Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):123-129

Effect of Urea, Guanidine Hydrochloride, and Organic Solvents on the Kinetic Activity of Proteinase K Enzyme

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Shareghi B.* *PhD*,
Yadollahi E.[1] *MSc*,
Rabie A.[1] *MSc*

How to cite this article
Shareghi B, Yadollahi E, Rabie A. Effect of Urea, Guanidine Hydrochloride, and Organic Solvents on the Kinetic Activity of Proteinase K Enzyme. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):123-129.

*Biology Department, Basic Sciences Faculty, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[1]Biology Department, Sciences Faculty, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

Correspondence
Address: Basic Sciences Faculty, Shahrekord University, Rahbar Boulevard, Shahrekord, Iran
Phone: +98 (38) 32324401
Fax: +98 (38) 32324401
b_shareghi@yahoo.com

Article History
Received: May 03, 2015
Accepted: October 23, 2017
ePublished: March 20, 2018

ABSTRACT

Aims Proteinase K is an extracellular endopeptidase, which is secreted by *Tritirachium album Limber* and belongs to the serine endopeptidase class. This enzyme is extensively applied to protein-related studies. The present study aimed at evaluating the effect of urea, guanidine hydrochloride (GnHCl), and organic solvents on the kinetic activity of proteinase K enzyme.

Materials & Methods In this experimental study, kinetics studies were performed, using UV-Vis spectrophotometer on different concentrations of substrate, urea, and GnHCl at 40°C and pH 7.4.

Findings Urea decreased the Vmax and K_m of enzyme at 1 and 2molar concentrations, but at higher concentrations such as 3 and 4molar, it increased enzyme activity. GnHCl had an inhibitory effect on the enzyme activity, resulting in a decrease in V_{max} and K_m in 1, 2, and 3molar concentrations and acted as an uncompetitive inhibitor. Organic solvents including methanol, ethanol, and isopropanol had activatory effect at low concentrations and inhibitory effect at high concentrations on the kinetic activity of proteinase K enzyme.

Conclusion Urea has an inhibitory effect at low concentrations and an activatory effect on the activity of the enzyme at a concentrations above 2molar, but GnHCl has an inhibitory effect at all concentrations and can be used as an enzyme inhibitor. The effect of organic solvents including methanol, ethanol, and isopropanol on the activity of the proteinase K enzyme depends on their volume/volume percent; they cause enzyme activation at low percentages, but have inhibitory effect at high percentages, so that activates methanol below 30% and isopropanol below 50%.

Keywords Proteinase K; Organic Solvents; Guanidine Hydrochloride; Urea

CITATION LINKS

[1] Proteinase K from Tritirachium album ... [2] Molecular investigation on the interaction of spermine with proteinase K by multispectroscopic techniques and molecular ... [3] Impact of Mercury (II) on proteinase K catalytic center: Investigations via classical and Born-Oppenheimer molecular ... [4] Conjugation of biogenic polyamine (putrescine) with proteinase K: Spectroscopic and theoretical ... [5] Green synthesis of zinc oxide nanoparticles and their effect on the stability and activity of ... [6] The enzymatic activity of proteinase K is controlled by ... [7] The effect of spermidine on the structure, kinetics and stability of proteinase K: Spectroscopic and computational ... [8] Comparative studies on the interaction of proteinase-K with nano-CuO and copper ... [9] Role of water in the formation of macromolecular ... [10] Cosolvent effects on protein ... [11] Effect of chemical modification on the activity of lipases in organic ... [12] Functional properties and application in peptide synthesis of trypsin modified with cyclodextrin-containing dicarboxylic ... [13] Inhibition of proteinase K activity by copper (II) ... [14] Principles of enzyme ... [15] Enzyme assays: A practical approachJournal ofBiochemistry and ... [16] Classificationof acid denaturation of proteins: intermediates and ... [17] Protein interactions with urea and guanidinium chloride, a calorimetric ... [18] Opposite effect of urea and some of its derivatives on water ... [19] Thermodynamics of interactions of urea and guanidinium salts with protein surface: Relationship between solute effects on protein processes and changes in water-accessible ... [20] Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: Application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' ... [21] The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by ... [22] Insight derived from molecular dynamics simulation into substrate-induced changes in protein motions of ... [23] Effect of urea on trypsin and ... [24] Thermodynamic characterization of the osmolyte effect on protein stability and the effect of GdnHCl on the protein ... [25] Living with water stress: Evolution of ... [26] Kinetics of hydrogen peroxide decomposition by catalase: Hydroxylic solvent ... [27] Interaction of ribonuclease A with aqueous 2-methyl-2,4-pentanediol ... [28] Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: Why is trehalose more effective than ... [29] Effect of polyols on the native structure of ... [30] Effect of alkyl alcohols on partially unfolded state of proteinase K ...

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

اثر اوره، گوانیدین هیدروکلراید و حلال‌های آلی بر فعالیت سینتیکی آنزیم پروتئیناز-K

بهزاد شارقی* PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
الهام یداللهی MSc
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
عظیمه ربیعی MSc
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

اهداف: پروتئیناز K یک اندوپپتیداز خارج سلولی است که توسط قارچ *تریتیراچیوم آلبوم* لیمبر (*Tritirachum album* Limber) ترشح می‌شود و متعلق به رده سرین‌اندوپپتیدازها است. این آنزیم در مطالعات مربوط به پروتئین‌ها کاربرد دارد. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر اوره، گوانیدین‌هیدروکلراید و سه حلال آلی متانول، اتانول و ایزوپروپانول بر فعالیت سینتیکی آنزیم پروتئیناز K بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر مطالعات سینتیکی با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis، در دمای ۴۰°C، pH برابر ۷/۴ و غلظت‌های مختلف سوبسترا، اوره و گوانیدین‌هیدروکلراید انجام شد.

یافته‌ها: اوره در غلظت‌های یک و ۲مولار موجب کاهش V_{max} و K_m آنزیم شد، ولی در غلظت‌های بالاتر مانند ۳ و ۴مولار فعالیت آنزیم را افزایش داد. گوانیدین‌هیدروکلراید بر فعالیت آنزیم اثر مهارکنندگی داشت، به‌طوری که در غلظت‌های یک، ۲ و ۳مولار موجب کاهش در V_{max} و K_m شد و به‌عنوان مهارکننده نارقابتی برای آنزیم عمل کرد. حلال‌های آلی متانول، اتانول و ایزوپروپانول در غلظت‌های پایین اثر فعال‌کنندگی و در غلظت‌های بالا اثر مهاری بر فعالیت سینتیکی آنزیم پروتئیناز K داشتند.

نتیجه‌گیری: اوره در غلظت‌های پایین اثر مهاری و از غلظت ۲مولار به بالا اثر فعال‌کنندگی بر فعالیت آنزیم دارد، ولی گوانیدین‌هیدروکلراید در تمامی غلظت‌ها اثر مهاری نشان می‌دهد و می‌توان از آن به‌عنوان یک مهارکننده آنزیم نام برد. اثر حلال‌های آلی متانول، اتانول و ایزوپروپانول روی فعالیت آنزیم پروتئیناز K به درصد حجمی- حجمی آنها بستگی دارد؛ آنها در درصدهای پایین باعث فعال‌شدن آنزیم می‌شوند، ولی در درصدهای بالا اثر مهاری دارند، به‌طوری که متانول زیر ۳۰%، اتانول و ایزوپروپانول کمتر از ۵۰% آنزیم را فعال می‌کنند.

کلیدواژه‌ها: پروتئیناز K، حلال‌های آلی، گوانیدین‌هیدروکلراید، اوره

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۰۱

*نویسنده مسئول: b_shareghi@yahoo.com

مقدمه

آنزیم پروتئیناز K، (۳.۴.۲۱.۱۴) EC یک اندوپپتیداز خارج سلولی از خانواده سابتیلیزین‌ها است که توسط قارچ *تریتیراچیوم آلبوم* لیمبر (*Tritirachium album Limber*) ترشح می‌شود[1,2].

آنزیم پروتئیناز K در حضور اوره و سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS) نیز فعال باقی می‌ماند و این ویژگی آن را به ابزار مناسبی برای آماده‌کردن نمونه DNA و RNA بدون پروتئین تبدیل کرده است[3,4]. پروتئیناز K به‌صورت تک‌زنجیره‌ای با وزن مولکولی ۲۸/۹کیلودالتون است. این آنزیم دو پیوند دی‌سولفیدی و یک سیستئین آزاد دارد[5]. در ساختمان آن دو یون کلسیم وجود دارد که تیمار آنزیم به‌وسیله EDTA و در نتیجه برداشت کلسیم موجب کاهش فعالیت آنزیم به میزان ۲۰% مقدار اولیه خواهد شد [6]. مطالعات فلورسانس این آنزیم به‌واسطه وجود دو تریپتوفان ۸ و ۲۱۲ انجام می‌گیرد که هر دو در محیط قطبی قرار دارند و فلورسانس را کاهش می‌دهند[7]. پروتئیناز K نسبت به بقیه اعضای شبه‌سابتیلیزین در برابر عوامل دناتوره‌کننده و شیمیایی پایدارتر به‌علاوه در pH برابر ۳ تا ۱۱ بسیار پایدار و فعال است[8]. مولکول‌های آبی کوچک در محلول‌های آبی می‌توانند اثرات عمیقی بر ساختار، عملکرد و پایداری پروتئین‌ها داشته باشند. استفاده از این محلول‌ها برای پایدارسازی و دگرگون‌سازی پروتئین‌ها رایج است[9]. از جمله عوامل افزاینده آب‌دوستی می‌توان به اوره، تیواوره، گوانیدین‌هیدروکلراید و لیتیوم‌پرکلراید اشاره کرد. این ترکیبات نیروهای درون‌مولکولی شبکه مولکول‌های آب را کاهش می‌دهند. این امر موجب حل‌شدن آسان‌تر پروتئین‌ها در آب می‌شود. همچنین با نیروهای پایدارکننده درون‌مولکولی غیرکووالان مثل نیروهای آب‌گریز، هیدروژنی و واندروالس تداخل می‌کنند. اوره ترکیبی است که در فرآیندهای زیستی بدن مهره‌داران به‌شدت فعال است و به‌عنوان یک منبع نیتروژن در بدن انسان و همچنین به‌عنوان یک دگرگون‌کننده پروتئین عمل می‌کند. دو مکانیزم متفاوت برای دگرگون‌سازی پروتئین توسط اوره پیشنهاد می‌شود. این مولکول یا به‌صورت مستقیم با اتصال به گروه‌های پپتیدی از طریق پیوند هیدروژنی یا الکترواستاتیک و در نتیجه ضعیف‌شدن پیوندهای هیدروژنی داخلی منجر به دگرگون‌سازی پروتئین می‌شود یا به‌طور غیرمستقیم با تغییر در پیوندهای هیدروژنی شبکه آب اطراف گروه‌های هیدروفوب که منجر به حلالیت بیشتر این گروه‌ها و تضعیف اثرات هیدروفوبیسیته می‌شود عمل دگرگون‌سازی را انجام می‌دهد. گوانیدین‌هیدروکلراید نیز از عوامل افزاینده آب‌دوستی است که سبب کاهش قطبیت و ثابت دی‌الکتریک حلال می‌شود. از طرف دیگر با داشتن گروه‌های هیدروکسیل روی اتم نیتروژن خود قابلیت ایجاد پیوند هیدروژنی با پروتئین را نیز دارد[10]. امروزه رشد قابل توجهی در استفاده از آنزیم‌ها در حضور غلظت‌های مختلفی از محلول‌های الکلی وجود دارد. استفاده از آنزیم‌ها در محلول‌های آلی مزایای بسیاری نسبت به محیط‌های آبی دارد، به‌عنوان مثال افزایش حلالیت سوبسترا، بالابردن پایداری دمایی آنزیم و همچنین امکان انجام واکنش‌هایی که در محیط‌های آبی غیرقابل انجام هستند[11]. فعالیت آنزیم‌ها در چنین محیط‌هایی موجب افزایش پایداری، فعالیت یا تسهیل واکنش‌هایی می‌شود که در محیط‌های آبی به‌سختی انجام می‌شود. در سال‌های اخیر از روش‌های مختلفی برای حفظ فعالیت و ساختمان آنزیم‌ها در محلول‌های الکلی استفاده شده است[12].

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر اوره، گوانیدین‌هیدروکلراید و سه نوع حلال آلی متانول، اتانول و ایزوپروپانول بر فعالیت سینتیکی آنزیم پروتئیناز K انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، بافر فسفات‌سدیم با pH برابر ۷/۴ در غلظت ۲۵میلی‌مولار با آب مقطر دوبار تقطیر تهیه و با استفاده از محلول سود (NaOH) ۰/۱نرمال به pH مورد نظر رسید.

آنزیم پروتئیناز K قارچ *Tritirachum album Limber* (سیگما؛ ایالات متحده) در این بافر حل و در دمای زیر ۴°C نگهداری شد. پارانیتروفنیل‌استات که به‌عنوان سوبسترا استفاده شد در آب دوبار تقطیر حل و در غلظت ۹۰میلی‌مولار نگهداری شد. هیدرولیز این سوبسترا توسط آنزیم در طول موج ۴۲۵نانومتر قابل اندازه‌گیری است[13].

مطالعات سینتیکی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis مدل فارماسیا-۴۰۰۰ (Agilent؛ ایالات متحده) مجهز به سیستم کنترل دمایی انجام شد. مطالعات در سل کوارتز شامل ۰/۰۴میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنزیم و غلظت‌های مختلف سوبسترا

(۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵میلی‌مولار) صورت پذیرفت. در هر آزمایش ابتدا نمونه آنزیم در دمای ۴۰°C به‌مدت ۱۰دقیقه انکوبه و سپس سوبسترا اضافه و فعالیت آنزیم به‌مدت یک‌دقیقه اندازه‌گیری شد. در مطالعه حاضر، برای تمامی سنجش‌های آنزیمی pH و دما به‌ترتیب ۷/۴ و ۴۰°C در نظر گرفته شد. نمودار لینویور و برک از معکوس‌نمودن معادله میکائلیس و منتن به دست می‌آیند و به‌صورت زیر ارایه می‌شوند:

$$\frac{1}{v0} = \frac{Km}{Vmax}[S0] + \frac{1}{Vmax}$$

با ترسیم تغییرات $1/V_0$ در مقابل $1/[S_0]$ خط راستی با شیب K_m/V_{max}، عرض از مبدا $1/V_{max}$ و طول از مبدا $1/K_m$ به دست می‌آید[14].

بدین‌ترتیب k_m و V_{max} به‌ترتیب ۲/۱۲میلی‌مولار ۱۲۰ کاتال به دست آمدند.

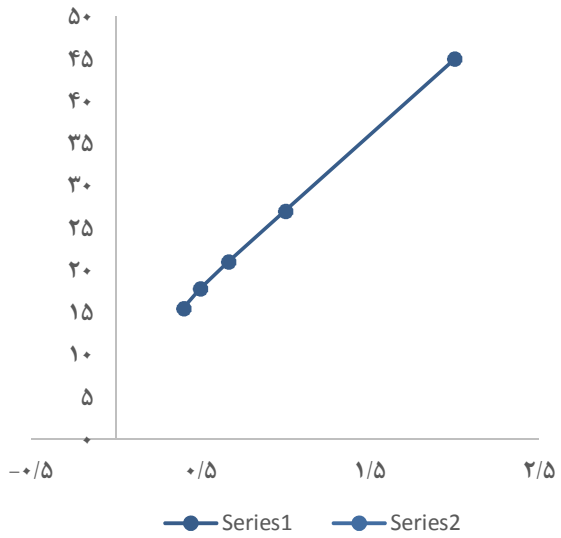
K_{cat} یا ثابت ویژگی از تقسیم V_{max} بر [E] به دست می‌آید.

نقطه قطع محور y در نمودار $1/V_{max}'$ (V_{max} در حضور مهارکننده) علیه $[I_0]$ برابر با میزان K_i است[15].

بررسی سنتیکی آنزیم پروتئیناز K در حضور اوره و گوانیدین‌هیدروکلراید و حلال‌های آلی: همه مطالعات در سل کوارتز شامل ۰/۰۴میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنزیم و غلظت‌های مختلف سوبسترا (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵میلی‌مولار) و غلظت‌های (۱، ۲، ۳ و ۴مولار) اوره، (۱، ۲ و ۳مولار) گوانیدین‌هیدروکلراید، (۱۰%، ۳۰%، ۵۰% و۷۰% حجمی- حجمی) حلال‌های آلی انجام شد. در هر آزمایش نمونه آنزیم در دمای ۴۰°C به‌مدت ۱۰دقیقه انکوبه شد.

یافته‌ها

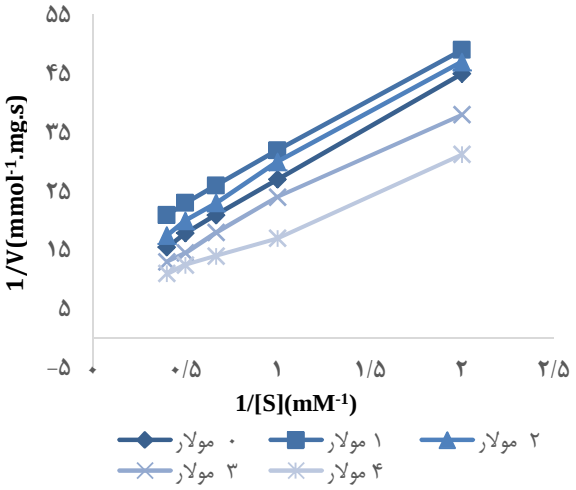
با افزایش غلظت سوبسترا فعالیت آنزیم پروتئیناز K نیز افزایش یافت (نمودار ۱).



نمودار ۱) نمودار لینویور- برک آنزیم پروتئیناز K در pH برابر ۷/۴ و دمای ۴۰°C

با افزایش غلظت اوره فعالیت آنزیم در ابتدا کاهش و سپس افزایش یافت (نمودار ۲).

مقدار V_{max} و K_m در غلظت‌های پایین اوره کاهش و در غلظت‌های ۳ و ۴مولار اوره افزایش نشان داد (جدول ۱).



نمودار ۲) اثر غلظت‌های مختلف اوره بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در دمای ۴۰°C و pH برابر ۷/۴

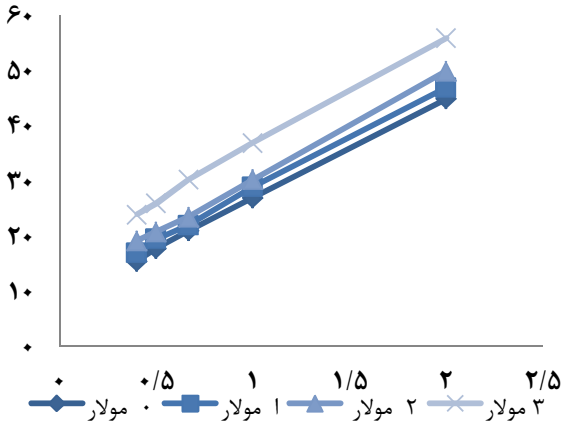
جدول ۱) تغییرات V_{max} (فعالیت)، K_m و K_{cat}/K_m آنزیم پروتئیناز K در غلظت‌های مختلف اوره در دمای ۴۰°C و pH برابر ۷/۴

اوره (مولار)	V_{max} (میلی‌مولار بر ثانیه)	درصد فعالیت (Vmax)	K_m (میلی‌مولار)	$K_{cat}/K_m \times 10$ ($Sec^{-1}.mM^{-1}$)
صفر	۰/۱۲	۱۰۰	۲/۱۲	٤/۰۹
۱	۰/۰۷	٥٨/٣	۱/۲	٤/٢٢
۲	۰/۰۹۲	٧٦/٦	۱/٦٦	٤/۰۱
۳	۰/۱٤	١٦٦/٦	۲/١٦	٤/٦٩
٤	۰/۱۷	١٤١/٦	۲/۲۲	٥/٥٤

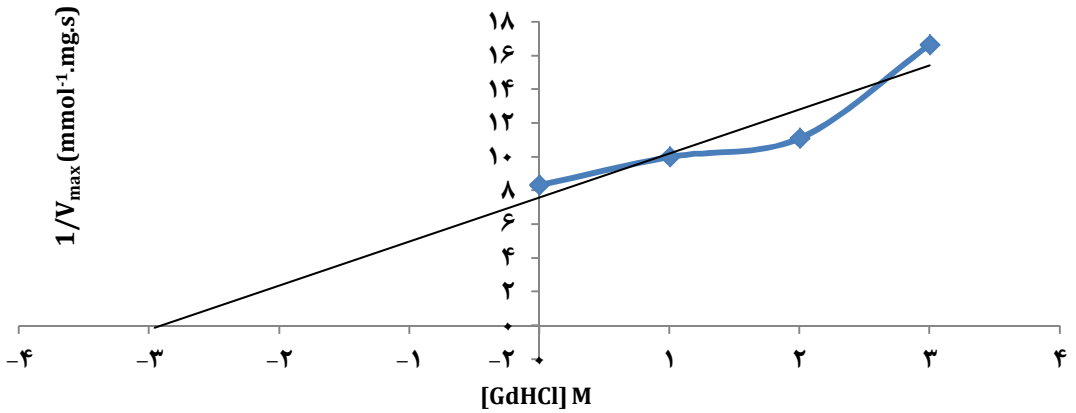
افزایش غلظت گوانیدین‌هیدروکلراید میزان V_{max}، K_m و K_{cat}/K_mرا کاهش می‌دهد (جدول ۲؛ نمودار ۳). بنابراین گوانیدین‌هیدروکلراید نوعی مهارکننده نارقابتی برای آنزیم بود.

جدول ۲) تغییرات V_{max} (فعالیت)، K_m و K_{cat}/K_m آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید در دمای ۴۰°C و pH برابر ۷/۴

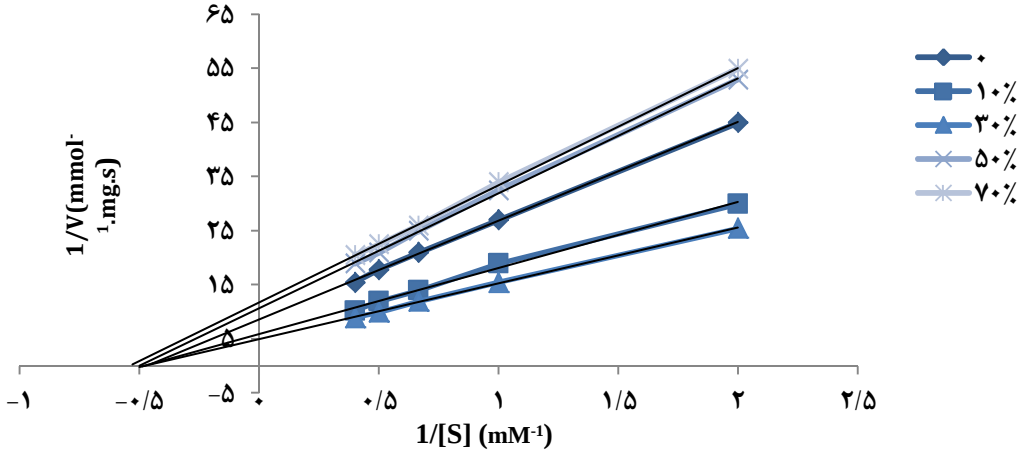
گوانیدین‌هیدروکلراید (مولار)	V_{max} (میلی‌مولار بر ثانیه)	درصد فعالیت (V_{max})	K_m (میلی‌مولار)	$K_{cat}/K_m \times 10$ ($Sec^{-1}.mM^{-1}$)
صفر	۰/۱۲	۱۰۰	۲/۱۲	٤/۰۹
۱	۰/۱	٨٣.٣	۱/٨٨	٣/٨٥
۲	۰/۰۹	٧٥	۱/٧٥	٣/٧٢
۳	۰/۰٦	٥٠	۱/۲	٣/٦٢



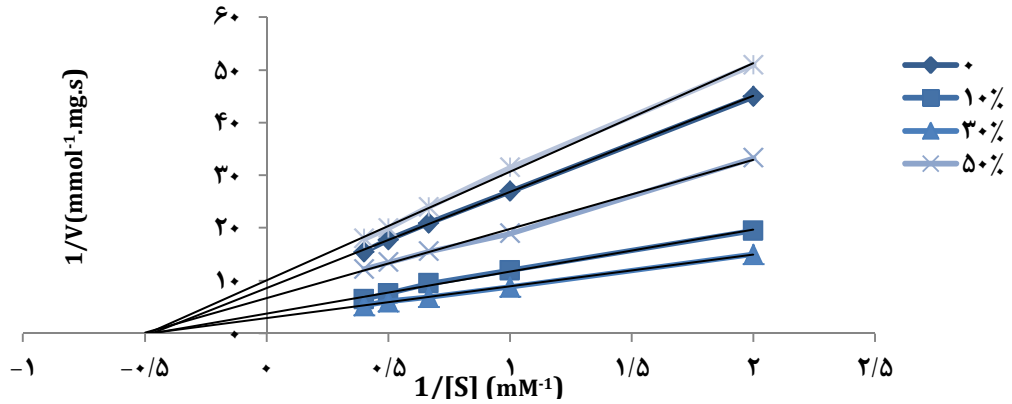
نمودار ۳) اثر غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در دمای ۴۰°C و pH برابر ۷/۴



نمودار ٤) نمودار ثانویه تغییرات $1/V_{max}$ آنزیم پروتئیناز K علیه تغییرات غلظت گوانیدین‌هیدروکلرید در دمای ٤٠°C و pH برابر ٧/٤



نمودار ۵) اثر غلظت‌های مختلف متانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در دمای ۴۰°C و pH برابر ۷/۴



نمودار ۶) اثر غلظت‌های مختلف اتانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در دمای ۴۰°C و pH برابر ۷/۴

با توجه به اینکه نقطه قطع محور y در نمودار $1/V_{max}'$ (V_{max} در حضور مهارکننده) علیه $[I_0]$ برابر با میزان K_i است، میزان K_i برابر با ۲/۹۸ به دست آمد (نمودار ۴).

با افزایش غلظت متانول از صفر تا ۳۰٪ حجمی- حجمی، V_{max} افزایش و K_m به مقدار جزئی کاهش یافت ولی در غلظت‌های بالاتر V_{max} و K_m هر دو کاهش نشان دادند که از الگوی مهار مخلوط پیروی کرد (مهار نارقابتی- غیررقابتی؛ نمودار ۵، جدول ۳).

با افزایش غلظت اتانول از صفر تا ۵۰٪ حجمی- حجمی، V_{max} افزایش و K_m به میزان جزئی کاهش یافت. ولی در غلظت ۷۰٪ V_{max} و K_m هر دو کاهش یافتند (نمودار ۶؛ جدول ۴).

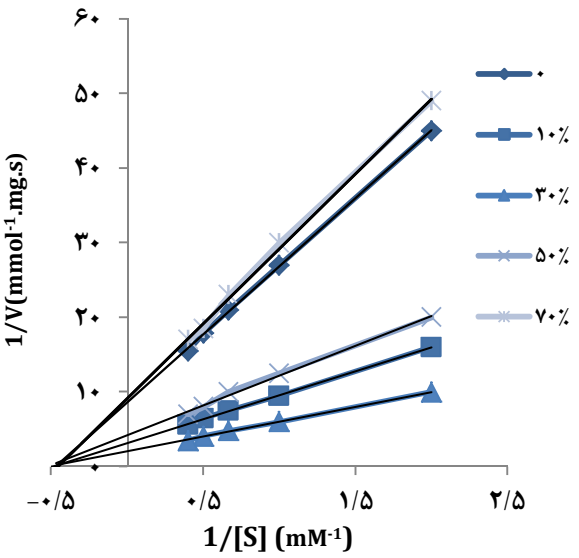
جدول ۳) تغییرات V_{max} (فعالیت)، K_m و K_{cat}/K_m آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت‌های مختلف متانول در دمای ۴۰°C و pH برابر ۷/۴

متانول (درصد حجمی- حجمی)	V_{max} (میلی‌مولار بر ثانیه)	درصد فعالیت (V_{max})	K_m (میلی‌مولار)	$K_{cat}/K_m \times 10$ ($Sec^{-1}.mM^{-1}$)
صفر	۰/۱۲	۱۰۰	۲/۱۲	٤/۰۹
٪۱۰	۰/۱۷	۱٤۱/٦	۲/۰۷	٥/۹٥
٪۳۰	۰/۲	۱٦٦/٦	۲/۰٦	۷/۰۳
٪٥۰	۰/۰۸۷	۷۲/٥	۱/۹	۳/۳۱
٪۷۰	۰/۰۸۳	٦۹/۱	۱/۲	٥/۰۱

جدول ۴) تغییرات V_{max} (فعالیت)، K_m و K_{cat}/K_m آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت‌های مختلف اتانول در دمای ۴۰°C و pH برابر ۷/۴

اتانول (درصد حجمی-حجمی)	V_{max} (میلی‌مولار بر ثانیه)	درصد فعالیت (V_{max})	K_m (میلی‌مولار)	$K_{cat}/K_m \times 10$ ($Sec^{-1}.mM^{-1}$)
صفر	۰/۱۲	۱۰۰	۲/۱۲	٤/۰۹
%۱۰	۰/۲۷	۲۲۵	۲/۱	۹/۳۱
%۳۰	۰/۳۵	۲۹۱/٦	۲/۰۹	۱۲/۱۳
%۵۰	۰/۱۵	۱۲۵	۱/۹۷	۵/۵۱
%۷۰	۰/۰۹۵	۷۹/۱	۱/۵۷	٤/۳۸

با افزایش غلظت ایزوپروپانول از صفر تا ۵۰% حجمی- حجمی، Vmax افزایش و K_m کاهش ولی در غلظت ۷۰% V_{max} و K_m هر دو کاهش یافتند (نمودار ۷؛ جدول ۵).



نمودار ۷) اثر غلظت‌های مختلف ایزوپروپانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در دمای ۴۰°C و pH برابر ۷/۴

جدول ۵) تغییرات V_{max} (فعالیت)، K_m و K_{cat}/K_m آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت‌های مختلف ایزوپروپانول در دمای ۴۰°C و pH برابر ۷/۴

ایزوپروپانول (درصد حجمی-حجمی)	V_{max} (میلی‌مولار بر ثانیه)	درصد فعالیت (V_{max})	K_m (میلی‌مولار)	$K_{cat}/K_m \times 10$ ($Sec^{-1}.mM^{-1}$)
صفر	۰/۱۲	۱۰۰	۲/۱۲	٤/۰۹
%۱۰	۰/۳۲	۲٦٦/٦	۲/۰۲	۱۱/٤۷
%۳۰	۰/٤۹	٤۰۸/۳	۱/۹٦	۱۸/۱۱
%۵۰	۰/۲٤	۲۰۰	۱/۹	۹/۱۵
%۷۰	۰/۱	۸۳/۳	۱/۸	٤/۰۲

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر اوره، گوانیدین‌هیدروکلراید و سه نوع حلال آلی متانول، اتانول و ایزوپروپانول بر فعالیت سینتیکی آنزیم پروتئیناز K انجام شد.

در شرایط آزمایشگاهی دگرگون‌سازی پروتئین در حضور اوره یا دترجنت‌ها که اتصالات آب‌گریز در پروتئین‌ها را تضعیف و فرم دگرگون پروتئین را پایدار می‌کنند، رخ می‌دهد. روش‌های دیگر برای دگرگون‌کردن پروتئین اضافه‌کردن باز، اسید یا حلال‌های آلی قوی و حرارت‌دادن پروتئین‌ها تا دماهای بالای ۶۰°C برای اکثر پروتئین‌ها است. دگرگون‌سازی هنگامی رخ می‌دهد که ساختار طبیعی دوم، سوم یا چهارم یک پروتئین تخریب شود[16]. اوره و گوانیدین‌هیدروکلراید از جمله دگرگون‌کننده‌های قوی هستند که بیش از سایر دگرگون‌کننده‌ها به کار می‌روند و موجب بهتربودن آب برای اسیدآمینه‌های غیرقطبی می‌شوند. به عبارت دیگر این ترکیبات برهم‌کنش آب‌گریز را تضعیف می‌کنند. ساختارهای اوره و گوانیدین‌هیدروکلراید نشان می‌دهند این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان دهنده یا گیرنده پروتون در تشکیل پیوند هیدروژنی با پروتئین نقش داشته باشند. حضور اتم‌های هیدروژن روی اتم ازت که قابلیت تشکیل پیوند هیدروژنی دارند نقش مهمی را در عمل دگرگون‌کردن پروتئین‌ها ایفا می‌کنند[17].

اوره (CH_4N_2O) به‌طور وسیعی برای دگرگون‌کردن پروتئین‌ها استفاده می‌شود. با وجود کاربرد گسترده از اوره هنوز مکانیزم مولکولی آن مبنی بر دگرگون‌کردن پروتئین به‌خوبی مشخص نشده است[18]. همه اسیدآمینه‌ها به‌جز گلوتامیک‌اسید و آسپارتیک‌اسید با مولکول‌های اوره واکنش می‌دهند. اسیدآمینه‌های تریپتوفان و سیستئین تمایل فراوانی برای اوره دارند[19]. در مطالعه‌ای که اثر غلظت‌های ۱ تا ۴ اوره روی آنزیم پروتئیناز K توسط *هیلز* و همکاران صورت گرفت، اثر فعال‌کنندگی اوره در این غلظت‌ها مشاهده شد[20].

در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم پروتئیناز K در غلظت‌های مختلفی از اوره بررسی شد که در غلظت‌های پایین، اوره سرعت ماکزیمم و K_m آنزیم را کاهش داده و از طریق مهار نارقابتی موجب کاهش فعالیت آنزیم شد. برای توجیه این موضوع می‌توان گفت که اوره موجب کاهش ثابت دی‌الکتریک حلال شده و اصولاً به‌عنوان کاهش‌دهنده برهم‌کنش‌های هیدروفوبیک بخش‌های درونی پروتئین عمل می‌کند. افزایش غلظت اوره بر انعطاف‌پذیری برخی از زنجیره‌های جانبی سطحی اثر می‌گذارد و موجب تبدیل بی‌نظمی به نظم می‌شود، که احتمالاً از طریق فراهم‌کردن شریک برای پیوندهای هیدروژنی اضافی در ساختار کمپلکس اوره خواهد بود. اوره در سطح پروتئین به‌خصوص در نزدیکی ریشه‌هایی که کمتر قطبی‌اند قرار می‌گیرد و در اسکلت تجمع می‌یابد. این پدیده منجر به جابه‌جایی مولکول‌های آب از سطح حلال به ریشه کمتر قطبی و پروتئین‌های اسکلتی به درون حفره آبی می‌شود که از لحاظ آنتروپیک و آنتالپیک قابل قبول است[19]. اگر چه باندهای هیدروژنی پروتئین- اوره به نظر نمی‌رسد سبب دگرگون‌شدن شوند ولی در ایجاد انرژی نقش دارند. اوره به اندازه کافی غیرقطبی است که گروه‌های غیرقطبی را حل کند. همچنین به اندازه کافی قطبی است که باندهای هیدروژنی را برای اسکلت پروتئینی فراهم کند. اوره سبب دگرگون‌شدن پروتئین‌ها از طریق میان‌کنش بین آب و بخش‌هایی که به‌طور طبیعی درون پروتئین قرار دارند، می‌شود[21, 19].

طبق یافته‌های مطالعه حاضر اوره در غلظت‌های ۳ و ۴مولار موجب افزایش V_{max} شد،که می‌تواند به‌دلیل نفوذ آن داخل مولکول و اتصال آن به زیرواحدهای باردار از جمله آرژنین قرارگرفته (همه اسیدآمینه‌ها به‌جز گلوتامیک‌اسید و آسپارتیک‌اسید با ملکول‌های اوره واکنش می‌دهند) در اطراف Trp۸ (مجاور جایگاه فعال) باشد که به دنبال آزادشدن این زیرواحد، از اثرات ناشی از اسیدآمینه آرژنین کم شده و با فشرده‌شدن آنزیم عملکرد آن بهبود می‌یابد. مطالعات سینتیکی نشان داد که با افزایش غلظت سوبسترا فشردگی آنزیم پروتئیناز K بیشتر شده و عملکرد آن بهتر می‌شود[22]. پس با توجه به ارتباط بین ساختار و عملکرد یک آنزیم شاید فشردگی ایجادشده توسط اوره موجب عملکرد بهتر آنزیم شود. این فشردگی می‌تواند به‌واسطه نفوذ اوره درون مولکول و

قرارگرفتن در نواحی اطراف جایگاه فعال باشد که به‌دنبال آن جهت‌گیری باندهای مختلف بهبود یافته و آنزیم عملکرد بهتری دارد.

در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم پروتئیناز K در غلظت‌های مختلفی از گوانیدین‌هیدروکلراید بررسی شد. بررسی پارامترهای سینتیکی نشان داد که گوانیدین‌هیدروکلراید سرعت ماکزیمم و K_m آنزیم را کاهش داده و از طریق مهار نارقابتی موجب کاهش فعالیت آنزیم شد، به‌طوری که با افزایش غلظت گوانیدین‌هیدروکلراید کاهش مقادیر V_{max} و K_m بیشتر شد. گوانیدین‌هیدروکلراید یکی از دگرگون‌کننده‌های قوی است. این ترکیب موجب می‌شود آب حلال بهتری برای اسیدآمینه‌های غیرقطبی شده و برهم‌کنش‌های آب‌گریز را تضعیف می‌کند. انتظار می‌رود که قدرت یونی خیلی بالای محلول‌های گوانیدین‌هیدروکلراید اثر سرکوبی و پوشانندگی روی برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک بین گروه‌های باردار در پروتئین‌ها داشته باشد. این ترکیب می‌تواند به‌عنوان دهنده یا گیرنده الکترون در تشکیل پیوند هیدروژنی با پروتئین نقش داشته باشد. گوانیدین‌هیدروکلراید موجب کاهش قطبیت حلال و ثابت دی‌الکتریک آن شده و به پیوندهای پپتیدی در سطح پروتئین وصل و در نهایت موجب بازشدن ساختمان آن می‌شود[23]. با توجه به آنچه که گفته شد مولکول‌های گوانیدین‌هیدروکلراید با سه مکانیزم زیر موجب بازشدن ساختار آنزیم پروتئیناز K و در نتیجه از بین‌رفتن فعالیت آن می‌شوند:

۱) به پیوندهای پپتیدی متصل و موجب بازشدن پروتئین می‌شوند و بنابراین پیوندهای پپتیدی بیشتری در معرض مولکول‌های دناتوره‌کننده قرار می‌گیرند.

۲) با گروه‌های جانبی اسیدهای‌آمینه پیوند هیدروژنی برقرار کرده و شبکه پیوند هیدروژنی پروتئینی را بر هم می‌زند.

۳) باعث تضعیف برهم‌کنش‌های آب‌گریز و الکتروستاتیک می‌شوند.

پایداری پروتئین وابسته به برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک، هیدروفوبیک و واندروالسی درون‌مولکولی و با محیط حلال اطراف آن است[24]. مطالعه انجام‌شده مبین نقش پایدارکنندگی برخی حلال‌های آلی به‌ویژه ترکیبات پلی‌اُل بر ساختار پروتئین و در نتیجه بهبود عملکرد آنها است[25]. در مطالعه حاضر اثر حلال‌های آلی، متانول، اتانول و ایزوپروپانول روی فعالیت سینتیکی آنزیم پروتئیناز K مطالعه شد. در غلظت‌های پایین این الکل‌ها موجب افزایش فعالیت آنزیم شد که این افزایش فعالیت با طویل‌شدن زنجیره هیدروکربنی افزایش یافت. این تغییر فعالیت ممکن است به این دلیل باشد که این ترکیبات با مجزاکردن سطح پروتئین طبیعی و محدودکردن آب‌پوشی منجر به پایداری پروتئین‌ها می‌شوند[26, 27].

حلال‌های آلی واجد گروه هیدروکسیل وقتی در محیط پروتئین‌ها قرار می‌گیرند موجب منظم‌ترشدن مولکول‌های آب در اطراف پروتئین می‌شوند. این مواد می‌توانند با مولکول‌های آب اطراف پروتئین پیوند هیدروژنی برقرار کنند[28]. بنابراین پیوندهای هیدروژنی بین آب و آب- پروتئین تا حدود زیادی از بین می‌رود و با پیوندهای ایجادشده با حلال‌های آلی واجد گروه هیدروکسیل جایگزین می‌شوند. به‌علت این پدیده، لایه آب‌پوشی روی سطح پروتئین ایجاد می‌شود و پیوندهای درونی پروتئین‌ها تقویت می‌شوند. بنابراین با افزایش اندازه حلال‌های آلی واجد گروه هیدروکسیل و قوی‌ترشدن لایه آب‌پوشی اطراف پروتئین، فشردگی و پایداری پروتئین بیشتر می‌شود. طی این مدت پیوندهای دی‌سولفید و شبکه اطراف پروتئین نیز یک لایه آب‌پوشی با مولکول‌های آب تشکیل می‌دهند. بنابراین تغییر ساختار و دینامیک آب در محلول می‌تواند برهم‌کنش‌های آب‌گریز بین جفت گروه‌های آب‌گریز در ساختار پروتئین را افزایش دهد و حالت‌های طبیعی پروتئین را پایدار سازد[29]. در غلظت‌های بالای این حلال‌ها فعالیت آنزیم کاهش یافته است. طبق یک مکانیزم الکل‌ها در غلظت بالا از طریق برهم‌ریختن اثر هیدروفوبیک و تغییر میان‌کنش‌های یونی و پیوندهای هیدروژنی ساختار سوم پروتئین را ناپایدار می‌کنند. تغییر در پیوندهای هیدروژنی علاوه بر ناپایدارکردن ساختار سوم منجر به بازشدن برخی از ساختارهای دوم می‌شود[26]. مطالعات ساختاری روی آنزیم پروتئیناز K در حضور اتانول، متانول و ایزوپروپانول نشان داده است که این الکل‌ها در غلظت‌های پایین (تا حدود ۴۰%) باعث پایداری این آنزیم می‌شوند، به‌نحوی که آنزیم حتی در برابر دناتوراسیون به‌وسیله گرما و گوانیدین‌هیدروکلرید مقاومت نشان می‌دهد ولی افزایش غلظت این الکل‌ها باعث تغییرات ساختمانی آنزیم شده و موجب تبدیل ساختارهای آلفا-هلیکس آنزیم پروتئیناز K به صفحات بتا می‌شود که ازبین‌رفتن ساختارهای آلفا ازدست‌رفتن پایداری و فعالیت آنزیم را در پی دارد[30].

در مطالعه حاضر به‌دلیل عدم وجود دستگاه رنگ‌تابی دورانی (CD) امکان مطالعه ساختار ثانویه وجود نداشت.

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده اثر اوره، گوانیدین‌هیدروکلراید و حلال‌های آلی روی آنزیم پروتئیناز K در محدوده‌های وسیع‌تری از دما، pH و غلظت بررسی شود. همچنین می‌توان اثر این مواد را روی آنزیم‌هایی با ساختار مشابه انجام داد تا شاید بتوان به اطلاعات بیشتری بین ساختار و عملکرد این آنزیم‌ها دست یافت.

نتیجه‌گیری

اوره در غلظت‌های پایین اثر مهاری و از غلظت ۲مولار به بالا اثر فعال‌کنندگی بر فعالیت آنزیم دارد، در حالی که گوانیدین‌هیدروکلراید در تمامی غلظت‌ها اثر مهاری دارد و می‌توان از آن به‌عنوان یک مهارکننده برای آنزیم نام برد. اثر حلال‌های آلی متانول، اتانول و ایزوپروپانول روی فعالیت آنزیم پروتئیناز K به درصد حجمی- حجمی آنها بستگی دارد و در درصدهای پایین باعث فعال‌شدن آنزیم می‌شوند ولی در درصدهای بالا اثر مهاری دارند، به‌طوری که متانول زیر ۳۰%، اتانول و ایزوپروپانول کمتر از ۵۰% آنزیم را فعال می‌کنند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از دانشگاه شهرکرد به‌دلیل حمایت مالی و معنوی در پیشبرد مطالعه حاضر کمال تشکر را دارند.

تاییدیه‌اخلاقی: تمامی داده‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه حاضر از پایان‌نامه بوده و مقاله در جای دیگری چاپ یا ارسال نشده است.

تعارض منافع: تعارض منافعی میان نویسندگان وجود ندارد.

سهم نویسندگان: بهزاد شارقی (نویسنده اول)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰%)؛ الهام یداللهی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۵%)؛ عظیمه ربیعی (نویسنده سوم)، پژوهشگر اصلی (۲۵%)

منابع مالی: منابع مالی مطالعه حاضر توسط دانشگاه شهرکرد تامین شده است.

منابع

1- Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H. Proteinase K from Tritirachium album limber. Eur J Biochem. 1974;47(1):91-7.

2- Hosseini Koupaei M, Shareghi B, Saboury AA, Davar F. Molecular investigation on the interaction of spermine with proteinase K by multispectroscopic techniques and molecular simulation studies. Int J Biol Macromol. 2017;94(Pt A):406-14.

3- Panek JJ, Mazzarello R, Novič M, Jezierska-Mazzarello A. Impact of Mercury (II) on proteinase K catalytic center: Investigations via classical and Born-Oppenheimer molecular dynamics. Mol Divers. 2011;15(1):215-26.

4- Hosseini Koupaei M, Shareghi B, Saboury AA. Conjugation of biogenic polyamine (putrescine) with proteinase K: Spectroscopic and theoretical insights. Int J Biol Macromol. 2017;98:150-8.

5- Hosseini Koupaei M, Shareghi B, Saboury AA, Davar F, Semnani A, Evini M. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles and their effect on the stability and activity of proteinase K. RSC Adv. 2016;6(48):42313-23.

6- Bajorath J, Hinrichs W, Saenger W. The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium. Eur J Biochem. 1988;176(2):441-7.

7- Hosseini Koupaei M, Shareghi B, Saboury A, Davar F, Raisi F. The effect of spermidine on the structure, kinetics and stability of proteinase K: Spectroscopic and computational approaches. RSC Adv. 2016;6(107):105476-86.

8- Nooraei P, Shareghi B, Salavati Niasari M, Shahbazkia HR, Semnani A. Comparative studies on the interaction of proteinase-K with nano-CuO and copper ions. J Nanostruct. 2012;2(1):35-41.

9- Privalov PL, Crane-Robinson C. Role of water in the formation of macromolecular structures. Eur Biophys J. 2017;46(3):203-24.

10- Canchi DR, García AE. Cosolvent effects on protein stability. Annu Rev Phys Chem. 2013;64:273-93.

11- Koops BC, Verheij HM, Slotboom AJ, Egmond MR. Effect of chemical modification on the activity of lipases in organic solvents. Enzyme Microb Technol. 1999;25(7):622-31.

12- Fernández M, Fragoso A, Cao R, Baños M, Ansorge-Schumacher M, Hartmeier W, et al. Functional properties and application in peptide synthesis of trypsin modified with cyclodextrin-containing dicarboxylic acids. J Mol Catal B, Enzym. 2004;31(1-3):47-52.

13- Stone LA, Jackson GS, Collinge J, Wadsworth JD, Clarke AR. Inhibition of proteinase K activity by copper (II) ions. Biochemistry. 2007;46(1):245-52.

14- Cornish-Bowden, A .Principles of enzyme kinetics. New York City: Elsevier; 1976. pp. 1420-760.

15- Eisenthal, R, Danson MJ. Enzyme assays: A practical approachJournal ofBiochemistry and Biophysics. In: Eisenthal, R, Danson MJ editors. Enzyme Assays: A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press; 2002. p. 257.

16- Fink AL, Calciano LJ, Goto Y, Kurotsu T, Palleros DR. Classificationof acid denaturation of proteins: Intermediates and unfolded states. Biochem. 1994;33(41):12504-11.

17- Makhatadze GI, Privalov PL. Protein interactions with urea and guanidinium chloride, a calorimetric study. J Mol Biol. 1992;226(2):491-505.

18- Barone G, Rizoo E, Vitagliano V. Opposite effect of urea and some of its derivatives on water structure. J Phys Chem. 1970;74(10):2230-2.

19- Courtenay ES, Capp MW, Record MT Jr. Thermodynamics of interactions of urea and guanidinium salts with protein surface: Relationship between solute effects on protein processes and changes in water-accessible surface area. Protein Sci. 2001;10(12):2485-97.

20- Hilz H, Wiegers U, Adamietz P. Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: Application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins. Eur J Biochem. 1975;56(1):103-8.

21- Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(9):5142-7.

22- Tao Y, Rao ZH, Liu SQ. Insight derived from molecular dynamics simulation into substrate-induced changes in protein motions of proteinase K. J Biomol Struct Dyn. 2010;28(2):143-58.

23- Harris JI. Effect of urea on trypsin and alpha-chymotrypsin. Nature. 1956;177(4506):471-3.

24- Venkatesu P, Lee MJ, Lin HM. Thermodynamic characterization of the osmolyte effect on protein stability and the effect of GdnHCl on the protein denatured state. J Phys Chem B. 2007;111(30):9045-56.

25- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. Science. 1982;217(4566):1214-22.

26- Raducan A, Cantemir AR, Puiu M, Oancea D. Kinetics of hydrogen peroxide decomposition by catalase: Hydroxylic solvent effects. Bioprocess Biosyst Eng. 2012;35(9):1523-30.

27- Pittz EP, Timasheff SN. Interaction of ribonuclease A with aqueous 2-methyl-2,4-pentanediol at pH 5.8. Biochemistry. 1978;17(4):615-23.

28- Sola-Penna M, Meyer-Fernandes JR. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: Why is trehalose more effective than other sugars?. Arch Biochem Biophys. 1998;360(1):10-4.

29- Kumar A, Attri P, Venkatesu P. Effect of polyols on the native structure of α-chymotrypsin: A comparable study. Thermochimi Acta. 2012;536:55-62.

30- Tomar R, Dubey VK, Jagannadham MV. Effect of alkyl alcohols on partially unfolded state of proteinase K: Differential stability of α-helix and β-sheet rich regions of the enzyme. Biochimie. 2009;91(8):951-60.