

## تشخیص هیستیدین اساسی در عمل کاتالیتیکی آنزیم فسفاتیدات فسفوھیدرولاز غشایی کبد موش صحرایی نر

\*۱  
اسفندیار حیدریان ، بهرام حقیقی

### خلاصه

**سابقه و هدف:** آنزیم فسفاتیدات فسفوھیدرولاز (PAP) باعث تبدیل اسید فسفاتیدیک به دی‌آسیل گلیسرول و فسفات معدنی (Pi) می‌شود. دو فرم مختلف از آنزیم PAP در سلولهای کبدی موش صحرایی گزارش شده است، یکی  $PAP_1$  که در متاپولیسم فسفولیپیدها و گلیسرولیپیدها و دیگری  $PAP_2$  که در پدیده Signal transduction نقش دارد.  $PAP_2$  در موش صحرایی دارای دو ایزوفرم  $PAP_{2a}$  و  $PAP_{2b}$  می‌باشد. در این مطالعه وجود هیستیدین اساسی در آنزیم  $PAP_{2b}$  مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** با استفاده از  $n$ -اکتیل گلوکوزید، غشای سلولهای کبدی موش صحرایی حل گردید و  $PAP_{2b}$  طی چندین مرحله کروماتوگرافی تخلیص گردید. ثابت‌های کیتیکی بر اساس مدل کیتیکی رقت سطحی تعیین گردیدند. جهت تعیین خلوص، تعداد و وزن زیرواحدهای آنزیمی از روش الکتروفورز نایپوسته در حضور SDS با ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰ درصد استفاده گردید. تعداد مول هیستیدین موجود در یک مول آنزیم با استفاده از مشتق N-کربتوکسی هیستیدین محاسبه شد.

**نتایج:**  $PAP_{2b}$  تخلیص شده فعالیت ویژه‌ای معادل  $7350\text{mU/mg protein}$  داشت. الکتروفورز  $PAP_{2b}$  تخلیص شده در حضور SDS یک نوار با وزن مولکولی  $33/8$  کیلو Dalton نشان داد. مطالعات غیرفعال‌سازی آنزیم به وسیله معرف دی‌اکتیل پیرو کربنات شواهدی بر ضرورت وجود هیستیدین اساسی برای فعالیت آنزیم مهیا کرد. تعداد مول هیستیدین تعديل شده به ازای هر مول آنزیم ۶ عدد بود.

**نتیجه‌گیری:** مهار آنزیم توسط دی‌اکتیل پیرو کربنات نسبت به اسید فسفاتیدیک رقابتی بود و نشان از حضور هیستیدین در مکان فعال آنزیم داشت. احتمالاً واکنش کاتالیتیکی  $PAP_{2b}$  نیز می‌بایستی همانند سایر اعضای خانواده‌اش از طریق تشکیل واسطه‌ی فسفوھیستیدینی انجام گیرد.

**واژگان کلیدی:** فسفاتیدات فسفوھیدرولاز، هیستیدین، دی‌اکتیل پیروکربنات، اسید فسفاتیدیک

۱- استادیار گروه بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۲- استاد گروه بیوشیمی بالینی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

\* نویسنده مسؤول: اسفندیار حیدریان

آدرس: ایلام، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی

پست الکترونیک: heidarian46@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۳ ۳۱۴ ۵۲۲۹

دورنويis: ۰۸۴۱ ۲۲۲۷۱۲۲

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۲۶

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۷/۶/۵

فعالیت نیازمند یون  $Mg^{2+}$  است و کاملاً به وسیله N-اکتیل مالیمید (NEM) مهار می‌شود [۲-۵]. فرم دیگر آن غشایی است و به آن  $PAP_2$  گفته می‌شود که برای فعالیت نیازی به یون  $Mg^{2+}$  ندارد و توسط NEM نیز مهار نمی‌شود و در پدیده transduction، تمایز و مهاجرت سلولی نقش دارد [۶-۸].  $PAP_2$  در موش صحرایی، دارای دو ایزوفرم  $PAP_{2a}$  و  $PAP_{2b}$  می‌باشد که از نظر میزان اسید سیالیک با یکدیگر متفاوت هستند [۹]. افزون بر این از لحاظ مقدار،  $PAP_{2a}$  تقریباً ۳۰ درصد و مابقی را  $PAP_{2b}$  در غشا تشکیل می‌دهد [۱۰]. در کبد انسان افزون

### مقدمه

**آنزیم فسفاتیدات فسفوھیدرولاز (4.3.1.3.4)** Phosphatidate phosphohydrolase، EC تبدیل اسید فسفاتیدیک به دی‌آسیل گلیسرول و فسفات معدنی (Pi) می‌شود [۱]. این واکنش مرحله محدود کننده و تنظیمی در متاپولیسم گلیسرولیپیدها در سلولهای حیوانی است. این آنزیم دارای دو فرم است؛ یک فرم سیتوزولی که به آن  $PAP_1$  گفته می‌شود و در متاپولیسم گلیسرولیپیدها مثل تری‌گلیسرید، فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین نقش داشته و برای

<sup>3</sup>PMSF، <sup>2</sup>EGTA، <sup>1</sup>EDTA (Sigma، U.S.A)، گلیسرول و سرم آلبومین گاوی از شرکت مرك (Merck، Germany).

- نابسازی آنزیم: ابتدا کبد قبل از برداشته شدن، توسط یک محلول ایزوتونیک از NaCl پرفیوز گردید. برای این کار موش صحرایی نر توسط کلروفرم بیهوش شد و با استفاده از لوله مویینه از گوشه چشم موش صحرایی بیشتر خون بدن خارج گردید. سپس حفره شکمی به صورت لـ باز شد و ورید اجوف تحتانی در بالای کلیه و ورید باب کبدی توسط نخ بسته و محلول ایزوتونیک NaCl به عنوان پرفیوزات از طریق ورید اجوف تحتانی به کبد تزریق شد تا متسع گردید. سپس با مالش دادن سطح کبد به عبور پرفیوزات کمک شد. این عمل تا سفید شدن کامل کبد ادامه یافت. متعاقب آن کبد خارج و چندین بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. ابتدا بافت‌های زاید کبد پرفیوز شده جدا گردید و با سرم فیزیولوژی شستشو و در سه حجم از بافر هموژنیزاسیون (تریس HCl با غلظت PH=۷/۴۲۵ mM، ۱mM NaCl، ۵۰ mM PMSF، ۱ mM EDTA، ۱ mM EGTA، ۱ mM DTT) در صد گلیسرول، ۱ mM بنتامیدین، ۱ mM لوبیتین A، پیستاتین و مهارکننده تریپسین سویا، هموژنیزه گردید (تمام مراحل روی بخ انجام گرفت) [۱۰]. هموژنیزه به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰g سانتریفوژ و محلول رویی جدا گردید. PAP<sub>2b</sub> از غشای سلول‌های کبدی موش صحرایی بر اساس روش Fleming و همکارانش با استفاده از بافر کروماتوگرافی (همان روش هموژنیزه کننده به علاوه ۱ درصد (W/V) از تریتون X نابسازی گردید [۱۰] و فقط مرحله هیدروکسیل آپاتیت به روش wise انجام گرفت.

- سنجش فعالیت آنزیم: فعالیت آنزیم PAP<sub>2b</sub> در بافر سنجش ( $\mu\text{l}$ ) (۲۵۰) که حاوی ۵۰ میلی مولار تریس هیدروکلرید با PH=۷/۴، ۱ میلی گرم بر میلی لیتر آلبومین گاوی، ۳/۲ میلی مولار تریتون X-۱۰۰، ۴ میلی مولار NEM، ۰/۳۵ میلی مولار اسید EGTA و EDTA و DTT است. مقدار مناسب آنزیم اندازه‌گیری شد، به طوری که در شرایط سنجش، فعالیت نسبت به غلظت آنزیم خطی بود. شاهد شامل همه اجزا به جز سوبسترا بود [۱۲]. مخلوط سنجش فعالیت برای ۱۰

بر دو ایزوفرم مذکور نوع PAP<sub>2c</sub> نیز وجود دارد [۱۱]. PAP<sub>2a</sub> کنون در حد یک پروتئین همگن، خالص نشده است. PAP<sub>2a</sub> در مقابل انواع اسید فسفاتیدیک با طول زنجیره و درجه اشباعی مختلف فعال است ولی PAP<sub>2b</sub> تمایلی به مصرف اسید فسفاتیدیک با طول زنجیره متوسط را ندارد [۱۰]. مطالعات انجام گرفته بر روی PAP<sub>2b</sub> نشان داده است که یون‌های Ca<sup>2+</sup> و Mn<sup>2+</sup> و Zn<sup>2+</sup> و Co<sup>2+</sup> دارای اثرات مهاری بر فعالیت آنزیم هستند [۱۰، ۱۲] و افزون بر این آمین‌های آمفی فیلیک مثل پروپرانولول، کلوروپرامازین، اسفنگوگوژین و دسی‌برامین نیز باعث مهار PAP<sub>2b</sub> می‌گردند [۱۰، ۱۲]. PAP<sub>2</sub> را به علت برخی از تشابهاتش در یک گروهی از فسفاتازها به نام لیپید فسفات فسفاتازها (Lipid phosphate phosphatases) قرار می‌دهند که شامل اسید فسفاتاز غیراختصاصی، دی‌آسیل گلیسرول پیروفسفاتاز باکتریایی و مخمری، هالوپراکسیداز قارچی و گلوکز ۶ فسفاتاز پستانداران نیز می‌باشد [۱۳-۱۵]. علی‌رغم اهمیت PAP<sub>2</sub> در پدیده transduction اطلاعات محدودی در مورد ساختمان، مکانیسم عمل و اسید یا اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال آن وجود دارد. شناخت خواص آنژیمولوژیکی و ساختمانی این آنزیم می‌تواند گام موثری در شناسایی مکانیسم عمل و نحوه تنظیم فعالیت این آنزیم در سلول باشد. با توجه به این که بسیاری از آنزیم‌های هیدرولیزکننده و همچنین آنزیم‌های انتقال‌دهنده گروه فسفات دارای هیستیدین اساسی در جایگاه فعال خود هستند [۱۶، ۱۷]، لذا در این مطالعه وجود هیستیدین اساسی در آنزیم PAP<sub>2b</sub> مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**حیوانات آزمایشگاهی:** در این تحقیق تجربی از موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar در محدود ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرمی استفاده گردید. این حیوانات از انسٹیتو پاستور تهران خریداری و در اتاق حیوانات نگهداری گردیدند. موش‌های صحرایی در دریافت آب و غذا تا زمان آزمایش آزاد بودند. ۱۴ سر موش‌های صحرایی نر جهت تخلیص آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

**مواد:** اسید فسفاتیدیک (ملح دی سدیم)، دی تیوتراپیتول N-اتیل مالیمید (DTT)، لوبیتین، مهارکننده (DEPC)، Soyabean tripsin، بنتامیدین، دی اتیل پیروکربنات (NEM)، هیدروکسیل آپاتیت، پیستاتین، هپارین سفارز، n-اکتیل گلوکوزید، سفاکریل Blue AffiGel Blue و تریتون X-۱۰۰ از شرکت

1- EDTA; Ethylenediaminetetra acetic acid

2-EGTA; [Ethylene bis (Oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid]

3- PMSF; Phenylmethylsulfanyl fluoride

(بررسی جذب اسپکتروفوتومتری)، جذب UV آنها در مقابل بافر مربوط در ۲۴۲ nm قرائت گردید و سپس فعالیت آنزیمی لوله شاهد تعیین شد و هم‌زمان از یک استوک هیدروکسیل آمین (M) در لوله آزمون ایجاد غلظت ۰/۴ mM در لوله آزمون ایجاد غلظت ۰/۴ mM هیدروکسیل آمین گردید و به فواصل زمانی ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه افزون بر این که جذب ۲۴۲ nm لوله آزمون قرائت شد فعالیت آنزیمی آن نیز تعیین گردید و نتیجه به صورت یک منحنی رسم گردید [۲۶].

- برسی نوع مهار PAP<sub>2b</sub> به وسیله DEPC: فعالیت آنزیم PAP<sub>2b</sub> (۰/۰ میکروگرم) بر اساس مدل کیتیکی رقت سطحی [۲۷] در محیط سنجش فعالیت محتوی غلظت‌های سطحی ۰/۵، ۰/۱، ۰/۵، ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۲ مول درصد از فسفاتیدات در میسل‌های مخلوط تریتون X-۱۰۰ فسفاتیدات در غیاب و حضور M ۰/۶ mM از DEPC پس از پیش انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه اندازه‌گیری شد و نتیجه به صورت نمودار Lineweaver-Burk رسم گردید.

- سایر شیوه‌ها: اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد (Bradford) و با استفاده از آلبومین گاوی به عنوان استاندارد انجام گرفت [۲۸]. مطالعات اسپکتروفوتومتری در بافر کروماتوگرافی Cecil CEI021 [۱۰] و با استفاده از اسپکتروفوتومترهای Shimaduz Multispec (ژاپن) انجام گرفت. SDS پلی‌اکریل آمید ژل الکتروفورز جهت تعیین درجه خلوص، تعداد و وزن زیرواحدهای آنزیمی در ژل ۱۰ درصد به صورت ناپیوسته (Discontinuous) [۲۹] انجام گرفت. قبل از الکتروفورز جهت حذف تریتون X-۱۰۰، نمونه مورد استفاده به مدت ۱۰ دقیقه در مخلوط استون/هیدروکسید آمونیوم (V/V) ۳/۱.۷ به نسبت حجمی ۱ به ۵ انکوبه [۳۰] و سپس رسوب در دور ۲۰۰۰g جدا و پس از خشک شدن در بافر سمپلر حل گردید. ژل به روش رنگ آمیزی با نیترات نقره رنگ شد [۳۱].

#### نتایج

PAP<sub>2b</sub> ناب‌سازی شده از غشای سلول‌های کبدی موش صحرایی نر، فعالیت ویژه‌ای معادل ۷۳۵۰ mU/mg protein داشت. K<sub>m</sub> آنزیم در مدل کیتیکی رقت سطحی ۰/۴۳ مول درصد SDS-PAGE-کتروفورزیک نوار اصلی با وزن مولکولی ۳۳/۸ کیلو دالتون نشان داد (شکل شماره‌ی ۱). غیرفعال‌سازی آنزیم با غلظت‌های مختلف دی‌اتیل پیروکربنات در نمودار شماره‌ی ۲ مشاهده می‌شود.

دقیقه در ۳۷ °C انکوبه و سپس به وسیله افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد واکنش آنزیمی متوقف گردید و فسفات معدنی (Pi) حاصل از فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد [۱۸]. هر واحد آنزیمی (U) معادل مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول فسفات معدنی را در دقیقه آزاد کند، در نظر گرفته شد.

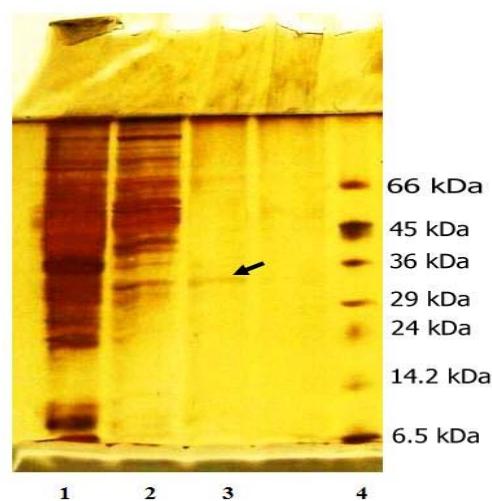
- غیرفعال‌سازی و اثر غلظت‌های مختلف دی‌اتیل پیروکربنات بر فعالیت PAP<sub>2b</sub>: محلول‌های تازه دی‌اتیل پیروکربنات (DEPC) روزانه تبیه [۱۹] و سپس شش عدد لوله آزمایش تمیز انتخاب گردید و در آنها در محیط سنجش فعالیت غلظت‌های ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌مولار از DEPC ایجاد و به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردیدند، سپس به لوله‌ها سوبسترا اضافه و فعالیت آنزیمی (۰/۰ میکروگرم) آنها تعیین و نتیجه به صورت یک منحنی رسم گردید. از غلظت‌های بالاتر دی‌اتیل پیروکربنات به این علت که با سایر اسیدهای آمینه واکنش جانبی می‌دهد، استفاده نگردید [۲۰].

- مطالعات کیتیکی: ثابت‌های کیتیکی و K<sub>m</sub> آنزیم بر اساس مدل کیتیکی رقت سطحی (Surface dilution) تعیین گردیدند [۲۱] و درصد مولی فسفاتیدات در میسل‌های مخلوط تریتون X-۱۰۰ فسفاتیدات با استفاده از فرمول:  $\times 100 \times ([\text{تریتون } X-100] + [\text{X}-100]) / [\text{X}] = \text{اسید فسفاتیدیک} / [\text{اسید فسفاتیدیک}] = \text{mol\% محاسبه گردید}$  [۲۱].

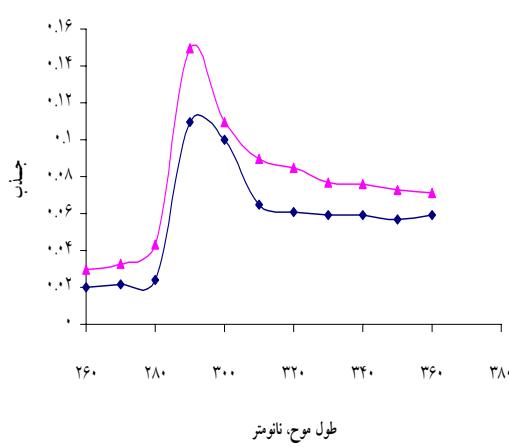
- برسی جذب اسپکتروفوتومتری آنزیم طبیعی و آنزیم غیرفعال شده با DEPC: دو لوله آزمایش تمیز یکی به عنوان شاهد و دیگری آزمون انتخاب و به هر کدام ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنزیم در بافر کروماتوگرافی اضافه شد و سپس در لوله آزمون غلظت ۱ mM DEPC ایجاد و لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند، سپس جذب اسپکتروفوتومتری شاهد در مقابل شاهدی که حاوی بافر کروماتوگرافی بود و جذب اسپکتروفوتومتری آزمون در مقابل شاهدی که حاوی بافر کروماتوگرافی و DEPC بود در طول موج بین ۲۶۰ تا ۳۶۰ nm خوانده و نتایج به صورت منحنی رسم گردید [۲۲، ۲۳] و سپس تعداد مول دی‌اتیل پیروکربنات متصل شده به مول آنزیم با استفاده از ضریب جذب مولی  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 10^3$  در ۲۴۲ نانومتر برای مشتق N-کربتوکسی هیستیدین [۱۷] و وزن مولکولی ۱۷۶ کیلو Dalton برای آنزیم PAP<sub>2b</sub> [۱۰] محاسبه شد.

- برسی اثر هیدروکسیل آمین بر روی آنزیم غیرفعال شده با DEPC: جهت برسی اثر هیدروکسیل آمین پس از اتمام زمان انکوباسیون لوله‌های آزمون و شاهد مرحله قبل

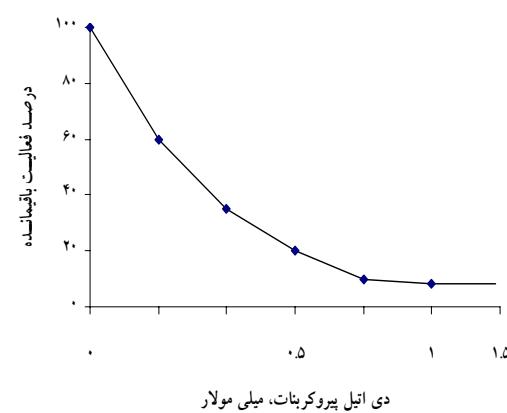
پیش انکوباسیون آنزیم  $\text{PAP}_{2b}$  با غلظت ۱ میلی مولار از دی اتیل پیروکربنات برای ۵ دقیقه منجر به کاهش فعالیت به میزان ۹۰ درصد نسبت به شاهد شد. نمودار شماره ۳ جذب اسپکتروفوتومتری آنزیم طبیعی و آنزیم غیرفعال شده با دی اتیل پیروکربنات را نشان می‌دهد. در این نمودار، منحنی آنزیم غیرفعال شده یک افزایش جذب را در ۲۹۰ نانومتر نسبت به آنزیم طبیعی نشان می‌دهد که مربوط به تغییر شکل فضایی (Conformational) آنزیم در اثر اتصال دی اتیل پیروکربنات به آنزیم می‌باشد. نمودار شماره ۴ نشان می‌دهد که نوع مهار ایجاد شده توسط دی اتیل پیروکربنات نسبت به فسفاتیدات، رقابتی است و نمودار شماره ۵ نشان می‌دهد که هیدروکسیل آمین در غلظت ۰/۴ میلی مولار قادر است فعالیت آنزیم  $\text{PAP}_{2b}$  غیرفعال شده را بازگرداند. استوکیومتری غیرفعال سازی  $\text{PAP}_{2b}$  با دی اتیل پیروکربنات در نمودار شماره ۶ مشاهده می‌شود. با استفاده از ضریب جذب مولی  $1\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$   $3 \times 10^3$  برای N-کربتوکسی هیستیدین در ۲۴۲ نانومتر [۱۰] و احتساب وزن مولکولی ۱۷۶ کیلو Dalton برای آنزیم  $\text{PAP}_{2b}$  مشخص گردید، وقتی آنزیم ۹۰ درصد غیرفعال می‌شود ۶ مول باقیمانده هیستیدین به ازای هر مول آنزیم تعدیل گردیده است.



شکل ۱- ژل الکتروفورز آنزیم نابسازی شده  $\text{PAP}_{2b}$  نمونه‌ها روی ژل ۱۰ درصد آکریل آمید حاوی SDS طبق شرایطی که در متن آمده الکتروفورز گردیدند. بندها از شماره ۱ تا ۳ به ترتیب شامل: هموژنیزه (۱۸۰ میکروگرم)، فراکسیون غشایی (۴۰ میکروگرم) و آنزیم خالص شده (۱۰ میکروگرم). پیکان روی شکل محل آنزیم نابسازی شده را نشان می‌دهد. نوار شماره ۴ استانداردهای پروتئینی (هر کدام ۵ میکروگرم) است که از بالا به پایین عبارتند از: سرم آلبومین گاوی (۶۶ کیلو Dalton)، اوآلبومن (۴۵ کیلو Dalton)، گلیسرآلدید ۳ فسفات دهیدروژناز (۳۶ کیلو Dalton)، کربنیک اسیدراز (۲۹ کیلو Dalton)، تریپسینوژن (۲۴ کیلو Dalton)، لاکتالبومین (۱۴/۲ کیلو Dalton) و آپروتینین (۶/۵ کیلو Dalton).



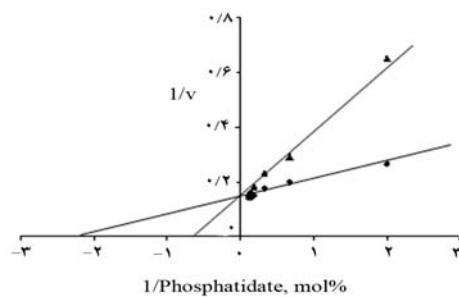
نمودار ۳- طیف جذبی آنزیم طبیعی و تعدیل شده با دی اتیل پیروکربنات. غلظت آنزیم طبیعی ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر در بافر کروماتوگرافی (♦) و غلظت آزمون ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر به همراه ۱ میلی مولار دی اتیل پیروکربنات (▲) در بافر مذکور. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه انکوبه سپس جذب آنزیم طبیعی در مقابل شاهدی که حاوی بافر کروماتوگرافی بود و جذب آزمون در مقابل شاهدی از بافر کروماتوگرافی که محتوی ۱ میلی مولار دی اتیل پیروکربنات بود قرائت شد.



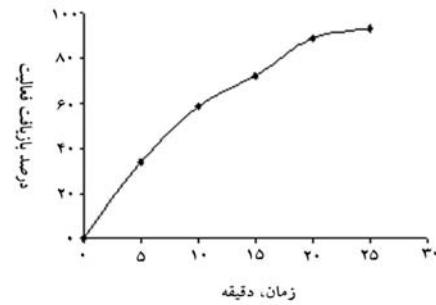
نمودار ۲- غیرفعال سازی آنزیم  $\text{PAP}_{2b}$  به وسیله دی اتیل پیروکربنات. غلظت‌های مختلف از دی اتیل پیروکربنات و ۰/۵ میکروگرم آنزیم در محیط سنجش فعالیت ایجاد و به مدت ۵ دقیقه انکوبه سپس با افزودن سویسترا فعالیت آنزیمی آنها اندازه‌گیری گردید. هر نقطه میانگین دو آزمایش مستقل است.

### بحث

جایگاه فعال بسیاری از آنزیم‌ها دارای اسیدهای آمینه با زنجیر اسیدی یا بازی هستند که می‌توانند در هنگام واکنش کاتالیتیکی به مولکول سوبسترا پروتئون بدنه‌دی یا از آن پروتئون بگیرند. هیستیدین در pH فیزیولوژیک می‌تواند هم به صورت یک اسید و هم به صورت باز عمل نماید و به این علت هیستیدین در جایگاه فعال بسیاری از آنزیم‌ها وجود دارد [۳۲]. باقیمانده هیستیدین اساسی، در جایگاه فعال آنزیم‌های متعددی همچون سوکروز فسفات سنتاز Prosops juliflora [۳۳]، ۶-فسفوگلوکو نات دهیدروژناز [۲۵]، آرژیناز [۳۴] و فسفاتیدات فسفوهیدرولاز سیتوزولی رات [۲۶] وجود دارد. برخی از ترکیبات شیمیابی می‌توانند با عوامل شیمیابی اسیدهای آمینه جایگاه فعال یک آنزیم، باکوآنزیم و یا یون‌های فعال کننده آنزیم ترکیب شوند و بدین ترتیب سدی در مقابل فعالیت کاتالیزوری آنزیم ایجاد کنند. از جمله این ترکیبات دی‌اتیل پیروکربنات است که قادر است با ریشه ایمیدازول اسید آمینه هیستیدین ترکیب و ایجاد مشتق N-کربتوکسی هیستیدین [۱۷، ۲۲] را بکند و چنانچه هیستیدین در مکان فعال آنزیم باشد منجر به غیرفعال شدن آنزیم می‌شود [۳۴]. PAP<sub>2b</sub> تخلیص شده در SDS پلی‌اکریل آمید ژل الکتروفورز یک نوار اصلی با وزن مولکولی ۳۳/۸ کیلو Dalton را نشان داد (شکل شماره ۱) که با نتایج سایر محققین که ۳۵ [۳۵] و ۳۱ [۳۶] کیلو Dalton گزارش شده هم خوانی دارد. نمودار شماره ۲ نشان می‌دهد که میزان غیرفعال شدن PAP<sub>2b</sub> تحت تاثیر معرف دی‌اتیل پیروکربنات وابسته به غلظت و زمان انکوباسیون است. آنزیم مذکور توسط دی‌اتیل پیروکربنات با غلظت ۱ میلی مولار در مدت ۵ دقیقه ۹۰ درصد مهار می‌شود. بنابراین طبق نتیجه حاصله پیشنهاد می‌گردد PAP<sub>2b</sub> دارای هیستیدین اساسی می‌باشد که با معرف دی‌اتیل پیروکربنات تشکیل کمپلکس N-کربتوکسی هیستیدین را می‌دهد. نتایج مشابهی برای آنزیم‌های دیگر مثل PAP<sub>1</sub> [۲۶]، آرژیناز [۳۴] و سوکروز فسفات سنتاز [۲۲] نیز به دست آمده است. هر چند دی‌اتیل پیروکربنات و پیشگی بالایی برای هیستیدین دارد ولی احتمال واکنش جانی آن با اسید آمینه لیزین، سیستین و تیروزین در غلظت‌های بالا نیز وجود دارد [۱۷، ۲۲، ۳۴] ولی فقط باقیمانده تیروزین و هیستیدین بلوکه شده با دی‌اتیل پیروکربنات به وسیله هیدروکسیل آمین قابل برگشت است و باقیمانده تیروزین تعديل شده با دی‌اتیل پیروکربنات قابل بازگشت نمی‌باشد [۱۷، ۳۷]. از طرف دیگر اگر واکنش با دی‌اتیل پیروکربنات همراه با کاهش جذب نوری در ۲۹۰ نانومتر باشد، دلیل بر واکنش تیروزین با دی‌اتیل پیروکربنات است [۱۷، ۳۷]. در



نمودار ۴- نمودار Lineweaver-Burk مربوط به اثر دی‌اتیل پیروکربنات. فعالیت آنزیم PAP<sub>2b</sub> در حضور ۰/۶ میلی مولار دی‌اتیل پیروکربنات (▲) و غیاب آن (◆) در غلظت‌های سطحی ۱/۵، ۰/۵، ۳/۱، ۵/۵، ۷/۲ و ۸/۵ مول درصد فسفاتیدات در میسل‌های مخلوط تریتون ۱۰۰-X / فسفاتیدات اندازه‌گیری شد. غلظت فسفاتیدات ۰/۳ میلی مولار ثابت و غلظت تریتون ۱۰۰-X متغیر بود. هر نقطه میانگین دو آزمایش مستقل است.



نمودار ۵- اثر هیدروکسیل آمین بر بازگشت فعالیت PAP<sub>2b</sub> تعديل شده با دی‌اتیل پیروکربنات. غلظت آنزیم ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر در بافر کروماتوگرافی به همراه ۱ میلی مولار دی‌اتیل پیروکربنات که به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. متعاقباً غلظت ۰/۴ میلی مولار هیدروکسیل آمین در محیط ایجاد و به فواصل زمانی مختلف فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری گردید. هر نقطه میانگین دو آزمایش مجزا است.



نمودار ۶- تعداد مول دی‌اتیل پیروکربنات متصل شده به مول آنزیم PAP<sub>2b</sub> برای ۵ دقیقه در حضور غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۵ و ۱ میلی مولار دی‌اتیل پیروکربنات در بافر کروماتوگرافی انکوبه شد. سپس فعالیت نمونه‌های آنزیمی و تعداد مول دی‌اتیل پیروکربنات متصل شده به آنزیم مطابق روش ذکر شده در متن اندازه‌گیری و محاسبه شد. هر نقطه میانگین دو آزمایش مستقل است.

وسيعى به نام ليبيد فسفات فسفاتازها (Lipid phosphate phosphatases) تعلق دارد [۳۸، ۱۳]. آزمایشات انجام گرفته بر روی دو عضو اين خانواده يعني گلوکز ۶ فسفاتاز و کلروپراکسیداز قارچی نشان داد که θیدرولیز استرفسفات از طريق يك واسطه فسفوهیستیدین انجام می گيرد [۳۹، ۴۰]. افزون بر اين، در رابطه با PAP<sub>1</sub> سیتوزولی نيز اثبات شده که واکنش کاتالیتيکي از طريق تشکيل يك واسطه فسفوهیستیدین صورت می گيرد [۲۶]. بنابراین، احتمالاً واکنش کاتالیتيکي PAP<sub>2b</sub> نيز از طريق يك واسطه فسفوهیستیدین انجام می گيرد. به هر حال برای ارایه يك مکانism دقیق پیشنهادی جهت واکنش آنزیم، نیاز به تحقیق و پژوهش در رابطه با وجود اسید آمینه لیزین و آرژینین اساسی در فعالیت آنزیم می باشد چون اهمیت لیزین و آرژینین اساسی به ترتیب در فعالیت کلروپراکسیداز قارچی و گلوکز ۶ فسفاتاز اثبات شده است [۳۹، ۴۰].

#### نتیجه گیری

مهار آنزیم PAP<sub>2b</sub> توسط دی اتیل پیر و کربنات حاکی از اساسی بودن هیستیدین برای فعالیت آنزیم PAP<sub>2b</sub> می باشد و احتمالاً واکنش کاتالیتيکي PAP<sub>2b</sub> نيز می بايستی همانند سایر اعضای خانواده اش از طريق تشکيل واسطه فسفوهیستیدینی پیش رود.

#### تشکر و قدر دانی

بدین وسیله از کلیه پرسنل محترم گروه بیوشیمی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که در انجام این مطالعه همکاری و مساعدت نمودند صمیمانه سپاسگزاری می گردد.

#### References:

- [1] Smith SW, Weiss SB, Kennedy EP. Enzymatic dephosphorylation of phosphatidic acid. *J Biol Chem* 1957; 228: 915-922.
- [2] Jamal Z, Martin A, Munoz AG, Brindley DN. Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol. *J Biol Chem* 1991; 266: 2988-2996.
- [3] Brindley DN. Intracellular translocation of phosphatidate phosphohydralase and its possible role in the control of glycerolipid synthesis. *Prog Lipid Res* 1984; 23: 115-33.
- [4] Pyne S, Long JS, Ktistakis NT, Pyne NJ. Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling. *Biochem Soc Trans* 2005;33: 1370-1374.
- [5] Han G-S, Wu WI, Carman GM. The *Saccharomyces cerevisiae* lipin homolog is a Mg<sup>2+</sup> dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J Biol Chem* 2006;281:9210-9218.
- [6] Kanoh H, Kai M, wada I. Molecular characterization of the type 2 phosphatidic acid phosphatase. *Chem Phys Lipids* 1999; 98: 119-126.
- [7] Nanjundan, M. and Possmayer, F. Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphohydrolase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284: L1-L23.
- [8] Brindley DN. Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem* 2004;92: 900-912.

نمودار شماره ۳ جذب آنزیم طبیعی و تعديل شده با دی اتیل پیر و کربنات در ۲۹۰ نانومتر دیده می شود، که همراه با افزایش جذب در ۲۹۰ نانومتر برای آنزیم تعديل شده با دی اتیل پیر و کربنات است. بنابراین با توجه به مطالب ذکر شده، واکنش انجام گرفته مربوط به تیروزین نمی باشد. در نمودار شماره ۴ نوع مهار ایجاد شده توسط دی اتیل پیر و کربنات مشاهده می شود که باعث افزایش  $K_m$  ظاهری آنزیم و ایجاد مهار رقابتی (Competitive inhibition) شده است. بنابراین با توجه به نوع مهار می توان گفت که هیستیدین در جایگاه فعال و یا در نزدیکی آن قرار گرفته است، به طوری که بلوکه شدن آن توسط دی اتیل پیر و کربنات باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم می شود. نمودار شماره ۵ اثر هیدروکسیل آمین بر روی PAP<sub>2b</sub> غیرفعال شده PAP<sub>2b</sub> توسط دی اتیل پیر و کربنات را نشان می دهد. انکوباسیون PAP<sub>2b</sub> غیرفعال شده با ۰/۴ میلی مولار هیدروکسیل آمین در مدت ۲۵ دقیقه، باعث بازگشت فعالیت آنزیم تعديل شده به میزان ۹۰ درصد فعالیت اولیه آنزیم و کاهش جذب در ۲۴۲ نانومتر گردید. افزون بر این اثبات شد که در ۷/۴ pH تغییر توسط دی اتیل پیر و کربنات به طور فوق العاده ای برای هیستیدین اختصاصی است [۲۲]. لذا با توجه به غلطت به کار رفته دی اتیل پیر و کربنات و مطالب ذکر شده می توان ادعا کرد که هیستیدین اساسی در PAP<sub>2b</sub> تعديل شده است. در نمودار شماره ۶ رابطه بین تعداد مول هیستیدین تغییر یافته و میزان غیرفعال شدن آنزیم مشاهده می شود. در این نمودار با اصلاح قسمت خطی منحنی مشاهده می شود که برای غیرفعال شدن یک مول آنزیم نیاز به ۶ مول دی اتیل پیر و کربنات است. لذا با توجه به ساختمان هگزامری پیشنهاد شده برای آنزیم PAP<sub>2b</sub> [۱۰]، احتمالاً در هر زیر واحد یک عدد هیستیدین تعديل شده است. PAP<sub>2</sub> در واقع نوعی فسفاتاز است که به یک خانواده

- [9] Waggoner DW, Martin A, Dewald J, Munoz AG, Brindley DN. Purification and characterization of a novel plasma membrane phosphatidate phosphohydrolase from rat liver. *J Biol Chem* 1995; 270: 19422-19429.
- [10] Fleming IN, Yeaman SJ. Purification and characterization of N-ethylmaleimide-insensitive phosphatidic acid phosphohydrolase (*PAP<sub>2</sub>*) from rat liver. *Biochem J* 1995; 308: 983-989.
- [11] Hooks SB, Ragan SP, Lynch KR. Identification of a novel human phosphatidic acid phosphatase type 2 isoform. *FEBS Lett* 1998; 427: 188-192.
- [12] Kanoh H, Imai SI, Yamada K, Sakane F. Purification and properties of phosphatidic acid phosphatase from porcine thymus membrane. *J Biol Chem* 1992; 267: 25309-25314.
- [13] Waggoner DW, Xu J, Singh I, Jasinska R, Zhang QX, Brindley DN. Structural organization of mammalian lipid phosphate phosphatase: implications for signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1439: 299-316.
- [14] Sigal YJ, McDermott MI, Morris AJ. Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem J* 2005; 387: 281-293.
- [15] Sciorra VA, Morris AJ. Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1582: 45-51.
- [16] Grouselle M, Thiam AA, Pudles J. The role of histidine residues in yeast hexokinase. *Eur J Biochem* 1973; 39: 431-441.
- [17] Ding S, Li Y, Zhu L. Identification of histidine residues at the active site of *Megalobatrachus japonicus* alkaline phosphatase by chemical modification. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1594: 100-108.
- [18] Haghghi B, Honarjou S. The effects of hydrazine on the phosphatidate phosphohydrolase activity in rat liver. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 1163-1165.
- [19] Hirs CHW, Timasheff SN. Modification of histidyl residues in protein by diethylpyrocarbonate. *Meth Enzymol* 1977; 47: 431-441.
- [20] Donovan JW. Changes in ultraviolet absorption produced by alteration of protein conformation. *J Biol Chem* 1969; 244: 1961-1967.
- [21] Carman GM, Deems RA, Dennis EA. Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics. *J Biol Chem* 1995; 270: 18711-18714.
- [22] Shina AK, Pathre UV, Sane PV. Essential histidyl residues at the active site(s) of sucrose-phosphate synthase from *Prosopis juliflora*. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1388: 397-404.
- [23] Morris DL, McKinley-McKee JS. Histidine in liver alcohol dehydrogenase. Chemical modification with diethylpyrocarbonate. *Eur J Biochem* 1972; 29: 515-520.
- [24] Burstein Y, Walsh KA, Neurath H. Evidence of an essential histidine residue in thermolysin. *Biochemistry* 1974; 13: 205-210.
- [25] Rippa M, Signorini M, Pontremoli S. Evidence for the involvement of a histidine residue in the binding of substrate to 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 1972; 150: 503-510.
- [26] Haghghi B, Takhshid A. The evidence for essential histidine residue in soluble phosphatidate phosphohydrolase of rat liver. *Iranian J Sci Thech* 1999; 23: 109-116.
- [27] Dennis EA. Phospholipase *A<sub>2</sub>* activity towards phosphatidylcholine in mixed micelles: surface dilution kinetics and the effect of thermotropic phase transitions. *Arch Biol Biophys* 1973; 158: 485-493.
- [28] 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: 248-254.
- [29] Weber K, Pringle JR, Osborn M. Measurement of molecular weight by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Meth Enzymol* 1972; 26: 3-27.
- [30] Feuerstein N, Cooper HL. Rapid protein phosphorylation induced by phorbol ester in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1983; 258: 10786-10793.
- [31] Heukeshoven J, Dernick R. Simplified method for silver staining of protein in polyacrylamide gel and the mechanism of the silver staining. *Electrophoresis* 1985; 6(3): 103-112.
- [32] Stryer L. Biochemistry. WH, Freeman and company/New York. 1988.
- [33] Shina AK, Pathre UV, Sane PV. Essential histidyl residues at the active site(s) of sucrose-phosphate synthase from *Prosopis juliflora*. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1388: 397-404.
- [34] Carvajal N, Enriquez S, Salas M, Uribe E. A critical histidine residue in arginase from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 1997; 46: 1327-1329.
- [35] Kai M, Wada I, Imai S, Sakane F, Kanoh H. Identification and cDNA cloning of 35-KDa phosphatidic acid phosphatase (type 2) bound to plasma membrane. *J Biol Chem* 1996; 271: 18931-18938.
- [36] Siess EA, Hofstetter MM. Identification of phosphatidate phosphohydrolase purified from rat liver membrane on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *FEBS Lett* 1996; 381: 169-173.
- [37] Cousineau J, Meighen E. Chemical modification of bacterial Luciferase with ethoxyformic anhydride; Evidence for a histidyl residue. *Biochemistry* 1976; 15: 4992-5000.

- [38] Brindley DN, Waggoner DW. Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. *J Biol Chem* 1998; 273: 24281-24284.
- [39] Pan CJ, Lei KJ, Annabi B, Hemrike W, Chou JY. Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem* 1998; 273: 6144-6148.
- [40] Messerschmidt A, Prade L, Wever R. Implication for the catalytic mechanism of the vanadium enzyme chloroperoxidase from the fungus Curvularia inaequalis by X-ray structure of the native and peroxide form. *Biol Chem* 1997; 378: 309-315.