دراسة بعض الخصائص الفيزيائية والكيميائية لأنزيم الستافيلولايسين Staphylolysin المنقى من بكتريا الـ *Pseudomonas aeruginosa*

*شيماء سهيل نجم** *مي طالب فليح**

استلام البحث 20، كانون الاول، 2012
قبول النشر 3، اذار، 2014

الخلاصة:

درست بعض خصائص انزيم الستافيلولايسين(Staphylolysin) A وD المنقى من بكتريا P_5, P_{16} *Pseudomonas aeruginosa* على التوالي فكان الوزن الجزيئي 20,417 كيلو دالتون و 23,988 كيلودالتون للستافيلولايسين D,A على التوالي عند تقديرهما بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام SDS-PAGE. لوحظ ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الستافيلولايسين A هو 8 اذا اعطى فعالية بلغت 150 وحدة / مل، ولثبات الانزيم 7.5-8.5 اذ احتفظ الانزيم بكامل فعاليته تقريبا، فيما كان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الستافيلولايسين D هو 9.5 إذ اعطى اعلى فعالية بلغت 16 وحدة /مل، ولثبات الانزيم 8.5-9.5 إذ احتفظ الانزيم بكامل فعاليته تقريباً، وظهرت اقصى فعالية للانزيمين عند درجة حرارة 40م اذ بلغت الفعالية النوعية للستافيلولايسن A 140 وحدة / مل وللستافيلولايسين D 16.4 وحدة/ مل ، واحتفظ كلا الانزيمين بكامل فعاليتهما تقريبا عند حضنها بدرجة حرارة 25-40 م لمدة ساعة .

عند دراسة تاثير بعض المواد في الفعالية الانزيمية الستافيلولايسين (Staphylolysin) D,A كان لكلوريد الصوديوم وكلوريد البوتاسيوم بتركيز 1و5 ملي مولار تأثير منشط للفعالية الانزيمية قياسا بالسيطرة اذ احتفظ انزيم الستافيلولايسينD,A بـــ 105%، 108% و 102%، 104% من فعاليتهما على التوالي عند معاملتهما بكلوريد الصوديوم بينما احتفظ كلا الانزيمين بـ 110%, 114% و133% ،118% من فعاليتهما على التوالي عند معاملتهما بكلوريد البوتاسيوم. ثبطت الفعالية الانزيمية لكلا الانزيمين عند معاملتهما بكلوريدات الحديد والزئبق والخارصين وبنسب متفاوتة، إذ احتفظ انزيم الستافيلولايسين A بـــ 73% و 7% من فعاليته الابتدائية على التوالي عند معاملته بـ 5 ملي مولار من كلوريد الحديد والزئبق على التوالي، و9% فقط من فعاليته عند معاملته بـ 0.1 ملي مولار من كلوريد الخارصين، فيما احتفظ انزيم الستافيلولايسين D بـــ 45% و 13% من فعاليته فقط عند معاملته بـــ 5 ملي مولار من كلوريد الحديد والزئبق على التوالي، 23% فقط من فعاليته عند معاملته بـــ 0.1 ملي مولار من كلوريد الخارصين ، بينما احتفظ كلا الانزيمين بكامل فعاليتهما عند المعاملة بمادة EDTA بتركيز 10 ملي مولار ، وفينيل مثيل سلفونيل فلورايد (PMSF) بتركيز 0.4 ملي مولار .هذه النتائج تشير الى ان انزيمي الستافيلولايسين من الانزيمات المعدنية (Zn -metallo endopeptidase) .

الكلمات المفتاحية:Staphylolysin , *Pseudomon aeruginosa*,EDTA,Immunosuppressve ,

المقدمة:

توصف بكتريا *P. aeruginosa* بكونها منتهزة للفرص (Opportunistic) فهي تسبب المرض لمرضى المستشفيات كما في حالة الإصابة بالحروق الشديدة المؤدية الى تحطم جلد المصاب بوصفه أحد أهم الوسائل الدفاعية وفي حالة اصابة الجهاز التنفسي باحد الأمراض المزمنة كما في التليف الكيسي (Cystic fibrosis) كما تصيب الأشخاص ذوي المناعة المثبطة (Immunosuppressive) ومرضى قلة خلايا الدم البيض العدلة (Neutropenia) في حالة العلاج الكيميائي للأورام إذ يبلغ عدد كريات الدم العدلة عندهم أقل من 500/µl، كما تتسبب البكتريا في 10-20% من الإصابات المكتسبة من المستشفيات [1،2].

يعد انزيم الستافيلولايسين (EC3.4.24.B16) من الانزيمات المحللة للجدار الخلوي لخلايا العنقوديات المقتولة حراريا بطريقة تختلف عن انزيم اللايسوزايم وذلك بمهاجمة الاواصر الببتيدية ضمن الجسور العرضية خماسية الكلايسين في طبقة الببتيدوكلايكان ، تنتج بكتريا*P. aeruginosa* نوعين من انزيمات الستافيلولايسين الحالة للعنقوديات: الستافيلولايسينA (Las A) والستافيلولايسين D (Las D) [5، 4،3].

لانزيم الستافيلولايسين A القابلية على تحليل العديد من مكونات الانسجة الرابطة المحتوية على الحامض الاميني الكلايسين فضلا عن قدرته على تحليل الايلاستين(Elastin) والكولاجين (Collagen)[6] ، كما له القابلية على تحليل العديد من البيبتيدات الخماسية المحتوية على

*قسم علوم الحياة- كلية العلوم-جامعة بغداد . بغداد/ العراق

الحامض الاميني الكلايسين ووجد ان له القدرة على تحليل 22 نوعا من البيبتيدات الخماسية الموجودة في Tropoelastin البشري [7] بينما يزيد الستافيلولايسين D من امراضية البكتريا عن طريق تحويل انزيم الستافيلولايسين A من الشكل غير الفعال الى الشكل الفعال [4]

على الرغم من ان انزيمات الستافيلولايسين (Staphylolysin) A و D يسهمان وبشكل تام في ضراوة بكتريا*P. aeruginosa* عن طريق فعاليتهما المحللة للبروتين (Proteolysis) [8،9] إلا إن لإنزيم الستافيلولايسين A دوراً مهماً في مرحلة الاستيطان عندما تقترن إصابة البكتريا عادة بإصابات بكتيرية أخرى ، ففي حالة اقتران البكتريا مع *S. aureus* يقوم الانزيم بالتخلص منها وذلك بتحليلها حيث وجد ان اقل من 0.1 مايكروغرام من الانزيم مناسبة لتحلل سريع للعنقوديات ، وبذا تتخلص البكتريا من البكتريا المنافسة لها [6،10] .

وفي المجال الطبي وجد أن إنزيم الستافيلولايسين A يكون فعالاً في علاج التهاب القرنية (Keratitis) المتسبب عن *S. aureus* في الارانب حيث لايعتبر الانزيم عامل ضراوة رئيسي في التهاب قرنية العين في الحيوانات المختبرية [11].لذا هدف هذا البحث الى دراسة بعض خصائص الستافيلولايسين A ، D الفيزيائية والكيميائية .

المواد و طرائق العمل :

-انزيمي الستافيلولايسين (Staphylolysin) A ، D :-

استخدم انزيم الستافيلولايسين A المنقى من بكتريا *P. aeruginosa* P_{16} والستافيلولايسين D المنقى من بكتريا *P. aeruginosa* P_5. حيث تم تنقية الانزيمين جزئيا في بحث سابق باستخدام بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 80% ، ثم بكروموتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادل DEAE- cellulose [12].

-تقدير فعالية انزيمي الستافيلولايسين (Staphylolysin) D,A :-

أ-تحضير خلايا المادة الأساس

نُميت بكتريا *S. aureus* في وسط مرق نقيع الدماغ والقلب السائل بحجم 30مل بدرجة حرارة 37 م ولمدة 18 ساعة ،ثم غُلي الوسط لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 100 م ،وأجري النبذ المركزي لمدة 10 دقائق عند 3500 دورة / دقيقة وأُخذ الراسب لتحضير العالق البكتيري [13].

ب- تقدير فعالية إنزيم الستافيلولايسين A [14] .

- أضيف 0.05 مل (50 µl) من الإنزيم الى 1 مل من المادة الاساس (عالق خلايا *S.aureus* المقتولة حرارياً) في انبوبة ابندروف بحجم 1.5 مل ومزج المحلول باستخدام المازج وقيست الأمتصاصية باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 595 نانوميتر.
- قدرت الفعالية استنادا الى المعادلة الآتية :

$$\text{الفعالية (وحدة/مللتر)} = \frac{\text{الامتصاصية 595 نانوميتر} \times \text{الحجم الكلي في خلية الجهاز (مللتر)}}{\text{الانخفاض في قراءة جهاز المطياف في الدقيقة الواحدة}(0.001) \times \text{زمن التفاعل (دقيقة)} \times \text{حجم الانزيم(مللتر)}}$$

عرفت وحدة الفعالية للإنزيم (Unit) أنها كمية الإنزيم التي تسبب انخفاضاً للإمتصاصية عند الطول الموجي 595 نانوميتر مقداره وحدة امتصاصية واحدة بالدقيقة [6].

ج- تقدير فعالية إنزيم الستافيلولايسين D [15]

- أضيف 1 مل من الإنزيم الى 1 مل من المادة الاساس(عالق خلايا *S.aureus* المقتولة حرارياً)، أي بنسبة 1:1 حجم/حجم
- حضن مزيج التفاعل بدرجة حرارة 37م ولمدة زمنية أكثر من 3 ساعات . وقيست الأمتصاصية عند الطول الموجي 595 نانوميتر كل 30 دقيقة . وقدرت الفعالية استناداً الى المعادلة السابقة.

-تعيين الوزن الجزيئي بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل أمايد بوجود SDS :-

إجري الترحيل لتقدير الوزن الجزيئي للستافيلولايسين (Staphylolysin) طبقاً لما أورده [16]، اضيف 100 مايكروليتر من محلول الإنزيم المحضر الى الهلام في جهاز الترحيل، و100 مايكروليتر من مزيج البروتينات القياسية ثم أوصل التيار الكهربائي بقوة 2 ملي أمبير/ لوح في مرحلة الرص لمدة 30 دقيقة ، و 5 ملي أمبير/ لوح (بفرق جهد مقداره 220 فولت) في مرحلة الفصل . استمرت عملية الترحيل لمدة 4-5 ساعات مع التبريد بدرجة حرارة 4م ،وبعد انتهاء عملية الترحيل الكهربائي ، نزع الهلام من الألواح وغمر في محلول التثبيت لمدة ساعة واحدة ، ثم غمر في محلول صبغة الكوماسي الزرقاء لمدة 3 ساعات بعدها أزيلت الصبغة بغمر الهلام في محلول إزالة الصبغة وتبديله مرات عدة لحين ظهور الحزم البروتينية الزرق بوضوح ، ثم حفظ الهلام في محلول 7 % حامض الخليك . قيست المسافة التي قطعتها صبغة البروموفينول الأزرق من السطح العلوي للهلام الى مركز حزمة الصبغة لإستخراج الوزن الجزيئي لإنزيم الستافيلولايسين A وD . كما

قيست المسافات من السطح العلوي للهلام الى مركز حزم البروتينات القياسية المنفصلة واستخرجت قيمة الحركة النسبية (Relative mobility " Rm") لكل بروتين على وفق المعادلة الآتية :

$$\text{الحركة النسبية (Rm)} = \frac{\text{المسافة التي قطعها البروتين}}{\text{المسافة التي قطعتها صبغة البروموفينول الازرق}}$$

رسمت العلاقة بين الحركة النسبية (Rm) ولوغارتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية ، وقدر الوزن الجزيئي لإنزيم الستافيلولايسين A وD بعد استخراج قيمة Rm للإنزيم وإسقاطها على المنحنى القياسي .

-تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الأنزيم :-

حضرت محاليل المادة الأساس من خلايا *S.aureus* المقتولة حرارياً باستخدام محاليل دارئة بأرقام هيدروجينية تراوحت بين 6-10.5[17] وبتركيز 0.02 مولار حيث استخدم دارئ الفوسفات (Phosphate buffer) للأرقام الهيدروجينية تراوحت بين (6-8) واستخدم دارئ Tris-HCL للأرقام الهيدروجينية (8.5 -9.5) واستخدم دارئ Carbonate – Bicarbonate بأرقام هيدروجينية (10-10.5) ،وقدرت فعالية انزيم الستافيلولايسين A ، وفعالية انزيم الستافيلولايسين D ، ورسمت العلاقة بين الأرقام الهيدروجينية المختلفة مقابل فعالية الإنزيم لتعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم .

-تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم :-

مزجت حجوم متساوية من محلول انزيم الستافيلولايسين A و الستافيلولايسين D مع المحاليل ذات الأرقام الهيدروجينية(6-10.5) وبتركيز 0.02 مولار ، حضنت الأنابيب بدرجة حرارة الغرفة مدة 60 دقيقة ، وبانتهاء مدة الحضن بردت الأنابيب مباشرة في حمام ثلجي ثم قدرت فعالية الانزيمين، و قدرت الفعالية المتبقية (Remaining activity) ، ثم رسمت العلاقة بين قيم الرقم الهيدروجيني مقابل نسبة الفعالية المتبقية للإنزيم (%) لتعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم .

-تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم :-

قدرت فعالية انزيمي الستافيلولايسين A و الستافيلولايسين D على التوالي ، وفي مدى من درجات الحرارة تراوح بين 20-65م [17] ورسمت العلاقة بين درجات الحرارة مقابل فعالية الإنزيم لتحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم .

-تعيين الثبات الحراري للإنزيم :-

حضن انزيمي الستافيلولايسين A و الستافيلولايسين D بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين 25-65م لمدة 60 دقيقة [17]،بعدها نقلت الأنابيب مباشرة الى حمام ثلجي ثم قيست الفعالية لإنزيم الستافيلولايسين A وللستافيلولايسين D وقدرت الفعالية المتبقية للإنزيمين لكل درجة حرارية على حده .

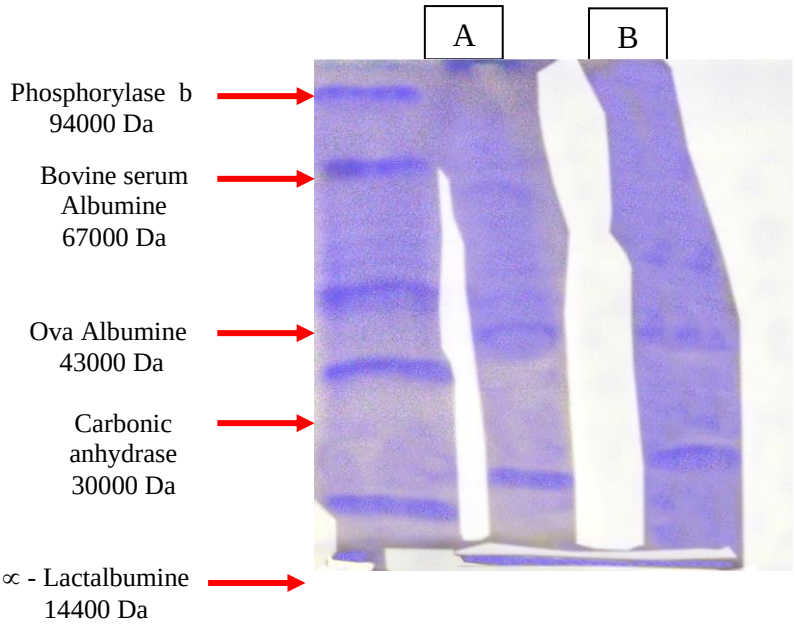
-دراسة تأثير بعض المركبات الكيميائية في فعالية انزيم الستافيلولايسين(Staphylolysin) :-

درس تأثير الفلزات في فعالية انزيمي الستافيلولايسين A و الستافيلولايسين D ، إذ استعملت الكلوريدات الآتية ($MgCl_2$, KCl, $FeCl_3$, $CaCl_2$, $HgCl_2$, NaCl, $ZnCl_2$) حضر كل فلز بتركيزين (1 و5 ملي مولار) باستثناء $ZnCl_2$ حضر بتراكيز (0.01 و0.1 ملي مولار) ،واستعمل 2- mercaptoethanol بتركيز (5 و10 ملي مولار) واستعمل EDTA بتركيز (10 و25 ملي مولار) و PMSF بتركيز (0.4 و 2 ملي مولار)، ومزج كل تركيز من التراكيز المذكورة مسبقاً مع الإنزيم بنسبة 1:1 (حجم/حجم) وحضن لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة[9،6] ،ثم قدرت الفعالية الإنزيمية للستافيلولايسين A و للستافيلولايسين D بالقياس مع فعالية الستافيلولايسين A و D غير المعامل ومنها قدرت النسبة المئوية للتثبيط واحتسبت الفعالية المتبقية .

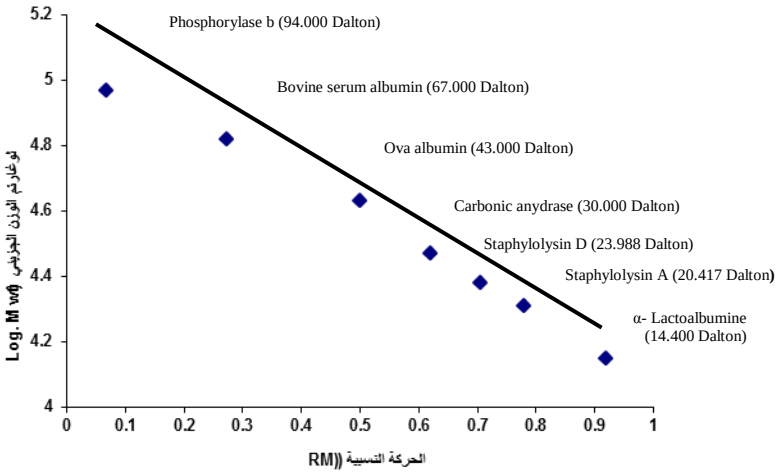
النتائج والمناقشة :

تعيين الوزن الجزيئي للانزيم

قدر الوزن الجزيئي استخدم انزيم الستافيلولايسين A المنقى من بكتريا *P. aeruginosa* P_{16} والستافيلولايسين D المنقى من بكتريا *P. aeruginosa* P_5 [12] فكان 20.417 دالتون لانزيم ستافيلولايسين A و 23.988 دالتون لانزيم ستافيلولايسين D شكل (1،2).جاءت هذه النتيجة متقاربة مع عدد من الدراسات التي تناولت تحديد الوزن الجزيئي للستافيلولايسين Staphylolysin (A و D)اذ ذكر[18] ان الوزن الجزيئي لانزيم الستافيلولايسين A باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود SDS كان 21.000 دالتون ،بينما قدر [4] الوزن الجزيئي له بحدود 20.000 دالتون عند تقديره بطريقة (PAGE-SDS) .في حين اشارت نتائج [9]و [19] الى ان الوزن الجزيئي لانزيم الستافيلولايسين D يبلغ 23.000 دالتون.



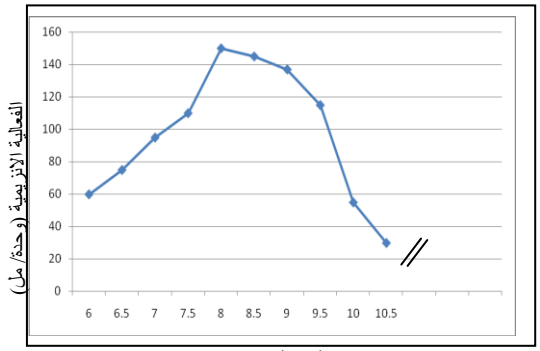
شكل (1) نمط الترحيل الكهربائي لانزيم الستافيلولايسين(Staphylolysin) D,A المنتج من العزلة P_{16} و P_5 باستخدام هلام متعدد الاكريل امايد بوجود SDS قياسا بنمط الترحيل الكهربائي للبروتينات القياسية
A: انزيم الستافيلولايسين A B: انزيم الستافيلولايسين D



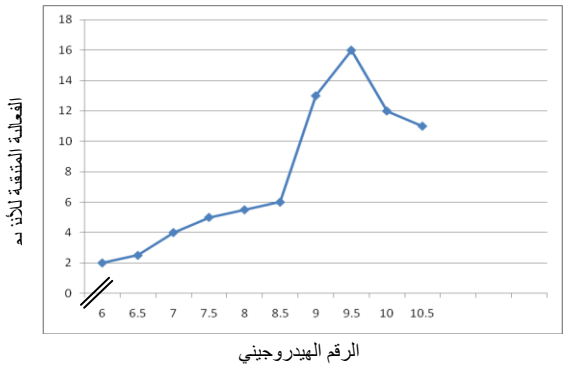
شكل (2) المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لانزيم الستافيلولايسين(Staphylolysin) D , A بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود SDS

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم الستافيلولايسين(Staphylolysin) D,A
بينت النتائج ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الستافيلولايسين A هو 8 اذ اعطى اعلى فعالية كانت 150 وحدة/ مل (شكل3) وللستافيلولايسين D هو 9.5 اذ اعطى اعلى فعالية وكانت 16 وحدة/ مل (شكل 4) ،وانخفضت الفعالية الانزيمية عند الاقام الهيدروجينية الاعلى والاقل من هذه القيمة ،ويأتي هذا الانخفاض نتيجة لتأثير الرقم الهيدروجيني في المجاميع القابلة للتاين الموجودة في الموقع الفعال ، او نتيجة التغير في الحالة الايونية لمعقد الانزيم – المادة الاساس (ES) ومعقد الانزيم – الناتج (EP)، ويقع هذا التاثير بشكل اساسي في معقد الانزيم – المادة الاساس (ES) عندما يكون تركيز المادة الاساس اكبر من قيمة ثابت ميكالس – منتن (Km < S)، وعندما يكون تركيز المادة الاساس اقل من قيمة ثابت ميكالس – منتن (Km > S) فان التاثير يقتصر على الانزيم بالدرجة الرئيسة [20].

تتفق هذه النتيجة مع الكثير من الدراسات التي اشارت الى ان الفعالية المثلى لانزيم الستافيلولايسين A تقع عند الرقم الهيدروجيني 8.5 [21]. بينما اشارت الدراسات التي اجريت على الستافيلولايسين D الى ان اعلى فعالية انزيمية تظهر عند الرقم الهيدروجيني 9.5 ،في حين لا يظهر الانزيم اي مقدرة في فعالية تحليل العنقوديات عند الرقم الهيدروجيني المتعادل او دونه [9].



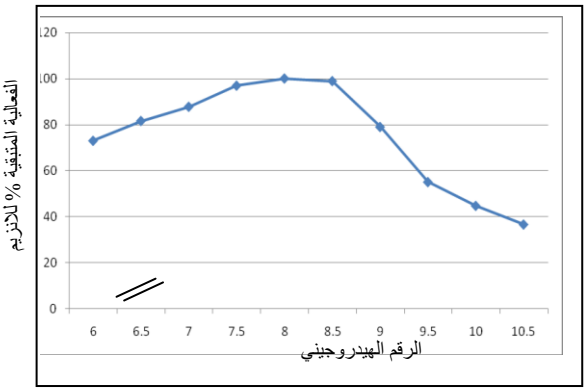
شكل (3) فعالية انزيم الستافيلولايسين A في ارقام هيدروجينية مختلفة



شكل (4) فعالية انزيم الستافيلولايسين D في ارقام هيدروجينية مختلفة

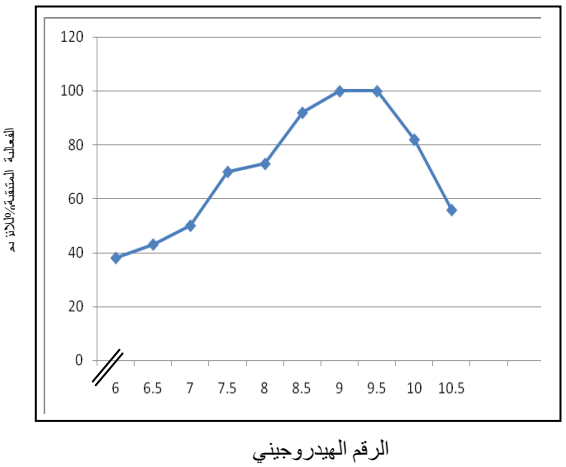
الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم الستافيلولايسين(Staphylolysin) (A و D)

أظهرت النتائج المبينة في (الشكل 5) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم الستافيلولايسين A يقع مابين (7.5- 8.5) ، اذ احتفظ الانزيم بكامل فعاليته تقريبا مع الاحتفاظ بما يقارب 88% من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 7 ، بينما انخفضت الفعالية عند الارقام الهيدروجينية القاعدية اذ احتفظ الانزيم بما يقارب بـ 45% و 37% فقط من فعاليته عند حضن الانزيم في الرقم الهيدروجيني 10 و 10.5 على التوالي.



شكل (5) ثبات انزيم الستافيلولايسين A بارقام هيدروجينية مختلفة

واظهرت النتائج المبينة في (الشكل 6) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم الستافيلولايسين D يقع مابين (8.5 – 9.5) ، اذ احتفظ الانزيم بكامل فعاليته تقريبا مع الاحتفاظ بمايقارب 82% من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 10 ، بينما انخفضت الفعالية عند وتحت الرقم الهيدروجيني المتعادل اذ احتفظ الانزيم بما يقارب 50% ، 43% ، 38% فقط من فعاليته عند حضنه في الرقم الهيدروجيني 7 ، 6.5 ، 6 على التوالي.



شكل (6) ثبات انزيم الستافيلولايسين D بارقام هيدروجينية مختلفة

يفسر انخفاض ثبات الانزيم عند بعض الارقام الهيدروجينية بحصول تغير في تركيبه الثانوي او الثالثي او الرابعي مما يعرض معظم الانزيمات الى تغيرات لاعكسية (Irreversible) عند تعرضها الى الظروف الحامضية او القاعدية[20].

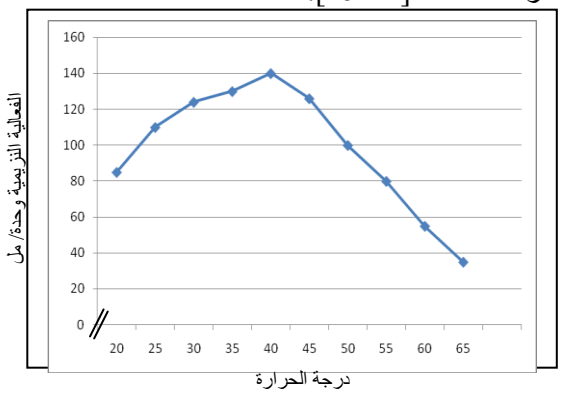
وقد ذكر [20] ان فعالية الانزيم وثباته تتاثر سلبا او ايجابا بعدد من العوامل المهمة مثل: الرقم الهيدروجيني ، والقوة الايونية ، ودرجة الحرارة ، وتركيز الانزيم ، وكذلك مادة التفاعل.

تأثير درجة الحرارة في فعالية أنزيم الستافيلولايسين (Staphylolysin) A و D

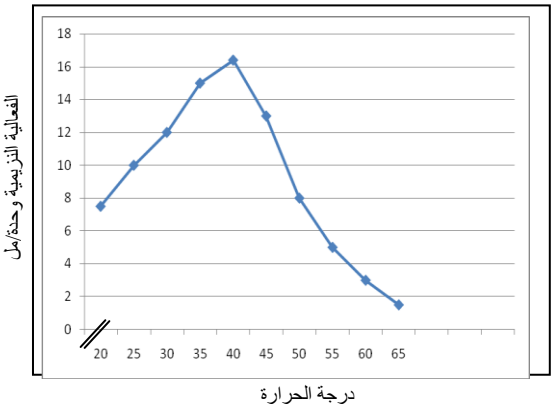
اظهرت نتائج دراسة تأثير درجة الحرارة في فعالية انزيم الستافيلولايسين (Staphylolysin) A و D ان الفعالية الانزيمية تزداد بارتفاع درجة الحرارة ، اذ بلغت اعلى فعالية للستافيلولايسين A و D عند 40 مئوية (شكل 7 ، 8) في حين معظم الدراسات اشارت الى ان اعلى فعالية للستافيلولايسين (Staphylolysin) D,A تكون عند درجة حرارة 37م [23].

ثم بدأت بعدها الفعالية بالانخفاض تدريجيا ، ويعود هذا الانخفاض الى حدوث مسخ في التركيب الثلاثي للبروتين نتيجة تأثير الحرارة ، وتغير تركيب الموقع الفعال للانزيم ، مما يؤدي الى عدم ملائمته للارتباط والتفاعل مع المادة الاساس وعندها تنخفض سرعة التفاعل[24].

ان ازدياد الفعالية الانزيمية مع ازدياد درجة الحرارة يشير الى ان الزيادة في درجة الحرارة تؤدي الى زيادة في الطاقة الحركية للانزيم والمادة الاساس التي تؤدي الى تصادم احداهما بالاخر ومن ثم تكوين معقد ارتباط الانزيم بالمادة الاساس ، وبذلك يزيد من تحفيز التفاعل الكيميائي و زيادة سرعة التفاعل [22،25].



شكل (7) فعالية انزيم الستافيلولايسين A في درجات حرارية مختلفة

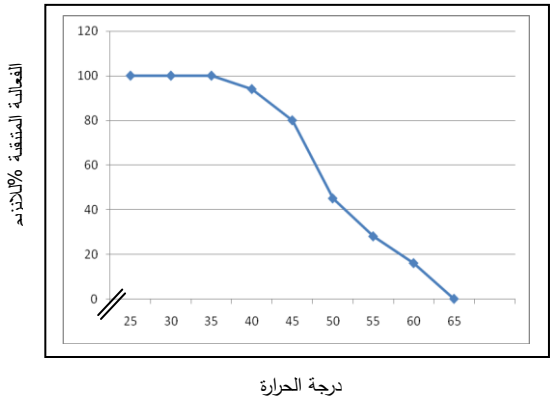


شكل (8) فعالية انزيم الستافيلولايسين D في درجات حرارية مختلفة

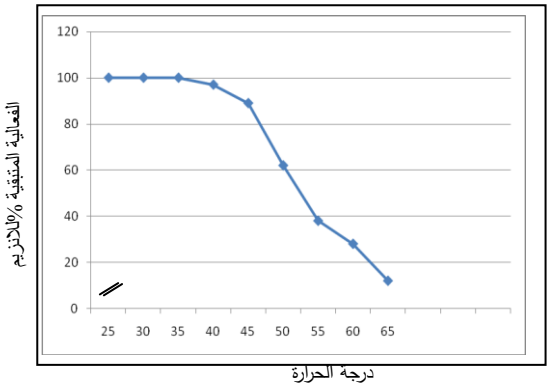
الثبات الحراري لانزيم الستافيلولايسين (Staphylolysin)

اظهرت نتائج الثبات الحراري لانزيمي الستافيلولايسين (Staphylolysin) A و D احتفاظ الستافيلولايسين A بكامل فعاليته تقريبا عند حضنه بدرجة حرارة 25 – 40م لمدة ساعة ، بينما انخفضت فعاليته وبشكل واضح مع ارتفاع درجة الحرارة ، اذ احتفظ الانزيم بما يقارب 45% من فعاليته عند حضنه للمدة نفسها بدرجة 50م . وفقد الانزيم حوالي 84% من فعاليته عند درجة 60م (شكل 9) . كما واظهرت النتائج احتفاظ الستافيلولايسين D بكامل فعاليته تقريبا عند حضنه بدرجة حرارة 25 – 40م لمدة ساعة ،وانخفضت فعاليته بارتفاع درجة الحرارة ، اذ احتفظ الانزيم بما يقارب 62% من فعاليته عند حضنه للمدة نفسها بدرجة حرارة 50م وفقد حوالي 72% من فعاليته عند درجة 60م (شكل 10).

ان ارتفاع درجات الحرارة اعلى من 50م يؤدي الى تفكك الاواصر المختلفة في الانزيم التي تكون مسؤولة عن ثبات بناء الانزيم ، وهذا يؤدي الى مسخ جزيئة الانزيم [26].



شكل (9) الثبات الحراري لانزيم الستافيلولايسين A عند حضنه بدرجات حرارية مختلفة



شكل (10) الثبات الحراري لانزيم الستافيلولايسين D عند حضنه بدرجات حرارية مختلفة

تأثير بعض المركبات الكيميائية في فعالية انزيم الستافيلولايسين(Staphylolysin)
يبين (جدول 1) وجود تباين في تاثير الايونات الفلزية في فعالية الستافيلولايسين Staphylolysin () A و D .كما واظهرت النتائج الزيادة في فعالية الستافيلولايسين D عند حضنه مع 1 ملي مولار من كلوريد الصوديوم والبوتاسيوم ، اذ بلغت الفعالية المتبقية للانزيم 110 و 113% على التوالي وعند زيادة التركيز الى 5 ملي مولار ارتفعت الفعالية المتبقية الى 114 و 118% على التوالي . كما كان لكلوريد المغنيسيوم والكاليسيوم تنشيطا واضحا لفعالية الانزيم عند التركيزين فبلغت الفعالية المتبقية عند التركيز 1 ملي مولار 115 و 111% على التوالي ،وارتفعت بزيادة التركيز الى 5 ملي مولار لتبلغ 123 و 120% على التوالي.
تميزت كلوريدات الحديد والزئبق والخارصين بفعل تثبيطي في فعالية الانزيمين وبنسب متفاوتة والذي ممكن ان يعزى الى تاثير تلك الايونات الفلزية في التركيب الثلاثي للانزيم او في الموقع الفعال عن طريق تكوين معقدات مما ينتج عنه فقدان الانزيم لفعاليته لحدوث تثبيط لاعكسي[20].
في حين لوحظ ان لايونات الصوديوم والبوتاسيوم تاثيرا منشطا في فعالية الانزيمين وربما يعود هذا التنشيط الى ان هذه الفلزات تؤثر في تركيب الانزيم والمادة للاساس بطريقة تجعلها اكثر الفة للارتباط بالمادة الاساس ، وتكوين معقد الانزيم - المادة الاساس.لاحظ [6] في دراستهم ان $Zncl_2$ يكون ذا تاثير تثبيطي في فعالية انزيم الستافيلولايسين A عندما يكون بتراكيز اعلى من 10 مايكرو مولار، في حين لا تتطلب ايونات الكالسيوم لثبات وفعالية الانزيم.واظهر تأثير بعض العوامل المختزلة والكلابية في فعالية انزيم الستافيلولايسين (Staphylolysin) Aو D ثبات فعالية الانزيمين عند معاملتهم بمادة EDTA بتركيز 10 ملي مولار اذ بلغت الفعالية المتبقية 100% (جدول 1) ، تعد هذه المادة عامل مخلبي (Chelating factor) ومن مثبطات الانزيمات المعدنية (metallo enzymes) الا انها ليس لها تأثير تثبيطي في انزيم الستافيلولايسين D,A عندما تكون بتركيز اقل من 25 ملي مولار والسبب يعود الى ان انزيمي الستافيلولايسينDوA لهما الفة عالية اتجاه الخارصين الموجود في الموقع الفعال فهذا الايون ضروري جدا لفعالية الانزيم و ربما يكون مكوناً للانزيم الناضج وكذلك لان هذا الايون يكون محميا بفعل موقعه الى داخل جزيئة الانزيم [9] لذلك يحتاج تراكيز عالية من العامل المخلبي ليتمكن من سحبه واحداث التثبيط لذلك عند استعمال EDTA بتركيز 25 ملي مولار انخفضت الفعالية الانزيمية للستافيلولايسين D,A لتبلغ 37 ، 41% على التوالي .

واظهرت النتائج انخفاض فعالية الستافيلولايسين A و D عند حضنهم مع مركب 2- Mercaptoethanol بتركيز 5 و 10 ملي مولار اذ انخفضت فعالية الستافيلولايسن A الى 25 و 0% على التوالي، وبلغت الفعالية المتبقية للستافيلولايسين D 32 و9% على التوالي ، يعمل هذا المركب على شطر الاواصر ثنائية الكبريت (S-S) الموجودة بين السلاسل الببتيدية ذات الاهمية في المحافظة على التكوين الجزيئي الذي يتطلب لاجل الفعالية الى مجاميع ثايولية (Thiol groups)في جزيئة البروتين، وبذا تعمل هذه المادة المختزلة على تغير تركيب الانزيم ومن ثم فقدان فعاليته[27] .وهذا التثبيط يشير الى ان ايون الخارصين في الانزيم مرتبط مع S من الحامض الامينى Cysteine اذ ان الخارصين في الانزيمات المعدنية (Zn-metalloenzymes) يرتبط بالانزيم ليكون تركيب بلوري رباعي السطوح او ثلاثي الزوايا من خلال ارتباطه مع S من الحامض الامينى Cystiene او N من الحامض الامينيHistidine اوO من Aspartate او Glutamate وقد اشار[28] الى ان انزيم الستافيلولايسين يحتوي بتركيبه على اربع جزيئات Cysteine مكونه اصرتين ثنائية الكبريت ويحتوي ذرة خارصين واحدة ترتبط مع الحامض الامينيHistidine والحامض الامينى Aspartate
واظهرت النتائج احتفاظ انزيم الستافيلولايسين Aو D بفعاليتهما عند معاملتهم بمركب PMSF بتركيز 0.4، 2 ملي مولار ، في حين انخفضت فعالية الستافيلولايسين D عند التركيز 2 ملي مولار لتبلغ 90% اذ من المعروف ان هذا المركب يتفاعل مع مجموعة الهيدروكسيل للحامض الامينى السيرين(Serine) الموجود في الموقع الفعال ، وان عدم تاثر فعالية الانزيمين بهذا المركب دلالة على عدم وجود الحامض الامينى السيرين في الموقع الفعال للانزيم. هذه النتائج تعطي احتمالية ان الانزيمين هما ليس من الانزيمات الثايولية(Thiol enzymes) او السيرينية(Serine enzymes) وانهما من الانزيمات المعدنية (Zn -metallo endopeptidase) .

جدول (1) تاثير بعض المركبات الكيميائية في فعالية انزيم الستافيلولايسين (Staphylolysin (D,A

المركبات	التركيز (ملي مولار)	الفعالية المتبقية % للستافيلولايسين A	الفعالية المتبقية % للستافيلولايسين D
Control	-	100	100
NaCl	1 5	105 108	110 114
KCl	1 5	102 104	113 118
$CaCl_2$	1 5	94 98	111 120
$MgCl_2$	1 5	93 95	115 123
$FeCl_3$	1 5	90 73	54 45
$HgCl_2$	1 5	12 7	22 13
$ZnCl_2$	0.01 0.1	41 9	52 23
EDTA	10 25	100 37	100 41
2-ME	5 10	25 0	32 9
PMSF	0.4 2	100 100	100 90

المصادر:

1. Levinson, W. and Jawetz, E. (2000). Medical Microbiology & Immunology: Examination & Board Review (6th ed.). Mc Graw-Hill, Singapore.
2. Karlsson , T; Turkina,M.V.; Yakymenko,o; Magnusson, K.E.& vikstrom, E.2012. The *pseudomonas aeruginosa* N- acylhomoserine lactone quorum sensing molecules target IQGAP1 and Modulate epithelial cell migration. PLOS. Pathog.8(10):e1002953.
3. Kessler, E.; safrin, M.; oslan, J.C. and ohman, D.E. (1993). Secreted LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protese. J.Biol. chem. 268:7503-7508.
4. Park, S. and Galloway, D.R. (1998). *Pseudomona aeruginosa* Las D processes the inactive LasA precursor to the Active protease form. Biochem. Biophys. 357: 8 – 12.
5. Kessler, E. and Ohman, D.E. (1998). In handbook of proteolytic enzymes. (eds. Barrett, A.J.; Rawling, N.D. and woessner, F.). Academic press, New York.
6. - Kessler, E.; Safrin, M.; Abrams, W.R.; Rosenbloom, J. and ohman, D.E. (1997). Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. J. Biol. Chem. 272:9884-9889.
7. Vessillier, S.; Delorme, F.; Bernillon, J.; Saulnier, J. and Wallach, J. (2001). Hydrolysis of glycine-containing elastin pentapeptides by Las A Protease, a metalloelastase from *Pseudomonas aeruginosa*. Eur.J. Biochem. 268: 1049-1057.
8. Schad, P.A. and Iglewski, B.H. (1998). Nucleotide sequence and expression in Escherichia coli of the *Pseudomonas aeruginosa* LasA gene. J. Bacteriol. 170: 2784-2789.
9. - Park, S. and Galloway, D.R. (1995). Purification and characterization of Las D: Second staphylolytic proteinase produced by *Pseudomona aeruginosa*. Mol. Microbiol. 16:263 - 270.
10. Kessler, E.; Safrin, M.; peretz, M. and Burstein, Y. (1992). Identification of cleavage sites involved in protolytic processing of *Pseudomonas aeruginosa* preproelastase. FEBS Lett. 299: 291-293.
11. Barequet, I.S.; Ben Simon, G.J.; Safrin, M.; Ohman, D.E. and Kessler, E. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* Las A protease in treatment of Experimental Staphylococcal keratitis. Antimicrob. Agents chemother. 48(5): 1681-1687.
12. Najim, Sh.S.; Flaih, M. T. (2013). Extraction and Purifications of staphylolysin produced by pseudomonas aeruginosa. Iraqi Journal of science [under published].
13. Diggle, S.P.; Winzer, K.; Lazdunski, A.; Williams, P. and Camara, M. (2002). Advancing the quorum in pseudomonas aeruginosa: mva T and the regulation of N-acetyl homoserine Lactone production and virulence gene expression. J. Bacteriol. 184 (10): 2576-2586.

for *Pseudomonas aeruginosa* LasA protease (staphylolysin) using a two-stage enzymatic reaction. 328:225-232.
22. Tortora, G.J.; Funke, B.R. and case, C.L. (2004). Microbiology. (8th ed). Pearson Education, Inc. San Francisco. New York.
23. Kita, K.; Sueyoshi, N.; Okino, N.; Inagaki, M.; Ishida, H.; Kiso, M.; Imayama, S.; Nakamura, T. and Ito, M. (2002). Activation of bacterial ceramidase by anionic glycerophospholipids: possible involvement in ceramide hydrolysis on atopic skin by pseudomonas ceramidase. J. Biochem. 362: 619-626.
24. Segal, I.H. (1976). Biochemical calculation. John wiley and Sons, Inc. New York.
25. Whitaker, J.R. and Bernhard, R.A. (1972). Experiments for: An Introduction to Enzymology, the Whiber press.
26. -Rodwell, V.W. (1996). Structures and function of protein and enzymes. In: Biochemistry. 24th ed. (eds. Murray, R.K.; Granner, D.K. and Rodwell, V.W.). Prentis-Hall of international INC. USA. 13 – 92.
27. Engel, L.E.; Hill, J.M.: Caballero, A.R.; Green, L.C. and O'Callaghan, R.J. (1998). Protease IV, a unique Exrtacellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 273 (27):16792-16797.
28. Kessler, E and Ohman, D.E. (2013). Staphylolysin. In :Hand Book of Proteolytic Enzymes(Rawlings,N. D. and Salvesen, G.S. eds.). Vol. 1 . 3rd edition. P:1553-1558.Elsevier, UK.
14. Gustin, J.K.; Kessler, E. and ohman, D.E. (1996). A substitution at His-120 in the Las A protease of Pseudomonas aeruginosa Blocks enzymatic Activity without Affecting propertiede processing or Extracellular Secretion. J.Bacteriol. 178 (22): 6608-6617.
15. Folders, J.; Tommassen, J.; vanloon, L.C. and Bitter, w. (2000). Identification of a chitin-Binding protein Secreted by Pseudomonas aeroginosa. J. Bacteriol. 182 (5): 1257-1263.
16. Garfin, D.E. (1990). Purification procedure: electrophoretic methods. In: Methods in Enzymology. (ed. Deutscher, M.P.). vol.182:425 – 441; Academic press, New York.
17. Karadzic, I.; Masui, A. and Fujiwara, N. (2004). Purification and characterization of a protease from Pseudomonas aeruginosa Grow in cutting oil. J. Biosci. Bioeng. 98 (3): 145-152.
18. - Olson, J.C. and Ohman , D.E. (1992). Efficient production and processing of Elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* Require zinc and calcium Ions. J. Bacteriol. 174 (12): 4140 - 4147.
19. Braun, P.; de Groot, A.; Bitter, W. and Tommasen, J. (1998). Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa* .J. Bacteriol. 180:3467-3469.
20. Whitaker, J.R. (1972). Principle of Enzymology for the food science. New York . P. 481-501.
21. Kessler, E.; Safrin, M.; Blumberg, S. and Ohman, D.E. (2004). Acontinous spectrophotometric assay

Study of Some Physical and Chemical Properties of Staphylolysin Enzyme purified from *Pseudomonas aeruginosa*

Shayma'a S. Najim* ***May T. Flaih****

*Department of Biology / College of Science / University of Baghdad. Baghdad -Iraq

Abstract:

Some of the characters of the Staphylolysin A and D enzymes purified from *Pseudomonas aeruginosa* P_{16} and P_5 respectively were studied, the molecular weights of Staphylolysin A and D were 20.417 kilo dalton and 23.988 kilo Dalton respectively by SDS- polyacryl amide gel electrophoresis. The optimum pH for staphylolysin A activity was found to be 8 which gives higher activity reaches 150 unit/ml, and for enzyme stability was 7.5-8.5 in which the enzyme nearly retained its full activity, while it was 9.5 for staphylolysin D that gives higher activity of 16 unit/ml,and 8.5-9.5 for enzyme stability in which the enzyme nearly retained its full activity, Maximum activity of two enzymes was obtained at 40C in which the specific activity for staphylolysin A and D were 140 and 16.4 unit/ml, and the two enzymes remained approximately without change at 25-40C for one hour.

When the effects of some materials on Staphylolysin A&D activity were studied, the results showed that both sodium chloride & potassium chloride at 1 & 5 mM had the activator effect on enzymatic activity compared with its control where the staphylolysin A and D retained 105% ,108% and 102%, 104% of their activity respectively when treated with sodium chloride, while they retained 110%, 114% and 133%, 118% of their activity respectively when treated with potassium chloride.

The enzymatic activity for both enzymes were inhibited when treated with ferric , mercury and zinc chloride at variable ratios, Staphylolysin A kept 73% and 7% of its initial activity respectively when treated with 5mM of ferric chloride and mercury chloride respectively and it kept only 9% of its initial activity when treated with 0.1mM Zinc chloride .

Staphylolysin D kept 45% and 13% of it is initial activity respectively when treated with 5mM of ferric chloride and mercury chloride respectively and it kept only 23% of its initial activity when treated with 0.1mM Zinc chloride while enzymatic activity for both enzymes were not affected when treated with EDTA at l0mM and phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF) at 0.4mM.These results referred to that Staphylolysin A and D are Zn -metallo endopeptidase .