interactive computer graphics study of thermolysin-catalyzed peptide cleavage and inhibition by N-carboxymethyl dipeptides. *Biochemistry*, 23(24), 5730-5741.
- 9- Holmes, M., & Matthews, B. W. 1982. Structure of thermolysin refined at 1.6 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 160(4), 623-639 .
- 10- Inouye, K. 2003. *Handbook of food enzymology*. eds. Whitaker JR, Voragen AGJ, and Wong DWS, Marcel Dekker, New York, 1019-1028 .
- 11- Inouye, K. I. 1992. Effects of salts on thermolysin: activation of hydrolysis and synthesis of N-carbobenzoxy-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester, and a unique change

The effect of calcium on the activation of thermolysin by salt

Varasteh A.¹, Asghari S. M.¹, Taghdir M.², Agha Maali M. R.¹, Pazhang M.³ and Mehrnejad F.⁴

¹ Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, I. R. of Iran

² Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. of Iran

³ Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I. R. of Iran

⁴ Faculty of Science and Modern Techniques, University of Tehran, Tehran, I. R. of Iran

Abstract

Thermolysin, obtained from *bacillus thermoproteolyticus*, is a thermophilic protease having application in peptide synthesis. Previous studies have revealed that salt activates the enzyme. Thermal stability of TLN is critically dependent on four calcium ions bound in N- and C-terminal domains. The aim of present study is unraveling the role of calcium ions in the salt activation of enzyme. In the presence of NaCl 2 M, measurement of the activity of enzyme in the absence and presence of CaCl₂ 10 mM using FAGLA as substrate was investigated. In addition, Far-UV circular dichroism and fluorescence spectroscopies were used to understand the calcium dependent changes in the enzyme structure. Results revealed the activation of enzyme using FAGLA and in the presence of CaCl₂ 10 mM increased 2.5 times. Far-UV circular dichroism spectra suggest that the overall structure of thermolysin has not changed during salt and calcium activation. However, fluorescence studies revealed that the active site has changed under calcium-dependent salt activation. According to the results of the present study, the binding of calcium ions might influence the activation of thermolysin by salt.

Key words: thermolysin, activity, sodium chloride, calcium.