

## ارتباط زاویه بین دمین‌های انتهای آمینو و انتهای کربوکسی با فعالیت آنزیمی ترمولیزین و الاستاز

عبدالعلی وارسته<sup>۱</sup>، سید محسن اصغری<sup>۱\*</sup>، مجید تقدیر<sup>۲</sup> و محمودرضا آقامعالی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه

<sup>۲</sup> تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی

تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۱۰



### چکیده

پروتئازهای خانواده ترمولیزین زیر مجموعه‌ای از سوپر فامیلی متالوپروتئازهای روی می‌باشند. این خانواده دارای یک یون روی بوده که نقش مهمی در عملکرد آنزیم داشته و همچنین شامل تعداد متفاوتی کلسیم بوده که در پایداری آنها مؤثر است. عملکرد آنزیم‌های این خانواده به حرکت‌های کانفورماسیونی ویژه جایگاه فعال بستگی دارد. جایگاه فعال در این خانواده بین دو دمین انتهای آمینو و انتهای کربوکسی واقع شده و پیشنهاد شده است که این خانواده در هنگام کاتالیز متحمل حرکت hinge-bending شده که منجر به بسته و باز شدن شکاف جایگاه فعال شده و احتمال بروز تغییرات ساختاری را در حین فرآیند کاتالیز مطرح می‌سازد. در این مطالعه فعالیت آنزیمی ترمولیزین در مقایسه با الاستاز حاصل از سودوموناس آئروجینوزا مورد بررسی قرار گرفته و تغییرات ساختاری آنزیم‌ها با استفاده از شبیه‌سازی مولکولی مطالعه گردید. نتایج نشان داد که از یک طرف، ترمولیزین به دلیل کاهش زاویه لولا نسبت به الاستاز دارای تمایل بیشتری نسبت به سوستررا بوده و از طرف دیگر، بازتر بودن دهانه جایگاه فعال در الاستاز نشان‌دهنده آزادی حرکت بیشتر باقی‌مانده‌های کاتالیتیک در الاستاز و در نتیجه بالاتر بودن ثابت سرعت کاتالیتیک می‌باشد. در مجموع، کارایی کاتالیتیک دو آنزیم در دمای ۶۰ درجه تفاوت چندانی را نشان نمی‌دهد.

واژه‌های کلیدی: ترمولیزین، فعالیت آنزیمی، زاویه لولا، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۳۳۳۳۳۶۴۷، پست الکترونیکی: sm\_asghari@guilan.ac.ir

### مقدمه

پروتئازهای خانواده ترمولیزین متعلق به سوپرفامیلی متالوپروتئازهای روی می‌باشند. عملکرد بهینه این آنزیم‌ها در pH خنثی بوده و دارای یک یون روی هستند که برای فعالیت آنزیم ضروری می‌باشد (۱۱). این خانواده از آنزیم‌ها تعداد متفاوتی کلسیم ساختاری داشته که در پایداری آنها حائز اهمیت است (۱، ۷ و ۱۵). در آنزیم‌های این خانواده جایگاه فعال بین دو دمین انتهای آمینو و انتهای کربوکسی واقع شده است و به نظر می‌رسد که جایگاه فعال آنزیم در حالت عدم اتصال به مهارکننده، بازتر از حالت متصل به مهارکننده می‌باشد. این تفاوت احتمال

پروتئازهای خانواده ترمولیزین متعلق به سوپرفامیلی متالوپروتئازهای روی می‌باشند. عملکرد بهینه این آنزیم‌ها در pH خنثی بوده و دارای یک یون روی هستند که برای فعالیت آنزیم ضروری می‌باشد (۱۱). این خانواده از آنزیم‌ها تعداد متفاوتی کلسیم ساختاری داشته که در پایداری آنها حائز اهمیت است (۱، ۷ و ۱۵). در آنزیم‌های این خانواده جایگاه فعال بین دو دمین انتهای آمینو و انتهای کربوکسی واقع شده است و به نظر می‌رسد که جایگاه فعال آنزیم در حالت عدم اتصال به مهارکننده، بازتر از حالت متصل به مهارکننده می‌باشد. این تفاوت احتمال

میلی‌مولار، کلرید سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۲۰ میلی‌مولار با pH ۸ به تعادل رسیده بود، برده شد و پس از شستشو با همان بافر، جهت جداسازی پروتئین از ستون، از بافر شستشوی فسفات دی هیدروژن سدیم ۵۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار با pH ۸ استفاده شد.

**سنجش فعالیت کازئینولیتیک:** برای تعیین فعالیت پروتئازی از سنجش فعالیت کازئینولیتیک استفاده شد (۱۳). ۲۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی به غلظت مشخصی از بافر تریس، کلرید کلسیم و PMSF اضافه شده و سپس مقدار مشخصی از محلول کازئین ۱ درصد (وزنی/حجمی) به آن اضافه گردیده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر محلول تری کلرو استیک اسید (TCA) ۱۰ درصد (وزنی/حجمی) به مخلوط واکنش اضافه شده تا واکنش متوقف شود. پس از گذشت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، مخلوط واکنش در rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و جذب ۲۸۰ نانومتر محلول رویی به عنوان معیاری از فعالیت آنزیمی در نظر گرفته شد.

ساختار بلور آنزیمهای مربوطه از پایگاه ذخیره اطلاعات PDB با کدهای 1TLX و 1EZM به ترتیب برای ترمولیزین و الاستاز به دست آمد و پس از بررسی، به عنوان ساختار اولیه برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. مطالعات ساختاری با استفاده از نرم‌افزارهای Swiss-PDB viewer 4.0.1 و Pymol 1.3 انجام شد.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم افزار AMBER 12 (۵) و به وسیله میدان نیروی ff12sb (۶) انجام شد. پروتئین در لایه‌ای از مولکولهای آب TIP3P به ضخامت ۸ آنگستروم قرار گرفت و بار سطحی آن نیز با افزودن یونهای سدیم و کلر خنثی گردید. کاهش انرژی روی ساختار با ۵۰۰ گام و به روش steepest descent

ترمولیزین (EC 3.4.24.27) یک متالوپروتئاز ترموفیل بوده و از باکتری *Bacillus pasteurii* به دست می‌آید. این آنزیم برای فعالیت به یک یون روی و برای پایداری ساختمانی به ۴ یون کلسیم نیاز دارد (۸ و ۱۲) و تمایل به هیدورلیز پیوندهای پپتیدی در محل آمینواسیدهای آب‌گریز دارد (۳). الاستاز *Sordomonas aurogineosa* یک متالوپروتئاز خنثی و دارای یک اتم روی کاتالیتیک است (۲). ساختار سوم مولکول الاستاز مشابه ترمولیزین بوده و حدود ۲۸ درصد همسانی توالی آمینواسیدی در این دو پروتئین وجود دارد (شکل ۱). تقریباً تمام باقی‌مانده‌های جایگاه فعال آن که با سوپرسترا میانکنش دارند در دو پروتئین یکسان هستند. دو پروتئاز از دو دمین انتهای آمینو که غنی از صفحات بتا و انتهای کربوکسی که غنی از صفحات آلفا می‌باشد، تشکیل شده‌اند (۱۴).

در مطالعه حاضر، فعالیت آنزیمی ترمولیزین و الاستاز بر روی سوپرسترای کازئین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد مورد مقایسه قرار گرفت. از سوی دیگر ساختار جایگاه فعال دو آنزیم، پس از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، از نظر زاویه لولا مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفته است.

## مواد و روشها

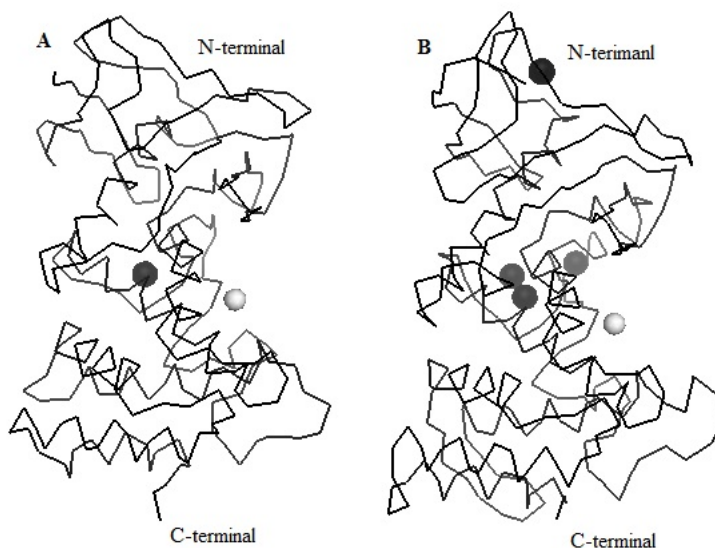
**مواد:** آنزیم ترمولیزین از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA)، الاستاز به صورت نوترکیب تولید و خالص شد. سایر مواد استفاده شده از شرکت مرک آلمان (Darmstadt, Germany) خریداری شد.

**خالص‌سازی الاستاز نوترکیب:** ژن الاستاز *Pseudomonas aeruginosa* در pET21a<sup>+</sup> کلون شده و در سویه PTCC1430 از باکتری *E. coli* بیان گردید. به منظور خالص‌سازی آنزیم از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل آگارز استفاده گردید. نمونه پروتئینی روی ستونی که توسط بافر شستشو حاوی، فسفات دی هیدروژن سدیم ۵۰

## نتایج

مقایسه فعالیت آنزیمی: نتایج حاصل از فعالیت دو آنزیم، نشان‌دهنده کارایی کاتالیتیکی تقریباً برابر دو آنزیم می‌باشد. همان‌گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است،  $K_m$  ترمولیزین در مقایسه با الاستاز کمتر بوده و از طرف دیگر،  $k_{cat}$  الاستاز بیشتر از ترمولیزین می‌باشد، ولی، کارایی کاتالیتیکی ( $k_{cat}/K_m$ ) دو آنزیم تقریباً مشابه بوده که بر عملکرد مشابه دو آنزیم در دمای ۶۰ درجه دلالت دارد.

انجام گردید. دینامیک مولکولی در سه مرحله و به صورت زیر انجام گرفت. ابتدا دما به تدریج در شرایط حجم ثابت از صفر کلون تا ۳۳۳ کلون در مدت زمان ۱۰۰ پیکو ثانیه بالا برده شد. در مرحله بعد سیستم به مدت ۱۰۰ پیکو ثانیه در فشار ثابت به تعادل رسانده شد و در مرحله سوم شبیه‌سازی، دینامیک مولکولی در فشار ثابت به مدت ۱۰ نانو ثانیه در دمای ۳۳۳ کلون انجام شد. نتایج شبیه‌سازی نیز به صورت ریشه میانگین مجذور انحراف ها (RMSD) و ریشه میانگین مجذور نوسانات (RMSF) مورد بررسی قرار گرفت.



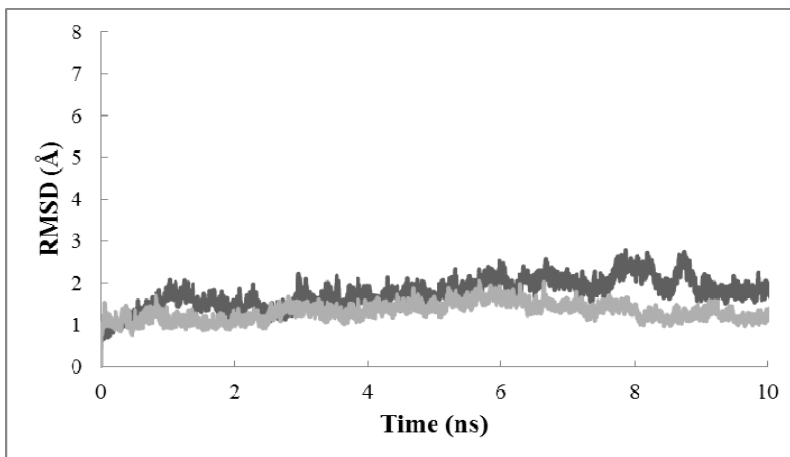
شکل ۱- ساختار الاستاز (A) (pdb code: 1EZM) و ترمولیزین (B) (pdb code: 1TLX). یون روی به رنگ سفید و یون کلسیم به رنگ خاکستری نشان داده شده است.

جدول ۱- مقایسه پارامترهای سنتیکی ترمولیزین و الاستاز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد.

	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1} \times 10^{-3}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $mM^{-1}s^{-1} \times 10^{-3}$ )
TLN	۰/۱۷۱	۱۲۸/۷	۷۵۲/۶
Elastase	۰/۲۲۸	۱۷۶/۱	۷۷۲/۴

شبیه‌سازی به ثبات رسیده و از پایداری قابل قبولی برخوردارند و ساختارهای مورد نظر انحراف قابل ملاحظه-ای را از ساختار اولیه نشان نمی‌دهند.

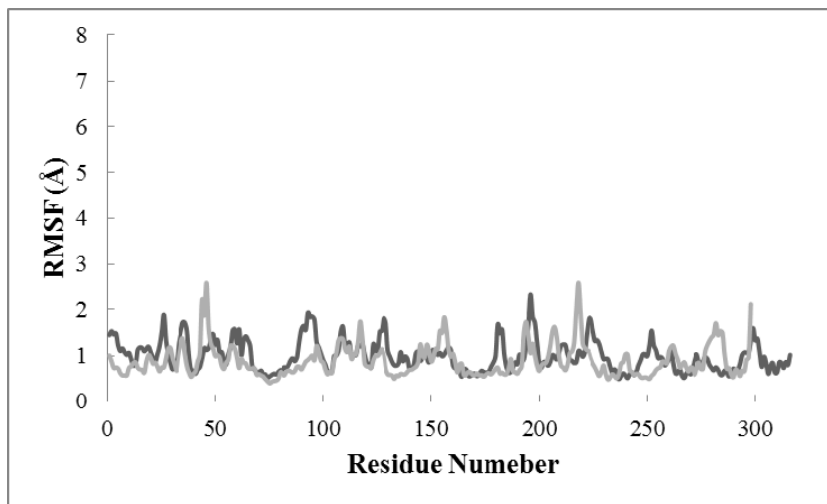
مطالعات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی: شکل ۲ نشان-دهنده RMSD کربن آلفای مربوط به ترمولیزین و الاستاز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد طی زمان ۱۰ نانوثانیه است. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود ساختارها طی



شکل ۲- تغییرات RMSD ترمولیزین (تیره) و الاستاز (روشن) در زمان ۱۰ نانوثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد. با توجه به شکل ساختارها پس از گذشت زمان مورد نظر به پایداری رسیده اند.

به‌علاوه، جدول ۲ تغییر زاویه لولا و RMSD نواحی مختلف دو پروتئین را با هم مقایسه می‌کند. طبق داده‌های این جدول، زاویه لولا در ترمولیزین ۱۶ درجه بسته‌تر از الاستاز می‌باشد. همچنین، مقادیر RMSD دمین انتهای آمینی ۲/۳ آنگستروم، دمین انتهای کربوکسی ۱/۱ آنگستروم و کل دو پروتئین ۱/۸ آنگستروم می‌باشد.

از طرف دیگر، بررسی رفتار دینامیکی اتمهای کربن آلفا در ساختار، حاوی اطلاعات کافی جهت بررسی حرکت‌های مهم در پروتئینها بوده و منعکس کننده حرکت‌های کلی ساختار می‌باشد. بنابراین نوسانات کربنهای آلفا (RMSF) جهت بررسی حرکتها و انعطاف‌پذیری ساختاری در نظر گرفته شد (شکل ۳).



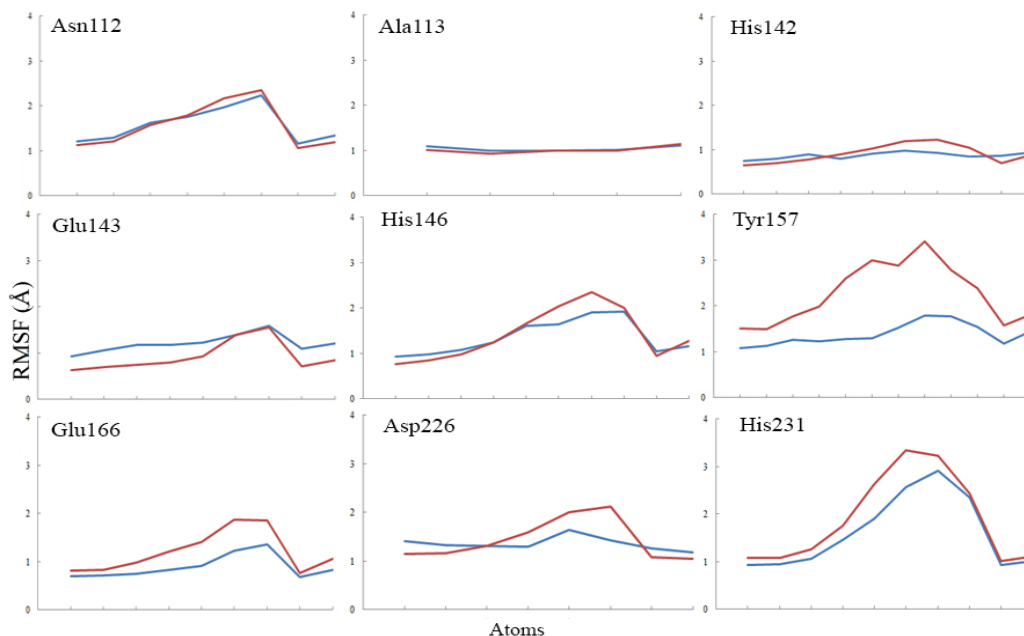
شکل ۳- نمودار تغییرات RMSF کربن آلفا پروتئینهای ترمولیزین (تیره) و الاستاز (روشن) در زمان ۱۰ نانوثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد.

جدول ۲- مقایسه زاویه لولا و RMSD در ترمولیزین و الاستاز.

RMSD بین اتمهای کربن آلفا در دمین‌ها				
تغییر کل	دمین انتهای کربوکسی (Å)	دمین انتهای آمینی (Å)	تغییر زاویه لولا (درجه)	مقایسه
۱/۸	۱/۱	۲/۳	۱۶	TLN vs Elastase

پذیری زنجیره جانبی در الاستاز بیشتر از ترمولیزین می‌باشد. هر چند در مواردی مانند آسپاراژین ۱۱۲ و آلانین ۱۱۳ انعطاف‌پذیری زنجیره‌های جانبی یکسان می‌باشد.

همچنین، انعطاف‌پذیری زنجیره جانبی باقی‌مانده‌های کاتالیتیک دو آنزیم با هم مقایسه گردید. همان‌گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود در غالب آمینواسیدها انعطاف-



شکل ۴- مقایسه انعطاف‌پذیری زنجیره جانبی آمینواسیدهای کاتالیتیک در ترمولیزین و الاستاز. نمودارهای قرمز مربوط به الاستاز و نمودارهای آبی مربوط به ترمولیزین می‌باشند. شماره آمینواسیدها بر اساس پروتئین ترمولیزین می‌باشد.

زاویه لولا نسبت به الاستاز دارای تمایل بیشتری برای اتصال به سوبسترا می‌باشد.

همچنین، داده‌های سنتیکی نشان‌دهنده ثابت سرعت کاتالیتیک ( $k_{cat}$ ) بالاتر آنزیم الاستاز در مقایسه با ترمولیزین بوده است. ثابت سرعت واکنش کاتالیز ارتباط تنگاتنگی با حرکت باقی‌مانده‌های کاتالیتیک در جایگاه فعال دارد. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میزان حرکات ستون فقرات پروتئین در محل آمینواسیدهای کاتالیتیک، تقریباً در تمام موارد الاستاز از حرکات بیشتری برخوردار است. از سوی دیگر، همان‌گونه که اشاره شد، دهانه جایگاه فعال آنزیم این الاستاز بازتر از ترمولیزین می‌باشد. این امر مؤید این است که باقی‌مانده‌های کاتالیتیک در الاستاز از آزادی حرکت بیشتری نسبت به ترمولیزین برخوردارند. بنابراین حرکات بیشتر آمینواسیدهای کاتالیتیک موجب گردیده که

## بحث

در این مطالعه ساختار و فعالیت دو آنزیم ترمولیزین و الاستاز بررسی گردید. بر اساس پارامترهای سنتیکی به دست آمده  $K_m$  آنزیم ترمولیزین  $0/171$  و الاستاز  $0/228$  بوده است. بر این اساس تمایل ترمولیزین برای اتصال به سوبسترا بالاتر می‌باشد. از سوی دیگر، بررسی زاویه لولا که در برگرفته جایگاه فعال این آنزیم‌هاست پیشنهاد می‌کند که زاویه لولا در آنزیم ترمولیزین به مراتب (به اندازه ۱۶ درجه) بسته‌تر از زاویه لولا در آنزیم الاستاز است. مطالعات پیشین نشان می‌دهند که کاهش زاویه لولا موجب کاهش نوسانات در جایگاه فعال می‌شود (۱۷ و ۴) که این مسئله موجب می‌گردد تعداد ساختارهای متصل شونده به سوبسترا محدودتر شده و اتصال به سوبسترا با راندمان بهتری انجام شود. بنابراین آنزیم ترمولیزین به سبب کاهش

ترمولیزین مطلوب‌تر است، کارایی کاتالیتیک دو پروتئین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تفاوت چندانی را نشان نمی‌دهد.

الاستاز ثابت سرعت کاتالیتیک بیشتری را نشان دهد. در مجموع، با توجه به این‌که کارایی کاتالیتیک آنزیم متأثر از هر دو پارامتر  $K_m$  و  $k_{cat}$  آنزیم است و با توجه به در نظر گرفتن این یافته که یکی از این دو در الاستاز و دیگری در

## منابع

۲- صدر ممتاز، ا.، اصغری، س. م. ۱۳۹۴. مطالعات مقایسه‌ای مقاومت پروتئاز حاصل از سودوموناس آئروجینوزا در مقایسه با ترمولیزین حاصل از باسیلوس ترموپروتولیتیکوس در حلال‌های آلی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. دوره ۲۸. شماره ۴. ص ۵۶۰-۵۶۷

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.

- 3- Adekoya, O. A., & Sylte, I. 2009. The thermolysin family (M4) of enzymes: therapeutic and biotechnological potential. *Chemical biology & drug design*, 73(1), 7-16 .
- 4- 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 .
- 5- Case, D., Darden, T., Cheatham III, T., Simmerling, C., Wang, J., Duke, R., Merz, K. 2012. AMBER 12. University of California San Francisco, San Francisco, CA. There is no corresponding record for this reference .
- 6- Cheatham III, T. E., Cieplak, P., & Kollman, P. A. 1999. A modified version of the Cornell et al. force field with improved sugar pucker phases and helical repeat. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 16(4), 845-862 .
- 7- 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 .
- 8- Feder, J., Garrett, L. R., & Wildi, B. S. 1971. Role of calcium in thermolysin. *Biochemistry*, 10(24), 4552-4556 .
- 9- Holland, D., Tronrud, D., Pley, H., Flaherty, K., Stark, W., Jansonius, J., Matthews, B. 1992. Structural comparison suggests that thermolysin and related neutral proteases undergo hinge-bending motion during catalysis. *Biochemistry*, 31(46), 11310-11316 .
- 10- Holland, D. R., Hausrath, A. C., Juers, D., & Matthews, B. W. 1995. Structural analysis of zinc substitutions in the active site of thermolysin. *Protein Science*, 4(10), 1955-1965 .
- 11- Jiang, W., & Bond, J. S. 1992. Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS letters*, 312(2-3), 110-114 .
- 12- Latt, S. A., Holmquist, B., & Vallee, B. L. 1969. Thermolysin: a zinc metalloenzyme. *Biochemical and biophysical research communications*, 37(2), 333-339 .
- 13- Pazhang, M., Khajeh, K., Ranjbar, B., & Hosseinkhani, S. 2006. Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin. *Journal of biotechnology*, 127(1), 45-53 .
- 14- Rulišek, L. r., & Vondrášek, J. 1998. Coordination geometries of selected transition metal ions (Co 2+, Ni 2+, Cu 2+, Zn 2+, Cd 2+, and Hg 2+) in metalloproteins. *Journal of inorganic biochemistry*, 71(3), 115-127 .
- 15- Titani, K., Hermodson, M., Ericsson, L., Walsh, K., & Neurath, H. 1972. Amino-acid sequence of thermolysin. *Nature*, 238(80), 35-37 .
- 16- Van Aalten, D., Amadei, A., Linssen, A., Eijsink, V., Vriend, G., & Berendsen, H. 1995. The essential dynamics of thermolysin: confirmation of the hinge-bending motion and comparison of simulations in vacuum and water.

Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 22(1), 45-54 .

in thermolysin-like proteases by glycine→ alanine mutations. Biochemistry, 37(15), 5305-5311 .

17- Veltman, O. R., Eijssink, V. G., Vriend, G., de Kreij, A., Venema, G., & Van den Burg, B. 1998. Probing catalytic hinge bending motions

## The relationship of angle between N- and C-terminal domains and the activity of thermolysin and elastase

Varasteh A.<sup>1</sup>, Asghari S.M.<sup>1</sup>, Taghdir M.<sup>2</sup> and Agha Maali M.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, I. R. of Iran

<sup>2</sup> Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. of Iran

### Abstract

Thermolysin- like proteases (TLPs) belong to subset of Zn-metalloproteases superfamily. The family includes a zinc ion which plays a critical role in the function of enzyme and some different calcium ions to improve stability of the structure. The enzyme function of this family depends on specific conformational motions of active site. The active site in this family is located between N-terminal and C-terminal domain and it has been proposed that TLPs endure a hinge-bending motion during catalysis resulting in “closure” and “opening” of the active-site cleft and raise the probability of structural changes during catalytic process. In this study, the activity of thermolysin compared with elastase achieved from *Pseudomonas aeruginosa* was investigated and structural changes of the enzymes were investigated by molecular dynamics simulation. The results disclosed that, on one hand- due to reduced hinge-angle- thermolysin tends to greater affinity to the substrate, however, the open mouth of active site represents more freedom of movements of catalytic residues in elastase and therefore catalytic rate constant ( $k_{cat}$ ) is higher. In general, catalytic efficiency of two enzymes does not reveal much difference at 60 °C.

**Key words:** Thermolysin, Enzyme Activity, Hinge-bending, Molecular Dynamics Simulation.