



Effect of Deep Eutectic Solvent on Stability and Structure of Matrix Metalloproteinase 9 with Therapeutic Purpose

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Mohseni S.¹ PhD,
Khajeh Kh.² PhD,
Tohidi Moghadam T.¹ PhD,
Dabirmanesh B.² PhD,
Haddadi M.² MSc

How to cite this article

Mohseni S, Khajeh Kh, Tohidi Moghadam T, Dabirmanesh B, Haddadi M. Effect of Deep Eutectic Solvent on Stability and Structure of Matrix Metalloproteinase 9 with Therapeutic Purpose. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):427-433.

¹Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jala-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran

Phone: -

Fax: -

khajeh_k@yahoo.com

Article History

Received: May 16, 2018

Accepted: July 17, 2018

ePublished: September 22, 2018

ABSTRACT

Aims Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) plays an important role in the development of many diseases such as periodontitis, atherosclerosis, and cancer. One of the methods for stability of enzyme is using deep eutectic solvents (DESS). The aim of this study was to investigate the effect of deep eutectic solvent on stability and structure of Matrix Metalloproteinase 9 with therapeutic purpose.

Materials & Methods Herein, active full length recombinant human MMP-9 (amino acid residues 107-707) was expressed in *Escherichia coli* BL21, using the vector pET21a, and purification and refolding were conducted, using urea gradient method on Ni-NTA column, simultaneously. The effect of DES based on choline chloride and glycerol with a 1:1 mol ratio was investigated on activity, stability, and structure of MMP-9. The enzyme activity at different concentrations of gelatin in the presence of 15% and 30% volume/volume DESs at pH 7.8 was investigated for obtaining V_{max} and k_m by Michaelis-Menten kinetics, using the Prism 5.0 software.

Findings With an increase in the percentage of solvents up to 30%, the specific activity of enzyme increased, followed by a decreasing trend, and in the presence of a 30% volume/volume solvent at a temperature of 50°C and 60°C, compared with a 15% solvent and no solvent, contained more residue activity. The results showed more solubility of enzyme in 30% solvent. **Conclusion** MMP-9 has the highest activity in presence of 30% volume/volume DES based on choline chloride and glycerol. Increase in thermal stability of MMP-9 can be attributed to compactness of structure in the presence of DES.

Keywords Matrix Metalloproteinase 9; Deep Eutectic Solvent; Thermal Stability; Residual Activity

CITATION LINKS

[1] Matrix metalloproteinases [2] Engineering autoactivating forms of matrix metalloproteinase-9 and expression of the active enzyme in cultured cells and transgenic mouse brain [3] Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis [4] New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression [5] APMA (4-aminophenylmercuric acetate) activation of stromelysin-1 involves protein interactions in addition to those with cysteine-75 in the propeptide [6] Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications [7] Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents [8] Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents [9] Deep eutectic solvents (DESS) are viable cosolvents for enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis [10] Molecular cloning: A laboratory manual [11] A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [12] Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin [13] Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling [14] Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in osteosarcoma: Review and meta-analysis [15] Neutrophil gelatinase B and chemokines in leukocytosis and stem cell mobilization [16] On the diffusion of ferrocenemethanol in room-temperature ionic liquids: An electrochemical study [17] New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel

اثر حلال فرازودگداز بر پایداری و ساختار آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ با هدف درمانی

سارا محسنی PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

خسرو خواجه PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

طاهره توحیدی مقدم PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

بهاره دبیرمنش PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مژده حدادی MSc

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در پیشرفت روند بسیاری از بیماری‌ها مانند پریودنتیت، آترواسکروزیس و سرطان‌ها نقش بسزایی دارد. یکی از روش‌های پایداری آنزیم استفاده از حلال‌های فرازودگداز است. هدف این پژوهش، بررسی اثر حلال فرازودگداز روی پایداری و ساختار آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ با هدف درمانی بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ فرم فعال (۷۰۷-۱۰۷۰ توالی رزیدوی آمینواسیدی) با استفاده از وکتور بیانی pET21a در باکتری *شریشیا کلی* (*Escherichia coli*) سویه BL21 بیان و تخلیص و ریفلودینگ آنزیم توسط روش گرادیان شیب اوره به‌طور همزمان روی ستون نیکل سفارز انجام شد. سپس تاثیر حلال فرازودگداز بر پایه کولین‌کلراید و گلیسرول با نسبت مولی ۱:۱ بر فعالیت، پایداری و ساختار آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ بررسی شد. فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف ژلاتین در حضور حلال‌های فرازودگداز ۱۵ و ۳۰٪ حجمی/حجمی در pH=۷/۸ برای به‌دست‌آوردن Vmax و Km با رسم نمودار میکائیلیس-منتن و استفاده از نرم‌افزار Prism version 5.0 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: با افزایش درصد حلال‌ها تا ۳۰٪، فعالیت ویژه آنزیم افزایش یافت و پس از آن روند کاهشی داشت و در حضور حلال ۳۰٪ حجمی/حجمی در دو دمای ۵۰ و ۶۰°C در مقایسه با حلال ۱۵٪ و عدم حضور حلال دارای فعالیت باقیمانده بیشتری بود. نتایج نشان‌دهنده پایداری بیشتر آنزیم در حلال ۳۰٪ بود.

نتیجه‌گیری: آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در حضور حلال فرازودگداز ۳۰٪ حجمی/حجمی بر پایه کولین‌کلراید و گلیسرول دارای بیشترین فعالیت و پایداری است. افزایش پایداری حرارتی آنزیم را می‌توان به فشردگی ساختار آن در حضور حلال فرازودگداز نسبت داد.

کلیدواژه‌ها: آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹، حلال فرازودگداز، پایداری حرارتی، فعالیت باقیمانده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۶

*نویسنده مسئول: khajeh_k@yahoo.com

مقدمه

ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) از آنزیم‌های وابسته به روی (Zinc) هستند که علیه پروتئین‌های بافت پیوندی از جمله کلاژن، پروتئوگلیکان و الاستین، فعالیت پروتئولیتیک دارند^[1]. تحقیقات نشان داده است که این خانواده آنزیمی نه تنها در تغییرات فیزیکی بافت غشای پایه و اتصالات خارج سلولی نقش دارند، بلکه در شرایط پاتولوژیک شامل پیشرفت و رشد تومورها و بسیاری از بدخیمی‌ها موثرند. بین اعضای این خانواده، ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ تنها عضوی است که توانایی هضم ژلاتین را دارد و یکی از مهم‌ترین ترکیبات بافت غشای پایه است و به‌عنوان یک مارکر سرطانی و التهابی امیدبخش برای بررسی وضعیت بیماران

شناخته شده است^[2, 3]. فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ توسط آلفا ۲-ماکروگلوبولین‌ها و مهارکننده بافتی نوع ۱ (TIMP-I) مهار می‌شود. تغییر در سطح بیان مهارکننده بافتی نوع ۱ به سبب این که به‌طور مستقیم بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ طی فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک تاثیر می‌گذارد، بسیار مهم و قابل توجه است^[4, 5]. بنابراین اخیراً سنتز مهارکننده‌ها برای جلوگیری از فعالیت آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ با هدف درمانی توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. سنتز مهارکننده‌ها نیاز به بررسی دقیق ساختار سوم آنزیم توسط روش‌های رایج آزمایشگاهی مانند تفرق اشعه ایکس دارد. به‌منظور تحقق این هدف نیاز است که آنزیم پایداری، ساختار خود را در شرایط فیزیکی و شیمیایی حفظ نماید.

امروزه استفاده از حلال‌ها برای پایداری آنزیم‌ها و پروتئین‌ها به‌ویژه در محیط کاتالیز آنزیمی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در سال‌های اخیر، نسل جدیدی از حلال‌ها با عنوان حلال‌های فرازودگداز (DESS) معرفی شده‌اند. این حلال‌ها علی‌رغم داشتن تشابهاتی با حلال‌های یونی، حلال‌هایی ارزان و ایمن برای کاتالیز به شمار می‌آیند^[6]. گورک و همکاران گزارش کرده‌اند که واکنش ترانس‌استریفیکاسیون توسط آنزیم لیپاز در حلال‌های فرازودگداز بر پایه کولین‌کلراید و دهنده پیوند هیدروژنی مانند اوره و گلیسرول در مقایسه با محلول تولوئن، با حساسیت و انتخاب‌پذیری بهتری انجام می‌شود^[7]. همچنین ژائو و همکاران در سال ۲۰۱۱ تاثیر حلال‌های فرازودگداز را بر پایه نمک‌های کولین‌کلراید، کولین‌استات و گلیسرول به‌عنوان دهنده پیوند هیدروژنی بر پروتئازهای مانند کیموتریپسین و سوبستیلین بررسی کرده‌اند. این گروه از محققان افزایش فعالیت پروتئازها را در حلال‌های فوق گزارش کردند^[8]. فعالیت هیدرولازی آنزیم اپوکسیدهدرولاز نیز در حلال‌های فرازودگداز گزارش شده و بین حلال‌های فرازودگداز مختلف، مخلوط فرازودگداز کولین‌کلراید گلیسرول، کارآمدترین محیط معرفی شد^[9].

بنابراین با توجه به چنین پیشینه‌ای از به‌کارگیری حلال‌های فرازودگداز به‌منظور افزایش فعالیت و پایداری آنزیم‌ها، حلال فرازودگداز کولین‌کلراید و گلیسرول به‌عنوان حلال انتخابی برای بررسی کاتالیز آنزیمی ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در این پژوهش انتخاب شد. در واقع هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر حلال فرازودگداز روی پایداری و ساختار آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ با هدف درمانی بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر از تریس، تربیتون و عصاره مخمر (liofilchem؛ ایتالیا)، فنیل‌متیل‌سولفونیل‌فلوراید (PMSF)، سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS) و اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید (EDTA؛ سیگما؛ ایالات متحده)، ستون نیکل سفارز (Ni-NTA؛ Qiagen؛ آلمان)، آگارز (GibcoBRL؛ مرلند)، آمپی‌سیلین و ایزوپروپیل‌تیوبوتا-دی‌گالاکتوزید (IPTG؛ فرمنتاز؛ ایالات متحده)، سایر مواد شیمیایی و کیت‌های استخراج پلاسמיד (مرک؛ آلمان)، سلول‌های باکتری *شریشیا کلی* (*Escherichia coli*) سویه BL21 (Novagen؛ ایالات متحده) و پلاسמיד بیانی pET21a حاوی توالی فرم فعال آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (GenCust؛ لوکزامبورگ) استفاده شد.

ترانسفورم و بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹: پلاسמיד pET21a حاوی فرم فعال آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ به

۱٪، الکتروفورز شدند^[13]. ژل در دمای اتاق با تریتون ایکس-۱۰۰ شست و شو و سپس در محلول ۲۰ میلی مولار Tris/HCl، ۵ میلی مولار کلسیم کلرید (CaCl₂) در دمای ۳۷°C و pH برابر ۷/۸ به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. پس از رنگ آمیزی با کوماسی بلو، باندهای بی رنگ حاصل از تجزیه آنزیم مشخص شد.

تهیه حلال فرازودگداز: حلال مورد نظر در این مطالعه، با نسبت ۱:۱ از گلیسرول و کولین کلراید انتخاب شد. به منظور سنتز، دو ماده شیمیایی خالص با توجه به نسبت مولی صحیح در داخل بشر مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل در داخل ژل سلیکون و حضور مگنت در دمای حدود ۷۰°C و برای مدت زمان تقریبی ۶۰ دقیقه حرارت داده شد تا در نهایت مایع شفاف که همان حلال فرازودگداز است، حاصل شود.

تعیین رقت بهینه از حلال فرازودگداز: به منظور تعیین رقت بهینه از حلال فرازودگداز، سریال رقتی به صورت درصد حجمی/حجمی از حلال نسبت به کل حجم، سنجش و در مقادیر ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ تهیه شد. سپس فعالیت آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در بافر حاوی ۲۰ میلی مولار Tris/HCl، ۵ میلی مولار CaCl₂ و یک میکرومولار کلریدروی (ZnCl₂) در حضور سوبسترای ژلاتین ۱٪ در هر یک از رقت های تهیه شده از حلال ها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین فعالیت آنزیم در بافر بدون حضور حلال به عنوان کنترل منفی، سنجش و پس از مقایسه نتایج، رقت بهینه حلال فرازودگداز در حجم نهایی سنجش آنزیمی تعیین شد. فعالیت ویژه آنزیم براساس روش اندپوینت (endpoint) در هر یک از درصدها مورد بررسی قرار گرفت.

ساختار سه بعدی آنزیم در حضور و عدم حضور حلال فرازودگداز توسط فلورسانس ذاتی با طول موج برانگیختگی ۲۹۰ و طیف نشری در بازه ۳۱۸ تا ۴۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی ساختار سوم آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در حلال کولین کلراید و گلیسرول (۱:۱)، از ۱۰، ۱۵ و ۳۰٪ حجمی/حجمی حلال استفاده شد.

تعیین پارامترهای سینتیک آنزیم ها در حضور حلال فرازودگداز: در این مطالعه پارامترهای سینتیک برای سوبسترای ژلاتین محاسبه شد. پارامترهای سینتیک آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ با تعیین فعالیت آنزیم در حضور حلال فرازودگداز با ۲٪ حجمی/حجمی ۱۵ و ۳۰٪ با نسبت ۱:۱ از گلیسرول و کولین کلراید در غلظت های مختلف سوبسترا در pH برابر ۷/۸ برای به دست آوردن V_{max} و K_m با رسم منحنی های سینتیک میکائلیس- منتن و لینیویر- بورک به دست آمد. رسم منحنی و محاسبات سینتیک با استفاده از نرم افزار prism 5.0 انجام شد. تمام آزمایشات سه بار تکرار شدند.

بررسی پایداری حرارتی آنزیم: پایداری حرارتی آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در دماهای ۵۰ و ۶۰°C در بافر حاوی ۲۰ میلی مولار Tris/HCl با pH برابر ۷/۸، ۵ میلی مولار CaCl₂ و یک میکرومولار ZnCl₂ در حضور حلال با ۲٪ حجمی/حجمی ۱۵ و ۳۰٪ به مدت ۶۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. سپس در فاصله های زمانی ۱۰ دقیقه ای، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه از محلول آنزیمی خارج و برای مدت ۳۰ دقیقه درون یخ قرار گرفته و باقیمانده فعالیت آنزیمی طبق روش ذکر شده برای تعیین فعالیت آنزیمی تعیین شد. نمونه آنزیمی که در حرارت قرار نگرفت، به عنوان کنترل (۱۰۰٪ فعالیت) در نظر گرفته شد. سپس نمودار درصد فعالیت باقیمانده علیه زمان ترسیم شد. آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در دماهای ۵۰ و ۶۰°C در بافر تریس ۲۰ میلی مولار با pH برابر ۷/۸ حاوی

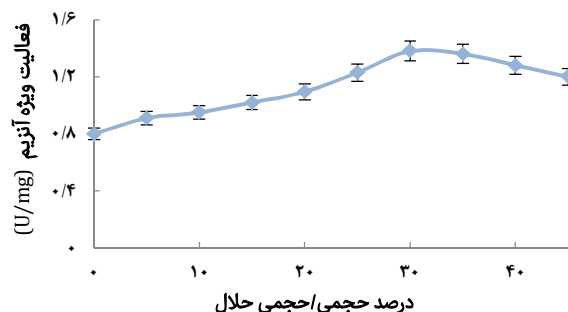
باکتری مستعد/شریشیا کلی سویه (E.coli BL21- BL21-DE3) به روش شوک سرمایی و گرمایی ترانسفورم شد^[10]. سپس کلنی باکتری حاوی پلاسمید در محیط کشت لوریا برتانی (LB) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی سیلین در دمای ۳۷°C به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. در ادامه سلول های باکتریایی در محیط کشت 2xYT حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تلقیح شدند. پس از رسیدن جذب نوری به میزان ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، دو غلظت ۰/۵ و یک میلی مولار IPTG و مدت زمان انکوباسیون ۶ و ۲۲ ساعت در دمای ۲۵°C برای تعیین شرایط بهینه انتخاب شد. سلول های باکتریایی توسط سانتریفیوژ با ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شدند. از آنجایی که آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ به صورت اجسام توده ای در رسوب باقی می ماند، رسوب باکتریایی حاصل در بافر حاوی ۲۰ میلی مولار تریس- هیدروکلریک اسید (Tris/Hcl)، ۲ میلی مولار اوره، ۵۰۰ میلی مولار سدیم کلرید (NaCl) و ۱٪ تریتون ایکس-۱۰۰ حل شد. محلول حاصل، سونیکه (۲۰ بار پالس در ۲۱ ثانیه) و سپس رسوب حاصل از آن در بافر حاوی ۲۰ میلی مولار Tris/Hcl، ۶۰ میلی مولار اوره، ۵۰۰ میلی مولار NaCl و ۵ میلی مولار ایمیدازول، حل و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق شیک شد. به منظور جداسازی محلول رویی حاوی آنزیم، سانتریفیوژ با ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. در نهایت برای حصول اطمینان به منظور تایید بیان آنزیم از تکنیک الکتروفورز سدیم دودوسیل سولفات- الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) استفاده و آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ با وزن ملکولی ۵۵ کیلودالتون براساس روش ذکر شده جداسازی شد.

تخلیص و ریفلدینگ آنزیم: به منظور انجام سنجش های آنزیمی، نیاز به بیان بالای آنزیم ها به شکل فعال و خالص سازی آنها است. به منظور تخلیص آنزیم های مورد نظر از روش کروماتوگرافی تمایلی (به کمک ستون Ni-NTA) استفاده شد. آنزیم های نوترکیب بیان شده دارای دنباله هیستیدینی در انتهای آمین (N-terminal) خود هستند. آنزیم روی ستون، تخلیص و به روش گردایان اوره، ریفلد شد. برای انجام فرآیند ریفلدینگ از بافر حاوی ۲۰ میلی مولار Tris/Hcl، ۵۰۰ میلی مولار NaCl و ایمیدازول ۵ میلی مولار با گردایان اوره صفر تا ۶۰ میلی استفاده شد. در آخر برای جداسازی پروتئین های متصل به ستون از بافر جداکننده حاوی ۵۰ میلی مولار ایمیدازول استفاده شد. برای اطمینان از خلوص پروتئین از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE استفاده و غلظت آن توسط روش برادفورد با رسم منحنی استاندارد به کمک پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) سنجش شد^[11].

بررسی فعالیت آنزیم: نمونه های آنزیمی به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به ویال ها اضافه شدند. در ویال شاهد همان حجم از بافر بدون نمونه آنزیمی ریخته و با فواصل زمانی مناسب به هر ویال به میزان ۶۰ میکرولیتر ژلاتین ۱٪ اضافه شد. حجم نهایی ویال ها با اضافه کردن بافر تریس ۲۰ میلی مولار به ۵۰۰ میکرولیتر رسید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. بعد از انکوبه کردن نمونه ها، حدود ۱۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس با استفاده از جذب محلول های استاندارد تیروزین و نمونه های آنزیمی، منحنی استاندارد تیروزین (جذب علیه میکرومول تیروزین) رسم و واحد آنزیمی محاسبه شد^[12].

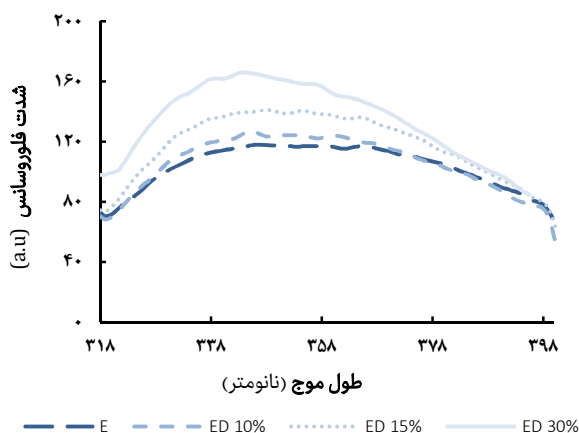
برای بررسی فعالیت آنزیم توسط روش زایموگرام، نمونه ها در بافر لودینگ، رقیق و با ژل ۱۲/۵ SDS-PAGE کاپیلیمیزه با ژلاتین

رقت بهینه از حلال فرازودگداز و بررسی فعالیت آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹: با افزایش درصد حلال‌ها تا ۳۰٪، فعالیت ویژه آنزیم افزایش یافت و پس از آن روند کاهشی داشت (نمودار ۱).



نمودار ۱) تغییرات فعالیت ویژه آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در حلال کولین کلراید و گلیسرول (۱:۱) در بافر ۲۰ میلی‌مولار تریس، ۵ میلی‌مولار CaCl_2 و یک میکرومولار ZnCl_2 در pH برابر ۷/۸

بررسی ساختار سه‌بعدی آنزیم در حلال فرازودگداز کولین کلراید و گلیسرول: شدت فلورسانس ذاتی در حلال ۱۰٪ در مقایسه با بافر تفاوت چندانی نداشت، اما افزایش چشمگیری در حلال‌های ۱۵ و ۳۰٪ ملاحظه شد. فشردگی ساختار آنزیم در حضور حلال‌های فرازودگداز ۱۵ و ۳۰٪ بیشتر از حلال ۱۰٪ و بافر بود (نمودار ۲).



نمودار ۲) طیف فلورسانس ذاتی آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در حلال کولین کلراید و گلیسرول (۱:۱) در بافر ۲۰ میلی‌مولار تریس، ۵ میلی‌مولار CaCl_2 و یک میکرومولار ZnCl_2 در pH برابر ۷/۸: E: آنزیم، ED: حلال

تعیین پارامترهای سینتیک آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در حلال فرازودگداز بر پایه کولین کلراید و گلیسرول: ثابت کاتالیتیک (k_{cat}) و کارایی کاتالیتیک آنزیم در حضور حلال فرازودگداز نسبت به آنزیم در شرایط عدم حضور حلال افزایش یافت. بنابراین افزایش فعالیت آنزیم را می‌توان به پایداری آن در حلال‌ها نسبت داد (جدول ۱؛ نمودار ۳).

جدول ۱) پارامترهای سینتیک آنزیم در عدم حضور و حضور حلال‌های فرازودگداز ۱۵ و ۳۰٪

آنزیم	غلظت سوبسترا (k_m : میکرومول)	ثابت کاتالیتیک (k_{cat} : میکرومول بر دقیقه)	کارایی کاتالیتیک (k_{cat}/k_m)
آنزیم بدون حلال	۰/۰۹	۰/۰۱۲	۰/۱۳
آنزیم در حضور حلال ۱۵٪	۰/۰۷	۰/۰۱۶	۰/۲۲
آنزیم در حضور حلال ۳۰٪	۰/۰۵	۰/۰۲۲	۰/۴۴

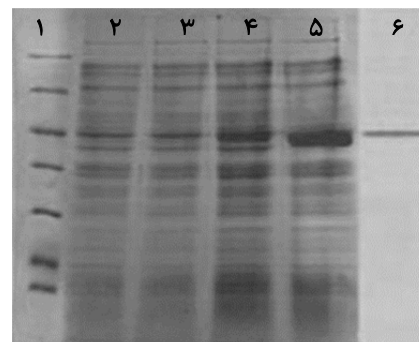
۵ میلی‌مولار CaCl_2 به همراه حلال فرازودگداز ۱۵ و ۳۰٪ حجمی/حجمی به مدت یک ساعت مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار در فاصله‌های زمانی ۱۰ دقیقه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه از محلول آنزیمی خارج و برای مدت ۳۰ دقیقه درون یخ قرار گرفت و باقیمانده فعالیت آنزیمی طبق روش ذکر شده برای تعیین فعالیت آنزیمی محاسبه شد. فعالیت باقیمانده هر یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری و با فعالیت آنزیم بدون حضور حلال مقایسه و به صورت درصد فعالیت نسبی محاسبه شد.

به منظور بررسی پایداری حرارتی آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ پارامتر نیمه عمر آنزیم‌ها در دماهای ۵۰ و ۶۰°C، حلال‌های فرازودگداز ۱۵ و ۳۰٪ حجمی/حجمی مورد مقایسه قرار گرفتند. پارامتر نیمه عمر مدت زمانی است که پس از انکوباسیون آنزیم در آن دما، آنزیم، نیمی از فعالیت خود را دارد.

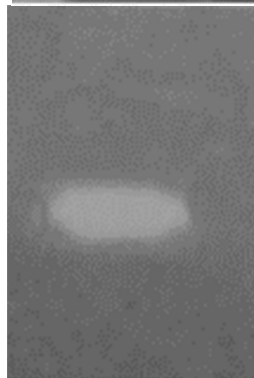
یافته‌ها

ترانسفورم، بیان و تخلیص آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹: یک میلی‌مولار IPTG به مدت ۲۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵°C به عنوان بهترین شرایط برای بیان آنزیم انتخاب شد (شکل ۱- الف). تخلیص و ریفرودینگ آنزیم به روش گرادیان اوره روی ستون نیکل سفارز به طور همزمان، انجام و خلوص آنزیم جداسازی شده توسط SDS-PAGE مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱- الف). فعالیت پروتئینازی آنزیم توسط هیدرولیز ژلاتین و زایموگرافی بررسی شد (شکل ۱- ب).

(الف)



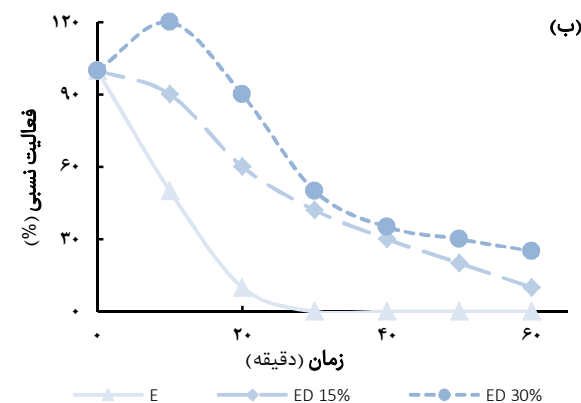
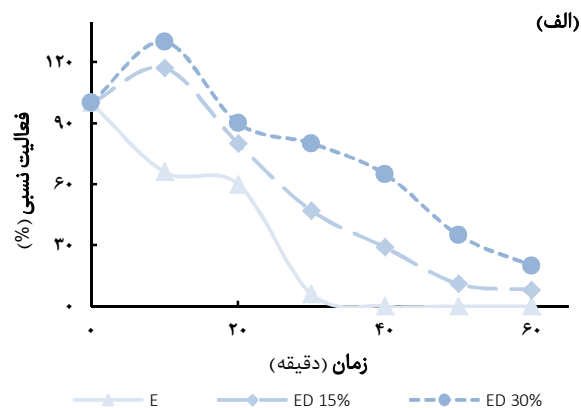
(ب)



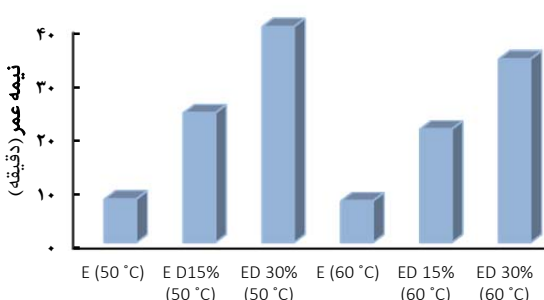
شکل ۱) بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در محیط کشت 2xYT توسط غلظت‌های مختلف IPTG و تجزیه ژلاتین توسط آنزیم به روش زایموگرافی؛ الف) بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (ردیف ۱: پروتئین مارکر، ردیف ۲: ۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۲۵°C و ۶ ساعت انکوباسیون، ردیف ۳: یک میلی‌مولار IPTG در دمای ۲۵°C و ۶ ساعت انکوباسیون، ردیف ۴: ۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۲۵°C و ۲۲ ساعت انکوباسیون، ردیف ۵: یک میلی‌مولار IPTG در دمای ۲۵°C و ۲۲ ساعت انکوباسیون، ردیف ۶: پروتئین تخلیص شده)، ب) تجزیه ژلاتین توسط آنزیم به روش زایموگرافی

اثر حلال فرازودگداز بر پایداری و ساختار آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ با هدف درمانی ۴۳۱ حلال ۳۰٪ حجمی/حجمی در دو دمای ۵۰ و ۶۰°C در مقایسه با حلال ۱۵٪ و عدم حضور حلال دارای فعالیت باقیمانده بیشتری بود. نتایج نشان‌دهنده پایداری بیشتر آنزیم در حلال ۳۰٪ بود (نمودار ۴).

آنزیم در حلال ۳۰٪ نسبت به حلال ۱۵٪ و همچنین عدم حضور حلال، پایداری حرارتی و نیمه‌عمر بیشتری داشت (نمودار ۵).



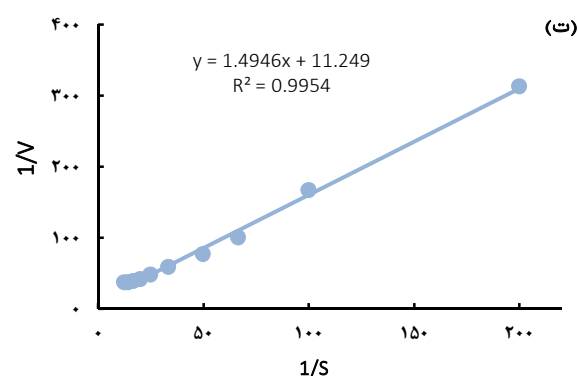
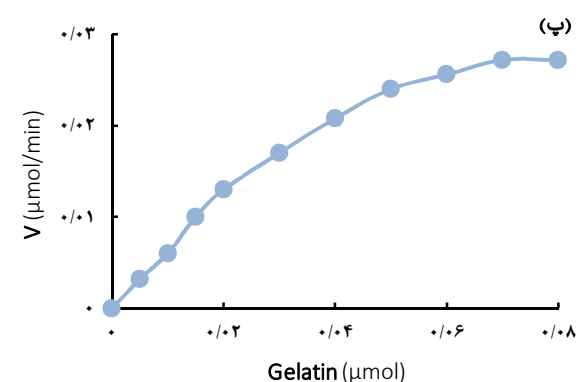
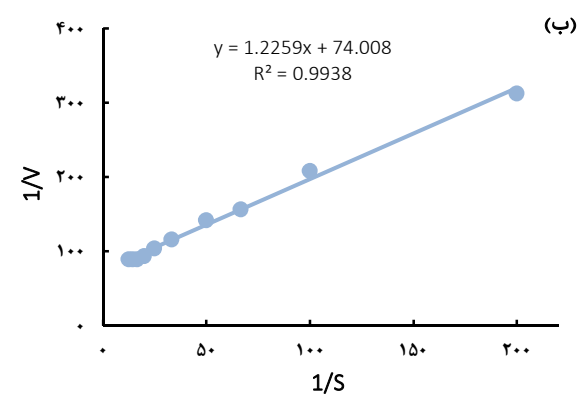
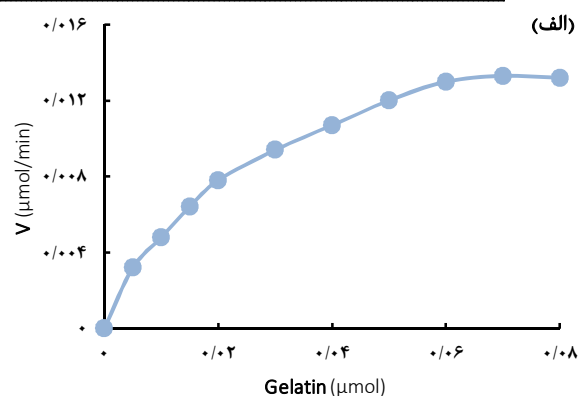
نمودار ۴ پایداری حرارتی در حلال‌های فرازودگداز ۱۵ و ۳۰٪ حجمی/حجمی بر پایه کولین کلراید و گلیسرول (۱:۱) در دو دمای ۵۰ و ۶۰°C؛ (الف) پایداری حرارتی در حلال‌های فرازودگداز ۱۵ و ۳۰٪ حجمی/حجمی در دمای ۵۰°C، (ب) پایداری حرارتی در حلال‌های فرازودگداز ۱۵ و ۳۰٪ حجمی/حجمی در دمای ۶۰°C



نمودار ۵ مقایسه تاثیر حضور و عدم حضور حلال‌های فرازودگداز بر پایداری حرارتی و نیمه‌عمر آنزیم

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر حلال فرازودگداز روی پایداری و ساختار آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ با هدف درمانی انجام شد. ماتریکس متالوپروتئینازها، اندوپیتیدازهای وابسته به روی هستند که در بیماری‌های التهابی حاد از لوکوسیت‌های چندهسته‌ای،



نمودار ۳ نمودارهای میکائیلیس-منتن و لینویر-بورک ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در حضور حلال‌های فرازودگداز ۱۵ و ۳۰٪؛ (الف، ب) نمودار میکائیلیس-منتن و لینویر-بورک ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در حضور حلال فرازودگداز ۱۵٪، (پ، ت) نمودار میکائیلیس-منتن و لینویر-بورک ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در حضور حلال فرازودگداز ۳۰٪

بررسی حلال‌های فرازودگداز بر پایه کولین کلراید و گلیسرول روی پایداری حرارتی آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹: آنزیم در حضور

را در پی داشت. در واقع کاهش فعالیت آنزیم در غلظت‌های بالای حلال‌های فرازودگداز را می‌توان به افزایش ویسکوزیته محلول، کاهش میزان دسترسی آنزیم و سوبسترا نسبت داد. کاهش فعالیت آنزیمی در غلظت‌های بالاتر حلال، پدیده‌ای مستقل از اثر حلال بر دنا توره شدن پروتئین بود و این امر به دلیل کاهش شانس برخورد موثر آنزیم و سوبسترا در غلظت‌های بالای حلال و ویسکوزیته زیاد آن است. براساس مطالعات فلورسانس ذاتی، درصد حجمی/حجمی ۱۵ و ۳۰ از حلال فرازودگداز در مقایسه با حلال ۱۰٪ و بافر، از نظر شدت فلورسانس افزایش چشمگیری داشت که نشان‌دهنده فشردگی و فولدینگ بهتر آنزیم است. همچنین کارایی کاتالیتیک آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در حضور حلال‌های ۱۵ و ۳۰٪ حجمی/حجمی نسبت به بافر افزایش یافت. بررسی‌های پایداری حرارتی در دو دمای ۵۰ و ۶۰°C در حضور حلال‌های ۱۵ و ۳۰٪ حجمی/حجمی هم موید پایداری آنزیم در مقایسه با استفاده از بافر به‌تنهایی بود. افزایش پایداری حرارتی را می‌توان به فشرده‌تر شدن ساختار در حضور این حلال نسبت داد که در نتیجه از دنا توره شدن حرارتی آنزیم ممانعت می‌کند. به‌طور خلاصه با توجه به مزایای متعدد حلال‌های فرازودگداز از جمله کم‌هزینه‌بودن، خنثی‌بودن (از نظر شیمیایی نسبت به آب)، تهیه آسان، زیست‌تخریب‌پذیری، سازگاری با محیط زیست و نداشتن سمیت، به‌کارگیری آنها در حیطه پژوهش و صنعت بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

نتیجه‌گیری

آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در حضور حلال فرازودگداز ۳۰٪ حجمی/حجمی بر پایه کولین کلراید و گلیسرول دارای بیشترین فعالیت و پایداری است. افزایش پایداری حرارتی این آنزیم را می‌توان به فشردگی ساختار آن در حضور حلال فرازودگداز نسبت داد.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از اساتید و پژوهشگران دانشگاه تربیت مدرس به‌دلیل همکاری علمی و حمایت مالی سپاسگزاری می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

سهم نویسندگان: سارا محسنی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ خسرو خواجه (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ طاهره توحیدی مقدم (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ بهاره دبیرمنش (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ مژده حدادی (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر توسط دانشگاه تربیت مدرس حمایت مالی شده است.

منابع

- 1- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999;274(31):21491-4.
- 2- Fisher KE, Fei Q, Laird ER, Stock JL, Allen MR, Sahagan BG, et al. Engineering autoactivating forms of matrix metalloproteinase-9 and expression of the active enzyme in cultured cells and transgenic mouse brain. Biochemistry. 2002;41(26):8289-97.

مشتق و آنزیم‌های کلیدی برای تجزیه ماتریکس کلاژن خارج سلولی محسوب می‌شوند. خانواده ماتریکس متالوپروتئینازها در فرآیندهای طبیعی بدن مانند پیشرفت جنینی، تکثیر، رگ‌زایی، پیشرفت استخوان، بهبود زخم، مهاجرت سلولی، یادگیری و حافظه نقش دارند^[14]. غالباً ماتریکس متالوپروتئینازها به شکل غیرفعال، ترشح و توسط پروتئینازهای خارج سلولی شکسته و فعال می‌شوند^[15]. از بین متالوپروتئینازها، متالوپروتئیناز ۹ به‌دلیل تجزیه کلاژن تیپ ۴ در غشای پایه در روند پیشرفت بیماری‌های کشنده مانند سرطان‌ها برای ایجاد رگ‌زایی، تهاجم و متاستاز دخالت دارد. بنابراین با توجه به نقش ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در ایجاد بیماری‌های التهابی و سرطان‌زا، طراحی و سنتز مهارکننده‌هایی برای جلوگیری از فعالیت آنزیم لازم و ضروری است. بدین منظور بهبود خواص عملکردی و ساختاری آنزیم از اهمیت بسیاری برخوردار است. با توجه به خواص حلال‌های فرازودگداز و امکان اعمال تغییر خواص مختلف آنزیمی مانند پایداری ساختار در حضور این حلال‌ها، در این مطالعه به بررسی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در حضور این گروه از حلال پرداخته شد.

حلال‌های فرازودگداز به‌عنوان گروه ویژه‌ای از حلال‌های یونی و به‌منظور رفع نقایص حلال‌های یونی (سمیت و پرهزینه‌بودن)، در اوایل قرن حاضر معرفی شدند و در سال‌های اخیر به‌عنوان حلال‌های سبز در حوزه صنعت و پژوهش بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند^[16]. در نتیجه می‌توان از این حلال‌ها بسته به نیاز و با توجه به خواص مختلف فیزیکی و شیمیایی مثل نقطه ذوب (بسیار پایین‌تر از اجزای تشکیل‌دهنده اولیه)، ویسکوزیته (عموماً دارای ویسکوزیته بالا هستند)، چگالی (با افزایش نسبت نمک آلی به گروه پیوند هیدروژنی‌دهنده افزایش می‌یابد)، قطبیت (که با تغییر نسبت نمک آلی به گروه پیوند هیدروژنی‌دهنده، قابل تغییر است) و هدایت یونی (با توجه به ویسکوزیته بالا، اغلب هدایت یونی پایینی دارند) استفاده نمود^[17].

یکی از اهداف این پژوهش بیان و تخلیص آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ نو ترکیب به شکل کامل و فعال دارای دومین‌های کاتالیتیک، لینکر و هموپکسین در باکتری *شریشیا کلی* سویه BL21 بود. در این بررسی وکتور pET21a شامل توالی cDNA آنزیم دارای بخش فعال و کامل، طراحی و سپس در باکتری مستعد، ترانسفورم و از محیط 2xYT به‌عنوان یک محیط غنی‌شده برای بیان آنزیم استفاده شد. همچنین لازم به ذکر است به‌دلیل این که آنزیم مذکور به‌صورت جسم توده‌ای درون سلول رسوب می‌کند، بهتر است برای بیان از دمای پایین استفاده شود. بنابراین به‌منظور بیان آنزیم به میزان زیاد از شرایط بهینه شامل غلظت یک میلی‌مولار IPTG، دمای ۲۵°C و زمان انکوباسیون ۲۲ ساعت استفاده شد. به‌طور کلی بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در پروکاریوت‌ها نسبت به میزبان یوکاریوتی مقرون‌به‌صرفه‌تر است و امکان آلودگی با سایر پروتئینازها و مهارکننده‌های آنزیم کاهش می‌یابد. نتایج نشان داد که تخلیص و ری‌فولدینگ آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ به‌طور همزمان به روش گرادیان اوره روی ستون از تشکیل تجمع (aggregation)، میان‌کنش‌های بین مولکولی و پیوندهای نابجای درون مولکولی جلوگیری کرد. سپس نقش حلال فرازودگداز بر پایه کولین کلراید و گلیسرول (۱:۱) بر پایداری و فعالیت آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ مورد بررسی قرار گرفت. طبق یافته‌ها با افزایش درصد حجمی/حجمی حلال تا میزان ۳۰٪ منجر به افزایش فعالیت آنزیم شد و مقادیر بیشتر کاهش فعالیت

11- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

12- Tripathi P, Tomar R, Jagannadham MV. Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin. *Food Chem.* 2011;125(3):1005-12.

13- Castro MM, Rizzi E, Prado CM, Rossi MA, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. *Matrix Biol.* 2010;29(3):194-201.

14- Wang J, Shi Q, Yuan TX, Song QL, Zhang Y, Wei Q, et al. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in osteosarcoma: Review and meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 2014;433:225-31.

15- Starckx S, Van Den Steen PE, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B and chemokines in leukocytosis and stem cell mobilization. *Leuk Lymphoma.* 2002;43(2):233-41.

16- Lovelock KR, Ejigu A, Loh SF, Men S, Licence P, Walsh DA. On the diffusion of ferrocenemethanol in room-temperature ionic liquids: An electrochemical study. *Phys Chem Chem Phys.* 2011;13(21):10155-64.

17- Zhao H, Baker GA, Holmes S. New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. *Org Biomol Chem.* 2011;9(6):1908-16.

3- Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2000;10(6):415-33.

4- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):161-74.

5- Galazka G, Windsor LJ, Birkedal-Hansen H, Engler JA. APMA (4-aminophenylmercuric acetate) activation of stromelysin-1 involves protein interactions in addition to those with cysteine-75 in the propeptide. *Biochemistry.* 1996;35(34):11221-7.

6- Zhang Q, De Oliveira Vigier K, Royer S, Jérôme F. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev.* 2012;41(21):7108-46.

7- Gorke JT, Sreenc F, Kazlauskas RJ. Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem Commun (Camb).* 2008;(10):1235-7.

8- Zhao H, Baker GA, Holmes S. Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents. *J Mol Catal B Enzym.* 2011;72(3-4):163-7.

9- Lindberg D, De La Fuente Revenga M, Widersten M. Deep eutectic solvents (DESS) are viable cosolvents for enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis. *J Biotechnol.* 2010;147(3-4):169-71.

10- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.