

Structural study on pepsin stability in the presence of urea

M. Kouhiyan^{1*}, B.Shareghi², F. Kouhiyan³

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 Dalton and 327 amino acids. 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 spectrophlormetry. Spectral measurements were made by sodium phosphate buffer (.02M) at pH: 2 and temperatures between 30 and 100 ° 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

مطالعه پایداری ساختمانی آنزیم پپسین در حضور اوره

محبوبه کوهیان^{۱*}، بهزاد شارق^۲، فریده کوهیان^۳

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: ۱۳۹۱/۴/۲۱)

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 و ۳۲۷ اسیدآمیننه است. آنالیز ساختاری آن نشان می‌دهد که ۱/۲ درصد اسیدآمیننه‌های آن بازی، ۱۳/۱ درصد اسیدی، ۴۶/۵ درصد اسیدآمیننه‌های قطبی و ۳۹/۲ درصد اسیدآمیننه‌های هیدروفوبیک هستند. پایداری ساختاری این آنزیم با استفاده از تکنیک‌های اسپکتروفتومتری در ناحیه ماوراء بنفش و اسپکتروفلوریمتری در حضور تأثیر دگرگون کننده اوره بررسی شد. مطالعه فوق با استفاده از بافر ۰/۰۲ مولار سدیم فسفات با pH=۲ و در دامنه دمایی ۳۰ تا ۱۰۰ درجه سانتیگراد انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که: ۱. پایداری قابل توجه آنزیم پپسین (T_m بالا نسبت به سایر هیدرولازها) ۲. کاهش پایداری حرارتی آنزیم پپسین (T_m آنزیم) در حضور اوره و pH=۲ ۳. کاهش مقادیر پارامترهای ترمودینامیکی ΔH°_m و ΔS°_m در حضور اوره ۴. افزایش شدت فلورسانس و ماکزیمم طول موج نشر آنزیم پپسین در حضور اوره .

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

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 می‌باشد (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 نظر اندازه و فولدینگ زنجیر پلی 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 شیمیایی یک پروتئین امکان دگرگون شدن آن وجود دارد که معمولاً روش‌های دگرگون کردن عبارتند از: حرارت دادن، افزودن یک دگرگون کننده شیمیایی مانند DTAB، تغییر pH به حالت اسیدی یا قلیایی و عمل کردن در فشار بالا. هدف اصلی از مطالعات دگرگون‌سازی پروتئین‌ها به دست آوردن اطلاعات اضافی در مورد ساختمان، خواص و عملکرد پروتئین‌ها می‌باشد. مطالعات در زمینه غیرطبیعی کردن پروتئین‌ها در محلول‌های آبی

انجام می‌شود و بنابراین در درک عملکرد پروتئین‌ها تحت شرایط فیزیولوژیک مفید واقع می‌شود. فرایند دگرگون‌سازی پروتئین‌ها برای مطالعه نیروهای تعیین‌کننده ساختمان سوم حائز اهمیت است (Ano Bom, Monica, Freitas, & Silva, 2010) استفاده دیگر از مطالعات دگرگون‌سازی، مطالعه نیروهای مؤثر و نقش انواع پروتئین‌ها میان کنش‌ها در جایگاه فعال آنزیم می‌باشد. با توجه به توضیحات کلی ارائه شده در مورد فولدینگ پروتئین‌ها و دناتوره شدن آنها باید گفت که جزئیات کمی در مورد ساختارهای حالت دگرگون‌شده آنزیم‌های پروتئاز به ویژه پپسین وجود دارد (Schellman, 2002) که در مطالعه حاضر تأثیر دگرگون کننده اوره بر ساختار آنزیم پپسین بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

آنزیم پپسین با منشا پورسین و همچنین اوره از شرکت مرک خریداری شد. اندازه‌گیری طیفی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر فارما سیا مدل ۴۰۰۰ مجهز به سیستم کنترل الکترونیکی دما در دامنه حرارتی ۳۰ تا ۱۰۰ درجه سانتیگراد انجام شد. اندازه‌گیری‌های فلوریمتری به کمک دستگاه

پذیرفتن مکانیسم دو حالتی و با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شده است.

$$F_d = \frac{Y - Y_N}{Y_D - Y_N} \quad (1)$$

در این رابطه Y_N و Y_D به ترتیب مقادیر جذب نوری مولکولهای طبیعی و دگرگون شده در حالتی میباشد که Y مورد اندازه گیری واقع شده است (۱۳). در مورد $\text{pH}=2$ 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 $\text{pH}=2$ می شود. برای محاسبه تغییر در انرژی آزاد حالت های طبیعی و دگرگون شده ΔG°_D ، میتوان از رابطه ۲ استفاده کرد (Pace, Shirley, 1989)

$$\Delta G^{\circ}_D = -RT \ln [F_d / (1 - F_d)] = -RT \ln [(Y_N - Y_{obs}) / (Y_N - Y_D)] \quad (2)$$

در این رابطه، R ثابت گازها و T دما بر حسب کلون است. دمای ذوب پروتئین (T_m)، دمایی است که مقدار ΔG°_D در آن 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 340 K است. تاثیر اوره بر مقدار T_m در جدول ۱

اسپکتروفلوریمتر فارما سیامدل RF-5301 مجهز به حمام آب گرم صورت گرفت.

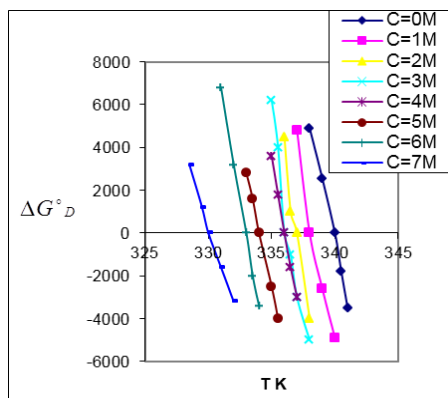
روش ها

۱- بررسی پایداری حرارتی آنزیم پپسین در حضور اوره در $\text{pH}=2$ و دامنه حرارتی $30 - 100 \text{ }^{\circ}\text{C}$: با فرسفات سدیم با $\text{pH}=2$ در غلظت 0.02 M و محلول اوره با غلظت 8 M و در $\text{pH}=2$ تهیه شد. منحنی های دگرگون سازی در حضور اوره در طول موج 280 nm با استفاده از محلول های پپسین با غلظت 3 mg/ml گرم بر میلی لیتر به دست آمده است.

۲- بررسی اسپکتروفلوریمتری آنزیم پپسین در حضور اوره در $\text{pH}=2$ و دماهای گوناگون: با فرسفات سدیم با $\text{pH}=2$ در غلظت 0.02 M و محلول اوره هم با غلظت 8 M در $\text{pH}=2$ تهیه شد. غلظت نمونه آنزیم پپسین 3 mg/ml گرم بر میلی لیتر است. بررسی های 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 در مقابل دما برای غلظت های مختلف اوره در $\text{pH}=2$ است. همانطور که مشاهده می شود در غیاب اوره، مقدار F_d تا دمای 338 K صفر است. کسر پروتئین دگرگون شده با



شکل ۳. منحنی تغییرات ΔG°_D در مقابل دما در حضور غلظت‌های مختلف اوره و بافر ۰/۰۲ مولار سدیم فسفات و $\text{pH}=2$

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

$$\Delta H^{\circ}_m = T_m \Delta S^{\circ}_m \quad (3)$$

ΔH°_m و ΔS°_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

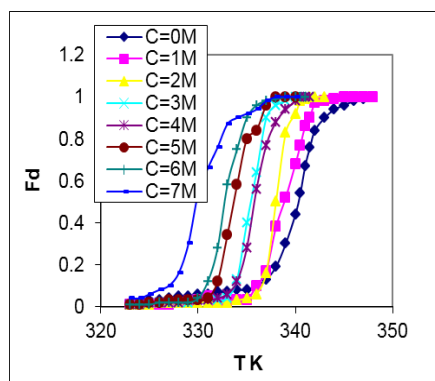
و ΔH°_m را می توان به صورت زیر بیان کرد: Shirley,

(Pace, 1989)

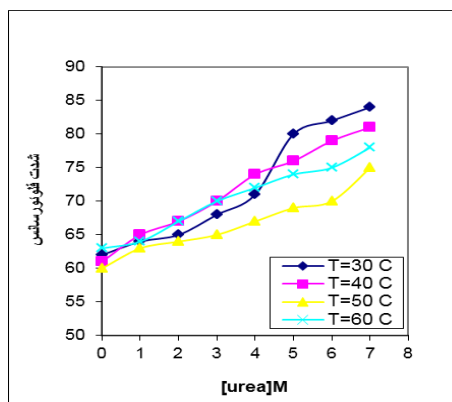
$$\Delta H^{\circ}_m = H^{\circ}_m(D) - H^{\circ}_m(N) \quad (4)$$

$$\Delta S^{\circ}_m = S^{\circ}_m(D) - S^{\circ}_m(N) \quad (5)$$

ارائه شده است. چنانچه ملاحظه می شود حضور اوره سبب کاهش T_m آنزیم می شود. با افزایش غلظت اوره از یک تا هفت مولار، T_m آنزیم کاهش می یابد به طوریکه در غلظت هفت مولار به 330K میرسد. شیب منحنی ΔG°_D بر حسب دما در نقطه T_m برابر ΔS°_m است.



شکل ۱. منحنی تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل حرارت در غلظت‌های مختلف اوره و بافر ۰/۰۲ مولار سدیم فسفات و $\text{pH}=2$



شکل ۲. تغییرات شدت فلورسانس آنزیم پپسین در حضور اوره در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم فسفات و $\text{pH}=2$

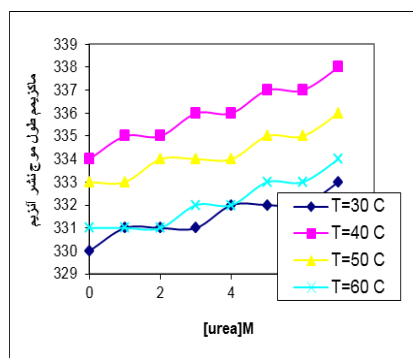
جدول ۱. پارامترهای ترمودینامیکی بر هم کنش آنزیم پپسین و اوره

ΔH°_m $kJmol^{-1}$	T_m K	ΔS°_m $Jmol^{-1}K^{-1}$	M [urea]
۲۷۲۰	۳۴۰	۸۰۰۰	۰
۱۵۷۷/۱۰.۸	۳۳۸	۴۶۶۶	۱
۱۵۵۰/۰.۰۲	۳۳۷	۴۶۰۰	۲
۱۳۴۰	۳۳۶	۴۰۰۰	۳
۱۳۴۴	۳۳۶	۴۰۰۰	۴
۱۰۶۸/۰.۰۸	۳۳۴	۳۲۰۰	۵
۸۸۸/۱.۰۰	۳۳۳	۲۶۶۶/۷	۶
۶۶۰	۳۳۰	۲۰۰۰	۷

در خصوص دگرگون سازی اوره بر پروتئین ها، دو مکانیسم، توجه 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 (Tobi, Elber & Thirumalia, 2003).

در این روابط، D نمایانگر حالت دگرگون شده و N نمایانگر حالت طبیعی پروتئین است. با توجه به اینکه حالت دگرگون شده به صورت پیچیده منظم در نظر گرفته می شود، کاهش مقادیر ΔH°_m و ΔS°_m مبین باز شدن شکل طبیعی آنزیم می باشد. با توجه به شکل ۲ که تغییرات شدت فلئورسانس آنزیم پپسین را در حضور غلظتهای مختلف اوره و در دامنه دمایی ۳۰ تا ۶۰°C در pH=۲ نشان می دهد، مشخص است که با افزایش غلظت اوره شدت فلئورسانس افزایش می یابد، به این مفهوم که آنزیم بازتر شده است پس پایداری پپسین در حضور 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°C آمده است، همانطور که 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 موید کاهش پایداری آنزیم پپسین در حضور اوره می باشد.

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 فلئورسانس افزایش می یابد (Nubinstein& Sherman,1997)



شکل ۴. 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 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.

مطالعات انجام گرفته در مورد بر هم کنش اوره با ترکیبات مدل مانند دی کتو پپیر آزین نمایانگر وجود بر هم کنشهای هیدروژنی بین اوره و گروههای پپتیدی ترکیبات مدل و پروتئینها 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 در حضور 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 $۶۷^{\circ}C$ است با افزایش غلظت اوره کاهش می یابد. در غلظت یک مولار اوره به $۶۵^{\circ}C$ ، در غلظت دو مولار به $۶۴^{\circ}C$ ، در غلظت سه مولار به $۶۳^{\circ}C$ ، در غلظت چهارمولار به $۶۳^{\circ}C$ ، در غلظت پنج مولار به $۶۱^{\circ}C$ 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، مقادیر فوق 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

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. Chem.285: 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 unique 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 Approach (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 propeptid 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.