

تشخیص لیزین اساسی در فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فسفاتیدات فسفو هیدرولاز غشایی کبد موش صحرایی

دکتر اسفندیار حیدریان^۱، دکتر بهرام حقیقی^۲

تاریخ پذیرش: ۸۴/۵/۲۵

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۰/۹

چکیده

مقدمه: آنزیم فسفاتیدات فسفو هیدرولاز (PAP) دارای دو فرم PAP_1 و PAP_2 می‌باشد که PAP_1 در سنتز تری آسیل گلیسرول و سایر فسفولیپیدهای مرکب ایفای نقش می‌کند در حالیکه PAP_2 در پدیده انتقال پیام نقش داشته و دارای دو ایزوفرم PAP_{2a} و PAP_{2b} می‌باشد. اطلاعات اندکی پیرامون ساختمان و تنظیم فعالیت PAP_2 وجود دارد. در این مطالعه به بررسی نقش اسید آمینه لیزین در فعالیت کاتالیتیکی آنزیم PAP_{2b} پرداخته شده است. **مواد و روشها:** در این مطالعه تجربی که در سال ۸۲ انجام گرفت به کمک چندین مرحله کروماتوگرافی از کبد موش صحرایی PAP_{2b} تخلیص و جهت تعیین تعداد و وزن زیر واحد آنزیم الکتروفورز گردید. غیر فعال‌سازی آنزیم و مطالعات اسپکتروفتومتری PAP_{2b} با استفاده از پیریدوکسال^{۵'} فسفات انجام گرفت و نتایج به کمک رگرسیون خطی و نمودار Lineweaver- Burk مورد تحلیل قرار گرفت. **یافته‌های پژوهش:** آنزیم PAP_{2b} توسط پیریدوکسال^{۵'} فسفات غیرفعال و مهار گردید. مطالعات اسپکتروفتومتری شواهدی بر ضرورت وجود لیزین اساسی برای فعالیت آنزیم بود. میزان مهار آنزیم بوسیله پیریدوکسال^{۵'} فسفات وابسته به غلظت و زمان بود. مهار آنزیم توسط پیریدوکسال^{۵'} فسفات نسبت به سوبسترای اسید فسفاتیدیک از نوع رقابتی بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج حاکی از احتمال حضور لیزین اساسی در مکان فعال آنزیم بود و تعداد مول لیزین اساسی تعدیل شده به ازاء هر مول آنزیم ۶ عدد بود.

واژه‌های کلیدی: فسفاتیدات فسفو هیدرولاز غشایی، لیزین، پیریدوکسال^{۵'} فسفات، اسید فسفاتیدیک

۱- استادیار بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایلام- نویسنده مسئول Email: heidarian46@yahoo.com

۲- استاد بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

مقدمه

با وجود اهمیت PAP_2 در پدیده انتقال پیام اطلاعات محدودی پیرامون ساختمان، ساز و کار و اسید یا اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال این آنزیم وجود دارد. با توجه به اینکه سوبسترای PAP_2 یک ترکیب فسفریله می باشد و از طرف دیگر بسیاری از آنزیم‌های هیدرولیزکننده مثل فروکتوز ۱،۶ بیس فسفاتاز و آلدولاز ماهیچه‌ای که دارای سوبسترای فسفریله هستند در جایگاه فعال خود دارای لیزین اساسی هستند (۸،۹). بنابراین در این مقاله نقش لیزین اساسی در عمل کاتالیتیکی PAP_{2b} غشایی تخلیص شده از کبد موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه تجربی بود که در سال ۱۳۸۲ در گروه بیوشیمی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گرفت. نتایج حاصل به کمک ریگرسیون خطی و نمودار Lineweaver-Burk تحلیل گردید.

مواد مورد استفاده عبارت بودند از: اسید فسفاتیدیک (ملح دی سدیم)، دی تیوترایتول (DTT)، N- اتیل مالیمید (NEM)، لوپیتین، مهارکننده Soyabean tripsin، بنزآمیدین، پیریدکسال ۵' فسفات (PLP) هیدروکسیل آپاتیت، پیستاتین، هپارین سفارز، n- اکتیل گلوکوزید، سفاکریل. S_{۳۰}، Affi Gel Blue و تریتون X-100 از شرکت سیگما (Sigma, U.S.A)، EDTA، EGTA، گلیسرو ل و سرم آلبومین گاوی از شرکت مرک (Merk, Germany).

الف) تخلیص آنزیم: PAP_{2b} از غشاء سلولهای کبدی موش صحرایی براساس روش Fleming و

آنزیم فسفاتیدات فسفو هیدرولاز^۱ (PAP, EC 3.1.3.4) تبدیل اسید فسفاتیدیک به فسفات معدنی (Pi) و دی‌آسیل گلیسرول را کاتالیز می‌کند (۱). دی‌آسیل گلیسرول حاصل یک پیش‌ساز برای سنتز تری‌آسیل گلیسرول، فسفولیپیدها، فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین است (۱،۲). جمال^۱ و همکاران فعالیت دو PAP مجزا را در کبد موش صحرایی توصیف کردند؛ بطوریکه نوع اول (PAP_1) سیتوزولی و برای فعالیت نیازمند به g^{2+} بود و کاملاً بوسیله N- اتیل مالیمید^۳ (NEM) مهار می‌گردید و نقش اساسی را در سنتز گلیسرولیپیدها و فسفولیپیدها بعهده داشت (۳،۴). نوع دوم (PAP_2) غشایی و برای فعالیت نیازمند به Mg^{2+} نبود و توسط N- اتیل مالیمید نیز مهار نمی‌گردید و در پدیده انتقال پیام^۴، تمایز و مهاجرت سلولی نقش داشت (۳،۵). متعاقباً اثبات شد PAP_2 دارای دو ایزوform PAP_{2a} و PAP_{2b} می‌باشد که از لحاظ مقدار تقریباً ۳۰٪ PAP_{2a} و مابقی را PAP_{2b} در غشاء تشکیل می‌دهد (۶،۷). PAP_{2a} تاکنون به صورت یک پروتئین همگن خالص سازی نشده است و بر روی PAP_{2b} نیز تحقیقات محدودی صورت گرفته است که حاکی از اثرات مهارتی یونهای Ca^{2+} ، Mn^{2+} ، Zn^{2+} ، آمین‌های آمفی‌فیلیک مثل پروپرانولول، کلروپرومازین، اسفنگوزین و دی‌پرامین بوده است (۷). ایزوformهای PAP_{2a} و PAP_{2b} جهت فعالیت نیازی به فسفولیپیدها ندارند و فعالیت آنزیمی PAP_{2b} توسط دی‌آسیل گلیسرول مهار می‌شود ولی تری‌آسیل گلیسرول بر فعالیت آن تأثیری ندارد (۷).

1. Phosphatidate phosphohydrolase
2. Jamal
3. N- ethylmaleimide
4. Signal transduction

5. Ethylen Diamine Tetra Acetic acid
6. Ethylene Gis(oxyethylene nitrilo)Tetraacetic Acid

د) **مطالعات کینتیکی:** ثابت‌های کینتیکی براساس مدل کینتیک رقت سطحی (Surface dilution kinetic) تعیین گردیدند (۱۳) و درصد مولی فسفاتیدات در میسل‌های مخلوط تریتون X-100 فسفاتیدات با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۳):

$$\text{Mol\% فسفاتیدات} = \frac{\text{[فسفاتیدات]}}{\text{[تریتون X-100] + [فسفاتیدات]}} \times 100$$

ه) **سایر روشها:** اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد (Bradford) و با استفاده از آلبومین گاوی بعنوان استاندارد انجام گرفت (۱۴). مطالعات اسپکتروفتومتری در بافر A (۷) که شامل ۲۵ میلی مولار تریس هیدروکلرید با $\text{pH}=7/4$ ، ۱۰٪ گلیسرول، ۱٪ (w/v) تریتون X-100، ۵۰ میلی مولار کلریدسدیم، ۱ میلی مولار EGTA، EDTA، DTT و ۵ میکروگرم بر میلی لیتر از هر یک از مهارکننده‌های لویپتین، پیستاتین و مهارکننده soyabean tripsin و با استفاده از اسپکتروفتومترهای Cecil 1021 CE (انگلستان) و Shimadzu multispec 1501 (ژاپن) انجام گرفت. SDS پلی آکریل آمیدژل الکتروفورز جهت تعیین درجه خلوص، تعداد و وزن زیر واحدهای آنزیمی در ژل ۱۰٪ به صورت ناپیوسته (Discontinuous) انجام گرفت (۱۵). قبل از الکتروفورز جهت حذف تریتون X-100، نمونه مورد استفاده به مدت ۱۰ دقیقه در مخلوط استون/هیدروکسید آمونیوم (۷/۷، ۱/۷: ۳۰) به نسبت حجمی ۱ به ۵ انکوبه (۱۶) و سپس رسوب در دور ۲۵۰۰g جدا و پس از خشک شدن در بافر سمپلر حل گردید. ژل به روش رنگ‌آمیزی با نیترات نقره رنگ شد (۱۷).

همکارانش تخلیص گردید و فقط مرحله هیدروکسل آپاتیت به روش Bacth wise انجام گرفت (۷). تعداد موشهای صحرایی ۱۴ عدد و در محدوده ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرمی بودند.

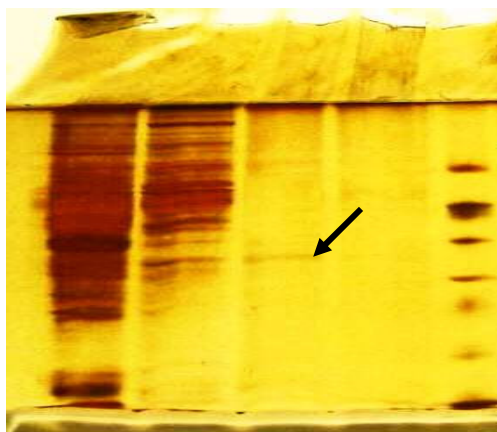
ب) **سنجش فعالیت آنزیم:** فعالیت آنزیم PAP_{2b} در بافر سنجش (۲۵۰ μl) که حاوی ۵۰ میلی مولار تریس هیدروکلرید با $\text{pH}=7/4$ ، ۱ میلی گرم بر میلی لیتر آلبومین گاوی، ۳/۲ میلی مولار تریتون X-100، ۴ میلی مولار NEM، ۰/۳۵ میلی مولار اسید فسفاتیدیک، ۱ میلی مولار از هر یک از EGTA، EDTA، DTT و مقدار مناسب آنزیم اندازه‌گیری شد (۱۰). مخلوط سنجش فعالیت برای ۱۰ دقیقه در 37°C انکوبه و سپس بوسیله افزودن ۰/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ واکنش آنزیمی متوقف گردید و فسفات معدنی حاصل از فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد (۱۱). هر واحد آنزیمی (U) معادل مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول فسفات معدنی را در دقیقه آزاد کند، در نظر گرفته شد.

ج) **غیرفعال سازی آنزیم بوسیله PLP:** شش سری لوله آزمایش تمیز تهیه گردید. یک سری به عنوان شاهد که فاقد PLP و پنج سری دیگر به عنوان تست که محتوی غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ میلی مولار از PLP در محیط سنجش فعالیت آنزیم بودند. لوله‌ها در دمای آزمایشگاه و تاریکی انکوبه، سپس طی زمانهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه به هر یک از لوله‌ها سوبسترا اضافه و فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری گردید. تعداد مول لیزین متصل شده به مول آنزیم با استفاده از ضریب جذب مولی $8600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ در ۳۱۶ نانومتر برای بازشیف احیاء شده (۱۲) و وزن مولکولی ۱۷۵ کیلودالتون برای آنزیم PAP_{2b} (۷) محاسبه شد.

یافته‌های پژوهش

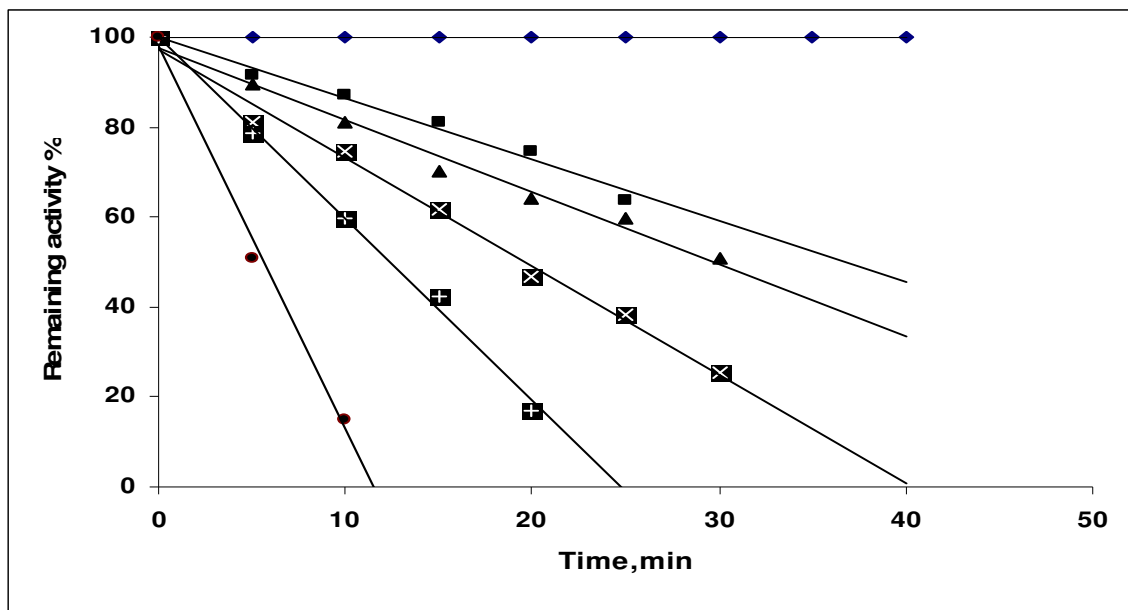
یک افزایش جذب را در ۳۲۵ نانومتر برای آنزیم تعدیل شده نشان داد که مربوط به بازشیف احیا شده با NaBH_4 بود و همانطوریکه مشاهده می‌شود، آنزیم شاهد فاقد چنین افزایش جذبی، در طول موج ۳۲۵ نانومتر می‌باشد (شکل شماره ۴). شکل شماره ۵ منحنی Lineweaver-Burk مربوط به اثر PLP بر فعالیت آنزیم PAP_{2b} را نشان می‌دهد که نوع مهار ایجاد شده توسط PLP رقابتی (Competitive) می‌باشد. شکل شماره ۶ استوکیومتری (Stoichiometry) غیرفعال سازی PAP_{2b} با PLP متعاقب احیاء بازشیف با NaBH_4 مشاهده می‌شود که با استفاده از ضریب جذب مولی $8600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ برای بازشیف احیاء شده با NaBH_4 در ۳۱۶ نانومتر و وزن مولکولی ۱۷۵ کیلوالتون برای آنزیم PAP_{2b} مشخص شد که در اثر غیرفعال شدن آنزیم و اصلاح دنباله خطی منحنی ۶ مول باقیمانده لیزین در مول آنزیم تعدیل شده است.

آنزیم PAP_{2b} خالص شده از غشاء سلولهای کبد موش صحرائی، فعالیت ویژه‌ای معادل $7350 \text{ mU/mg protein}$ داشت. K_m آنزیم در مدل کینتیک رقت سطحی ۰/۴۳ مول درصد بود. آنزیم تخلیص شده در روش SDS ژل الکتروفورز یک نوار با وزن مولکولی ۳۳/۸ کیلوالتون را نشان داد (شکل شماره ۱). غیرفعال سازی آنزیم با غلظت‌های مختلف PLP نشان داد، سرعت غیرفعال شدن آنزیم بستگی به غلظت و زمان دارد، به طوریکه در غلظت ۰/۶ میلی مولار در مدت ۲۵ دقیقه غیرفعال می‌شود (شکل شماره ۲). اسپکتروم تفاضل بین آنزیم تعدیل شده با PLP در حالت غیراحیاء شده و آنزیم شاهد یک ماکزیم جذب در ۴۲۰ نانومتر که مربوط به تشکیل بازشیف احیاء نشده است را نشان داد (شکل شماره ۳). اسپکتروم کمپلکس آنزیم-PLP و شاهد احیاء شده با NaBH_4 در طول موج ۲۸۰ تا ۳۶۰ نانومتر



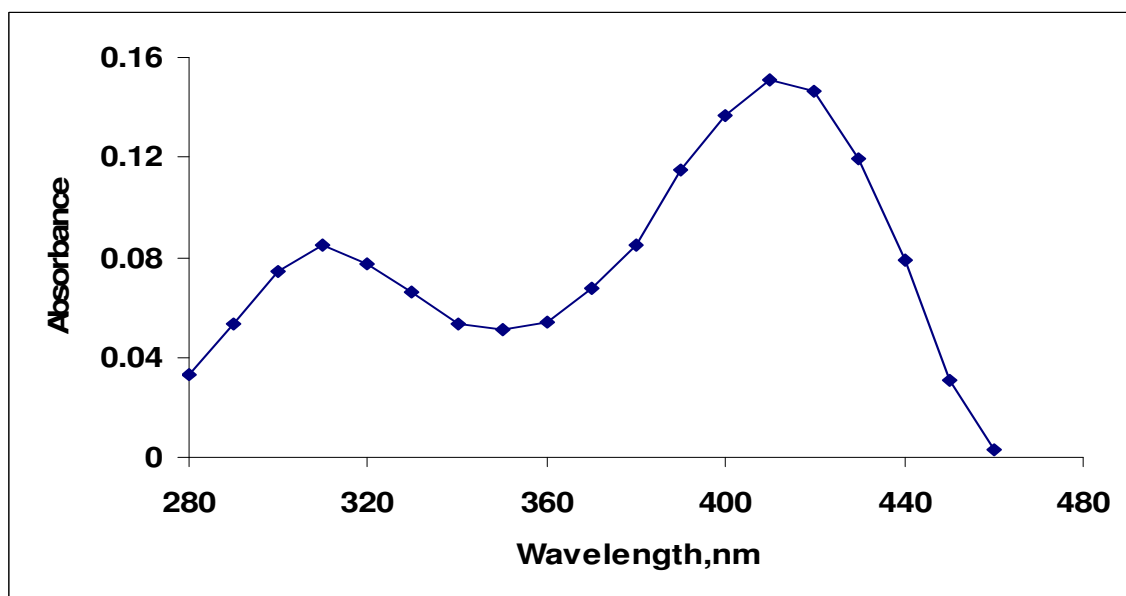
شکل شماره ۱: الکتروفورز آنزیم PAP_{2b} خالص شده از کبد موش صحرائی

نمونه ها روی ژل ۱۰% آکریل آمید حاوی SDS الکتروفورز گردیدند و بندها به کمک نیترات نقره رنگ آمیزی شدند. ۱- هموژنیزه ($180 \mu\text{g}$) ، ۲- فراکسیون غشایی ($40 \mu\text{g}$) ، ۳- آنزیم تخلیص شده ($10 \mu\text{g}$) ، ۴- مارکرها از بالا به پائین بترتیب شامل آلبومین (66 kDa) ، اوآلبومین (40 kDa) ، گلیسرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز (36 kDa) ، کربنیک انیدراز (29 kDa) ، تریپسینوژن (24 kDa) ، لاکتالبوومین (10 kDa) و آپروتینین (610 kDa) (هر کدام $5 \mu\text{g}$).



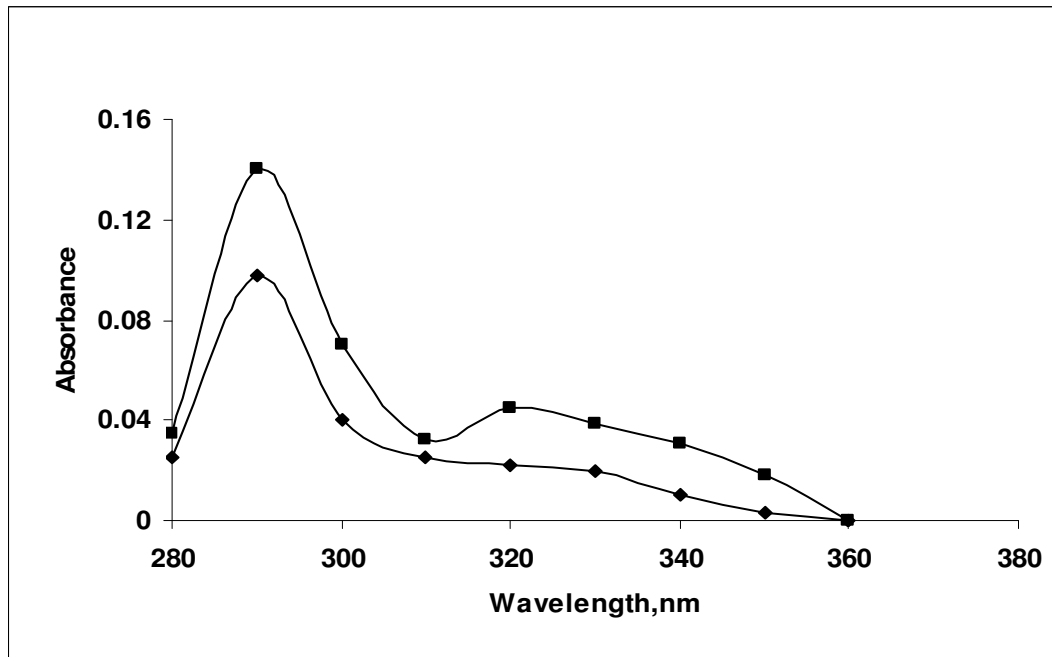
شکل شماره ۲: سرعت غیرفعال شدن PAP_{2b} در غلظت های مختلف PLP

غلظت های مختلف از PLP در محیط سنجش فعالیت آنزیم محتوی $0.5 \mu g$ آنزیم ایجاد گردید ، سپس در زمان های مشخص شده سوبسترا به هر سری از لوله ها اضافه و فعالیت آنزیمی آنها اندازه گیری گردید. فعالیت آنزیم در غیاب (\blacklozenge) ، در حضور 0.1 (\blacksquare) ، 0.2 (\blacktriangle) ، 0.4 (\times) ، 0.6 $(+)$ و 0.8 (\bullet) میلی مولار از PLP . هر نقطه میانگین دو آزمایش مستقل است.



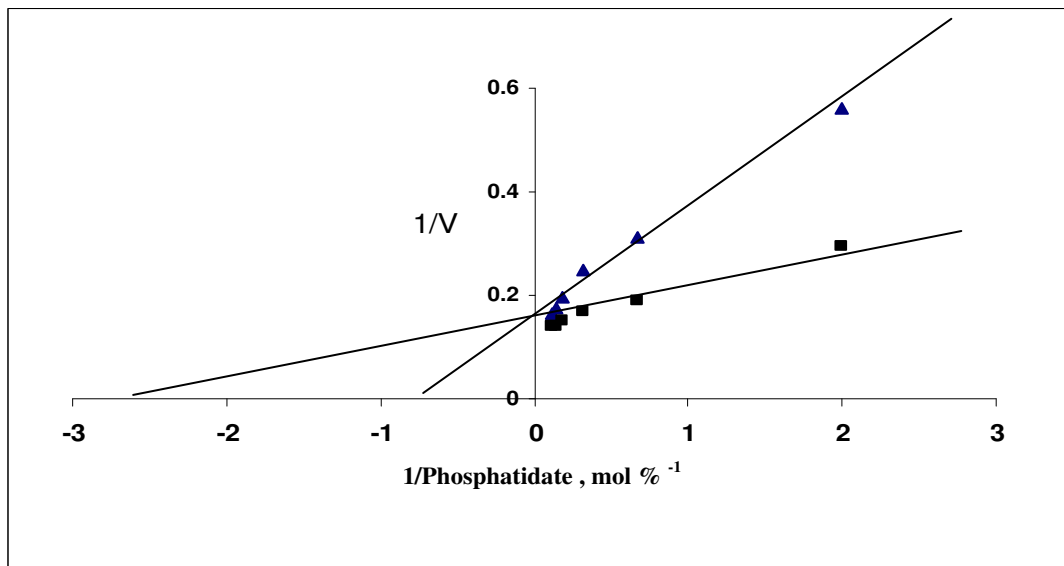
شکل شماره ۳: اسپکتروم تفاضل بین شاهد و آنزیم تغییر یافته با PLP

غلظت آنزیم و PLP در تست به ترتیب $80 \mu g/ml$ و 0.6 میلی مولار در بافر A و غلظت آنزیم شاهد $80 \mu g/ml$ در بافر مذکور. لوله ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه گردیدند، سپس جذب تست در مقابل بلانکی که حاوی بافر مذکور بعلاوه 0.6 میلی مولار PLP بود و جذب کنترل در مقابل بلانک فاقد PLP قرانت شد.



شکل شماره ۴: اسپکتروم شاهد و کمپلکس آنزیم - PLP احیاء شده با $NaBH_4$

غلظت آنزیم در شاهد $80 \mu g/ml$ در بافر A و غلظت آنزیم در تست $80 \mu g/ml$ به همراه 0.6 میلی مولار از PLP در بافر مذکور بود. لوله‌ها به مدت 30 دقیقه آنکوباسیون و متعاقب آن pH هر دو لوله با اسید استیک به 6 رسانیده شد و با $NaBH_4$ احیاء و یک شب بطور جداگانه در یک لیتر از بافر مذکور دیالیز گردیدند. اسپکتروم شاهد (◆) و آنزیم تغییر یافته (■) در مقابل بلانکی که حاوی بافر مذکور بود.



شکل شماره ۵: نمودار $Lineweaver - Burk$ مربوط به اثر PLP

فعالیت آنزیم PAP_{2b} ($0.5 \mu g$) در حضور 0.4 میلی مولار PLP (▲) و غیاب آن (■) در غلظت های سطحی 0.5 ، $1/5$ ، $3/1$ ، $5/5$ ، $7/2$ و $8/5$ مول در صد فسفاتیدات در میسل های مخلوط تریتون $X-100$ /فسفاتیدات اندازه گیری گردید. غلظت فسفاتیدات 0.3 میلی مولار ثابت و غلظت تریتون $X-100$ متغیر بود. هر نقطه میانگین دو آزمایش مستقل است.

توجه به نتایج حاصل که حاکی از وجود اهمیت نقش لیزین اساسی در عمل کاتالیتیکی PAP_{2b} است، برای ارائه یک مکانیسم پیشنهادی جهت واکنش آنزیم نیاز به تحقیق و پژوهش در رابطه با وجود اسید آمینه هیستیدین در فعالیت کاتالیتیکی آنزیم PAP_{2b} می‌باشد، چون که اهمیت هیستیدین اساسی در فعالیت کاتالیتیکی PAP_1 اثبات شده است (۲۲).

آنزیم وجود دارد (۲۲). در شکل شماره ۶ رابطه بین تعداد مول لیزین تغییر یافته و میزان غیرفعال شدن آنزیم مشاهده می‌شود که برای غیرفعال شدن یک مول آنزیم نیاز به ۶ مول PLP است. با توجه به محاسبه جرم مولکولی زیر واحدهای آنزیم که ۳۳/۸ کیلودالتون گردید و جرم مولکولی آنزیم که ۱۷۵ کیلودالتون گزارش شده است (۷)، احتمالاً آنزیم می‌بایستی ساختمان همگزامر داشته باشد و بنابراین احتمالاً در هر زیر واحد آنزیم یک لیزین اساسی تعدیل شده است. با

REFERENCES

- 1) Smith SW, Weiss SB, Kennedy EP; Enzymatic dephosphorylation of phosphatidic acid; J Biol Chem , 1957, 228: 915-22.
- 2) Brindley D.N; Intracellular translocation of phosphatidate phosphohydrolase and its possible role in the control of glycerolipid synthesis; Prog Lipid Res ,1984, 23: 115-33.
- 3) Jamal Z , Martin A , Munoz AG and Brindley DN; Plasma membrane fractions from rate liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol; J Biol Chem, 1991, 266: 2988-96.
- 4) Martin A , Comez-Munoz A , Jamal Zand Brindley DN;Characrization and assay of PAP; Methods Enzymol ,1991,197:553- 63 .
- 5) Day CP , Burt A D , Brown AM and et al.; Plasma membrane form of phosphatidate phosphohydrolase: a possible role in signal transduction during liver fibrogenesis; Clin Science ,1993, 85:281-7.
- 6) Waggoner DW , Martin A, Dewald J and et al. ; Purification and characterization of a novel plasma membrane phosphatidate phosphohydrolase from rat liver ; J Biol Chem , 1995,270: 19422-9 .
- 7) Fleming IN and Yeaman SJ ; Purification and characterization of N-ethylmaleimide-insensitive phosphatidic acid phosphohydrolase (PAP_2) from rat liver; Biochem J , 1995,308: 983-9.
- 8) Anai M , Lai CY.and Horecker BL; The pyridoxal phosphate binding site of rabbit muscle aldolase; Arch Biochem Biophys , 1973, 156: 712-9.
- 9) Colombo G and Marcus F; Modification of fructose 1,6 diphosphatase with pyridoxal 5 phosphate. Evidence for the participation of lysyl residuse at the active site ; Biochemistry, 1974, 13 (15): 3085-91.
- 10)Kano H , Imai SI , Yamada K ,Sakane.F; Purification and properties of phosphatidic acid phosphatase from porcine thymus membrane; J Biol Chem , 1992, 267: 25309-14 .

- 11) Haghghi B, Honarju S ; The effects of hydrazine on the phosphatidate phosphohydrolase activity in rat liver; *Biochem Pharmacol* ,1987,36 :1163-5.
- 12) Haghghi B , Flynn G and Levy R; Glucose 6 phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* . Isolation and sequence of a peptide containing an essential lysine; *Biochemistry*, 1982, 24: 6415-20.
- 13) Carman GM , Deems RA .and Dennis EA ; Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics;*J Biol Chem* , 1995, 270: 18711-4.
- 14) Bradford MMA; 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.
- 15) Weber K, Pringle JR, Osborn M; Measurement of molecular weight by electrophoresis on SDS acrylamide gel ;*Methods Enzymol* ,1972 ,26 :3 27 .
- 16) Feuerstein Nand Cooper HL; Rapid protein phosphorylation induced by phorbol ester in HL-60 cells; *J Biol Chem* , 1983, 258: 10786-93.
- 17) Heukeshoven J , Dernick R; Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of the silver staining ; *Electrophoresis* ,1985 , 6 (3) :103- 12.
- 18) Milhousen M and Levy R; Evidence for an essential lysine in glucose-6-phosphate dehydrogenase *Leuconostoc mesenteroides*; *J Biochem* ,1975,50: 453-61.
- 19) Raetz CRH and Auld DS ; Schiff bases of pyridoxal phosphate with active center lysine of ribonuclease A; *Biochemistry* ,1972, 11 (12):2229-2236.
- 20) Greenwell P ,Jewett SL and Stark GR; Aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*; *J Biol Chem* , 1973, 248: 5994-01.
- 21) Haghghi Band Heidarian E; Evidence for an essential lysine residue on cytosolic phosphatidate phosphohydrolase from rat liver; *Iranian J Sci Technol* ,2001, 25: 175-82.
- 22) Haghghi B and Takhshid A; The evidence for essential histidine residue in soluble phosphatidate phosphohydrolase of rat liver; *Iranian J Sci Thech* , 1999, 23: 109-116.