اندازه گیری فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز و اثرات عمل فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون بر فعالیت آن در مغز موش آزمایشگاهی

سهراب حلالخور[1]،دردی قوجق[2]، رامین شیخ پور[3]
1- مربی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
2- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
3- پزشک عمومی

یافته / دوره دهم / شماره 3 / پاییز 87 / مسلسل 37

چکیده

دریافت مقاله: 86/12/28، ***پذیرش مقاله***: 87/4/11

Ø مقدمه: گزارش های قبلی نشان می‌دهد که مکانیزم فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون در تنظیم فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز دخالت دارند. در این پژوهش هدف بررسی تغییرات فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز از طریق مکانیسم فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون است.

Ø مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر بر روی 25 موش آزمایشگاهی انجام شد. مغز موشها را بیرون آورده و هموژنهٔ مغز تهیه شد. جدا سازی آنزیم سیالیل ترانسفراز مغز موش‌آزمایشگاهی در کروماتوگرافی ستونی سفادکس G50- انجام شد. فعالیت آنزیم در حضور پروتئین کیناز c، فسفاتاز، اکادئیک اسید و فوربل اندازه گیری شد. نتایج توسط نرم‌افزار آماری SPSS آنالیز شد.

Ø یافته‌ها: مقایسهٔ فعالیت سیالیل ترانسفراز در حضور پروتئین‌کیناز c واکادئیک اسید با گروه کنترل نشان داد که سطح فعالیت سیالیل ترانسفراز نسبت به گروه‌کنترل پایین تر و از نظر آماری معنی دار بود ($p<0/05$). مقایسهٔ فعالیت سیالیل ترانسفراز در حضور پروتئین فسفاتاز و فوربل نشان داد که در گروه کنترل پایین‌تر و نسبت به حضور پروتئین کیناز بالاتر بود و از نظر آماری معنی دار بود.

Ø بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که واکنش سیالیل ترانسفراز مغز موش آزمایشگاهی با پروتئین‌کیناز c فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهد و این نتایج با یافته‌های سایر محققان منطبق است. ما در یافتیم که استفاده از سیالیل ترانسفراز همراه با پروتئین کیناز c باعث کاهش‌فعالیت آن می‌شود و پروتئین فسفاتاز فعالیت آن را افزایش می دهد. در نهایت فسفریلاسیون سبب کاهش فعلیت آنزیم سیالیل ترانسفراز و دفسفرسیلاسیون سبب افزایش فعالیت آن می گردد.

Ø کلید واژه‌ها: سیالیل ترانسفراز، فسفریلاسیون، دفسفریلاسیون

آدرس مکاتبه: بابل، خیابان گنج افروز، دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی ، بخش بیوشیمی وبیوفیزیک
پست الکترونیک: sohrabhalalkhor@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سیالیک اسید یک قند کمپکس است و در سلولهای حیوانی کارکرد وسیعی دارد (1). جهت سنتز الیگوساکاریدهای سیالیله، مقدار زیادی سیالیل ترانسفراز لازم است (2).

این آنزیم می‌تواند بعد از شکسته شدن پروتئولتیک در سرم آزاد شود (3). نیاز به سنجش آسان و حساس‌سیالیل ترانسفراز بطور دائم در حال افزایش است. فعالیت آنزیماتیک در سرم و سلولهای حیوانات مختلف بستگی به شرایط بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی محیط دارد (4).

سطح فعالیت سیالیل ترانسفراز می‌تواند شاخص مهمی برای بیماریهای خاص باشد. ترانسفورماسیون انکوژنیک التهاب و افزایش کلسترول برخی نمونه‌هایی هستند که تغییر فعالیت سیالیل ترانسفراز در سلولها یا سرم راسبب می‌شود (5).

اغلب سنجشها برای فعالیت سیالیل ترانسفراز نشان‌دار با رادیواکتیو را به عنوان سوبسترای دهنده استفاده می‌کنند. سنجش‌فلورومتریک بعنوان سوبسترای دهنده، بسیار حساس ولی وقت‌گیر است. در گذشته یک نوع از سنجش سیالیل ترانسفراز بر اساس‌اختصاصی بودن لکتین ها جهت تفکیک بین آلفا 2 و3 - سیالیل ترانسفراز، آلفا 2و6-سیالیل ترانسفراز استوار بود. برای گلیکوزیل ترانسفرازهای دیگر، روش ایمونواسی‌ایجاد شد (6).

خانوادهٔ سیالیل ترانسفراز شامل 12-10 آنزیم است که سیالیک اسید را ازسیالیک اسید - CMP به جایگاههای ترمینال روی زنجیره‌های الیگوساکاریدپروتوئینها و گلیکولیپیدها منتقل می‌کند(7، 8).

سیالیک اسیدها شاخص کلیدی بسیاری‌از ساختارها کربوهیدراتی هستند که در وقایع شناسایی بیولوژیکی مثل اتصال ویروس آنفلوانزا به سلولهای میزبان در طی عفونت، کلیرانس سیالوگلیکوپروتئین‌هااز جریان خون، چسبندگی سلول به سلول طی تکامل سیستم عصبی با واسطهٔ N-CAM و چسبندگی مشترک انتخابی لکوسیت‌ها به سلولهای اندوتلیال شرکت دارند. هر چند سیالیل ترانسفرازها از یک سوبسترای دهنده مشترک استفاده می‌کنند ولی برای توالی سوبسترای پذیرندهٔ الیگوساکارید و اتصال آنومریکی که بین سیالیک‌اسید و قندی که به آن متصل می‌شود، تشکیل می‌شود، اختصاصی هستند (9، 10، 11).

آنزیم سیالیل ترانسفراز اولین بار 10 سال قبل از کبد موش آزمایشگاهی خالص شد. ولی این تلخیص فقط مقادیر کمی از پروتئین را فراهم کرد (12، 13، 14).

تلاشهای بسیار جهت بدست آوردن اطلاعات توالی آمینو اسیدی یا جهت برانگیختن یک آنتی‌بادی علیه این آنزیم با استفاده از روش‌های مرسوم، شکست خورد. علت آن اندک بودن مقادیر پروتئین بدست آمده بود(15، 16). هدف از این پژوهش بررسی تغییرات فعالیت‌آنزیم سیالیل ترانسفراز در حضور ترکیبات فسفریله و دفسفریله است.

مواد و روشها

نوع مطالعهٔ انجام شده تجربی است. تعداد 25 سر موش آزمایشگاهی پرورش داده شدند. تعداد 7 عدد از این موش‌ها تلف شدند. تمام آزمایشات بر روی حیوان آزمایشگاهی تحت شرایط بیهوشی با اتر بود.

مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه عبارت بودند از: سیتیدین دی فسفات، کلرید سدیم، تریتون X-100، سیالیل ترانسفراز، 2- مرکاپتواتانول، لاکتوز، گلیسرول، فسفوتنگستیک اسید، تری کلرواستیک اسید، گالاکتوز، پروتئین کیناز C، اکادئیک اسید و فوربل که همگی از نمایندگی شرکت‌های شیمیایی تهیه شد. موش آزمایشگاهی با اتر بیهوش شدند، سپس با قطع گردن نخاع کشته شدند و به دنبال آن شکافتن استخوان‌های جمجمه، بافت مغز از داخل

Archive of SID

www.SID.ir

جمجمه بیرون آورده شد. مغز موشها ابتدا توسط هاون چینی همژنه شد، بدنبال آن درحجم 5 میلی‌لیتر از سوکروز 5% مولار بخوبی هم زده و هموژنهٔ مغز موش تهیه شد.

هموژنهٔ مغز موش آزمایشگاهی در کروماتوگرافی ستونی سفادکس G-50 انجام‌شد. حجم ستون 50 میلی‌لیتر و سرعت جریان حدود یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. بافر شستشوی آن سیتیدین دی فسفات و گلیسرول 30% و سدیم کلراید 200 میلی‌مول و2% ترایتون X-100 بود. نمونه از بالای ستون اضافه شد و فراکشن‌های خروجی از ستون، در حجم‌های دو میلی لیتری تهیه شد. این فراکشن‌ها حاوی سیالیل ترانسفرازبودند که به خوبی تغلیظ شده و جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز آماده‌بودند.

محلول اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز با مخلوط‌کردن 50 میکرولیتر2-مرکاپتو اتانول 0/25 مولار 30 میکرولیتر لاکتوز 0/4 مولار، 40 میکرولیتر سدیم‌کلراید 30%، 10 میکرولیتر گلیسرول 0/2%، 30 میکرولیتر پروتئین کیناز، 20 میکرولیتر اکادئیک اسید 0/2 مولار، 20 میکرولیتر پروتئین فسفاتاز 20 میکرولیترفوربل 0/2 مولار و 60 میکرولیتر ترایتون X100- در آب مقطر در لوله‌های آزمایش تهیه شد.

نمونه‌های حاوی 50 میکروگرم هموژنه در حجم حدود 100 میکرولیتر با 200 میکرولیتر از محلول اندازه‌گیری تهیه شده، مخلوط شد و سپس حجم تا 500 میکرولیتر رسانده شد با استفاده از آب مقطر.

نمونه‌ها به دو سری لولهٔ آزمایش‌تقسیم شدند. نمونه‌های کنترل آنهایی بودند که پروتئین کیناز C، اکادئیک اسید و فوربل به آنها افزوده نشد. پس از انکوباسیون در دمای 37 درجهٔ سانتیگراد به مدت 20 دقیقه، واکنش آنزیمی با افزودن 500 میکرولیتر از فسفوتنگستیک اسید متوقف شد. سپس به خوبی مخلوط شد و به مدت 20 دقیقه در ظرف یخ قرار داده شد. بعد از اتمام 20دقیقه، به مدت 15 دقیقه در دور 3000 سانتریفوژ شد. محلول رویی جمع‌آوری و با محلول 20% تری کلرو استیک شسته شد. فعالیت آنزیم برحسب پیکومول گالاکتوز دردقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

مقادیر محاسبه شده بر حسب Mean ± SD ارائه شده است و برای مقایسهٔ نتایج گروههاو اثر ترکیبات از روش آماری S tudent T-Test استفاده شد و مقدارP<0/05 بود.

یافته ها

در جدول 1 فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز در حضور ترکیبات مختلف نشان داده شده است. جداسازی سیالیل ترانسفراز که توسط کروماتوگرافی سفادکس انجام شد.

جدول شماره 1- فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز در حضور فاکتورهای مختلف

فاکتور مورد نظر	فعالیت آنزیم (میکرول در میگرم در میلی لیتر)
کنترل	81/2 ± 6/3
پروتئین کیناز	29/7 ± 4/2
اکادئیک اسید	32/6 ± 5/1
پروتئین فسفاتاز	72/8 ± 7/3
فوربل	55/9 ± 6/8

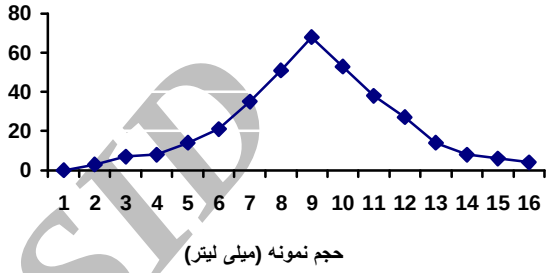
فعالیت آنزیم برحسب میکرومول در میلی گرم در دقیقه می‌باشد و مقادیر برحسب **Mean ± SD** ارایه شده است .

در نمودار 1 نشان داده شده است. همانگونکه که در این نمودار نشان داده شده است مناسبترین حجم برای جدا سازی آنزیم در حجم بین 17 الی 25 میلی لیتر است. منحنی استاندارد اندازه گیری فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز درنمودار 2 نشان داده شده است. فعالیت آنزیم در 20 دقیقه و40 دقیق اندازه گیری شد. مقایسه فعالیت سیالیل ترانسفراز بین گروه دارای پروتئین کیناز C واکادئیک اسید با گروه کنترل (فاقد پروتئین کیناز C و اکادئیک اسید) نشان داده شده‌است. سطح فعالیت سیالیل ترانسفراز در گروه کنترل بالاتر و از نظرآماری

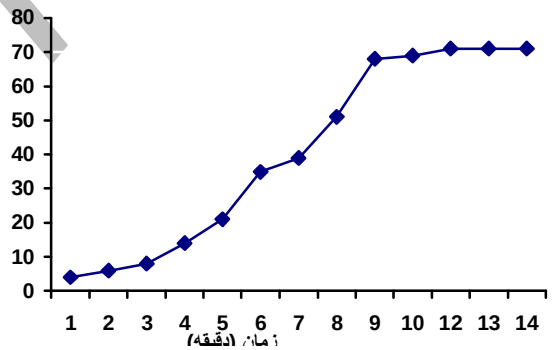
Archive of SID

www.SID.ir

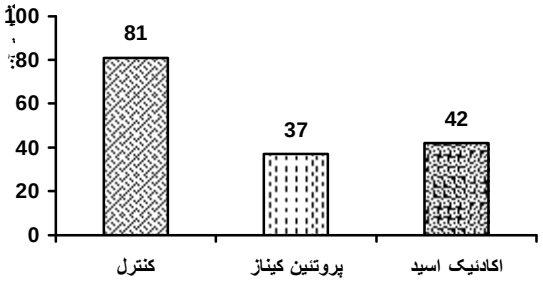
معنی دار بود ($p<0/05$). مقایسه فعالیت سیالیل ترانسفراز بین گروه دارای پروتئین‌فسفاتاز و فوربل با گروه کنترل نشان داده شده است (نمودار 4). سطح فعالیت آنزیم سیالیل‌ترانسفراز در گروه کنترل پایین‌تر و از نظر آماری معنی داربود ($p<0/05$). (نمودار 3) (مقادیر برحسب Mean ± SD ارایه شده است).



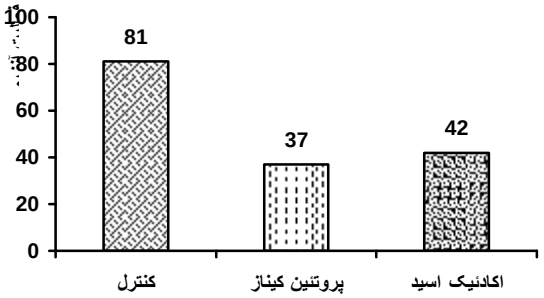
نمودار شماره 1- نمودار جداسازی سیالیل ترانسفراز توسط کروماتوگرافی سفادکس



نمودار شماره 2- نمودار فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز



نمودار شماره 3- نمودار اثر پروتئین کیناز C و اکادئیک‌اسید روی فعالیت سیالیل ترانسفراز



نمودار شماره 4- نمودار اثر پروتئین فسفاتاز و فوربل روی فعالیت سیالیل ترانسفراز

بحث و نتیجه‌گیری

عمل فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون در تنظیم فعالیت آنزیم ها بسیار با اهمیت است. همچنین این مکانیسم درکنترل متابولیسم سلولی و اثر هورمونها نقش مهمی می تواند داشته باشد. در این رابطه شناخت عمل آنزیم ها در حضور عوامل فسفریله و دفسفریله کننده کاربرد زیادی دارد. برای این منظور در پژوهش حاضر سیالیل ترانسفراز مغز موش جداسازی شد. همانگونه که در نمودار 1 نشان داده شده است، جداسازی در حجم 25-17 میلی‌لیتر شروع شده است و نشان می‌دهد که جداسازی خوبی با کروماتوگرافی‌سفادکس انجام شده است. تکرار پذیری نتایج نیز بسیار مناسب بود. در نمودار 2 نشان داده شده است که منحنی استاندارد اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تا حدود اندازه‌گیری فعالیت آنزیم به صورت خطی است و در فاصله زمانی 20 تا 40 دقیقه فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز مغز موش به طور دقیق بدست آمد، همچنین نتایج تکرار پذیر بود. در تحقیقی که مشابه تحقیق حاضر بود، سیالیل ترانسفرازهای مغز موش به صورت هموژنه خالص شد و در زمانهای انکوباسیون مختلف فعالیت این آنزیم با افزودن پروتئین کیناز C اندازه‌گیری شد. افزودن پروتئین کیناز C به سیالیل‌ترانسفراز، فعالیتهای این آنزیم را بصورت وابسته به زمان کاهش می‌دهد (5، 6). آنالیز آمینواسیدهای نشان‌دار با P-32

Archive of SID

www.SID.ir

مشخص کرد که جایگاه عمدهٔ فسفریلاسیون آمینواسیدهای سرین و ترئونین هستند. بهبودی نسبی فعالیت آنزیم نیز از طریق افزودن پروتئین فسفاتاز مغز موش آزمایشگاهی به سیالیل ترانسفراز فسفریله بدست آمده بود. بنابراین نتیجه گرفته شد که فعالیتهای سیالیل ترانسفراز ازطریق پروتئین کنیاز C و پروتئین فسفاتاز قابل تغییر است و این ممکن است یک‌مکانیسم تنظیمی برای بیوسنتز گانگلیوزیدها باشد (6، 7). در پژوهش دیگری سیالیل ترانسفراز مغز موش آزمایشگاهی تلخیص شده بود.توالی‌های بسیار کوچک پپتیدی که از آنزیم خالص مشتق شدند، دو توالی‌آمینواسیدی را بصورت پروتئینهای 14-3-3 آشکار کردند (8، 9). در یکی دیگر از تحقیقات که در آن تنظیم فعالیت سالیل ترانسفراز و ترانسفرازGal-NAC از طریق فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون مقایسه شده بود، مشخص شدکه انکوباسیون گانگلیوزیدهای حاوی سیالیل ترانسفراز با اکادئیک اسید، فعالیت سیالیل ترانسفراز را به میزان 45% سلولهای کنترل مهار می‌کند. این فرآیند فسفریلاسیون سیالیل ترانسفراز را نشان می‌داد که ناشی از مهار فسفاتاز اختصاصی سرین/ ترئونین بود. همچنین با سرعت مشابهی، این آنزیم توسط‌پروکنیاز C غیرفعال شد (15، 16). در این تحقیق تنظیم فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز را توسط مکانیسم فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون بررسی شد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که واکنش سیالیل ترانسفراز مغز موش با پروتئین کیناز C فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهد. این یافته معین می کند که فعایت آنزیم سیالیل ترانسفراز با عمل فسفریلاسیون مهار می گردد و این نتایج با یافته‌های سایر محققان منطبق و قابل مقایسه است(1، 3، 5، 7).

فعالیت آنزیم از طریق واکنش سیالیل ترانسفراز فسفریله با فسفاتاز انجام پذیر است. انکوباسیون با اکادئیک اسید، فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز را تاحدود 30% نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهد. این یافته مشخص می‌کند که فسفریلاسیون سیالیل ترانسفراز ممکن است به خاطر مهار جایگاههای سرین و یا ترئونین باشد. مشابه این غیرفعال‌سازی توسط تحریک پروتئین کیناز استرفوربل‌نیز بدست آمد. این یافته نیز با نتایج سایر محققان منطبق است (8، 11، 12).

در نمودار 3 نشان داده شده است که فعالیت آنزیم در حضور پروتئین کیناز C واکادئیک اسید کاهش می‌یابد. در نمودار 4 مقایسه فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز با فسفاتاز و استرفوربل نشان داده شده است. در این شرایط فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز نسبت به حضور پروتئین کیناز بالاتر است. این یافته ها نشان می دهند که عمل فسفریلاسیون فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز را مهار می نماید وعمل دفسفزیلاسیون فعالیت این آنزیم را افزایش می دهد.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که عمل فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون بر روی فعالیت‌آنزیم سیالیل ترانسفراز مغز موش مؤثراست.

تقدیر و تشکر

این پژوهش حاصل از پایان نامه شماره 659 دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل است و بدین وسیله از حمایت های بی دریغ معاونت محترم پژوهشی دانشکده پزشکی تشکر می شود.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Wen D. Primary Structure of Gal-β1, 3(4) GLCNAcα2, 3-Sialyltransferase Determined by Mass Spectrometry Sequence Analysis and Molecular Cloning. The Journal of Biological Chemisty. 1992; 267(29): 21011-21019
2. Barker R, Oslen K, Shaper J, Hill RL. Agarose-Derivatives of Uridine Diphosphate and N-Acetyl glucosamine for the Purification of a Galactosyl transferase. The Journal of Biological Chemistry.. 1972; 247(22): 7135-7147
3. Wlasichuk K, Kashem M, Nikrad P, Bird P, Jiang C,Venot A. Ditermination of the Specifities of Rat liver Gal (β1-4) GLcNAcα2, 6- Sialyltransferase and Gal (β1-3/4) Glc NAcα2,3- Sialyl transferase Using Synthetic Modified Acceptors. The Journal of Biological Chemistry. 1993; 268(19): 13971-13977
4. Weinstein J, Souza-e- Silva U, and Paulson J. Purification of a Galβ1¬≡4 GlcNAcα2 ¬≡6 Sialyl transferase and a Gal β1¬≡3(4) GlcNAcα2,3Sialyl transferase to Homogeneity from Rat liver. The Journal of Biological Chemistry. 1982; 257(22): 13835- 13844
5. Laroy W, Maras M, Fiers W, Contreras R. A Radioactive Assayfor Sialyl transferase Activity Using 96-Well Multiscreen Filtration Plates. Analytical Biochemistry. 1997; 249(1): 108-111
6. Sgroi D, Koretzky G, Stamenkovic I. Regulation of CD45engagement by the B-cell receptor CD22.Proc. Natl. A cad. Sci. U S A. 1995; 92(9): 4026-4030
7. Gu X, Preuss U, Gu T, Yu R. Regulation of sialyl transferaseactivities by phosphorylation and dephosphorylation.J. Neuro Chem. 1995; 64(5): 2295-2302
8. Gao L, Gu X, Yu D, Yu R, Zeng G. Association of a 14-3-3protein with CMP-Neu Ac: GM 1 alpha 2,3- sialyl transferase Biochem.Biophys. Res. Commun. 1996; 224(1): 103-107
9. Yamamoto H, Kaneko Y, Rebbaa A, Bremer E, Moskal J. Alpha 2, 6- Sialyl transfcrase gene transfection into a human glioma cell line (U373 MG) results in decreased invasivity. J. Neuro. Chem. 1997; 68(6): 2566-2576
10. Bieberich E, Freischutz B, Liour S, Yu R. Regulation of ganglioside metabolism by phosphorylation and dephosphoryl. J.Neurochem. 1998; 71(3): 972-979
11. Vazquez T, Ouellet F, Sarhan F. Low temperature-stimulated phosphorylation regulates the binding of nuclear factors to theprometer of WCS 120, a cold- specific gene in wheat. Biochemistry.1998; 5(2): 134-151
12. Takazawa K, Go M, Endo T, Erneux C, Onaya T. I nosital 1, 4, 5- trisphosphate 3-kinase activity in FRTL- 5 cells: Regulation of the enzyme activity by TSH..J. Endocrinal 1995; 144(3): 527-532
13. Gu X, Preuss U, Gu T, Yu R. Regulation of sialyl transferaseactivities by phosphorylation and dephosphorylation. J. Neuro Chem. 1995; 64(5): 2295-2302

Archive of SID

www.SID.ir

14. Mohamed A, Huang W, Huang W, Venkatachalam K, and Wakil S. Isolation and characterization of a novel acetyl-CoA. CarboxylaseKinase from rat liver. J. Biol.Chem. 1994; 269(9): 6859-6865
15. Smith C, Newpart J. Coupling of mitosis to the completion ofS phase in xenopus occurs via modulation of the tyrosine kinase thatphosphorylates.Cell. 1992; 68(4): 787-797
16. Hatch GM, Tsukitani Y, Vance D. The protein phosphatase inhibitor, okadaic acid, inhibits phosphatidyl choline biosynthesis in isolated rathepatocytes. Biochim. Biophy. Acta. 1991; 1081(1): 25-32

Archive of SID

www.SID.ir