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

Raheleh Shakeri[1], Mohadeseh Mahmoudian[2], Reza Khodarahmi[3], Soheila Mohammadi[4]

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 in 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 capsase-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 ^{o}C and lower activity at 4, 15, 45 and 60 ^{o}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 .ŞJKU 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.13]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و هفت / بهمن و اسفند ۱۴۰۱/۲۴-۱۳

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 کارشناسی‌ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۰۹۶۴-۵۵۶۱

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

۴. استادیار، ، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۶۶۷۰-۹۶۲۷

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 باقیمانده‌ی 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 آسپارتات با استفاده از روش جهش‌زایی هدفمند Quick change جهش داده شد. کاسپاز-۹ نوترکیب وحشی و جهش‌یافته در سویه باکتری BL21(DE3) بیان و با استفاده از کروماتوگرافی گرایشی تخلیص شدند. پروفایل دمایی و فعالیت کاسپاز-۹ جهش‌یافته در مقایسه با آنزیم وحشی به کمک سوبسترای کروموژنیک 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 جهش‌یافته‌ی S310D و آنزیم وحشی مشابه هستند، اما پروفایل دمایی آنها متفاوت است. آنزیم جهش‌یافته‌ی S310D در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد فعالیت بیشتر و در دماهای ۴، ۱۵، ۴۵ و ۶۰ درجه-ی سانتی‌گراد 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.13]

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 سیستئین پروتئازهایی 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 پرودمین و عملکردشان به کاسپازهای التهابی، کاسپازهای شروع‌کننده‌ی آپوپتوز و کاسپازهای اجرایی دسته‌بندی می‌شوند. با وجود اینکه همه‌ی کاسپازها برای فعال شدن نیاز به پردازش (حذف پرودمین) و دایمر شدن دارند، اما چگونگی فعال شدن کاسپازهای شروع کننده و اجرایی متفاوت است. کاسپازهای اجرایی در حالت پروآنزیم دایمر هستند و پس از حذف بخشِ پرو توسط کاسپازهای شروع‌کننده فعال می‌شوند. سازوکارِ 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 فعال‌شدن، در فرودست خود سبب تقویت پیام و اجرای سریع مرگ سلولی می‌شوند (۲). در پاسخ به محرک‌های آپوپتوزیِ درون‌سلولی 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 اسیدآمینه) 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 جهش‌یافته‌های S99A ،S195A, S183A ساخته شده بود (۶). کروماتوگرافی مایع چند بعدی متصل به طیف‌سنج جرمی یکی از ابزارهای مورداستفاده 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 آسپارتات 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 DHGFEVASTSPEDESPG**S**NPEPDATPFQE 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.13]

مواد سوبسترای کاسپاز-۹ (Ac-LEHD-pNA) از سیگما خریداری شد. پلاسمید حاوی ژن کاسپاز-۹ کلون شده از پروفسور گای سل وسن (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*پلیمراز EX Taq HS از شرکت تاکارا تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورداستفاده 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 آسپارتات

جهش	توالی	دمای ذوب (℃)
S310D	F: 5′ TGAAGACGAGTCCCCTGGCGATAACCCCGAGCCAGATGCCAC 3′	۷۲℃
	R: 5′ GTGGCATCTGGCTCGGGGTTATCGCCAGGGGACTCGTCTTCA 3′	۷۲℃

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 اسیدآمینه‌ی سرین ۳۱۰ به کدون GAT (آسپارتات) جهش یافت (۱۰). طراحی پرایمر در این روش به گونه‌ای است که کدون جهش‌یافته در بخش میانی پرایمرهای پیشرو و معکوس قرار گیرد تا نواحی مکملِ ابتدا و انتهای پرایمر به خوبی به توالی الگو بچسبند و فقط ناحیه‌ی ایجاد جهش با ژن الگو نمی‌چسبد. اسیدآمینه‌ی آسپارتات 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 موردنیاز 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 پلیمراز و بافر در دستگاه PCR قرار گرفتند و پس از تقلب اولیه به مدت ۱۵ ثانیه در ۹۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، 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 رشته-ها، محصول واکنش با آنزیم محدودکننده‌ی *DpnI* به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد 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 دریافت‌کننده‌ی پلاسمید به دلیل داشتن ژن مقاومت به

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.13]

آمپی‌سیلین می‌توانند در محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین تکثیر شوند، اما باکتری‌های فاقد پلاسمید قادر به زنده‌مانی و تکثیر در حضور آنتی‌بیوتیک نیستند. جهت استخراج پلاسمید یکی از کلونی‌های باکتری‌های رشدکرده 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 نوترکیب جهش‌یافته به باکتری‌های مستعد شده‌ی بیانی BL21(DE3) منتقل و در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تکثیر داده شدند. این سویه برای بیان وکتورهایی که تحت کنترل پروموتر 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

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 مورداستفاده 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 نوترکیب 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 جداکننده به ستون اضافه و پس از ۵ دقیقه از ستون جمع‌آوری شد. این مرحله چندین بار تکرار شد تا همه‌ی پروتئین‌های نوترکیب متصل شده به ستون جمع‌آوری شوند. از هر یک از این الوشن‌ها جهت بررسی با SDS-PAGE نمونه‌برداری شد. الوشن‌ها تا زمان سنجش آنزیمی در ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلیه‌ی مراحل تخلیص پروتئین در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد.

جدول ۲. بافرهای مورداستفاده 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 جداکننده

سنجش فعالیت آنزیمی:

از سوبسترای کروموژنیک 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 سیترات (۱/۵ مولار)، ۳ میکرولیتر بافر سنجش کاسپاز-۹ و ۱۰ میکرولیتر 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 سوبسترای 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 میکروپلیت‌خوان Tekan (مدل

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.13]

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_o) به دست آمد. جهت محاسبه پارامترهای سینتیکی، نمودار لاین‌ویور-برک (نمودار $1/V_o$ 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.

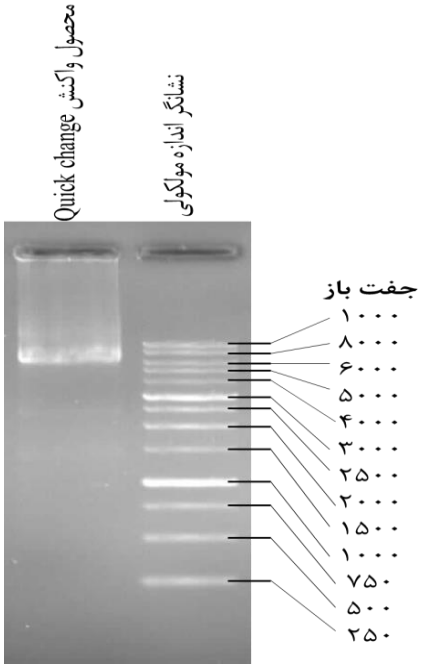
تجزیه و تحلیل آماری:

همه‌ی تست‌ها حداقل سه‌بار تکرار شد و با نرم‌افزار SPSS، با استفاده از آزمون T مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. $p \leq ۰/۰۵$ 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*

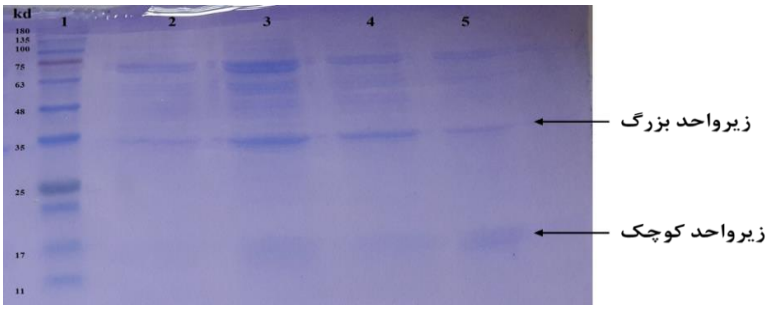
پس از تکثیر محصول Quick change در باکتری، پلاسمید استخراج شده برای تعیین توالی ارسال شد. پس از حصول اطمینان از ایجاد جهش، بیان و تخلیص کاسپاز-۹ وحشی و جهش‌یافته انجام شد. به دلیل اینکه هر دو آنزیم

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

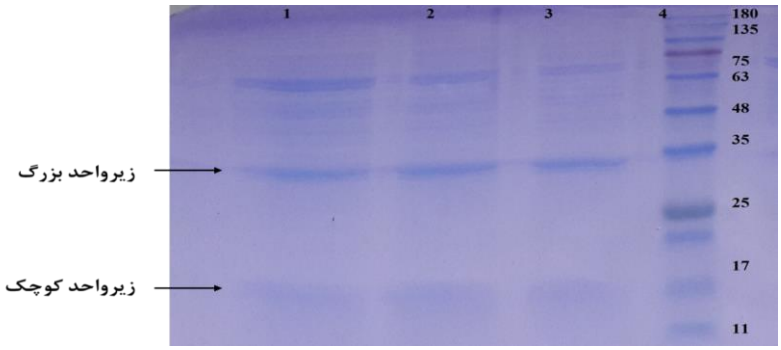
[DOI: 10.61186/sjku.27.6.13]

وحشی و جهش‌یافته دارای برچسب 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 کاسپاز-۹ وحشی و جهش‌یافته‌ی S310D در شکل ۲ آمده است. پروکاسپاز-۹ با وزن مولکولی ۴۶ کیلودالتون، پس از بریده‌شدن به دو زیرواحد بزرگ و کوچک به ترتیب با وزن مولکولی ۳۴ و ۱۲ کیلودالتون تبدیل می‌شود.

الف



ب



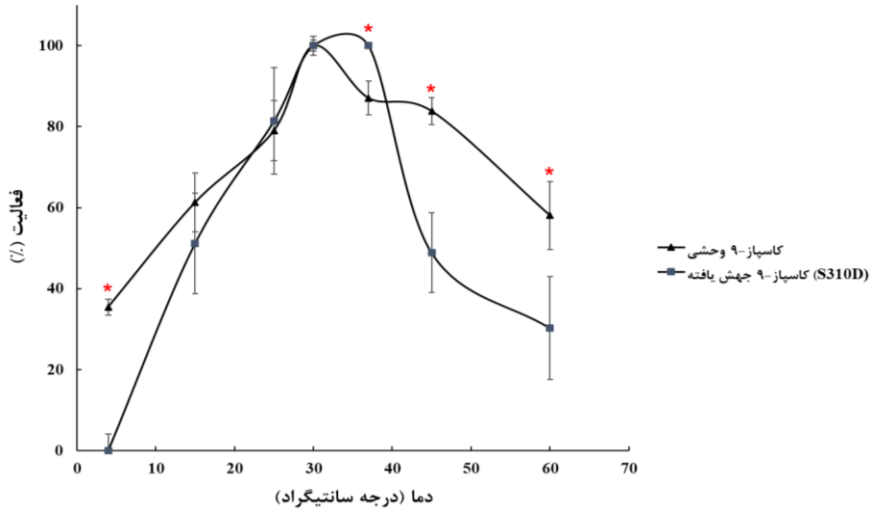
شکل ۲. تصویر ژل SDS-PAGE (۱۲/۵ درصد) مربوط به تخلیص. آنزیم کاسپاز-۹ وحشی (الف) و جهش‌یافته‌ی S310D (ب) به روش کروماتوگرافی گرایشی (ستون نیکل). ۱- الوشن ۱ ۲- الوشن ۲ ۳- الوشن ۳ ۴- نشانگر اندازه مولکولی

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

سنجش آنزیمی در دماهای بین ۴ تا ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نشان داد که کاسپاز-۹ جهش‌یافته‌ی S310D در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد فعالیت آنزیمی بیشتری در مقایسه با کاسپاز-۹ وحشی دارد اما در دماهای ۴، ۴۵ و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد فعالیت کمتری دارد. در دماهای ۱۵، ۲۵ و ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد 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 پائین‌تر و بالاتر به سرعت کاهش می‌دهد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.13]



نمودار ۱. پروفایل فعالیت نسبی آنزیمی کاسپاز-۹ وحشی و جهش‌یافته‌ی S310D در دماهای مختلف. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± دامنه‌ی تغییرات می‌باشد. * $p \leq$ ۰/۰۵ معنادار است. یک واحد فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ برابر با مقدار آنزیم موردنیاز برای هیدرولیز یک پیکومول سوبسترای Ac-LEHD-pNA در مدت زمان یک دقیقه در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد است.

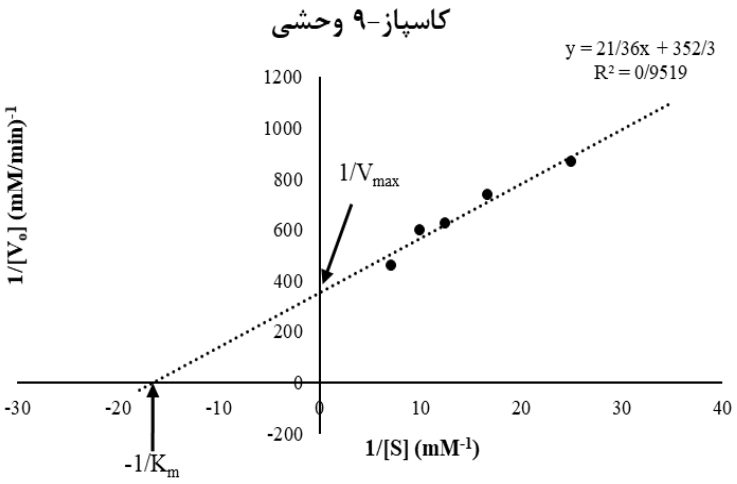
تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم کاسپاز-۹ وحشی و S310D:

جهت اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی، ابتدا سرعت اولیه‌ی (V_o) 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 ۰/۰۵ میکرومولار در ثانیه، در غلظت ۶۰/۶۳ میکرومولار از غلظت سوبسترا، سرعت آن نصف سرعت حداکثری ($1/2V_{max}$) است. آنزیم جهش‌یافته هم با سرعت حداکثری ۰/۰۶ میکرومولار بر ثانیه و K_m برابر با ۸۹/۲۹ 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 جهش‌یافته به ترتیب برابر با ۰/۰۳ و ۰/۰۴ 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 جهش‌یافته مشابه آنزیم وحشی است. براین‌اساس، جهش سرین ۳۱۰ به آسپارتات و ایجاد بارمنفی، تاثیری در فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ جهش‌یافته و تمایل آنزیم به سوبسترا ندارد.

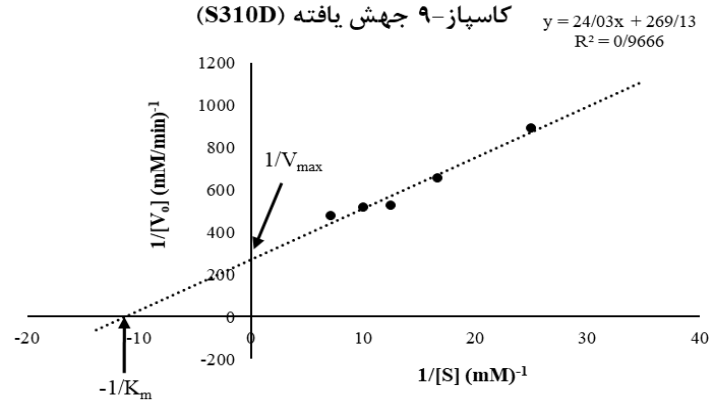
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.13]

الف



ب



نمودار ۲. نمودار لاین‌ویور-برک جهت تعیین K_m و V_{max}. نمودار تغییرات $1/V_o$ در مقابل $1/[S]$ آنزیم کاسپاز-۹ وحشی (الف) و جهش‌یافته‌ی S310D (ب).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.13]

جدول ۳. پارامترهای سینتیکی آنزیم کاسپاز-۹ وحشی و S310D. غلظت آنزیم برای اندازه‌گیری همه‌ی پارامترهای سینتیکی ۰/۰۶۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± دامنه‌ی تغییرات می‌باشد.

واریانت	K_m (µM)	V_{max} (µM s^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	$(k_{cat}/K_m)\times1000$ ($s\ \mu M)^{-1}$
وحشی	۶۰/۶۳±۲۰	۰/۰۵ ± ۰/۲	۰/۰۳ ± ۰/۱	۰/۵۳ ± ۰/۲
S3310D	۸۹/۲۹ ± ۳۰	۰/۰۶ ± ۰/۱	۰/۰۴ ± ۰/۲	۰/۴۷ ± ۰/۲

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 سوبسترای 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 سیستئین 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 محرک-های 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 می-شود (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 اسیدآمینه آسپارتات 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 تحتِ شرایط *برون-تنی* ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد است. در دمای بهینه، میزان انرژی جنبشی آنزیم و سوبسترا برای برخورد با یکدیگر و قرارگیری سوبسترا در جایگاه فعال آنزیم مطلوب است. با کاهش دما میزان انرژی جنبشی آنزیم کاهش و احتمال قرارگیری سوبسترا در جایگاه فعال آنزیم کاهش می‌یابد. در دماهای بالاتر از دمای بهینه، احتمال دناتوره‌شدن 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.13]

آنزیم و افزایش پایداری آن می‌شود که تائید 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 سوبسترای 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 سوبسترا است که در آن سرعت واکنش آنزیمی نصف سرعت حداکثری (V_{max}) است. این ثابت، شاخصی از تمایل آنزیم به سوبسترا است و هر چه مقدار آن کمتر باشد بیانگر تمایلِ بیشتر آنزیم به سوبسترا است. k_{cat} یا عدد نوسازی (Turnover number) به معنای تعداد مولکول‌های سوبسترای 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 سوبسترای فلوروژنیک Ac-LEHD-AFC به ترتیب برابر با ۳۵ ± ۴۳۰ µM و ۰/۱ ± ۱/۴ s^{-1} گزارش شده است (۱۴). K_m و k_{cat} کاسپاز-۹ تیپ وحشی تخلیص شده برای سوبسترای فلوروژنیک Ac-VEHD-AMC در پژوهش انجام شده توسط گارسیا-کالوٌ و همکاران به ترتیب برابر با ۴۰۸ µM و ۰/۲ – ۰/۱ s^{-1}(بسته به بافر مورد استفاده برای سنجش آنزیمی) بود (۱۵). در این پژوهش K_m و k_{cat} برای کاسپاز-۹ وحشی برابر با ۲۰ ± ۶۰/۶۳ و ۰/۱ ± ۰/۰۳ میکرومولار برای سوبسترای کروموژنیک Ac-LEHD-pNA به دست آمد. مقدار K_m و k_{cat} برای کاسپاز-۹ جهش‌یافته‌ی S310D به ترتیب برابر با ۳۰ ± ۸۹/۲۹ و ۰/۲ ± ۰/۰۴ 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 سوبستراهای کروموژنیک، فلوروژنیک و فیزیولوژیک یکسان نیست. مقایسه فعالیت آنزیمی کاسپاز-۹ دایمر شده با زیپ لوسین و آنزیم دایمر شده با آپوپتوزوم در حضور سوبسترای فلوروژنیک Ac-LEHD-AFC و سوبسترای 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 سوبسترای فیزیولوژیک متفاوت است. آنزیم دایمرشده با آپوپتوزوم، K_m کمتری برای سوبسترای فیزیولوژیک پروکاسپاز-۳ دارد. بنابراین آپوپتوزوم علاوه بر فراهم کردن بستری برای دایمر شدن کاسپاز-۹، سبب افزایش تمایل آنزیم به سوبسترای 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 سوبسترای فیزیولوژیک آن باشد. سنجش آنزیمی در این پژوهش با استفاده از آنزیم تخلیص شده و سوبسترای کروموژنیک Ac-LEH-pNA بود. با توجه به اینکه مونومرهای کاسپاز-۹ برخلاف کاسپازهای اجرایی به طور خودبخودی دایمر نمی‌شوند، از نمک آمونیوم سیترات 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 آسپارتات و سرین است. در اطراف سرین ۳۴۸ موشی (معادل سرین ۳۱۰ انسانی)، اسیدهای آمینه‌ی اسیدی بیشتری وجود دارد (۱۲).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.13]

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 جهش‌یافته در دماهای ۴، ۳۷، ۴۵ و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در مقایسه با آنزیم وحشی می‌شود.

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 منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.61186/sjku.27.6.13]