

شناسایی یک پپتید جدید مهار کننده آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین-۱ استخراج شده از هیدرولیزات پروتئین‌های سفیده تخم شترمرغ

مسعود همایونی تبریزی^۱، دکتر احمد آسوده^۲، دکتر محمدرضا عباسزادگان^۳، دکتر خدیجه شاهرخ‌آبادی^۴،
دکتر محبوبه نخعی مقدم^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: از آن جا که داروهای سنتزی ضد فشار خون دارای اثرات جانبی است، استخراج پپتیدهای ضد فشار خون از منابع طبیعی فاقد اثرات جانبی مورد نیاز است. هدف از این تحقیق، شناسایی پپتید حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های تخم شترمرغ و مطالعه اثرات مهار کنندگی آن بر آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین-۱ بود.

روش‌ها: هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های تخم شترمرغ با استفاده از آنزیم‌های پپسین و پانکراتین انجام شد. سپس فرکشن‌ها با استفاده از کروماتوگرافی تحت فشار بالا جدا شدند و توالی پپتید با استفاده از اسپکتروفتومتری جرمی شناسایی شد و فعالیت مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین-۱ و پارامترهای کینیتیک سنجش شد. آنالیز داکینگ مولکولی و پارامترهای برهمکنش پپتید ۱۰-DG با آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین-۱ محاسبه شد.

یافته‌ها: نتایج تعیین توالی نشان داد که پپتید خالص شده با نام ۱۰-DG دارای توالی DAESLSRLLG و وزن ملکولی ۱۰۶۰/۱۸ Da است. این پپتید دارای فعالیت بالای مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین-۱ با $IC_{50} = 0/133 \text{ mg/ml}$ در غلظت نهایی $0/159 \text{ mg/ml}$ به دست آمد. منحنی لینوربرک مربوط به پپتید ۱۰-DG نشان داد که مکانیسم مهار از نوع غیر رقابتی است. برهمکنش ملکولی و انرژی اتصال پپتید با آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین-۱ با داکینگ بررسی شد.

نتیجه‌گیری: پپتید ۱۰-DG جدا شده از پروتئین‌های تخم شترمرغ، دارای فعالیت مهار کننده آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین-۱ است.

واژگان کلیدی: آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین-۱، پروتئین‌های سفیده تخم شترمرغ، پپتید

ارجاع: همایونی تبریزی مسعود، آسوده احمد، عباسزادگان محمدرضا، شاهرخ‌آبادی خدیجه، نخعی مقدم محبوبه. شناسایی یک پپتید جدید مهار کننده آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین-۱ استخراج شده از هیدرولیزات پروتئین‌های سفیده تخم شترمرغ. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۱): ۱۴۹۶-۱۵۰۸

مقدمه

بیماری‌های قلبی-عروقی را کاهش می‌دهد (۱).
تنظیم فشار خون توسط سیستم رنین-آنژیوتانسین
صورت می‌گیرد که نقش کلیدی در کنترل فشار خون

فشار خون بالا، منجر به بروز بیماری‌های قلبی-
عروقی می‌شود و درمان فشار خون بالا خطرات

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- استاد، گروه ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی و مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

این پپتیدها ممکن است نقش‌های متنوعی شامل شبه-افیونی، اتصال مواد معدنی، تعدیل ایمنی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانت، ضد انعقادی، کاهش کلسترول و کاهش دهنده‌ی فشار خون داشته باشند. بسیاری از پپتیدهای فعال زیستی شناخته شده چند عملکردی هستند و می‌توانند بیش از یک اثر زیستی داشته باشند و به عنوان ترکیبات غذاهای فعال یا مواد مغذی مورد استفاده قرار گیرند (۷-۱۰).

به هر حال، پروتئین‌های سفیده‌ی تخم شترمرغ می‌تواند منبع اصلی برخی از پپتیدهای فعال زیستی باشد. تا زمان اجرای پژوهش، تحقیقی در این زمینه انجام نشده بود. هدف از این تحقیق، شناسایی پپتید مهار کننده‌ی آنزیم آنژیوتانسین-۱ حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های سفیده‌ی تخم شترمرغ با پپسین و پانکراتین است.

روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل آنزیم پپسین و پانکراتین، ۲ و ۳-N فوریل اکریلوئیل فیل آلانین گلاسیل گلاسیلین (FAPGG یا ۲-N-۳-N-Furyl acryloyl-L-phenylalanyl glycyl glycine)، از شرکت سیگما-آلدیش آمریکا و استونیتریل از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ از ریه‌ی شترمرغ استفاده شد.

تهیه‌ی هیدرولیزات: برای این منظور، هضم پروتئین‌های سفیده‌ی تخم شترمرغ با استفاده از آنزیم‌های پپسین و پانکراتین انجام شد (۱۱). عصاره‌ی پروتئین‌های سفیده‌ی تخم شترمرغ در بافر سدیم فسفات در pH بهینه‌ی آنزیم ۵ بار رقیق‌سازی شد. سپس به پروتئین رقیق شده به نسبت ۱/۲۰

دارد. آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ (دی پپتیدیل کربوکسی کیناز-۱، کیناز-۲ EC۳/۴/۱۵/۱)؛ ACE یا Angiotensin-converting enzyme) متعلق به کلاس متالوپروتئازها است (۲). این آنزیم برای عملکرد خود به روی و کلر نیاز دارد. آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ (ACE) فشار خون سرخرگ و تعادل آب و نمک بدن را تنظیم می‌کند و همچنین نقش کلیدی در سیستم رنین-آنژیوتانسین دارد. ACE هورمون آنژیوتانسین-۲، یک منقبض قوی کننده‌ی عروق (DRVYIHPF) را از یک پروهورمون غیر فعال آنژیوتانسین-۱ (DRVYIHPFHL) تولید می‌کند. کاهش آنژیوتانسین-۲ در جریان خون سبب کاهش فشار خون می‌شود.

داروهای سنتزی زیادی شامل کاپتوپریل، آنالاپریل، لیزینوپریل و لوسارتان وجود دارد، اما دارای اثرات منفی بسیاری مانند سرفه‌های خشک، هایپرکالمی و افت شدید فشار خون هستند. پپتیدهای مهار کننده‌ی آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱، فاقد اثرات جانبی است (۳). این گونه پپتیدها در شیر، تخم مرغ، گوشت و ماهی‌ها و همچنین در گیاهان یافت می‌شوند (۴-۵). پپتیدهای فعال زیستی در توالی پروتئین والد خود غیر فعال هستند و می‌توانند به وسیله‌ی هیدرولیز آنزیمی در طی هضم معدی-روده‌ای یا در طی پردازش غذایی آزاد شوند (همانند کامل شدن پنیر و تخمیر شیر). به طور معمول ۲ تا ۲۰ اسید آمینه طول دارند. به دنبال هضم، پپتیدهای فعال زیستی می‌توانند از طریق روده وارد گردش خون شوند و اثر سیستماتیک خود را اعمال کنند، یا اثری موضعی در مجرای معدی-روده‌ای ایجاد کنند (۶). خصوصیت ساختاری و ترکیب آمینواسید و توالی

۹۵ درصد آب و ۵ درصد استونیتریل باز گشت. طی این مدت، سرعت جریان حلال مورد استفاده برابر با ۲ ml بر دقیقه بود. فراکشن‌های مختلف پس از جمع‌آوری، با فریز درایر خشک شدند.

به منظور انجام فرایند تعیین توالی، محصول مورد نظر به مؤسسه‌ی بین‌المللی پروتئومیکس "Pty Ltd" واقع در سیدنی استرالیا ارسال شد. این فرایند با روش طیف‌سنجی جرمی مالدی-تاف (MALDI-TOF mass spectrometry) صورت گرفت.

سنجش فعالیت مهارى آنزیم تبدیل کننده‌ی

آنژیوتانسین-۱ و تعیین IC_{۵۰}

سویسترای FAPGG در طول موج ۳۴۰ nm دارای بیشترین جذب می‌باشد. این ماده سویسترای مخصوص آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین (ACE) محسوب می‌شود و تحقیقات زیادی روی آن انجام شده است. در زمانی که فقط آنزیم و سویسترا در محیط باشند (ماده‌ی مهارى دیگری وجود نداشته باشد)، این سویسترا در جایگاه فعال آنزیم قرار می‌گیرد و جذب آن در ناحیه‌ی ۳۴۰ nm کمتر می‌شود. حال اگر پپتیدی در سیستم حضور داشته باشد، این پپتید می‌تواند در اشغال جایگاه با سویسترا رقابت کند. در نتیجه، سویسترا بسته به میزان فعالیت پپتید مهار کننده، می‌تواند در محیط به شکل آزاد، باقی بماند و کاهش جذب آن در زمان مشخص کمتر اتفاق افتد.

روش انجام این آزمایش به صورت زیر بود. در ابتدا ۲۲ µl آنزیم تبدیل آنژیوتانسین با غلظت ۵۰ mU/ml، ۱۰۰ µl نمونه‌ی پپتیدی با غلظت‌های ۰/۱۵۶، ۰/۰۳۹، ۰/۰۷۸، ۰/۱۵۶ و ۰/۳۱۲ mg/ml، ۱۰۰ µl سویسترای FAPGG با غلظت ۰/۵ mM و

(آنزیم به سویسترا، وزنی/وزنی) آنزیم پیسین در pH حداکثر ۲/۵ اضافه شد. در این لحظه، هیدرولیز پروتئین توسط پیسین شروع شد و به مدت ۱۲۰ دقیقه در انکوباتور در دمای ۳۷ °C قرار گرفت تا پروتئین به هیدرولیزات خود تبدیل شود. سپس به مخلوط واکنش برای هضم بیشتر ابتدا pH مخلوط را به ۷/۵ رسانده شد و آنزیم پانکراتین رابه نسبت ۱/۲۰ (وزنی/وزنی آنزیم به سویسترا) اضافه شد. پس از اتمام زمان هیدرولیز، محلول برای ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار گرفت تا فعالیت آنزیم متوقف شود. سپس سوسپانسیون حاصل در ۸۰۰۰ rpm دور در دقیقه برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی به عنوان هیدرولیزات جداسازی شد. سپس با کمک دستگاه اولترافیلتراسیون با غشای ۳۰۰۰ Da، پپتیدهای کوچک‌تر از این محدوده تهیه شد. فرایند جداسازی پپتیدها طی چند مرحله انجام شد. در هر مرحله برای انجام فرایند کروماتوگرافی بر روی هیدرولیزات، از ستون C-۱۸ مخصوص جداسازی نیمه کمی استفاده شد. برای این منظور دو حلال آب و استونیتریل مورد استفاده قرار گرفت که حاوی ۰/۱ درصد تری‌فلوئورو استیک اسید (TFA یا Trifluoroacetic Acid) در هر حلال بودند. همچنین نمونه هر بار با غلظت ۳۰ mg/ml در آب تهیه و به دستگاه تزریق شد. فرایند تفکیک پپتیدها در شیب غلظت متغیری از دو حلال نسبت به زمان صورت گرفت. به گونه‌ای که درصد ترکیب دو حلال در زمان شروع فرایند تا دقیقه‌ی پنجم، شامل ۹۵ درصد آب و ۵ درصد استونیتریل بود. این ترکیب طی مدت ۴۰ دقیقه به ۶۰ درصد آب و ۴۰ درصد استونیتریل رسید و سپس طی مدت ۱۵ دقیقه بار دیگر به وضعیت اول یعنی

۰/۰۴۶، ۰/۰۹۳ و ۰/۱۸۷) انجام شد. نمونه‌های مورد سنجش شامل ۲۲ μl آنزیم ACE، ۵۰ μl سوپسترا (با غلظت‌های مختلف)، ۵۰ μl پپتید (با دو غلظت متفاوت ۰/۰۴۶ mg/ml و ۰/۰۹۰) و ۲۰۰ μl بافر ACE است. فعالیت آنزیم در حضور پپتید (با دو غلظت متفاوت) و غیاب پپتید سنجیده شد (۱۳).

محاسبه‌ی پارامترهای سینتیکی

ثابت میکائیلیس - منتن (Michaelis-Menten) (K_m) و سرعت بیشینه‌ی فرایند کاتالیز شده‌ی آنزیمی (V_{max}) با رسم نمودار Lineweaver-Berk (نمودار معکوس سرعت بیشینه در برابر معکوس غلظت‌های مختلف سوپسترا) قابل محاسبه است. همچنین پارامترهای سینتیکی K_i (ثابت مهار کننده برای اتصال مهار کننده به آنزیم آزاد) با رسم نمودار ثانویه (نمودار Dixon) محاسبه شد.

آنالیز داکینگ مولکولی

برای برهمکنش پپتید ۱۰-DG و آنزیم ACE از نرم‌افزار Molegro virtual docker استفاده شد. ساختار سه بعدی آنزیم ACE از سایت PDB گرفته شد. برای محاسبه‌ی پارامترهای برهمکنش پپتید ۱۰-DG و آنزیم ACE شامل انرژی اتصال کل، انرژی بین مولکولی و انرژی الکترواستاتیک، از نرم‌افزار MOE (Molecular operating environments) استفاده شد.

یافته‌ها

در این پژوهش پروتئین‌های تخم شترمرغ با استفاده از دو آنزیم پیپسین و پانکراتین هیدرولیز شد. هیدرولیزات‌ها با استفاده از روش‌های اولترافیلتراسیون و RP-HPLC (Reversed phase- high performance liquid chromatography) جداسازی شدند. یک

۱۰۰ μl بافر آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ (تریس -۵۰ mM HCL با pH ۷/۵، کلرید سدیم ۰/۳ مولار و استات روی ۱ mM) آماده و واکنش به مدت ۲ دقیقه انجام شد.

در این آزمایش، همچنین برای سنجش فعالیت مهاری پپتید، شاهد منفی مورد نیاز بود که به این صورت ساخته شد: ۲۲ μl آنزیم مبدل آنژیوتانسین، ۱۰۰ μl سوپسترا و ۲۰۰ μl بافر استفاده شد و نتایج طبق رابطه‌ی زیر محاسبه شد (۱۲).

$100 \times \{ \text{تغییرات جذب شاهد/تغییرات جذب مهار کننده} - 1 \} = \text{درصد مهار آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱}$

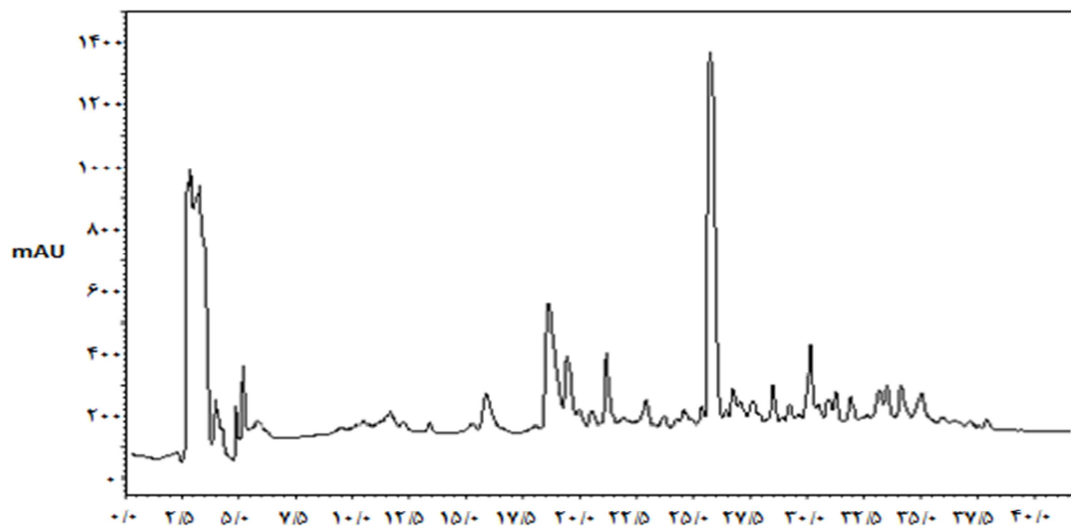
به منظور تعیین IC_{50} ، به ترتیب مخلوطی از ۶۵ μl FAPGG با غلظت ۰/۵ mM، ۵۰ μl پپتید با غلظت‌های ۰/۰۱۹، ۰/۰۳۹، ۰/۰۷۸ و ۰/۱۵۶ mg/ml، ۱۷۵ μl بافر و ۳۰ μl آنزیم ACE با غلظت ۰/۰۲۳ mg/ml به ترتیب با هم مخلوط شدند. مقادیر جذب در طول موج ۳۳۴ nm تا زمانی که تغییرات جذب به حداکثر خود نزدیک شد، ثبت گردید. درصد مهار آنزیم از رابطه‌ی پیش گفته به دست آمد و نمودار درصد مهار علیه غلظت‌های پپتید رسم شد.

تعیین الگوی مهار پپتید ۱۰-DG

الگوی مهار پپتید ۱۰-DG، با رسم منحنی Lineweaver-Berk تعیین می‌شود. با توجه به شکل نمودار Lineweaver-Berk، می‌توان الگوی مهار آنزیمی را تعیین کرد. با تعیین الگوی مهار پپتید ۱۰-DG می‌توان به چگونگی برهمکنش آن‌ها با آنزیم پی برد. آزمایش‌های سینتیکی در پنج غلظت مختلف سوپسترای FAPGG (۰/۰۱۱ mM، ۰/۰۲۳،

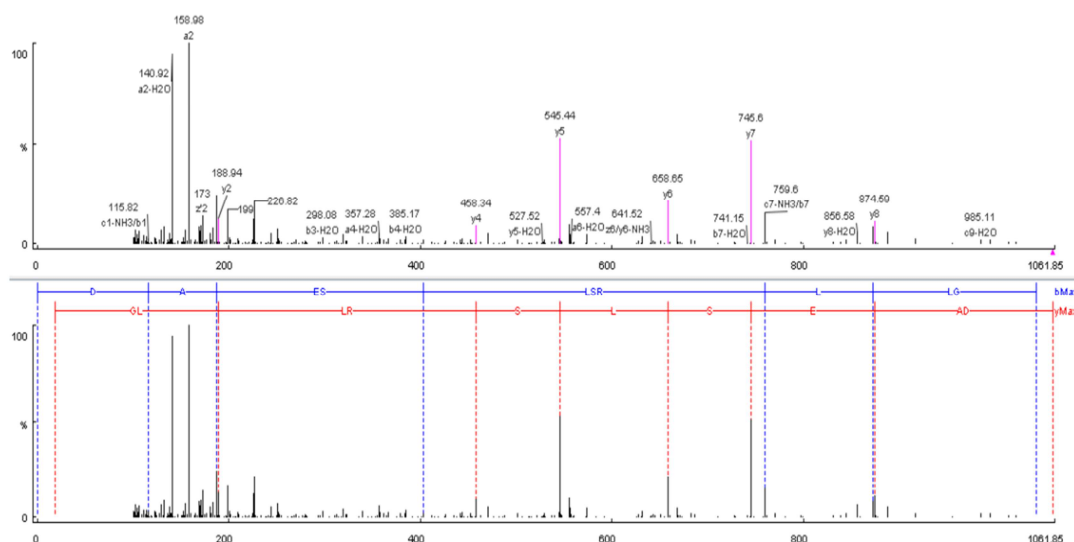
خالص به روش MALDI-TOF mass spectrometry تعیین توالی شد؛ توالی پپتید DAESLSRLLG و ۱۰- DG نامیده شد و وزن ملکولی آن ۱۰۶۰/۱۸ Da محاسبه شد (شکل ۲).

قطعه‌ی پپتیدی با بیشترین مقدار سطح زیر پیک RP-HPLC خالص‌سازی شد (شکل ۱). به منظور دستیابی به پپتیدهای خالص‌تر، این قطعه‌ی پپتیدی بار دیگر با روش RP-HPLC خالص‌سازی شد. پپتید



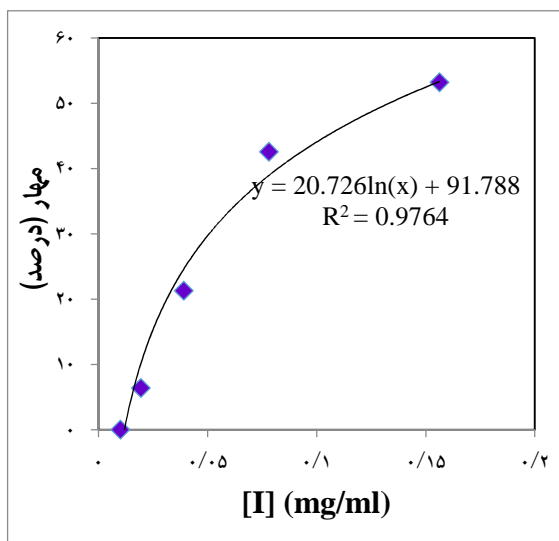
شکل ۱

شکل ۱. کروماتوگرام‌های RP-HPLC (Reversed phase- high performance liquid chromatography) هیدرولیزات پروتئین‌های سفیده‌ی تخم شترمرغ با آنزیم‌های پپسین و پانکراتین. پیک اصلی خارج شده در دقیقه‌ی ۲۶ جمع‌آوری و توالی پپتید آن با کمک طیف‌سنجی جرمی تعیین شد



شکل ۲. طیف اسپکتروفتومتری جرمی پپتید خالص شده (بالا). جرم قطعات ایجاد شده از پپتید اولیه ۱۰-DG (پایین) تفسیر نتایج جرمی و تعیین توالی پپتید ۱۰-DG

حضور غلظت‌های مختلف پپتید مهار کننده‌ی شیب، عرض از مبدأ ثابت و طول از مبدأ نمودار کاهش می‌یابد که این مؤید مهار غیر رقابتی است. ثابت مهار کننده برای اتصال به آنزیم آزاد (K_i) با رسم نمودار ثانویه محاسبه شد که برابر با 0.25 mg/ml به دست آمد (شکل ۵).

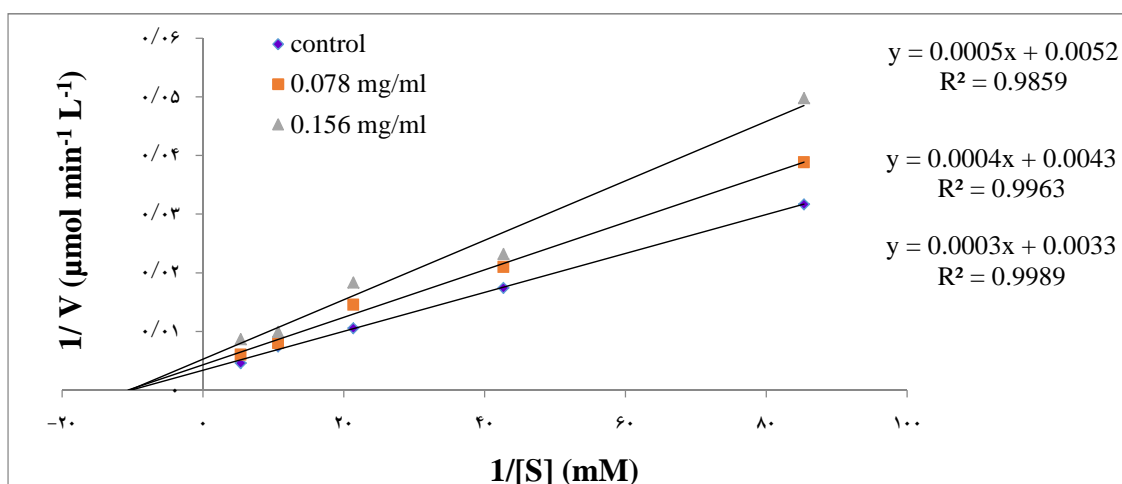


شکل ۳. تعیین مقدار IC_{50} پپتید DG-10 در مهار آنزیم ACE (Angiotensin-converting enzyme)

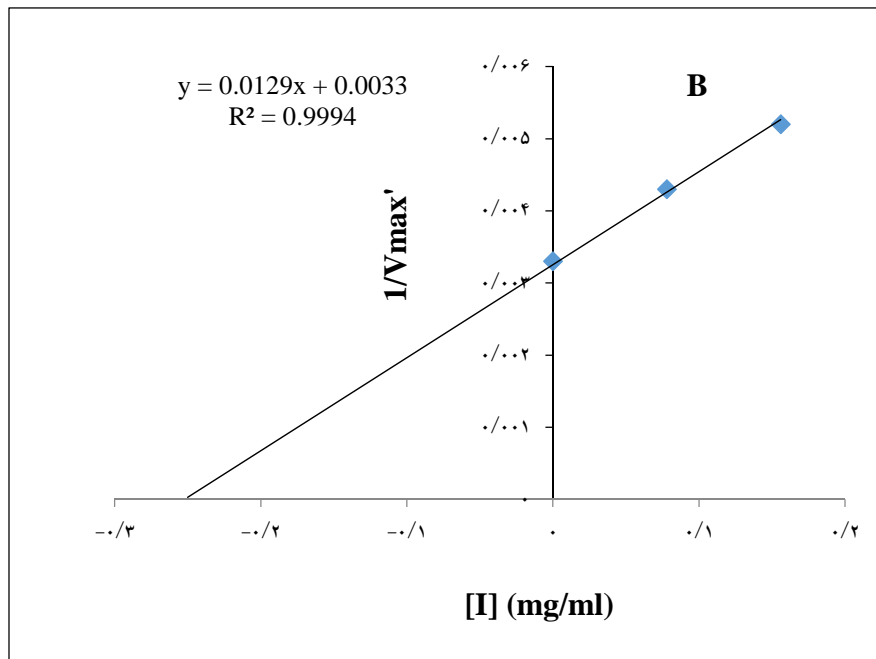
فعالیت مهار ACE در *In vitro* تعیین شد. IC_{50} غلظت مورد نیاز برای مهار ۵۰ درصد فعالیت آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ تعریف می‌شود. شکل ۳ فعالیت مهار پپتید DG-10 را نشان می‌دهد. در غلظت فعالیت مهار ۵۳/۱۹ درصد و میزان IC_{50} 0.133 mg محاسبه شد. برای تعیین الگوی مهار پپتید DG-10، با رسم نمودار Lineweaver-Berk الگوی مهار آنزیمی تعیین شد.

الگوی مهار پپتید DG-10 به صورت غیر رقابتی است (شکل ۴). این نوع مهار به این معنا است که پپتید مهار کننده به جایگاه فعال آنزیم متصل نمی‌شود؛ بلکه به جایگاهی غیر از جایگاه فعال آنزیم اتصال می‌یابد.

تعیین پارامترهای سینتیکی مهار آنزیم: برای تعیین پارامترهای سینتیکی مهار آنزیمی (K_m ، V_{max} و K_i) از نمودارهای Lineweaver-Berk و نمودارهای ثانویه (Dixon) استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد که در نمودارهای Lineweaver-Berk در غیاب و در



شکل ۴. نمودار Lineweaver-Berk برای تعیین الگوی مهار پپتید DG-10 در فعالیت آنزیم ACE (Angiotensin-converting enzyme). فعالیت آنزیم در غیاب پپتید و در حضور دو غلظت متفاوت پپتید، 0.155 mg/ml و 0.310 mg/ml تعیین شده است. نمودار Lineweaver-Berk الگوی مهار غیر رقابتی را برای این پپتید نشان می‌دهد



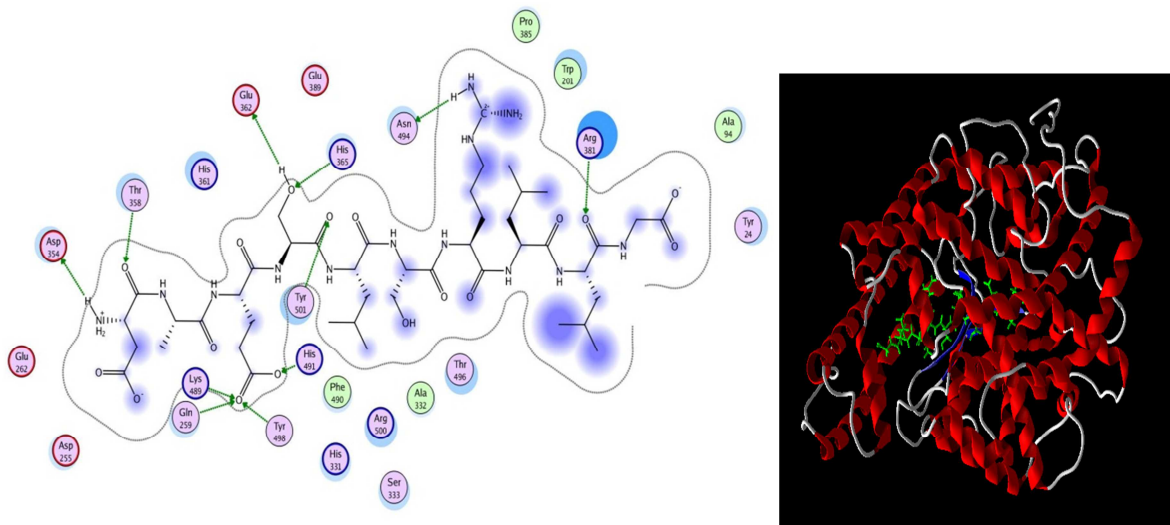
شکل ۵. نمودار ثانویه برای مهار غیر رقابتی توسط پپتید ۱۰-DG. با رسم این نمودارهای ثانویه ثابت اتصال مهار کننده به آنزیم آزاد (K_i) به دست آمد. K_i از طول از مبدأ نمودار شیب نمودار در برابر غلظت‌های مختلف مهار کننده محاسبه می‌شود

هیستیدین ۴۹۱، لیزین ۴۸۹ و گلوتامین ۲۵۹، برهمکنش می‌کند. این اسیدهای آمینه می‌توانند شامل برهمکنش الکترواستاتیک و هیدروژنی باشند.

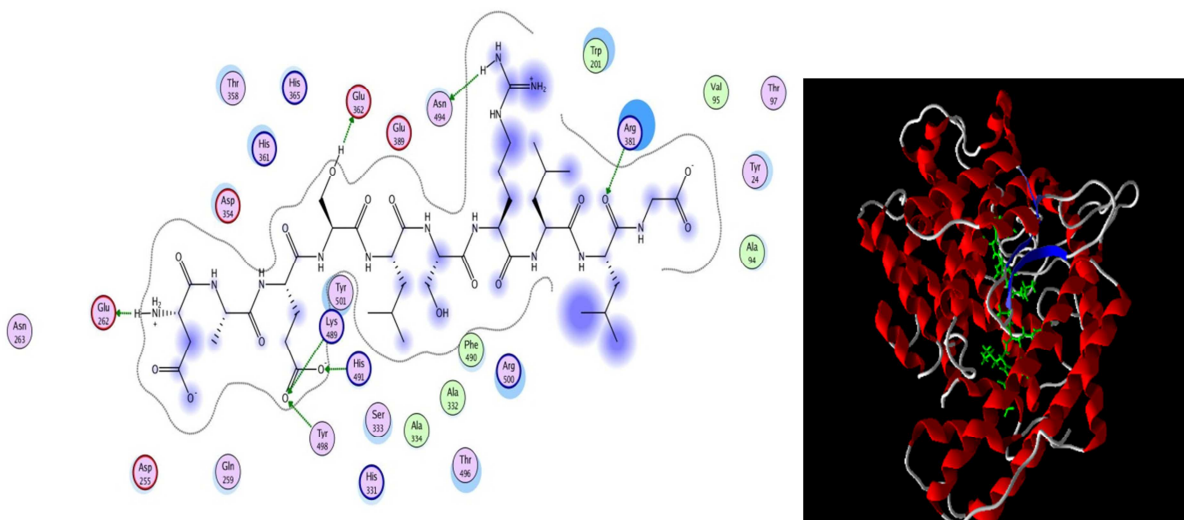
شکل ۷ در مکان اتصال C-دمین با برخی از اسیدهای آمینه شامل آرژنین ۳۸۱، آسپاراژین ۴۹۴، گلوتامیک اسید ۳۶۲، گلوتامیک اسید ۲۶۲، تیروزین ۴۹۸، هیستیدین ۴۹۱ و لیزین ۴۸۹ برهمکنش می‌کند. این اسیدهای آمینه می‌توانند شامل برهمکنش الکترواستاتیک و هیدروژنی باشند.

جدول ۱ تمایل اتصال pK_i ، انرژی بین مولکولی و انرژی اتصال انرژی الکترواستاتیک بین پپتید ۱۰-DG و آنزیم ACE نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد باقی مانده‌ی اسیدهای آمینه شامل گلوتامیک اسید، لوسین و گلايسین در پپتید ۱۰-DG در اتصال آنزیم ACE نقش دارد.

نتایج نشان داد که پپتید ۱۰-DG فعالیت بالای مهار آنزیم ACE دارد. برای تأیید آزمایش داکینگ مولکولی انجام شد. آزمایش‌های داکینگ با کنفورماسیون پایدار پپتید ۱۰-DG انجام شد. آنزیم ACE یک زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی تکی شامل ۶۲۵ اسید آمینه در دو دمین شامل ۲۹۲-۱، دمین دوم شامل ۶۲۳-۲۹۳ و آنزیم بیشتر از آلفا هلیکس و مقدار کمی صفحات بتا می‌باشد. شکل‌های ۶ و ۷ داکینگ مولکولی و نیروی برهمکنش پپتید ۱۰-DG و آنزیم ACE را نشان می‌دهند. بهترین درجه‌ی داکینگ ۲۲۸/۲۷۷- در بین ۱۰ ران داکینگ به دست آمد. شکل ۶ پپتید در مکان اتصال N-دمین با برخی از اسیدهای آمینه شامل آرژنین ۳۸۱، آسپاراژین ۴۹۴، هیستیدین ۳۶۵، گلوتامیک اسید ۳۶۲، ترئونین ۳۵۸، آسپارتیک اسید ۳۵۴، تیروزین ۵۰۱، تیروزین ۴۹۸



شکل ۶. نقشه‌ی برهمکنش‌های پپتید ۱۰-DG و N-دومین آنزیم ACE (Angiotensin-converting enzyme) (بالا) و نمایش کلی برهمکنش پپتید-آنزیم (پایین)



شکل ۷. نقشه‌ی برهمکنش‌های پپتید ۱۰-DG و C-دومین آنزیم ACE (Angiotensin-converting enzyme) (بالا) و نمایش کلی برهمکنش پپتید-آنزیم (پایین)

جدول ۱. تخمین مقادیر تمایل اتصال (pK_i) و انرژی اتم‌ها برای کمپلکس پپتید ۱۰-DG و آنزیم ACE (Angiotensin-converting enzyme)

pKi (μ M)	انرژی اتصال (Kcal/mol)	انرژی بین مولکولی (Kcal/mol)	انرژی پیوند هیدروژنی (Kcal/mol)	انرژی پیوند الکترواستاتیک (Kcal/mol)	سیستم
۲۲/۳۰۹	-۱۶۲/۲۱۵	۹/۲۳	-۱۵۴/۹۳	-۱۸/۷۰	DG-۱۰-دومین C
۲۳/۱۹۷	-۱۶۴/۰۵۸	۹/۲	-۱۵۵/۸۶	-۱۸/۱۲	DG-۱۰-دومین N

بحث

فشار خون بالا یکی از بیماری‌های قلبی-عروقی رایج است که حدود ۲۰-۱۵ درصد از جمعیت بالغ جهان را درگیر خود ساخته است و با خود عوارضی مانند آترواسکلروز، سکته، انفارکتوس میوکارد و آخرین مرحله‌ی بیماری کلیوی را به همراه می‌آورد. در این خصوص نقش آنزیم ACE در تنظیم فشار خون بسیار مهم است.

همان‌طور که تعادل مایعات و نمک‌ها در تنظیم فشار خون در پستانداران دارای اهمیت بالایی است، آنزیم ACE نیز دارای نقش مهمی در این امر می‌باشد. آنزیم ACE یک «دی پپتیدیل کربوکسی پپتیداز» است که دکاپپتید غیر فعال آنژیوتانسین-۱ را با جدا کردن هیستیدیل-ال-لوسین از انتهای کربوکسیلی آن به اکتاپپتید فعال آنژیوتانسین-۲ تبدیل می‌کند. آنژیوتانسین-۲ سبب تنگ شدن عروق و افزایش فشار خون می‌گردد. ACE همچنین برادی‌کینین را که یک پپتید گشاد کننده‌ی عروقی است، غیر فعال می‌کند و بنابراین فشار خون را افزایش می‌دهد. از این رو، مهار آنزیم ACE می‌تواند یکی از راه‌های کنترل پرفشاری خون باشد و یکی از ویژگی‌هایی که در مورد پپتیدهای فعال زیستی تاکنون به اثبات رسیده است، فعالیت مهار آنزیم ACE می‌باشد (۱۴-۱۵).

با در نظر گرفتن عوارض جانبی مصرف داروهای شیمیایی، اهمیت استفاده از یک منبع دارویی زیستی و طبیعی در درمان بیماری‌ها روشن می‌گردد. حضور اسیدهای آمینه هیدروفوب شامل لوسین و آلانین در پپتید ۱۰-DG باعث افزایش اثر مهار کنندگی فعالیت ACE می‌شود. الگوی مهار آنزیم، نشان می‌دهد که

پپتید ۱۰-DG مهار کننده، چگونه می‌تواند به آنزیم اتصال یابد و فعالیت آنزیم را مهار سازد. نتایج حاصل از مطالعات سینتیکی نشان می‌دهد که الگوی مهار پپتید ۱۰-DG به صورت غیر رقابتی است (شکل ۳). این نوع مهار به این معنا است که پپتید مهار کننده به جایگاه فعال آنزیم متصل نمی‌شود؛ بلکه به جایگاهی غیر از جایگاه فعال آنزیم اتصال می‌یابد (۱۶). الگوی مهار پپتیدهای مهار کننده، با ساختار پپتید مرتبط است. اتصال سوبسترا یا پپتیدهای مهار کننده به ACE به توالی تری پپتید انتهای کربوکسیلی وابسته است. اگر چه بیشتر پپتیدهای خالص شده از منابع طبیعی به عنوان مهار کننده‌ی رقابتی عمل می‌کنند؛ برخی پپتیدهای مهار کننده دارای الگوی مهار غیر رقابتی، نارقابتی و یا مخلوط هستند. برای مثال، پپتیدهای LW, IY, MY, LIY و YGGY به عنوان مهار کننده‌های غیر رقابتی (۱۷) و پپتیدهای FY, JW و YLYEIA به عنوان مهار کننده‌های نارقابتی عمل می‌کنند (۱۸).

در مطالعه‌ای، خالص‌سازی یک پپتید دارای فعالیت بالای مهار آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ و آنتی‌اکسیدانتی از هیدرولیز ژلاتین پوست نوعی ماهی در اقیانوس آرام به نام Cod انجام شد. در این مطالعه، ژلاتین از پوست استخراج و توسط آنزیم‌های پپسین، تریپسین و کیمتریپسین هیدرولیز شد. این پپتید دارای توالی LLMLDNDLPP و وزن ملکولی ۱۱۴۰/۳۷ دالتون است. این پپتید به صورت غیر رقابتی، آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ را مهار کرد و همچنین این پپتید بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی سوپراکسید دیسموتاز، گلووتاتیون پراکسیداز و کاتالاز را افزایش داد. این نتایج نشان دادند که این پپتید

می‌تواند به عنوان مکمل غذایی برای درمان فشار خون بالا و جلوگیری از استرس اکسیداتیو استفاده شود (۱۹). این پپتید، مشابه پپتید استخراج شده در تحقیق حاضر دارای اسیدهای آمینه‌ی لوسین و آسپارتیک اسید می‌باشد. این اسیدهای آمینه، نقش مهمی در مهار آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ دارد.

در مطالعه‌ی دیگری اثر آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ بر روی سوسیس پتروواک (Petrovac sausage) انجام شد. در این مطالعه، سوسیس پتروواک یک نوع سوسیس تخمیری خشک شده‌ی خاص ایالت وجودینای صربستان است. پروتئین استخراج شده از این سوسیس قبل از فراوری، رادیکال ۱،۱-دیفنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل (DPPH) یا ۱،۱-diphenyl-۲-picryl hydrazyl را که یک ترکیب برای سنجش آنتی‌اکسیدانتی است، در حد ۲۷/۶۱ درصد حذف کرد و مقدار این فعالیت تا روز ۹۰ فراوری به حدود ۴۵ درصد رسید. فعالیت مهار آنزیم ACE نیز در پروتئین فراوری نشده ۲۷/۱۱ درصد بود که تا روز ۹۰ به حدود ۷۱ درصد رسید (۲۰).

در مطالعه‌ی دیگری توسط Jamdar و همکاران، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ توسط پروتئین بادام زمینی و همچنین اثر درجه‌ی هیدرولیز بر فعالیت آن مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت حذف رادیکال DPPH توسط هیدرولیزات‌هایی با درجه‌ی هیدرولیز ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد به ازای غلظت ۲ mg/ml از نمونه، حدود ۵۰ درصد بود. در حالی که این مقدار برای درجه‌ی هیدرولیز ۱۰ درصد، حدود ۲۱ درصد بود. فعالیت مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین-۱ به ازای مطالعه‌ی اثر آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ توسط بامبوزا کائولیس (Bambusa caulis in liqiamen) صورت گرفته است. بامبوزا کائولیس یک مایع مغذی استخراج شده از ساقه‌ی بامبو به وسیله‌ی گرما می‌باشد. در این مطالعه، مقدار IC_{50} برای حذف رادیکال‌های DPPH و پروکسیل توسط بامبوزا کائولیس به ترتیب $79/85 \mu\text{g/ml}$ و $28/85$ بود. حذف رادیکال‌های DPPH و پروکسیل با افزایش غلظت بامبوزا کائولیس تا $125 \mu\text{g/ml}$ به ترتیب به $83/17$ و $90/00$ درصد رسید. همچنین مهار آنزیم ACE در غلظت $2000 \mu\text{g/ml}$ از نمونه به $52/41$ درصد رسید. در حالی که مقدار IC_{50} برای آن $1750 \mu\text{g/ml}$ بود (۱۹).

در بین پپتیدهای شناسایی شده، پپتید MKR دارای مقدار IC_{50} برابر با $0/2 \mu\text{M}$ است. این پپتید دارای C-ترمینال ARG است که به دلیل شارژ مثبت گروه گوانیدین، برای بازدارندگی تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ اهمیت بسیاری دارد. علاوه بر این، گزارش شده است که آمینو اسید K/R با بار مثبت، باعث تسهیل پیوند پپتید-آنزیم می‌شود و بنابراین قدرت بازدارندگی تری‌پپتیدها را تقویت می‌کند. به عنوان مثال، IRY به دلیل شارژ مثبت آمینو اسید باقی‌مانده در میانه‌ی این موقعیت، فعالیت بازدارندگی ۵ برابر قوی‌تر از INY دارد. در این نسبت، K باقی‌مانده در این پپتید MKR به احتمال زیاد نقش

در مطالعه‌ی دیگری اثر آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ بر روی سوسیس پتروواک (Petrovac sausage) انجام شد. در این مطالعه، سوسیس پتروواک یک نوع سوسیس تخمیری خشک شده‌ی خاص ایالت وجودینای صربستان است. پروتئین استخراج شده از این سوسیس قبل از فراوری، رادیکال ۱،۱-دیفنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل (DPPH) یا ۱،۱-diphenyl-۲-picryl hydrazyl را که یک ترکیب برای سنجش آنتی‌اکسیدانتی است، در حد ۲۷/۶۱ درصد حذف کرد و مقدار این فعالیت تا روز ۹۰ فراوری به حدود ۴۵ درصد رسید. فعالیت مهار آنزیم ACE نیز در پروتئین فراوری نشده ۲۷/۱۱ درصد بود که تا روز ۹۰ به حدود ۷۱ درصد رسید (۲۰).

در مطالعه‌ی دیگری توسط Jamdar و همکاران، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ توسط پروتئین بادام زمینی و همچنین اثر درجه‌ی هیدرولیز بر فعالیت آن مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت حذف رادیکال DPPH توسط هیدرولیزات‌هایی با درجه‌ی هیدرولیز ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد به ازای غلظت ۲ mg/ml از نمونه، حدود ۵۰ درصد بود. در حالی که این مقدار برای درجه‌ی هیدرولیز ۱۰ درصد، حدود ۲۱ درصد بود. فعالیت مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین-۱ به ازای

در مطالعه‌ی دیگری توسط Jamdar و همکاران، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ توسط پروتئین بادام زمینی و همچنین اثر درجه‌ی هیدرولیز بر فعالیت آن مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت حذف رادیکال DPPH توسط هیدرولیزات‌هایی با درجه‌ی هیدرولیز ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد به ازای غلظت ۲ mg/ml از نمونه، حدود ۵۰ درصد بود. در حالی که این مقدار برای درجه‌ی هیدرولیز ۱۰ درصد، حدود ۲۱ درصد بود. فعالیت مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین-۱ به ازای

مهمی را در قدرت بازدارندگی تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ ایفا می‌کند. در این جا، آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ ترجیح می‌دهد با مهار کننده‌هایی بر همکنش دهد که آمینو اسید آب‌گریز باقی‌مانده در سه موقعیت C-ترمینال اول دارند. آمینواسیدهای آب‌دوست باقی‌مانده‌ی C-ترمینال در پپتید MKR، باید نقش حیاتی را در ورود مرکز فعال آب‌گریز ACE ایفا کند. بنابراین باقی‌مانده‌ها در این سه موقعیت MKR همگی در قدرت بازدارندگی این پپتید مشارکت می‌کنند. این پپتید شباهت نسبی با پپتید MRW از اسفناج دارد. فعالیت ضد فشار خون پپتید $0.6 \mu\text{M}$ MRW گزارش شده است (۲۲).

در بین تمام تری‌پپتیدهای خالص، پپتید VAW قوی‌ترین فعالیت بازدارندگی ACE با مقدار $0.08 \mu\text{M}$ برابر با $0.08 \mu\text{M}$ از خود نشان داده است. به طور کلی، تری‌پپتیدهای دارای باقی‌مانده (W، F یا Y) در C-ترمینال و آلیفاتیک شاخه‌ای (V، I یا L) آمینو اسید باقی‌مانده در N-ترمینال دارای قدرت بازدارندگی تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ قوی دارند. توالی پپتیدهای VAW رابطه‌ی ساختار-فعالیت توصیف شده در بالا را دارد. بسیاری از توالی‌های مشابه تری‌پپتیدها در گزارش‌های دیگری مانند VAP $2 \mu\text{M}$ و همچنین $1/8 \mu\text{M}$ مطرح شده است. شایان ذکر است که پپتید RGY دارای باقی‌مانده‌ی آمینو اسید آروماتیکی (Y) در C-ترمینال است، اما باقی‌مانده‌ی آلیفاتیک شاخه‌ای در N-ترمینال ندارد. بر این اساس، این پپتید فعالیت بازدارندگی کمتری در

مقابل ACE در مقایسه با VAW دارد. در مطالعه‌ی Rohrbach و همکاران نشان داده شد که موقعیت دو تا مانده به آخر در C-ترمینال در تری‌پپتید برای شناسایی بیشتر پپتید در برابر تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ اهمیت دارد. در توالی JYRGYR، احتمال می‌رود باقی‌مانده‌ی آمینو اسید (R) نقش مهمی را در برش ACE در برابر این نوع تری‌پپتید ایفا کند (۲۳). با توجه به مطالعات انجام شده، اسیدهای آمینه‌ی گلیسین، لوسین و آسپارتیک اسید در پپتید DG-۱۰ نقش مهمی در مهار آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ می‌توانند داشته باشند. نتیجه‌گیری نهایی این که توسعه‌ی ترکیبات ضد فشار خون از منابع طبیعی در علوم زیستی و غذایی مهم است. در این تحقیق، یک پپتید ضد فشار خون از پروتئین‌های سفیده‌ی تخم شترمرغ با هضم آنزیم‌های پپسین و پانکراتین شناسایی گردید. پپتید ضد فشار خون DG-۱۰ با قدرت بالایی فعالیت آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین-۱ را مهار می‌کند. نتایج پیشنهاد می‌کند که این پپتید ممکن است نوید دهنده‌ی داروی طبیعی ضد فشار خون باشد. هر چند مطالعات بیشتر در سیستم *In vivo* ضروری است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات کارکنان و دانشجویان آزمایشگاه تحقیقاتی بیوشیمی دانشکده‌ی علوم دانشگاه فردوسی تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

References

- Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of

- randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 1990; 335(8693): 827-38.
2. Persson PB. Renin: origin, secretion and synthesis. *J Physiol* 2003; 552(Pt 3): 667-71.
 3. Bakris GL, Toto RD, McCullough PA, Rocha R, Purkayastha D, Davis P. Effects of different ACE inhibitor combinations on albuminuria: results of the GUARD study. *Kidney Int* 2008; 73(11): 1303-9.
 4. Chen Q, Xuan G, Fu M, He G, Wang W, Zhang H, et al. Effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from rice dregs protein on antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16(Suppl 1): 281-5.
 5. Miguel M, Aleixandre A. Antihypertensive peptides derived from egg proteins. *J Nutr* 2006; 136(6): 1457-60.
 6. Iroyukifujita H, Eiichiyokoyama K, Yoshikawa M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J Food Sci* 2000; 65(4): 564-9.
 7. Liu J, Yu Z, Zhao W, Lin S, Wang E, Zhang Y, et al. Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. *Food Chem* 2010; 122(4): 1159-63.
 8. Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Nokihara K. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem* 1996; 44(9): 2619-23.
 9. Li B, Chen F, Wang X, Ji B, Wu Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem* 2007; 102(4): 1135-43.
 10. Mendis E, Rajapakse N, Byun HG, Kim SK. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sci* 2005; 77(17): 2166-78.
 11. Park PJ, Jung WK, Nam KS, Shahidi F, Kim SK. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *J Amer Oil Chem Soc* 2001; 78(6): 651-6.
 12. Li GH, Le GW, Shi YH, Shrestha S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research* 2004; 24(7): 469-86.
 13. Lopez-Fandino R, Otte J, van Camp J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal* 2006; 16(11): 1277-93.
 14. Cheung HS, Wang FL, Ondetti MA, Sabo EF, Cushman DW. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J Biol Chem* 1980; 255(2): 401-7.
 15. Megias C, Pedroche J, Yust MM, Giron-Calle J, Alaiz M, Millan F, et al. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT-Food Science and Technology* 2008; 41(10): 1973-7.
 16. Holmquist B, Bunning P, Riordan JF. A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 540-8.
 17. Lahogue V, Rehel K, Taupin L, Haras D, Allaume P. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chemistry* 2010; 118(3): 870-5.
 18. Miguel M, Manso M, Aleixandre A, Alonso MJ, Salaices M, Lopez-Fandino R. Vascular effects, angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, and antihypertensive properties of peptides derived from egg white. *J Agric Food Chem* 2007; 55(26): 10615-21.
 19. Sun J, Yu J, Zhang PC, Tang F, Yue YD, Yang YN, et al. Isolation and identification of lignans from *Caulis Bambusae* in *Taenia* with antioxidant properties. *J Agric Food Chem* 2013; 61(19): 4556-62.
 20. Vastag ua, Popovič L, Popovič S, Petrovič L, Pericin D. Antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity in the water-soluble protein extract from *Petrovac Sausage* (*Petrovska Kolbasa*). *Food Control* 2010; 21(9): 1298-302.
 21. Jamdar SN, Rajalakshmi V, Sharma A. Antioxidant and ace inhibitory properties of poultry viscera protein hydrolysate and its peptide fractions. *J Food Biochem* 2012; 36(4): 494-501.
 22. Wu J, Aluko RE, Nakai S. Structural requirements of Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides. *J Agric Food Chem* 2006; 54(3): 732-8.
 23. Rohrbach MS, Williams EB, Jr., Rolstad RA. Purification and substrate specificity of bovine angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 1981; 256(1): 225-30.

Identification New Angiotensin-1 Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Ostrich Egg White Protein Hydrolysate

Masoud Homayouni-Tabrizi¹, Ahmad Asoodeh PhD², Mohammad-Reza Abbaszadegan PhD³, Khadijeh Shahrokhbabadi PhD⁴, Mahboobeh Nakhaie-Moghaddam PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: Due to the side effects of anti-hypertension drugs, extracting bioactive peptides from natural sources is of great importance. The main goal of this study was identifying a peptide for enzyme hydrolytic of ostrich egg white protein hydrolysate (OEWPH) and investigating its inhibitory effects on angiotensin-1 converting enzyme (ACE).

Methods: The ostrich egg white protein hydrolysate was prepared using pepsin and pancreatin and then fractionated using reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Tandem mass analysis of the purified peptide was used to reveal peptide sequence. ACE inhibitory effect and kinetic parameters of the reaction in the presence of the peptide was evaluated. Molecular docking was used to determine the interaction parameters of ACE-peptide comp.

Findings: Peptide sequencing of the selected peptide revealed a DAESLSRLLG (MW = 1060/18 Da) and named DG-10. The DG-10 peptide showed a potent inhibitory effect on ACE with the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of 0.133 mg/ml. Lineweaver-Burk plot exhibited a non-competitive behavior in the presence of the DG-10 peptide. Molecular interactions and energy binding of the peptide with ACE were investigated via molecular docking.

Conclusion: The DG-10 peptide isolated from ostrich egg white protein hydrolysate displayed a potent inhibitory effect on ACE.

Keywords: Angiotensin-1 converting enzyme (ACE), Ostrich egg white protein hydrolysate (OEWPH), Peptide

Citation: Homayouni-Tabrizi M, Asoodeh A, Abbaszadegan MR, Shahrokhbabadi Kh, Nakhaie-Moghaddam M. **Identification of New Angiotensin-1 Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Ostrich Egg White Protein Hydrolysate.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(301): 1496-508

1- PhD Student, Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Chemistry, School of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Professor, Department of Human Genetics, Immunology Research Center, Avicenna Research Institute AND Medical Genetics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

4- Assistant Professor, Department of Biology, School of Sciences, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Ahmad Asoodeh PhD, Email: asoodeh@um.ac.ir