Archive of SID

اندازه‌گیری فعالیت آدنیلیل سیکلاز غشاء سلولی در حضور پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ

*دکتر دردی قوجق I
دکتر مجید احمدی II

چکیده

هدف از این پژوهش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز غشاء سلولی جهت بررسی نقش پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ بود. آنزیم آدنیلیل سیکلاز یک آنزیم غشاء سیتوپلاسمی است که تبدیل مولکول ATP را به cAMP کاتالیز می‌کند. فعالیت آنزیمی آدنیلیل سیکلاز از طریق بررسی توانایی پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ در مهارکردن فعالیت القاء شده توسط فورسکولین (forskolin) بر روی این آنزیم اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلازیا استفاده از روش Weign صورت پذیرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز در حضور پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ نسبت به حالت کنترل کاهش می‌یابد. فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز در شرایط کنترل برابر با ۰/٤٥ ± ٦/٨٣ µmolcAMP/mgpro./mmin و در حضور پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ برابر با ۰/۱۵ ± ۲/۱۱ µmolcAMP/mgpro./mmin بود. نتیجه آنکه پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز را تا ۷۹/۹٪ کاهش می‌دهد. نتایج حاصل نشان می‌دهند که اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز غشاء سلولی در مطالعه نقش و عمل پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ قابل استفاده است.

کلید واژه‌ها: ۱ – آنزیم آدنیلیل سیکلاز ۲ – پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ

مقدمه

تعداد زیادی از پروتئینهای کموتاکسیک با استفاده از روشهای بیوشیمیایی جداسازی و شناسایی شده‌اند. این رسپتورها به دسته‌ای از پروتئینها که به پروتئین G با زیر واحدهای آلفا، بتا و گاما متصل می‌گردند متعلق می‌باشد(۱). فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز (E.C.4.6.1.1) توسط کمپلکس پروتئین G کنترل می‌شود. آدنیلیل سیکلاز مولکول ATP را به مولکول cAMP و پیروفسفات تبدیل می‌کند(۲). آدنوزین ۳ و ۵ منوفسفات (cAMP) بعنوان یک مولکول تنظیم کننده در سطح وسیع ـ در پروکاریوتها و اوکاریوتها ـ شناخته شده است(۳). بررسی فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز برای مطالعه عمل رسپتورهای متصل به پروتئین G استفاده می‌شود. فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز توسط آگونیستهای رسپتورآن با توجه به اتصال به قسمت تحریکی (Gs) و یا قسمت مهاری (Gi) پروتئین G ـ بطور مثبت و یا منفی ـ کنترل می‌شود(٤). تعدادی از این رسپتورها از جمله بتا ـ آدرنرژیک و پروتئین کموتاکسیک به قسمت Gi متصل می‌شوند و فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز را مهار می‌کنند(٥و ٦).

این مقاله در پنجمین کنگره ایمیونولوژی و آلرژی ایران ارائه شده است، دانشگاه تربیت مدرس، اردیبهشت ۱۳۷۹. همچنین این پژوهش تحت حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی بابل انجام شده است.

I) دانشیار گروه بیوفیزیک و بیوشیمی، دانشکده پزشکی، خیابان گنج‌افروز، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی بابل، بابل(*مولف مسؤول)
II) پزشک عمومی

www.SID.ir

Archive of SID

اگر چه عمل پروتئین G در پاسخ به فاکتورهای کموتاکسیک بخوبی معین شده است اما مکانیسم عمل آن هنوز ناشناخته است. هدف این مطالعه اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز جهت بررسی عمل پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ است.

روش بررسی

حیوان آزمایشگاهی ـ موشهای آزمایشگاهی با وزن ۲۴۰-۲۲۰ گرم و سن ۸-۶ هفته در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی حیوانات آزمایشگاهی استفاده شده سالم و فاقد هرگونه علائم بیماری بودند و تحت بیهوشی با استفاده از اتر مورد استفاده قرار گرفتند.

موشهای آزمایشگاهی در گروههای ده‌تایی در قفسه‌های جداگانه نگهداری گردیدند و با استفاده از آب و غذای استاندارد تغذیه شدند. حیوانات آزمایشگاهی دردرجه حرارت $23^{\circ}c$-۱۹ و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی پرورش داده شدند.

مواد شیمیایی ـ GTP, NaF, GppNHP, KCL, MgCL2, CaCL2, NaOH, NADPH, NADP, ATP, cAM، آسپیراز، اتر، لوپتین و فنیل متیل سولفونیل فلورایداز شرکت سیگما تهیه شدند. سایر ترکیبات شیمیایی از شرکت مرک تهیه شد.

روش آزمایش ـ در هر آزمایش تعداد ۱۰ عدد موش آزمایشگاهی از طریق قطع نخاعی کشته شدند، سپس بافت قلب موشهای آزمایشگاهی جدا شد و توزین گردید. ۱ گرم از بافت قلب موشهای آزمایشگاهی در بافر سرد حاوی (۰/۳ مولار سوکروز، ۰/۱ EDTA و ۵ مولار Tris-HCL و PH=۷/۲) قرار داده شد. در هر آزمایش بخشی از بافت قلب (۰/۵-۰/۲ گرم)به بافر فوق در یک لوله آزمایش انتقال داده شد. محلول حاصل از فیلتر عبور داده شد و سپس بمدت ۱۰ دقیقه تحت سانتریفوژ (۱۰۰۰۰g) قرار گرفت.

سلولهایی که در حضور پروتئین کموتاکسیک بودند تا غلظت 2×10^{8} سلول در میلی‌لیتر در ۴۰mmol در بافر Tris-HCL، PH=۷/۲ و حاوی ۱۰µg/ml لوپتین و آپوپتین، ۰/۲ میلی‌مول فنیل متی سولفونیل فلورایید، ۰/۰۵ میلی‌مول پفابلوک و ۱mmol میلی EDTA قرار داده شدند. سلولهای تهیه شده در ظرف نیتروژن تحت فشار ۳۰۰ psi و در درمای $5^{\circ}c$ بمدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد.

سپس سلولهای لیز شده بمدت ۱۵ دقیقه در دمای $5^{\circ}c$ تحت سانتریفوژ (۱۰۰۰۰g) قرار گرفت. پس از آن لایه رویی محلول (supernatate) بدست آمده بمدت ۳۰ دقیقه تحت سانتریفوژ (۴۵۰۰۰g) قرار گرفت. سپس محلول حاصل تا زمان انجام آزمایشهای بعدی $-70^{\circ}c$ ذخیره شد. فعالیت آنزیم در غشاهای تهیه شده از سلولها در فقدان و همچنین د رحضور غلظتهای مختلف پروتئین (۱۰-۰/۱µmol) که با فورسکولین تحریک شده بودند اندازه‌گیری شد.

روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز ـ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز با تغییرات جزئی براساس روش Wiegn انجام شد(۷). بهمین منظور مقدار µl ۱۰ از آب مقطر، NaF ۰/۱mmol، ۰/۰۰۱mmol GppNHP و ۰/۰۱mmol فورسکولین بهر یک از لوله‌های آزمایش اضافه در دمای $4^{\circ}c$ ذخیره گردید. سپس ۵۰µl از مخلوط واکنش (Tris-Hco$_3$ ۵۰mmol ، PH =۷/۲، KCL ۳۰mmol، MgCL2 ۵mmol، ۳۰mmol فسفوانول پیرووات، ATP ۴mmol، GTP۴mmol، ۵mmol دی‌تریتول، ۵٪ البومین سرم گاوی و ۲mg/ml پیرووات‌کیناز) به لوله آزمایش مرحله اضافه گردید. پس از آن ۵۰µl از سوسپانسیون غشاء (۹-۶۰ µg پروتئین) به لوله آزمایش محله قبل اضافه گردید و بمدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری $37^{\circ}c$ درجه قرار داده شد. پس از ۲۰ دقیقه با افزودن ۱۰۰µl میکرولیتر از محلول NaOH (۵۰mmol) واکنش حاصل متوقف گردید. مخلوط بدست آمده بمدت ۱۰ دقیقه و در دمای $100^{\circ}c$ حرارت داده شد. سپس یک حجم (۵۰µl) از مخلوط واکنش مرحله قبل به ۲۰۰µl از مخلوط حاوی ۱۰۰ml ۰/۱ مولار Tris-HCL۰/۱، مولار، PH=۷/۲، MgCL2 ۸mmol، ۰/۳mmol میلی‌مول CaCL2، ۰/۰۳IU/ml نوکلئوتیدازو ۰/۳IU/ml آسپیرازو ۰/۲mg آدنوزین دآمیناز اضافه شد. واکنش حاصل ابتدا بمدت ۲۰

www.SID.ir

Archive of SID

دقیقه در دمای ۳۷° c، سپس بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰° c قرار گرفت و در نهایت متوقف شد و سپس یک حجم (۵۰۰µl) از مخلوط cAMP(حاوی ٦٠mmol ایمیدازول – HCL، PH=۷/۲، ۰/۸mmol MgCL2، EGTA ۲mmol، ۰/۰۰۵٪ سرم آلبومین گاوی، ۲mmol فسفات آلی، ۰/۱mmol گلیکوژن، ۵µmol گلوکز ۱ و ٦ دی‌فسفاتو ۰/۲mmol NADP، ۰/۰۲IU/ml واحد فسفودی استراز، ۲۰µmol/ml گلوکز ٦ فسفات دهیدروژناز، ۵۰µg/ml فسفوگلوکو موتاز و ۱۰µg/ml گلیکوژن فسفریلاز) به لوله آزمایش حاوی واکنش مرحله قبل اضافه گردید. محلول فوق ۲۰ دقیقه در درمای ۳۷ درجه قرار گرفت و سپس ۵۰۰µl از بافر ۲-آمینو-۲-متیل-۱-پروپانل (۱۰۰mmol و PH=۷/۲) در لوله آزمایش قبلی به مخلوط واکنش اضافه گردید و غلظت نهایی NADPH بروش فلورومتری اندازه‌گیری شد. یک واحد آنزیمی براساس مقدار کاتالیز ، ۱µmol از cAMP در دقیقه در دمای ۳۷° c محاسبه شد. فعالیت ویژه آنزیمی بر حسب میلی‌گرم پروتئین بافت مغز محاسبه گردید و غلظت پروتئین هر یک از نمونه‌ها با استفاده از روش لوری (Lowry) محاسبه شد(۸).

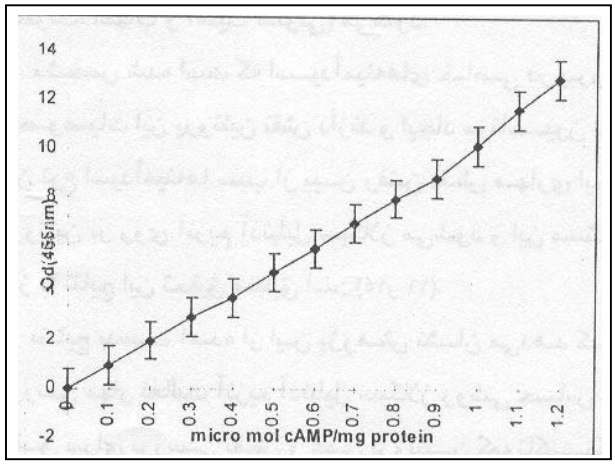
نتایج

منحنی کالیبراسیون فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز غشاء با استفاده از غلظتهای مختلف پیش ماده (substrate) رسم شد. منحنی کالیبراسیون بدست آمده در این پژوهش درمحدوده غلظت ۱۲-۰ میکرومول cAMP در میلی‌گرم پروتئین بافت قلب بصورت خطی بود. نمونه منحنی کالیبراسییون بدست آمده در نمودار شماره ۱، نشان داده شده است.

جدول شماره ۱- مقایسه فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز در شرایط کنترل و انکوبه شده با پروتئین کموتاکسیک

نمونه	فعالیت آدنیلیل سیکلاز (میکرومول cAMP/میگرم پروتئین/دقیقه)
کنترل	٦/۸۳ ± ۰/٤٥
در حضور (۱۰µmol) فورسکولین	۱۰/۵۲ ± ۱/۳۳
در حضور (۱۰µmol) فورسکولین و (۲µmol) کموتاکسیک	۸/۷۲ ± ۰/۹٤
در حضور (۱۰µmol) فورسکولین و (٤µmol) کموتاکسیک	۷/۱۱ ± ۰/۸۵
در حضور (۱۰µmol) فورسکولین و (٦µmol) کموتاکسیک	۵/۳۸ ± ۰/۷۲
در حضور (۱۰µmol) فورسکولین و (۸µmol) کموتاکسیک	۳/۵۹ ± ۰/٦۵
در حضور (۱۰µmol) فورسکولین و (۱۰µmol) کموتاکسیک	۲/۱۱ ± ۰/۱۵

هر یک از مقادیر نشان دهنده میزان متوسط اندازه‌گیری حاصل از شش بار انجام آزمایش است.



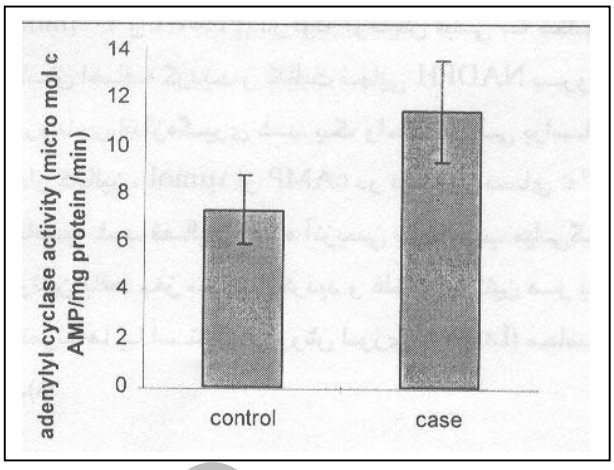
نمودار شماره ۱- منحنی کالیبراسیون اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز با استفاده از غلظتهای مختلف سوبسترا. منحنی کالیبراسیون در محدوده غلظت ۱۲-۰ میکرومول در لیتر پیش ماده بصورت خطی است. هر نقطه نشان دهنده مقدار متوسط اندازه‌گیری حاصل از شش بار انجام آزمایش است.

مقایسه فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز در گروه کنترل و در گروه آزمون انکوبه شده با غلظتهای مختلف پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز در گروه کنترل در مقایسه با گروه آزمون بالاتر بود. فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز در حضور فورسکولین نسبت به گروه کنترل ٥٤٪ افزایش یافته بود(نمودار شماره ۲).

Archive of SID
www.SID.ir

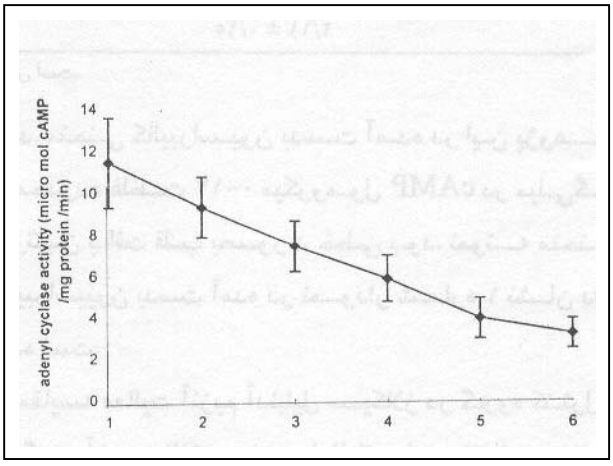
Archive of SID



نمودار شماره ۱- اثر فعال سازی فورسکولین بر روی آنزیم آدنیلیل سیکلاز هرستون نشان دهنده مقدار متوسط اندازه‌گیری حاصل از شش بار انجام آزمایش است.

اثر پروتئین کموتاکسیک در مهار فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است.

فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز در حضور پروتئین کموتاکسیک تا ۷۹/۹٪ نسبت به گروه کنترل کاهش یافت.



نمودار شماره ۳- فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز در حضور فورسکولین و پروتئین کموتاکسیک. ۱)فورسکولین(۱۰μmol)، ۲)فورسکولین(۱۰μmol) + پروتئین کموتاکسیک(۲μmol)، ۳)فورسکولین(۱۰μmol) + پروتئین کموتاکسیک(٤μmol)، ٤)فورسکولین(۱۰μmol) + پروتئین کموتاکسیک(٦μmol)، ۲)فورسکولین(۱۰μmol) + پروتئین کموتاکسیک(۸μmol)، ٥)فورسکولین(۱۰μmol) + پروتئین کموتاکسیک(۱۰μmol)،

بحث

اصول اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز براساس مقدار تبدیل مولکول ATP به مولکول cAMP است. تغییرات مقدار cAMP در واحد زمان برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز قابل استفاده است.

مهار فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز در این پژوهش از طریق اندازه‌گیری توانایی مهار پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ بواسطه فعالیت القاء شده آدنیلیل سیکلاز با فورسکولین اندازه‌گیری شد. فورسکولین آنزیم آدنیلیل سیکلاز را فعال می‌نماید(نمودار شماره ۲).

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ آنزیم آدنیلیل سیکلاز را مهار می‌کند(نمودار شماره ۳).

نتایج بدست آمده از این تحقیق با نتایج ارایه شده توسط سایر محققان منطبق و قابل مقایسه است(۱۱-۹). در یک مطالعه نشان داده شده است که پروتئین کموتاکسیک مونوسیت نیز فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز را کاهش می‌دهد و این خود تائید کننده یافته‌های این پژوهش می‌باشد(۱۳و ۱٤). همچنین در مطالعه مشابه دیگری مشخص شده است که پروتئین کموتاکسیک مونوسیت زمانیکه به گیرنده خود متصل می‌گردد سبب بروز بیماریهای مختلف (عفونت، التهاب و آسیب سلولی) می‌شود.

مشخص شده است که اسیدآمینه‌های خاصی در بروز خصوصیات این پروتئین نقش دارند و ایجاد موتاسیون در این نوع اسیدآمینه‌ها نقش مهاری این پروتئین را بر روی آنزیم آدنیلیل سیکلاز از بین می‌رود و این مسئله نیز با نتایج این تحقیق منطبق است(۱٥و ۱٦).

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که بررسی مهار فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز یک روش حساس و دقیق برای بررسی نقش و عمل پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ در سلولها است.

این مطالعه اولین پژوهش در زمینه بررسی مهار فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز در حضور پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ است و نتایج بدست آمده با نظریه اتصال گیرنده

www.SID.ir

Archive of SID

این پروتئین به قسمت مهاری (Gi) پروتئین G منطبق است(۲). اگر چه مهار فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز مشخص شده است اما اثرات مهاری Gi بخوبی شناخته نشده است. نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز توسط غلظتهای مختلف پروتئین کموتاکسیک مهار می‌شود که می‌تواند تایید کننده اتصال این پروتئین به قسمت Gi پروتئین G باشد و برای روشن شدن این مکانیسم عمل در آینده مطالعه بیشتری مورد نیاز است.

منابع

1- Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M. G. et al., Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. Annu. Rev. Biochem 1991, 60: 653-688.

2- Cutler, L.S. and Christian, C.P. Cytochemocal localization of adenylate cyclase. J. Histochem. Cytochem. 1980, 28(1): 62-65.

3- Roef, L., Witters, E., Gadeyne, J., et al., Analysis of 3, 5-cAMP and adenylyl cyclase activity in higher plants using polyclonal chicken egg yolk antibodies. Anal Biochem, 1996, 233: 188-196.

4- Probst, W.C.Snyder,L.A.Schuster,D.I. et al., Review article, sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. DNA-CellBiology, 1992, 11(1): 1-20.

5- Amatruda III,T.T. Gerard,C. et al., Specific interactions of chemoattractant factor receptors with G-proteins. J.biolog.chem. 1993, 268(14): 10139-10144.

6- Myers,S.J. Wong, L.M. and Charo, I.F. signal transduction andligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. J.biolog.chem. 1995, 270(11):5786-5792.

7- Wiegn,P. Dutton, J. and Lurie, K.G. An enzymatic fluorometric assay for adenylyl cyclase activity. Analy biochem, 1993, 208: 217-222.

8- Lowry, O.H. Rosebrough, N. Farr.A.L. Protein measurement with the folin phenol reagent.J.Biol.Chem, 1951, 193: 256-257.

9- Paavola,CD. Hemmerich, S.Grunberger, D. et al., Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B.J.Biol.Chem. 1992, 273(50): 33157-33165.

10- Franci,C.Wong,LM.Van-Damme,J.et al. Monocyte chemoattractant protein-3,but not monocyte chemoattractant protein-2, is a functional ligand of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor.J.Immunol 1995.154(12):6511-6517.

11-Monteclaro, FS.Charo, IF. The amino-terminal domain of CCR2 in both necessary and sufficient for high affinity-tethered ligand.J.Bilo.Chem.1997.272(37):23186-23190.

12-Shyamala, V. Khoja, H. Moghadam, M. Inhibition of adenylyl cyclase by alpha chemokines IL-8 and GRO-alpha in chinese hamster ovary cells expressing R1 and R2 receptors. J. Interferon Cytokine. Res. 18(4): 1998, 235-239.

13- Franci,C. Wong,LM. Van Damme,J. Monocyte chemoattractant protein-3, but not monocyte chemoattractant protein-2, is a functional ligand of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor. J. Immunol. 1995. 154(12): 6511-6517.

14- Myers, SJ. Wong, LM. Charo, IF., Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. J. Biol. Chem. 1995, 270(11): 5786-5792.

15- Preobrazhensky, AA. Dragan, S. Kawano, T. et al., Monocyte chemotatctic protein-1 receptor CCR2B is a glycoprotein that has tyrosine sulfation in a conserved extracellular n-terminal region. J. Immunol. 2000, 165(9): 5295-5303.

16- Tsou, CL., Gladue, RP. Carroll, LA. Et al., Identification of C-C chemokine receptor 1 (CCR1) as the monocyte hemofiltrate C-C chemokine (HCC)-1 receptor. J. Exp. Med. 1998, 188(30: 603-608.

www.SID.ir