Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2):305-311

Expression, Purification, and Stability Study of Uricase in Escherichia coli

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Daneshjoo S.*[1] *PhD,*
Dashtban Moghadam E.S.[2] *PhD,*
Jaafari M.R.[3] *PhD,*
Rezayat sorkhabadi S.M.[4] *PhD,*
Khajeh Kh.*[2] *PhD*

How to cite this article
Daneshjoo S, Dashtban Moghadam E.S, Jaafari M.R, Rezayat sorkhabadi S.M, Khajeh Kh. Expression, Purification, and Stability Study of Uricase in Escherichia coli. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2): 305-311.

[1]Medical Nanotechnology Department, Advanced Science & Technology Faculty, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3Nanotechnology Research Center, Pharmacy Faculty, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[4]Medical Nanotechnology Department, Advanced Technologies in Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82884717
Fax: +98 (21) 82884717
khajeh_k@yahoo.com

Article History
Received: August 22, 2017
Accepted: October 28, 2017
ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Some diseases such as gout, the formation of kidney stones, Lesch-Nyhan syndrome, Heart disease, diabetes type II and metabolic syndrome are caused due to the high concentration of uric acid. Within drugs, uricase significantly decreases the level of uric acid in plasma. The production, formulation and preservation proteins need special conditions so that there was no alteration in their structure and highest activity and response, at the same time the lowest immunogenicity can be achieved.In this study, uricase from Aspergillus flavus was cloned and expressed in Escherichia coli BL21. The protein was then purified using affinity chromatography. The enzyme activity and stability were compared with the common industrial Rasburicase. Results showed higher activity and stability at different temperatures (50, 37, 25, 4, and-20°C). Since uricase has an important role in the prevention and cure of mentioned diseases, therefore, the stable form of this enzyme could be a potential candidate for drug development.

Keywords Uricase; Rasburicase; Gout; Uric Acid; Thermal Stability

CITATION LINKS

[1] Improving the in vitro stability of proteins by PEGylation [Dissertation] [2] Pharma 2010: The threshold of innovation [Internet] [3] Handbook of modern pharmaceutical analysis [4] Stability of protein pharmaceuticals: An update [5] Protein drug stability: A formulation challenge [6] Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis [7] Uricase production by a recombinant Hansenula polymorpha strain harboring Candida utilis uricase gene [8] Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice [9] Improved performance of polyaniline-uricase biosensor [10] Immobilization of uricase within polystyrene using polymaleimidostyrene as a stabilizer and its application to uric acid sensor [11] Complexed and ligand-free high-resolution structures of urate oxidase (Uox) from Aspergillus flavus: a reassignment of the active-site binding mode [12] Rasburicase (Recombinant Urate Oxidase) for the Management of Hyperuricemia in Patients with Cancer: Report of an international compassionate use study [13] Rasburicase: a potent uricolytic agent [14] Recombinant urate oxidase (rasburicase) in the prevention and treatment of malignancyassociated hyperuricemia in pediatric and adult patients: results of a compassionate-use trial [15] High-level expression, purification, and characterization of non-tagged Aspergillus flavus urate oxidase in Escherichia coli [16] Enzymatic determination of uric acid in serum with the trinder reaction (author's transl) [17] A rapid and sensitive method for the quantization of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [18] Degradation of low molecular weight uremic solutes by oral delivery of encapsulated enzyme [19] In vitro and in vivo activity of soluble cross-linked uricase-albumin polymers: A model for enzyme therapy [20] Enzymatic degradation of uric acid by uricase-loaded human erythrocytes [21] Biochemical and biopharmaceutical properties of macromolecular conjugates of uricase with dextran and polyethylene glycol [22] PEGylation: Posttranslational bioengineering of protein biotherapeutics [23] Characterization, stabilization and activity of uricase loaded in lipid vesicles [24] Improvement of chymotrypsin enzyme stability as single enzyme nanoparticles

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

بیان، تخلیص و پایداری آنزیم اوریکاز در باکتری *اشریشیا کلی*

سمیه دانشجو PhD
گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
الهه‌سادات دشتبان‌مقدم PhD
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
محمودرضا جعفری PhD
مرکز تحقیقات نانوفناوری، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد، ایران
سیدمهدی رضایت PhD
گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ایران
خسرو خواجه* PhD
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده
به‌دنبال غلظت بالای اوریک‌اسید، بیماری‌هایی مانند نقرس (التهاب مفاصل)، شکل‌گیری سنگ‌های کلیوی، سندرم لیش- نیهان، بیماری‌های قلبی، دیابت تیپ ۲ و سندرم‌های متابولیک ایجاد می‌شود. از جمله داروهایی که موجب کاهش سطح آن در پلاسما می‌شود آنزیم اوریکاز است. تولید، فرمولاسیون و نگهداری پروتئین‌ها نیاز به توجه خاصی دارد تا ساختار آن تغییر نکند و بیشترین میزان فعالیت و پاسخ و کمترین میزان حساسیت‌زایی به دست آید، در این مطالعه، آنزیم اوریکاز پس از کلون، ترانسفورم، بیان در باکتری *اشریشیا کلی* و تخلیص توسط کروماتوگرافی تمایلی، در مقایسه با نمونه رایج دارویی آنزیم Rasburicase فعالیت بالاتری داشته و نیز در همه دماهای مورد مطالعه پایداری حرارتی (۵۰، ۳۷، ۲۵، ٤ و ۲۰°C-)، آنزیم اوریکاز نوترکیب دارای مقاومت بیشتری نسبت به آنزیم رایج دارویی است. حال با توجه به نتایج به‌دست‌آمده و همچنین اهمیت بالای آنزیم اوریکاز در پیشگیری، درمان و قیمت بالای این داروی وارداتی، توسعه اشکال پایدار این آنزیم میتواند به‌عنوان مصارف دارویی مد نظر قرار گیرد.
کلیدواژه‌ها: اوریکاز، Rasburicase، نقرس، اسیداوریک، پایداری حرارتی

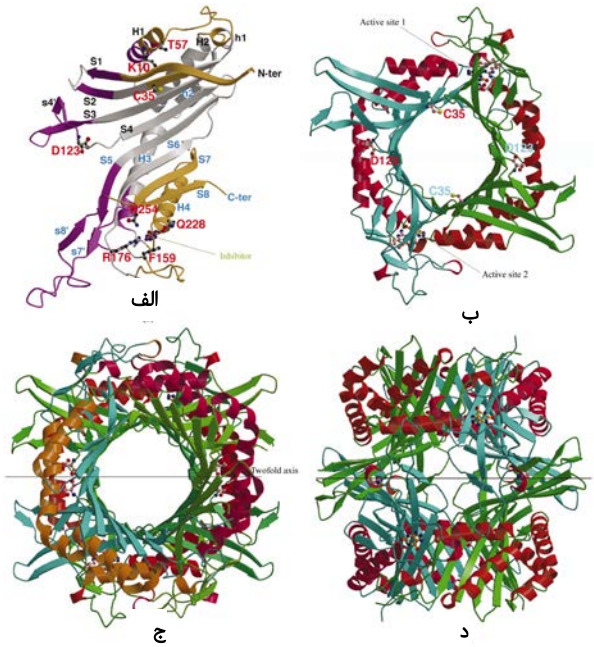
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۶
*نویسنده مسئول: khajeh_k@yahoo.com

مقدمه

پروتئین‌ها به‌عنوان دسته مهمی از داروها در درمان، بهبود یا جلوگیری از بیماری‌ها کاربرد دارند. این داروهای پروتئینی با استفاده از تکنولوژی‌های نوترکیب و انتقال ژنتیکی تولید می‌شوند[1]. بسیاری از داروهای جدید بر پایه فناوری‌های زیستی و استفاده از پروتئین‌ها بنا نهاده شده‌اند. دلیل استقبال عمومی به این داروها را می‌توان به سمیت اندک و رفتار "*درون‌تنی*" (In Vivo) قابل پیش‌بینی مرتبط دانست. از سوی دیگر داروهای نوترکیب با سرعت بیشتری از داروهای قدیمی و شیمیایی وارد بازار دارویی می‌شوند[2]. در مقایسه با مولکول‌های کوچک، پروتئین‌ها از لحاظ ساختاری پیچیدگی زیادی دارند. از دیگر خصوصیات قابل توجه داروهای پروتئینی جرم مولکولی بالای این داروها است[3]. علی‌رغم مزایای عنوان‌شده در مورد داروهای پروتئینی، این فرآورده‌های دارویی واجد مشکلاتی از قبیل ناپایداری ذاتی و نیمه‌عمر اندک بوده و نیز مستعد تخریب آنزیماتیک هستند[4]. از سوی دیگر به‌منظور توسعه داروهای پروتئینی، محققین دارویی با مشکلات زیادی روبه‌رو هستند. موفقیت یک داروی پروتئینی در درمان به عوامل مختلفی از قبیل خصوصیات فیزیکوشیمیایی مشخص، پایداری فیزیکی و شیمیایی، خاصیت ایمنی‌زایی و خصوصیات فارماکوکینتیکی مطلوب بستگی دارد[5].

به‌طور کلی می‌توان ناپایداری‌های پروتئینی را به دو دسته کلی ناپایداری‌های فیزیکی و ناپایداری‌های شیمیایی تقسیم‌بندی نمود[4, 6]. از مهم‌ترین عوامل ناپایداری فیزیکی پروتئین‌ها می‌توان به دناتوراسیون، جذب سطحی، تجمع و رسوب اشاره نمود. بنابراین بررسی ناپایداری آنزیم‌های دارویی و به‌کارگیری راهبردهایی برای پایدارسازی آنها اهمیت فراوانی دارد.

آنزیم دارویی اورات‌اکسیداز یا اوریکاز آنزیمی پراکسی‌زومی است و در اکثر مهره‌داران اکسیداسیون اوریک‌اسید به آلانتوئین را کاتالیز می‌کند. آلانتوئین یک متابولیت غیرفعال متابولیزم پورین‌ها است و ۵ تا ۱۰برابر از اسیداوریک محلول‌تر است، بنابراین دفع آن از طریق کلیه بهتر صورت می‌گیرد[7]. اسیداوریک در خون اکثراً به‌صورت نمک تک‌سدیمی یا به‌صورت آزاد است که در هر دو صورت نامحلول است و تجمع غیرمعمول آن در بدن معمولاً به‌صورت هایپراورسمیا بروز می‌کند. به‌دنبال غلظت بالای اوریک‌اسید بیماری‌هایی چون بیماری نقرس (التهاب مفاصل)، شکل‌گیری سنگ‌های کلیوی، سندرم لیش‌نیهان، دیابت تیپ ۲ و سندرم‌های متابولیک ایجاد می‌شود[8]. داروهایی که موجب کاهش سطح آن در پلاسما می‌شوند شامل الوپورینول، ایموران، کلوفیبرات، کورتیکواستروئیدها، استروژن‌ها، دیورتیک‌ها، انفوزیون‌های گلوکز، گایفنزین، وارفارین و آنزیم اوریکاز هستند که با توجه به کیفیت بالا و تدارکات کم‌هزینه آنزیم‌های میکروبی، استفاده از آنزیم اوریکاز عملی و رایج شده است. این آنزیم از سویه‌های میکروبی مانند میکروکوکوس، بروی‌باکتریوم، استرپتومیسس، کاندیدا، باسیلوس، سودوموناس، آرتروباکتر و آسپرژیلوس جدا شده است[9-10] (شکل ۱).



شکل ۱) (الف) توپولوژی آنزیم اورات‌اکسیداز (ب) مونومر آنزیم؛ رزیدوهای درگیر در تترامریزاسیون به رنگ سرخابی و رزیدوهای درگیر در دایمریزاسیون به رنگ طلایی نشان داده شده‌اند، (ج) و (د) دو نمای قائم از تترامر

اورات‌اکسیداز یک آنزیم گلوبولار و هموتترامر پایدار در محیط آبی با سایز ۵۰×۵۰آنگستروم مربع است که تونلی به قطر ۱۲ و طول ۵۰آنگستروم را در بر گرفته است. هر مونومر ترکیبی از دو دومین است که از نظر ساختاری معادل هم هستند و اصطلاحاً به آن

www.SID.ir

Archive of SID

Tunnelling-fold یا T-fold گفته می‌شود. مونومرها در اثر اتصالات هیدروژنی (بیش از ٤٠ پیوند هیدروژنی) با هم پیوند داده و به شکل دایمر در می‌آیند. در نهایت یک بشکه بتا با ١٦ رشته بتا و ٨ هلیکس که بخش خارجی آن را می‌سازند، شکل می‌گیرد. تترامر فعال با اتصال دو دایمر توسط پیوندهای هیدروژنی شکل می‌گیرد[11] (شکل ١).

امروزه این آنزیم با منشا *آسپرژیلوس فلاووس* به دو صورت تجاری Uricozyme و Rasburicase تولید می‌شود که برای کاربردهای درمانی مورد تایید FDA است. همچنین از این آنزیم در تهیه زیست‌حسگر برای کارهای تشخیصی استفاده وسیعی می‌شود[12-15]. در این مطالعه با توجه به اثرات بارز خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین ها و نیز افزایش پایداری پروتئین‌های دارویی از سوی دیگر، و با توجه به اهمیت بالای آنزیم اوریکاز در پیشگیری و درمان بیماری‌هایی مانند نقرس و قیمت بالای این داروی وارداتی، آنزیم اوریکاز در باکتری *اشریشیا کلی* کلون، ترانسفرم و بیان شد و پس از بهینه‌کردن بیان و تخلیص، فعالیت و پایداری این آنزیم، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد: در مطالعه تجربی حاضر اسیداوریک و فنول (سیگما؛ ایالات متحده آمریکا)، ستون Ni-NTA (کیاژن؛ آلمان)، کانامایسین و IPTG (فرمنتاز؛ کانادا)، سایر مواد شیمیایی مورد نیاز و همچنین کیت‌های استخراج پلاسمید (مرک؛ آلمان) به کار رفتند. سلول‌های باکتری *اشریشیا کلی* BL21 (DE3) نیز از شرکت نواژن (ایالات متحده) و سنتز ژن اوریکاز از شرکت ژن‌کاست (لوکرامبورگ) تهیه شد.

بیان آنزیم اوریکاز: از باکتری *اشریشیا کلی* سویه DH5α به‌منظور ترانسفورم و تکثیر ژن استفاده شد. در این پژوهش سویه BL21(DE3) به‌عنوان میزبان اختصاصی برای بیان ژن کلون‌شده استفاده شد. *اشریشیا کلی* BL21 (DE3) پس از کشت در محیط 2XYT مایع حاوی ١٠گرم تریپتون، ٥گرم عصاره مخمر، ١٠گرم سدیم‌کلرید و آنتی‌بیوتیک کانامایسین ٥٠میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، شبانه روی شیکر و در دمای ٣٧°C قرار گرفت. عمل تلقیح سپس از همین کشت‌های شبانه در ارلن‌های محتوی محیط کشت مایع 2XYT که از پیش استریل شده بودند و نیز محتوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین بودند، انجام شد. به‌منظور القا از IPTG ٠/٤میلی‌مولار استفاده شد. میزان محیط کشت موجود در ارلن به نسبت یک‌پنجم حجم ارلن در نظر گرفته می‌شود تا بدین‌ترتیب طی رشد باکتری‌ها هوادهی مناسب انجام شود. به‌ازای هر ١٠٠میلی‌لیتر از محیط کشت موجود در ارلن به میزان یک‌میلی‌لیتر از کشت شبانه افزوده شد و در دمای ٣٧°C و دستگاه شیکر با دور ١٨٠rpm قرار گرفت. زمانی که OD باکتری‌ها در طول موج ٦٠٠نانومتر به محدوده ٠/٧-٠/٤ رسید، IPTG به میزان ٠/٤میلی‌مولار در کنار شعله و در شرایط استریل به محیط‌های حاوی باکتری افزوده شد. این ارلن‌ها مجدداً روی شیکر ولی این‌بار در دمای ٣٠°C قرار گرفتند. پس از شش ساعت کشت، سپس سوسپانسیون باکتری‌های القاشده به‌مدت ١٠دقیقه با سرعت ٣٥٠٠×g در دمای ٤°C سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری به‌دست‌آمده با افزودن یک‌میلی‌لیتر بافر لیزکننده، به حالت سوسپانسیون درآمد. بافر لیزکننده دارای pH برابر ٧ و حاوی ٥٠میلی‌مولار تریس، ٣٠٠میلی‌مولار سدیم‌کلرید ٢٠میلی‌مولار ایمیدازول است. پس از آن سوسپانسیون باکتری تحت سونیکاسیون قرار گرفت. برنامه سونیکاسیون شامل ١٠ مرحله ٢٠ثانیه‌ای با فاصله زمانی ٣٠ثانیه بین هر مرحله بود. به‌علاوه برای جلوگیری از تخریب گرمایی تمامی مراحل سونیکاسیون در حضور یخ صورت گرفت. سلول‌های لیزشده، در دمای ٤°C با ١٥٥٠٠×g به‌مدت ٢٠دقیقه سانتریفیوژ شدند. فعالیت و میزان بیان پروتئین در سوپ رویی به‌ترتیب از طریق سنجش فعالیت آنزیمی و SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های دارای فعالیت و بیان بالا در این مرحله برای خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند.

تخلیص و سنجش غلظت پروتئین: تخلیص پروتئین‌های نوترکیب به روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از ستون نیکل سفارز طی یک مرحله صورت گرفت. در این مطالعه آنزیم‌های نوترکیب دارای دنباله هیستیدینی هستند که این دنباله تمایل زیادی به نیکل داشته و میانکش محکمی با آن برقرار می‌کند. قبل از انجام تخلیص، ابتدا ستون کروماتوگرافی توسط بافر شست‌وشو یا تعادلی شامل ٥٠میلی‌مولار تریس، ٣٠٠میلی‌مولار سدیم‌کلرید و ٢٠میلی‌مولار ایمیدازول با pH ٨ به تعادل رسید. سپس نمونه حاصل از لیز سلولی که دوباره سانتریفیوژ شده به ستون منتقل و به‌طور کامل از ستون عبور داده شد و به‌دنبال آن ستون توسط بافر شست‌وشو، شسته شد و در آخر برای جداسازی پروتئین متصل به ستون از بافر جداکننده استفاده شد. بافر جداکننده حاوی ٣٠٠میلی‌مولار سدیم‌کلرید، ٢٥٠میلی‌مولار ایمیدازول، ٥٠میلی‌مولار تریس با pH برابر با ٨ است. رقابت ایمیدازول موجود در این بافر با هیستیدین برای اتصال به نیکل سبب خروج پروتئین از ستون می‌شود. برای جلوگیری از تخریب گرمایی پروتئین مورد نظر و تاثیر پروتئازهای موجود در محیط، تخلیص در یخ و با استفاده از بافرهای سردشده، صورت گرفت. در نهایت پروتئین تخلیص‌شده جمع‌آوری شد و برای حصول اطمینان از خلوص نمونه‌ها تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE احیایی به کار رفت. پس از اطمینان از خلوص پروتئین (پروتئین تک‌باند روی ژل SDS-PAGE) همه نمونه‌های خالص روی هم ریخته شد و ٢میلی‌لیتر از آن در مقابل ٣لیتر بافر ٢٠میلی‌مولار تریس-HCl با pH برابر ٧/٤ به‌مدت ١٨ساعت دیالیز شد.

ژل تغلیظ‌کننده (بالا) با غلظت ٥% و ژل جداکننده (پایین) با غلظت ١٢/٥% مورد استفاده قرار گرفت. رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی‌بریلانت‌بلو R250 انجام شد. سپس به‌منظور سنجش غلظت پروتئین‌ها از روش برادفورد استفاده شد و در هر مورد با رسم منحنی استاندارد به کمک پروتئین BSA و معرف برادفورد، غلظت نمونه‌های پروتئینی مشخص شد[16].

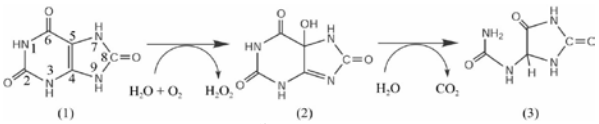
سنجش فعالیت آنزیم اوریکاز: سنجش فعالیت آنزیم براساس واکنش ترینذر صورت گرفت[17]. در این واکنش برای سنجش فعالیت آنزیم‌هایی با فعالیت اکسیدازی که هیدروژن‌پراکسید تولید می‌کنند استفاده می‌شود. در این واکنش معرف ترینذر که شامل آمینوآنتی‌پیرین و فنول است برای سنجش استفاده می‌شود. هیدروژن‌پراکسید تولیدشده در اثر اکسیداسیون با فنول و آمینوآنتی‌پیرین واکنش داده و تولید ترکیبی رنگی به نام کوئینون‌ایمین یا کوئینون می‌کند. این واکنش توسط پراکسیداز تربچه کوه (HRP) کاتالیز می‌شود. کوئینون ترکیبی قرمز-بنفش است که در طول موج‌های ٥٠٠-٥٥٠نانومتر اندازه‌گیری می‌شود[15, 18-20]. برای تعیین فعالیت آنزیم اوریکاز از روش کینتیکی فوق، بافرهای زیر استفاده شده است:

١) اسیداوریک ٢میلی‌مولار در بافر فسفات ٢٠میلی‌مولار با pH برابر ٧، ٢) کوکتل (معرف ترینذر) شامل ٤-آمینوآنتی‌پیرین ٣٠میلی‌مولار و فنول ١/٥% در بافر فسفات ٢٠میلی‌مولار با pH برابر

www.SID.ir

Archive of SID

۷، ۳) پراکسیداز (HRP) ۱۰۰واحد برمیلی‌لیتر برای هر بار سنجش آنزیم در حجم ۳۵۰میکرولیتر؛ ۲۰۰میکرولیتر سوبسترا ،۱۰۰میکرولیتر کوکتل و ۳۰میکرولیتر HRP و ۵۰میکرولیتر آنزیم اوریکاز وجود داشت که در ۵۱۰نانومتر تغییرات جذب آنزیم توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و با درنظرگرفتن ε=۶/۵۸ $mM^{-1}cm^{-1}$ فعالیت آنزیم برحسب میکرومول بر دقیقه محاسبه شد (شکل ۲).

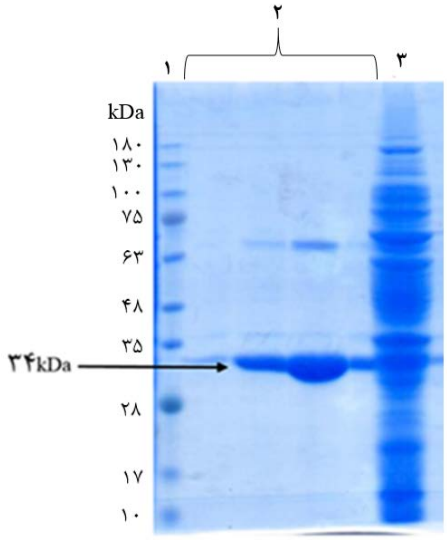


شکل ۲) واکنش تجزیه اسیداوریک به آلانتوئین با تولید حدواسط ۵-هیدروکسی‌ایزواورات (۲) فقط مرحله اول این مسیر با تولید H_2O_2 توسط آنزیم کاتالیز می‌شود.

بررسی پایداری حرارتی آنزیم: پایداری حرارتی آنزیم در دو دمای ۳۷، ۵۰°C و پایداری درازمدت آنزیم در دو دمای ٤ و ۲۰°C- در بافر فسفات ۲۰میلی‌مولار با میزان pH برابر با ۷/٤ مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه‌گیری سرعت غیرفعال‌سازی با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پس از تیمار دمایی به دست می‌آید. به این منظور نمونه‌های آنزیم اوریکاز در زمان‌های مختلف پس از انکوباسیون از بن‌ماری خارج شده و به‌مدت ۳۰دقیقه روی یخ قرار گرفتند. فعالیت باقیمانده هر یک از نمونه‌ها طبق روش ارایه‌شده برای تعیین فعالیت آنزیمی، اندازه‌گیری شد. به‌عنوان کنترل آنزیم رایج دارویی به کار رفت. نمونه آنزیمی که در حرارت قرار نگرفته است به‌عنوان کنترل (۱۰۰% فعالیت) در نظر گرفته شد.

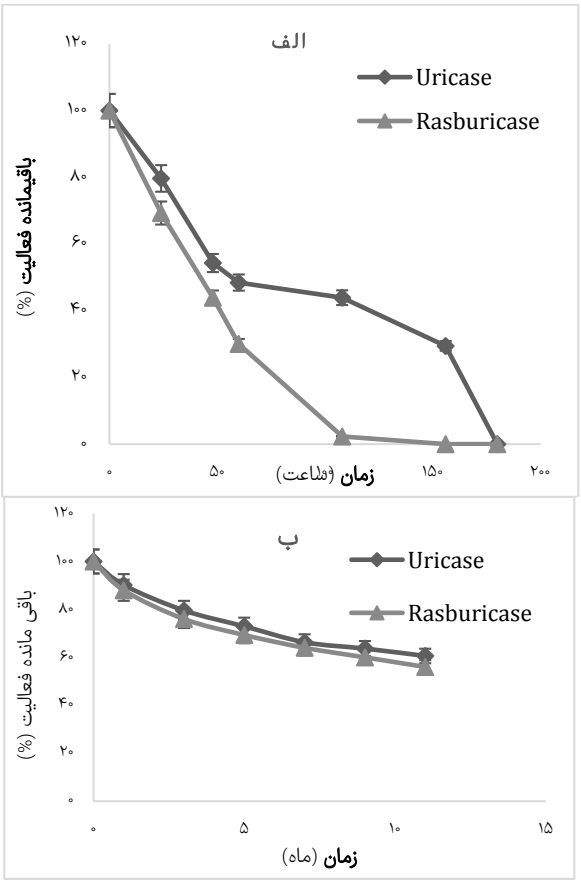
یافته‌ها

بیان و تخلیص آنزیم اوریکاز: بعد از انتقال وکتور حاوی ژن اوریکاز به میزبان بیانی مناسب و رسیدن به بیان بهینه با مشاهده ژل SDS-PAGE مشخص شد که آنزیم در مایع رویی است و سپس با استفاده از ستون نیکل‌سفارز تخلیص شد. بررسی ژل پلی‌آکریل‌آمید پس از الکتروفورز نمونه‌های تخلیص‌شده، تک‌باندهایی با وزن مولکولی حدود ۳٤کیلودالتون را نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳) بررسی SDS-PAGE آنزیم اوریکاز؛ ۱) استاندارد وزن مولکولی (استاندارد وزن مولکولی بر حسب کیلودالتون مشخص شده است)، ۲) باندهای مربوط به تخلیص پروتئین، ۳) نمونه قبل از تخلیص

بررسی پایداری حرارتی آنزیم و مقایسه آن با آنزیم رایج دارویی Rasburicase: پایداری آنزیم تولیدی اوریکاز نوترکیب با آنزیم رایج دارویی Rasburicase در دماهای ۵۰، ۳۷، ٤ و ۲۰°C- بررسی شد. نتایج حاصله نشان‌دهنده پایداری بیشتر آنزیم اوریکاز در مقایسه با شکل رایج دارویی آن است. در دمای ۲۰°C- ، آنزیم دارویی بعد از ۱۰۸ساعت تقریباً تمام فعالیت خود را از دست داده است در حالی که آنزیم اوریکاز نوترکیب بعد از گذشت این زمان هنوز ٤۳% فعالیت خود را حفظ کرده است (نمودار ۱- الف). در دمای ٤°C، بعد از ۱۱ ماه آنزیم اوریکاز نوترکیب ٦۰% و آنزیم دارویی ۵۰% فعالیت خود را حفظ کرده‌اند (نمودار ۱- ب).



نمودار ۱) لگوی غیرفعال‌شدن در دماهای الف) ۲۰°C- و ب) ٤°C در حضور تریس ۵۰میلی‌مولار؛ فعالیت اولیه آنزیم قبل از انکوباسیون ۱۰۰% در نظر گرفته شده است. نتایج به‌دست‌آمده سه بار تکرار شده‌اند.

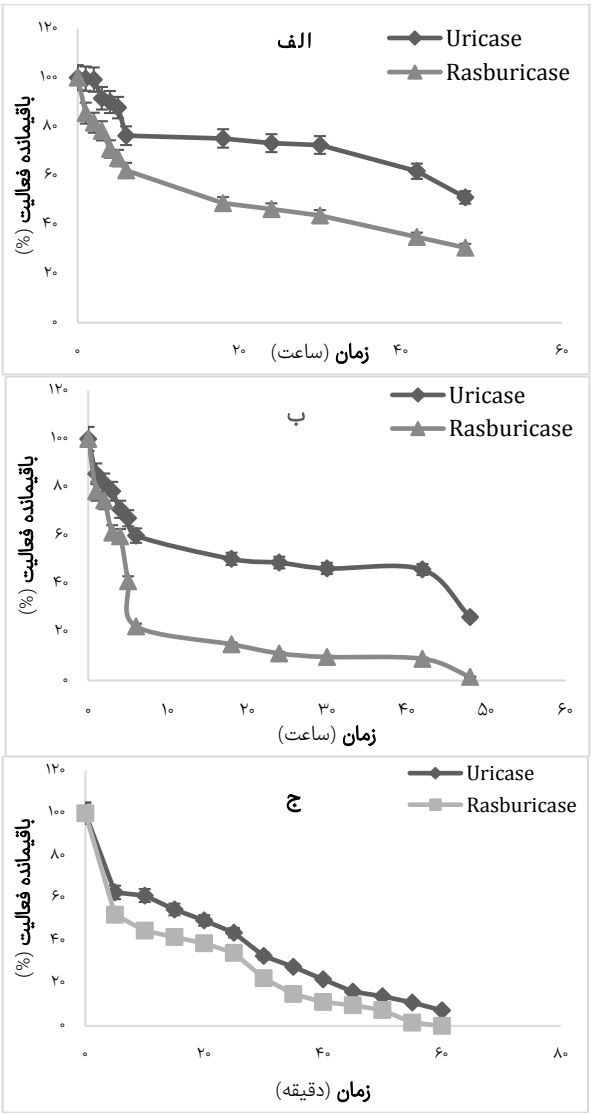
پایداری آنزیم اوریکاز در دمای ۲۵°C مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد پس از گذشت ٤۸ساعت Rasburicase تنها ۳۰% فعالیت خود را دارد در حالی که آنزیم اوریکاز نوترکیب بیش از ۵۰% فعالیت خود را حفظ کرده است (نمودار ۲- الف).

در ادامه برای بررسی پایداری حرارتی آنزیم، دو دمای ۳۷ و ۵۰°C انتخاب شد و نتایج نشان داد که در دمای ۳۷°C بعد از گذشت ٤۸ساعت آنزیم دارویی تقریباً تمام فعالیت خود را از دست داده است در حالی که آنزیم اوریکاز نوترکیب هنوز فعال بوده و ۲٦% از فعالیت خود را حفظ کرده است (نمودار ۲- ب).

در دمای ۵۰°C آنزیم دارویی بعد از ۵دقیقه فعالیتش به نصف رسیده و بعد از ۵۵دقیقه تقریباً فعالیتش به صفر می‌رسد در حالی که آنزیم اوریکاز نوترکیب بعد از ۲۰دقیقه فعالیتش به نصف رسیده و بعد از یک‌ساعت مقدار باقیمانده فعالیت برابر ۷/۲% است (نمودار ۲- ج).

www.SID.ir

Archive of SID

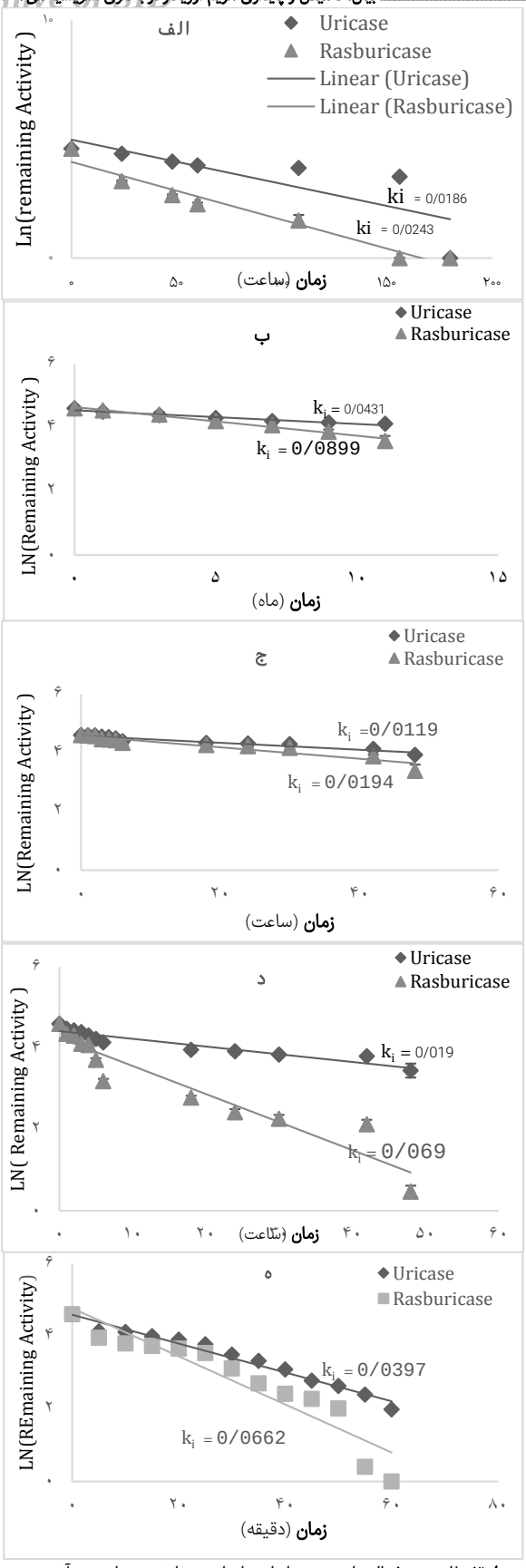


نمودار ۲) الگوی غیرفعال‌شدن الف) دمای ۲۵°C ب) دمای ۳۷°C ج) دمای ۵۰°C در حضور تریس ۵۰میلی‌مولار؛ فعالیت اولیه آنزیم قبل از انکوباسیون ۱۰۰% در نظر گرفته شده است. نتایج به‌دست‌آمده سه بار تکرار شده‌اند.

ثابت غیرفعال‌سازی در دماهای مختلف: با به‌دست‌آوردن و بررسی ثابت غیرفعال‌سازی در دماهای پایداری حرارتی و درازمدت آنزیم (جدول ۱)، نتایج نشان داد که آنزیم اوریکاز نوترکیب در تمامی دماهای مورد بررسی نسبت به آنزیم اوریکاز نوترکیب پایداری بیشتری دارد و با سرعت کمتری فعالیت خود را از دست می‌دهد (نمودار ۳). با درنظرگرفتن کاهش فعالیت آنزیم نسبت به زمان و فرض درجه‌اول‌بودن واکنش مربوطه، ثابت سرعت غیرفعال‌شدن محاسبه و در جدول ۱ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که در همه دماهای مورد مطالعه پایداری آنزیم اوریکاز نوترکیب مقاومت بیشتری نسبت به آنزیم رایج دارویی دارد.

جدول ۱) ثابت غیرفعال‌سازی آنزیم اوریکاز نوترکیب و تجاری در دماهای مختلف

k_i آنزیم دارویی	k_i آنزیم اوریکاز	دما
۰/۰۲۴۳±۰/۰۰۱۲	۰/۰۱۸٦±۰/۰۰۰۹	-۲۰°C
۰/۰۸۹۹±۰/۰۰٤٤	۰/۰٤۳۱±۰/۰۰۲۱	٤°C
۰/۰۱۹٤±۰/۰۰۰۹	۰/۰۱۱۹±۰/۰۰۰۵	۲۵°C
۰/۰٦۹±۰/۰۰۳٤	۰/۰۱۹±۰/۰۰۰۱	۳۷°C
۰/۰٦٦۲±۰/۰۰۳۳	۰/۰۳۹۷±۰/۰۰۱۹	۵۰°C



نمودار ۳) ثابت غیرفعال‌سازی در دماهای پایداری حرارتی و درازمدت آنزیم در دماهای نگه‌داری الف) ۲۰°C- و ب) ٤°C و دماهای ج) دمای ۲۵°C د) دمای ۳۷°C ه) دمای ۵۰°C در حضور تریس ۵۰میلی‌مولار؛ فعالیت اولیه آنزیم قبل از انکوباسیون ۱۰۰% در نظر گرفته شده است. نتایج به‌دست‌آمده سه بار تکرار شده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

یکی از مهم‌ترین مباحث در زیست‌فناوری نوین و مهندسی پروتئین، پایدارسازی پروتئین‌ها و به‌ویژه آنزیم‌ها به‌منظور استفاده از آنها در صنعت و داروسازی بوده است و در این راستا نیز تاکنون، راهکارهای گوناگون و متنوعی برای پایداری انواع پروتئین‌ها گزارش شده است[4]. همان‌طور که قبلاً هم اشاره شد اخیراً بسیاری از داروهای جدید بر پایه فناوری‌های زیستی و استفاده از پروتئین‌ها بنا نهاده شده‌اند. شناخت پایداری آنزیم‌های دارویی از اهمیت بسزایی در رفع مشکلات پیش‌رو به‌منظور توسعه داروهای پروتئینی و همچنین موفقیت آن در درمان برخوردار است.

بهبود پایداری اوریکاز، در پژوهش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است، تثبیت آنزیم با استفاده از میکروکپسول‌های آلژینات[18]، اتصال عرضی آلبومین و اوریکاز که باعث پایداری حرارتی آن و مقاوم‌شدن به پروتئولیز می‌شود و نیمه‌عمر آنزیم را نسبت به آنزیم وحشی تا شش‌برابر افزایش می‌دهد[19]، تثبیت اوریکاز روی اریتروسیت‌ها به‌عنوان حامل یا اتصال اوریکاز به غشای خارجی اریتروسیت که به‌دلیل غلظت بالای اریتروسیت‌ها با کارآیی و سرعت زیادی (۲۱میکرومول بر لیتر در دقیقه) می‌تواند اسیداوریک را تجزیه کند[20]، کونژوگه‌کردن اوریکاز با دکستران یا پلی‌اتیلن‌گلیکول[21]، پگیلاسیون اختصاصی اوریکار و تولید پوریکاز[22]، و استفاده از نانولیپوزوم‌ها به‌عنوان پوششی برای جلوگیری از صدمه به ساختار آنزیم از این رو مورد توجه قرار گرفته است که همزمان می‌تواند فعالیت و پایداری آنزیم را بالا ببرد[23].

مشکلی که در این روش‌ها وجود دارد، غیرفعال‌شدن آنزیم در طی مراحل تثبیت آنزیم و اتصال آن به سطح است، که گاهی باعث تغییر کنفورماسیون آنزیم تثبیت شده است. همچنین مشکلاتی از قبیل میانکنش آنزیم با سطح بستر، ناپایداری فیزیکی بستر تثبیت به‌دلیل تولید حباب‌های اکسیژن در اثر فعالیت آنزیم، کاهش فعالیت آنزیم در pH فیزیولوژیک و آمادگی یوریکاز برای خروج از وزیکول‌ها نیز وجود دارند[23].

به‌طور کلی راهکارهای مختلفی برای رفع نقیصه‌های داروهای پروتئینی و افزایش پایداری آنها مطرح است. از جمله این راهکارها، مهندسی واکنش حد واسط، ایجاد ساختار آنزیمی با پایداری بیشتر با تغییر محیط اطراف آنزیم نه خود آنزیم است[24].

در تحقیق حاضر، پس از ترانسفورم، بیان آنزیم با شرایط مختلف بررسی و شرایط بهینه انتخاب شد. پس از تخلیص آنزیم به‌دست‌آمده، میزان فعالیت و پایداری آنزیم اوریکاز در شرایط مختلف دمایی، بررسی و با نمونه رایج دارویی آنزیم مقایسه شد.

با توجه به مطالعات پایداری حرارتی این آنزیم، دارای پایداری بیشتری در دماهایی مانند ۲۵°C، ۳۷°C و ۵۰°C نسبت به آنزیم رایج دارویی هستیم. در دماهای ۴ و ۲۰°C- نیز پایداری نسبت به آنزیم دارویی افزایش پیدا کرده است. با توجه به اهمیت بالای آنزیم اوریکاز در پیشگیری و درمان بیماری‌هایی مانند نقرس و قیمت بالای این داروی وارداتی، پایداری مناسب این آنزیم به‌منظور توسعه اشکال پایدار آن به‌عنوان مصارف دارویی میتواند حائز اهمیت قرار گیرد.

در آخر باید ذکر کنیم که هر پروتئین به‌عنوان یک مولکول بی‌همتا، رفتار متفاوتی با پروتئین‌های دیگر حتی در شرایط یکسان نشان می‌دهد. بنابراین برای بررسی تغییر فعالیت و پایداری پروتئین‌ها نیاز است که شواهد و مدارک بیشتری داشته باشیم و پژوهش‌های بیشتری در این زمینه در رابطه با آنزیم‌ها و پروتئین‌های دیگر صورت گیرد. این نتایج در جمع‌آوری اطلاعات برای یک آنزیم دارویی الزامی است.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر مقدار پایین آنزیم فعال به‌دست‌آمده است. پیشنهاد می‌شود که در ادامه به‌منظور بررسی بیشتر و کامل‌تر مطالعات زیر صورت گیرد:

۱) به‌کاربردن راهکارهای مختلفی به‌منظور رفع نقیصه‌های این داروی پروتئینی و افزایش پایداری آن از جمله اصلاحات بعد از تولید نظیر اتصال به پلیمرهای سنتزی یا طبیعی به سطح پروتئین مانند پگیلاسیون که به‌عنوان فرآیندی موفقیت‌آمیز مطرح شده است.

۲) استفاده از مواد نانو ساختار برای تثبیت و پایدارسازی این آنزیم که نه‌تنها باعث افزایش پایداری فعالیت آنزیم می‌شود، بلکه سایر خواص ویژه آن، به‌عنوان یک سیستم نانوکاتالیست زیستی، را هم تقویت می‌کند. از جمله این ساختارها لیپوزوم‌ها هستند که به‌دلیل خصوصیات آمفیپاتیک (دوگانه‌دوست) عناصر سازنده آن، امکان دارورسانی داروهای هیدروفیل و لیپوفیل را فراهم می‌نمایند. ویژگی‌هایی از قبیل سمیت ذاتی پایین، زیست‌تجزیه‌پذیری و فقدان ایمونوژنیسیته، سبب شده است که لیپوزوم‌ها به‌عنوان یک حامل بسیار مناسب در سیستم‌های دارورسانی نوین مورد توجه واقع شوند.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت بالای آنزیم اوریکاز در پیشگیری و درمان بیماری‌هایی چون نقرس و قیمت بالای این داروی وارداتی، پایداری بالای آنزیم به‌دست‌آمده به‌منظور توسعه اشکال با پایداری بالای آنزیم به‌عنوان مصارف دارویی می‌تواند حائز اهمیت قرار گیرد.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
سهم نویسندگان: سمیه دانشجو (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۵%)؛ الهه‌سادات دشتبان‌مقدم (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰%)؛ محمودرضا جعفری (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰%)؛ سیدمهدی رضایت (نویسنده چهارم) پژوهشگر کمکی (۱۰%)؛ خسرو خواجه (نویسنده پنجم) روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۵%)
منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

1- Rodriguez-martinez JA. Improving the in vitro stability of proteins by PEGylation [Dissertation]. Puerto Rico: University of Puerto Rico, ProQuest Dissertations Publishing; 2010.

2- Arlington S, Barnett S, Hughes S, Palo J. Pharma 2010: The threshold of innovation [Internet]. Unknown City: IBM Institute for Business Value; 2002 [cited 2018 May 15]. Available from: https://www.pharmamanufacturing.com/assets/Media/MediaManager/ibm_pharma2010_threshold-of-innovation.pdf

3- Ahuja S, Scypinski S. Handbook of modern pharmaceutical analysis. 2nd edition. 10th Volume. Cambridge: Academic press; 2010.

4- Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: An update. Pharm Res. 2010;27(4):544-75.

5- Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: A

www.SID.ir

Archive of SID

Leukemia. 2001;15(10):1505-9.
15- Li J, Chen Z, Hou L, Fan H, Weng S, Xu C, et al. High-level expression, purification, and characterization of non-tagged Aspergillus flavus urate oxidase in Escherichia coli. Protein Expr Purif. 2006;49(1):55-9.
16- Prencipe L, Fossati P, Vanzetti G. Enzymatic determination of uric acid in serum with the trinder reaction (author's transl). Quad. Sclavo Diagn. 1978;15(3):382-94. [Italian]
17- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.
18- O'loughlin JA, Bruder JM, Lysaght MJ. Degradation of low molecular weight uremic solutes by oral delivery of encapsulated enzymes. Asaio J. 2004;50(3):253-60.
19- Poznansky MJ. In vitro and in vivo activity of soluble cross-linked uricase-albumin polymers: A model for enzyme therapy. Life Sci. 1979;24(2):153-8.
20- Ihler G, Lantzy A, Purpura J, GLEw RH. Enzymatic degradation of uric acid by uricase-loaded human erythrocytes. J Clin Invest. 1975;56(3):595-602.
21- Yasuda Y, Fujita T, Takakura Y, Hashida M, Sezaki H. Biochemical and biopharmaceutical properties of macromolecular conjugates of uricase with dextran and polyethylene glycol. Chem Pharm Bull. (Tokyo). 1990;38(7):2053-6.
22- Veronese FM, Pasut G. PEGylation: Posttranslational bioengineering of protein biotherapeutics. Drug Discov. Today Technol. 2008;5(2-3):e57-64.
23- Tan QY, Wang N, Yang H, Zhang LK, Liu S, Chen L, et al. Characterization, stabilization and activity of uricase loaded in lipid vesicles. Int J Pharm. 2010;384(1-2):165-72.
24- Hegedus I, Nagy E. Improvement of chymotrypsin enzyme stability as single enzyme nanoparticles. Chem Eng Sci. 2009;64(5):1053-60.
formulation challenge. Nat Rev Drug Discov. 2005;4(4):298-306.
6- Mahler HC, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. J Pharm Sci. 2009;98(9):2909-34.
7- Chen Z, Wang Z, He X, Guo X, Li W, Zhang B. Uricase production by a recombinant Hansenula polymorpha strain harboring Candida utilis uricase gene. Appl Microbiol Biotechnol. 2008;79(4):545-54.
8- Wu X, Wakamiya M, Vaishnav S, Geske R, Montgomery Jr C, Jones P, et al. Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91(2):742-6.
9- Arora K, Sumana G, Saxena V, Gupta R, Gupta S, Yakhmi J, et al. Improved performance of polyaniline-uricase biosensor. Anal Chim Acta. 2007;594(1):17-23.
10- Wang X, Hagiwara T, Uchiyama S. Immobilization of uricase within polystyrene using polymaleimidostyrene as a stabilizer and its application to uric acid sensor. Anal Chim Acta. 2007;587(1):41-6.
11- Retailleau P, Colloc'h N, Vivares D, Bonnete F, Castro B, El-Hajji M, et al. Complexed and ligand-free high-resolution structures of urate oxidase (Uox) from Aspergillus flavus: a reassignment of the active-site binding mode. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2004;60(Pt 3):453-62.
12- Bosly A, Sonet A, Pinkerton R, McCowage G, Bron D, Sanz MA et al. Rasburicase (Recombinant Urate Oxidase) for the Management of Hyperuricemia in Patients with Cancer: Report of an international compassionate use study. Cancer. 2003;98(5):1048-54.
13- Pui CH. Rasburicase: a potent uricolytic agent. Expert Opin Pharmacother. 2002;3(4):433-42.
14- Pui CH, Jeha S, Irwin D, Camitta B. Recombinant urate oxidase (rasburicase) in the prevention and treatment of malignancyassociated hyperuricemia in pediatric and adult patients: results of a compassionate-use trial.

www.SID.ir