خالص‌سازی آنزیم زینگبین از زنجبیل و بررسی سمیت و اثر بخشی آن بر پروتئین گلیادین

معصومه سادات موسوی ملکی (M.Sc)[1*]، سروش سرداری (Ph.D)[2]، حمید معدنچی (Ph.D)[1,2,3]

۱- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲- واحد طراحی دارو و بیوانفورماتیک، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

معصومه سادات موسوی ملکی: masmosavi@gmail.com

چکیده

هدف: گلیادین موجود در فراورده‌های آردی غنی از گلوتامین و پرولین بوده و به تجزیه پروتئولیتیک توسط پروتئازهای معده و روده مقاوم است. پلی‌پپتیدهای گلیادین تجزیه نشده با تغییر توسط ترانس گلوتامیناز بافتی تبدیل به پپتیدهای سمی و ایمنی‌زا شده که منجر به فعال‌شدن مسیرهای التهابی Th1 و Th2 می‌شود. آنزیم‌درمانی بیماری سلیاک، که گلیادین را به پپتیدهای غیر ایمنی‌زا و غیر سمی هضم می‌کند، می‌تواند یک گزینه درمانی مناسب برای سلیاک باشد. زینگبین، سیستئین پروتئازی مشتق از زنجبیل بوده که علاوه بر خاصیت ضدالتهابی آن می‌تواند پروتئین‌ها را از زیرواحدهای پرولینی برش دهد. هدف از این مطالعه بررسی اثر آنزیم زینگبین بر هضم گلیادین می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا جایگاه‌های برش با زینگبین در توالی کامل گلیادین شبیه‌سازی شد. سپس سمیت و ایمنی‌زایی پپتیدهای حاصل از هضم آنزیم با استفاده از سِرورِهای ToxinPred و IEDB پیش‌بینی گردید. در ادامه زینگبین از زنجبیل تازه تخلیص شد. گلیادین با زینگبین به نسبت ۱ به۱۰ (آنزیم:سوبسترا) در ۳۷°C به‌مدت ۱۶ ساعت تیمار شد و الگوی برشی گلیادین با SDS-PAGE ۱۲ درصد بررسی شد. هم‌چنین سمیت زینگبین بر سلول‌های Caco-2 با روش MTT تعیین گردید.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده از شبیه‌سازی برش آنزیمی توالی گلیادین توسط زینگبین و بررسی قطعات حاصل با سرورهای ToxinPredو IEDB نشان داد که زینگبین می‌تواند توالی گلیادین را به پپتیدهایی غیر سمی و غیر ایمنی‌زا هضم کند. هم‌چنین نتایج ژل SDS-PAGE نشان داد که زینگبین به‌خوبی قادر به تجزیه گلیادین می‌باشد. علاوه بر این زینگبین استخراج شده تا غلظت ۱۰۰۰ (µg/mL) سمیتی بر سلول‌های Caco-2 نشان نداد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر تجزیه‌کنندگی زینگبین بر گلیادین و هم‌چنین خاصیت ضد التهابی آن، با انجام مطالعات بیشتر می‌توان به پتانسیل درمانی این آنزیم طبیعی در درمان بیماری سلیاک امیدوار بود.

واژه‌های کلیدی: بیماری سلیاک، گلیادین، آنزیم‌درمانی، آنزیم زینگبین

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-03-20]

Purification of Zingibain enzyme from ginger and investigation of its toxicity and proteolytic effect on gliadin protein

Masoumeh Sadat Mousavi Maleki[1*], Soroush Sardari[2], Hamid Madanchi[1,2,3]
1- Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
2- Drug Design and Bioinformatics Unit, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3- Nervous System Stem Cells Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

Masoumeh Sadat Mousavi Maleki: masmosavi@gmail.com

Introduction: Gliadin in flour products is glutamine- and proline-rich and resistant to proteolytic breakdown by gastric and intestinal digestive proteases. Undigested gliadin polypeptides are transformed by tissue transglutaminase into toxic and immunogenic peptides, activating Th1 and Th2 inflammatory pathways. Enzyme therapy, which digests gliadin into non-immunogenic and non-toxic peptides, can be a promising therapeutic approach for celiac disease. Zingibain is a cysteine protease derived from ginger with strong anti-inflammatory properties that can cleave proteins from proline residues. The purpose of this study is to investigate the effect of the zingibain on gliadin digestion.

Methods and Materials: At first, the cleavage site of zingibain was simulated on the gliadin sequence. Then, the toxicity and immunogenicity of digested fragments were predicted using ToxinPred and IEDB servers. In the following, the zingibain enzyme was purified from fresh ginger. Gliadin was treated with zingibain at a ratio of 1 to 10 (enzyme: substrate) at 37°C for 16 hours, and the band's pattern of gliadin was investigated by SDS-PAGE 12%. Also, the toxicity of zingibain on the Caco-2 cell line was determined by the MTT method.

Results: The results obtained from the simulation of enzymatic cleavage of the gliadin sequence by zingibain and investigating the toxicity and immunogenicity of the resulting fragments with ToxinPred and IEDB servers showed that the zingibain can digest gliadin into non-toxic and non-immunogenic peptides. Also, SDS-PAGE gel demonstrated that zingibain is well able to digest gliadin. Furthermore, the extracted zingibain showed no toxicity on Caco-2 cells up to a concentration of 1000 (µg/mL).

Conclusion: Considering the digestion effect of zingibain on gliadin as well as its anti-inflammatory property, by conducting more studies, we can hope for the therapeutic potential of this natural enzyme in the treatment of celiac disease.

Keywords: Celiac disease, gliadin, enzyme therapy, zingibain enzyme

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-03-20]