

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

سهراب حالخور¹، دردی قوجق²، رامین شیخ پور³

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

مقدمه: گزارش های قبلی نشان می دهد 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.

مواد و روش ها: پژوهش حاضر بر روی 25 موش آزمایشگاهی انجام شد. مغز موشها را بیرون آورده و هموزنه مغز تهیه شد. جدا سازی آنزیم سیالیل ترانسفراز مغز موش آزمایشگاهی در کروماتوگرافی ستونی سفادکس G50 - انجام شد. فعالیت آنزیم در حضور پروتئین کیناز C، فسفاتاز، اکادئیک اسید و فوربل اندازه گیری شد. نتایج توسط نرم افزار آماری SPSS آنالیز شد.

یافته ها: مقایسه فعالیت سیالیل ترانسفراز در حضور پروتئین کیناز C و اکادئیک اسید با گروه کنترل نشان داد که سطح فعالیت سیالیل ترانسفراز نسبت به گروه کنترل پایین تر و از نظر آماری معنی دار بود ($p < 0/05$). مقایسه فعالیت سیالیل ترانسفراز در حضور پروتئین فسفاتاز و فوربل نشان داد که در گروه کنترل پایین تر و نسبت به حضور پروتئین کیناز بالاتر بود و از نظر آماری معنی دار بود.

بحث و نتیجه گیری: یافته های پژوهش حاضر نشان داد که واکنش سیالیل ترانسفراز مغز موش آزمایشگاهی با پروتئین کیناز C فعالیت آنزیم را کاهش می دهد و این نتایج با یافته های سایر محققان منطبق است. ما در یافتیم که استفاده از سیالیل ترانسفراز همراه با پروتئین کیناز C باعث کاهش فعالیت آن می شود و پروتئین فسفاتاز فعالیت آن را افزایش می دهد. در نهایت فسفریلاسیون سبب کاهش فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز و دفسفریلاسیون سبب افزایش فعالیت آن می گردد.

کلید واژه ها: سیالیل ترانسفراز، فسفریلاسیون، دفسفریلاسیون

آدرس مکاتبه: بابل، خیابان گنج افروز، دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی، بخش بیوشیمی و بیوفیزیک

پست الکترونیک: sohrabhalakhor@yahoo.com

مقدمه

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

این آنزیم می تواند بعد از شکسته شدن پروتئولیتیک در سرم آزاد شود (3). نیاز به سنجش آسان و حساس سیالیل 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 می تواند شاخص مهمی برای بیماریهای خاص باشد. ترانسفورماسیون انکوژنیک التهاب و افزایش کلسترول برخی نمونه هایی هستند که تغییر فعالیت سیالیل ترانسفراز در سلولها یا سرم را سبب می شود (5).

اغلب سنجشها برای فعالیت سیالیل ترانسفراز نشان دار با رادیواکتیو را به عنوان سوبسترای دهنده استفاده می کنند. سنجش فلورومتريک بعنوان سوبسترای دهنده، بسیار حساس ولی وقت گیر است. در گذشته یک نوع از سنجش سیالیل ترانسفراز بر اساس اختصاصی بودن لکتین ها جهت تفکیک بین آلفا 2 و 3 - سیالیل ترانسفراز، آلفا 2 و 6-سیالیل ترانسفراز استوار بود. برای گلیکوزیل ترانسفرازهای دیگر، روش ایمونواسی ایجاد شد (6).

خانواده سیالیل ترانسفراز شامل 10-12 آنزیم است که سیالیک اسید را از سیالیک اسید - CMP به جایگاههای ترمینال روی زنجیره های الیگوساکارید پروتئینها و گلیکولیپدها منتقل می کند (7، 8).

سیالیک اسیدها شاخص کلیدی بسیاری از ساختارها کربوهیدراتی هستند که در وقایع شناسایی بیولوژیکی مثل اتصال ویروس آنفلوانزا به سلولهای میزبان در طی عفونت، کلیرانس سیالوگلیکوپروتئینها از جریان خون، چسبندگی سلول

به سلول طی تکامل سیستم عصبی با واسطه N-CAM و چسبندگی مشترک انتخابی لکوسیتها به سلولهای اندوتلیال شرکت دارند. هر چند سیالیل ترانسفرازها از یک سوبسترای دهنده مشترک استفاده می کنند ولی برای توالی سوبسترای پذیرنده الیگوساکارید و اتصال آنومیکی که بین سیالیک اسید و قندی که به آن متصل می شود، تشکیل می شود، 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 آنتی بادی علیه این آنزیم با استفاده از روش های مرسوم، شکست خورد. علت آن اندک بودن مقادیر پروتئین بدست آمده بود (15، 16). هدف از این پژوهش بررسی تغییرات فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز در حضور ترکیبات فسفریله و دفسفریله است.

مواد و روشها

نوع مطالعه 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 اثر 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 شرکت های شیمیایی تهیه شد. موش آزمایشگاهی با اثر بیهوش شدند، سپس با قطع گردن نخاع کشته شدند و به دنبال آن شکافتن استخوان های جمجمه، بافت مغز از داخل

از اتمام 20 دقیقه، به مدت 15 دقیقه در دور 3000 سانتیفریوژ شد. محلول رویی جمع‌آوری و با محلول 20% تری کلرو استیک شسته شد. فعالیت آنزیم برحسب پیکومول گالاکتوز در دقیقه در میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

مقادیر محاسبه شده بر حسب $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده است و برای مقایسه نتایج گروه‌ها اثر ترکیبات از روش آماری S tudent T-Test استفاده شد و مقدار $P < 0/05$ 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 (میکرومول در میگریم 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 $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده است.

در نمودار 1 نشان داده شده است. همانگونه 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 در نمودار 2 نشان داده شده است. فعالیت آنزیم در 20 دقیقه و 40 دقیقه اندازه گیری شد. مقایسه فعالیت سیالیل ترانسفراز بین گروه دارای پروتئین کیناز C و اکادئیک اسید با گروه کنترل (فاقد پروتئین کیناز C و اکادئیک اسید) نشان داده شده است. سطح فعالیت سیالیل ترانسفراز در گروه کنترل بالاتر و از نظر آماری

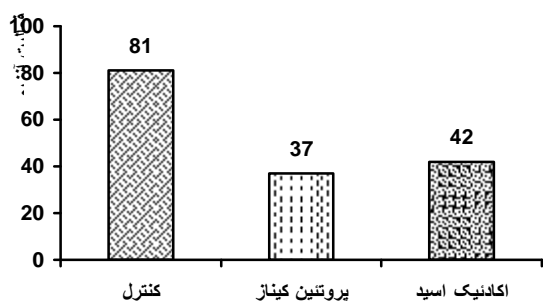
مجموعه بیرون آورده شد. مغز موشها ابتدا توسط هاون چینی همزده شد، بدنال آن در حجم 5 میلی لیتر از سوکروز 5% مولار بخوبی هم زده و هموزنه مغز موش تهیه شد.

هموزنه مغز موش آزمایشگاهی در کروماتوگرافی ستونی سفادکس G-50 انجام شد. حجم ستون 50 میلی لیتر و سرعت جریان حدود یک میلی لیتر در دقیقه بود. بافر شستشوی آن سیتیدین دی فسفات و گلیسرول 30% و سدیم کلراید 200 میلی مول و 2% تریتون 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 ترانسفراز بودند که به خوبی تغلیظ شده و جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز آماده‌بودند.

محلول اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز با مخلوط کردن 50 میکرولیتر 2-مرکاپتو اتانول 0/25 مولار 30 میکرولیتر لاکتوز 0/4 مولار، 40 میکرولیتر سدیم کلراید 30%، 10 میکرولیتر گلیسرول 0/2%، 30 میکرولیتر پروتئین کیناز، 20 میکرولیتر اکادئیک اسید 0/2 مولار، 20 میکرولیتر پروتئین فسفاتاز 20 میکرولیتر فوربل 0/2 مولار و 60 میکرولیتر تریتون X100- در آب مقطر در لوله‌های آزمایش تهیه شد.

نمونه‌های حاوی 50 میکروگرم هموزنه 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 لوله آزمایش تقسیم شدند. نمونه‌های کنترل آنهایی بودند که پروتئین کیناز C، اکادئیک اسید و فوربل به آنها افزوده نشد. پس از انکوباسیون در دمای 37 درجه 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

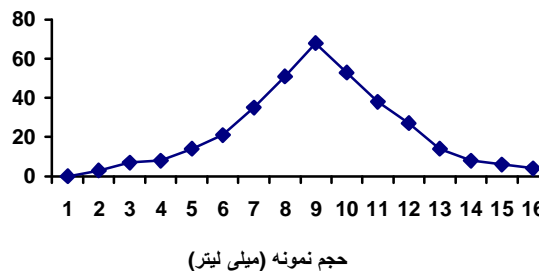


نمودار شماره 4- نمودار اثر پروتئین فسفاتاز و فوربل روی فعالیت سیالیل ترانسفراز

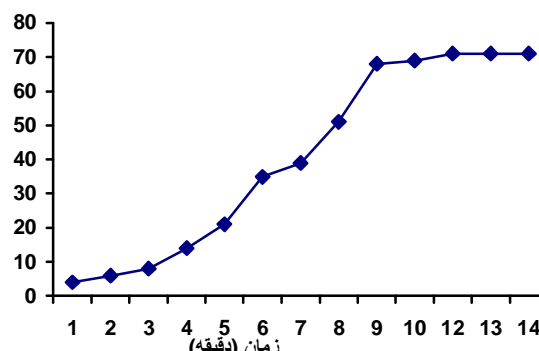
بحث و نتیجه گیری

عمل فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون در تنظیم فعالیت آنزیم ها بسیار با اهمیت است. همچنین این مکانیسم در کنترل 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 17-25 میلی لیتر شروع شده است و نشان می دهد که جداسازی خوبی با کروماتوگرافی سفادکس انجام شده است. تکرار پذیری نتایج نیز بسیار مناسب بود. در نمودار 2 نشان داده شده است که منحنی استاندارد اندازه گیری فعالیت آنزیم تا حدود اندازه گیری 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 هموزنه خالص شد و در زمانهای آنکو باسیون مختلف فعالیت این آنزیم با افزودن پروتئین کیناز C اندازه گیری شد. افزودن پروتئین کیناز C به سیالیل ترانسفراز، فعالیت های این آنزیم را بصورت وابسته به زمان کاهش می دهد (5، 6). آنالیز آمینواسیدهای نشان دار با P-32

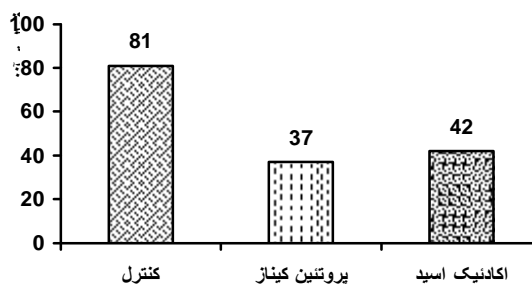
معنی دار بود ($p < 0/05$). مقایسه فعالیت سیالیل ترانسفراز بین گروه دارای پروتئین فسفاتاز و فوربل با گروه کنترل نشان داده شده است (نمودار 4). سطح فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز در گروه کنترل پایین تر و از نظر آماری معنی دار بود ($p < 0/05$). (نمودار 3) (مقادیر بر حسب $Mean \pm SD$ ارایه شده است).



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 اکادئیک اسید روی فعالیت سیالیل ترانسفراز

فعالیت آنزیم از طریق واکنش سیالیل ترانسفراز فسفریله با فسفاتاز انجام پذیر است. انکوباسیون با اکادئیک اسید، فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز را تا حدود 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 غیرفعال سازی توسط تحریک پروتئین کیناز استر فوریل نیز 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 و اکادئیک اسید کاهش می‌یابد. در نمودار 4 مقایسه فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز با فسفاتاز و استر فوریل نشان داده شده است. در این شرایط فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز نسبت به حضور پروتئین کیناز بالاتر است. این یافته ها نشان می‌دهند که عمل فسفریلاسیون فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز را مهار می‌نماید و عمل دفسفریلاسیون فعالیت این آنزیم را افزایش می‌دهد.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که عمل فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون بر روی فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز مغز موش مؤثر است.

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 می‌شود.

مشخص کرد که جایگاه عمده 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 از طریق پروتئین کیناز C و پروتئین فسفاتاز قابل تغییر است و این ممکن است یک مکانیسم 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 توالی آمینواسیدی را بصورت پروتئین‌های 14-3-3 آشکار کردند (8، 9). در یکی دیگر از تحقیقات که در آن تنظیم فعالیت سیالیل ترانسفراز و ترانسفراز Gal-NAC از طریق فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون مقایسه شده بود، مشخص شد که 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 توسط پروکیناز 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 می‌کند که فعالیت آنزیم سیالیل ترانسفراز با عمل فسفریلاسیون مهار می‌گردد و این نتایج با یافته‌های سایر محققان منطبق و قابل مقایسه است (1، 3، 5، 7).

References

1. Wen D. Primary Structure of Gal- β 1, 3(4) GLCNAC α 2, 3-Sialyltransferase Determined by Mass Spectrometry Sequence Analysis and Molecular Cloning. *The Journal of Biological Chemistry*. 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 Specificities of Rat liver Gal (β 1-4) GLcNAc α 2, 6- Sialyltransferase and Gal (β 1-3/4) Glc NAc α 2,3- 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 Gal β 1 \rightarrow 4 GlcNAc α 2 \rightarrow 6 Sialyl transferase and a Gal β 1 \rightarrow 3(4) GlcNAc α 2,3Sialyl 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 Assay for 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 CD45 engagement 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 transferase activities 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 14-3-3 protein 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 the promoter 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. Inositol 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 transferase activities by phosphorylation and dephosphorylation. *J. Neuro Chem*. 1995; 64(5): 2295-2302

14. Mohamed A, Huang W, Huang W, Venkatachalam K, and Wakil S. Isolation and characterization of a novel acetyl-CoA. Carboxylase Kinase from rat liver. *J. Biol.Chem.* 1994; 269(9): 6859-6865
15. Smith C, Newport J. Coupling of mitosis to the completion of S phase in xenopus occurs via modulation of the tyrosine kinase that phosphorylates. *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 rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991; 1081(1): 25-32