

Role of Serine 310 in the Activity and Temperature Profile of Human Caspase-9

Raheleh Shakeri¹, Mohadeseh Mahmoudian², Reza Khodarahmi³, Soheila Mohammadi⁴

1. Assistant Professor, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran., (Corresponding Author), Tel: +98-87-33664600, Email: r.shakeri@uok.ac.ir. ORCID ID: 0000-0002-1048-1472

2. MSc Student, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0003-0964-5561

3. Professor, Medical Biology Research Center, Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2474-5037

4. Assistant Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ORCID ID: 0000-0001-6670-9627

ABSTRACT

Background and Aim: Caspase-9 is a key enzyme in the intrinsic pathway of apoptosis that its activity is regulated by various mechanisms such as phosphorylation. It has been reported that phosphorylation of serine 310 in murine caspase-9 prevents enzyme processing. The role of this residue in human caspase-9 activity is not clear. In this study we investigated the effect of negative charge on serine 310 in caspase-9 activity.

Materials and Methods: Considering that phosphorylation leads to negative charge on caspase-9, the codon of serine 310 in human caspase-9 was mutated to aspartate via quick change site-directed mutagenesis. Recombinant wild type and mutant caspase-9 were expressed in BL21(DE3) and purified by affinity chromatography. The temperature profile and activity of the mutant caspase-9 were assessed by chromogenic substrate of Ac-LEHD-pNA *in vitro*, and compared to those of wild enzyme. Student's t test was used for data analysis.

Results: The results showed that kinetics parameters of S310D mutant and wild type caspase-9 were similar, but their temperature profiles were different. Comparison of S310D mutant enzyme and wild type caspase-9 showed that S310D mutant enzyme had higher activity at 37 °C and lower activity at 4, 15, 45 and 60 °C.

Conclusion: In our study, the negative charge on serine 310 in caspase-9 led to change in the profile temperature of the enzyme with no effect on kinetic parameters.

Keywords: Caspase, Enzyme assay, Apoptosis, Mutagenesis

Received: Jan 16, 2022

Accepted: June 15, 2022

How to cite the article: Raheleh Shakeri, Mohadeseh Mahmoudian, Reza Khodarahmi, Soheila Mohammadi. The Role of Serine 310 in the Activity and Temperature Profile of Human Caspase-9. *ŠJKU* 2023;27(6):13-24.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

نقش سرین ۳۱۰ در فعالیت آنزیمی و پروفایل دمایی کاسپاز-۹ انسانی

راحله شاکری^۱، محدثه محمودیان^۲، رضا خدارحمی^۳، سهیلا محمدی^۴

۱. استادیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، پست الکترونیک: r.shakeri@uok.ac.ir تلفن: ۰۸۷-۳۳۶۶۴۶۰۰ کد ارکید:

۰۰۰۰-۰۰۰۲-۱۰۴۸-۱۴۷۲

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، کد ارکید: ۵۵۶۱-۰۹۶۴-۰۰۰۰-۰۰۰۳

۳. استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد ارکید: ۵۰۳۷-۲۴۷۴-۰۰۰۰-۰۰۰۲

۴. استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد ارکید: ۹۶۲۷-۰۶۶۷۰-۰۰۰۰-۰۰۰۱

چکیده

زمینه و هدف: کاسپاز-۹ یک آنزیم کلیدی در مسیر داخلی آپوپتوز است که فعالیت آن با سازوکارهای مختلفی مانند فسفریلاسیون تنظیم می‌شود. گزارش شده است که فسفریلاسیون سرین ۳۱۰ در کاسپاز-۹ موشی مانع پردازش آنزیم می‌شود. نقش این باقیمانده آمینواسیدی در فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ انسانی نامشخص است. در این پژوهش اثر ایجاد بار منفی روی سرین ۳۱۰ در فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ انسانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: با توجه به اینکه فسفریلاسیون منجر به ایجاد بار منفی در کاسپاز-۹ می‌شود، کدون سرین ۳۱۰ در کاسپاز-۹ انسانی به کدون آسپاراتات با استفاده از روش جهش‌زایی هدفمند Quick change جهش داده شد. کاسپاز-۹ نو ترکیب وحشی و جهش یافته در سویه باکتری BL21(DE3) بیان و با استفاده از کروماتوگرافی گرایشی تخلیص شدند. پروفایل دمایی و فعالیت کاسپاز-۹ جهش یافته در مقایسه با آنزیم وحشی به کمک سوبسترای کروموزونیک Ac-LEHD-pNA در شرایط برون‌تنی سنجش شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با آزمون t انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پارامترهای سینتیکی کاسپاز-۹ جهش یافته S310D و آنزیم وحشی مشابه هستند، اما پروفایل دمایی آنها متفاوت است. آنزیم جهش یافته S310D در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد فعالیت بیشتر و در دماهای ۴، ۱۵، ۴۵ و ۶۰ درجه سانتی گراد فعالیت کمتری در مقایسه با آنزیم وحشی داشت.

نتیجه‌گیری: ایجاد بار منفی بر روی سرین ۳۱۰ در کاسپاز-۹ بدون تاثیر بر پارامترهای سینتیکی سبب تغییر در پروفایل دمایی آنزیم می‌شود.

کلمات کلیدی: کاسپاز، سنجش آنزیمی، آپوپتوز، جهش‌زایی

وصول مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۲۶ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۲/۲۲ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۲۵

مقدمه

آپوپتوز نوعی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب‌دیده، اضافی و مضر شده و برای تکامل و هموستازی بافتی ضروری است (۱). اجرای آپوپتوز در سلول به واسطه‌ی سیستمین پروتئازهای به نام کاسپاز است که با ایجاد برش در پروتئین‌های سلولی تغییرات ریخت‌شناسی را در سلول سبب می‌شوند. کاسپازها در غیاب محرک‌های آپوپتوزی به صورت پروآنزیم (پروکاسپاز) و غیرفعال در سیتوزول وجود دارند که پس از پردازش فعال می‌شوند. در سلول انواع مختلفی از کاسپازها وجود دارد که براساس طول پرودومین و عملکردشان به کاسپازهای التهابی، کاسپازهای شروع‌کننده-ی آپوپتوز و کاسپازهای اجرایی دسته‌بندی می‌شوند. با وجود اینکه همه‌ی کاسپازها برای فعال شدن نیاز به پردازش (حذف پرودومین) و دایمر شدن دارند، اما چگونگی فعال شدن کاسپازهای شروع‌کننده و اجرایی متفاوت است. کاسپازهای اجرایی در حالت پروآنزیم دایمر هستند و پس از حذف بخش پرو توسط کاسپازهای شروع‌کننده فعال می‌شوند. سازوکار سلول برای دایمر و فعال کردن کاسپازهای شروع‌کننده کمی پیچیده‌تر است تا مانع فعالیت ناخواسته و تصادفی آپوپتوز شود. زیرا این کاسپازها به دلیل قرارگیری در ابتدای مسیر آپوپتوز، پس از فعال شدن، در فرودست خود سبب تقویت پیام و اجرای سریع مرگ سلولی می‌شوند (۲). در پاسخ به محرک‌های آپوپتوزی درون سلولی مانند تخریب DNA و استرس اکسیداتیو، کاسپاز-۹ به عنوان کاسپاز شروع‌کننده در قالب کمپلکسی به نام آپوپتوزوم فعال می‌شود. این کمپلکس متشکل از هفت پروتئین به نام Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1) متصل به سیتوکروم C و حداقل هفت پروکاسپاز-۹ است. هنوز به طور دقیق سازوکار فعال شدن کاسپاز-۹ توسط آپوپتوزوم مشخص نیست. یکی از

راهکارهای سلول برای تنظیم فعالیت کاسپاز-۹ فسفریلاسیون است. سرین و ترئونین از باقیمانده‌های آمینواسیدی مستعد فسفریلاسیون هستند (۳). کاسپاز-۹ انسانی (متشکل از ۴۱۶ اسید آمینه) در توالی خود ۳۵ سرین و ۱۸ ترئونین دارد. Akt کیناز، با فسفریله کردن سرین ۱۹۶ (۴) و ERK MAPK، با فسفریله کردن ترئونین ۱۲۵ سبب مهار فعالیت کاسپاز-۹ می‌شود (۵). مارتین و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که پروتئین کیناز A کاسپاز-۹ انسانی را در ریشه‌های سرین ۹۹، ۱۸۳ و ۱۹۵ فسفریله می‌کند. پروتئین کیناز A اثر مهاری بر فعالیت کاسپاز-۹ دارد، اما فسفریلاسیون در ریشه‌های فوق برای داشتن اثر مهاری بر فعالیت کاسپاز-۹ لازم نیست. در این پژوهش جهش‌یافته-های S99A، S195A، S183A ساخته شده بود (۶). کروماتوگرافی مایع چند بعدی متصل به طیف-سنج جرمی یکی از ابزارهای مورد استفاده برای شناسایی فسفوپپتیدها است. در مطالعه‌ای که با استفاده از روش طیف‌سنجی جرمی روی کبد موش انجام شد، سرین ۳۴۸ در کاسپاز-۹ موشی به عنوان جایگاه مستعد فسفریلاسیون معرفی شد (۷). گزارش شده است فسفریلاسیون سرین ۳۴۸ در کاسپاز-۹ موشی توسط کازئین کیناز ۲ (CK2)، مانع برش پروتئولیتیک این آنزیم در آسپاراتات ۳۵۳ توسط کاسپاز-۸ و عدم فعالیت آن می‌شود (۸). سرین ۳۴۸ موشی معادل سرین ۳۱۰ (زیر آن خط کشیده شده است) در توالی پپتیدی DHGFEVASTSPEDSPGSNPEPDATPFQE GLR کاسپاز-۹ انسانی است (۹). اهمیت این سرین حفاظت شده در فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ در سلول‌های انسانی و هم‌چنین تحت شرایط برون‌تنی نامشخص است. به همین دلیل در این پژوهش، با استفاده از جهش‌زایی هدفدار، نقش سرین ۳۱۰ در فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ انسانی تحت شرایط برون‌تنی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد سوپسترای کاسپاز-۹ (Ac-LEHD-pNA) از سیگما خریداری شد. پلاسمید حاوی ژن کاسپاز-۹ کلون شده از پروفیسور گای سل و سن (Guy Salvesen) استاد موسسه تحقیقات پزشکی برنهام (Sanford-Burnham Medical Research Institute)، آمریکا به صورت هدیه دریافت گردید. سنتز آغازگرهای رفت و برگشت به سفارش شرکت تکاپوزیست توسط شرکت بایونیر (کره جنوبی) انجام

گرفت (جدول ۱). کیت استخراج پلاسمید از شرکت Gene All تهیه گردید. رزین نیکل سفارز از کیاژن، آنزیم *DpnI* از Thermo Scientific، نشانگرهای سایز مولکولی DNA و پروتئین از سیناکلون، آنزیم *DNA* EX Taq پلیمرز HS از شرکت تاکارا تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش مربوط به شرکت‌های مرک و سیگما بود.

جدول ۱. توالی آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده جهت ایجاد جهش سرین ۳۱۰ به آسپاراتات

جهش	توالی	دمای ذوب (°C)
S310D	F: 5' TGAAGACGAGTCCCCTGGCGATAACCCGAGCCAGATGCCAC 3'	۷۲°C
	R: 5' GTGGCATCTGGCTCGGGGTTATCGCCAGGGGACTCGTCTTCA 3'	۷۲°C

جهش‌زایی هدفمند:

ساختار سه‌بعدی و کانفورماسیون طبیعی یک پروتئین، وابسته به توالی آمینواسیدی آن است. پلاسمید حامل ژن کاسپاز-۹ وحشی و کلون شده در pET23b به عنوان ژن الگو با استفاده از کیت شرکت Gene All در مقیاس کم تخلیص شد و با استفاده از روش Quick change، کدون AGT اسید آمینه‌ی سرین ۳۱۰ به کدون GAT (آسپاراتات) جهش یافت (۱۰). طراحی پرایمر در این روش به گونه‌ای است که کدون جهش یافته در بخش میانی پرایمرهای پیشرو و معکوس قرار گیرد تا نواحی مکمل ابتدا و انتهای پرایمر به خوبی به توالی الگو بچسبند و فقط ناحیه‌ی ایجاد جهش با ژن الگو نمی‌چسبد. اسید آمینه‌ی آسپاراتات در سیستم‌های پروکاریوتی دارای دو کدون GAT و GAC است. در این پژوهش از کدون GAT به دو دلیل استفاده شد: یکی فراوانی بالای این کدون در سیستم بیان پروکاریوتی و دیگری کمترین تغییر نوکلئوتیدی مورد نیاز برای اعمال جهش. توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است. در مرحله بعد، آغازگرهای رفت و برگشت به صورت جداگانه با

پلاسمید الگو، dNTP، آنزیم پلیمرز و بافر در دستگاه PCR قرار گرفتند و پس از تقلب اولیه به مدت ۱۵ ثانیه در ۹۸ درجه‌ی سانتی گراد، واکنش Quick change به تعداد ۶ سیکل با برنامه حرارتی ۴۰ ثانیه در ۹۵ درجه (دناتوراسیون)، ۳۵ ثانیه در ۶۸ درجه (اتصال پرایمر) و ۷ دقیقه در ۶۸ درجه (طویل شدن و سنتز DNA) انجام شد. سپس دستگاه متوقف و محصولات حاصل از هر دو واکنش با یکدیگر مخلوط و دوباره به دستگاه PCR با همان برنامه به تعداد ۲۴ سیکل منتقل شدند. جهت حصول اطمینان از ساخت رشته‌های جدید، محصول حاصل از Quick change بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. رشته‌های پلاسمید الگو متیله هستند، جهت حذف این رشته‌ها، محصول واکنش با آنزیم محدود کننده‌ی *DpnI* به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد گرماگذاری شد. محصول حاصل از هضم آنزیمی به باکتری‌های مستعد شده-ی DH5α با استفاده از روش شوک حرارتی منتقل شدند تا توسط باکتری، حلقوی و تکثیر شوند. باکتری‌های دریافت کننده‌ی پلاسمید به دلیل داشتن ژن مقاومت به

آمپی سیلین می‌توانند در محیط کشت حاوی آمپی سیلین تکثیر شوند، اما باکتری‌های فاقد پلاسمید قادر به زنده‌مانی و تکثیر در حضور آنتی‌بیوتیک نیستند. جهت استخراج پلاسمید یکی از کلونی‌های باکتری‌های رشد کرده در حضور آنتی‌بیوتیک به محیط کشت مایع جهت تکثیر و استخراج پلاسمید تلقیح شدند. پلاسمید pET23b حاوی ژن کاسپاز-۹ انسانی با برچسب هیس‌تیدین (His tag)، طولی در حدود ۴۹۱۴ جفت باز دارد (شکل ۱). پلاسمیدهای استخراج شده پس از تعیین توالی و حصول اطمینان از ایجاد جهش در ناحیه‌ی مورنظر، به منظور بیان و تولید پروتئین نو ترکیب جهش‌یافته به باکتری‌های مستعد شده‌ی بیانی BL21(DE3) منتقل و در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین تکثیر داده شدند. این سویه برای بیان و کتورهای که تحت کنترل پروموتور T7 هستند، مناسب است. پس از القای بیان با IPTG (ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید)، رسوبات سلولی جمع‌آوری و لیز شد. محلول روئی حاصل از لیز سلولی جهت تخلیص پروتئین جمع‌آوری شد.

تخلیص پروتئین کاسپاز-۹ وحشی و جهش‌یافته‌ی S310D

جدول ۲. بافرهای مورد استفاده برای لیز کردن سلول و تخلیص پروتئین

pH	Immidazol	NaCl	Tris-HCl	بافر
۸	-	۱۰۰ میلی‌مولار	۵۰ میلی‌مولار	بافر لیز کننده
۸	۲۰ میلی‌مولار	۵۰۰ میلی‌مولار	۵۰ میلی‌مولار	بافر شستشو
۸	۲۰۰ میلی‌مولار	۱۰۰ میلی‌مولار	۵۰ میلی‌مولار	بافر جدا کننده

سنجش فعالیت آنزیمی:

از سوسترای کروموزنیک Ac-LEHD-pNA برای بررسی فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ استفاده شد. سنجش‌های آنزیمی در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر شامل ۷۷ میکرولیتر بافر آمونیوم سترات (۱/۵ مولار)، ۳ میکرولیتر بافر سنجش کاسپاز-۹ و ۱۰ میکرولیتر

ژن کاسپاز-۹ کلون‌شده در پلاسمید pET23b دارای برچسب هیس‌تیدین است و به همین دلیل از کروماتوگرافی گرایشی و ستون نیکل-سفاروز برای تخلیص پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته استفاده شد. بافرهای مورد استفاده برای تخلیص در جدول ۲ آمده است. جهت تخلیص، لیز سلولی به باکتری به ستون کروماتوگرافی حاوی رزین نیکل-سفارز منتقل و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد تا پروتئین‌های نو ترکیب دارای برچسب هیس‌تیدین به رزین متصل شوند. سپس ستون با ۲۰ میلی‌لیتر بافر شستشو، شسته شد تا پروتئین‌هایی که به صورت غیراختصاصی به رزین متصل شده‌اند جدا شوند. در مرحله‌ی بعد، ۲۰۰ میکرولیتر بافر جدا کننده به ستون اضافه و پس از ۵ دقیقه از ستون جمع‌آوری شد. این مرحله چندین بار تکرار شد تا همه‌ی پروتئین‌های نو ترکیب متصل شده به ستون جمع‌آوری شوند. از هر یک از این الوشن‌ها جهت بررسی با SDS-PAGE نمونه برداری شد. الوشن‌ها تا زمان سنجش آنزیمی در ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلیه‌ی مراحل تخلیص پروتئین در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد.

آنزیم با یکدیگر مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. در ادامه ۱۰ میکرولیتر سوسترای یک میلی-مولار کاسپاز-۹ به چاهک اضافه و بلافاصله جذب در ۴۰۵ نانومتر در مدت زمان یک ساعت با فاصله‌ی زمانی ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه میکروپلیت خوان Tekan (مدل

Sunrise) قرائت شد. سنجش‌ها هر کدام در سه تکرار صورت گرفت و چاهک بلانک حاوی تمام مواد چاهک تست، به غیر از آنزیم بود.

سنجش پارامترهای سینتیکی آنزیم:

پس از تخلیص میزان فعالیت کاسپاز-۹ وحشی و جهش-یافته در دماهای مختلف سنجش شد و همچنین پارامترهای سینتیکی شامل K_m ، k_{cat} و V_{max} برای هر دو آنزیم بررسی شد. به منظور انجام مطالعات سینتیکی، سنجش مقدار مشخصی از آنزیم در حضور غلظت‌های ۰/۰۴، ۰/۰۶، ۰/۰۸، ۰/۱ و ۰/۱۴ میلی‌مولار از سوبسترا در مدت زمان یک‌ساعت با فاصله‌ی زمانی ۱۰ دقیقه انجام شد. از روی شیب نمودار تغییرات جذب در واحد واحد زمان برای هر سنجش و تبدیل آن به غلظت در واحد زمان، میزان سرعت اولیه واکنش آنزیمی (V_0) به دست آمد. جهت محاسبه

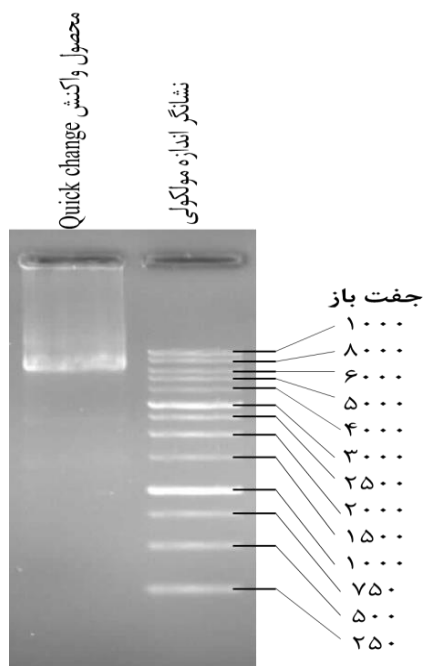
پارامترهای سینتیکی، نمودار لاین‌ویور-برک (نمودار $1/V_0$ در مقابل $1/[S]$) ترسیم شد و با استفاده از نقاط عرض از مبدا و طول از مبدا، K_m و V_{max} به دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری:

همه‌ی تست‌ها حداقل سه‌بار تکرار شد و با نرم‌افزار SPSS، با استفاده از آزمون T مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. $p \leq 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار فرض شد. برای ترسیم منحنی‌ها از نرم‌افزار اکسل استفاده شد.

یافته‌ها

ساخت واریانت کاسپاز-۹ جهش‌یافته‌ی S310D از آنزیم وحشی جهش نقطه‌ای در پلاسمید حاوی ژن کاسپاز-۹ با استفاده از روش Quick change ایجاد شد (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر ژل آگارز. محصول واکنش Quick change تیمار شده با آنزیم *DpnI*

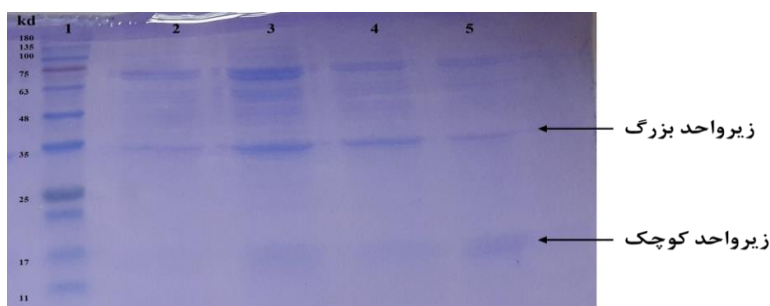
حصول اطمینان از ایجاد جهش، بیان و تخلیص کاسپاز-۹ وحشی و جهش‌یافته انجام شد. به دلیل اینکه هر دو آنزیم

پس از تکثیر محصول Quick change در باکتری، پلاسمید استخراج شده برای تعیین توالی ارسال شد. پس از

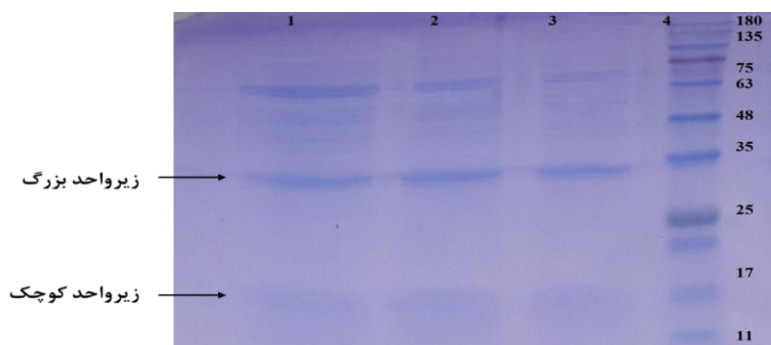
کاسپاز-۹ وحشی و جهش یافته‌ی S310D در شکل ۲ آمده است. پروکاسپاز-۹ با وزن مولکولی ۴۶ کیلودالتون، پس از بریده شدن به دو زیرواحد بزرگ و کوچک به ترتیب با وزن مولکولی ۳۴ و ۱۲ کیلودالتون تبدیل می‌شود.

وحشی و جهش یافته دارای برجسب هیستیدین هستند، برای تخلیص از کروماتوگرافی گرایشی و ستون نیکل-سفاروز استفاده شد. الوشن‌های حاصل از تخلیص با SDS-PAGE بررسی شدند. تصویر ژل SDS-PAGE مربوط به تخلیص

الف



ب

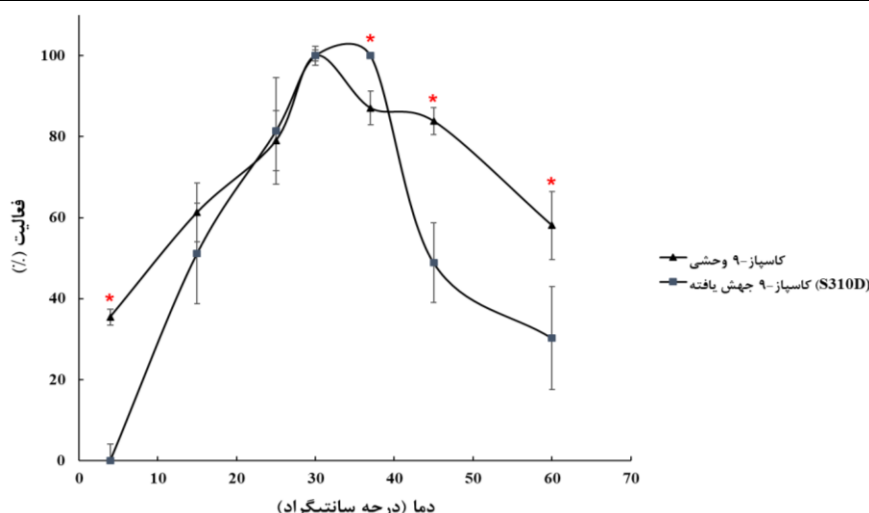


شکل ۲. تصویر ژل SDS-PAGE (۱۲/۵ درصد) مربوط به تخلیص. آنزیم کاسپاز-۹ وحشی (الف) و جهش یافته‌ی S310D (ب) به روش کروماتوگرافی گرایشی (ستون نیکل). ۱- الوشن ۱- الوشن ۲- الوشن ۳- الوشن ۴- نشانگر اندازه مولکولی

درجه‌ی سانتی گراد فعالیت هر دو آنزیم وحشی و جهش-یافته مشابه است (نمودار ۱). دمای مطلوب فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ وحشی تحت شرایط *in vitro* ۳۰ درجه‌ی سانتی گراد است. به نظر می‌رسد ایجاد بار منفی بر روی سرین ۳۱۰ در کاسپاز-۹ سبب تداوم فعالیت آنزیم تا دمای ۳۷ درجه که دمای فیزیولوژیک است می‌شود، اما پایداری آن را در دماهای پائین تر و بالاتر به سرعت کاهش می‌دهد.

بررسی پروفایل دمایی فعالیت آنزیم کاسپاز-۹ وحشی و S310D:

سنجش آنزیمی در دماهای بین ۴ تا ۶۰ درجه‌ی سانتی گراد نشان داد که کاسپاز-۹ جهش یافته‌ی S310D در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد فعالیت آنزیمی بیشتری در مقایسه با کاسپاز-۹ وحشی دارد اما در دماهای ۴، ۴۵ و ۶۰ درجه‌ی سانتی گراد فعالیت کمتری دارد. در دماهای ۱۵، ۲۵ و ۳۰



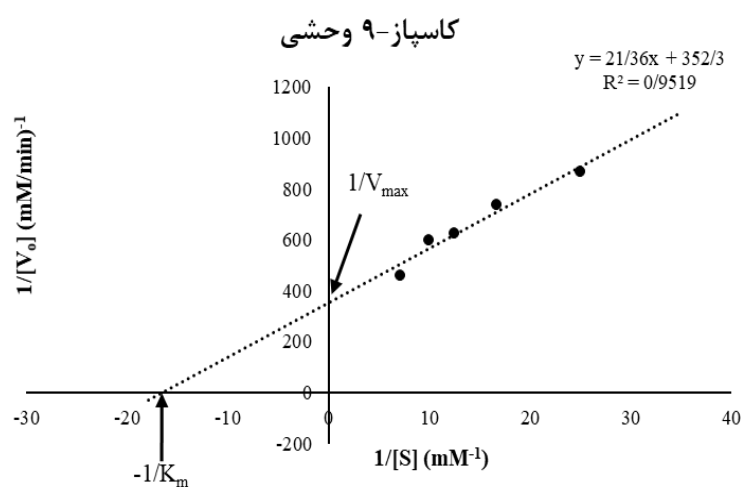
نمودار ۱. پروفایل فعالیت نسبی آنزیمی کاسپاز-۹ وحشی و جهش یافته S310D در دماهای مختلف. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل \pm دامنه‌ی تغییرات می‌باشد. * $p \leq 0.05$ معنادار است. یک واحد فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ برابر با مقدار آنزیم مورد نیاز برای هیدرولیز یک پیکومول سوبسترای Ac-LEHD-pNA در مدت زمان یک دقیقه در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد است.

با سرعت حداکثری 0.06 میکرومولار بر ثانیه و K_m برابر با $89/29$ میکرومولار اختلاف معناداری با آنزیم وحشی نداشت. k_{cat} پارامتر دیگری است که بیانگر تعداد مولکول‌های سوبسترای تبدیل شده به محصول در واحد زمان توسط یک مولکول آنزیم است. k_{cat} آنزیم وحشی و جهش یافته به ترتیب برابر با 0.03 و 0.04 بر ثانیه بود که اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند. با توجه به اینکه K_m و k_{cat} به تنهایی نمی‌توانند مبنای مقایسه‌ی فعالیت دو آنزیم باشند، برای مقایسه‌ی دو آنزیم، از نسبت k_{cat}/K_m تحت عنوان ثابت ویژگی استفاده شد. بنابراین همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، پارامترهای سینتیکی آنزیم جهش یافته مشابه آنزیم وحشی است. براین اساس، جهش سرین ۳۱۰ به آسپاراتات و ایجاد بارمنفی، تأثیری در فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ جهش یافته و تمایل آنزیم به سوبسترا ندارد.

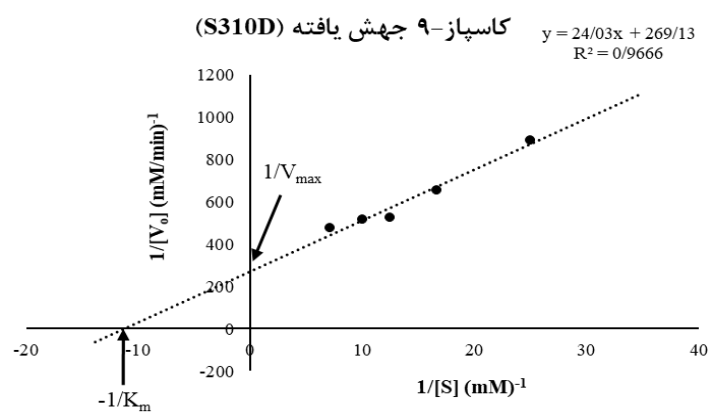
تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم کاسپاز-۹ وحشی و S310D:

جهت اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی، ابتدا سرعت اولیه‌ی (V_0) واکنش آنزیمی با استفاده از سنجش فعالیت آنزیمی در حضور غلظت‌های مختلف سوبسترا به دست آمد. پارامترهای سینتیکی شامل K_m (غلظتی از سوبسترا که در آن غلظت، سرعت واکنش آنزیمی نصف سرعت حداکثری است)، V_{max} (سرعت حداکثری) و k_{cat} (عدد نوسازی) کاسپاز-۹ S310D در مقایسه با آنزیم وحشی از طریق نمودار لاین‌ویور برک (Lineweaver-burk) محاسبه شد (نمودار ۲ و جدول ۳). نتایج نشان داد که آنزیم وحشی با سرعت حداکثری 0.05 میکرومولار بر ثانیه، در غلظت $60/63$ میکرومولار از غلظت سوبسترا، سرعت آن نصف سرعت حداکثری $(1/2V_{max})$ است. آنزیم جهش یافته هم

الف



ب



نمودار ۲. نمودار لاین ویور-برک جهت تعیین V_{\max} و K_m . نمودار تغییرات $1/V_0$ در مقابل $1/[S]$ آنزیم کاسپاز-۹ وحشی (الف) و جهش یافته S310D (ب).

جدول ۳. پارامترهای سینتیکی آنزیم کاسپاز-۹ وحشی و S310D. غلظت آنزیم برای اندازه گیری همه‌ی پارامترهای سینتیکی ۰/۰۶۸ میلی گرم در میلی لیتر بود. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل \pm دامنه‌ی تغییرات می باشد.

واریانت	$K_m (\mu M)$	$V_{max} (\mu M s^{-1})$	$k_{cat} (s^{-1})$	$(k_{cat}/K_m) \times 1000 (s \mu M)^{-1}$
وحشی	$60/63 \pm 20$	$0/05 \pm 0/2$	$0/03 \pm 0/1$	$0/53 \pm 0/2$
S3310D	$89/29 \pm 30$	$0/06 \pm 0/1$	$0/04 \pm 0/2$	$0/47 \pm 0/2$

بحث

آپوپتوز، برخلاف مسیرهای پیام‌رسانی کلاسیک، به طور مستقیم از کینازها برای پیشبرد خود استفاده نمی‌کند. تحقیقات نشان داده است که فعالیت کینازها می‌تواند در حساسیت سلول به مرگ سلولی موثر باشد (۱۱). همه‌ی کاسپازها سوپسترای کینازها هستند و کاسپازها به طور معمول کینازهایی که آنها را فسفریله می‌کنند، می‌شکنند. تلاش برای نقشه‌برداری از تنظیم متقابل کیناز-کاسپاز و رقابت این دو دسته‌ی آنزیمی ادامه دارد. تعدادی از کاسپازها دارای چندین جایگاه فسفریلاسیون هستند که توسط کینازهای مختلفی فسفریله می‌شوند (۱۲). کاسپاز-۹ یک سیستم پروتئاز کلیدی در مسیر داخلی آپوپتوز است که پس از فعال‌شدن، کاسپاز-۳ را در فرودست خود پردازش و فعال می‌کند. فسفریلاسیون یکی از سازوکارهای سلول برای تنظیم فعالیت کاسپازها است که اساس مولکولی اثر آن بر عملکرد کاسپاز-۹ به خوبی بررسی نشده است. هم‌چنین در بین کاسپازها، کاسپاز-۹ بیشتر مستعد فسفریلاسیون توسط کینازهای مختلف در پاسخ به محرک‌های سلولی است (۹). پروتئین کیناز A در پاسخ به افزایش میزان cAMP سلولی فعال می‌شود و با فسفریله کردن کاسپاز-۹ در سرین‌های ۹۹، ۱۸۳ و ۱۹۵ مانع فعال شدن کاسپاز-۹ و سرکوب آپوپتوز می‌شود (۱۲). گزارش شده است که فسفریلاسیون کاسپاز-۹ در سرین ۳۴۸ توسط CK2 در سلول‌های موشی مانع پردازش پروکاسپاز-۹ می‌شود (۸). با توجه به اینکه سرین ۳۴۸ معادل سرین ۳۱۰ در

کاسپاز-۹ انسانی است، اهمیت این باقیمانده آمینواسیدی حفاظت شده در فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ در سلول‌های انسانی و هم‌چنین تحت شرایط برون‌تنی نامشخص است. به همین دلیل در این پژوهش، سرین ۳۱۰ به اسیدآمینو آسپاراتات جهش داده شد که مشابه فسفریلاسیون دارای بار منفی است. نتایج نشان داد که ایجاد بار منفی بر روی سرین ۳۱۰ در کاسپاز-۹، سبب کاهش فعالیت آنزیم در دماهای ۴، ۴۵ و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و افزایش فعالیت آن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در مقایسه با آنزیم وحشی می‌شود. دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ تحت شرایط برون-تنی ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد است. در دمای بهینه، میزان انرژی جنبشی آنزیم و سوپسترا برای برخورد با یکدیگر و قرارگیری سوپسترا در جایگاه فعال آنزیم مطلوب است. با کاهش دما میزان انرژی جنبشی آنزیم کاهش و احتمال قرارگیری سوپسترا در جایگاه فعال آنزیم کاهش می‌یابد. در دماهای بالاتر از دمای بهینه، احتمال دناتوره شدن آنزیم افزایش می‌یابد که منجر به رسوب پروتئین و در نهایت غیرفعال شدن آنزیم می‌شود. گزارش شده است که کاسپاز-۹ در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بیشترین حلالیت را دارد و با افزایش دما تا ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد میزان رسوب آنزیم افزایش می‌یابد (۱۳). براساس نتایج حاصل از این پژوهش، کاسپاز-۹ جهش‌یافته‌ی S310D در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد فعالیت آنزیمی بیشتری در مقایسه با دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد دارد. به نظر می‌رسد ایجاد بار منفی بر روی سرین ۳۱۰، سبب کاهش سرعت دناتوره شدن

آنزیم و افزایش پایداری آن می‌شود که تأیید این فرضیه به بررسی تغییرات ساختاری کاسپاز-۹ جهش‌یافته در مقایسه با آنزیم وحشی نیاز دارد. گزارش شده است که کاسپاز-۹ در دمای ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به طور کامل دناتوره می‌شود. پروکاسپاز-۹ متشکل از سه دمین CARD، زیرواحد بزرگ و زیرواحد کوچک است. دمین CARD نه تنها پایداری حرارتی آنزیم را افزایش می‌دهد بلکه به دلیل داشتن میان‌کنش با بخش مرکزی آنزیم، سبب افزایش فعالیت کاتالیتیک آن می‌شود (۱۴). ممکن است ایجاد بار منفی بر روی سرین ۳۱۰، در میان‌کنش بخش مرکزی آنزیم با دمین CARD موثر باشد.

نتایج فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ وحشی و جهش‌یافته‌ی (S310D) در حضور سوسترای کروموژنیک Ac-LEHD-pNA مشابه بود و پارامترهای سینتیکی شامل K_m ، k_{cat} و V_{max} برای هر دو آنزیم تفاوت معناداری نداشت. K_m غلظتی از سوسترا است که در آن سرعت واکنش آنزیمی نصف سرعت حداکثری (V_{max}) است. این ثابت، شاخصی از تمایل آنزیم به سوسترا است و هر چه مقدار آن کمتر باشد بیانگر تمایل بیشتر آنزیم به سوسترا است. k_{cat} یا عدد نوسازی (Turnover number) به معنای تعداد مولکول‌های سوسترای تبدیل شده به محصول در واحد زمان توسط یک مولکول آنزیم است. در یک پژوهش مقدار K_m و k_{cat} کاسپاز-۹ (تخلیص شده) برای سوسترای فلوروژنیک Ac-LEHD-AFC به ترتیب برابر با $430 \pm 35 \mu M$ و $0.1 s^{-1}$ و گزارش شده است (۱۴). K_m و k_{cat} کاسپاز-۹ تیپ وحشی تخلیص شده برای سوسترای فلوروژنیک Ac-VEHD-AMC در پژوهش انجام شده توسط گارسیا-کالو و همکاران به ترتیب برابر با $408 \mu M$ و $0.2 s^{-1}$ (۱۵). در این پژوهش K_m و k_{cat} برای کاسپاز-۹ وحشی برابر با $20 \pm 60/63 \mu M$ و $0.1 \pm 0.3 s^{-1}$ میکرومولار برای سوسترای کروموژنیک Ac-LEHD-pNA به دست آمد.

مقدار K_m و k_{cat} برای کاسپاز-۹ جهش‌یافته‌ی S310D به ترتیب برابر با $30 \pm 89/29 \mu M$ و $0.2 \pm 0.4 s^{-1}$ میکرومولار برای Ac-LEHD-pNA به دست آمد که براساس تحلیل‌های آماری با پارامترهای آنزیم وحشی تفاوت معناداری ندارند. تحقیقات نشان داده است که میزان تمایل کاسپاز-۹ به سوسترهای کروموژنیک، فلوروژنیک و فیزیولوژیک یکسان نیست. مقایسه فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ دایمر شده با زیپ لوسین و آنزیم دایمر شده با آپوپتوزوم در حضور سوسترای فلوروژنیک Ac-LEHD-AFC و سوسترای فیزیولوژیک (پروکاسپاز-۳) نشان داد که با وجود اینکه هر دو آنزیم، K_m مشابهی برای Ac-LEHD-AFC دارند، اما K_m آنها برای Ac-LEHD-AFC و سوسترای فیزیولوژیک متفاوت است. آنزیم دایمر شده با آپوپتوزوم، K_m کمتری برای سوسترای فیزیولوژیک پروکاسپاز-۳ دارد. بنابراین آپوپتوزوم علاوه بر فراهم کردن بستری برای دایمر شدن کاسپاز-۹، سبب افزایش تمایل آنزیم به سوسترای فیزیولوژیک آن می‌شود (۱۶). عدم تغییر در پارامترهای سینتیکی آنزیم جهش‌یافته ممکن است به دلیل بررسی فعالیت آنزیم تحت شرایط برون‌تنی و در غیاب آپوپتوزوم و سوسترای فیزیولوژیک آن باشد. سنجش آنزیمی در این پژوهش با استفاده از آنزیم تخلیص شده و سوسترای کروموژنیک Ac-LEH-pNA بود. با توجه به اینکه مونومرهای کاسپاز-۹ برخلاف کاسپازهای اجرایی به طور خودبخودی دایمر نمی‌شوند، از نمک آمونیوم سترات برای دایمر کردن آنزیم و سنجش فعالیت آنزیمی آن تحت شرایط *In vitro* استفاده شد. یکی دیگر از علل عدم تغییر در فعالیت کاسپاز-۹ جهش‌یافته در سرین ۳۱۰، ممکن است مربوط به اسیدهای آمینه‌ی مجاور سرین ۳۱۰ باشد. در کاسپاز-۹ انسانی، اسیدهای آمینه‌ی ۳۱۱ و ۳۱۲، به ترتیب آسپاراژین و پرولین است، در حالی‌که این جایگاه‌ها در کاسپاز-۹ موشی، شامل آسپاراتات و سرین است. در اطراف سرین ۳۴۸ موشی (معادل سرین ۳۱۰ انسانی)، اسیدهای آمینه‌ی اسیدی بیشتری وجود دارد (۱۲).

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در قالب طرح پژوهشی با کد ۹۷/۱۱/۱۹۳۱۲ تحت حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان انجام شد. از دانشگاه کردستان و دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه کمال تشکر و قدردانی می‌گردد. هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاهها تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

نتیجه‌گیری

بنابر نتایج حاصل از این پژوهش، ایجاد بار منفی بر روی سرین ۳۱۰ در کاسپاز-۹ بدون تاثیر بر پارامترهای سینتیکی سبب تغییر در فعالیت آنزیم جهش یافته در دماهای ۴، ۳۷، ۴۵ و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در مقایسه با آنزیم وحشی می‌شود.

منابع

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
2. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):a008656.
3. Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*. 2017;135:111-25.
4. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998;282(5392):1318-21.
5. Allan LA, Morrice N, Brady S, Magee G, Pathak S, Clarke PR. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat Cell Biol*. 2003;5(7):647-54.
6. Martin MC, Allan LA, Lickrish M, Sampson C, Morrice N, Clarke PR. Protein kinase A regulates caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. *J Biol Chem*. 2005;280(15):15449-55.
7. Dai J, Jin W-H, Sheng Q-H, Shieh C-H, Wu J-R, Zeng R. Protein phosphorylation and expression profiling by Yin-yang multidimensional liquid chromatography (Yin-yang MDLC) mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2007;6(1):250-62.
8. Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, et al. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*. 2017;8(14):23996-24008.
9. Allan LA, Clarke PR. Apoptosis and autophagy: regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J*. 2009;276(21):6063-73.
10. Fisher CL, Pei GK. Modification of a PCR Based Site-Directed Mutagenesis Method. *Biotechniques*. 1997;23(4):570-4.
11. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell*. 2009;138(5):838-54.
12. Serrano BP, Hardy JA. Phosphorylation by protein kinase A disassembles the caspase-9 core. *Cell Death Differ*. 2018;25(6):1025-39.
13. Almeida VM, Marana SR. Optimum temperature may be a misleading parameter in enzyme characterization and application. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212977.
14. Huber KL, Serrano BP, Hardy JA. Caspase-9 CARD: core domain interactions require a properly formed active site. *Biochem J*. 2018;475(6):1177-1196.
15. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Rasper DM, Vaillancourt JP, Zamboni R, Nicholson DW, et al. Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differ*. 1999;6(4):362-369.
16. Yin Q, Park HH, Chung JY, Lin S-C, Lo Y-C, da Graca LS, et al. Caspase-9 holoenzyme is a specific and optimal procaspase-3 processing machine. *Mol Cell*. 2006;22(2):259-268.