

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۸، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۱۸۲ - ۱۶۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۱/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۱۳

تأثیر یون‌های فلزی بر فعالیت و پایداری آنزیم‌های پیرازین آمیداز نوع وحشی و جهش یافته

مهرنوش صفرزاده: دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، safarzade.ma@yahoo.com
محمد پازنگ*: استادیار بیوشیمی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، pazhang@azaruniv.ac.ir
فرامرز مهرنژاد: استادیار بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران، mehrraz@ut.ac.ir
فرحناوش دوستدار: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، f_doustdar@sbm.ac.ir
نادر چاپارزاده: دانشیار فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، nchapar@azaruniv.ac.ir
داود ربیعی فردنبه: دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، d.rabiei@yahoo.com

چکیده

مقدمه: پیرازین آمیداز یک متالو آنزیم مونومری با فعالیت هیدرولازی است و مسئول تبدیل داروی ضدسل پیرازین آمید به شکل فعالش یعنی پیرازینوئیک اسید است. جایگاه اتصال به فلز در آنزیم پیرازین آمیداز مایکوباکتریوم *Tobrikluzis* حاوی یک آسپارتیک اسید (آسپارتیک اسید ۴۹) و سه هیستیدین (هیستیدین ۵۱، هیستیدین ۵۷ و هیستیدین ۷۱) است. بروز جهش در ژن پیرازین آمیداز (*pnca*) مسؤول اصلی مقاومت پیرازین آمیدی است و می‌تواند جایگاه اتصال به فلز را تغییر دهد. از این جهت، بررسی تأثیر یون‌های فلزی مختلف بر فعالیت و پایداری آنزیم پیرازین آمیداز نوع وحشی و جهش یافته می‌تواند مهم باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ناقل بیانی حاوی ژن پیرازین آمیدازهای نوع وحشی و جهش یافته به *شرشیا کلی* سویه BL21 منتقل شد سپس پروتئین‌های نوترکیب بیان و تخلیص شدند. میزان تخلیص با روش الکتروفورز SDS-PAGE ارزیابی شد؛ سپس فعالیت و پایداری آنزیم‌های خالص شده در حضور غلظت یک میلی‌مولار از یون‌های دو ظرفیتی نیکل (Ni^{2+})، آهن (Fe^{2+}) و منگنز (Mn^{2+}) بررسی شد.

نتایج: بررسی ژل حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE نشان داد که آنزیم‌های بیان شده، خالص شده‌اند. بررسی فعالیت و پایداری در حضور فلزات نشان داد که نیکل باعث افزایش فعالیت و پایداری آنزیم‌های نوع وحشی و جهش یافته‌ها (جهش یافته ۱: L151S و جهش یافته ۲ (سه گانه): A143T/T168A/E173K) شد. آهن باعث کاهش فعالیت و پایداری جهش یافته ۱ شد؛ اما بر سایر آنزیم‌ها تأثیر چشمگیری نداشت. منگنز باعث کاهش فعالیت و پایداری آنزیم‌ها شد.

بحث و نتیجه‌گیری: یون نیکل نسبت به یون‌های آهن و منگنز میان‌کنش‌های مساعدتری با جایگاه اتصال به فلز در پیرازین آمیداز نوع وحشی و جهش یافته‌ها برقرار کرد و بنابراین باعث افزایش فعالیت و پایداری آنزیم‌ها شد.

واژه‌های کلیدی: مایکوباکتریوم *Tobrikluzis*، پیرازین آمیداز، مقاومت به پیرازین آمید، جایگاه اتصال به فلز، فعالیت و پایداری

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

یون‌های فلزی به میزان زیادی در ساختار پروتئین‌ها دیده می‌شوند (۱). این یون‌ها می‌توانند در عملکرد و پایداری پروتئین‌ها نقش حیاتی داشته باشند (۲-۴). آمینواسیدهای مختلفی در اتصال به یون‌های فلزی در پروتئین‌ها مشارکت دارند. از این آمینواسیدها می‌توان به آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید، سیستئین و هیستیدین اشاره کرد (۱). همه فلزات غیر از مس تمایل دارند با زنجیره‌های جانبی حاوی گروه کربوکسیل میان‌کنش دهند (۱). فلزاتی همچون منگنز، کبالت و آهن ترجیح می‌دهند با گروه ایمیدازول در زنجیره جانبی آمینواسید هیستیدین میان‌کنش دهند، به این دلیل به این فلزات، فلزات کلاس کلاس سولفور یعنی نیکل، روی و مس با گروه تیول در زنجیره جانبی سیستئین میان‌کنش می‌دهند. فلزات این کلاس به گروه ایمیدازول نیز تمایل زیادی دارند (۱). آنزیم پیرازین آمیداز (رمز شده توسط ژن *pncA*) یک متالوپروتئین مونومری ۱۸۶ آمینواسیدی با وزن مولکولی ۲۰/۸۹ کیلو دالتون است و pH بهینه آن ۷ و دمای بهینه آن ۴۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (۵). این آنزیم داروی پیرازین آمید (دارویی ارزشمند در کنترل بیماری سل) را هیدرولیز می‌کند و به پیرازینوئیک اسید (شکل فعالش) تبدیل می‌کند (۶). پیرازینوئیک اسید در عملکردهای طبیعی سلول باکتری عامل بیماری سل (مایکوباکتریوم توبریکلوزیس) اختلال ایجاد می‌کند (۷ و ۸). دو^۱ و همکارانش ساختار سه‌بعدی پیرازین آمیداز مربوط به پیروکوکوس هورلیکوشی^۲ را مشخص کردند. آن‌ها در مطالعه خود نشان دادند رزیدوهای آسپارتیک اسید ۵۲،

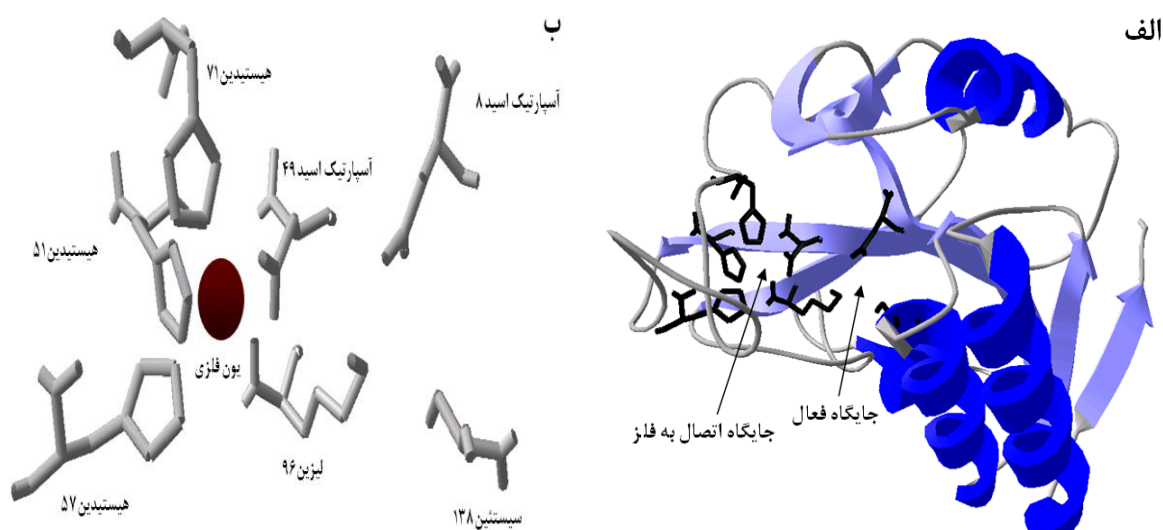
هیستیدین ۵۴ و هیستیدین ۷۱ در ناحیه اتصال فلز مشارکت دارند (۹). با تعیین ساختار سه‌بعدی آنزیم پیرازین آمیداز مایکوباکتریوم توبریکلوزیس (عامل بیماری سل) مشخص شد که در ساختار آن دو نوع یون فلزی Fe^{+2} و Mn^{+2} وجود دارد (۱۰). نتایج تعیین ساختار نشان داد این آنزیم از صفحه بتای موازی شش‌رشته‌ای با مارپیچ‌های واقع در هر دو طرف به شکل یک α/β واحد ساخته شده است (شکل ۱ الف) (۱۰). جایگاه فعال حاوی سه رزیدوی کاتالیتیک متشکل از آسپارتیک اسید ۸، لیزین ۹۶ و سیستئین ۱۳۸ (شکل ۱ ب) است و جایگاه اتصال به فلز نیز دارای یک آسپارتیک اسید (آسپارتیک اسید ۴۹) و سه هیستیدین (هیستیدین ۵۱، هیستیدین ۵۷ و هیستیدین ۷۱) است (شکل ۱ ب) (۱۰). همان‌طور که در شکل ۱ الف و ۱ ب مشخص است جایگاه اتصال به فلز در نزدیکی جایگاه فعال قرار دارد و بنابراین فلز قرار گرفته در جایگاه اتصال به فلز می‌تواند با مولکول‌های آب نزدیک جایگاه فعال میان‌کنش دهد (۱۰-۱۳).

مشاهده شده است که جهش در ژن آنزیم‌هایی همچون DNA ژیراز و پیرازین آمیداز در مایکوباکتریوم توبریکلوزیس به ترتیب باعث بروز مقاومت به داروهای افلوکسازین و پیرازین آمید می‌شود (۱۲ و ۱۴). به‌علت جهش در ژن آنزیم پیرازین آمیداز، فعالیت پیرازین آمیدازی پروتئین حاصل از آن از دست می‌رود و باکتری از تبدیل پیرازین آمید به شکل فعال پیرازینوئیک اسید ناتوان می‌شود (۱۲، ۱۵-۲۰)؛ بنابراین نبود فعالیت پیرازین آمیدازی باعث مقاومت پیرازین آمیدی در سویه‌های مایکوباکتریوم توبریکلوزیس

آمینواسیدی ژن آنزیم پیرازین‌آمیداز در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv به‌عنوان مبنا قرار می‌گیرد (سویه رفرنس) (۱۰ و ۲۲) و توالی آنزیم‌های جهش‌یافته از سویه‌های مقاوم نسبت به آن مقایسه می‌شوند. همان‌طور که نتایج تطبیق توالی در شکل ۲ و همچنین بررسی ساختار جهش‌یافته‌ها در شکل ۳ (الف و ب) نشان می‌دهد، در جهش‌یافته‌های ۱ و ۲، جهش‌ها در نزدیکی جایگاه اتصال به فلز و جایگاه فعال قرار ندارند. گفتنی است در این مطالعه ژن آنزیم نوع وحشی مربوط به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv است و ژن آنزیم‌های جهش‌یافته را دوستاندار^۳ و همکاران از سویه‌های مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از ایران، گزارش کرده‌اند (۲۳). هدف از این مطالعه، بررسی خصوصیات آنزیمی پیرازین‌آمیداز نوع وحشی و جهش‌یافته و ارزیابی فعالیت آنزیمی و پایداری حرارتی آن‌ها در حضور فلزات است.

می‌شود. چندین مطالعه با پیرازین‌آمیداز مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نو ترکیب نشان داد که جهش‌های مؤثر بر جایگاه فعال و جایگاه اتصال فلز، فعالیت آنزیم پیرازین‌آمیداز را مختل می‌کنند در حالی که جهش‌های دور از این جایگاه‌ها تأثیر کمتری بر فعالیت آنزیمی می‌گذارند (۵، ۱۲ و ۲۱)؛ بنابراین بروز مقاومت به داروی پیرازین‌آمیداز در جهش‌یافته‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌تواند به دلیل تأثیر جهش‌ها بر جایگاه اتصال فلزی باشد. جهش در جایگاه اتصال به فلز می‌تواند فعالیت و پایداری آنزیم پیرازین‌آمیداز را تحت تأثیر قرار دهد.

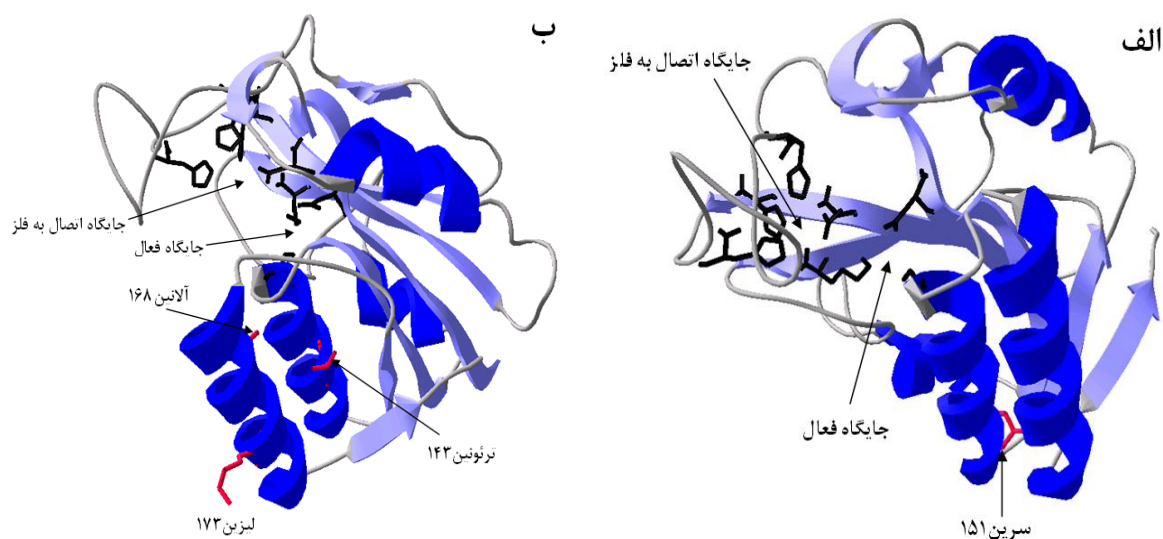
در این مطالعه، فعالیت و پایداری آنزیم پیرازین‌آمیداز نوع وحشی (مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv) و دو جهش‌یافته L151S (جهش‌یافته ۱، شکل ۲) و A143T/T168A/E173K (جهش‌یافته ۲ (سه‌گانه)، شکل ۲) بررسی شد. گفتنی است که توالی



شکل ۱- الف) ساختار سوم آنزیم پیرازین‌آمیداز، ب) رزیدوهای دخیل در جایگاه فعال و جایگاه اتصال به فلز. شکل‌ها با استفاده از فایل با کد پی‌دی‌بی: 3p11 با نرم‌افزار اس‌پی‌دی‌بی‌وی^۵ رسم شده‌اند. گفتنی است فایل پی‌دی‌بی مربوط به باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv بوده (۱۰) و از سایت اینترنتی www.pdb.org تهیه شده است.

Wild type	MRALIIIVDVQ [*] NDFCEGGSLAVTGGAAALARAISDYLAEEADYHHVVATKDF 50
L151S	MRALIIIVDVQ [*] NDFCEGGSLAVTGGAAALARAISDYLAEEADYHHVVATKDF 50
A143T/T168A/E173K	MRALIIIVDVQ [*] NDFCEGGSLAVTGGAAALARAISDYLAEEADYHHVVATKDF 50
Wild type	HIDPGDHFSGT [*] PDYSSSWPPHCVSGT [*] PGADFHP [*] SLD [*] SAIEAVFYK [*] GAYT 100
L151S	HIDPGDHFSGT [*] PDYSSSWPPHCVSGT [*] PGADFHP [*] SLD [*] SAIEAVFYK [*] GAYT 100
A143T/T168A/E173K	HIDPGDHFSGT [*] PDYSSSWPPHCVSGT [*] PGADFHP [*] SLD [*] SAIEAVFYK [*] GAYT 100
Wild type	GAYSGFEGVDENGTP [*] LLN [*] WLRQ [*] RGVDEVDV [*] VGIATDHC [*] V [*] RQ [*] TAEDAV [*] RNG 150
L151S	GAYSGFEGVDENGTP [*] LLN [*] WLRQ [*] RGVDEVDV [*] VGIATDHC [*] V [*] RQ [*] TAEDAV [*] RNG 150
A143T/T168A/E173K	GAYSGFEGVDENGTP [*] LLN [*] WLRQ [*] RGVDEVDV [*] VGIATDHC [*] V [*] RQ [*] TAEDAV [*] RNG 150
Wild type	LATRVLVDLTAGVSADTTVAALEEMRTASVELV [*] CSS 186
L151S	ⓈATRVLVDLTAGVSADTTVAALEEMRTASVELV [*] CSS 186
A143T/T168A/E173K	LATRVLVDLTAGVSADTTVAALⓈEMRTASVELV [*] CSS 186

شکل ۲- تطبیق توالی آمینواسیدی آنزیم پیرازین آمیداز نوع وحشی و جهش یافته‌ها. توالی آمینواسیدی آنزیم نوع وحشی از میکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv است. توالی مربوط به جهش یافته ۱ (L151S) و جهش یافته ۲ (سه گانه) از منبع ۲۳ تهیه شده است. اطراف آمینواسیدهای تغییر یافته در جهش یافته‌ها، خط کشیده شده است. آمینواسیدهای نشان داده شده با علامت ستاره و پیکان به ترتیب مربوط به آمینواسیدهای دخیل در جایگاه فعال و جایگاه اتصال به فلز هستند.



شکل ۳- ساختار مدل سازی شده جهش یافته ۱ (الف) و جهش یافته ۲ (سه گانه) (ب). مدل‌ها با استفاده از الگو با کد پی‌دی‌بی: 3pl1 از طریق SWISS-MODEL Workspace (<http://swissmodel.expasy.org>) ساخته شده‌اند.

مواد و روش‌ها

مواد: ایزوپروپیل بتا-د-تیوگالاکتوپیرانوزید^۶ از شرکت فرمنتاز^۷ تهیه شد. پیرازین آمید و سایر مواد به کاررفته در این پژوهش از شرکت مرک خریداری شد.

بیان، تخلیص و الکتروفورز پیرازین آمید از نوع وحشی و جهش یافته‌های آن: ناقل بیانی (+) pET28a حاوی ژن آنزیم نوع وحشی و آنزیم‌های جهش یافته از دوستاندار و همکاران (۲۴) تهیه شد و با شوک حرارتی به سلول‌های *شریشیا کلسی* سویه BL21 منتقل شد و سپس با استفاده از محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین، بیان پروتئین در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد توسط غلظت نهایی یک میلی‌مولار از ایزوپروپیل بتا-د-تیوگالاکتوپیرانوزید به مدت ۱۴ ساعت القا شد. برای تخلیص، از ستون نیکل NTA- (شرکت کیاژن^۸) (۲۲) استفاده شد و الکتروفورز SDS-PAGE با استفاده از ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲ درصد (وزنی/حجمی) توسط روش لاملی^۹ انجام شد (۲۵).

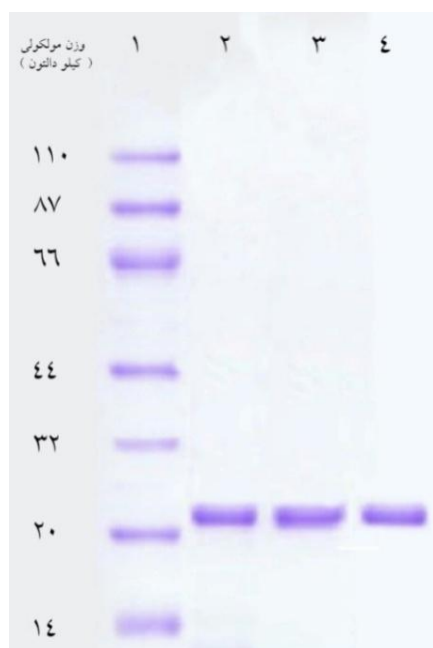
تعیین فعالیت آنزیم‌ها (۱۲): تعیین فعالیت آنزیمی براساس تست واین^{۱۰} انجام شد (۱۲). ۵۰ میکرولیتر از محلول حاوی سوسترا (پیرازین آمید ۴۰ میلی‌مولار، تریس ۱۰۰ میلی‌مولار pH ۷، ۲-مرکاپتواتانول ۲ میلی‌مولار) به ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های حاوی آنزیم اضافه شد. به محیط واکنش آنزیمی بعد از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۱۰ میکرولیتر از آمونیوم فرسولفات^{۱۱} و ۸۹۰ میکرولیتر از گلیسین هیدروکلراید^{۱۲} (pH ۳/۴) اضافه شد. سپس ناخالصی‌ها توسط سانتریفیوژ در دور ۲۰۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه حذف شد و جذب محلول رویی در طول موج ۴۸۰ نانومتر تعیین شد. این نوع تعیین فعالیت براساس

پیرازینوئیک اسید تولیدی است و یک واحد عمل آنزیمی معادل مقدار آنزیمی است که در زمان یک دقیقه، یک میکرومول پیرازینوئیک اسید تولید کند.

تأثیر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم‌ها: فعالیت آنزیمی (نوع وحشی و جهش یافته‌ها) در حضور غلظت ۱ میلی‌مولار از نمک‌های سولفات فلزات نیکل، آهن و منگنز براساس روش مذکور در فوق انجام شد. گفتنی است که هر کدام از واکنش‌ها سه بار تکرار شدند.

بررسی پایداری حرارتی هر کدام از پروتئین‌ها در حضور و نبود یون‌های فلزی: ابتدا محلول‌های آنزیمی هر کدام از پیرازین آمید از نوع وحشی و جهش یافته‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و در بازه‌های زمانی صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ دقیقه برداشته شدند و به داخل یخ منتقل شدند. پس از ۳۰ دقیقه فعالیت باقی مانده آنزیم براساس روش مذکور در فوق ارزیابی شد. بررسی پایداری برای هر یک از آنزیم‌ها سه بار تکرار شد. زمان صفر انکوباسیون دمایی به‌عنوان کنترل (۱۰۰ درصد فعالیت) در نظر گرفته شد.

جهت بررسی تأثیر یون‌های فلزی بر پایداری آنزیم‌ها، محلول‌های آنزیمی نوع وحشی و جهش یافته‌ها در غلظت ۱ میلی‌مولار از فلزات نیکل، آهن و منگنز، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در بازه‌های زمانی صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه برداشته شدند و به داخل یخ منتقل شدند. پس از ۳۰ دقیقه سرعت‌های آنزیمی ارزیابی شدند. زمان صفر انکوباسیون دمایی به‌عنوان کنترل (۱۰۰ درصد فعالیت) در نظر گرفته شد. بررسی پایداری برای هر یک از آنزیم‌ها در حضور فلزات مختلف، سه بار تکرار شد.



شکل ۴- نتیجه الکتروفورز ژل SDS-PAGE. ۱. اندازه نمای پروتئین، ۲. آنزیم نوع وحشی، ۳. جهش یافته ۱ و ۴. جهش یافته ۲

تأثیر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم‌ها: جهت
 بررسی فعالیت آنزیم پیرازین آمیداز نوع وحشی و جهش یافته‌ها فعالیت آنزیم‌های مذکور در غلظت یک میلی‌مولار از فلزات آهن، نیکل و منگنز ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل ۵ و جدول ۱ (به عنوان مثال فلز آهن) مشاهده می‌شود، فلزات بر فعالیت آنزیم‌های نوع وحشی و جهش یافته به‌طور معنی‌داری تأثیر گذاشته‌اند. نتایج نشان داد که نیکل باعث افزایش فعالیت آنزیم نوع وحشی و جهش یافته‌ها شد. این افزایش در مورد آنزیم نوع وحشی و جهش یافته ۱ بیشتر است (شکل ۵ الف). آهن در جهش یافته ۱ باعث کاهش فعالیت شد اما در آنزیم‌های دیگر (نوع وحشی و جهش یافته ۲) مقداری فعالیت آنزیم‌ها را افزایش داد (شکل ۵ ب). بررسی فعالیت آنزیم‌ها در حضور منگنز نشان داد که منگنز فعالیت آنزیم‌های نوع وحشی و جهش یافته را کاهش می‌دهد (شکل ۵ ج).

محاسبه ثابت سرعت غیرفعال شدن (k_{in}) و نیمه عمر

آنزیم در حضور و نبود فلزات: با توجه به اینکه غیرفعال شدن آنزیم‌ها (کاهش پایداری) مطابق با واکنش‌های درجه یک بود، بنابراین برای محاسبه ثابت سرعت غیرفعال شدن (k_{in}) و همچنین نیمه عمر آنزیم‌ها از معادلات زیر استفاده شد (۲۶):

$$\ln(\text{Activity}) = \ln(\text{Activity})_0 - k_{int} t \quad (۱)$$

$$\text{Half life} = \frac{0.693}{k_{in}} \quad (۲)$$

تجزیه و تحلیل آماری: در این پژوهش جهت

تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات حاصل از فعالیت و پایداری آنزیم نوع وحشی و جهش یافته‌ها در حضور و نبود فلزات از نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

نتایج

بیان و تخلص پیرازین آمیداز نوع وحشی و

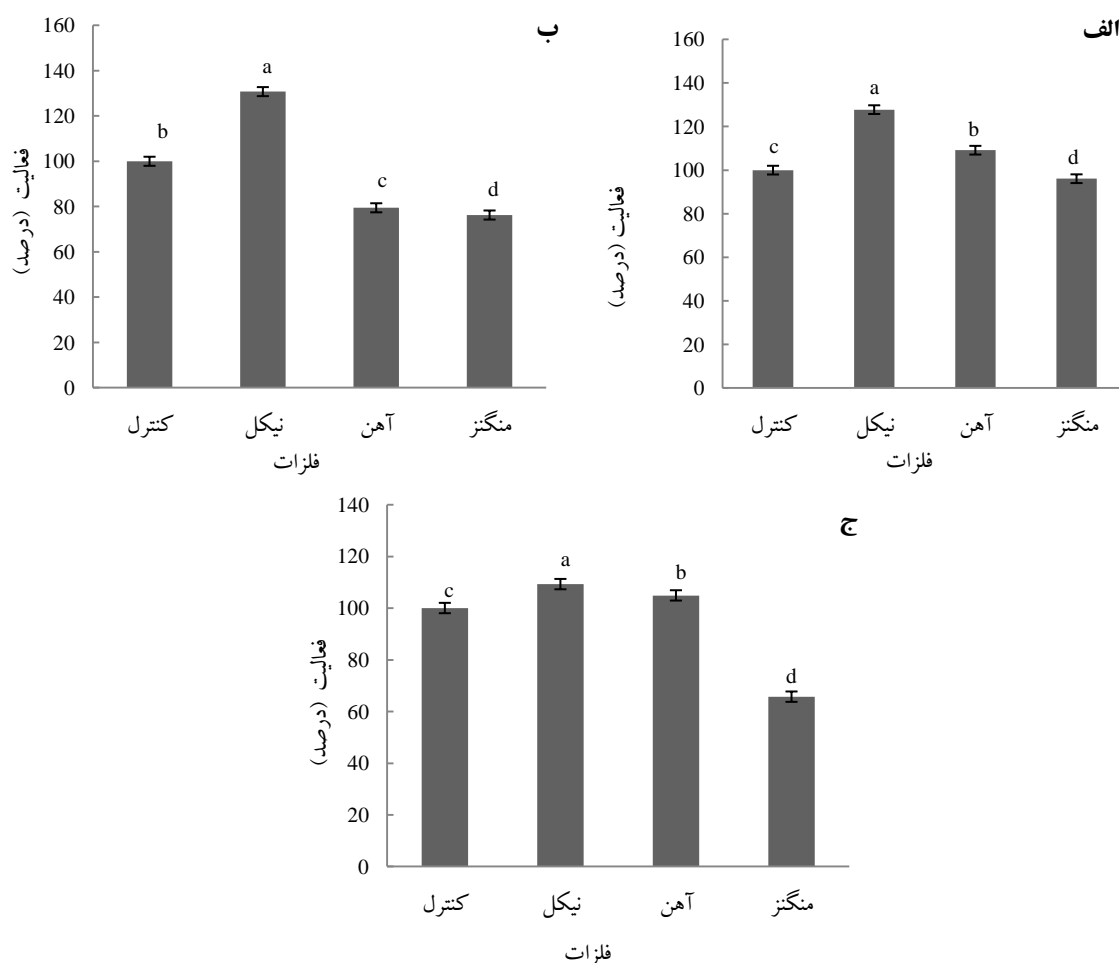
جهش یافته‌های آن: بعد از بیان و تخلص آنزیم پیرازین آمیداز نوع وحشی و جهش یافته‌ها، جهت ارزیابی میزان خلوص پروتئین‌ها، آنزیم‌های خالص شده توسط الکتروفورز SDS-PAGE بررسی شد. نتیجه نشان داد که پروتئین‌های حاصل از بیان تقریباً ۲۱ کیلو دالتون وزن مولکولی داشته و به‌طور کامل خالص شده‌اند (شکل ۴).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر فلز آهن بر فعالیت آنزیم نوع

وحشی و جهش یافته‌ها

F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
۶۶۸/۲*	۵۹۸/۲	۱۷۹۴/۴	۳	نوع وحشی
۴۸۴/۶*	۱۸۷۴/۲	۵۶۲۲/۲	۳	جهش یافته ۱
۱۸۲/۶*	۱۱۸۴/۵	۳۵۵۲/۶	۳	جهش یافته ۲

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد



شکل ۵- تأثیر غلظت یک میلی‌مولار یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم نوع وحشی (الف)، جهش‌یافته ۱ (ب) و جهش‌یافته ۲ (سه‌گانه) (ج).

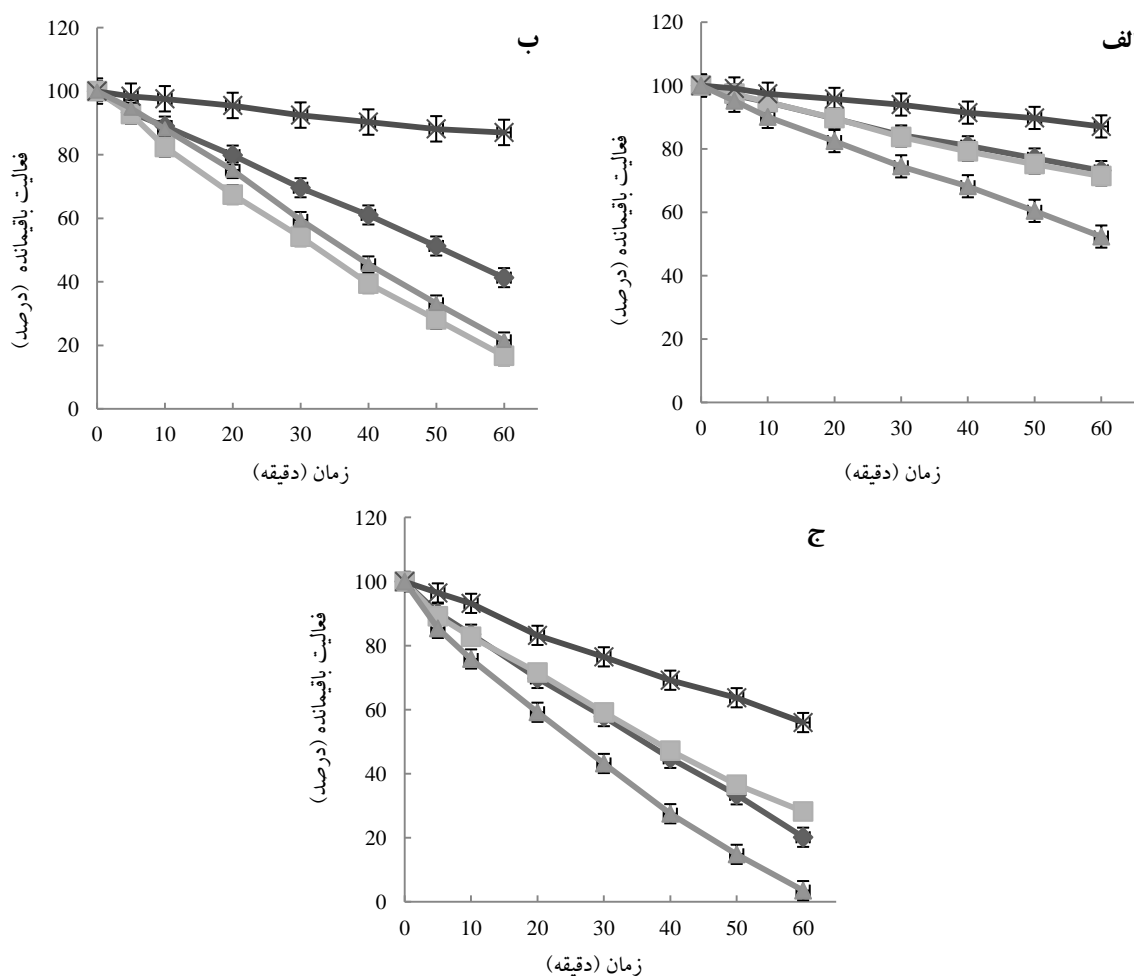
که باعث کاهش و یا افزایش ثابت سرعت غیرفعال‌شدن آنزیم‌ها شود، به ترتیب باعث افزایش و کاهش پایداری آنزیم‌ها می‌شود. همان‌طور که در شکل ۷ و جدول ۲ قابل مشاهده است، تأثیر فلزات بر ثابت سرعت غیرفعال‌شدن آنزیم‌ها و در نتیجه بر پایداری آنزیم‌ها، در کل (غیر از آهن در نوع وحشی و جهش‌یافته سه‌گانه) معنی‌دار بوده است. نتایج نشان داد نیکل باعث کاهش ثابت سرعت غیرفعال‌شدن و در نتیجه افزایش نیمه عمر (پایداری) آنزیم نسبت به حالت کنترل (بدون حضور فلز) به خصوص در جهش‌یافته ۱ (تا پنج برابر) شده (شکل ۷ الف و جدول ۳) و این تأثیر معنی‌دار بوده

بررسی پایداری حرارتی آنزیم‌ها در حضور

یون‌های فلزی: محلول‌های آنزیمی از آنزیم وحشی و جهش‌یافته‌ها در حضور فلزات نیکل، آهن و منگنز (با غلظت یک میلی‌مولار) و بدون حضور آن‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های مختلف انکوبه شد و سپس نمودار فعالیت باقی مانده علیه زمان رسم شد (شکل ۶). سپس براساس نمودارهای حاصل (شکل ۶) و با استفاده از معادله (۱) ثابت سرعت غیرفعال‌شدن (k_{in}) آنزیم‌ها (در حضور و نبود فلزات به دست آمد (شکل ۷) گفتنی است که با کاهش ثابت سرعت غیرفعال‌شدن، پایداری (نیمه عمر) افزایش می‌یابد. بنابراین هر عاملی

نیمه عمر) جهش یافته ۱ (نسبت به حالت کنترل) شده است (شکل ۷ ب و جدول ۳). یون منگنز باعث کاهش نیمه عمر در همه آنزیم‌های مورد مطالعه شده است (شکل ۷ ج و جدول ۳).

است. فلز آهن تأثیری بر ثابت سرعت غیرفعال شدن (پایداری) آنزیم نوع وحشی و جهش یافته سه‌گانه نگذاشته (شکل ۷ ب و جدول ۳) اما باعث افزایش سه‌برابری ثابت سرعت غیرفعال شدن (کاهش سه‌برابری

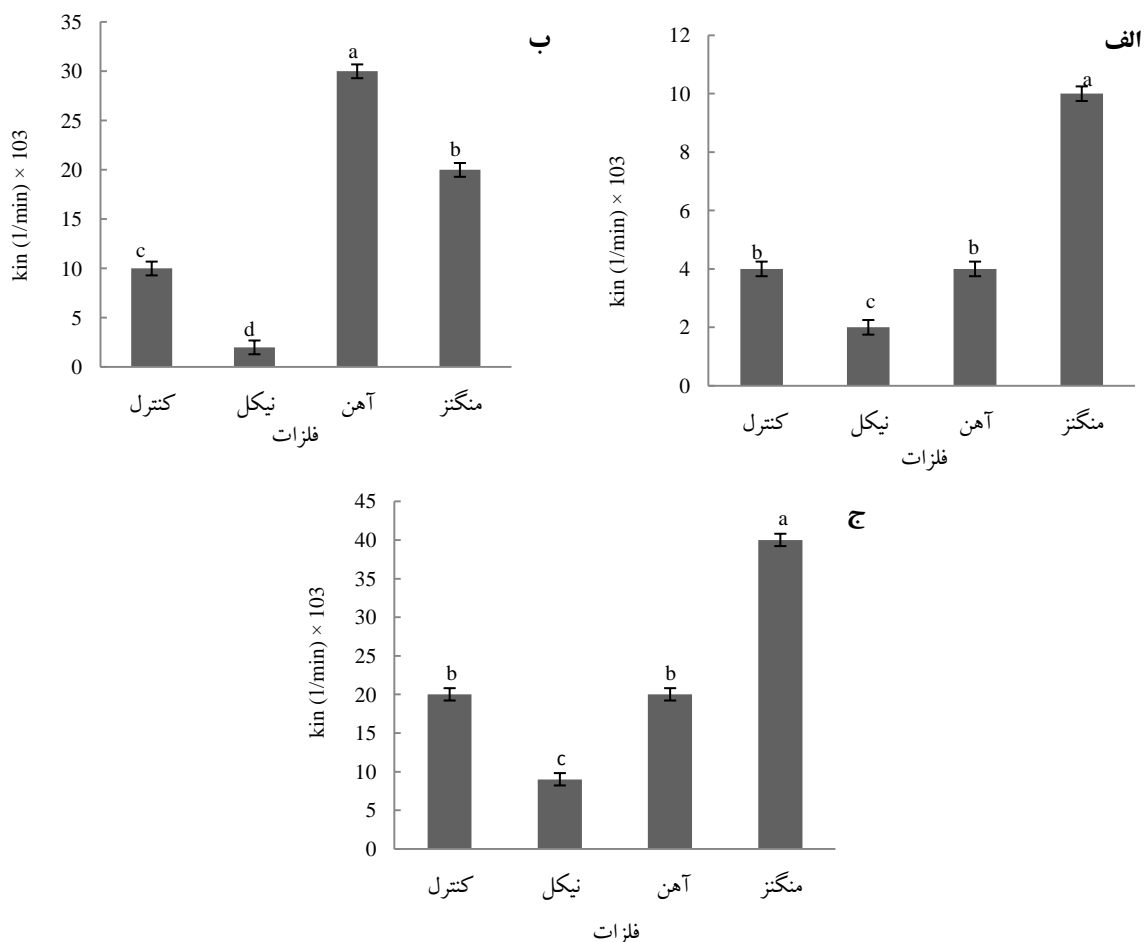


شکل ۶- پایداری حرارتی آنزیم نوع وحشی (الف)، جهش یافته ۱ (ب) و جهش یافته ۲ (سه‌گانه) (ج) در عدم حضور (کنترل) (◆) و حضور غلظت یک میلی‌مولار منگنز (▲)، نیکل (×) و آهن (■)، انحراف معیار نمودارها تا ۴ درصد است. گفتنی است که error bar نشان داده شده در نمودارها در اغلب نقاط در داخل علائم قرار گرفته است.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر فلزات بر ثابت غیرفعال شدن آنزیم نوع وحشی و جهش یافته‌ها

F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
۱۷۶/۶*	۳۵/۹	۱۰۷/۸	۳	نوع وحشی
۳۴۷/۳*	۴۴۳	۱۳۲۹	۳	جهش یافته ۱
۹۷۲/۴*	۵۰۰/۱	۱۵۰۰/۳	۳	جهش یافته ۲

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد



شکل ۷- ثابت سرعت غیرفعال‌شدن آنزیم نوع وحشی (الف)، جهش‌یافته ۱ (ب) و جهش‌یافته ۲ یا سه‌گانه (ج) در حضور فلزات مختلف. همان‌طور که در نمودارها مشخص است تأثیر فلزات بر ثابت غیرفعال‌شدن آنزیم‌ها معنی‌دار است (به جز آهن در آنزیم نوع وحشی و جهش‌یافته ۲).

جدول ۳- ثابت سرعت غیرفعال‌شدن (k_{in}) و نیمه عمر برای هر یک از آنزیم‌ها در حضور و نبود فلزات. اطلاعات مربوط به کنترل از منبع ۲۴ آورده شده است.

آنزیم	یون‌های فلزی	k_{in} (دقیقه ^{-۱}) × ۱۰ ^۳	نیمه عمر (دقیقه)
نوع وحشی	کنترل	۴ ± ۰/۰۸	۱۷۳ ± ۸
	Fe ²⁺	۴ ± ۰/۰۷	۱۷۰ ± ۶
	Ni ²⁺	۲ ± ۰/۰۵	۳۴۶ ± ۱۶
	Mn ²⁺	۱۰ ± ۰/۰۲	۶۹ ± ۴
جهش‌یافته ۱	کنترل	۱۰ ± ۰/۳	۶۹ ± ۴
	Fe ²⁺	۳۰ ± ۱	۲۳ ± ۱
	Ni ²⁺	۲ ± ۰/۰۴	۳۴۶ ± ۱۴
	Mn ²⁺	۲۰ ± ۰/۰۶	۳۴ ± ۱
جهش‌یافته ۲ (سه‌گانه)	کنترل	۲۰ ± ۰/۵	۳۴ ± ۲
	Fe ²⁺	۲۰ ± ۰/۰۴	۳۴ ± ۲
	Ni ²⁺	۹ ± ۰/۰۲	۷۷ ± ۳
	Mn ²⁺	۴۰ ± ۱/۲	۱۷ ± ۰/۵

بحث و نتیجه‌گیری

نقش مهم آنزیم پیرازین آمیداز در تعیین مقاومت مایکوباکتریوم *Tuberculosis* به داروی پیرازین آمیداز باعث شده است درک تأثیر فلزات یونی بر فعالیت و پایداری این آنزیم و جهش‌یافته‌های آن از اهمیت بسزایی برخوردار باشد (۲۲). در این پژوهش جهت بررسی تأثیر فلزات مختلف بر فعالیت و پایداری آنزیم پیرازین آمیداز نوع وحشی و جهش‌یافته‌ها سه فلز آهن، منگنز و نیکل انتخاب شد. گفتنی است آهن و منگنز با توجه حضور در ساختار آنزیم (۱۰) و نیکل نیز به دلیل نبود اطلاعات کافی درباره اثر آن بر فعالیت و پایداری آنزیم پیرازین آمیداز انتخاب شد (درباره تأثیر فلزات دیگر همچون منیزیوم و کبالت که در ساختار آنزیم دیده نشده‌اند، قبلاً اطلاعاتی ارائه شده است (۲۲). آهن، منگنز و نیکل توانایی میان‌کنش با رزیدوهای هیستیدین موجود در جایگاه اتصال به فلز در آنزیم‌ها را دارند (۱)، نتایج نشان داد که فلز نیکل باعث افزایش فعالیت و پایداری آنزیم نوع وحشی و جهش‌یافته‌ها می‌شود. فلزات می‌توانند از طریق میان‌کنش با زنجیره‌های جانبی رزیدوهای موجود در پروتئین‌ها، به آن‌ها متصل شوند و بدین ترتیب عملکرد و پایداری پروتئین‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (۲۷). ژنگ^{۱۴} و همکاران نشان دادند یون‌های فلزی نقش مهمی در تعدیل فعالیت و پایداری آنزیم پیرولیزین دارند (۲۷). اسپاراتا^{۱۵} و همکاران مشاهده کردند جانیشینی یون‌های فلزی به جای یکدیگر در آنزیم کاتکول-او-متیل ترانسفراز^{۱۶} می‌تواند فعالیت آنزیم را در مرحله انتقال گروه متیل به روی سوبسترای کاتکولی تحت تأثیر قرار دهد (۲۸). شین^{۱۷} و همکاران نشان دادند که فعالیت آنزیم پیرازین آمیداز با نوع یون فلزی و همچنین نوع جهش‌ها در ارتباط است (۲۲). از

طرف دیگر سالازار-سالیانس^{۱۸} و همکاران مشاهده کردند که فلزات می‌توانند از طریق میان‌کنش با مواد تغییر مقدار قطبیت آن‌ها، واکنش‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (۱۱). آن‌ها نشان دادند فلزاتی همچون روی از طریق جهت‌گیری مناسب در جایگاه اتصال به فلز می‌توانند با افزایش میزان قطبیت گروه هیدروکسیل در مولکول آب، حمله نوکلئوفیلی آن را در واکنش هیدرولیزی کاتالیز شده توسط آنزیم پیرازین آمیداز افزایش دهد و بدین ترتیب باعث افزایش فعالیت هیدرولازی آنزیم شود (۱۱). بنابراین درباره نیکل می‌توان گفت، این فلز می‌تواند در جایگاه اتصال به فلز در آنزیم پیرازین آمیداز به جای فلز آهن که به طور طبیعی در آن جایگاه حضور دارد (۱۰)، قرار گیرد و احتمالاً با جهت‌گیری مناسب نسبت به آهن توانسته است میان‌کنش‌های مساعدتری را با زنجیره‌های جانبی رزیدوهای موجود در جایگاه اتصال به فلز برقرار کند. در نتیجه نیکل توانسته از طریق جهت‌گیری مناسب با جایگاه اتصال به فلز میان‌کنش دهد و بدین ترتیب باعث افزایش پایداری آنزیم‌ها (نوع وحشی و جهش‌یافته‌ها) شود. این جهت‌گیری به گونه‌ای بوده است که توانسته همچون روی باعث قطبی‌تر شدن گروه هیدروکسیل در مولکول آب (دخیل در هیدرولیز) شود و در نتیجه باعث افزایش فعالیت آنزیم‌ها نیز شود.

با بررسی تأثیر فلز آهن بر آنزیم نوع وحشی و جهش‌یافته‌ها نتایج نشان داد که آهن فعالیت جهش‌یافته^۱ (L151S) را کاهش داده است در حالی که بر فعالیت دو آنزیم دیگر تأثیر چشمگیری نگذاشته است. همچنین فلز آهن پایداری (نیمه عمر) جهش‌یافته^۱ را به طور چشمگیری کاهش داده است. پژوهش‌ها نشان داده است که تغییر در جایگاه اتصال به فلز می‌تواند بر اتصال فلز و

پیرازین‌آمیداز نوع وحشی و جهش‌یافته‌ها شده است. با وجود این، جهت درک بهتر و کامل از نحوه تأثیر فلزات ذکر شده در این پژوهش بر آنزیم نوع وحشی و جهش‌یافته‌ها نیاز به مطالعات بیشتر از جمله مطالعات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از مساعدت سرکار خانم دکتر لیلا زرنندی میاندوآب در تجزیه و تحلیل آماری نتایج و از حمایت‌های مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

- (1) Zheng H., Chruszcz M., Lasota P., Lebioda L., Minor W. Data mining of metal ion environments present in protein structures. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2008; 102 (9): 1765- 76.
- (2) Dahms SO., Konnig I., Roeser D., Guhrs KH., Mayer MC., Kaden D., et al. Metal binding dictates conformation and function of the amyloid precursor protein (APP) E2 domain. *Journal of Molecular Biology* 2012; 416 (3): 438- 52.
- (3) Carrell AB., Shimoni L., Carrell CJ., Bock CW, Murray-Rust P, Glusker JP. The stereochemistry of the recognition of nitrogen-containing heterocycles by hydrogen bonding and by metal ions. *Receptor* 1993; 3 (1): 57- 76.
- (4) Guengerich FP. Thematic minireview series: metals in biology 2014. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289 (41): 28094.
- (5) Zhang H., Deng JY., Bi LJ., Zhou YF., Zhang ZP., Zhang CG., et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* nicotinamidase/ pyrazinamidase. *FEBS Journal* 2008; 275 (4): 753- 62.

در نهایت عملکرد آن در پروتئین‌ها تأثیرگذار باشد (۲۷) و (۲۸). بنابراین می‌توان گفت جایگزینی آمینواسید سرین به جای لوسین در جهش یافته ۱ احتمالاً باعث تغییر ساختار جایگاه اتصال به فلز در این جهش یافته شده است. این تغییر ساختار جایگاه اتصال به نحوی است که آهن به‌طور مناسب نمی‌تواند در آن قرار گیرد و میان‌کنش مساعد با رزیدوهای آن برقرار کند (۲۸). این امر باعث کاهش چشمگیر پایداری و به تبع آن کاهش فعالیت در این جهش یافته در حضور آهن شده است.

فلز منگنز نیز همانند آهن در جایگاه اتصال به فلز در آنزیم پیرازین‌آمیداز دیده شده است (۱۰). نتایج این پژوهش نشان داد که آنزیم‌ها در حضور این فلز پایداری و فعالیت کمی نسبت به حالت کنترل (بدون فلز) در مقایسه با فلز آهن و نیکل دارند. سالازار- سالیناس و همکاران نشان دادند که منگنز بیشتر از آهن باعث افزایش قطبیت گروه هیدروکسیل در مولکول آب درگیر در هیدرولیز پیرازین‌آمید می‌شود اما میان‌کنش آن با آنزیم ضعیف‌تر از آهن است (نیروی کئوردینه شدن منگنز با آنزیم کمتر از آهن است) (۱۱). بنابراین می‌توان گفت گرچه منگنز در جایگاه اتصال به فلز در آنزیم مشاهده شده است و می‌تواند در کاتالیز آنزیم نقش داشته باشد (۱۰)؛ اما به نظر می‌رسد میان‌کنش نیکل و آهن با جایگاه اتصال به فلز در آنزیم پیرازین‌آمیداز نسبت به منگنز مساعدتر است و جهت‌گیری آن‌ها برای تأثیرگذاری بر کاتالیز آنزیمی بهتر از منگنز است.

در نهایت می‌توان گفت فلز نیکل احتمالاً با ایجاد میان‌کنش‌های مساعدتر با جایگاه اتصال به فلز و احتمالاً افزایش قطبیت گروه هیدروکسیل در مولکول آب به‌ترتیب باعث افزایش پایداری و فعالیت آنزیم

- (6) Zhang Y., Scorpio A., Nikaido H., Sun Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of Bacteriology* 1999; 181 (7): 2044- 9.
- (7) Zhang Y., Wade MM., Scorpio A., Zhang H., Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 52 (5): 790- 5.
- (8) Zhang Y., Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2003; 7 (1): 6-21.
- (9) Du X., Wang W., Kim R., Yakota H., Nguyen H., Kim SH. Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry* 2001; 40 (47): 14166- 72.
- (10) Petrella S., Gelus-Ziental N., Maudry A., Laurans C., Boudjelloul R., Sougakoff W. Crystal structure of the pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. *PLoS One* 2011; 6 (1): e15785.
- (11) Salazar-Salinas K., Baldera-Aguayo PA., Encomendero-Risco JJ., Orihuela M., Sheen P., Seminario JM., et al. Metal-ion effects on the polarization of metal-bound water and infrared vibrational modes of the coordinated metal center of *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase via quantum mechanical calculations. *Journal of Physical Chemistry B* 2014; 118 (34): 10065- 75.
- (12) Sheen P., Ferrer P., Gilman RH., Lopez-Llano J., Fuentes P., Valencia E., et al. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2009; 89 (2): 109- 13.
- (13) Quiliano M., Gutierrez AH., Gilman RH., Lopez C., Evangelista W., Sotelo J., et al. Structure-Activity relationship in mutated pyrazinamidases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioinformation* 2011; 6 (9): 335- 9.
- (14) Vahidi V., Zolfaghari M R., Ahmadi A., Shojapour M., Moadab S R., Arjomandzadegan M. Allele Specific-PCR method for rapid detection of gyrA gene mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 3 (9): 21- 34.
- (15) Scorpio A., Lindholm-Levy P., Heifets L., Gilman R., Siddiqi S., Cynamon M., et al. Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41 (3): 540- 3.
- (16) Hirano K., Takahashi M., Kazumi Y., Fukasawa Y., Abe C. Mutation in pncA is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Disease* 1997; 78 (2): 117- 22.
- (17) Hou L., Osei-Hyiaman D., Zhang Z., Wang B., Yang A., Kano K. Molecular characterization of pncA gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China. *Epidemiology and Infection* 2000; 124 (2): 227- 32.
- (18) Mestdagh M., Fonteyne PA., Realini L., Rossau R., Jannes G., Mijs W., et al. Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the pncA locus in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43 (9): 2317- 9.
- (19) Park SK., Lee JY., Chang CL., Lee MK., Son HC., Kim CM., et al. pncA mutations in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *BMC Infectious Diseases* 2001; 1: 4.
- (20) Sreevatsan S., Pan X., Zhang Y., Kreiswirth BN., Musser JM. Mutations associated with pyrazinamide resistance in pncA of *Mycobacterium tuberculosis*

- complex organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41 (3): 636- 40.
- (21) Lemaitre N., Sougakoff W., Truffot-Pernot C., Jarlier V. Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase PncA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999; 43 (7): 1761- 3.
- (22) Sheen P., Ferrer P., Gilman RH., Christiansen G., Moreno- Roman P., Gutierrez AH., et al. Role of metal ions on the activity of *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2012; 87 (1): 153- 61.
- (23) Doustdar F., Khosravi AD., Farnia P. *Mycobacterium tuberculosis* genotypic diversity in pyrazinamide-resistant isolates of Iran. *Microbial Drug Resistance* 2009; 15 (4): 251- 6.
- (24) Doustdar F., Pazhang M., Mehrnejad F., Safarzadeh M., Rabiei D., Chaparzadeh N., et al. Biochemical Characterization and Computational Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Pyrazinamidase in Some Pyrazinamide-Resistant Isolates of Iran. *Protein Journal* 2015.
- (25) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 (5259): 680- 5.
- (26) Asghari SM., Pazhang M., Ehtesham S., Karbalaee-Heidari HR., Taghdir M., Sadeghizadeh M., et al. Remarkable improvements of a neutral protease activity and stability share the same structural origins. *Protein Engineering Design and Selection* 2010; 23 (8): 599- 606.
- (27) Zeng J., Gao X., Dai Z., Tang B., Tang XF. Effects of metal ions on stability and activity of hyperthermophilic pyrolysin and further stabilization of this enzyme by modification of a Ca²⁺-binding site. *Applied Environmental Microbiology* 2014; 80 (9): 2763- 72.
- (28) Sparta M., Alexandrova AN. How metal substitution affects the enzymatic activity of catechol-O-methyltransferase. *PLoS One* 2012; 7 (10): e47172.

-
- ¹- Du
 - ²- *Pyrococcus horilcoshii*
 - ³- Doustdar
 - ⁴- Protein Data Bank Code
 - ⁵- SPDBV
 - ⁶- Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)
 - ⁷- Fermentas
 - ⁸- Qiagen
 - ⁹- Laemmli
 - ¹⁰- Wayne
 - ¹¹- FeSO₄(NH₄)₂
 - ¹²- Glycine HCl
 - ¹³- Half Life
 - ¹⁴- Zheng
 - ¹⁵- Sparta
 - ¹⁶- Catechol-O-methyltransferase
 - ¹⁷- Sheen
 - ¹⁸- Salazar-Salinas

Effect of metal ions on the activity and stability of wild type and mutant pyrazinamidases

Mehrnoosh Safarzadeh

M.Sc. of Cellular and Molecular biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, safarzade.ma@yahoo.com

Mohammad Pazhang*

Assistant Professor of Biochemistry, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, pazhang@azaruniv.ac.ir

Faramarz Mehrnejad

Assistant Professor of Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran, mehrnejad@ut.ac.ir

Farahnoosh Dostdar

Assistant Professor of Microbiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, f_doustdar@sbmu.ac.ir

Nader Chaparzadeh

Associate Professor of Plant physiology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, nchapar@azaruniv.ac.ir

Davoud Rabiei Faradonbeh

M.Sc. of Cellular and Molecular biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, d.rabiei@yahoo.com

Abstract

Introduction: Pyrazinamidase is a metalloenzyme with hydrolyzing activity which is responsible for conversion of pyrazinamide (anti tuberculosis drug) to active molecule, pyrazinoic acid. The metal-binding site in the enzyme is composed of Asp49, His51, His56 and His71. Mutations in the pyrazinamidase gene are responsible for resistance to pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* and can alter the binding of metal ions to the metal binding site in the enzyme. Therefore, it is important to study the effect of metal ions on the enzymatic activity and stability of the wild type and mutant pyrazinamidases.

Materials and methods: In this study, *E. coli* BL21 was transformed by expression vectors carrying wild type and mutant pyrazinamidase genes. The recombinant proteins were expressed and then purified by Ni- agarose column. The purity of the purified proteins was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. Finally, the activity and stability of the purified enzymes were studied in the presence of 1mM of Ni²⁺, Fe²⁺ and Mn²⁺.

Results: SDS-PAGE analysis showed that the expressed enzymes were purified. The activity and stability results depicted that Ni²⁺ increases the activity and stability of the wild type and mutant (mutant1: L151S, and mutant2 (triple): A143T/T168A/E173K) enzymes. Fe²⁺ decreased the activity and stability of mutant1, but has no significant effect on other enzymes. The activity and stability of the enzymes decreased in the presence of Mn²⁺.

Discussion and conclusion: Ni²⁺ interact favorably with metal binding site of the wild type enzyme and mutants compared with Fe²⁺ and Mn²⁺ and then increases the activity and stability of the enzymes.

Key words: Activity and stability, Metal binding site, *Mycobacterium tuberculosis*, Pyrazinamidase, Resistance to pyrazinamide

* Corresponding author

Received: April 18, 2015 / Accepted: July 4, 2015