Archive of SID

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

دکتر اسفندیار حیدریان[1]*، دکتر بهرام حقیقی[2]

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 گلیسروليپیدها 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 برروی فعالیت آنزیم و چگونگی پاسخ‌های آن به برخی از عوامل از جمله $Mg^{2+}$، علت عدم نیازمندی آن به $Mg^{2+}$ و تاثیر ساختارشکن‌های 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 $L_a$(Lamellar) و $H_{II}$(Hexagonal) سوبسترای فسفاتیدات در حضور غلظت‌های مختلف تریتون X-100 بررسی شد. تاثیر زمان و اثر ساختارشکن‌های مذکور بر روند تبدیل فرم $L_a$ به $H_{II}$ فسفاتیدات بررسی شد. مقدار فرم $L_a$ به روش هضم فسفولیپیدی در حضور ساختارشکن ها 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 ساختارشکن‌های مذکور بود. روند تبدیل فرم $L_a$ به$H_{II}$ در محیط فاقد تریتون X-۱۰۰ نسبت به محیط حاوی تریتون X- ۱۰۰ 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 ساختارشکن‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید بعلت ابقاء فرم $L_a$ باعث افزایش فعالیت آنزیم می‌گردند. چون یون $Mg^{2+}$ باعث تسهیل ایجاد فرم $H_{II}$ سوبسترا می شود 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

E-mail: heidarian46@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

## مقدمه

آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز[1] (PAP, C 3.1.3.4) تبدیل اسید فسفاتیدیک به دی‌آسیل‌گلیسرول و فسفات معدنی ($P_i$) را کاتالیز می‌کند (۱). دی آسیل گلیسرول حاصل از این واکنش بعنوان پیش ساز در سنتز تری گلیسرید و سایر فسفولیپیدهای مرکب مثل فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱ و۲). 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 و۴). 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 ۵mM از یون $Mg^{2+}$ مهار می‌شود (۶ و۷). 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 و۷). 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 برروی آن انجام نگرفته است (۷). تحقیقات انجام گرفته برروی $PAP_{2b}$ حاکی از اثرات مهاری یونهای $Ca^{2+}$، $Mn^{2+}$، $Zn^{2+}$، آمین‌های آمفی فیلیک مثل پروپرانولول، کلرپرومازین، اسفنگوزین و دی‌پرامین می‌باشد (۷). در خصوص مکانیسم و یا چگونگی اثرات مهاری کاتیونهای مذکور هیچگونه تحقیقاتی صورت نگرفته است (۷). همچنین مشخص شده است که $PAP_{2b}$ جهت فعالیت نیازی به فسفولیپیدها ندارد و توسط دی آسیل گلیسرول 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 برروی 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 ساختارشکن‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید از دیدگاه سوبسترای آن می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده عبارت بودند از: اسید فسفاتیدیک (ملح دی سدیم)، دی‌تیوترایتول (DTT)، N-اتیل مالیمید (NEM)، لوپیتین، مهارکننده Soyabean tripsin، بنزآمیدین، هیدروکسیل آپاتیت، پپستاتین، هپارین سفارز، n- اکتیل گلوکوزید، سفاکریل $S_{300}$ (Sigma,USA)، $EDTA^2$، $EGTA^3$، 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 ۱۴عدد 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[4] دیده می‌شود که می‌تواند از نوع $L_a$ (Lammelar) 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 $4^{\circ}C$ به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰g 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 در۱۰۰ میلی‌لیتر پروپیلن گلیکول) وجود فسفاتیدات آزمایش می‌گردد تا بطور کلی صحت فاز $H_{II}$ در

1.Phosphatidate phosphohydrolase
2. Ethylene diamine tetra acetic acid
3. Ethylene bis (Oxyethylene nitrilo) tetra acetic acid
4. Aggregated

www.SID.ir

Archive of SID

آن اثبات گـردد. محلول رویی به دسـت آمـده نیـز بـه عنـوان سوبسترای امولسیونه فاز $L_a$ در نظر گرفته می‌شود (۹).

**د) بررسی رابطه زمـان و تغییـر فـاز $L_a$ بـه $H_{II}$ فسفاتیدات در بافر سنجش فعالیـت آنزیـم:** جهـت بررسی تغییر فاز $L_a$ به $H_{II}$ در امولسیون اسـید فـسفاتیدیک در بافر سنجش فعالیت آنزیم، پس از ایجاد غلظـت ۰/۳۵ mM از اسید فسفاتیدیک در بافر سنجش، تغییر جـذب نـوری در طـول موج ۳۵۶nm برای تشکیل $H_{II}$ در فواصل زمانی یـک دقیقـه قرائت و نتیجه به صورت نمودار زمـان در مقابـل جـذب نـوری رسم گردید (۹و۱۰).

**ه) بررسـی تمایـل آنـزیم $PAP_{2b}$ در مـصرف فرم‌های $L_a$ و $H_{II}$ فـسفاتیدات:** جهـت تهیـه فـرم$H_{II}$ سوبسترا هشت لوله آزمایش تمیز انتخاب و غلظـت ۰/۳۵mM از سوبسترا در محیط سـنجش فاقـد تریتـون X-100 و فاقـد آنزیم ایجاد گردید و برای تبدیل فرم $L_a$ سوبسترا بـه فـرم $H_{II}$ (Phase transition) در محـیط ایجـاد غلظـت ۱۰۰mM یون $Ca^{2+}$ گردید و به مدت ده دقیقه انکوبـه شـدند (۱۰). سپس رسوب$H_{II}$ مطابق بند ج جـدا گردیـد و بـا ۱۰ ml آب دوبار تقطیر بخوبی شسته شد و در حین شستشو با اسـتفاده از یـک میلـه شیـشه ای رسـوب کـاملاً خـرد شـده و دوبـاره سانتریفوژ گردید و این عمل حداقل ۵ بـار بـا آب دوبـار تقطیـر تکرار گردید. درآخرین مرحله رسوب ها در بافر سنجشی که بـه ترتیب محتوی غلظـت هـای۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلـی مولار تریتون X-100 بود حل شدند (۱۰). سـپس هـشت لولـه دیگر که همگی دارای غلظت ۰/۳۵mM فـسفاتیدات بـه فـرم $L_a$ در بافرسـنجش محتـوی ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌مـولار تریتون X-100 بودند، ایجـاد و سـپس بـه کلیـه لوله ها آنزیم اضافه و فعالیت آنها اندازه گیری شـد و نتـایج بـه صورت منحنی فعالیت در مقابل غلظـت‌های مختلف تریـتـون X-100 برای فرم‌های $L_a$ و $H_{II}$ رسم گردید.

**و) بررسی اثر ساختارشکن های اوره و گوانیـدین هیدروکلراید برفعالیت $PAP_{2b}$ غـشایی:** غلظـت هـای مختلـف ۱۰،۲۰،۴۰،۵۰،۸۰، ۷، ۵، ۲، ۱، ۰ میلـی‌مـولار از ساختارشکن های اوره و گوانیدین هیدروکلرید به طور مجـزا در محیط سنجش فعالیت آنزیم ایجاد و فعالیت آنزیم اندازه گیـری و نتایج به صورت فعالیت در مقابـل غلظـت ساختارشـکن رسـم گردید.

**ز) بررسی اثر ساختارشکن های اوره و گوانیـدین هیدروکلراید در امولسیون اسید فسفاتیدیک برونـد تبدیل فرم $L_a$ به $H_{II}$:** جهت بررسی تغییر پیشرونده فـاز از فرم $L_a$ به$H_{II}$ بطور مجـزا غلظـت هـای ۰، ۰/۱، ۰/۴، ۱، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۵۰ میلی مولار از ساختـارشکـن اوره و غلظت هـای 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 نـوری در طـول موج ۳۵۶ nm در فواصل زمـانی یک دقیقه‌ای خوانده شد (۱۰) و نتـایج بـه صـورت نمودارهـای زمان در مقابل جذب نوری رسم گردید.

**ح) بررسی اثر غلظت های مختلف یون $Mg^{2+}$ بـر رونـد تبدیل سوبستـرای $L_a$ به $H_{II}$ در محـیط سنجش فعالیـت و محیـط سنجش فـاقـد تـریـتـون X-100 :** دو دسـته هفـت عـددی لولـه آزمایش تمیز، یک دسته به عنوان شاهد و دسته دیگر به عنـوان تست انتخاب گردید. در سری شـاهد، محـیط سـنجش فعالیـت آنزیم حـاوی ۰/۳۵mM فـسفاتیدات و غلظـت هـای ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۱، ۲، ۴ و ۱۰ میلی مولار از $MgCl_2$ بود. در سری تست نیز، محـیط سـنجش فعالیـت آنـزیم فاقـد تریتـون X-100 و غلظت‌های ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۱، ۲، ۴، ۱۰ میلی مـولار از $MgCl_2$ و ۰/۳۵mM از فسفاتیدات ایجاد گردید. سپس همه لوله ها بـه مدت ۱۰ دقیقـه انکوبـه شـدند. متعاقبـاً همـه لولـه هـا در دور ۱۵۰۰g در $4^{\circ}c$ سانتریفوژ و سـوپرناتانت محتـوی فـاز $L_a$ از رسوب که محتوی فاز$H_{II}$ بود جدا گردید و لوله های محتـوی فاز $L_a$ مورد هضم فسفولیپیدی قرار گرفتند (۱۰و۱۱). نتایج بـه صورت درصد مقـدار فـرم $L_a$ در مقابـل غلظـت $MgCl_2$ در محیط سنجش حاوی تریتون X-100 و فاقد آن رسم گردید.

## یافته های پژوهش

نمودار شماره ۱ رابطـه زمـان و تغییـرات جـذب نـوری در ۳۵۶nm برای روند تبدیل فـرم $L_a$ بـه فـرم $H_{II}$ امولـسیون اسید فسفاتیدیک در محیط سنجش فعالیت آنزیم مشاهده مـی شود. این نمودار نشان می‌دهد که با گذشت زمان میـزان جـذب نوری به دلیل تشکیل ذرات $H_{II}$ از فرم $L_a$ افـزایش مـی یابـد ولی از دقیقه هشتم به بعد تشکیل ذرات $H_{II}$ در محیط کـاهش می یابد.

www.SID.ir

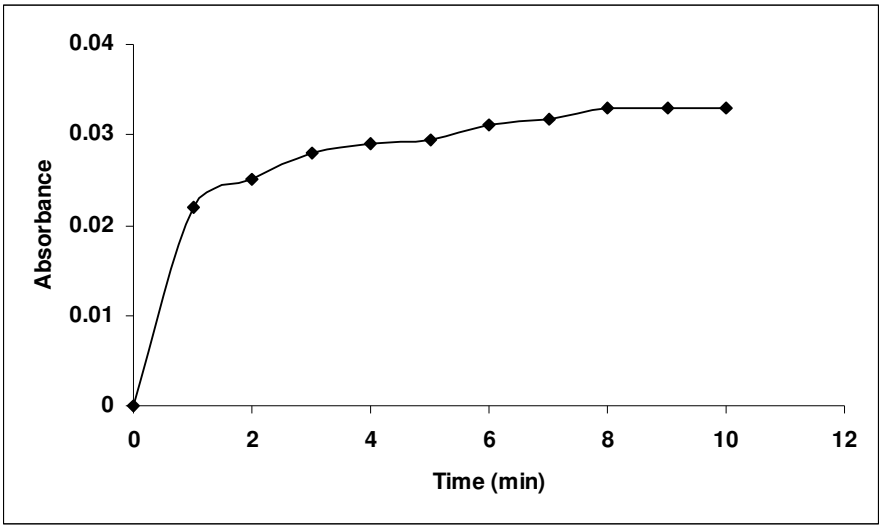
Archive of SID

نمـــودار شمـاره ۲ تمایـل آنـزیم $PAP_{2b}$ را در مـصرف فرم های $L_a$ و $H_{II}$ فسفاتیدات نشان می‌دهد. این نمودار نشان می دهد کـه آنـزیم $PAP_{2b}$ تمـایلی بـه مـصرف سوبـسترای فسفاتیدات به فرم $H_{II}$ حتی در حضور تریتـون X-100 نـدارد و تمایل به مصرف فرم $L_a$ سوبسترا دارد و ایـن تمـــایـــل در حضـــور تریتـون X-100 در غلظـــت ۴mM تـا ۲/۵ برابـر بیشتـــر، تحریک می شود. درنمودار شماره۳ و۴ بـه ترتیـب اثـر ساختارشکن هـــای اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر روند تبـدیل $L_a$ بـه$H_{II}$ فـسفـاتیدات دیـده مـی شـود، همـــانطور کـه در نمودارها مشاهده می شود با افزایش غلظت ساختار شکن ها در محیط سنجش از شدت جذب نوری کاسته می شود که به دلیل جلوگیری از تشکیل ذرات $H_{II}$ در محیـــط می باشد.

نمودار شماره ۵ اثـر غلظـت هـای مختلـف اوره و گوانیـدین هیدروکلراید بر فعالیـت $PAP_{2b}$ غـشایی را نـشان مـی دهـد. مطابق ایـن نمـودار، حـضور ساختارشـکن‌هـای مـذکور باعـث افزایش فعـــالیت آنزیم می‌گردند، بطـــوریکه غلظت هـــای ۱۰ میلی مولار اوره و ۲۰ میلی‌مـولار از گوانیـدین هیدروکلرایـد بیشترین اثر در محیط سنجش فعالیت نسبت به شـاهد را ایجـاد می‌کنند.

در نمودار شماره ۶، درصد باقیمانده فرم $L_a$ به روش هـضم فـسفـولیپیدی پـس از جـــداسازی فـاز $L_a$ از $H_{II}$ در حـضور غلظـت هـای مـذکور از ساختـــارشکن‌هـای اوره و گوانیـدین هیدروکلراید مشاهده می شود. همانطور کـه شـکل نـشان مـی دهد با افـــزایش غلظت ساختارشکن های مـذکور درصـد ابقـاء فرم $L_a$ در محیط افزایش می یابد.

نمودار شماره ۷، درصد ابقاء سوبسترا به فـرم $L_a$ در حـضور غلظـت هـای مختلـف $Mg^{2+}$ را در بـافر سـنجش فعـــالیت محتـوی و فـــاقد تریتون X-100 نشـــان می دهد. این شکل نشان می دهد که افـزایش غلظـت یـون $Mg^{2+}$ باعـث القـاء تشکیل فاز $H_{II}$ و کاهش فاز $L_a$ می گردد ولی این وضعیت در محیط سنجشی کـه فاقـــد تریتـــون X-100 اسـت، بیـشتر می‌باشد.

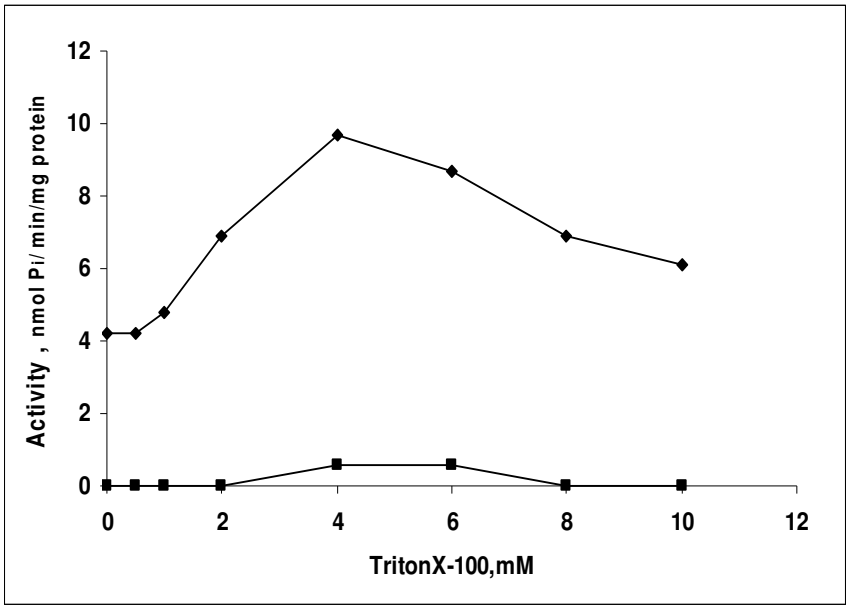



**نمودار ۱: تغییرات جذب نوری در مقابل زمان برای امولسیون اسید فسفاتیدیک.**

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

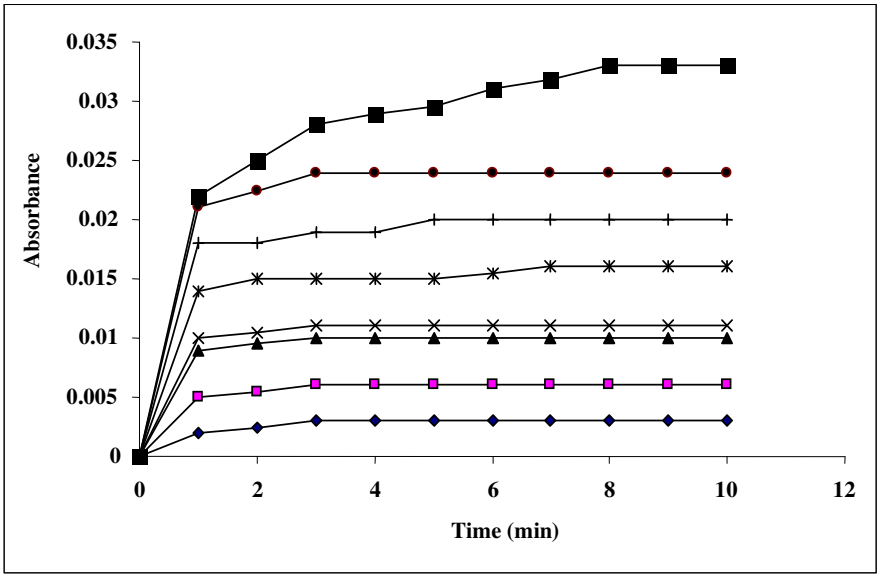
www.SID.ir

Archive of SID




**نمودار ۲: تمایل آنزیم $PAP_{2b}$ در مصـــــرف فرم های $L_a$ و $H_{II}$ سوبستـــرا.**

فعـالیت $PAP_{2b}$(۰/۵ $\mu$ g) در بافر سنجش فعالیت محتوی سوبسترا بـه فـرم هـای $L_a$ (♦) و $H_{II}$ (■) در حـضور غلظـت هـای مختلف تریتون X-100 اندازه گیری گردید.

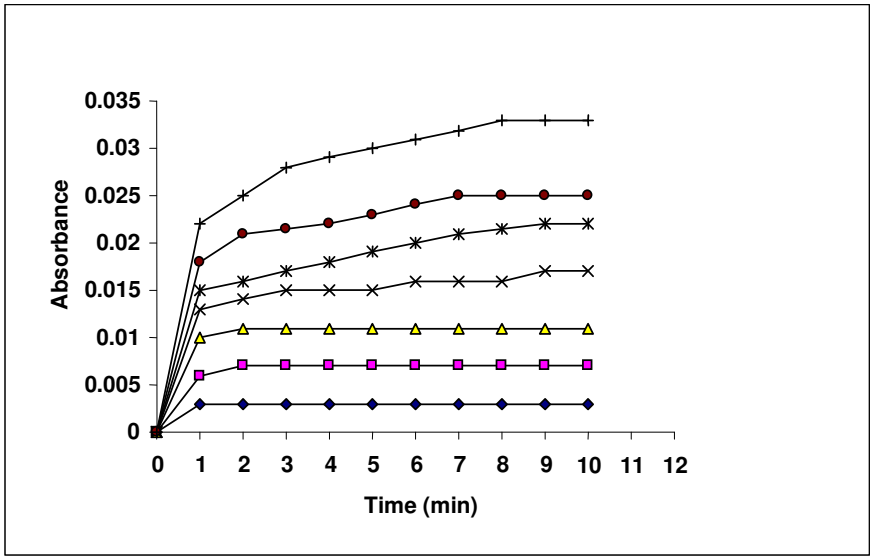



**نمودار ۳ : اثر ساختارشکن اوره بر تغییر فاز از $L_a$ به $H_{II}$ در امولسیون اسید فسفاتیدیک.**

تغییـرات جـذب نـوری امولسیـون اسیـد فسفـاتیدیک ۰/۳۵ میلی مـولار در بافـر سنجش فعالیت در مجـاورت غلظـت هـای ۰ (■)، ۰/۱ (●)، ۰/۴ (+)، ۱(*)، ۱۰(×)، ۲۰(▲)، ۴۰ (■) و ۵۰ (♦) میلی مولار اوره اندازه گیری شد.

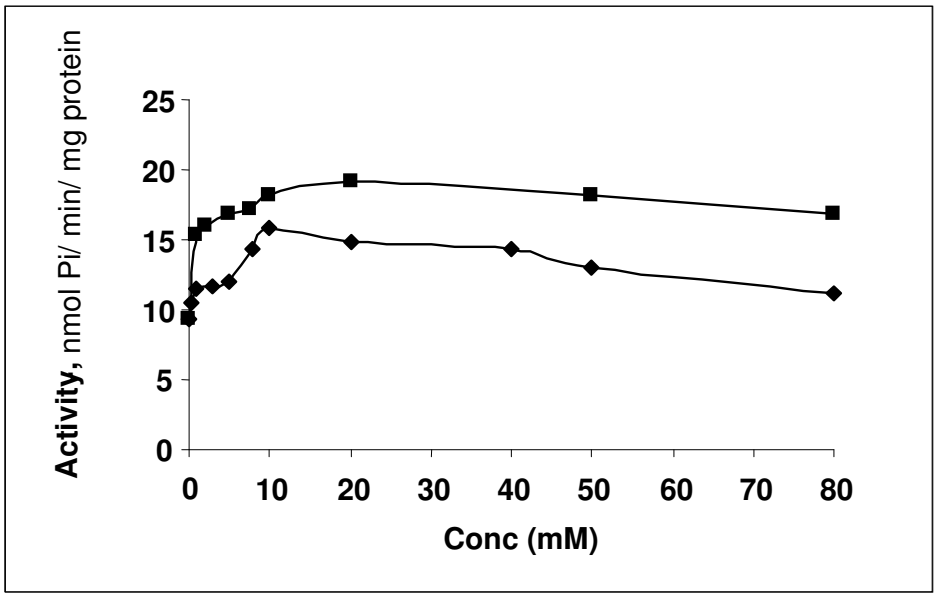
www.SID.ir

Archive of SID




**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 (×)، ۷/۵ (Δ)، ۱۰ (■) و ۱۵ (♦) میلی مولار هیدروکلراید گوانیدین اندازه گیری شد.

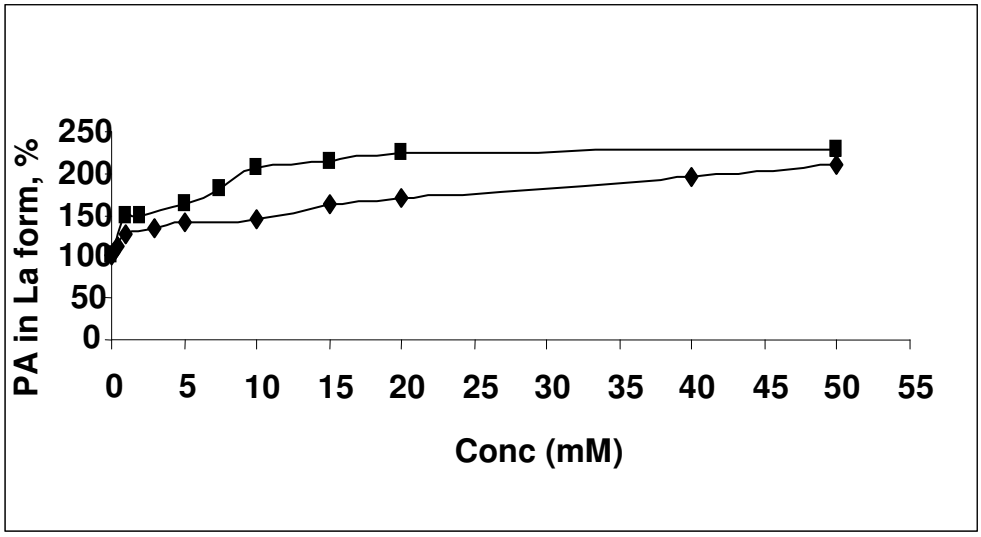



**نمودار ۵ : اثر اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر فعالیت $PAP_{2b}$**

فعالیت آنزیم $PAP_{2b}$ (۰/۵ $\mu$ g) در بافر سنجش فعالیت در حضورغلظت‌های مختلف از اوره (♦) وگوانیدین هیدروکلرید (■) به طور جداگانه اندازه گیری شد.

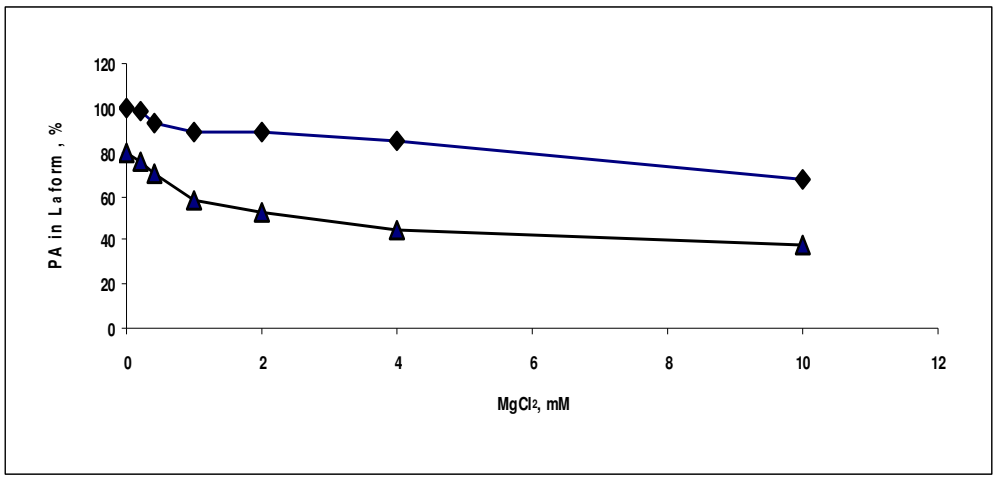
www.SID.ir

Archive of SID




**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 هیدروکلرید (■) 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٪ اندازه گیری شد.




**نمودار ۷ : اثر غلظت های 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 غلظت های 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**

www.SID.ir

Archive of SID

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 مهاری 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 $L_a$ سوبسترا 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 $L_a$ سوبسترای موردنیاز آنزیم باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌گردد. از طرف دیگر اثرات یونهای دوظرفیتی در پلی مورفیسم فسفولیپیدهای باردار پیچیده است و بین آنها تفاوت وجود دارد (۱۳و۱۴). معمولاً چنین یونهایی از لحاظ استوکیومتری تمایل اتصال به گروه سری فسفو لیپید دارند و این تمایل حتی در غلظت های اندک یونها نیز وجود دارد، بدلیل اینکه ثابت های اتصال آنها بسیار بزرگ است (۱۳و۱۴) و باعث القاء فاز $H_{II}$ فسفاتیدات می گردند (۱۷- ۱۵) که مورد مصرف آنزیم قرار نمی‌گیرد. در رابطه با اسید فسفاتیدیک اثبات گردیده که بعلت داشتن بار منفی در ناحیه سری تمایل به اتصال به کاتیونها دارد و در حضور مقادیر اندک کایتونها فاز $H_{II}$ در آن القاء می‌گردد (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 می‌توان استدلال کرد چون $PAP_{2b}$ فرم $L_a$ سوبسترا را مصرف می کند بنابراین نیازی به یون $Mg^{2+}$ که یک عامل القاءکننده 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 $H_{II}$ سوبسترا 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. بهرحال 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 برروی 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 اثرساختارشکن های مذکور در غلظت‌های 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 $H_{II}$ سوبسترا می شود (۱۰) می توان استنتاج کرد که این یون اثری مهاری بر فعالیت آنزیم دارد و نیازی به آن ندارد.

در نمودار شماره ۷ درصد باقیمانده فرم $L_a$ سوبسترا 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 $100 - X$ روند تبدیل

www.SID.ir

Archive of SID

فـرم $L_a$ به $H_{II}$ تشدید می‌گردد. احتمالاً میسل هـای تریتـون X-100 و یا سایـر دترجنت ها زمینه قرار گرفتن سوبسترای

فسفاتیدات در این غشاء های مـصنوعی را مهیـا کـرده و بـا ایجـاد تغییر شکل فیزیکی در فسفاتیدات امکـان رونـد تبـدیل فرم $L_a$ به $H_{II}$ سـوبسترا را از طریـق ایجـاد رقـت سـطحی و ممانعت از تشکیل کمپلکس های تجمعی کـاهش داده و نهاتیـاً باعث ابقاء فرم $L_a$ سوبسترا در محیط می گردد.

**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. Charactrization 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 procine thymus membrane; J Biol Chem 1992, 267: 25309- 25314.

7. Fleming IN, Yeaman SJ. Purification and characterization of N- ethylmaleimide-insensitve phosphatidic acid phosphohydrolase ($PAP_2$) 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 phosphohyrolase 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 $^{2}$H 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.


www.SID.ir

Archive of SID

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.

www.SID.ir

Archive of SID

# Rat Membrane Phosphatidate Phosphohydrolase and the Reason for its Mg+ Independence

**Heidarian E[4]*, Haghigh B[2].**

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 ($PAP_1$) that is responsible for glycerolipid metabolism and requires $Mg^{2+}$ for its activity. Another form ($PAP_2$) is primarily involved in lipid signaling pathways which dose not need $Mg^2$+. It has two isoforms; PAP 2a and PAP2b.

Little information is known about enzymological characterization of $PAP_2$ especially its substrate. We investigated the enzyme behavior against $Mg^{2+}$ 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 $Mg^{2+}$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 $Mg^{2+}$ 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 $Mg^{2+}$ stimulates $H_{II}$ formation and the enzyme needs $L_a$ form substrate, it can be concluded that, Not only does the enzyme need no $Mg^{2+}$,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.

www.SID.ir