

علت عدم نیاز به یون Mg^{2+} در آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز غشایی نسبت به فرم سیتوزولی آن در کبد موش صحرایی

دکتر اسفندیار حیدریان^{۱*}، دکتر بهرام حقیقی^۲

(۱) گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

(۲) گروه بیوشیمی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۵/۷/۱۰

تاریخ پذیرش: ۸۵/۹/۲

چکیده

مقدمه: آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز (PAP)، تبدیل اسید فسفاتیدیک به دی‌آسیل گلیسرول و فسفات را کاتالیز می‌کند. این آنزیم در کبد موش صحرایی دارای دو فرم می‌باشد. یک فرم سیتوزولی (PAP_1) در متابولیسم گلیسرولیپیدها نقش داشته و برای فعالیت نیازمند یون Mg^{2+} می‌باشد. فرم دیگر آن (PAP_2) غشایی است که در Signal transduction دخیل است و جهت فعالیت خود نیازی به یون Mg^{2+} ندارد. PAP_2 دارای دو ایزوفرم PAP_{2a} و PAP_{2b} می‌باشد. اطلاعات محدودی پیرامون خواص آنزیمولوژیکی، مکانیسم عمل PAP_2 و علت عدم نیاز آن به Mg^{2+} نسبت به PAP_1 وجود دارد. در تحقیقات انجام گرفته بر روی این آنزیم همواره خصوصیات سوبسترای متفاوت آن از نظر دور مانده است. به همین دلیل اهداف این تحقیق بررسی فعالیت آنزیم و چگونگی پاسخ‌های آن به برخی از عوامل از جمله Mg^{2+} ، علت عدم نیازمندی آن به Mg^{2+} و تاثیر ساختار شکن‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر فعالیت آنزیم از دیدگاه سوبسترای آن می‌باشد.

مواد و روشها: آنزیم غشایی PAP_{2b} طی چندین مرحله کروماتوگرافی از کبد موش صحرایی تخلیص گردید. تمایل آنزیم PAP_{2b} در مصرف فرم‌های $(Lamellar)L_a$ و $(Hexagonal)H_{II}$ سوبسترای فسفاتیدات در حضور غلظت‌های مختلف تریتون X-100 بررسی شد. تاثیر زمان و اثر ساختار شکن‌های مذکور بر روند تبدیل فرم L_a به H_{II} فسفاتیدات بررسی شد. مقدار فرم L_a به روش هضم فسفولیپیدی در حضور ساختار شکن‌ها و غلظت‌های مختلف یون Mg^{2+} بررسی شد.

یافته‌های پژوهش: PAP_{2b} فرم L_a سوبسترا را مصرف می‌کند. ساختار شکن‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید با ابقاء فرم L_a باعث افزایش فعالیت آنزیم گردیدند. نتایج حاصل از هضم فسفولیپیدی نیز حاکی از ابقاء فرم L_a فسفاتیدات در حضور ساختار شکن‌های مذکور بود. روند تبدیل فرم L_a به H_{II} در محیط فاقد تریتون X-100 نسبت به محیط حاوی تریتون X-100 سریعتر صورت گرفت.

نتیجه‌گیری نهایی: PAP_{2b} فرم L_a فسفاتیدات را مصرف می‌کند و لذا هر عاملی که باعث تسهیل روند تبدیل فرم L_a به H_{II} گردد باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌گردد و برعکس، عواملی مثل ساختار شکن‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید باعث ابقاء فرم L_a باعث افزایش فعالیت آنزیم می‌گردند. چون یون Mg^{2+} باعث تسهیل ایجاد فرم H_{II} سوبسترا می‌شود و آنزیم نیاز به فرم L_a سوبسترا دارد لذا می‌توان نتیجه گرفت که نه تنها آنزیم نیازی به یون Mg^{2+} ندارد بلکه توسط آن مهار می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: فسفاتیدات فسفوهیدرولاز غشایی، اسید فسفاتیدیک، L_a فسفاتیدات، H_{II} فسفاتیدات

* نویسنده مسئول: گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

مقدمه

آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز^۱ (PAP, C 3.1.3.4) تبدیل اسید فسفاتیدیک به دی‌آسیل‌گلیسرول و فسفات معدنی (P_i) را کاتالیز می‌کند (۱). دی‌آسیل‌گلیسرول حاصل از این واکنش بعنوان پیش‌ساز در سنتز تری‌گلیسرید و سایر فسفولیپیدهای مرکب مثل فسفاتیدیل‌کولین و فسفاتیدیل‌اتانول آمین مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱ و ۲). این آنزیم در کبد موش صحرایی دارای دو ایزوفرم می‌باشد، یک فرم در سیتوزول و میکروزوم‌ها وجود دارد و به آن PAP_1 گفته می‌شود. این فرم جهت فعالیت کاتابولیکی خود نیاز به یون Mg^{2+} دارد و بوسیله N-اتیل مالیمید (NEM) مهار می‌شود و در متابولیسم گلیسرولیپیدها و فسفولیپیدها دخیل است (۳ و ۴). فرم دیگر که در غشاء سیتوپلاسمی جای گرفته و به آن PAP_2 گفته می‌شود، در Signal transduction نقش دارد و توسط N-اتیل مالیمید مهار نمی‌شود (۳ و ۵) و در غلظت‌های بالاتر از $5mM$ از یون Mg^{2+} مهار می‌شود (۶ و ۷). متعاقباً اثبات شده که PAP_2 در کبد موش صحرایی دارای دو ایزوفرم PAP_{2a} و PAP_{2b} می‌باشد که از لحاظ مقدار تقریباً ۳۰٪ PAP_{2a} و مابقی را PAP_{2b} تشکیل می‌دهد (۵ و ۷). تحقیقات محدودی بر روی ایزوفرم‌های PAP_{2a} و PAP_{2b} صورت گرفته است. به علت اینکه PAP_{2a} تاکنون به صورت یک پروتئین همگن تخلیص نشده است، تحقیقات قابل ملاحظه‌ای بر روی آن انجام نگرفته است (۷). تحقیقات انجام گرفته بر روی PAP_{2b} حاکی از اثرات مهار یونهای Ca^{2+} ، Mn^{2+} ، Zn^{2+} ، آمین‌های آمفی‌فیلیک مثل پروپرانولول، کلرپرومازین، اسفنگوزین و دی‌پرامین می‌باشد (۷). در خصوص مکانیسم و یا چگونگی اثرات مهار یون کاتیونهای مذکور هیچگونه تحقیقاتی صورت نگرفته است (۷). همچنین مشخص شده است که PAP_{2b} جهت فعالیت نیازی به فسفولیپیدها ندارد و توسط دی‌آسیل‌گلیسرول مهار می‌شود (۷).

تاکنون تحقیقاتی در خصوص علت عدم نیازمندی PAP_2 به یون Mg^{2+} صورت نگرفته است. از طرف دیگر در تحقیقات انجام گرفته بر روی این آنزیم همواره خصوصیات سوبسترای متفاوت آن از نظر دور مانده است. لذا هدف از این پژوهش بررسی فعالیت آنزیم و چگونگی پاسخ‌هایش به برخی از عوامل

از جمله کاتیون Mg^{2+} و ساختار شکن‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید از دیدگاه سوبسترای آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده عبارت بودند از: اسید فسفاتیدیک (ملح دی‌سدیم)، دی‌تیوترایتول (DTT)، N-اتیل مالیمید (NEM)، لویپتین، مهارکننده Soyabean trypsin، بنز آمیدین، هیدروکسیل آپاتیت، پیستاتین، هپارین سفارز، n-اکتیل گلوکوزید، سفاکریل S₃₀₀ (Sigma, USA)، EDTA²، EGTA³، گلیسرول و سرم آلبومین گاوی (Merck, Germany).

الف) تخلیص آنزیم: PAP_{2b} از غشاء سلولهای کبدی موش صحرایی بر اساس روش Fleming و همکارانش تخلیص گردید و فقط مرحله هیدروکسیل آپاتیت به روش Batch wise انجام گرفت (۷). تعداد موشهای صحرایی ۱۴ عدد و در محدوده ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم بودند.

ب) سنجش فعالیت آنزیم: طبق روشی که قبلاً شرح داده شده است در بافر سنجش اندازه‌گیری گردید (۸).

ج) جداسازی و تشخیص فازهای مختلف تشکیل شده توسط اسید فسفاتیدیک امولسیونه: اسید فسفاتیدیک در آب به صورت ساختارهای تجمعی^۴ دیده می‌شود که می‌تواند از نوع L_a (Lammellar) یا H_{II} (Hexagonal) باشد، نظر به اینکه خواص این دو ساختار با هم متفاوت است، امکان جداسازی و تشخیص آنها توسط روشهای فیزیکوشیمیایی ممکن است، به این طریق که این دو فاز توسط سانتریفوژ در دمای $40^\circ C$ به مدت ۲۰ دقیقه در $1500g$ به راحتی جدا می‌شوند و رسوب امولسیونه که ته‌نشین می‌گردد به دقت جدا شده و با استفاده از محلول سودان سیاه B (۰/۷ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر پروپیلن گلیکول) وجود فسفاتیدات آزمایش می‌گردد تا بطور کلی صحت فاز H_{II} در آن اثبات گردد. محلول رویی

1. Phosphatidate phosphohydrolase

2. Ethylene diamine tetra acetic acid

3. Ethylene bis (Oxyethylene nitrido) tetra acetic acid

4. Aggregated

ز) بررسی اثر ساختارشکن های اوره و گوانیدین هیدروکلراید در امولسیون اسید فسفاتیدیک بر روند تبدیل فرم L_a به H_{II} : جهت بررسی تغییر پیشرونده فاز از فرم L_a به H_{II} بطور مجزا غلظت های ۰، ۰/۱، ۰/۴، ۱، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۵۰ میلی مولار از ساختارشکن اوره و غلظت های ۰، ۱، ۲، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۵ میلی مولار گوانیدین هیدروکلراید در امولسیون اسید فسفاتیدیک در بافر سنجش فعالیت ایجاد گردید و تغییر جذب نوری در طول موج ۳۵۶ nm در فواصل زمانی یک دقیقه ای خوانده شد (۱۰) و نتایج به صورت نمودارهای زمان در مقابل جذب نوری رسم گردید.

ح) بررسی اثر غلظت های مختلف یون Mg^{2+} بر روند تبدیل سوبسترای L_a به H_{II} در محیط سنجش فعالیت و محیط سنجش فاقد

تریتون X-100: دو دسته هفت عددی لوله آزمایش تمیز، یک دسته به عنوان شاهد و دسته دیگر به عنوان تست انتخاب گردید. در سری شاهد، محیط سنجش فعالیت آنزیم حاوی ۰/۳۵mM فسفاتیدات و غلظت های ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۱، ۲، ۴ و ۱۰ میلی مولار از $MgCl_2$ بود. در سری تست نیز، محیط سنجش فعالیت آنزیم فاقد تریتون X-100 و غلظت های ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۱، ۲، ۴، ۱۰ میلی مولار از $MgCl_2$ و ۰/۳۵mM از فسفاتیدات ایجاد گردید. سپس همه لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. متعاقباً همه لوله ها در دور ۱۵۰۰g در ۴°C سانتریفوژ و سوپرناتانت محتوی فاز L_a از رسوب که محتوی فاز H_{II} بود جدا گردید و لوله های محتوی فاز L_a مورد هضم فسفولیپیدی قرار گرفتند (۱۰ و ۱۱). نتایج به صورت درصد مقدار فرم L_a در مقابل غلظت $MgCl_2$ در محیط سنجش حاوی تریتون X-100 و فاقد آن رسم گردید.

یافته های پژوهش

نمودار شماره ۱ رابطه زمان و تغییرات جذب نوری در ۳۵۶nm برای روند تبدیل فرم L_a به فرم H_{II} امولسیون اسید فسفاتیدیک در محیط سنجش فعالیت آنزیم مشاهده می شود. این نمودار نشان می دهد که با گذشت زمان میزان جذب نوری به دلیل تشکیل ذرات H_{II} از فرم L_a افزایش می یابد ولی از دقیقه هشتم به بعد تشکیل ذرات H_{II} در محیط کاهش می یابد.

به دست آمده نیز به عنوان سوبسترای امولسیونه فاز L_a در نظر گرفته می شود (۹).

د) بررسی رابطه زمان و تغییر فاز L_a به H_{II} فسفاتیدات در بافر سنجش فعالیت آنزیم: جهت بررسی تغییر فاز L_a به H_{II} در امولسیون اسید فسفاتیدیک در بافر سنجش فعالیت آنزیم، پس از ایجاد غلظت ۰/۳۵ mM از اسید فسفاتیدیک در بافر سنجش، تغییر جذب نوری در طول موج ۳۵۶nm برای تشکیل H_{II} در فواصل زمانی یک دقیقه قرائت و نتیجه به صورت نمودار زمان در مقابل جذب نوری رسم گردید (۹ و ۱۰).

ه) بررسی تمایل آنزیم PAP_{2b} در مصرف فرم های L_a و H_{II} فسفاتیدات: جهت تهیه فرم H_{II} سوبسترا هشت لوله آزمایش تمیز انتخاب و غلظت ۰/۳۵mM از سوبسترا در محیط سنجش فاقد تریتون X-100 و فاقد آنزیم ایجاد گردید و برای تبدیل فرم L_a سوبسترا به فرم H_{II} (Phase transition) در محیط ایجاد غلظت ۱۰۰mM یون Ca^{2+} گردید و به مدت ده دقیقه انکوبه شدند (۱۰). سپس رسوب H_{II} مطابق بند ج جدا گردید و با ۱۰ ml آب دوبار تقطیر بخوبی شسته شد و در حین شستشو با استفاده از یک میله شیشه ای رسوب کاملاً خرد شده و دوباره سانتریفوژ گردید و این عمل حداقل ۵ بار با آب دوبار تقطیر تکرار گردید. در آخرین مرحله رسوب ها در بافر سنجشی که به ترتیب محتوی غلظت های ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی مولار تریتون X-100 بود حل شدند (۱۰). سپس هشت لوله دیگر که همگی دارای غلظت ۰/۳۵mM فسفاتیدات به فرم L_a در بافر سنجش محتوی ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی مولار تریتون X-100 بودند، ایجاد و سپس به کلیه لوله ها آنزیم اضافه و فعالیت آنها اندازه گیری شد و نتایج به صورت منحنی فعالیت در مقابل غلظت های مختلف تریتون X-100 برای فرم های L_a و H_{II} رسم گردید.

و) بررسی اثر ساختارشکن های اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر فعالیت PAP_{2b} غشایی: غلظت های مختلف ۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۵۰، ۸۰، ۷، ۵، ۲، ۱، ۰ میلی مولار از ساختارشکن های اوره و گوانیدین هیدروکلراید به طور مجزا در محیط سنجش فعالیت آنزیم ایجاد و فعالیت آنزیم اندازه گیری و نتایج به صورت فعالیت در مقابل غلظت ساختارشکن رسم گردید.

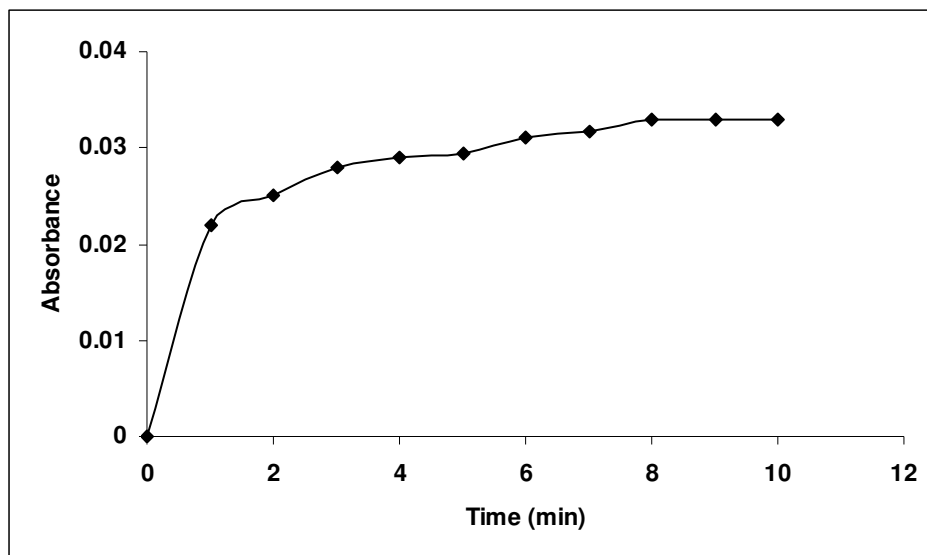
میلی مولار اوره و ۲۰ میلی مولار از گوانیدین هیدروکلراید بیشترین اثر در محیط سنجش فعالیت نسبت به شاهد را ایجاد می کنند.

در نمودار شماره ۶ درصد باقیمانده فرم L_a به روش هضم فسفولیپیدی پس از جداسازی فاز L_a از H_{II} در حضور غلظت های مذکور از ساختارشکن های اوره و گوانیدین هیدروکلراید مشاهده می شود. همانطور که شکل نشان می دهد با افزایش غلظت ساختارشکن های مذکور درصد ابقاء فرم L_a در محیط افزایش می یابد.

نمودار شماره ۷، درصد ابقاء سوپسترا به فرم L_a در حضور غلظت های مختلف Mg^{2+} را در بافر سنجش فعالیت محتوی و فاقد تریتون X-100 نشان می دهد. این شکل نشان می دهد که افزایش غلظت یون Mg^{2+} باعث القاء تشکیل فاز H_{II} و کاهش فاز L_a می گردد ولی این وضعیت در محیط سنجشی که فاقد تریتون X-100 است، بیشتر می باشد.

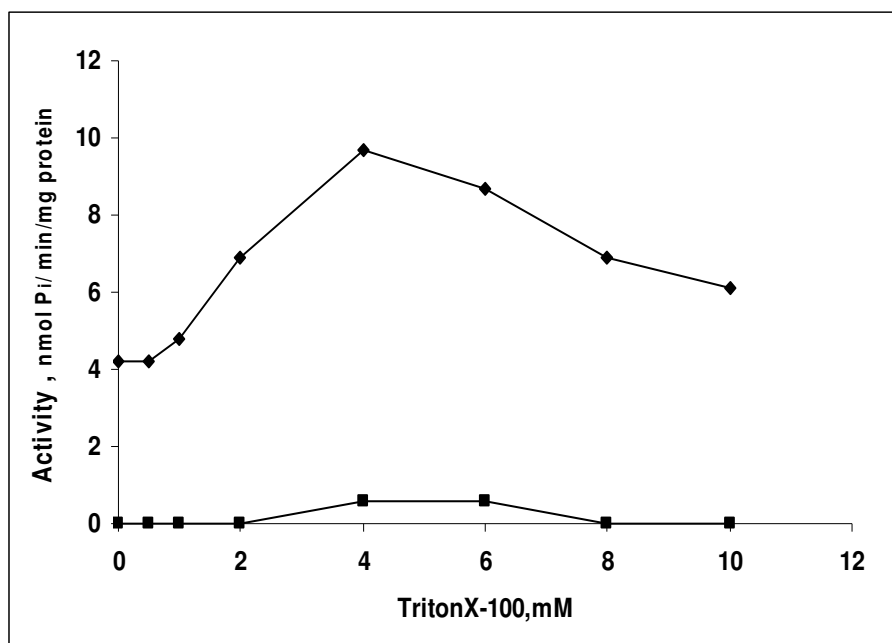
نمودار شماره ۲ تمایل آنزیم PAP_{2b} را در مصرف فرم های L_a و H_{II} فسفاتیدات نشان می دهد. این نمودار نشان می دهد که آنزیم PAP_{2b} تمایلی به مصرف سوپسترای فسفاتیدات به فرم H_{II} حتی در حضور تریتون X-100 ندارد و تمایل به مصرف فرم L_a سوپسترا دارد و این تمایل در حضور تریتون X-100 در غلظت ۴mM تا ۲/۵ برابر بیشتر، تحریک می شود. در نمودار شماره ۳ و ۴ به ترتیب اثر ساختارشکن های اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر روند تبدیل L_a به H_{II} فسفاتیدات دیده می شود، همانطور که در نمودارها مشاهده می شود با افزایش غلظت ساختارشکن ها در محیط سنجش از شدت جذب نوری کاسته می شود که به دلیل جلوگیری از تشکیل ذرات H_{II} در محیط می باشد.

نمودار شماره ۵ اثر غلظت های مختلف اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر فعالیت PAP_{2b} غشایی را نشان می دهد. مطابق این نمودار، حضور ساختارشکن های مذکور باعث افزایش فعالیت آنزیم می گردند، بطوریکه غلظت های ۱۰



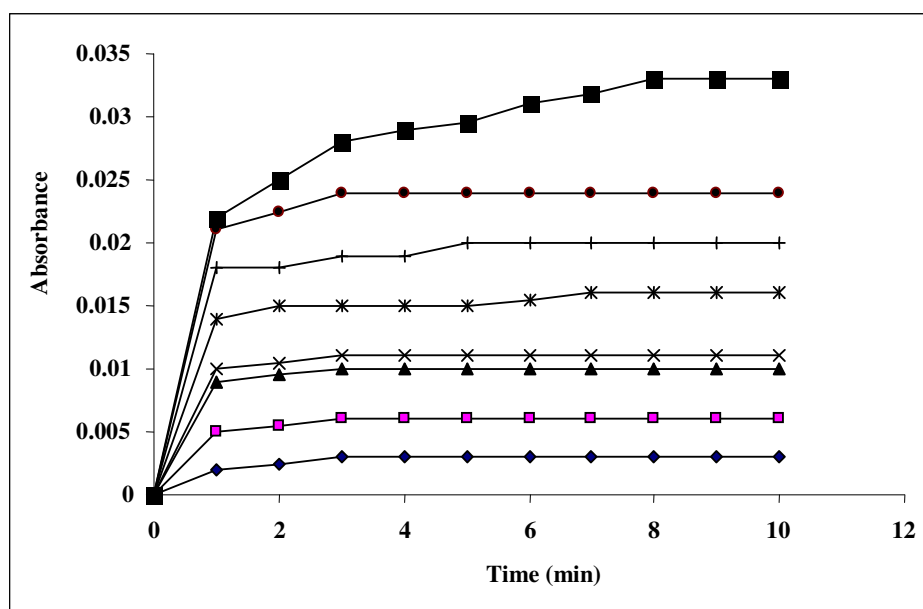
نمودار ۱: تغییرات جذب نوری در مقابل زمان برای امولسیون اسید فسفاتیدیک.

غلظت اسید فسفاتیدیک ۰/۳۵ میلی مولار در بافر سنجش فعالیت آنزیم و طول موج ۳۵۶nm بود.



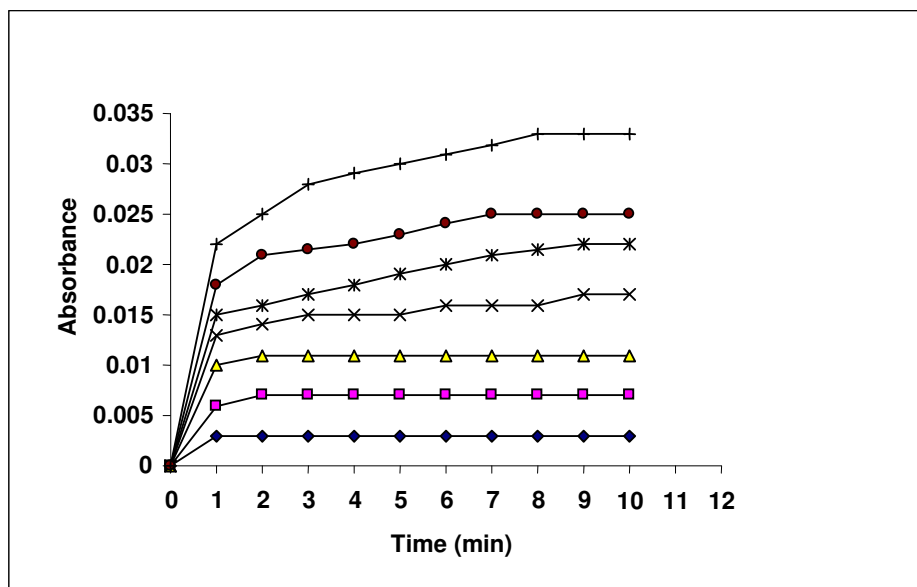
نمودار ۲: تمایل آنزیم PAP_{2b} در مصرف فرم های L_a و H_{II} سوپسترا.

فعالیت PAP_{2b} (g/μ ۰/۵) در بافر سنجش فعالیت محتوی سوپسترا به فرم های L_a (♦) و H_{II} (■) در حضور غلظت های مختلف تریتون X-100 اندازه گیری گردید.



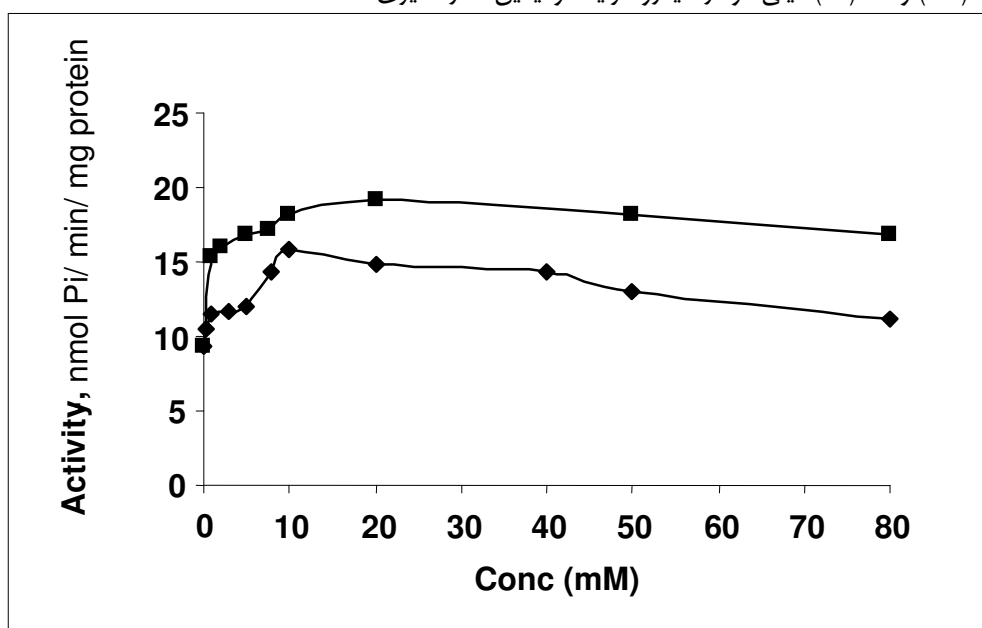
نمودار ۳: اثر ساختارشکن اوره بر تغییر فاز از L_a به H_{II} در امولسیون اسید فسفاتیدیک.

تغییرات جذب نوری امولسیون اسید فسفاتیدیک ۰/۳۵ میلی مولار در بافر سنجش فعالیت در مجاورت غلظت های ۰ (■)، ۰/۱ (●)، ۰/۴ (+)، ۱ (*)، ۱۰ (×)، ۲۰ (▲)، ۴۰ (■) و ۵۰ (♦) میلی مولار اوره اندازه گیری شد.



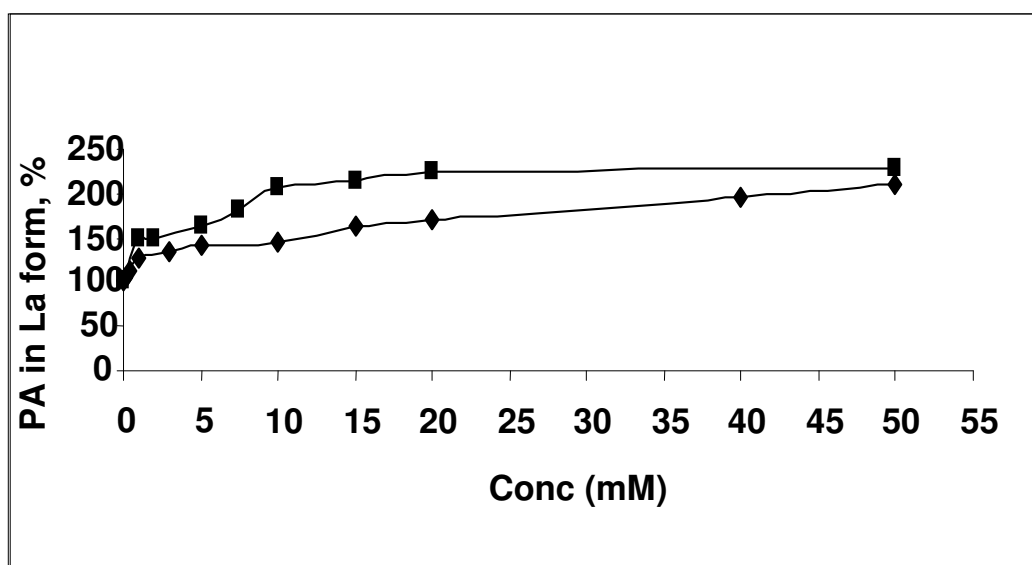
نمودار ۴: اثر ساختارشکن گوانیدین هیدروکلراید بر تغییر فاز از L_a به H_{II} در امولسیون اسید فسفاتیدیک

تغییرات جذب نوری امولسیون اسید فسفاتیدیک ۰/۳۵ میلی مولار در بافر فعالیت در مجاورت غلظت های ۰ (+)، ۱ (●)، ۲ (*)، ۵ (X)، ۷/۵ (Δ)، ۱۰ (■) و ۱۵ (◆) میلی مولار هیدروکلراید گوانیدین اندازه گیری شد.



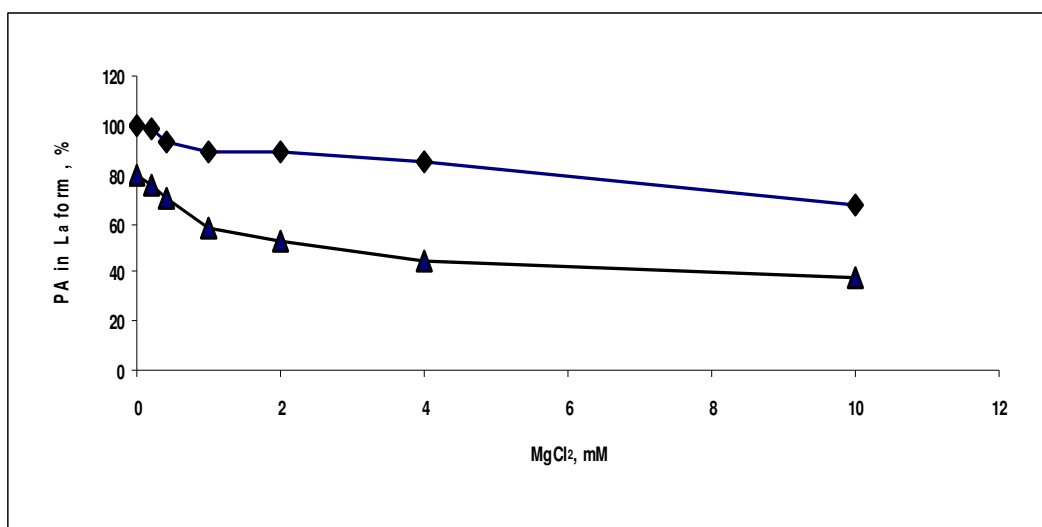
نمودار ۵: اثر اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر فعالیت PAP_{2b}

فعالیت آنزیم PAP_{2b} (۰/۵ μg) در بافر سنجش فعالیت در حضور غلظت های مختلف از اوره (◆) و گوانیدین هیدروکلراید (■) به طور جداگانه اندازه گیری شد.



نمودار ۶: مقدار اسید فسفاتیدیک موجود به شکل L_a پس از تعادل امولسیون اسید فسفاتیدیک با غلظت‌های مختلف اوره و گوانیدین هیدروکلراید

اسید فسفاتیدیک باقیمانده به شکل L_a پس از افزودن غلظت‌های مختلف اوره (◆) و گوانیدین هیدروکلراید (■) به امولسیون اسید فسفاتیدیک ۰/۳۵mM در بافر سنجش فعالیت از رسوب H_{II} جداسازی گردید و P_i آزاد شده از آن در اثر هضم اسیدی توسط اسید پرکلریک ۷۰٪ اندازه‌گیری شد.



نمودار ۷: اثر غلظت‌های مختلف Mg^{2+} بر اسید فسفاتیدیک موجود به شکل L_a در حضور و غیاب تریتون X-100 در بافر سنجش

اسید فسفاتیدیک باقیمانده به شکل L_a در بافر سنجش محتوی تریتون X-100 (◆) و فاقد تریتون X-100 (▲) در غلظت‌های مختلف Mg^{2+} از رسوب H_{II} جداسازی گردید و P_i آزاد شده از آن در اثر هضم اسیدی توسط اسید پرکلریک ۷۰٪ اندازه‌گیری شد.

بحث و نتیجه گیری

برخی از فسفولیپازها برای فعالیت خود نیاز به یونهای دوظرفیتی دارند، فعالیت PAP_1 نیز بوسیله Mg^{2+} تحریک می شود درحالیکه PAP_2 غیر وابسته به Mg^{2+} است (۱۲). نتایج حاصل از بررسی اثرات یونهای دو ظرفیتی مثل Ca^{2+} ، Mg^{2+} ، Zn^{2+} بر روی PAP_{2b} حاکی از اثر مهارى آنها بر فعالیت PAP_{2b} می باشد (۵ و ۶). ولی در تحقیقات مذکور اشاره ای به نوع مهار یا مکانیسم احتمالی آن نشده است. در نمودار شماره ۲ مشاهده می شود که آنزیم PAP_{2b} فرم L_a سوپسترا را مصرف می کند و لذا هر عاملی که باعث تسهیل و تشدید روند تبدیل فرم L_a به H_{II} فسفاتیدات گردد، با خارج کردن فرم L_a سوپسترای موردنیاز آنزیم باعث کاهش فعالیت آنزیم می گردد. از طرف دیگر اثرات یونهای دوظرفیتی در پلی مورفیسم فسفولیپیدهای باردار پیچیده است و بین آنها تفاوت وجود دارد (۱۳ و ۱۴). معمولاً چنین یونهایی از لحاظ استوکیومتری تمایل اتصال به گروه سری فسفو لپید دارند و این تمایل حتی در غلظت های اندک یونها نیز وجود دارد، بدلیل اینکه ثابت های اتصال آنها بسیار بزرگ است (۱۳ و ۱۴) و باعث القاء فاز H_{II} فسفاتیدات می گردند (۱۷ - ۱۵) که مورد مصرف آنزیم قرار نمی گیرد. در رابطه با اسید فسفاتیدیک اثبات گردیده که بعثت داشتن بار منفی در ناحیه سری تمایل به اتصال به کاتیونها دارد و در حضور مقادیر اندک کاتیونها فاز H_{II} در آن القاء می گردد (۱۸). علاوه بر موارد مذکور اثبات شده که قدرت اتصال کاتیونهای مختلف به اسید فسفاتیدیک درجات مختلفی دارد که رابطه مستقیمی با قدرت ایجاد ذرات H_{II} دارد (۱۴). لذا با توجه به مطالب مذکور می توان استدلال کرد چون PAP_{2b} فرم L_a سوپسترا را مصرف می کند بنابراین نیازی به یون Mg^{2+} که یک عامل القاء کننده فرم H_{II} می باشد را ندارد. در رابطه با علت نیازمندی PAP_1 به یون Mg^{2+} جهت فعالیت، حقیقی و همکارانش اثبات کردند که آنزیم PAP_1 فرم حد واسطی از فسفاتیدات که در طی روند تبدیل فرم L_a به H_{II} ایجاد می گردد، را مصرف می کند (۱۰) و به همین دلیل نیازمند یون Mg^{2+} یا برخی از یونها در غلظت های پایین می باشد، تا باعث القاء و تبدیل فرم L_a به H_{II} و در کنار آن تشکیل فرم حد واسط موردنیاز آنزیم PAP_1 شود (۱۰).

در نمودار شماره ۱ روند تغییرات فاز L_a به H_{II} سوپسترا

در محیط سنجش فعالیت آنزیم دیده می شود که پس از گذشت هشت دقیقه روند تبدیل فرم L_a به H_{II} تقریباً ثابت و متوقف می گردد. بهر حال در روند تبدیل فرم L_a به H_{II} عوامل بسیار متعددی دخالت دارند. از جمله این عوامل می توان نوع اسیدهای چرب، طول زنجیره آنها، اشباع یا غیراشباع بودن در اسید فسفاتیدیک را نام برد (۶) که همگی قادرند فعالیت PAP_2 را تحت تاثیر قرار دهند. از عوامل دیگر که قادرند بر روی روند تبدیل فرم L_a به H_{II} فسفاتیدات موثر باشد، مواد حل شده در بافر سنجش مورد استفاده است که اثر آنها بستگی به غلظت و مکان آنها دارد و با تغییر خواص محلول اثر خود را اعمال می کنند (۱۹). از جمله این مواد می توان ساختارشکن گوانیدین هیدروکلراید و اوره را نام برد که سبب پایدارسازی فاز تیغه ای L_a می شود (۱۹). در نمودار های شماره ۳ و ۴ اثرات ساختارشکن های مذکور بر روند تبدیل فاز L_a به H_{II} مشاهده می شود و نتیجه گرفته می شود که حضور این ترکیبات در محیط سنجش از روند تبدیل فرم L_a به H_{II} ممانعت می کنند.

در نمودار ۵ اثر ساختارشکن های مذکور در غلظت های مختلف بر فعالیت آنزیم مشاهده می شود. در این شکل مشاهده می شود که متناسب با افزایش غلظت ساختارشکن های مذکور در محیط سنجش، فعالیت آنزیم نیز افزایش می یابد که خود تایید دیگری بر مصرف فرم L_a توسط آنزیم و عدم نیاز آن به یون Mg^{2+} است. در نمودار شماره ۶ نتایج حاصل از هضم فسفولیپیدی اثرات ساختارشکن های مذکور در روند تبدیل فرم L_a به H_{II} مشاهده می شود و از این نمودار نتیجه گرفته می شود که وجود این ساختار شکن ها مانع از تشکیل ذرات H_{II} فسفاتیدات و باعث حفظ و ابقاء فرم L_a در محیط و در نتیجه در حضور آنها فعالیت آنزیم نیز افزایش می یابد. بنابراین نتایج حاصل از این آزمایشات تاییدی دیگر برای آنزیم PAP_2 جهت مصرف فرم L_a فسفاتیدات می باشد و با توجه به اینکه یون Mg^{2+} باعث القاء فرم H_{II} سوپسترا می شود (۱۰) می توان استنتاج کرد که این یون اثری مهارى بر فعالیت آنزیم دارد و نیازی به آن ندارد.

در نمودار شماره ۷ درصد باقیمانده فرم L_a سوپسترا در حضور Mg^{2+} در محیط سنجش حاوی و فاقد تریتون X-100 مشاهده می شود. از این شکل استنباط می شود که در

محیط سنجش فاقد تریتون $X-100$ روند تبدیل فرم L_a به H_{II} تشدید می‌گردد. احتمالاً میسل‌های تریتون $X-100$ و یا سایر دترجنت‌ها زمینه قرار گرفتن سوسترای فسفاتیدات در این غشاء‌های مصنوعی را مهیا کرده و با ایجاد تغییر شکل فیزیکی در فسفاتیدات امکان روند تبدیل فرم L_a به H_{II} سوستر را از طریق ایجاد رقت سطحی و ممانعت از تشکیل کمپلکس‌های تجمعی کاهش داده و نهایتاً باعث ابقاء فرم L_a سوستر در محیط می‌گردد.

References

1. Smith SW, Weiss SB, Kennedy EP. Enzymatic dephosphorylation of phosphatidic acid. J Biol Chem 1957, 228: 915 - 22.
2. Brindley DN. Intracellular translocation of phosphatidate phosphohydrolase and its possible role in the control of glycerolipid synthesis. Prog Lipid Res 1984, 115-33.
3. Jamal Z, Martin A, Munoz AG, et al. 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- 96.
4. Martin A, Comez- Munoz A, Jamal Z, et al. Characterization and assay of PAP; Methods Enzymol 1991, 197: 553-63.
5. Waggoner DW, Martin A, Dewald J, et al. Purification and characterization of a novel plasma membrane phosphatidate phosphohydrolase from rat liver; J Biol Chem 1995, 270: 19422- 19429.
6. Kanoh H, Imai SI, Yamada K, et al. Purification and properties of phosphatidic acid phosphatase from porcine thymus membrane; J Biol Chem 1992, 267: 25309- 25314.
7. Fleming IN, Yeaman SJ. Purification and characterization of N- ethylmaleimide-insensitive phosphatidic acid phosphohydrolase (PAP₂) from rat liver; Biochem J 1995, 308: 983- 989
۸. حیدریان، اسفندیار. تشخیص لیزین اساسی در فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز غشایی کبد موش صحرایی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دوره سیزدهم، شماره اول، بهار ۱۳۸۴، ص ۵۰-۵۸.
9. Seddon JM. Structure of the inverted hexagonal (H_{II}) phase, and nonlamellar phase transition of lipids; Biochim Biophys Acta 1990, 1031: 1- 69
10. Haghighi B, Yari M, Tori S. The relationship between cation induced substrate configuration and enzymatic activity of phosphatidate phosphohydrolase from human liver; Iranian Biomed J 2000, 4: 13 - 19
11. Comfurius P, Zwaal RFA. The enzymatic synthesis of phosphatidylserine and purification by CM- cellulose column chromatography; Biochim Biophys Acta 1977, 488: 36- 42.
12. Butterwith SC, Hopewell R, Brindley DN. Partial purification and characterization of the phosphatidate phosphohydrolase of rat liver; Biochem J 1984, 220: 828- 833.
13. Farren SB, Hope MJ, Cullis PR. Polymorphic phase preference of phosphatidic: A ^{31}P and 2H NMR study; Biochem Biophys Res Commun 1983, 111: 675- 682.
14. Papahadjopoulos D, Vail WJ, Pangborn WA, et al. Studies on membrane fusion. II) Induction of fusion in pure phospholipids membranes by calcium ions and other divalent metals; Biochim Biophys Acta 1976, 448: 265- 283.
15. Hope MJ, Cullis PR. Effects of divalent cations and pH on phosphatidylserine model membranes. A ^{31}P NMR study; Biochem Biophys Res Commun 1980, 92: 846- 852.

16. Jacobson K, Papahadjopoulos D. Phase transition and phase separation in phospholipids membrane induced by changes in temperature, pH and concentration of bivalent cations; *Biochemistry* 1975, 14: 153- 161
17. Hauser H, Friner E, Darke A. Crystalline anhydrous Ca-phosphatidylserine bilayer; *Biochem Biophys Res Commun* 1977, 76: 276- 274.
18. Ito T, Ohnishi SI. Ca^{2+} - induced lateral phase separations in phosphatidic acid phosphatidylcholine membranes; *Biochim Biophys Acta* 1974, 325: 29- 37.
19. Marsh D, Watts A, Smith ICP. Dynamic structure and phase behavior of dimyristoylphosphatidylethanolamine bilayers studied by deuterium nuclear magnetic resonance; *Biochemistry* 1983, 22: 3023 – 3026.

Rat Membrane Phosphatidate Phosphohydrolase and the Reason for its Mg²⁺ Independence

Heidarian E^{4*}, Haghighi B².

1) Dept of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences.

2) Dept of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Esfahan University of Medical Sciences.

Abstract

Introduction: phosphatidate phosphohydrolase (PAP) catalyzes the dephosphorylation of phosphatidic acid to yield Pi and diacylglycerol. Two forms of PAP in rat hepatocyte have been reported. A cytosolic form (PAP_I) that is responsible for glycerolipid metabolism and requires Mg²⁺ for its activity. Another form (PAP₂) is primarily involved in lipid signaling pathways which does not need Mg²⁺. It has two isoforms; PAP 2a and PAP2b.

Little information is known about enzymological characterization of PAP₂ especially its substrate. We investigated the enzyme behavior against Mg²⁺ structure- breaking agents (urea and guanidine HCl) with respect to its substrate.

Materials & Methods: PAP_{2b} was purified from rat hepatocyte membrane using a multi – stage chromatography. The enzyme activity was determined against L_a (lamellar) and H_{II} (Hexagonal) forms of substrate in the presence of triton X-100. The effect of Mg²⁺ concentration and urea and guanidine HCl (structure- breaking agents) were examined on L_a to H_{II} phase transition and enzyme activity.

Results: PAP_{2b} consumes L_a form of phosphatidate. Cations such as Mg²⁺ result in H_{II} from L_a phase of substrate and therefore reduce enzyme activity. Urea and guanidine HCl increase enzyme activity due to prevention of H_{II} formation. Both can also reduce the effect of cations on L_a to H_{II} transition of phosphatidate.

Conclusion: Since PAP_{2b} consumes L_a form of substrate parameters can induce L_a to H_{II} phase transition which result in low enzyme activity. In contrast, factors such as urea and guanidine HCl increase activity due to prevention of L_a to H_{II} phase transition. As Mg²⁺ stimulates H_{II} formation and the enzyme needs L_a form substrate, it can be concluded that, Not only does the enzyme need no Mg²⁺, but it is controlled by it too.

Key words: Membrane phosphatidate phosphohydrolase, phosphatidic acid, L_a and H_{II} phosphatidate.

* **Corresponding Author:** Dept of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences.