دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا:۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هفتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۷
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 7(2), 2018

Protease Inhibitors and Their Application Against Plant Pathogens

MALIHE ERFANI and MAHDI DAVARI ✉

Departments of Horticulture and Plant Protection, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran (✉Corresponding author: mdavari@uma.ac.ir)

Received: 12.11.2016 Accepted: 30.04.2017

Erfani M. and Davari M. 2018. Protease inhibitors and their application against plant pathogens. *Plant Pathology Science* 7(2):60-72. DOI: 10.2982/PPS.7.2.60

Abstract: Proteases cleave the peptide bonds in proteins and in this way prevent protein activity by degrading them. Proteases are classified into four categories: serine proteases, cysteine proteases, aspartic proteases and metalloproteases. Plant pathogens utilize these vital molecules in plant infecting process. In the other hand, the activity of proteases is inhibited by protease inhibitors of plants. Serine is one of the protease inhibitors. The plants produce the materials inhibiting pathogenic proteases. These molecules are produced in plant cells during pathogenic microorganisms and viruses attack. Protease inhibitors are divided into several families based on sequence similarity and structure. Because the risk of pathogen resistance to this defense strategy is low, it seems these molecules could be use for biological control against plant pathogens.

Key words: Enzyme, Inhibitor, *Fusarium*, *Alternaria*

بازدارنده‌های پروتئازی و کاربرد آن‌ها بر علیه بیمارگرهای گیاهی

ملیحه عرفانی و مهدی داوری✉

گروه‌های علوم باغبانی و گیاه‌پزشکی دانشگاه محقق اردبیلی

دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۱۴

عرفانی م. و داوری م. ۱۳۹۷. بازدارنده‌های پروتئازی و کاربرد آن‌ها بر علیه بیمارگرهای گیاهی. *دانش بیماری‌شناسی گیاهی* ۷(۲): ۷۲-۶۰. DOI: 10.2982/PPS.7.2.60

چکیده: پروتئازها باعث شکستن پیوندهای پپتیدی شده و مانع فعالیت پروتیینها و باعث تخریب آن‌ها می‌گردند. این مولکول‌ها به چهار گروه پروتئازهای سرین، سیستئین، آسپارتیک و متالوپروتئازها تقسیم می‌شوند . بیمارگرهای گیاهی از این مولکول‌ها برای بیمار نمودن گیاهان استفاده می‌کنند. در مقابل، گیاهان نیز موادی تولید می‌کنند که بازدارنده پروتئازهای بیمارگری است. مهار کننده پروتئازی سرین یکی از مهم‌ترین این مهارکننده‌ها است. این مولکول‌ها در سلول‌های گیاهی و در هنگام حمله ریزجانداران بیماریزا و ویروس‌ها تولید می‌گردند. بازدارنده‌های پروتئازی بر اساس تشابه توالی ژنی و ساختاری خود به خانواده‌های مختلفی تقسیم می‌شوند. با شناخت نحوه عمل این نوع مولکول‌ها و انتقال ژن‌های تولید کننده آن‌ها به گیاهان مهم می‌توان از این مواد به عنوان یک روش مبارزه زیستی با بیمارگرهای گیاهی استفاده کرد، چرا که احتمال مقاوم شدن بیمارگرها به این روش دفاعی خیلی کم است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، بازدارنده، *Alternaria* ،*Fusarium*

✉ مسئول مکاتبه: mdavari@uma.ac.ir

مقدمه

حیات ما به طور مستقیم و غیر مستقیم به گیاهان وابسته است. امروزه کشاورزی و کشت محصولات مورد نیاز یکی از منابع با ارزش در تولید غذای مردم جهان است، ولی رقبایی در استفاده از گیاهان با انسان رقابت می‌کنند و با تغذیه از گیاهان، خسارت زیادی به محصولات کشاورزی وارد می‌کنند. بشر برای کاهش خسارت ناشی از حشرات و بیمارگرهای گیاهی از انواع آفت‌کش‌های شیمیایی استفاده می‌کند ولی با استفاده بیش از حد آن، آلودگی منابع آبی و خاک از یک سو و مقاوم شدن عوامل خسارت‌زا از سوی دیگر، به دو معضل مهم تبدیل شده است. بنابراین دانشمندان برای مبارزه با این عوامل به سیستم‌های حفاظتی خود گیاه در مقابله با آفات و بیماری‌ها روی آورده‌اند، چرا که گیاهان برای مقابله با این عوامل، سازوکارهای دفاعی شگرفی دارند که آن‌ها را نسبت به آفات و بیماری‌ها مقاوم کرده و با آن‌ها مبارزه می‌کنند. در زمان تماس بیمارگر با گیاه، در نتیجه ساختار دفاعی میزبان، پروتیین‌های مختلفی القا می‌شود که به آن‌ها پروتیین‌های وابسته به بیمارگر (Pathogenesis-related proteins) یا به اصطلاح PR می‌گویند. این پروتیین‌ها در مقادیر کم در سلول‌های سالم بیان می‌شوند و ایزوآنزیم‌های (Isozymes) مشخصی هستند که در طول تماس بیمارگر به دو صورت موضعی و سیستمیک القا می‌شوند. در نواحی پروموتری (Promoter regions) ژن‌های مولد این پروتیین‌ها توالی‌های ویژه‌ای وجود دارد که برای القا و تحریک شدن ضروری هستند. پروتیین‌های القا شده با توجه به آزمایشهای سرولوژیکی و همولوژی آن‌ها در ۱۴ گروه پروتیین‌های PR دسته‌بندی می‌شوند. نقش بیوشیمیایی این پروتیین‌ها نیز مشخص شده است، برای مثال کیتینازها (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11)، کیتین دیواره سلولی قارچ را هیدرولیز می‌کنند و یا گلوکونازها (PR-2)، پروتیینازها (PR-7) و ریبونوکلئازها (PR-10) که با توجه به فعالیت ویژه آن‌ها روی سوبسترای مختلف، همگی نقش هیدرولیز آنزیمی دارند و بر علیه قارچ‌ها و باکتری‌ها استفاده می‌شوند و همچنین از پروتئازها و ریبونوکلئازها بر علیه ویروس‌ها استفاده می‌گردد. بعضی از پروتیین‌های PR نقش مهمی در مبارزه با عامل‌های بیماریزایی دارند، از جمله آن‌ها بازدارنده‌های پروتئازی یا PR-6 است که توسط گیاه تولید می‌گردند و آنزیم‌های پروتئازی حشرات و عوامل میکروبی را مهار می‌کنند (Dickenson 2003). همانطور که گفته شد، این بازدارنده‌ها فعالیت پروتیین‌های پروتئازی را که حشرات و بیمارگرها هنگام حمله به گیاه تولید می‌کنند، مهار می‌کنند و

از این طریق مانع آلودگی گیاه به این عوامل خسارت‌زا می‌گردند. بنابراین با شناخت نحوه فعالیت این بازدارنده‌ها و تأثیر آن‌ها بر بیمارگرها می‌توان از آن‌ها برای مدیریت بیماری‌های گیاهی استفاده نمود.

۱-پروتئازها(Protease)

پروتئازها آنزیم‌های هیدرولیزکننده‌ای هستند که قادرند پروتیین‌ها را شکسته و تغییر دهند. این آنزیم‌ها شکست و تغییر در پروتیین‌ها را با هیدرولیز پیوند پپتیدی موجود در زنجیره پلی‌پپتیدی پروتیین انجام می‌دهند. پروتئازها بر اساس محل فعالیت هیدرولیزی به دو دسته اصلی اگزوپپتیدار و اندوپپتیداز تعریف می‌شوند و آنزیم‌های اگزوپپتیداز شامل دو گروه آمینوپپتیداز و کربوکسی‌پپتیداز است. اندوپپتیدازها باندهای پپتیدی درون زنجیره پلی‌پپتیدی را برش می‌دهند که این برش، قبل یا بعد از یک اسیدآمینه خاص انجام می‌گیرد. اندوپپتیدازها با توجه به محل فعالیت آنزیم پروتئولیتیک به چهار دسته پروتئازهای سرین، پروتئازهای سیستئین، پروتئازهای اسید آسپارتیک و متالوپروتئازها دسته‌بندی می‌شوند. مثال‌هایی از انواع این پروتئازها در جدول ۱ آمده است (Walsh 2002).

۱-۱- پروتئازهای سرین: برای فعالیت این نوع پروتئازها وجود اسیدآمینه سرین ضروری است. یعنی این آنزیم، رشته پلی‌پپتیدی را از محل اسیدآمینه سرین برش می‌دهد. این آنزیم‌ها در آرکئی‌باکتری‌ها، باکتری‌ها، یوکاریوت‌ها و ویروس‌ها تولید می‌شوند.

جدول ۱- اندوپروتئازها و مثال‌های آن.

Table 1. Endoproteases and its examples

گروه پروتئاز	مثال‌ها
سرین	تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز، پروتییناز K
آسپارتیک	پپسین، رنین (کیموزین)، پروتئازهای میکروبی آسپارتیک
سیستئن	پاپائین، فیسین، بروملاین
متالوپروتئازها	کلاژنز، الاستاز، ترمولیزین

پروتئاز سرین به دو دسته آنزیمی trypsin-like و subtilisin-like تقسیم می‌گردند که اولین گروه آن توسط قارچ‌های *Cochliobolus carbonum* (R.R. Nelson)، *Verticillium dahlia*(Kleb)، *Stagonospora odorum* (E. Müll and Hedjar) و *Phytophtora infestans* (Mont and de Bary) و آنزیم Subtilisin-like به‌وسیله *C. carbonum*، *P. infestans*، *Acremonium typhium* (W.Gams)، *Magnaporthe poae*(Landschoot and N.Jackson) و *Trichoderma harzianum* (Rifa) و *Fusarium oxysporum*(Schlecht. Snyder and Hansen) تولید می‌شوند (Valueva and Mosolov 2004).

۱-۲- پروتئازهای آسپارتیک: این نوع پروتئازها در محل اسید آمینه آسپارتیک فعالیت کاتالیتیکی (Catalytic activity) خود را انجام می‌دهد. اغلب پروتئازهای آسپارتیک در pH=۴/۳ دارای بالاترین فعالیت هستند، این آنزیم‌ها در جنس‌های قارچی *Aspergillus*، *Penicillium*، *Rhizopus* و *Mucor* تولید می‌شوند.

۱-۳- پروتئازهای سیستئین: این نوع پروتئازها در جایگاه‌هایی که سیستئن و هیستیدین وجود دارند، زنجیره پلی‌پپتیدی را برش می‌دهند (والش ۲۰۰۲).

۱-۴- متالوپروتئازها: یک خانواده آنزیمی وابسته به عنصر روی است که از باکتری‌های جنس *Erwinia* و *Pectobacterium* استخراج شده‌اند. یکی از این پروتئازها از *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* جداسازی شده است که مشابه ترمولایزین در باکتری *Bacillus thermoproteolyticus* است(Valueva and Mosolov 2004).

پروتئازهای آسپارتیک در بین این آنزیمها گستردگی و تنوع بیشتری دارند. بر اساس این اطلاعات می‌توان به نحوه فعالیت بیمارگر با استفاده از پروتئازها پی برد و در مبارزه با آن‌ها استفاده کرد. با شناسایی پروتئازهای تولید شده توسط بیمارگرها می‌توان یک بازدارنده خاص را برای مقابله با آن بیمارگر به کار برد. چرا که بذر و اندام‌های رویشی گیاهان عالی، حاوی بازدارنده‌های پروتیینی متنوعی هستند که با اتصال به جایگاه فعال آنزیم هدف، از فعالیت پروتئازها و آمیلازهای حشرات، ریزجانداران بیماری‌زا، قارچ‌ها و پستانداران جلوگیری می‌کنند، اما روی آنزیم‌های خودِ گیاهان بی‌تاثیر هستند. برای مثال از برگ‌های گوجه‌فرنگی در حمله حشرات و ریزجاندارها بیش از ۲۰ پروتیین مختلف مهارکننده پروتئازهای سرین، سیستئن، آسپارتیک و

متالوکربوکسی پپتیداز به دست آمده است. با توجه به اهمیت این بازدارنده‌های گیاهی، تعدادی از بازدارنده‌ها به همراه نقش آن‌ها در مدیریت بیماری‌های گیاهی در زیر توضیح داده می‌شود.

۲-بازدارنده‌های پروتئازی(Protease inhibitors)

بازدارنده‌های پروتئازی در چندین فعالیت حیاتی دخالت دارند. این مولکول‌ها دارای فعالیت ضدتوموری، حشره‌کشی و ضدباکتریایی هستند. بازدارنده‌های پروتیینی به محل فعالیت آنزیم متصل شده و یک ساختار غیرفعال و یا بازدارنده را به وجود می‌آورند. در این فرایند، رقابتی بین بازدارنده و آنزیم پروتئاز در اتصال به سوبسترا وجود دارد. اتصال بین بازدارنده و پروتئازها به صورت اتصالِ مکمّل است و چندین برهمکنش بین جایگاه اتصال آنزیم و قطعه‌ای در زنجیره پلی‌پپتیدی بازدارنده که جایگاه غیرفعال‌سازی است، رخ می‌دهد. این کمپلکس آنزیم-بازدارنده، فعالیت کاتالیتیکی سوبسترای خود را کاهش می‌دهد و به این ترتیب، آنزیم قادر به عمل هیدرولیزکنندگی خود نیست. تشکیل کمپلکس آنزیم-بازدارنده تغییراتی را در مولکول بازدارنده شامل چرخش زنجیره‌های اطراف و زنجیره اصلی آنزیم ایجاد می‌کند (Patricia *et al*. 2013). بررسی‌ها نشان داده است که این مولکول‌ها در اغلب موجودات تولید می‌گردند. در شکل زیر بخشی از بازدارنده کونیتز در چند موجود زنده نشان داده شده است. مشاهده می‌گردد که این قسمت در موجودات مختلف، ساختار و ناحیه‌ای یکسان و حفاظت شده است (Caroline *et al*. 2013).

بازدارنده‌های پروتئاز گیاهی یا PIs (Protein inhibitors) نقش دفاعی قوی علیه گیاه‌خواران و بیمارگرها ایفا می‌کنند. این مهارکننده‌ها بر اساس اسیدهای آمینه‌ی فعال در مرکز واکنش به عنوان بازدارنده‌های پروتئازی سرین، سیستئین، آسپارتیک و متالوپروتئازها طبقه‌بندی شده‌اند (Koiwa *et al*. 1997) که هر کدام از این بازدارنده‌ها بر اساس نوع گیاه دارنده‌ی آن‌ها به گروه‌هایی تقسیم می‌شوند. مهم‌ترین خانواده‌های بازدارنده پروتئازی گیاهی Arrowhead، Bowman-Birk، Kunitz، Potato I، Potato II، Cereal، Rapeseed و Squash هستند که خانواده‌های Bowman-Birk و Kunitz بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و بازدارنده‌های آن‌ها از حبوبات جداسازی شده است (Habib and Fazili 2007). بازدارنده‌های پروتیینی آلفا-آمیلاز بر اساس ساختمان سوم پروتیینی خود به شش گروه تقسیم می‌شوند که می‌توان از ۱-Lectinlike (در لوبیای معمولی)، ۲-Knotin-like (در تاج خروس)، ۳-Cereal-type (در گندم، جو و ارزن)، ۴-Kunitz-like

(در گندم، جو و برنج)، ۵-γ-purothionin (در سورگوم) و ۶- Thaumatin-like (در ذرت) نام برد (Franco *et al*. 2002). برخی از بازدارنده‌های آلفا-آمیلاز موجود در دانه‌ها و اندام‌های سبز گیاهان در تنظیم برخی رفتارهای تغذیه‌ای حشرات گیاه‌خوار دخالت دارند (Kidric *et al*. 2014). با شناسایی این پروتیین‌ها و روش‌های انتقال ژن، پژوهشهای گسترده‌ای در استفاده از این نوع مولکول‌ها برای مهار زیستی بیمارگرها در حال انجام است که در زیر به تعدادی از آنها اشاره میشود.

۳- فعالیت ضدقارچی بازدارنده‌های پروتئازی

بازدارنده‌های پروتئازی به عنوان بخشی از سازوکار دفاعی گیاهان برعلیه قارچها گزارش شده‌اند. این مولکول‌ها قادرند روی پروتئازهای درون و برون سلولی قارچها که نقش مهمی در تغذیه و آلوده کردن سلول میزبان دارند، تأثیر بگذارند.

پروتیین‌های ضدقارچی با فعالیت بازدارندگی تریپسین نیز مستقیماً بر سطح غشای قارچها عمل می‌کنند. آنالیز cDNA گیاه تنباکو نشان داده است که میزان بیان قابل توجهی در بازدارنده پروتئازی کونیتز در تمام اندام‌های این گیاه وجود دارد که به شدت فعالیت قارچ *Rhizoctonia solani* (J.G. Kühn) و تا حدی رشد *Rhizopus nigricans* (Ehrenberg) و *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*(Breda de Haan) را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Huang *et al*. 2010). همچنین یک بازدارنده تریپسین ۱۴ کیلودالتونی در ذرت گزارش شده که مقاومت میزبان را به آفلاتوکسین تولیدی توسط قارچ *Aspergillus flavus* (Link) باعث می‌شود، این بازدارنده همچنین قادر است توانایی فعالیت و تولید برون‌سلولی گلوکوزیداز (آلفا-آمیلاز) را در این قارچ کاهش دهد (Chen *et al*. 1999a).

در آزمایشی ژن بازدارنده تریپسین ذرت در باکتری *Escherichia coli* (Migula) بیان و ماده خالصسازی شده از محیط کشت باکتری به محیط رشد قارچ *Fusarium moniliforme* (J. Sheld) اضافه و مشاهده شد که جوانه‌زنی کنیدیوم‌ها و رشد میسلیوم قارچ متوقف می‌شود (Chen *et al*. 1999b). به همین ترتیب در آزمایش دیگری یک بازدارنده پروتئاز سیستئین توانست رشد میسلیومی قارچ *Trichoderma reesei* را مهار کند و آنالیز میکروسکوپی نشان داد که این بازدارنده مستقیماً بر پروتئاز قارچ اثر می‌گذارد و جوانه‌زنی و توسعه عادی میسلیوم را کاهش می‌دهد (Soares-Costa *et al*. 2002). همچنین ثابت شده است که

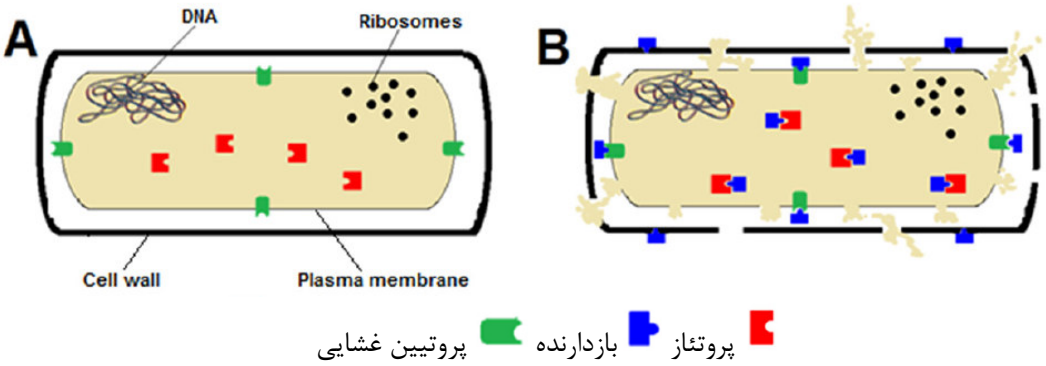
بازدارنده تریپسین باکتری *Pseudostellaria heterophylla* (Rupr. and Maxim) فعالیت ضدقارچی روی قارچ *F. oxysporum* دارد که مانند آپروتینین فعالیت بازدارندگی روی چندین پروتئاز دارد (Wang and Ng 2006). سه ایزوفرم یک بازدارنده پروتئاز سرین که در بذرهای نوعی اقاقیا (*Acacia plumose*) تولید می‌شود، رشد قارچ‌های *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg، *Aspergillus niger* (Tieghem) (C. Moreau) *Thielaviopsis paradoxa* و *Colletotrichum* sp. را مهار می‌کند (Lopes *et al*. 2009). همچنین بازدارنده تریپسین که در بذرهای گیاه باکوچی (*Psoralea corylifolia*) یافت می‌شود، رشد *F. oxysporum*، *Alternaria brassicae* (Sacc and Berk.) *A. niger* و *Rhizoctonia cerealis* (J.G. Kühn) را مختل میکند (Yang *et al*. 2006). در تحقیق دیگری بعد از اضافه نمودن بازدارنده تریپسین موجود در گل‌های آفتابگردان، جوانه‌زنی قارچ *Sclerotinia sclerotiorum*(de Bary) مهار شد (Giudici *et al*. 2000). بازدارنده تریپسین-کیموتریپسین موجود در سیب‌زمینی به شدت رشد بیمارگرهای قارچی (Berkhout) *Candida albicans* و *R. solani* را مهار کرد. این بازدارنده، ۶۲ درصد همولوژی (مشابهت) با بازدارنده پروتئازی خانواده Kunitz نشان داد که قادر به القای لیز شدن گلبول‌های قرمز خون انسانی نیست و از بی‌خطر بودن آن‌ها برای استفاده به‌عنوان عوامل ضدباکتری حکایت می‌کند (Kim *et al*. 2005). در بررسی بیان ژن‌های مقاومت به سپتوریوز برگی در گندم نان (*Triticum aestivum*) نشان داده شده که بیان ژن‌های بازدارنده پروتئازی در کنار ژن‌های اصلی، باعث تشدید و حفظ مقاومت می‌شوند (حبیبی و همکاران ۱۳۹۲).

بازدارنده‌های تریپسین و کیموتریپسین از سبوس و بذر لوبیا و همچنین از غده‌های سیب‌زمینی استخراج شده‌اند که قادرند فعالیت پروتئازهای ترشحی توسط قارچ *F. solani* را مهار نمایند. به‌علاوه، بازدارنده Bowman.Birk رشد میسلیوم و جوانه‌زنی کنیدیوم در *F. solani*، *F. culmorum* Wm.G.Sm. و *B. cinerea* را مهار کرده است (Mosolov *et al*. 1976). مهارکننده تریپسین به دست آمده از دانه ذرت، رشد میسلیوم و جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ‌های *Aspergillus flavus* (Link), *A. parasiticus* Speare و *F. verticillioides* و بیان ژن *wip1* در بلال گیاه ذرت، بیماری *F. verticillioides* در رقم MO17 ذرت را مهار کرده است (رائی و همکاران ۱۳۹۵).

بازدارنده تریپسین به دست آمده از بذر گندم نیز فعالیت پروتئازی در قارچ *Alternaria alternata* (Keissl) را مهار کرده است. همچنین مهار جوانه‌زنی هاگ و رشد میسیلیوم قارچهای بیماریزای گیاهی *A. alternata* و *F. oxysporum* توسط این بازدارنده گزارش شده است. بازدارنده کیموتریپسین استخراج شده از غده‌های سیب‌زمینی، رشد و توسعه شبه‌قارچ *P. infestans* عامل بیماری سوختگی شاخ و برگ سیب‌زمینی را مهار می‌کند. یک بازدارنده استخراج شده از بذر جو نیز فعالیت پروتئازی *Aspergillus oryzae*، *Streptomyces griseus* و *Alternaria tennuissima* را مهار کرد. بازدارنده پروتئازی به‌دست آمده از دانه لوبیا فعالیت پروتئاز سرین قارچ *Colletotrichum lindemuthianum* عامل آنتراکنوز لوبیا را مهار می‌کند، اما مشخص شده است که به اندازه تریپسین و کیموتریپسین مؤثر نیست. همچنین یک پروتیین با وزن مولکولی ۱۰ کیلودالتون از میوه کدوتنبل (*Cucurbita maxima* L.) به دست آمده که یک بازدارنده پروتئازی آسپارتیک است و فعالیت پروتئازی قارچ *Glomerella cingulata* را مهار کرده و رشد قارچ *B. cinerea* را متوقف می‌سازد. همچنین در هندوانه آلوده به Colletotrichum *lagenarium* فعالیت بازدارنده‌ها روی پروتئاز تولیدی بیمارگر، باعث مهار بیماری شده است. از طرفی آلودگی ذرت به قارچ *F. verticillioides* هم به صورت موضعی و هم به صورت سیستمیک تولید بازدارنده پروتئازی سرین را تحریک می‌کند که از لحاظ ساختاری شبیه بازدارنده سیب‌زمینی است. القا در پاسخ به آلودگی، منحصر به بازدارنده سرین نیست، برای مثال، سیستاتین در برگ‌های شاه بلوط در پاسخ به آلودگی به قارچ *B. cinerea* تولید می‌گردد. از طرفی یک خانواده درون‌سلولی بازدارنده پروتئازی سیستئین Kazal-like در سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی تولید می‌گردد که این بازدارنده ۳۵ نوع مختلف دارد و پنج شبه‌قارچ بیمارگر گیاهی شامل *Phytophthora brassicae*، *P. infestans*، *P. sojae* Werres *et al*. و *P. ramorum* و *Plasmopara halstedii* را مهار می‌کند (Valueva and Mosolov 2004).

۴- اثر ضدباکتریایی بازدارنده‌های پروتئازی

بازدارنده‌های پروتئازی به عنوان عامل ضدباکتریایی نیز عمل می‌کنند، چرا که پروتئازها در باکتری‌ها نیز وجود دارند. اثر بازدارنده‌ها روی باکتری‌ها شامل چندین فرآیند فیزیولوژیکی علاوه بر برهمکنش بین



شکل ۱- قسمت A، نمایی شماتیک از سلول باکتری، قسمت B، فعالیت ضد باکتریایی بازدارنده‌های پروتئازی، برهمکنش بین بازدارنده و دیواره سلولی یا پروتیین‌های غشایی منجر به متلاشی شدن سلول می‌گردد (Patricia *et al*. 2013).

Figure 1. A, Schematic representation of bacteria cell. B, Antibacterial activity of protease inhibitors may be linked to inhibition of bacterial proteases, interactions between the inhibitor and the cell wall or membrane proteins leading to leakage of cellular contents (Patricia *et al*. 2013) .

بازدارنده و دیواره سلولی یا پروتیین‌های غشای سلولی منجر به تغییر در نفوذپذیری و القای مرگ باکتری‌ها می‌شود (شکل ۱).

بازدارنده استخراج شده از برگ‌های گیاه فلوس (*Cassia fistula* L.) در آزمایشی، رشد باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Klebsiella pneumonia* و *E. coli* را مهار کرد. همچنین گزارش شده است که بازدارنده پروتئاز بذرهای گیاه لاواترا (*Lavatera cashmeriana* Camb.) اثر ضدباکتریایی بر *K. pneumonia* و *Pseudomonas aeruginosa* دارد، اما این بازدارنده اثر معنی‌داری بر رشد *E. coli* نشان نداد. بازدارنده پروتئازی موجود در برگ نوعی کدو به نام *Coccinia grandis* (L.) Voigt رشد باکتری *S. aureus*، *B. subtillis*، *K. pneumoniae*، *Proteus vulgaris* و *E. coli* را مهار کرد. محققان تصور می‌کنند که شاید خاصیت بازدارندگی در اثر تشکیل کانال درون غشای سلولی و سپس مرگ سلول باشد که در نتیجه بیرون ریختن محتویات سلول انجام می‌گیرد (Satheesh and Murugan, 2011). همچنین یک پروتیین استخراج شده از گل‌های ترب کوهی که محتوی بازدارنده MoFTI است روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت *B. subtilis*، *Enterococcus faecalis* و *S. aureus* مؤثر گزارش شده است (Moura *et al*. 2011).

پژوهشهای دیگر نشان داده است که یک پلی‌پپتید شبیه ناپین با بازدارنده تریپسین به دست آمده از بذر نوعی کلم، رشد *Pseudomonas fluorescens* را مهار می‌کند. همچنین این پلی‌پپتید، رشد *Mycobacterium phlei*، *Bacillus subtilis*، *Bacillus cereus* و *Bacillus megaterium* را متوقف می‌کند (Ngai and Ng 2004).

بازدارنده‌های پروتئازی به دست آمده از برخی موجودات زنده دیگر نیز اثر ضدباکتریایی نشان می‌دهند. به عنوان مثال، فعالیت ضدباکتریایی بازدارنده الاستاز به دست آمده از گونه‌های مختلف عنکبوت را بر علیه باکتری *Enterococcus faecalis* مؤثر گزارش کردند ولی نشان دادند که رشد *B. subtilis*، *S. aureus* و *K. pneumonia* را مهار نمی‌کند (Soares *et al*. 2011). به نظر سایر محققین شاید عمل این بازدارنده در عنکبوت برای حفاظت از آلودگی توسط *E. faecalis* و بندپایان است (پاتریسیا و همکاران ۲۰۱۳).

۵-اثر ضدویروسی بازدانده‌های پروتئازی

برای ساخت پروتیین‌های ویروسی، عناصر سیس و ترانس مورد نیاز است، بنابراین ویروس در فرآیند ساخت پروتیین‌های ویروسی، پروتئازهایی را کد می‌کند. تصور بر این است که بازدارنده‌های پروتئازی می‌توانند برای کنترل ویروس‌ها نیز استفاده شوند. فرآیند ساخت پروتیین برای ویروس به‌ویژه برای خانواده‌های ویروسی Potyviridae و Comoviridae حیاتی است. بازدارنده پروتئازی سیستئین در صورت بیان در توتون، مقاومت به ویروس وای سیب‌زمینی (PVY) و ویروس خراشک توتون (TEV) را باعث می‌شود. گیاهانی که ژن بازدارنده پروتئازی سیستئین به آن‌ها انتقال داده شده بود، به دو ویروس از خانواده *Potyviridae* مقاومت نشان دادند (Ronald 2007). پوتی‌ویروس‌ها دارای پروتئاز سیستئین هستند و بنابراین می‌توان از بازدارنده این پروتئاز برای مقاومت گیاهان میزبان استفاده کرد. به نظر می‌رسد که بازدارنده‌های سیستئینی می‌توانند نقش مهمی در رابطه بین گیاه و ویروس ایفا نمایند. آزمایشهای اولیه روی بازدارنده‌های اوریزاسیستئین I و II نشان داده است که این بازدارنده‌ها قادرند همانندسازی ویروس‌های جانوری مانند خانواده *Picornaviruses* را مهار کنند. همچنین گیاهان تراریخت تنباکو با ژن اوریزاسیستاتین I به دست آمده است که به PVY و TEV مقاومت زیادی نشان می‌دهند (Gutierrez -Campos *et al.* 1999).

نتیجه‌گیری و پیشنهاد

پروتئازها آنزیم‌هایی هستند که پروتیین‌ها را هیدرولیز کرده و در همه موجودات زنده وجود دارند. این مولکول‌ها در همه گیاهان، حیوانات و ریزجاندارها وجود داشته و نقش کلیدی در واکنش‌های حیاتی بر عهده دارند. بیمارگرهای‌گیاهی از پروتئازها برای رخنه و نفوذ در گیاهان میزبان استفاده می‌کنند. این مولکول‌ها پیوندهای پپتیدی پروتیین‌ها را شکسته و به این ترتیب به گیاهان حمله می‌کنند. اما در گیاهان نیز برای مبارزه با مهاجمان، علاوه بر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، تقویت دفاع ساختمانی و تولید فیتوآلکسین‌های ضدمیکروبی، پروتیین‌های جدید متنوعی در طول حمله بیمارگر تحریک می‌شوند که از حمله بیمارگرها جلوگیری می‌کنند. این پروتیین‌های تولید شده، از فعالیت پروتئازهای بیمارگرها جلوگیری کرده و آن‌ها را مهار می‌کنند. در حقیقت، این بازدارنده‌ها باعث مهار فعالیت مولکول‌های پروتئازی می‌شوند. پروتیین‌های بازدارنده پروتئازی، پروتیین‌های کوچکی هستند که به طور طبیعی بر علیه پروتئازها عمل کرده و در همه فرم‌های زنده وجود دارند. بازدارنده به پروتئاز متصل می‌گردد و با فعالیت آنزیمی خود پروتئازها را هیدرولیز می‌کند. بازدارنده‌ها در چند تیره مهم گیاهی از جمله لگومینوز، سولاناسه و پوآسه مورد مطالعه قرار گرفته است، تعدادی از ژن‌های این پروتیین‌ها شناسایی و به گیاهان میزبان برخی بیمارگرها منتقل گردیده و بیان این پروتیین‌ها چه در حالت طبیعی و چه به صورت انتقال یافته در گیاهان میزبان، باعث مقاومت به بیماری شده است. با نتایج نویدبخش به دست آمده در این زمینه می‌توان استفاده از مولکول‌های بازدارنده پروتئازی را برای مدیریت تلفیقی بیماری‌های گیاهی، پیشنهاد داد.

منابع References

۱. حبیبی م.، میرآخورلی ن.، شیران ب. و مردی م. ۱۳۹۲. بررسی الگوی بیان ۵ ژن مرتبط با مقاومت به سپتوریوز برگی در گندم نان (*Triticum aestivum*). *ژنتیک نوین* ۸: ۱۵۸-۱۴۹.

۲. رائی ج.، سلطانلو ح.، رمضانپور س.س. و مساوات س.ا. ۱۳۹۵. بررسی بیان ژن *wip1* در بلال ذرت آلوده به بیماری *Fusarium verticillioides*. خلاصه مقالات دومین کنگره ملی توسعه و ترویج مهندسی کشاورزی و علوم خاک ایران، تهران، ص ۲۲۳.

3. Caroline B. F. Mourão and Elisabeth F. S. 2013. Protease inhibitors from marine venomous animals and their counterparts in terrestrial venomous animals. *Marine Drugs* 11:2069-2112.

4. Chen Z. Y., Brown R. L., Russin J. S., Lax A. R. and Clevel T. E. 1999a. A corn trypsin inhibitor with antifungal activity inhibits *Aspergillus flavus* alpha-amylase. *Phytopathology* 89:902-907.

5. Chen Z. Y., Brown R. L., Lax A. R., Clevel T. E. and Russin J. S.1999b. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli. Journal of Applied and Environmental Microbiology* 65:1320-1324.

6. Dickenson M. 2003. Molecular plant phathology. Bios Scientific publishers. England. 170p.

7. Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R. and Grossi-de-Sa M. F. 2002. Plant α-amylase inhibitors and theiri nteraction with insect α-amylases-structure, function and potential for crop protection. *Eurupean Journal of Biochemistry* 269:397-412.

8. Giudici A. M., Regente M. C. and Cana L. 2000. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:881-888.

9. Gutierrez-Campos R., Torres-Acosta J. A., Saucedo-Arias L. J. and Gomez-Lim. M. A. 1999. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature Biotechnology* 17:1223-1226.

10. Habib H. and Fazili K. M. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2:68-85.

11. Huang H., Qi S. D., Qi F., Wu C. A., Yang G. D. and Zheng C. C. 2010. NtKTI1, a Kunitz trypsin inhibitor with antifungal activity from *Nicotiana tabacum*, plays an important role in tobacco's defense response. *The FEBS Journal* 277:4076-4088.

12. Kidric, M., Kos J. and Sabotic J. 2014. Proteases and their endogenous inhibitors in the plant response to abiotic stress. *Botanica Serbica* 38:139-158.

13. Kim J. Y., Park S. C., Kim MH., Lim H. T., Park Y. and Hahm K. S. 2005. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330:921-927.

14. Koiwa H., Bressan R. A. and Hasegawa P. M. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* 2:379-384.

15. Lopes J. L. S., Valadares N. F., Moraes D. I., Rosa J. C., Araújo H. S. S. and Beltramini L. M. 2009. Physico-chemical and antifungal properties of protease inhibitors from *Acacia plumosa*. *Phytochemistry* 70:871-879.

16. Mosolov V. V., Loginova M. D., Fedurkina N. V. and Benken I. I. 1976. *Plant Scicence Letters* 7:77-80.

17. Moura M. C., Pontual E. V., Gomes F. S., Napoleão T. H., Xavier H. S., Paiva P. M. G. and Coelho L. C. B. B. 2011. Preparations of *Moringa oleifera* flowers to treat contaminated water. *Advances in Environmental Research* 21:269-285.

18. Ngai P. H. K. and Ng T. B. 2004. A napin-like polypeptide from dwarf Chinese white cabbage seeds with translation-inhibitory, trypsininhibitory, and antibacterial activities. *Peptides* 25:171–176.

19. Patrícia M. G. Paiva E. V. Pontual L. C., Coelho B. B. and Napoleão. T. H. 2013. Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, Technology and Education, 1:641-649.

20. Ronald P. C. 2007. Plant-Pathogen Interactions. Methods and Protocols. 393p.

21. Satheesh L. P. and Murugan K. 2011. Antimicrobial activity of protease inhibitors from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt. *Indian Journal of Experimental Biology* 49:366-374.

22. Soares T., Ferreira F. R. B., Gomes F. S., Coelho L. C. B., Torquato R. J. S., Napoleão T. H., Cavalcanti M. S. M., Tanaka A. S., Paiva P. M. G. 2011. The first serine protease inhibitor from *Lasiodora* sp. (Araneae: Theraphosidae) hemocytes. *Process Biochemistry* 46:2317-2321.

23. Soares-Costa A., Beltramini L. M., Thiemann O. H. and Henrique-Silva F. 2002. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification,and antifungal activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296:1194-1199

24. Valuev T. A. and Mosolov V. V. 2004. Role of Inhibitors of Proteolytic Enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry* 69:1305-1309.

25. Walsh G. 2002. Proteins Biochemistry and Biotechnology. John Wiley and Sons, LTD, 210p.

26. Wang X. and Ng T. B. 2006. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342:349-353.

27. Yang X., Li J., Wang X., Fang W., Bidochka M. J., She R., Xiao Y. and Pei Y. 2006. Psc-AFP, an antifungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds. *Peptides* 27:1726-1731.