

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

دکتر اسفندیار حیدریان^۱، دکتر بهرام حقیقی^۲

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۰/۹ تاریخ پذیرش: ۸۴/۵/۲۵

چکیده

مقدمه: آنزیم فسفاتیدات فسفو هیدرولاز (PAP) دارای دو فرم PAP_1 و PAP_2 می باشد که PAP_1 در سنتز تری اسیل گلیسرول و سایر فسفولیپیدهای مرکب ایفای نقش می کند در حالیکه PAP_2 در پدیده انتقال پیام نقش داشته و دارای دو ایزوفرم PAP_{2a} و PAP_{2b} می باشد. 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 فعال سازی 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. **یافته های 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. **نتیجه گیری 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.

واژه های 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 آنزیم های هیدرولیزکننده مثل فروکتوز ۱،۶ بیس فسفاتاز و آلدولاز ماهیچه ای 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 روش ها

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)، لویپنتین، مهار کننده Soyabean tripsin، بنز آمیدین، پیریدکسال ۵' فسفات (PLP) هیدروکسیل آپاتیت، پیستاتین، هپارین سفارز، n- اکتیل گلوکوزید، سفاکریل، Affi Gel Blue، S_{۳۰۰} و تریتون X-100 از شرکت سیگما (Sigma, U.S.A)، EDTA، EGTA، گلیسرول 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 دی آسید گلیسرول را کاتالیز می کند (۱). دی آسید گلیسرول حاصل یک پیش ساز برای سنتز تری آسید 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+} M بود و کاملاً بوسیله N- اتیل مالیمید^۳ (NEM) مهار می گردید 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 نمی گردید و در پدیده انتقال پیام^۴، تمایز و مهاجرت سلولی نقش داشت (۳،۵). متعاقباً اثبات شد PAP_2 دارای دو ایزوفرم PAP_{2a} و PAP_{2b} می باشد که از لحاظ مقدار تقریباً ۳۰٪ PAP_{2a} و مابقی را PAP_{2b} در غشاء تشکیل می دهد (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 مهاري یونهای Ca^{2+} ، Mn^{2+} ، Zn^{2+} ، آمین های آمفی فیلک مثل پروپرانولول، کلروپرومازین، اسفنگوزین و دی پر آمین بوده است (۷). ایزوفرم های PAP_{2a} و PAP_{2b} جهت فعالیت نیازی به فسفولیپیدها ندارند و فعالیت آنزیمی PAP_{2b} توسط دی آسید گلیسرول مهار می شود ولی تری آسید 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 بر اساس 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):

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

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 هریک از مهارکننده‌های لویپیتین، پیستاتین و مهارکننده soyabean tripsin و با استفاده از اسپکتروفتومترهای Cecil 1021 CE (انگلستان) و Shimadzu multispec 1501 (ژاپن) انجام گرفت. SDS پلی آکریل آمید ژل 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.

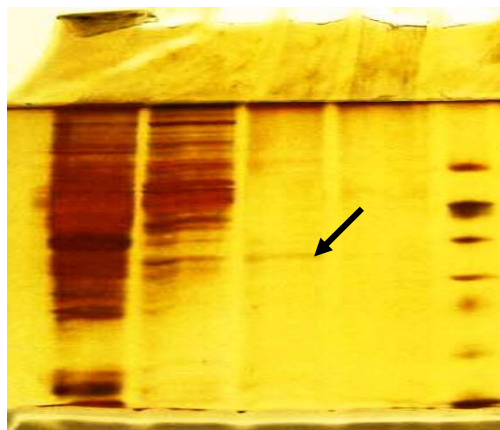
ب) **سنجش فعالیت آنزیم:** فعالیت آنزیم PAP_{2b} در بافر سنجش (۲۵۰ μl) که حاوی ۵۰ میلی مولار تریس هیدروکلرید با $\text{pH}=7.4$ ، ۱ میلی گرم بر میلی لیتر آلبومین گاوی، ۳/۲ میلی مولار تریتون X-۱۰۰، ۴ میلی مولار NEM، ۰/۳۵ میلی مولار اسید فسفاتیدیک، ۱ میلی مولار از هریک از EGTA، EDTA، DTT و مقدار مناسب آنزیم 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

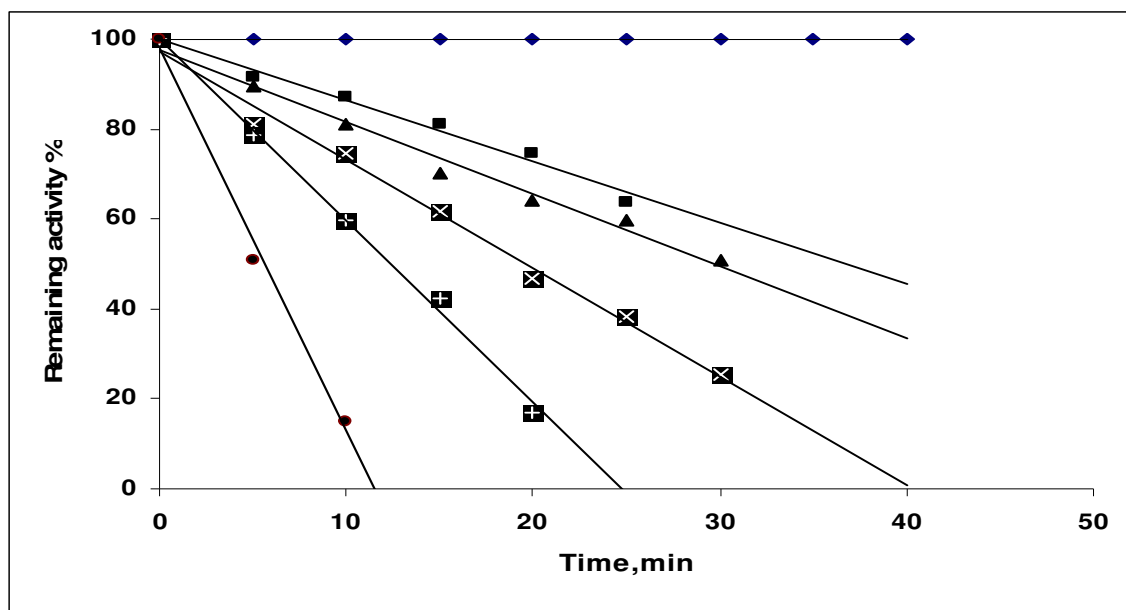
یک افزایش جذب را در ۳۲۵ نانومتر برای آنزیم تعدیل شده نشان داد که مربوط به بازشیف احیا شده با NaBH_4 بود و همانطوریکه مشاهده می‌شود، آنزیم شاهد فاقد چنین افزایش جذبی، در طول موج ۳۲۵ نانومتر می‌باشد (شکل شماره ۴). شکل شماره ۵ منحنی Lineweaver-Burk مربوط به اثر PLP بر فعالیت آنزیم PAP_{2b} را نشان می‌دهد 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 صحرایی، 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 شده 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



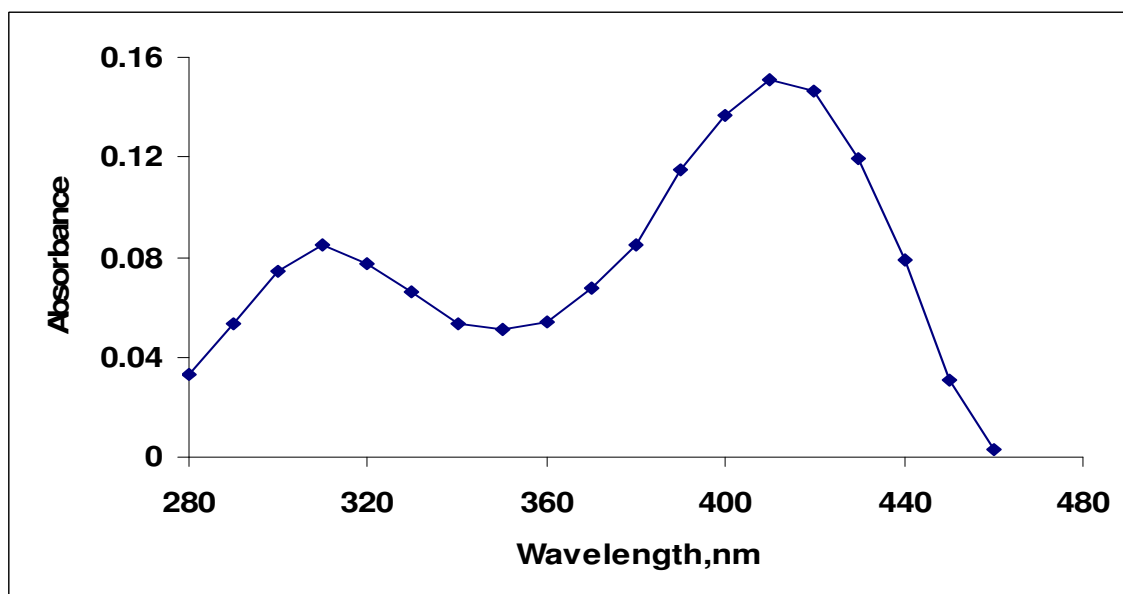
شکل شماره ۱: الکتروفورز آنزیم PAP_{2b} خالص شده از کبد موش صحرایی

نمونه‌ها 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) ، لاکتاللبومین (10 kDa) و آپروتینین (60 kDa) (هر کدام $5 \mu\text{g}$).



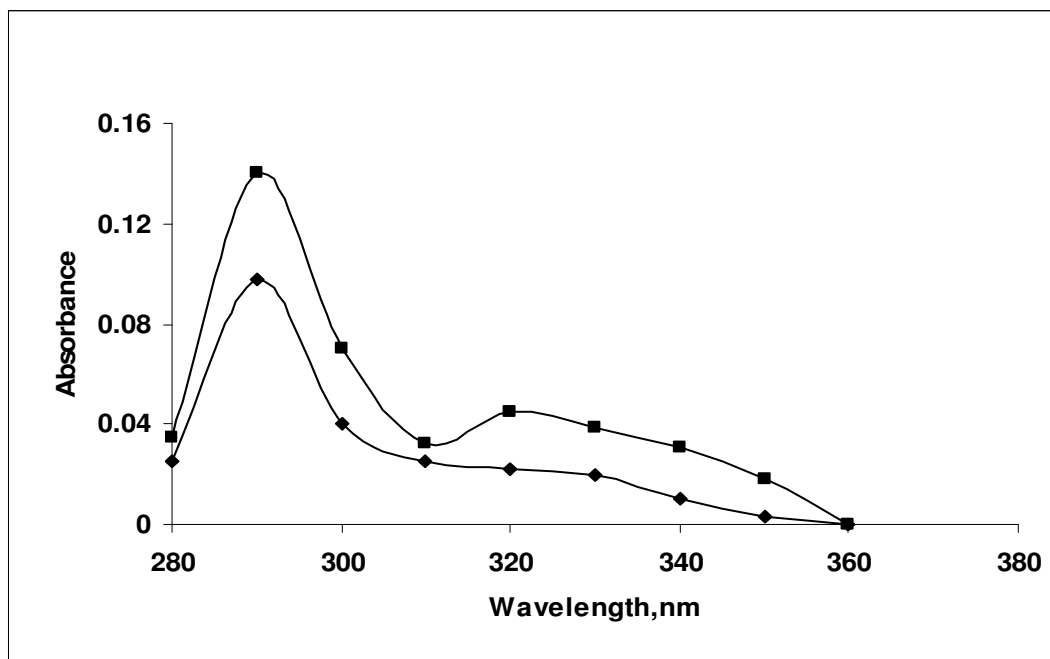
شکل شماره ۲: سرعت غیرفعال شدن PAP_{2b} در غلظت های مختلف PLP

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



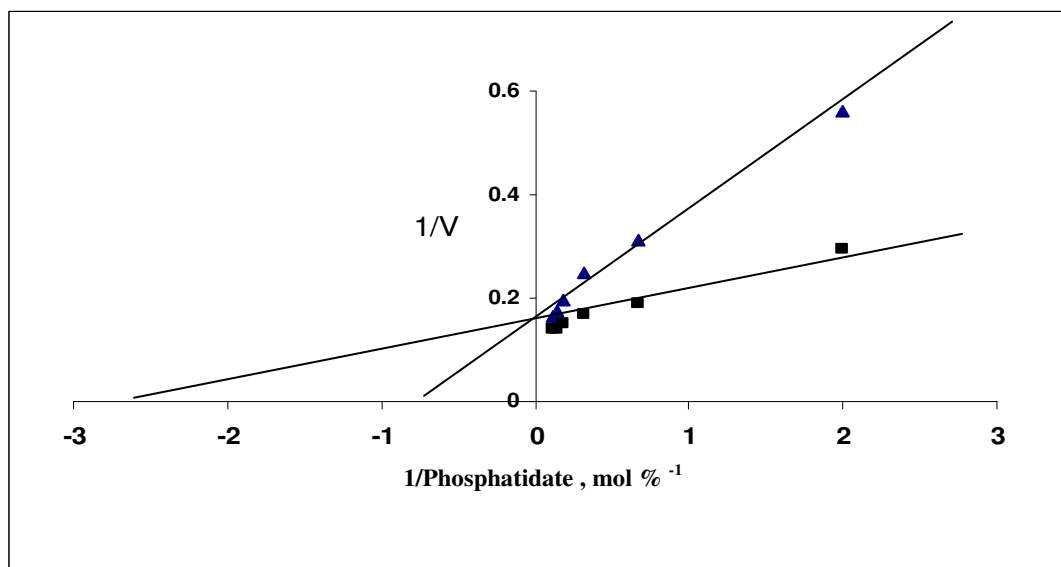
شکل شماره ۳: اسپکتروم تفاضل بین شاهد و آنزیم تغییر یافته با PLP

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 قرائت شد.



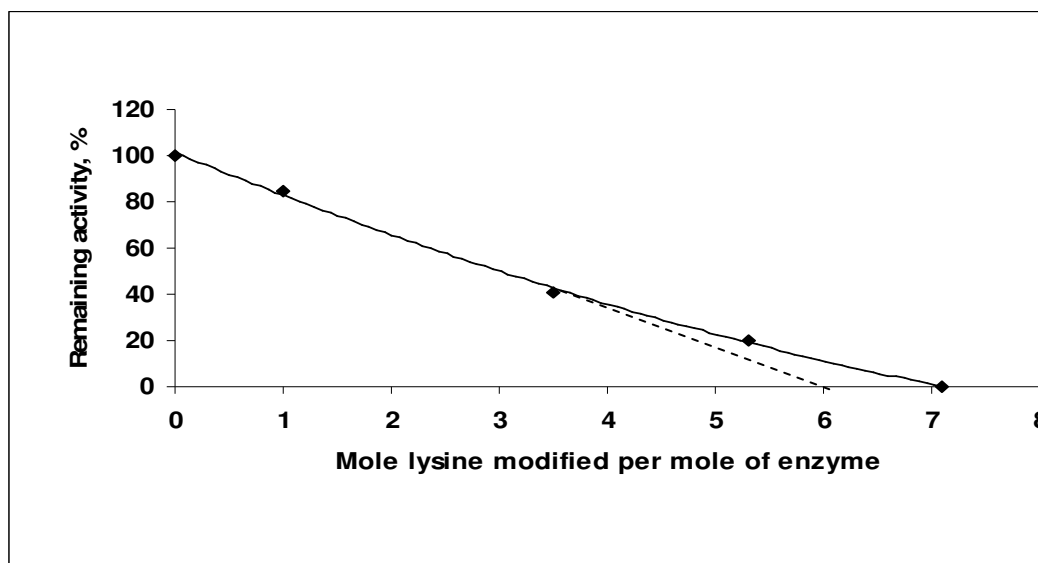
شکل شماره ۴: اسپکتروم شاهد و کمپلکس آنزیم - PLP احیاء شده با $NaBH_4$

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 انکوباسیون 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 غلظت‌های سطحی 0.5 ، $1/5$ ، $3/1$ ، $5/5$ ، $7/2$ و $8/5$ مول در صد فسفاتیدات در میسل‌های مخلوط تریتون $X-100$ اندازه‌گیری گردید. غلظت فسفاتیدات 0.3 میلی مولار ثابت و غلظت تریتون $X-100$ متغیر بود. هر نقطه میانگین دو آزمایش مستقل است.



شکل شماره ۶: تعداد مول PLP متصل شده به مول آنزیم PAP_{2b}

آنزیم PAP_{2b} ($80 \mu g/ml$ در بافر A) برای ۳۰ دقیقه در حضور غلظتهای $0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0$ و 10.0 از PLP در بافر A انکوبه شد. سپس pH لوله ها با اسیداستیک به ۶ رسانیده شد و با $NaBH_4$ احیاء و یک شب بطور جداگانه در مقابل بافر مذکور دیالیز گردیدند. سپس فعالیت نمونه های آنزیمی و تعداد مول PLP متصل شده به آنزیم محاسبه شد.

بحث و نتیجه گیری

برخی از عوامل شیمیایی قادرند با باقیمانده اسیدهای آمینه روی یک زنجیر پروتئینی ترکیب شوند و چنانچه این اسید آمینه در جایگاه فعال یک آنزیم باشد، منجر به غیرفعال شدن آنزیم می گردد. PLP به عنوان یکی از ترکیباتی است که قادر است با ϵ -Aminogroup لیزین موجود در یک پروتئین ترکیب و ایجاد بازشیف کند و اگر این لیزین در جایگاه فعال یک آنزیم باشد منجر به غیرفعال شدن آن می گردد (۹). با توجه به اینکه PLP دارای یک ماکزیم جذب اسپکتروفتومتری در طول موج حدود ۳۸۸ نانومتر می باشد (۱۸)، در شکل شماره ۳ اسپکتروم تفاضل بین کمپلکس آنزیم - PLP و آنزیم شاهد مشاهده می شود که مؤید اتصال PLP به PAP_{2b} و ایجاد بازشیف احیاء نشده در ۴۲۰ نانومتر می باشد. در شکل شماره ۴ مشاهده می شود که احیاء بازشیف ایجاد شده در

PAP_{2b} با $NaBH_4$ منجر به اتصال کووالانست عامل کربونیل PLP به PAP_{2b} و متعاقب آن تغییر مکان ماکزیم جذب نوری از ۴۲۰ به ۳۲۵ نانومتر می گردد. چنین وضعیتی مشابهی نیز برای بعضی از آنزیمها مشاهده شده است (۱۹،۲۰). شکل شماره ۵ نوع مهار ایجاد شده توسط PLP برای آنزیم PAP_{2b} را نشان می دهد که از نوع رقابتی می باشد و باعث افزایش k_m ظاهری آنزیم شده است، بنابراین با توجه به نوع مهار رقابتی می توان گفت که لیزین در جایگاه فعال و یا در نزدیکی آن قرار گرفته است، بطوریکه بلوکه شدن آن توسط PLP باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم می شود. مطالعات انجام گرفته در رابطه با نقش لیزین اساسی در فعالیت PAP_1 نشان داد که هرچند اسید آمینه لیزین در جایگاه فعال، PAP_1 قرار ندارد ولی برای فعالیت کاتالیتیکی آنزیم PAP_1 اساسی است، بطوریکه تعدیل آن با PLP منجر به کاهش چشمگیر فعالیت آنزیم PAP_1 می گردد (۲۱). در تحقیق دیگری نقش هیستیدین اساسی در عمل کاتالیتیکی PAP_1 اثبات گردید و مشخص شد هیستیدین اساسی در جایگاه فعال این

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 $33/8$ کیلوالتون گردید و جرم مولکولی آنزیم که 175 کیلوالتون گزارش شده است (۷)، احتمالاً آنزیم می‌بایستی ساختمان هگزامر 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 Z and Brindley DN; Characterization 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 residue at the active site ; Biochemistry, 1974, 13 (15): 3085-91.
- 10) Kanoh H , Imai SI , Yamada K , Sakane F; Purification and properties of phosphatidic acid phosphatase from porcine thymus membrane; J Biol Chem , 1992, 267: 25309-14 .

- 11) Haghighi B, Honarju S ; The effects of hydrazine on the phosphatidate phosphohydrolase activity in rat liver; Biochem Pharmacol ,1987,36 :1163-5.
- 12) Haghighi 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;JBiolChem , 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) Haghighi B and Heidarian E; Evidence for an essential lysine residue on cytosolic phosphatidate phosphohydrolase from rat liver; Iranian J Sci Technol ,2001, 25: 175-82.
- 22) Haghighi B and Takhshid A;The evidence for essential histidine residue in soluble phosphatidate phosphohydrolase of rat liver; Iranian J Sci Technol , 1999, 23: 109-116.