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

اسفندیار حیدریان [*۱]، بهرام حقیقی [۲]

خلاصه

سابقه و هدف: آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز (PAP) باعث تبدیل اسید فسفاتیدیک به دی‌آسیل گلیسرول و فسفات معدنی (Pi) می شود. دو فرم مختلف از آنزیم PAP در سلولهای کبدی موش صحرایی گزارش شده است، یکی PAP_1 که در متابولیسم 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 مرحله‌ی کروماتوگرافی تخلیص گردید. ثابت‌های کینتیکی بر اساس مدل کینتیک رقت سطحی تعیین گردیدند. جهت تعیین خلوص، تعداد و وزن زیرواحدهای آنزیمی از روش الکتروفورز ناپیوسته 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 ۷۳۵۰mU/mg protein داشت. الکتروفورز PAP_{2b} تخلیص شده در حضور SDS یک نوار با وزن مولکولی ۳۳/۸ کیلودالتون نشان داد. مطالعات غیرفعال‌سازی آنزیم به وسیله معرف دی‌اتیل پیرو کربنات شواهدی بر ضرورت وجود هیستیدین اساسی برای فعالیت آنزیم مهیا کرد. تعداد مول هیستیدین تعدیل شده به ازای هر مول آنزیم ۶ عدد بود.

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

واژگان کلیدی : فسفاتیدات فسفوهیدرولاز، هیستیدین، دی‌اتیل 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 مسوول:** اسفندیار حیدریان

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

پست الکترونیک: heidarian46@ yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۳ ۳۱۴ ۵۲۲۹

دورنویس: ۰۸۴۱ ۲۲۲۷۱۲۲

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۲۶

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۷/۶/۵

مقدمه

آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز (3.1.3.4 Phosphatidate phosphohydrolase, PAP, EC) باعث تبدیل اسید فسفاتیدیک به دی‌آسیل گلیسرول و فسفات معدنی (Pi) می‌شود [۱]. این واکنش مرحله محدودکننده و تنظیمی در متابولیسم گلیسرولیپیدها در سلول‌های حیوانی است. این آنزیم دارای دو فرم است؛ یک فرم سیتوزولی که به آن PAP_1 گفته می‌شود و در متابولیسم گلیسرولیپیدها مثل تری‌گلیسرید، فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین نقش داشته و برای فعالیت نیازمند یون Mg^{2+} است و کاملا به وسیله N– اتیل مالیمید (NEM) مهار می‌شود [۵-۲]. 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 Signal transduction، تمایز و مهاجرت سلولی نقش دارد [۸- ۶]. 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} تقریبا ۳۰ درصد و مابقی را PAP_{2b} در غشا تشکیل می‌دهد [۱۰]. درکبد انسان افزون

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]

بر دو ایزوفرم مذکور نوع PAP_{2c} نیز وجود دارد [۱۱]. PAP_{2a} تا کنون در حد یک پروتئین همگن، خالص نشده است. PAP_{2a} در مقابل انواع اسید فسفاتیدیک با طول زنجیره و درجه اشباعی مختلف فعال است ولی PAP_{2b} تمایلی به مصرف اسید فسفاتیدیک با طول زنجیره متوسط را ندارد [۱۰]. مطالعات انجام گرفته بر روی PAP_{2b} نشان داده است که یون‌های Ca^{2+}، Mn^{2+} و Zn^{2+} و Co^{2+} دارای اثرات مهاری بر فعالیت آنزیم هستند [۱۰، ۱۲] و افزون بر این آمین‌های آمفی فیلیک مثل پروپرانولول، کلروپرومازین، اسفنگوزین و دسی‌پرامین نیز باعث مهار PAP_{2b} می‌گردند [۱۰، ۱۲]. PAP_2 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 [۱۵-۱۳]. علی‌رغم اهمیت PAP_2 در پدیده Signal transduction اطلاعات محدودی در مورد ساختمان، مکانیسم عمل و اسید یا اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال آن وجود دارد. شناخت خواص آنزیمولوژیکی و ساختمانی این آنزیم می‌تواند گام موثری در شناسایی مکانیسم عمل و نحوه‌ی 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_{2b} 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 انستیتو پاستور تهران خریداری و در اتاق حیوانات نگهداری گردیدند. موش‌های صحرایی در دریافت آب و غذا تا زمان آزمایش آزاد بودند. ۱۴سر موش‌های صحرایی نر جهت تخلیص آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

مواد: اسید فسفاتیدیک (ملح دی سدیم)، دی تیوترایتول (DTT)، N- اتیل مالیمید (NEM)، لوپپتین، مهارکننده Soyabean tripsin، بنزآمیدین، دی‌اتیل پیروکربنات (DEPC)، هیدروکسیل آپاتیت، پپستاتین، هپارین سفارز، n- اکتیل گلوکوزید، سفاکریل S۳۰۰، AffiGel Blue و تریتون X-۱۰۰ از شرکت سیگما (Sigma, U.S.A). EDTA[1]، EGTA[2]، PMSF[3]، گلیسرول و سرم آلبومین گاوی از شرکت مرک (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 ⊥ 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 ۲۵ mM و PH=۷/۴ که محتوی ۱۰ درصد گلیسرول، NaCl ۵۰ mM، ۱mM دی‌تیوتریتول، EDTA ۱mM، EGTA ۱ mM، PMSF ۱ mM ، ۱ mM بنزآمیدین، ۵ µg/ml از هر یک از آنتی‌پروتئازهای پپستاتین A، لوپپتین و مهارکننده تریپسین سویا)، هموژنیزه گردید (تمام مراحل روی یخ انجام گرفت) [۱۰]. هموژنیزه به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰g سانتریفوژ و محلول رویی جدا گردید. PAP_{2b} از غشای سلول‌های کبدی موش صحرایی بر اساس روش Fleming و همکارانش با استفاده از بافر کروماتوگرافی (همان بافر هموژنیزه‌کننده به علاوه ۱ درصد (W/V) از تریتون X-۱۰۰) ناب‌سازی گردید [۱۰] و فقط مرحله هیدروکسیل آپاتیت به روش Batch wise انجام گرفت.

- سنجش فعالیت آنزیم: فعالیت آنزیم PAP_{2b} در بافر سنجش (μl ۲۵۰) که حاوی ۵۰ میلی‌مولار تریس هیدروکلرید با PH=۷/۴، ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین گاوی، ۳/۲ میلی‌مولار تریتون X-۱۰۰ ، ۴ میلی‌مولار NEM، ۰/۳۵ میلی‌مولار اسید فسفاتیدیک، ۱ میلی‌مولار از هر یک از DTT، EDTA و EGTA و 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

1- EDTA; Ethylenediaminetetra acetic acid

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

3- PMSF; Phenylmethylsulfunyl fluoride

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]

دقیقه در ^{o}C ۳۷ انکوبه و سپس به وسیله افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک 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 دی اتیل پیروکربنات بر فعالیت PAP_{2b}: محلول‌های تازه دی‌اتیل پیروکربنات (DEPC) روزانه تهیه [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 (۰/۵ 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 کینتیکی: ثابت‌های کینتیکی و K_m آنزیم بر اساس مدل کینتیک رقت سطحی (Surface dilution kinetic) تعیین گردیدند [۲۱] و درصد مولی فسفاتیدات در میسل‌های مخلوط تریتون X-۱۰۰/ فسفاتیدات با استفاده از فرمول: ۱۰۰× ([تریتون X-۱۰۰] + [اسید فسفاتیدیک] / [اسید فسفاتیدیک])= mol% محاسبه گردید [۲۱].

- بررسی جذب اسپکتروفتومتری آنزیم طبیعی و آنزیم غیرفعال شده با DEPC: دو لوله آزمایش تمیز یکی به عنوان شاهد و دیگری آزمون انتخاب و به هرکدام ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنزیم در بافر کروماتوگرافی اضافه شد و سپس در لوله آزمون غلظت ۱ mM از DEPC ایجاد و لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند، سپس جذب اسپکتروفتومتری شاهد در مقابل شاهدی که حاوی بافر کروماتوگرافی بود و جذب اسپکتروفتومتری آزمون در مقابل شاهدی که حاوی بافر کروماتوگرافی و ۱ mM از DEPC بود در طول موج بین ۲۶۰ تا ۳۶۰ nm خوانده و نتایج به صورت منحنی رسم گردید [۲۳، ۲۴] و سپس تعداد مول دی‌اتیل پیروکربنات متصل شده به مول آنزیم با استفاده از ضریب جذب مولی $M^{-1} cm^{-1}$ ۳×۱۰ ^{3} در ۲۴۲ نانومتر برای مشتق N– کربتوکسی هیستیدین [۱۷، ۲۲] و وزن مولکولی ۱۷۶ کیلودالتون برای آنزیم PAP_{2b} [۱۰] محاسبه شد.

- بررسی اثر هیدروکسیل آمین بر روی آنزیم غیرفعال شده با DEPC: جهت بررسی اثر هیدروکسیل آمین پس از اتمام زمان انکوباسیون لوله‌های آزمون و شاهد مرحله قبل (بررسی جذب اسپکتروفتومتری)، 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 (۲M) 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 [۲۵، ۲۶].

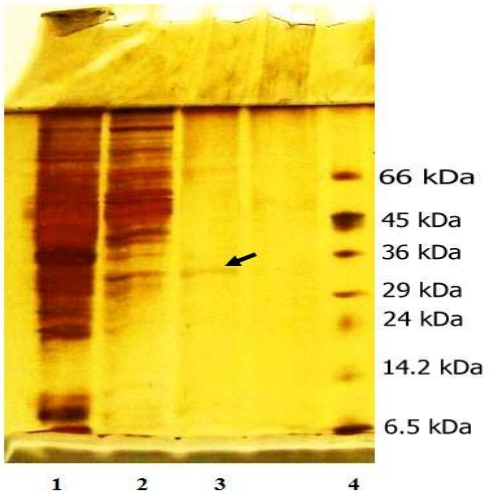
- بررسی نوع مهار PAP_{2b} به وسیله DEPC: فعالیت آنزیم PAP_{2b} (۰/۵ میکروگرم) بر اساس مدل کینتیک رقت سطحی [۲۱، ۲۷] در محیط سنجش فعالیت محتوی غلظت‌های سطحی ۰/۵، ۱/۵، ۵/۱، ۵/۳، ۷/۲ و۸/۵ مول درصد از فسفاتیدات در میسل‌های مخلوط تریتون X -۱۰۰ فسفاتیدات در غیاب و حضور ۰/۶ mM از DEPC پس از پیش انکوباسیون به مدت ۵دقیقه 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 اسپکتروفتومتری در بافرکروماتوگرافی [۱۰] و با استفاده از اسپکتروفتومترهای Cecil CEl021 (انگلستان) و Shimaduz Multispec 1501 (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، نمونه‌ی مورد استفاده به مدت ۱۰ دقیقه در مخلوط استون/ هیدروکسیدآمونیوم (V/V، 3/1.7) به نسبت حجمی ۱ به ۵ انکوبه [۳۰] و سپس رسوب در دور ۲۵۰۰۰g جدا و پس از خشک شدن در بافر سمپلر حل گردید. ژل به روش رنگ‌آمیزی با نیترات نقره رنگ شد [۳۱].

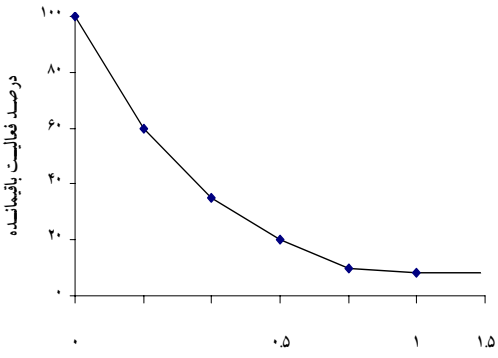
نتایج

PAP_{2b} ناب‌سازی شده از غشای سلول‌های کبدی موش صحرایی نر، فعالیت ویژه‌ای معادل ۷۳۵۰mU/mg protein داشت. K_m آنزیم در مدل کینتیک رقت سطحی ۰/۴۳ مول درصد بود و آنزیم ناب‌سازی شده با روش SDS -PAGE الکتروفورزیک 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]

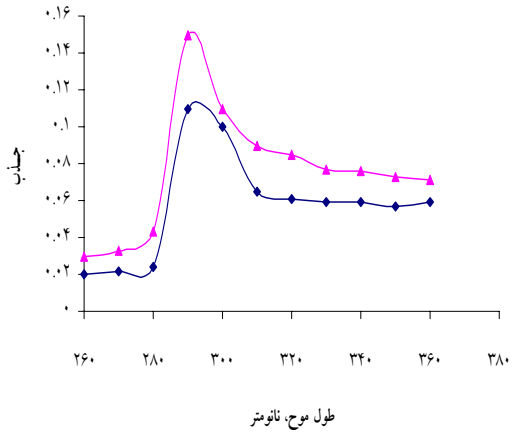


شکل ۱- SDS ژل الکتروفورز آنزیم ناب‌سازی شده PAP_{2b}. نمونه‌ها روی ژل ۱۰ درصد آکریل آمید حاوی SDS طبق شرایطی که در متن آمده الکتروفورز گردیدند. بندها از شماره ۱ تا ۳ به ترتیب شامل: هموژنیزه (۱۸۰ میکروگرم)، فراکسیون غشایی (۴۰ میکروگرم) و آنزیم خالص شده (۱۰ میکروگرم). پیکان روی شکل محل آنزیم ناب‌سازی شده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



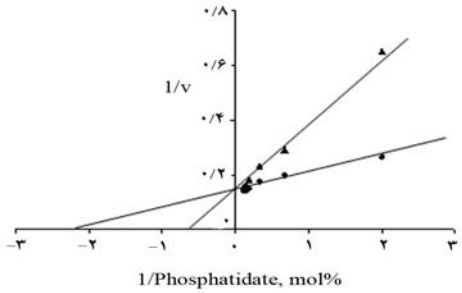
نمودار ۲- غیرفعال‌سازی آنزیم PAP_{2b} به وسیله دی اتیل پیروکربنات. غلظت‌های مختلف از دی‌اتیل پیروکربنات و ۰/۵ میکروگرم آنزیم در محیط سنجش فعالیت ایجاد و به مدت ۵ دقیقه انکوبه سپس با افزودن سوبسترا فعالیت آنزیمی آنها اندازه‌گیری گردید. هر نقطه میانگین دو آزمایش مستقل است.

پیش انکوباسیون آنزیم PAP_{2b} با غلظت ۱ میلی‌مولار از دی‌اتیل پیروکربنات برای ۵ دقیقه منجر به کاهش فعالیت به میزان ۹۰ درصد نسبت به شاهد شد. نمودار شماره‌ی ۳ جذب اسپکترفتومتری آنزیم طبیعی و آنزیم غیرفعال شده با دی‌اتیل 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 دی‌اتیل پیروکربنات به آنزیم می‌باشد. نمودار شماره‌ی ۴ نشان می‌دهد که نوع مهار ایجاد شده توسط دی‌اتیل پیروکربنات نسبت به فسفاتیدات، رقابتی (Competitive) است و نمودار شماره‌ی ۵ نشان می‌دهد که هیدروکسیل آمین در غلظت ۰/۴ میلی‌مولار قادر است فعالیت آنزیم PAP_{2b} غیرفعال شده توسط دی‌اتیل پیروکربنات را به میزان ۹۰ درصد اولیه در مدت ۲۵ دقیقه باز گرداند. استوکیومتری غیرفعال‌سازی PAP_{2b} با دی‌اتیل پیرو کربنات در نمودار شماره‌ی ۶ مشاهده می‌شود. با استفاده از ضریب جذب مولی $M^{-1}\ cm^{-1}$ ۳×۱۰^{۳} برای N– کربتوکسی هیستیدین در ۲۴۲ نانومتر [۲۲، ۲۷] و احتساب وزن مولکولی ۱۷۶ کیلودالتون برای آنزیم PAP_{2b} [۱۰] مشخص گردید، وقتی آنزیم ۹۰ درصد غیرفعال می‌شود ۶ مول باقی‌مانده هیستیدین به ازای هر مول آنزیم تعدیل گردیده است.

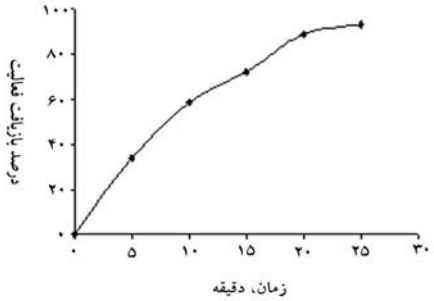


نمودار ۳- طیف جذبی آنزیم طبیعی و تعدیل شده با دی اتیل پیروکربنات. غلظت آنزیم طبیعی ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بافر کروماتوگرافی (♦) و غلظت آزمون ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به همراه ۱ میلی‌مولار دی‌اتیل پیروکربنات (▲) در بافر مذکور. لوله ها به مدت ۵ دقیقه انکوبه سپس جذب آنزیم طبیعی در مقابل شاهدی که حاوی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

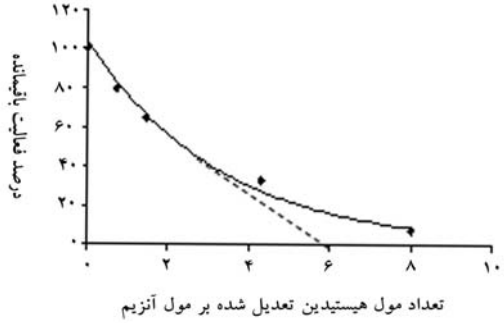
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]



نمودار ۴- نمودار Lineweaver- Burk مربوط به اثر دی‌اتیل پیروکربنات. فعالیت آنزیم PAP_{2b} در حضور ۰/۶ میلی‌مولار دی اتیل پیرو کربنات (▲) و غیاب آن (♦) در غلظت‌های سطحی ۰/۵، ۱/۵، 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 میلی‌مولار ثابت و غلظت تریتون ۱۰۰-X متغییر بود. هر نقطه میانگین دو آزمایش مستقل است.



نمودار ۵- اثر هیدروکسیل آمین بر بازگشت فعالیت PAP_{2b} تعدیل شده با دی‌اتیل پیروکربنات. غلظت آنزیم ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بافر کروماتوگرافی به همراه ۱ میلی مولار دی اتیل پیروکربنات که به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. متعاقباً غلظت ۰/۴ میلی‌مولار 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 دی اتیل پیروکربنات متصل شده به مول آنزیم PAP_{2b}. آنزیم PAP_{2b} برای ۵ دقیقه در حضور **غلظت‌های ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۵ و ۱ میلی مولار دی اتیل پیروکربنات در** بافر کروماتوگرافی انکوبه شد. سپس فعالیت نمونه‌های آنزیمی و تعداد مول دی اتیل پیروکربنات متصل شده به آنزیم مطابق روش ذکر شده در متن اندازه‌گیری و محاسبه شد. 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 پروتون بدهند یا از آن پروتون 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- فسفوگلوکونات دهیدروژناز [۲۵]، آرژیناز [۳۴] و فسفاتیدات فسفوهیدرولاز سیتوزولی رات [۲۶] وجود دارد. برخی از ترکیبات شیمیایی می‌توانند با عوامل شیمیایی اسیدهای آمینه جایگاه فعال یک آنزیم، باکوآنزیم و یا یون‌های فعال‌کننده 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_{2b} تخلیص شده در SDS پلی‌اکریل آمید ژل الکتروفورز یک نوار اصلی با وزن مولکولی ۳۳/۸ کیلودالتون را نشان داد (شکل شماره‌ی ۱) که با نتایج سایر محققین که ۳۵ [۳۵] و ۳۱ [۳۶] کیلودالتون گزارش شده هم‌خوانی دارد. نمودار شماره‌ی ۲ نشان می‌دهد که میزان غیرفعال شدن PAP_{2b} تحت تاثیر معرف دی‌اتیل پیروکربنات وابسته به غلظت و زمان انکوباسیون است. آنزیم مذکور توسط دی‌اتیل پیروکربنات با غلظت ۱ میلی‌مولار در مدت ۵ دقیقه ۹۰ درصد مهار می‌شود. بنابراین طبق نتیجه حاصله پیشنهاد می‌گردد PAP_{2b} دارای هیستیدین اساسی می‌باشد که با معرف دی‌اتیل پیروکربنات تشکیل کمپلکس N- کربتوکسی هیستیدین را می‌دهد. نتایج مشابهی برای آنزیم‌های دیگر مثل PAP_1 [۲۶]، آرژیناز [۳۴] و سوکروزفسفات سنتاز [۲۲] نیز به دست آمده است. هر چند دی اتیل پیروکربنات ویژگی بالایی برای هیستیدین دارد ولی احتمال واکنش جانبی آن با اسید آمینه لیزین، سیستئین 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 تعدیل شده با دی‌اتیل پیروکربنات قابل بازگشت نمی‌باشد [۱۷، ۳۷]. از طرف دیگر اگر واکنش با دی اتیل پیروکربنات همراه با کاهش جذب نوری در ۲۹۰ نانومتر باشد، دلیل بر واکنش تیروزین با دی‌اتیل پیروکربنات است [۱۷، ۳۷]. در

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]

نمودار شماره‌ی ۳ جذب آنزیم طبیعی و تعدیل شده با دی‌اتیل پیروکربنات در ۲۹۰ نانومتر دیده می‌شود، که همراه با افزایش جذب در ۲۹۰ نانومتر برای آنزیم تعدیل شده با دی‌اتیل پیروکربنات است. بنابراین با توجه به مطالب ذکر شده، واکنش انجام گرفته مربوط به تیروزین نمی‌باشد. در نمودار شماره‌ی ۴ نوع مهار ایجاد شده توسط دی‌اتیل پیروکربنات مشاهده می‌شود که باعث افزایش K_m ظاهری آنزیم و ایجاد مهار رقابتی (Competitive inhibition) شده است. بنابراین با توجه به نوع مهار می‌توان گفت که هیستیدین در جایگاه فعال و یا در نزدیکی آن قرار گرفته است، به طوری که بلوکه شدن آن توسط دی‌اتیل پیروکربنات باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم می‌شود. نمودار شماره‌ی ۵ اثر هیدروکسیل آمین بر روی PAP_{2b} غیرفعال شده توسط دی اتیل پیروکربنات را نشان می‌دهد. انکوباسیون PAP_{2b} غیرفعال شده با ۰/۴ میلی‌مولار هیدروکسیل آمین در مدت ۲۵ دقیقه، باعث بازگشت فعالیت آنزیم تعدیل شده به میزان ۹۰ درصد فعالیت اولیه آنزیم و کاهش جذب در ۲۴۲ نانومتر گردید. افزون بر این اثبات شد که در pH=۷/۴ تغییر توسط دی اتیل پیروکربنات به طور فوق‌العاده‌ای برای هیستیدین اختصاصی است [۲۲]. لذا با توجه به غلظت به کار رفته دی اتیل پیروکربنات و مطالب ذکر شده می‌توان ادعا کرد که هیستیدین اساسی در PAP_{2b} تعدیل شده است. در نمودار شماره‌ی ۶ رابطه بین تعداد مول هیستیدین تغییر یافته و میزان غیرفعال شدن آنزیم مشاهده می‌شود. در این نمودار با اصلاح قسمت خطی منحنی مشاهده می‌شود که برای غیرفعال شدن یک مول آنزیم نیاز به ۶ مول دی‌اتیل پیروکربنات است. لذا با توجه به ساختمان هگزامری پیشنهاد شده برای آنزیم PAP_{2b} [۱۰]، احتمالا در هر زیرواحد یک عدد هیستیدین تعدیل شده است. PAP_2 در واقع نوعی فسفاتاز است که به یک خانواده وسیعی به نام لیپید فسفات فسفاتازها (Lipid phosphate phosphatases) تعلق دارد [۱۳، ۳۸]. آزمایشات انجام گرفته بر روی دو عضو این خانواده یعنی گلوکز ۶ فسفاتاز وکلروپراکسیداز قارچی نشان داد که ئیدرولیز استرفسفات از طریق یک واسطه فسفوهیستیدین انجام می‌گیرد [۳۹، ۴۰]. افزون بر این، در رابطه با PAP_1 سیتوزولی نیز اثبات شده که واکنش کاتالیتیکی از طریق تشکیل یک واسطه فسفوهیستیدین صورت می‌گیرد [۲۶]. بنابراین، احتمالا واکنش کاتالیتیکی PAP_{2b} نیز از طریق یک واسطه فسفوهیستیدین انجام می گیرد. به هرحال برای ارایه یک مکانیسم دقیق پیشنهادی جهت واکنش آنزیم، نیاز به تحقیق و پژوهش در رابطه با وجود اسید آمینه لیزین و آرژنین اساسی در فعالیت آنزیم می‌باشد چون اهمیت لیزین و آرژنین اساسی به ترتیب در فعالیت کلروپراکسیداز قارچی و گلوکز ۶ فسفاتاز اثبات شده است [۳۹، ۴۰].

نتیجه‌گیری

مهار آنزیم PAP_{2b} توسط دی‌اتیل پیر و کربنات حاکی از اساسی بودن هیستیدین برای فعالیت آنزیم PAP_{2b} می‌باشد و احتمالا واکنش کاتالیتیکی PAP_{2b} نیز می‌بایستی همانند سایر اعضای خانواده‌اش از طریق تشکیل واسطه فسفوهیستیدنی 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^{2+} 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]

[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-insensitve phosphatidic acid phosphohydrolase (PAP_2) 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 1ett*** 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 phosphatasesin 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] Haghigh B, Honarjou S. The effects of hydrazine on the phosphatidate phosphohydrolase activity in rat liver. ***Biochem Pharmaco*** 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 diethylpyrocarbonat. ***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-phopsphogluconate dehydrogenase. ***Arch Biochem Biophys*** 1972; 150:503-510.
[26] Haghighi 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_2 activity towards phosphatidylcholine in mixed micelles: surface dilution kinetics and the effect of thermotropic phase transitions. ***Arch Biol Biophy*** 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]

[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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-04]