

## اثر برخی از دترجنت‌ها و عوامل پایدارکننده بر فعالیت آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز غشایی (PAP<sub>2</sub>) کبد موش صحرایی

اسفندیار حیدریان<sup>۱\*</sup>؛ بهرام حقیقی<sup>۲</sup>؛ عصمت جعفری دهکردی<sup>۳</sup>

### چکیده

**زمینه:** آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز (PAP) تبدیل اسید فسفاتیدیک به دی‌آسیل گلیسرول و فسفات معدنی (Pi) را کاتالیز می‌کند. دو فرم مختلف از آنزیم PAP در سلول‌های کبدی موش صحرایی گزارش شده است، یکی PAP<sub>1</sub> که در متابولیسم فسفولیپیدها و گلیسرولیپیدها دخالت دارد و شکل دیگر PAP<sub>2</sub> که در پدیده Signal transduction نقش دارد. متعاقباً اثبات شد PAP<sub>2</sub> دارای دو ایزوفرم PAP<sub>2a</sub> و PAP<sub>2b</sub> می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر عوامل دترجنتی توئین ۸۰، لوپرول PX، CTAB و غیردترجنتی سوکروز، تراهالوز و آلبومین بر پایداری و فعالیت PAP<sub>2b</sub> می‌باشد.

**روش‌ها:** تعداد ۱۴ سر موش‌های صحرایی نژاد Wistar و در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرمی مورد استفاده قرار گرفت. PAP<sub>2b</sub> از غشاء سلول‌های کبدی موش صحرایی با استفاده از n-اکتیل گلوکوزید محلول‌سازی و طی چندین مرحله کروماتوگرافی تخلیص گردید. SDS پلی‌اکریل آمید ژل الکتروفورز برای تعیین درجه خلوص، تعداد و وزن زیرواحدهای آنزیمی در ژل ۱۰ درصد به صورت ناپیوسته انجام گرفت. اثر سوکروز، تراهالوز و آلبومین بر فعالیت PAP<sub>2b</sub> در غلظت‌های مختلف بررسی شد.

**یافته‌ها:** PAP<sub>2b</sub> تخلیص شده، فعالیت ویژه‌ای معادل ۷۳۵۰ mU/mg protein داشت. الکتروفورز PAP<sub>2b</sub> تخلیص شده در حضور SDS یک نوار با وزن مولکولی ۳۳/۸ کیلو دالتون نشان داد. فعالیت آنزیم PAP<sub>2b</sub> با لوپرول PX و توئین ۸۰ در غلظت ۳mM تقریباً ۳ برابر تحریک گردید و با CTAB در غلظت ۱-۲mM برابر تحریک شد. تراهالوز، سوکروز و آلبومین به ترتیب در غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۰ درصد در محیط سنجش بیشترین اثر پایدارکنندگی را برای آنزیم داشتند.

**نتیجه‌گیری:** دترجنت‌های توئین ۸۰، لوپرول PX و CTAB نیز قادر به تحریک فعالیت آنزیم PAP<sub>2b</sub> هستند. در صورت نیاز به پایدار نمودن آنزیم PAP<sub>2b</sub> به وسیله عوامل غیردترجنتی، استفاده از تراهالوز بهتر از سوکروز و آلبومین است. دترجنت غیر یونی لوپرول PX نسبت به سایر دترجنت‌های یونی و غیر یونی توانایی بیشتری در فعال‌سازی آنزیم PAP<sub>2b</sub> نشان می‌دهد.

**کلیدواژه‌ها:** فسفاتیدات فسفوهیدرولاز غشایی، دترجنت، سوکروز، تراهالوز، آلبومین

«دریافت: ۱۳۸۷/۳/۲۰ پذیرش: ۱۳۸۸/۳/۱۲»

۱. گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۲. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۳. گروه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز بهداشت شهرستان شهرکرد

\* عهده‌دار مکاتبات: ایلام، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده پزشکی، تلفن: ۰۹۱۳۳۱۴۵۲۲۹

## مقدمه

تحریک شده به دی آسیل گلیسرول تبدیل می شود و این عمل موجب تأخیر در فعال شدن پروتئین کیناز C از مسیر فسفولیپاز D در مقایسه با مسیر فسفولیپاز C است (۱۱-۱۳). متعاقباً اثبات شد PAP<sub>2</sub> دارای دو ایزوفرم PAP<sub>2a</sub> و PAP<sub>2b</sub> می باشد که از لحاظ میزان اسیدسیالیک با یکدیگر متفاوت هستند (۲). علاوه بر این از لحاظ مقدار، PAP<sub>2a</sub> تقریباً ۳۰ درصد و مابقی را PAP<sub>2b</sub> در غشاء تشکیل می دهد (۱۴). مطالعات انجام گرفته در روی PAP<sub>2b</sub> نشان داده است که یونهای Ca<sup>2+</sup>، Mn<sup>2+</sup>، Zn<sup>2+</sup> و Co<sup>2+</sup> دارای تأثیرات مهاری بر فعالیت آنزیم هستند و علاوه بر این آمینهای آمفی فیلک مانند پروپرانولول، کلروپرومازین، اسفنگوزین و دسی پرامین نیز موجب مهار PAP<sub>2b</sub> می گردند (۱۴ و ۱۵). PAP<sub>2a</sub> تاکنون به صورت یک پروتئین همگن خالص سازی نشده است و بر روی PAP<sub>2b</sub> نیز به رغم تخلیص آن مطالعات محدودی صورت گرفته است (۱۵). در رابطه با اثر برخی از دترجنتها بر فعالیت آنزیم PAP<sub>2</sub> تحقیقاتی صورت گرفته است ولی اشاره ای به مکانیسم اثر دترجنت بر فعال سازی آنزیم نشده است (۱۴ و ۱۵). همچنین اثر عوامل پایدارکننده غیردترجنتی نیز تاکنون بر روی PAP<sub>2b</sub> بررسی نشده است.

با توجه به اهمیت آنزیم PAP<sub>2</sub> در انتقال پیام سلولی، یافتن عوامل پایدارکننده یا فعال کننده آنزیم تخلیص شده می تواند گام مؤثری در مطالعات بعدی پیرامون ساختمان، مکانیسم عمل و شناسایی اسید آمینه یا اسیدهای آمینه درگیر در مکان فعال آنزیم داشته باشد. لذا در این مطالعه اثر دترجنتهای غیر یونی لوپرول PX، توئین ۸۰ و CTAB<sup>۲</sup> بر فعالیت آنزیم PAP<sub>2b</sub> و اثر عوامل غیردترجنتی سوکروز، تراهالوز و آلومین بر پایداری آنزیم

آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز<sup>۱</sup> (PAP: EC 3.1.3.4) برای اولین بار توسط اسمیت و همکارانش در کبد موش صحرایی شناسایی شد (۱) ولی بعداً مشخص شد در بسیاری از بافت های بدن وجود دارد (۲). این آنزیم تبدیل اسیدفسفاتیدیک به دی آسیل گلیسرول و ارتوفسفات را کاتالیز می کند (۱ و ۳). دی آسیل گلیسرول حاصل از این واکنش می تواند آنزیمی به عنوان پیش ساز بیوستز تری گلیسرید و نقش ذخیره انرژی برای موجود را اعمال کند. علاوه بر این، تنظیم ذخیره تری گلیسرید در بیماری های انسانی حایز اهمیت است، زیرا که افزایش و یا کمبود ذخیره تری گلیسریدی توأم با دیس لیپیدی، مقاومت به انسولین و دیابت است (۴ و ۵). آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز (PAP) دارای دو شکل می باشد که عبارتند از شکل سیتوزولی (PAP<sub>1</sub>) که دی آسیل گلیسرول حاصل از واکنش آنزیمی آن، در بیوستز تری گلیسرید و فسفولیپیدهای مرکب نقش دارد، برای فعالیت نیازمند یون Mg<sup>2+</sup> است و کاملاً به وسیله N- اتیل مالیمید (NEM) مهار می شود (۸-۶) و شکل دیگر، غشایی (PAP<sub>2</sub>) است که برای فعالیت، نیازی به یون Mg<sup>2+</sup> ندارد و توسط NEM نیز مهار نمی شود و در پدیده انتقال پیام سلولی نقش دارد (۹ و ۱۰). هم اکنون اثبات شده که تقریباً تمامی آنزیم های درگیر در سنتز لیپیدها می توانند در کنترل پدیده انتقال پیام سلولی دخیل باشند، چون که اغلب لیپیدهای حد واسط به عنوان Signal molecule عمل می کنند. نقش PAP<sub>2</sub> در پدیده انتقال پیام سلولی از این جا استنباط می شود که اسیدفسفاتیدیک حاصل از عمل فسفولیپاز D معمولاً در سلول های

PAP<sub>2b</sub> نیز مورد بحث قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل اسید فسفاتیدیک (ملح‌دی‌سدیم)، دی‌تیوترایتول (DTT)، N-اتیل‌مالیمید (NEM)، لویپتین، مهارکننده Soyabean tripsin، بنزآمیدن، هیدروکسیل آپاتیت، پیستاتین، هپارین سفارز، n اکتیل گلوکوزید، سفاکریل Affi Gel Blue، S<sub>p</sub>، تریتون X-۱۰۰ از شرکت سیگما (USA) و EDTA، EGTA، CTAB، گلیسرول و سرم آلبومین گاوی از شرکت مرک (Merck, Germany) می‌باشد.

● حیوانات آزمایشگاهی و شرایط نگهداری آن‌ها: تعداد موش‌های صحرایی نر، ۱۴ سر از نژاد Wistar و در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرمی بودند. موش‌ها از انستیتوپاستور تهران خریداری و در لانه حیوانات دانشکده داروسازی نگهداری گردیدند. موش‌ها در دریافت آب و غذا تا زمان آزمایش آزاد بودند.

● تخلیص آنزیم: PAP<sub>2b</sub> از غشاء سلول‌های کبدی موش صحرایی براساس روش Fleming و همکارانش تخلیص گردید و فقط مراحل هیدروکسیل آپاتیت به روش Bacth wise انجام گرفت (۱۴).

● سنجش فعالیت آنزیم: فعالیت آنزیم PAP<sub>2b</sub> در بافر سنجش (۲۵۰ μl) 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 هریک از DTT.

EDTA و EGTA و مقدار مناسب آنزیم اندازه‌گیری شد (۱۵). مخلوط سنجش فعالیت برای ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس به‌وسیله افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد واکنش آنزیمی متوقف گردید و فسفات معدنی (P<sub>i</sub>) حاصل از فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد (۱۶). هر واحد آنزیمی (U) معادل مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول فسفات معدنی را در دقیقه آزاد کند، در نظر گرفته شد. ثابت‌های کینتیکی و K<sub>m</sub> آنزیم براساس مدل کینتیک رقت سطحی تعیین گردیدند (۱۷) و درصد مولی فسفاتیدات در میسل‌های مخلوط تریتون X-۱۰۰/ فسفاتیدات با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید (۱۷):

$$\text{mol}\% = ((\text{اسید فسفاتیدیک}) / (\text{اسید فسفاتیدیک}) + (\text{تریتون X-100})) \times 100$$

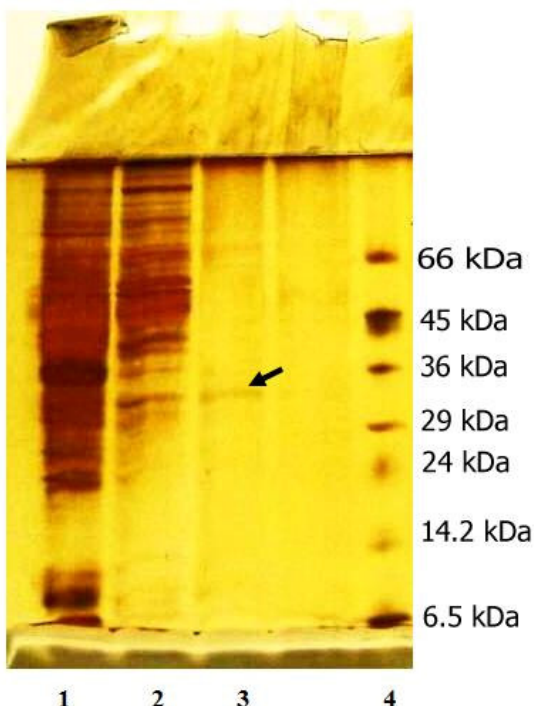
● اندازه‌گیری پروتئین و الکتروفورز: اندازه‌گیری پروتئین به‌روش برادفورد انجام گرفت (۱۸) و استاندارد مورد استفاده شامل محلول سرم آلبومین گاوی با غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی بود. SDS پلی‌اکریل‌امید ژل الکتروفورز برای تعیین درجه خلوص، تعداد و وزن زیر واحدهای آنزیمی در ژل ۱۰ درصد به‌صورت ناپیوسته انجام گرفت (۱۹). قبل از الکتروفورز برای حذف تریتون X-۱۰۰، نمونه‌های مورد استفاده به مدت ۱۰ دقیقه در مخلوط استون/هیدروکسید آمونیوم (V/V، 3/1.7) به‌نسبت حجمی ۱ به ۵ انکوبه و سپس رسوب در دور ۲۵۰۰۰g جدا و پس از خشک شدن در بافر سمپلر حل گردیدند (۲۰). ژل با نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد (۲۱).

1. Ethylene diamine tetraacetic acid

2. Ethyleneglycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

### یافته‌ها

PAP<sub>2b</sub> تخلیص شده از غشاء سلول‌های کبدی موش صحرائی نر فعالیت ویژه‌ای معادل ۷۳۵۰ mU/mg protein داشت. K<sub>m</sub> آنزیم در مدل کیتیک رقت سطحی ۰/۴۳ مول درصد بود و آنزیم تخلیص شده با روش SDS - PAGE الکتروفورز یک نوار اصلی با وزن مولکولی ۳۳/۸ کیلو دالتون نشان داد (تصویر ۱).



**تصویر ۱-** SDS ژل الکتروفورز آنزیم تخلیص شده PAP<sub>2b</sub>. 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 تخلیص شده را نشان می‌دهد. نوار شماره ۴ استانداردهای پروتئینی (هر کدام ۵ میکروگرم) است که از بالا به پائین عبارتند از: سرم آلبومین گاوی (۶۶ کیلو دالتون)، اوآلبومین (۴۵ کیلو دالتون)، گلیسرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز (۳۶ کیلو دالتون)، کربنیک انیدراز (۲۹ کیلو دالتون)، تریپسینوژن (۲۴ کیلو دالتون)، لاکتالبومین (۱۴/۲ کیلو دالتون) و آپروتینین (۶/۵ کیلو دالتون).

● بررسی اثر دترجنت‌های لوبرول PX، توئین ۸۰ و CTAB بر فعالیت PAP<sub>2b</sub>: اثر دترجنت‌های مذکور بر فعالیت آنزیم PAP<sub>2b</sub> در محیط سنجش مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از دترجنت‌های لوبرال PX و توئین ۸۰، جداگانه غلظت‌های ۰-۱۰ mM و برای CTAB غلظت‌های ۰-۶ mM در محیط سنجش فعالیت آنزیم فاقد تریتون X-۱۰۰ ایجاد و فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد و نتایج به صورت نمودار فعالیت در مقابل غلظت دترجنت‌های مذکور رسم گردید.

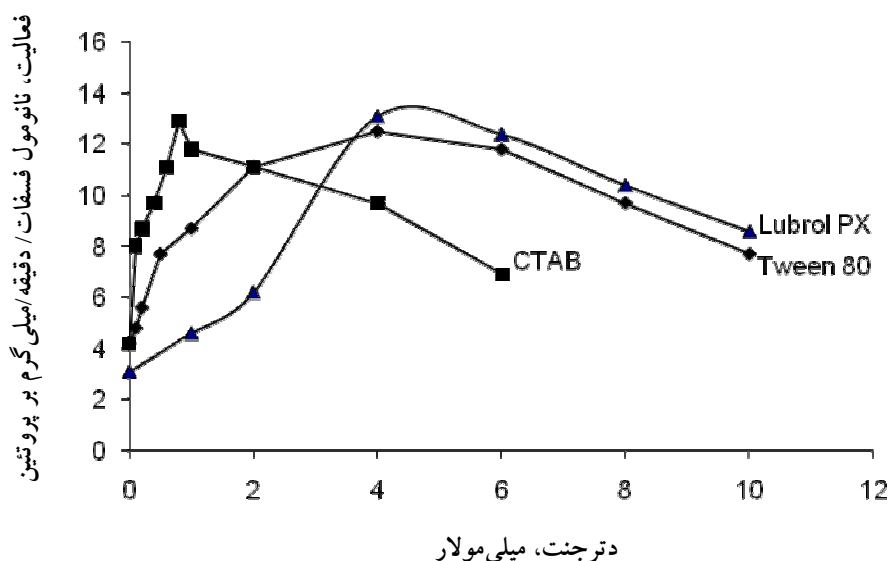
● بررسی اثر آلبومین، سوکروز و تره هالوز بر پایداری آنزیم PAP<sub>2b</sub>: برای بررسی اثر آلبومین، چهار سری لوله آزمایش تمیز به عنوان تست و یک لوله به عنوان شاهد انتخاب شد و در لوله‌های تست در محیط سنجش، فعالیت به ترتیب غلظت‌های ۰، ۱، ۵ و ۱۰ درصد از آلبومین ایجاد و لوله‌ها در ۴°C انکوبه شدند. سپس فعالیت شاهد اندازه‌گیری و فعالیت لوله‌های تست به فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با افزودن سوسترها به لوله‌ها اندازه‌گیری گردید و نتیجه به صورت نمودارهای درصد فعالیت باقی مانده در مقابل غلظت آلبومین رسم شد.

برای بررسی اثر سوکروز و تره هالوز نیز برای هر کدام پنج سری لوله آزمایش به عنوان تست و یک لوله به عنوان شاهد انتخاب و در لوله‌های تست در محیط سنجش، فعالیت به ترتیب غلظت‌های ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ درصد از قندهای مذکور ایجاد گردید و لوله‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، سپس فعالیت لوله شاهد اندازه‌گیری و فعالیت لوله‌های تست در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با افزودن سوسترها اندازه‌گیری و نتایج به صورت نمودارهای درصد فعالیت باقی مانده در مقابل غلظت قند رسم گردید.

۱۳، ۲۵ و ۷۵ درصد از فعالیت باقی می‌ماند. در نمودار ۳ اثر غلظت‌های مختلف سوکروز بر پایداری  $PAP_{2b}$  مشاهده می‌شود. این نمودار نشان می‌دهد که با افزایش سوکروز تا غلظت ۷ درصد در محیط سنجش فعالیت آنزیم، اثر پایدارکنندگی به حداکثر خود می‌رسد و در غلظت‌های بالاتر، اثر پایدارکنندگی کاهش می‌یابد. از طرف دیگر این نمودار نشان می‌دهد که با گذشت زمان، اثر پایدارکنندگی سوکروز کاهش می‌یابد به طوری که پس از ۷۲ ساعت در غلظت ۷ درصد در حدود ۲۳/۸ درصد فعالیت اولیه می‌شود. در نمودار ۴ تأثیرات غلظت‌های مختلف تروهالوز بر پایداری  $PAP_{2b}$  مشاهده می‌شود. تروهالوز تا ۳ درصد در محیط سنجش فعالیت آنزیم، بیشترین اثر پایدارکنندگی که ۹۷ درصد پس از ۲۴ ساعت می‌باشد را دارا است. این نمودار نشان می‌دهد که اثر پایدارکنندگی تروهالوز در غلظت‌های بالاتر از ۳ درصد کاهش می‌یابد.

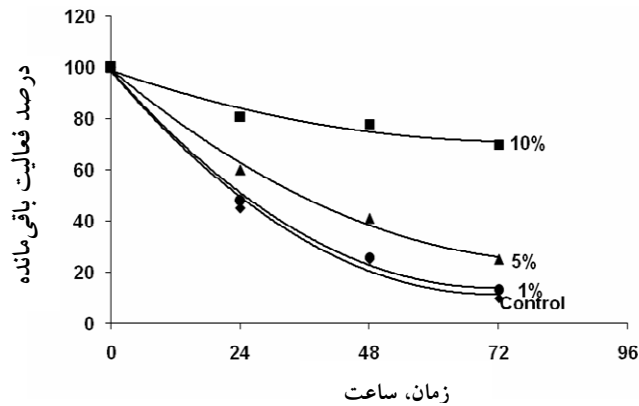
در نمودار ۱ اثر غلظت‌های مختلف توئین ۸۰، لوپرول PX و CTAB بر فعالیت  $PAP_{2b}$  مشاهده می‌شود. ملاحظه می‌گردد که دترجنت غیریونی توئین ۸۰، در غلظت ۴ میلی‌مولار فعالیت آنزیم را تا حدود ۳ برابر افزایش می‌دهد ولی دترجنت غیریونی دیگر، یعنی لوپرول PX در ۲/۵ میلی‌مولار قادر به ایجاد تحریک فعالیت تا حدود ۳ برابر می‌گردد. از طرف دیگر CTAB که دترجنت یونی است در غلظت ۱ میلی‌مولار اثر تحریکی بیش از ۳ برابر بر فعالیت آنزیم دارد.

در نمودار ۲ اثر غلظت‌های مختلف آلبومین بر پایداری  $PAP_{2b}$  مشاهده می‌شود. این نمودار نشان می‌دهد که با افزایش غلظت آلبومین در محیط، اثر پایدارکنندگی آن بیشتر می‌شود، به طوری که در غلظت ۰، ۱، ۵ و ۱۰ درصد با گذشت ۲۴ ساعت به ترتیب ۰، ۴۵، ۴۸، ۶۰ و ۸۰ درصد از فعالیت باقی می‌ماند، در حالی که پس از گذشت ۴۸ ساعت به ترتیب ۲۵، ۲۶، ۴۱ و ۷۸ درصد و پس از گذشت ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۰،

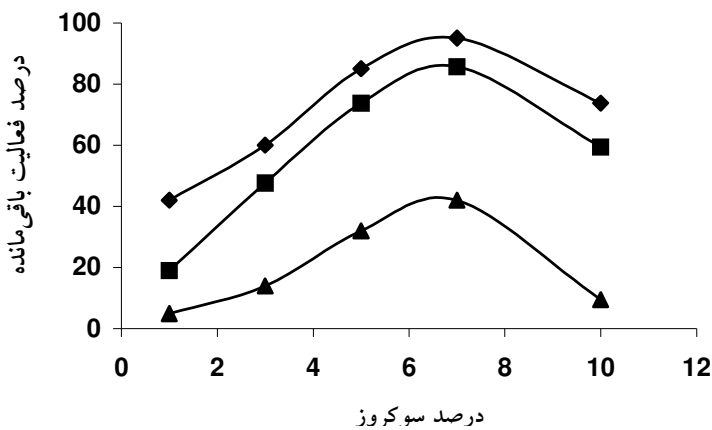


نمودار ۱ - اثر دترجنت‌های توئین ۸۰، لوپرول PX و CTAB بر فعالیت  $PAP_{2b}$  غشایی (فعالیت آنزیم  $PAP_{2b}$  غشایی در بافر سنجش فعالیت در

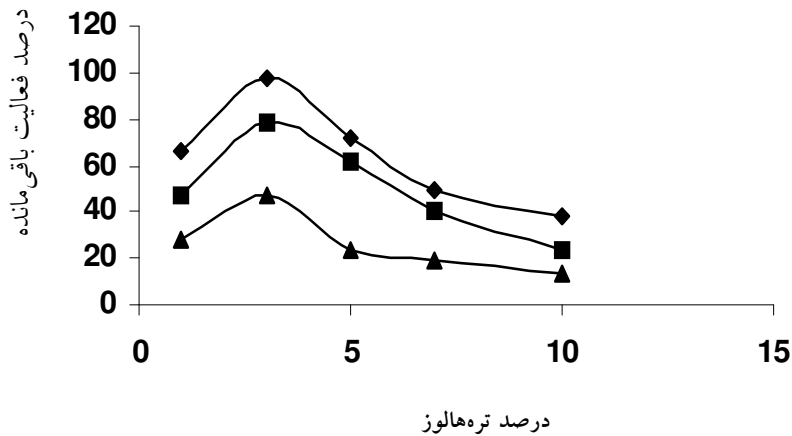
حضور غلظت‌های مختلف لوپرول PX (▲)، توئین ۸۰ (◆) و CTAB (■) اندازه‌گیری شد. هر نقطه میانگین دو آزمایش مستقل است.)



**نمودار ۲-** اثر غلظت‌های مختلف آلبومین گاوی بر پایداری PAP<sub>2b</sub> (آنزیم PAP<sub>2b</sub> ۰/۵ gμ) در غلظت‌های ۰ (♦)، ۱ (●)، ۵ (▲) و ۱۰ (■) درصد از آلبومین گاوی در محیط سنجش فعالیت در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس در فواصل زمانی مشخص شده فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. هر نقطه میانگین دو آزمایش مستقل است.



**نمودار ۳-** اثر غلظت‌های مختلف سوکروز بر پایداری PAP<sub>2b</sub> (آنزیم PAP<sub>2b</sub> ۰/۵ gμ) در غلظت‌های مختلف سوکروز در محیط سنجش فعالیت در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس در فواصل زمانی ۲۴ (▲)، ۴۸ (■) و ۷۲ (♦) ساعت فعالیت آن اندازه‌گیری شد. هر نقطه میانگین دو آزمایش مستقل است.



**نمودار ۴-** اثر غلظت‌های مختلف ترهالوز بر پایداری PAP<sub>2b</sub>

(آنزیم PAP<sub>2b</sub> ۰/۵ gμ) در غلظت‌های مختلف ترهالوز در محیط سنجش فعالیت در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس در فواصل زمانی ۲۴ (♦)، ۴۸ (■) و ۷۲ (▲) ساعت فعالیت آن اندازه‌گیری شد. هر نقطه میانگین دو آزمایش مستقل است.

## بحث

در نمودار ۱ اثر دترجنت لوپرول PX، توئین ۸۰ و CTAB که تاکنون بر روی فعالیت PAP<sub>2b</sub> بررسی نشده است، مشاهده می‌گردد. دترجنت‌های غیر یونی لوپرول PX و توئین ۸۰ در غلظت‌های ۳-۶ میلی مولار اثر تحریکی تا ۳ برابر بر فعالیت آنزیم دارند، در حالی که CTAB که یک دترجنت یونی است تا غلظت ۱ میلی مولار تا حدود ۴ برابر اثر تحریکی دارد. مطالعات انجام گرفته با برخی از دترجنت‌ها در غلظت‌های مختلف در محیط سنجش مانند داکسی کولات، تریتون X-100، CHAPS<sup>۱</sup> و کولات اثبات کرده که آنزیم در حضور دترجنت‌های تریتون X-100 و داکسی کولات، دارای فعالیت بیشتری است، به طوری که در غلظت‌های بین ۳-۶ میلی مولار نسبت به دو دترجنت دیگر تا ۴ برابر در فعال سازی آنزیم مؤثر هستند. در خصوص تریتون X-100 مشخص شده است که علاوه بر افزایش فعالیت، دارای اثر پایدارکنندگی بر فعالیت PAP<sub>2b</sub> نیز می‌باشد (۱۵). بنابراین استنباط می‌شود که دترجنت غیر یونی لوپرول PX توانایی بیشتری نسبت به تریتون X-100 در فعال سازی آنزیم در غلظت‌های یکسان دارد ولی اثر پایدارکنندگی آن در روی فعالیت این آنزیم تاکنون بررسی نشده است و چنانچه اثر پایدارکنندگی نیز داشته باشد می‌توان از لوپرول PX در مطالعاتی که امکان تداخل تریتون X-100 با مواد آزمایش یا روش آزمایش وجود دارد استفاده کرد. در رابطه با چگونگی اثر دترجنت‌ها گفته شده است که آن‌ها نه تنها یک سطح کاتالیتیکی را در غیاب فسفولیپیدها مهیا بلکه یک محیط مناسب را نیز برای عمل آنزیم مهیا می‌کنند (۱۵). مطالعات انجام گرفته در روی PAP<sub>2</sub> نشان داد که حذف

دترجنت تریتون X-100 از بافر تخلیص موجب غیرفعال شدن آنزیم می‌گردد (۱۴). به هر حال در مطالعات انجام گرفته با دترجنت‌ها مکانیسمی برای چگونگی اثر دترجنت‌ها ارائه نشده است (۱۵). با توجه به این که اثبات شده محصول آنزیم PAP<sub>2</sub> یعنی دی‌آسیل گلیسرول دارای اثر مهارى در روی آنزیم است (۲۲) و از طرف دیگر در رابطه با آنزیم فسفولیپاز C نیز اثبات شده که اثر فعال سازی دترجنت‌ها در روی این آنزیم ناشی از رهاسازی دی‌آسیل گلیسرول از غشاء و حذف اثر مهارى بر روی آنزیم است (۲۵-۲۳)، لذا ما پیشنهاد می‌کنیم با توجه به اثر مهارى دی‌آسیل گلیسرول در روی فعالیت PAP<sub>2</sub>، اثر دترجنت‌های توئین ۸۰، لوپرول PX و CTAB در روی این آنزیم علاوه بر ایجاد سطح کاتالیتیکی در غیاب فسفولیپیدها، موجب تسهیل رهاسازی دی‌آسیل گلیسرول از آنزیم در طی واکنش نیز می‌شود. از طرف دیگر اثبات شده که دترجنت‌ها در غلظت‌های بالا تأثیرات مهارى بر فعالیت آنزیم دارند که ناشی از تأثیرات تقلیبی آن‌ها در روی ساختار پروتئینی آنزیم است (۲۳ و ۲۶). بنابراین اثر مهارى غلظت‌های بالای دترجنت‌های به کار رفته در این تحقیق نیز می‌بایستی ناشی از تأثیرات تقلیبی آن‌ها بر روی ساختار پروتئینی آنزیم باشد.

تاکنون اثر عوامل پایدارکننده غیر دترجنتی پیرامون PAP<sub>2b</sub> بررسی نشده است. از آلبومین به عنوان یک پایدارکننده پروتئینی استفاده می‌شود (۲۷). نمودار ۲ نشان می‌دهد که آلبومین در غلظت ۱۰ درصد بهترین اثر پایدارکنندگی را بر آنزیم PAP<sub>2b</sub> در محیط سنجش فعالیت دارد ولی در غلظت‌های کم تر از ۱۰ درصد اثر پایدارکنندگی قابل ملاحظه‌ای ندارد. به هر حال در رابطه با اثر پایدارکنندگی آلبومین می‌بایستی خاطر نشان کرد، از

غلظت ۷ درصد تأثیرات مشابهی با غلظت ۳ درصد تره‌هالوز دارد. علاوه بر این در رابطه با  $PAP_{2b}$  اثبات شد که  $PAP_{2b}$  سوبسترای اسید فسفاتیدیک را به شکل  $L_a$  (Lamellar) مصرف می‌کند و قادر به مصرف شکل  $H_{II}$  (Hexagonal) سوبسترا نمی‌باشد (۳۲). حال با توجه به این نکته می‌توان توضیح داد که چرا در غلظت‌های بالای قند، فعالیت آنزیم  $PAP_{2b}$  کاهش می‌یابد. افزایش غلظت قندها در محیط سنجش فعالیت آنزیم نه تنها فشار اسمزی را افزایش می‌دهند بلکه موجب کاهش هیدراسیون سوبسترای اسید فسفاتیدیک نیز می‌شوند (۳۳) و (۳۴)، بنابراین روند تبدیل شکل  $H_{II}$  را در محیط تسهیل می‌کنند. علاوه بر این آورل و همکارانش اثبات کردند که حضور تره‌هالوز در محیط فسفاتیدیل اتانول آمین موجب القاء شکل  $L_a$  به  $H_{II}$  می‌گردد (۳۵). پس می‌توان ادعا کرد که کاهش فعالیت آنزیم در غلظت‌های بالاتر از ۳ درصد تره‌هالوز و ۷ درصد سوکروز ناشی از ایجاد شکل  $H_{II}$  سوبسترا در محیط سنجش فعالیت می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

از جمع‌بندی مطالب مذکور نتیجه گرفته می‌شود که در صورت نیاز به پایدار نمودن آنزیم  $PAP_{2b}$  به‌وسیله عوامل غیردترجنتی، استفاده از تره‌هالوز بهتر از سوکروز و آلبومین است. دترجنت غیریونی لوپرول PX نسبت به سایر دترجنت‌های یونی و غیریونی توانایی بیشتری در فعال‌سازی آنزیم  $PAP_{2b}$  نشان می‌دهد.

این عامل در مراحل مختلف تخلیص برای پایداری آنزیم نمی‌توان استفاده کرد زیرا که اندازه‌گیری پروتئین و ویسکوزیته بافر را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۸). بنابراین از آلبومین پس از اتمام مراحل تخلیص و مشروط بر آن‌که با روش‌های موردآزمایش تداخل نداشته باشد می‌توان استفاده کرد.

امروزه از قندها به‌خصوص قندهای دی‌ساکاریدی غیراحیاءکننده برای پایداری آنزیم‌ها به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود (۲۹ و ۳۰). نمودارهای ۳ و ۴ به‌ترتیب اثر سوکروز و تره‌هالوز بر پایداری  $PAP_{2b}$  را نشان می‌دهند. همان‌طور که دیده می‌شود سوکروز در غلظت ۷ درصد و تره‌هالوز در غلظت ۳ درصد بهترین اثر پایدارکنندگی را دارند. در رابطه با توانایی بیشتر تره‌هالوز در مقایسه با سوکروز در پایداری آنزیم می‌توان به چندین خصوصیت آن از جمله تشکیل پیوند هیدروژنی با غشاءها یا توانایی تعدیل لایه‌های حلال پروتئین و حجم هیدراته بالاتر نسبت به سوکروز اشاره کرد، به‌طوری‌که تره‌هالوز حداقل حجمی تا ۲/۵ برابر بیشتر از سوکروز اشغال می‌کند، لذا برای ساخت محلول‌های تره‌هالوزی، آب کم‌تری در مقایسه با ساخت سایر محلول‌های سوکروزی با مولاریته یکسان نیاز است و دلیل آن بزرگ‌تر بودن اندازه مولکول تره‌هالوز می‌باشد که عامل ایجادکننده اختلاف در ویسکوزیته و حجم هیدراته است (۳۱). علاوه بر این مائورو و همکارانش (۳۱) اثبات کردند که اگر غلظت همه قندهای مورد استفاده در پایداری پروتئین‌ها از نظر درصد اشغال حجم برداشته شوند، همگی اثر یکسانی را نشان می‌دهند، لذا با توجه به مطالب مذکور می‌توان استدلال کرد که چرا سوکروز در



## References

1. Smith SW, Weiss SB, Kennedy EP. The enzymatic dephosphorylation of phosphatidic acid. *J Biol Chem* 1957; 228(2): 915-22.
2. 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(33): 19422-19429.
3. Carman GM, Han GS. Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(12):694-699.
4. Petersen KF, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 2006; 119 (5 Suppl 1): S10-6.
5. Reue K, Phan J. Metabolic consequences of lipodystrophy in mouse models. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9(4): 436-441.
6. 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(5): 2988-2996.
7. Pyne S, Long JS, Ktistakis NT, Pyne NJ. Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(6): 1370-1374.
8. Han G-S, Wu WI, Carman GM. The *Saccharomyces cerevisiae* lipid homolog is a Mg<sup>2+</sup>-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J Biol Chem* 2006; 281(14): 9210-9218.
9. Nanjundan M., Possmayer, F. Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphohydrolase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284(1): L1-L23
10. Brindley DN. Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem* 2004; 92(5): 900-912.
11. Donkor J, Sariahmetoglu M, Dewald J, Brindley DN, Reue K. Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J Biol Chem* 2007; 282(6): 3450-3457.
12. Carman GM, Wu WI. Lipid phosphate phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 2007; 434: 305-315.
13. Carman GM, Han GS. Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(12): 694-699.
14. Fleming IN, Yeaman SJ. Purification and characterization of N-ethylmaleimide-insensitive phosphatidic acid phosphohydrolase (PAP2) from rat liver. *Biochem J* 1995; 308(3): 983-989.
15. Kanoh H, Imai SI, Yamada K, Sakane F. Purification and properties of phosphatidic acid phosphatase from porcine thymus membrane. *J Biol Chem* 1992; 267(35): 25309-25314.
16. 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(2): 299-316.
17. Carman GM, Deems RA, Dennis EA. Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics. *J Biol Chem* 1995; 270(32): 18711-18714.
18. Bradford MMA. A 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.
19. Weber K, Pringle JR, Osborn M. Measurement of molecular weight by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Meth Enzymol* 1972; 26: 3-27.
20. Feuerstein N, Cooper HL. Rapid protein phosphorylation induced by phorbol ester in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1983; 258(17): 10786-10793.
21. 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.
22. English D, Martin M, Harvey KA, Akard LP, Allen R, Widlanski TS, et al. Siddiqui R. Characterization and purification of neutrophil ecto-phosphatidic acid phosphohydrolase. *Biochem J* 1997; 324(3): 941-950.
23. El-sayed MY, Roberts MF. Charged detergents enhance the activity of phospholipase C (*Bacillus cereus*) towards micellar short-chain phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1985; 831(1):133-141.
24. Cornell RB, Arnold RS. Modulation of the activities of enzymes of membrane lipid metabolism by non-bilayer-forming lipids. *Chem Phys Lipids* 1996; 81(2): 215-227.
25. Burns RA, Friedman JM, Roberts MF. Characterization of short-chain alkyl ether lecithin analogues: NMR and phospholipase studies. *Biochemistry* 1981; 20(21): 5945-5950.
26. Burns RA, El-sayed MY, Roberts MF. Kinetic model for surface-active enzymes based on the langmuir adsorption isotherm: Phospholipase C (*Bacillus cereus*) activity toward dimyristoyl phosphatidylcholine/detergent micelles. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79(16): 4902-4906.
27. North MJ. Prevention of unwanted proteolysis, In: Benyon, JS, Bond (Eds), *Proteolytic Enzymes: A practical Approach*, Vol 6, IRL Press Oxford 1989: 105-124-472.
28. Furukawa STL, Byers SD, Hodges DM, Laroche A, Weselaka RJ. Identification of N-ethylmaleimide sensitive and insensitive phosphatidate phosphatase activity in microspore-derived cultures of oilseed rape. *Plant Sci* 1998; 131(22): 139-147.
29. Privalov PL, Gill SJ. Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv Prot Chem* 1988; 39: 193-231.

30. Fennema O. Water and protein hydration. In Whitaker, JR, Tannenbaum, SR, ed Food protection. Westport, Ari Publ Co , 1977: 71.
31. Sola-Penna M, Mayer-Fernandes JR. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugar on enzyme structure and function: Why is trehalose more effective than other sugars?. Arch Biochem Biophys 1998; 360(1): 10-14.
32. Heidarian E, Haghighi B [Rat membrane phosphatidate phosphohydrolase and the reason for its Mg+2 independence] Journal of Ilam University of Medical Sciences 2006;14(3): 12-21, (Persian).
33. Seddon JM, Ceve G, Marxh D. Calorimetric studies of gel -fluid ( $L\beta$  -  $L\alpha$ ) and lamellar-inverted hexagonal ( $L\alpha$  - HII) phase transitions in dialkyl and diacylphosphatidylethanolamine . Biochemistry 1983; 22(5): 1280-1289.
34. Caffrey M. Kinetics and mechanism of transitions involving the lamellar cubic, inverted hexagonal and fluid isotropic phases of hydrated monoacylglycerides monitored by time-resolved X-ray diffraction. Biochemistry 1987; 26(20): 6349-6363.
35. Aurell WC, Rand RP, Growe LM, Spargo BJ, Crowe JH. Direct transition of dioleoyl phosphatidylethanolamine from lamellar gel to inverted hexagonal phase caused by trehalose. Biochim Biophys Acta 1989; 984(22): 238-242.