مقاله پژوهشی

بررسی پایداری زیرواحدهای نوترکیب و تغییریافته کالپروتکتین

فاطمه نعمتی نیکو[1]، دکتر کوروش گودرزوند چگینی[2]، دکتر نعمت‌اله غیبی[3]

[1] کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی

[2] استادیار بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، داشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

[3] دانشیار بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پیراپزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

نشانی نویسنده مسؤول: قزوین، بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پیراپزشکی، گروه بیوتکنولوژی، نعمت اله غیبی
E-mail: gheibi_n@yahoo.com

وصول:۹۳/۱۱/۲۵، اصلاح:۹۳/۱۲/۱۲، پذیرش:۹۴/۱/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: کالپروتکتین یک فاکتور دخیل در ایمنی ذاتی است و همراه با دو زیرواحد خود، S100A8 و S100A9 در فرآیندهای التهابی و تومورزایی شرکت می کند. این مطالعه به منظور بررسی پایداری دمایی زیرواحدهای طبیعی و تغییریافته کالپروتکتین نوترکیب در حضور لیگاند کلسیم انجام شد.

مواد و روش ها: زیر واحدهای نوترکیب S100A8 و S100A9 در دو شکل طبیعی و تغییر یافته با DEP ، پس از انکوباسیون با کلسیم توسط دستگاه اسپکتروسکوپی فلورسانس در محدوده دمایی ۹۵-۲۰ درجه سانتیگراد دناتوره شدند. با بدست آمدن شدت نشر فلورسانس در حالات طبیعی و دناتوره شده، تغییرات انرژی آزاد گیبس و نیز Tm در نرم افزار Excel محاسبه و میزان پایداری شکلهای مختلف پروتئین مشخص گردید.

یافته‌ها: نمودار شدت فلورسانس بر حسب تغییرات دما در سه حالت طبیعی، تغییریافته با DEP ، انکوبه شده با کلسیم و نیز محاسبه انرژی آزاد گیبس، افزایش پایداری پروتئین تغییریافته با DEP و نیز انکوبه شده با کلسیم را نسبت به نوع طبیعی پروتئین نشان داد.

نتیجه گیری: پایداری یا ناپایداری پروتئین بر عملکرد بهینه آن موثر بوده و می تواند مفید یا مضر باشد، با توجه به خواص دوگانه کالپروتکتین و زیرواحدهای آن در فرآیند سرطان، تغییر در ساختار و پایداری این پروتئین می تواند سبب تغییر در عملکرد آن و در نهایت تغییر در روند سرطان گردد. بنابراین مطالعه این پروتئین جهت مهار سرطان با استفاده از یک منبع طبیعی می تواند سودمند باشد.

کلید واژه ها: *کالپروتکتین، S100A8، S100A9 ، اسپکتروسکوپی فلورسانس، انرژی آزاد گیبس*

مقدمه

پروتئین کالپروتکتین به عنوان یک فاکتور دخیل در ایمنی ذاتی است که توسط نوتروفیلها و ماکروفاژها بیان شده(۱) و در حضور کلسیم به صورت یک هترودایمر، متشکل از دو زنجیره سبک و سنگین S100A8(8KD) و S100A9(14KD) در پروسه های التهابی ایفای نقش می کند (۲). روند التهاب و تومورزایی نیز به یکدیگر مرتبط بوده(۳) و افزایش کالپروتکتین وزیر

واحدهای آن در بسیاری از مراحل پیشرفت سرطان، گاهی با خاصیت ضدتوموری و در مواردی، القاء کنندگی تومور معلوم شده است (٤). این افزایش در پلاسما ، ادرار و یا مدفوع بیماران دیده شده (٥) و می تواند سبب تبدیل سلولهای نرمال به نئوپلاسم و سلولهای سرطانی گردد (٥). در شرایط in vivo تغییرات متعددی در ساختار زیرواحدهای سازنده کالپروتکتین ایجاد می شود که در برخی موارد نقش تنظیمی داشته و می تواند منجر به تغییر عملکرد آنها گردد (٦). استیلاسیون هیستیدینها توسط معرف DEP(diethyl pyrocarbonate) (٧) می تواند نمونه ای از این تغییرات در شرایط in vitro باشد. ایجاد تغییرات ساختاری روی زیر واحدهای نوترکیب کالپروتکتین و در مطالعات تکمیلی، بررسی عملکرد آنها در شرایط in vitro و in vivo می تواند راهگشایی برای مهار پروسه های التهابی منتهی به تومورزایی در بسیاری از سرطانها گردد (٨). تغییر در ساختار پروتئین که می تواند منجر به تغیر در میزان پایداری آن گردد ، بر تداوم یا قطع عملکرد طبیعی پروتئین تاثیرگذار است (٩)، کالپروتکتین و زیرواحدهای آن نیز که در برخی غلظتها مهارکننده و در برخی دیگر فعال کننده روند سرطان زایی هستند، پس از انجام تغییر در ساختار و کاهش یا افزایش میزان پایداری، لزوما عملکرد طبیعی خود را نخواهند داشت. بنابراین با بررسی پایداری زیرواحدهای نوترکیب طبیعی و تغییر یافته کالپروتکتین می توان امکان تغییر در عملکرد آنها را در روند التهاب و سرطان زایی پیش بینی نمود و در آینده با اهداف مختلف کلینیکی آنها را مورد مطالعه و استفاده بیشتر قرار داد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی با تکیه بر روش‌های زیست فناوری در سال ١٣٩٢، در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. از زیرواحدهای S100A8 و S100A9 نوترکیب و تغییریافته با DEP ، که حاصل از مطالعه قبلی است (١٠)، به عنوان منبع پروتئینهای نوترکیب و تغییر یافته در این مطالعه استفاده شد. کلسیم کلراید، سدیم کلراید و سدیم هیدروژن فسفات مونوبازیک از شرکت Merk (آلمان) خریداری شدند.

با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوریمتر فلورسانس Cary-Bio700، بررسی اثر تغییرات دمایی بر زیرواحدهای نوترکیب S100A8 و S100A9 در دو حالت طبیعی و تغییر یافته با DEP انجام شد. هر یک از پروتئینهای S100A8 و S100A9 در سه آزمایش جداگانه: بدون تیمار، تیمار با کلسیم و نیز حالت تغییر یافته با DEP ، تحت دناتوراسیون دمایی قرار گرفتند. در هر یک از این بررسی ها ٢٠٠ میکرولیتر از نمونه پروتئینی با غلظت ١ میکرومولار با ٢٠٠ میکرولیتر بافر دیالیز (سدیم هیدروژن فسفات مونو بازیک ٢٥ میلی‌مولار، سدیم کلراید ١٠٠ میلی‌مولار و pH=٦/٥) رقیق شد و ٤٠٠ میکرولیتر محلول پروتئینی رقیق شده در کووت با استفاده از برنامه Thermal در دستگاه فلورسانس، تنظیم شده با طول موج تحریکی ٢٨٠ نانومتر و میزان نشر تا محدوده طول موج ٣٣٠ نانومتر و طیف دمایی ٩٥-٢٠ درجه سانتیگراد، دناتوره گردید و شدت نشر آنها به دست آمد. در آزمایش تیمار با کلسیم، ٤٠٠ میکرولیتر نمونه پروتئینی با غلظت ١ میکرومولار به مدت ١٠ دقیقه با ١ میکرولیتر از کلسیم کلراید ١ میلی مولار انکوبه گردید و پس از آن مورد دناتوراسیون دمایی قرار گرفت. پروتئینهای تغییر یافته، علاوه بر DEP ١ میلی مولار، با کلسیم ١ میلی مولار نیز در مطالعه قبلی تیمار شدند و تنها در این مطالعه مورد دناتوراسیون قرار گرفتند.

یک سیستم دو وضعیتی را در نظر گرفتیم که پروتئین در این سیستم در یکی از حالت‌های طبیعی (N) و یا غیر طبیعی (D) قرار داشته و در شرایط برگشت‌پذیر یک ثابت تعادل برای سیستم تعریف می‌شود :

$$N \leftrightarrow D \ , \ K=[D]/[N]=(Y_{obs}-Y_N)/(Y_D-Y_{obs})$$

در این رابطه Y_{obs} شاخص فیزیکی قابل اندازه‌گیری

پروتئین یعنی شدت نشر فلورسانس در تعادل بین حالات N و D می باشد، Y_Nو Y_D، به ترتیب، مقادیر همان شاخص درحالت‌های N و D پروتئین می‌باشند. اختلاف انرژی آزاد گیبس(ΔG°) بین حالت‌های پروتئین طبیعی و دناتوره شده با توجه به رابطه زیر به دست می‌آید :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K = -RT \ln[(Y_{obs} - Y_N)/(Y_D - Y_{obs})]$$

در این رابطه R ثابت عمومی گازها و T دمای مطلق است. با تهیه نمودار تغییرات دما بر حسب شدت فلورسانس در دناتوراسیون دمایی و با استفاده از نرم افزار Excel، معادله شیب خط پروتئین طبیعی و دناتوره شده را بدست آورده و پس از محاسبه ثابت ترمودینامیکی K و G نمودار تغییرات دما را بر حسب تغییرات انرژی در شدتهای مختلف فلورسانس رسم کردیم ، در معادله خط بدست آمده عرض از مبدا به عنوان تغییرات انرژی آزاد گیبس و طول از مبدا T_m می باشد.

یافته‌ها

پس از انجام سه آزمایش دناتوراسیون بر روی پروتئین طبیعی، انکوبه شده با کلسیم و نیز تغییر یافته با DEP ، نمودار شدت فلورسانس بر حسب تغییرات دما بدست آمد. انرژی آزاد گیبس(ΔG°) نیز محاسبه و نمودار آن رسم گردید(نمودار ۱،۲).

همچنین مقدار عددی انرژی آزاد گیبس(ΔG°) و T_m پس از دناتوراسیون دمایی در سه آزمایش ذکر شده بدست آمد (جدول ۱،۲). افزایش (ΔG°) و T_m در پروتئینهای S100A8 و S100A9 پس از تیمار با کلسیم در مقایسه با زمانیکه پروتئینها، تیماری دریافت نکرده اند نشان دهنده افزایش پایداری آنهاست، همچنین کاهش (ΔG°) و T_m پس از تیمار با DEP بیانگر کاهش پایداری است.

بحث

در این مطالعه پایداری دمایی زیرواحدهای نوترکیب کالپروتکتین در حالات طبیعی، تغییر یافته با DEP و نیز انکوبه شده با کلسیم بررسی گردید. بررسی نمودارهای حاصل از دناتوراسیون و نیز محاسبه انرژی آزاد گیبس، در حالات مختلف از تیمار S100A8 و S100A9 ، کاهش پایداری پروتئین طبیعی را نسبت به حالات انکوبه شده با کلسیم و نیز تغییر یافته با DEP نشان داد.

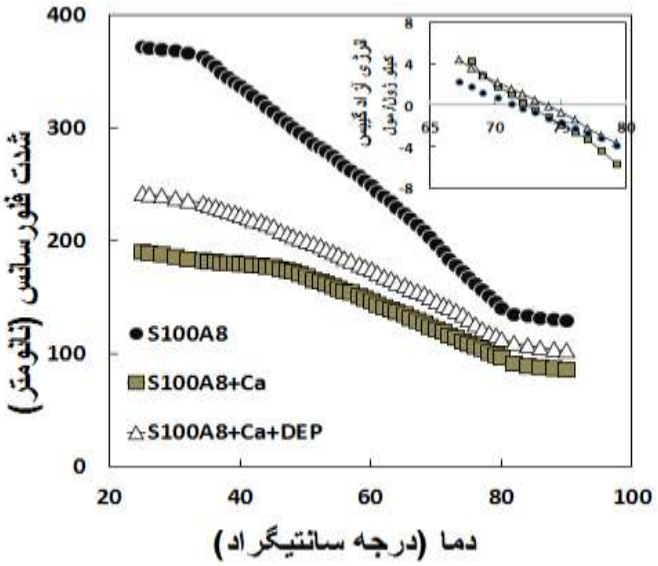
S100A8/S100A9 به وسیله سلولهای توموری

جدول۱: مقایسه عددی انرژی آزاد گیبس (ΔG°) و دمای لازم برای دناتوراسیون نیمی از پروتئین (T_m) در غلظت ۱ میکرومولار S100A8 نوترکیب در ۳ حالت: طبیعی، تغییر یافته با DEP ۲ میکرومولار و تیمار شده با کلسیم کلراید ۱ میلی مولار پس از دناتوراسیون در طیف دمایی ۹۵-۲۰ درجه سانتیگراد با طول موج تحریکی ۲۸۰ نانومتر

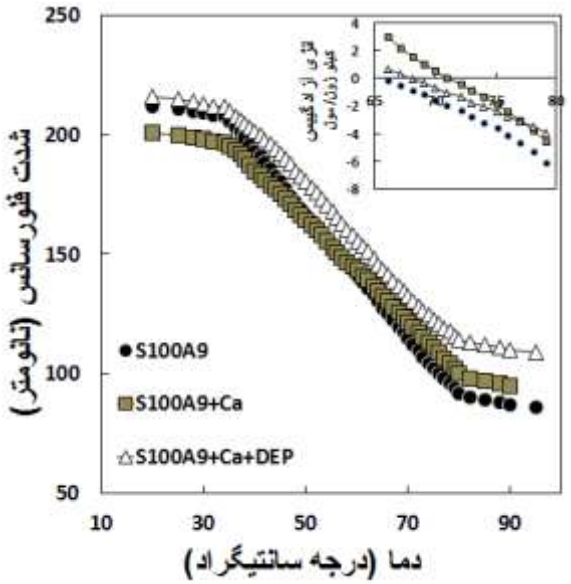
گروههای مورد بررسی	انرژی آزاد گیبس(ΔG°)	دمای دناتوراسیون نیمی از پروتئین(T_m)
S100A8	۳۹/۱۶۵	۵۹/۰۵
S100A8 + Ca	۵۳/۱۸۹	۷۲/۶۰
S100A8 + Ca + DEP	۵۲/۲۹۲	۷۳/۸۵

جدول۲: مقایسه عددی انرژی آزاد گیبس (ΔG°) و دمای لازم برای دناتوراسیون نیمی از پروتئین (T_m) در غلظت ۱ میکرومولار S100A9 نوترکیب در ۳ حالت: طبیعی، تغییر یافته با DEP ۲ میکرومولار و تیمار شده با کلسیم کلراید ۱ میلی مولار پس از دناتوراسیون در طیف دمایی ۹۵-۲۰ درجه سانتیگراد با طول موج تحریکی ۲۸۰ نانومتر

گروههای مورد بررسی	انرژی آزاد گیبس(ΔG°)	دمای دناتوراسیون نیمی از پروتئین(T_m)
S100A9	۲٤/۰۳۷	۶۵/۵٤
S100A9 + Ca	۳۵/۱۶۳	۷۱/۲۲
S100A9 + Ca + DEP	۲۵/۸۳۹	۶۸/٤٤



نمودار۱: مقایسه شدت فلورسانس در غلظت ۱ میکرومولار S100A8 نوترکیب در ۳ حالت: طبیعی، تغییریافته با DEP ۲ میکرومولار و تیمار شده با کلسیم کلراید ۱ میلی مولار پس از دناتوراسیون در طیف دمایی ۹۵-۲۰ درجه سانتیگراد با طول موج تحریکی ۲۸۰ نانومتر



نمودار۲:مقایسه شدت فلورسانس در غلظت ۱ میکرومولار S100A9 نوترکیب در ۳ حالت: طبیعی، تغییریافته با DEP ۲ میکرومولار و تیمار شده با کلسیم کلراید ۱ میلی مولار پس از دناتوراسیون در طیف دمایی ۹۵-۲۰ درجه سانتیگراد با طول موج تحریکی ۲۸۰ نانومتر

کننده تومور را نیز ایجاد می کند، غلظت مؤثر S100A8/S100A9 برای آپوپتوز سلولهای توموری۲۵ – ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر میباشد در حالیکه غلظتهای پایین تر S100A8/S100A9 سبب رشد و تکثیر سلولهای توموری می شوند (۱۱) مشخص شدن مسیرهای مولکولی با میانجیگری S100A8/S100A9 می تواند اهداف بالقوه جدیدی برای پیشبرد درمان سرطان و نیز شناسایی بیومارکرهایی جهت تشخیص مراحل اولیه سرطان و یا روند درمان آن پیش روی ما بگذارد.(۱۲)

افزایش کالپروتکتین و زیرواحدهای آن در بسیاری از سرطانها چون پوست، سینه، معده، پروستات، کلون و.... قابل مقایسه با حالت نرمال فرد بوده و می تواند به عنوان یک مارکر ارزان، غیر تهاجمی، قابل دسترس، سریع و آسان جهت تشخیص بیماری، پیش بینی بیماری، تعیین مرحله بیماری، پی گیری درمان ، روند بهبودی و نیز درمان فرد استفاده گردد(۱۳).

بررسی ها نشان دادند که تغییر در ساختار S100A8/S100A9 منجر به تنظیم رونویسی آنها می شود هیستیدینهای پروتئین با DEP که در مطالعات متعدد با اهداف مختلف انجام شده می تواند زمینه تغییر در فعالیت پروتئین را فراهم سازد(۱۸). کلسیم نیز نقش مهمی در پایداری و تجمع زیرواحدهای کالپروتکتین دارد، بررسیها نشان دادند در بیماران آلزایمری علت تجمع کالپروتکتین در مغز، کلسیم می باشد. تغییر در ساختار و پایداری کالپروتکتین، پس از اتصال با کلسیم، می تواند بر عملکرد بیولوژیک کالپروتکتین موثر باشد(۱۹)، بنابراین حضور و عدم حضور کلسیم نیز بر فعالیت کالپروتکتین موثر بوده و میتواند یکی از جنبه های بررسی فعالیت های مختلف کالپروتکتین در آینده باشد.

برهم کنش لیگاند با پروتئین و نیز تغییر در ساختار آمینواسیدها ، نقش مهمی در عملکرد بیولوژیک پروتئین داشته و مبنایی برای مطالعه درمان بسیاری از بیماریها بوده است. در صورتی که مهارکننده ها از یک منبع طبیعی فراهم شوند امنیت بیشتری داشته و اثرات جانبی کمتری دارند، بنابراین مطالعه مهار کنندگی سرطان و بیماریهای التهابی وابسته به آن بوسیله پروتئینها، پپتیدها

و آمینواسیدها می تواند سودمند می باشد(۲۰).

مطالعات ترمودینامیکی حاصل از دناتوراسیون پروتئین می تواند تغییر در میزان پایداری پروتئین را پس از مجاورت با لیگاند کلسیم و تغییر دهنده DEP نشان دهد . افزایش ΔG پس از دناتوراسیون دمایی پروتئینهای تغییر یافته نسبت به میزان این پارامتر در حالت طبیعی پروتئین ، نشان دهنده افزایش پایداری و عکس آن بیانگر کاهش پایداری این پروتئین ها پس از مجاورت با آن لیگاند می باشد. در حضور کلسیم، زیر واحدهای کالپروتکتین پایدارتر می شوند، همچنین با تغییر ساختاری این پروتئینها بوسیله DEP نیز تغییر در میزان پایداری را داریم. مسئله پایداری پروتئین و ارتباط آن با میان-کنش‌های درون مولکولی شکل‌دهنده ساختار پروتئین‌ها و نقش آن در ارزیابی ارزش پروتئین‌ها از مسائل مورد بحث در بیوفیزیک بوده‌است. پایداری یا ناپایداری پروتئین نیز بر عملکرد بهینه آن موثر بوده و می تواند مفید یا مضر باشد، به عنوان مثال زیرواحدهای کالپروتکتین که در برخی غلظتها مهارکننده و در برخی دیگر فعال کننده روند سرطان زایی هستند با پایداری تغییر یافته ، عملکرد طبیعی خود را نخواهند داشت. بررسی پایداری ترمودینامیکی دربرگیرنده تغییرات ساختار سوم پروتئین بدون تغییر در ساختار اول بوده و در شرایط برگشت‌پذیر مطالعه می‌شود (۲۱)

پروتئینهای نوترکیب S100A8 و S100A9 می توانند در جهت مهار، کنترل و یا شناسایی مسیرهای متابولیکی وابسته به التهاب و سرطان مفید واقع شوند. عملکرد پروتئینها وابسته به پایداری ساختاری آنهاست، لذا بررسی پایداری پروتئین قبل از بررسی عملکرد آن می تواند از گامهای اولیه مطالعاتی جهت استفاده کلینیکی از آن در آینده باشد. در مطالعات تکمیلی آینده، با بررسی اثر انواع طبیعی و تغییر یافته این پروتئینها بر فعالیت آنزیمهای کلیدی شرکت کننده در انواع سرطانها، (به عنوان فعال کننده یا مهار کننده آنزیمی) (۲۲)، ودر مراحل بعدی استفاده از غلظتهای مختلف این پروتئینها بر روی انواع سل لاینهای سرطانی، می توان اثرات تومورزایی ویا ضد توموری آنها را در جهت مهار، کنترل و یا شناسایی مسیرهای متابولیکی وابسته به التهاب و سرطان مورد مطالعه بیشتر قرار داد.

تقدیر و تشکر

از شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین جهت تأمین هزینه‌های لازم برای انجام این طرح تحقیقاتی قدردانی می‌شود.

References

1. Korndorfer I.P, Brueckner F, Skerra A. The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)2 heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific association of two EF-hand proteins. Mol Biol. 2007; 370(5): 887-98. Cited in PubMed; PMID 17553524.
2. Kostakis I.D, Cholidou K.G, Kallianidis K, Perrea , Antsaklis, A. The role of calprotectin in obstetrics and gynecology. Obstet Gynecol Reprod Biol. 2010; 151(1): 3-9. Cited in PubMed; PMID 20378239.
3. Noori-Daloii M , Tabarestani S. Molecular genetics, diagnosis and treatment of breast cancer. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 2014; 17(2): 74. (Persian)
4. Ichikawa M, Williams R, Wang L, Vogl T, Srikrishna G. S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. Mol Cancer Res. 2011; 9(2): 133-48. Cited in PubMed; PMID 21228116.
5. Meucci G, D'Incà R, Maieron R, Orzes N, Vecchi M, Visentini D, Minoli G, Dal Pont E, Zilli M, Benedetti E, et al. Diagnostic value of faecal calprotectin in unselected outpatients referred for colonoscopy: multicenter prospective study. Dig Liver Dis. 2010; 42(3): 191-5. Cited in PubMed; PMID 19695969.

6. Gibson R.J, Bowen J.M. Biomarkers of regimen-related mucosal injury. Cancer Treat Rev. 2011; 37(6): 487-93. Cited in PubMed; PMID 21689887.
7. Ito Y, Arai K, Ryushi, Nozawa, Yoshida H, Tomoda C, Uruno T, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, et al. S100A9 expression is significantly linked to dedifferentiation of thyroid carcinoma. Pathol Res Pract. 2005; 201(8-9: 551-6. Cited in PubMed; PMID 16259107.
8. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, Foell D, Gerke V, Manitz MP, Nacken W, et al. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. Blood. 2004; 104(13): 4260-8. Cited in PubMed; PMID 15331440.
9. Vangrysperre W, Callens M, Kersters-Hilderson H, De Bruyne C.K. Evidence for an essential histidine residue in D-xylose isomerases. Biochem. 1988; 250(1): 153-60. Cited in PubMed; PMID 3355509.
10. Srikrishna G. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. Innate Immun. 2012; 4(1): 31- 40. Cited in PubMed; PMID 21912088.
11. Privalov P. Stability of proteins: Small globular proteins. Adv. Protein Chem. 1979; 33(167-241). Cited in PubMed; PMID 44431.
12. Asghari H, Gheibi N, Goodarzvand chegini K, Sahmani M, Ilghari D. Evaluating Gene Expression, Purification and Structural Characterization of the Calprotectin Subunits of S100A8 and S100A9. Journal of Ardabil University of Medical Sciences 2014; 14(2): 107-117. (Persian)
13. Nemati nikoo F,Gheibi N, Goodarzvand Chegini K. Expression of recombinant S100A8 and Evaluation of Ca effect on its tertiary structure. Journal of Qazvin University of Medical Sciences 2014; 18(4): 15-20. (Persian)
14. Hermani A, Hess J, De Servi B, Medunjanin S, Grobholz R, Trojan L, Angel P, Mayer D. Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. Clin Cancer Res. 2005; 15;11(14):5146-52. Cited in PubMed; PMID 16033829.
15. Karl J, Wild N, Tacke M, Andres H, Garczarek U, Rollinger W, Zolg W. Improved diagnosis of colorectal cancer using a combination of fecal occult blood and novel fecal protein markers. ClinGastroenterolHepatol. 2008; 6(10):1122-8. Cited in PubMed; PMID 18928937.
16. Ni Bhriain H, Trovik J, Wik E, Stefansson IM, Akslen LA, Salvesen HB, Staff AC. Plasma calprotectin concentrations in women with endometrial carcinoma. GynecolOncol. 2009; 114(3): 491-5. Cited in PubMed; PMID 19577278.
17. Roth J, Goebeler M, WrocklageV, Van Den Bos C, Sorg C. Expression of the calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 in monocytes is regulated by a calcium-induced suppressor mechanism. Biochem. 1994; 301(3): 655-60. Cited in PubMed; PMID 8053890.
18. Lim S.Y, Raftery M.J, Goyette J, Hsu K, Geczy C.L. Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. Leukoc Biol. 2009; 86(3): 577-87. Cited in PubMed; PMID 19237640.
19. Goyette J, Geczy C.L. Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function. Amino Acids. 2011; 41(4): 821-42. Cited in PubMed; PMID 20213444.
20. Hayden J.A, Brophy M.B, Cunden L.S, Nolan E.M. High-affinity manganese coordination by human calprotectin is calcium-dependent and requires the histidine-rich site formed at the dimer interface. Am Chem Soc. 2013; 135(2): 775-87. Cited in PubMed; PMID 23276281.
21. Sohnle G, Hunter M, Hahn B, Chazi W. Zinc-Reversible Antimicrobial Activity of Recombinant Calprotectin(Migration Inhibitory Factor–Related Proteins 8 and 14). Infectious Disease. 2013; 182(4): 1272-5. Cited in PubMed; PMID 10979933.
22. Yousefi R, Imani M, Ardestani SK, Saboury AA, Gheibi N, Ranjbar B. Human calprotectin: effect of calcium and zinc on its secondary and tertiary structures, and role of pH in its thermal stability. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2007; 39(10): 795-802. Cited in PubMed; PMID 17928929.
23. Hamta A, Ghazzafi S. The study of thymus vulgaris cytotoxity effects on breast cancer cell s line. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 2014; 21(1): 122-130. (Persian)

24. Schurink M, van Berkel WJ, Wichers HJ, Boeriu CG. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. Peptides. 2007; 28(3): 485-95. Cited in PubMed; PMID 17241698.
25. Cooper A. Thermodynamic fluctuations in protein molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1976; 73(2740-2741). Cited in PubMed; PMID 1066687.
26. Nemati Nikoo F, Gheibi N, Godarzvand Chegini K. Evaluation the effect of recombinant Calprotectin on Tyrosinase activity. Proceedings of the 12th International Congress of Immunology & Allergy. 2014 April. 29 to May. 2, Tehran, Iran. Iranian Journal of Immunol.

Evaluation of Recombinant Modified Calprotectin Subunits Stability

Fatemeh Nemati nikoo.,
Department of Nanotechnology, Islamic Azad University of Pharmacuitical Sciences Branch, Tehran, Iran

Koroush Goodarzvand.,
Molecular Research Center and Department of Biochemistry, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Nematollah Gheibi.,
Molecular Research Center and Department of Biophysics, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Received:14/02/2015**, Revised:**03/03/2015**, Accepted:**14/04/2015

Corresponding Author:
Nematollah Gheibi, Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran,
P.O.Box: 34199-15315.
E-mail: gheibi_n@yahoo.com

Abstract

Background and purpose: Calprotectin is a participant factor in innate immune system which, with its subunits, interferes in inflammatory and tumorigenesis processes. This study performed in order to evaluate thermal stability of native and modified recombinant calprotectin subunits in presence of Calcium ligand.

Methods and materials: Recombinant subunitsin two native and modified forms, S100A8 & S100A9, were denatured by fluorescence spectroscopy in the temperature range of 20-95°c after incubation with Calcium. Using Excel program, Gibbs free energy changes and T_m were calculated with fluorescence intensity of native and denatured forms and the stability of different forms of protein was indicated.

Results: The chart of fluorescence intensity against temperature changes in three forms, native, DEP modified and Calcium incubated ones. Also the calculateed Gibbs free energy showed increasing stability of both DEP modified and Calcium incubated protein in comparison with native form.

Conclusion: Stability or instability of protein affects its performance and it can be useful or harmful. According to dual properties of calprotectin and its subunits in cancer process, structure and stability changes of this protein can be affect its performance in cancer process. Therefore, study of calprotectin can be useful for inhibition of cancer by a natural resource.

Keywords: *Calprotectin, S100A8, S100A9, Fluorescence Spectroscopy, Gibbs free energy*