

اندازه‌گیری فعالیت آدنیلیل سیکلاز غشاء سلولی در حضور پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ

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 مهار کردن فعالیت القاء شده توسط فورسکولین (forskolin) بر روی این آنزیم اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز 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 $0.15 \pm 0.01 \mu\text{molcAMP/mgpro./mmin}$ و در حضور پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ برابر با $0.083 \pm 0.004 \mu\text{molcAMP/mgpro./mmin}$ 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.

*دکتر دردی قوجق I

دکتر مجید احمدی II

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

مقدمه

اوکاریوتها - 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 رسپتور آن با توجه به اتصال به قسمت تحریکی (Gs) و یا قسمت مهارری (Gi) پروتئین G - بطور مثبت و یا منفی - کنترل می‌شود (۴). تعدادی از این رسپتورها از جمله بتا - آدرنرژیک و پروتئین کموتاکسیک به قسمت Gi متصل می‌شوند و فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز را مهار می‌کنند (۵ و ۶).

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 - در پروکاریوتها و

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

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

آپوپتین، ۰/۲ میلی‌مول فنیل متی سولفونیل فلوراید، ۰/۰۵ میلی‌مول پفابلوک و ۱mmol میلی EDTA قرار داده شدند. سلولهای تهیه شده در ظرف نیتروژن تحت فشار ۳۰۰ psi و در دمای ۵°C بمدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد.

سپس سلولهای لیز شده بمدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵°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 ۷۰°C ذخیره شد. فعالیت آنزیم در غشاهای تهیه شده از سلولها در فقدان و همچنین در حضور غلظتهای مختلف پروتئین (۱۰-۱/۰ μmol) که با فورسکولین تحریک شده بودند اندازه‌گیری شد.

روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنیل سیکلاز -
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنیل سیکلاز با تغییرات جزئی براساس روش Wiegand انجام شد (۷). بهمین منظور مقدار ۱۰ از آب مقطر، ۰/۱mmol NaF، ۰/۱mmol GppNHP و ۰/۱mmol فورسکولین بهر یک از لوله‌های آزمایش اضافه در دمای ۴°C ذخیره گردید. سپس ۵۰ μl از مخلوط واکنش (۵۰mmol Tris-HCO₃، PH=۷/۲، ۳۰mmol MgCL₂، ۳۰mmol KCL، ۴mmol ATP، ۴mmol GTP، ۲mg/ml دی‌تریپتول، ۵٪ البومین سرم گاوی و ۲mg/ml پیرووات کیناز) به لوله آزمایش مرحله اضافه گردید. پس از آن ۵۰ μl از سوسپانسیون غشاء (۹-۶۰ μg پروتئین) به لوله آزمایش محله قبل اضافه گردید و بمدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷°C درجه قرار داده شد. پس از ۲۰ دقیقه با افزودن ۱۰۰ μl میکرولیتر از محلول NaOH (۵۰mmol) واکنش حاصل متوقف گردید. مخلوط بدست آمده بمدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۱۰۰°C حرارت داده شد. سپس یک حجم (۵۰ μl) از مخلوط واکنش مرحله قبل به ۲۰۰ μl از مخلوط حاوی ۱۰۰ml ۰/۱ مولار Tris-HCL، ۰/۱ مولار، PH=۷/۲، ۱mmol MgCL₂، ۳mmol میلی مول CaCL₂، ۰/۲mg/ml نوکلئوتیداز و ۰/۳IU/ml آسپیراز و ۲۰ آدنوزین دامیناز اضافه شد. واکنش حاصل ابتدا بمدت ۲۰

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 آدنیل سیکلاز جهت بررسی عمل پروتئین کموتاکسیک ماکروفاژ است.

روش بررسی

حیوان آزمایشگاهی - 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 در درجه حرارت ۱۹-۲۳°C و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی پرورش داده شدند.

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

روش آزمایش - 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 (۰/۲-۰/۵ 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 ۱۰^۸×۲ سلول در میلی‌لیتر در ۴۰mmol در بافر PH=۷/۲، Tris-HCL و حاوی ۱۰ μg/ml لوپتین و

دقیقه در دمای 37°C ، سپس بمدت ۱۰ دقیقه در دمای 100°C قرار گرفت و در نهایت متوقف شد و سپس یک حجم $500\ \mu\text{l}$ از مخلوط cAMP (حاوی $60\ \text{mmol}$ ایمیدازول - HCL ، $\text{pH}=7/2$ ، $0/8\ \text{mmol}$ MgCl_2 ، $2\ \text{mmol}$ EGTA، $0/005\%$ سرم آلبومین گاوی، $2\ \text{mmol}$ فسفات آلی، $0/8\ \text{mmol}$ گلیکوژن، $6\ \mu\text{mol}$ و $1\ \mu\text{mol}$ دی فسفاتو NADP ، $0/2\ \text{mmol}$ ، $0/2\ \text{IU/ml}$ واحد فسفودی استراز، $20\ \mu\text{mol/ml}$ گلوکز 6 فسفات دهیدروژناز، $50\ \mu\text{g/ml}$ فسفوگلوکو موتاز و $10\ \mu\text{g/ml}$ گلیکوژن فسفریلاز) به لوله آزمایش حاوی واکنش مرحله قبل اضافه گردید. محلول فوق 20 دقیقه در دمای 37 درجه قرار گرفت و سپس $500\ \mu\text{l}$ از بافر ۲-آمینو-۲-متیل-۱-پروپانل

شد(۸).

نتایج

منحنی کالیبراسیون فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز غشاء با استفاده از غلظتهای مختلف پیش ماده (substrate) رسم

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

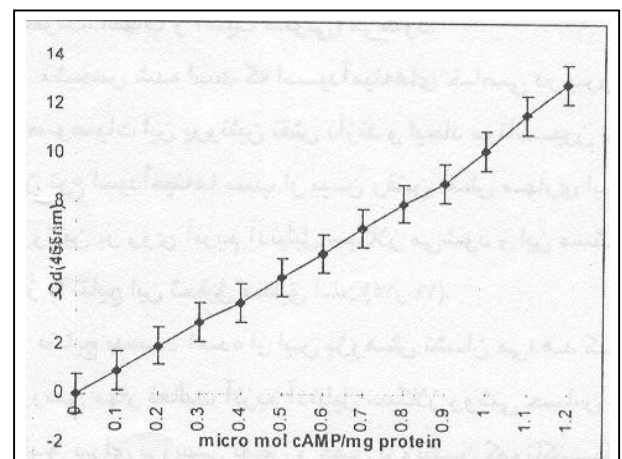
نمونه	فعالیت آدنیلیل سیکلاز (میکرومول cAMP/میکرومول پروتئین/دقیقه)
کنترل	$6/83 \pm 0/45$
در حضور ($10\ \mu\text{mol}$) فورسکولین	$10/52 \pm 1/33$
در حضور ($10\ \mu\text{mol}$) فورسکولین و ($2\ \mu\text{mol}$) کموتاکسیک	$8/72 \pm 0/94$
در حضور ($10\ \mu\text{mol}$) فورسکولین و ($4\ \mu\text{mol}$) کموتاکسیک	$7/11 \pm 0/85$
در حضور ($10\ \mu\text{mol}$) فورسکولین و ($6\ \mu\text{mol}$) کموتاکسیک	$5/38 \pm 0/72$
در حضور ($10\ \mu\text{mol}$) فورسکولین و ($8\ \mu\text{mol}$) کموتاکسیک	$3/59 \pm 0/65$
در حضور ($10\ \mu\text{mol}$) فورسکولین و ($10\ \mu\text{mol}$) کموتاکسیک	$2/11 \pm 0/15$

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

شد. منحنی کالیبراسیون بدست آمده در این پژوهش در محدوده غلظت $0-12$ میکرومول cAMP در میلی‌گرم پروتئین بافت قلب بصورت خطی بود. نمونه منحنی کالیبراسیون بدست آمده در نمودار شماره ۱، نشان داده شده 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 54% افزایش یافته بود(نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۱- منحنی کالیبراسیون اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز با استفاده از غلظتهای مختلف سوبسترا. منحنی کالیبراسیون در محدوده غلظت $0-12$ میکرومول در لیتر پیش ماده بصورت خطی است. هر نقطه نشان دهنده مقدار متوسط اندازه‌گیری حاصل از شش بار انجام آزمایش است.

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 ماکروفاز بواسطه فعالیت القاء شده آدنیلیل سیکلاز با فورسکولین اندازه‌گیری شد. فورسکولین آنزیم آدنیلیل سیکلاز را فعال می‌نماید (نمودار شماره ۲).

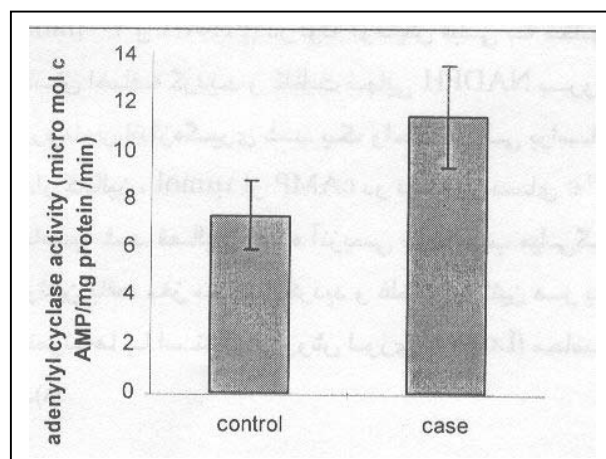
نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که پروتئین کموتاکسیک ماکروفاز آنزیم آدنیلیل سیکلاز را مهار می‌کند (نمودار شماره ۳).

نتایج بدست آمده از این تحقیق با نتایج ارایه شده توسط سایر محققان منطبق و قابل مقایسه است (۹-۱۱). 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 (۱۳ و ۱۴). 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 اسیدآمینوهای خاصی در بروز خصوصیات این پروتئین نقش دارند و ایجاد موتاسیون در این نوع اسیدآمینوها نقش مهمی را بر روی آنزیم آدنیلیل سیکلاز از بین می‌رود و این مسئله نیز با نتایج این تحقیق منطبق است (۱۵ و ۱۶).

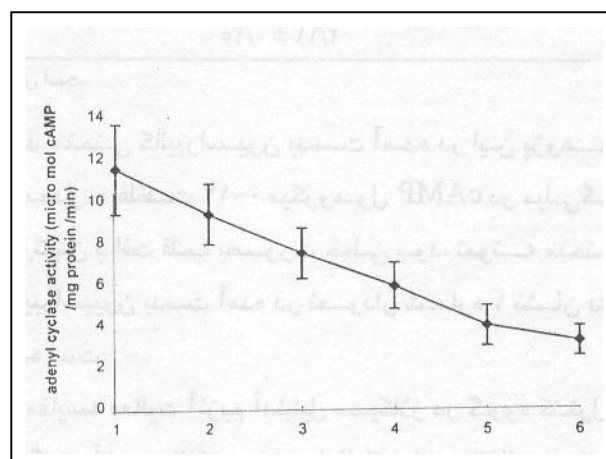
نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که بررسی مهار فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز یک روش حساس و دقیق برای بررسی نقش و عمل پروتئین کموتاکسیک ماکروفاز در سلولها است.

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



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 (۱۰ μmol)، ۲) فورسکولین (۱۰ μmol) + پروتئین کموتاکسیک (۲ μmol)، ۳) فورسکولین (۱۰ μmol) + پروتئین کموتاکسیک (۴ μmol)، ۴) فورسکولین (۱۰ μmol) + پروتئین کموتاکسیک (۶ μmol)، ۵) فورسکولین (۱۰ μmol) + پروتئین کموتاکسیک (۸ μmol)، ۶) فورسکولین (۱۰ μmol) + پروتئین کموتاکسیک (۱۰ μmol).

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. Biol. 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 chemotactic 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.

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. Cytochemical localization of adenylyl 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-Cell Biology*, 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 and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. *J. biolog. chem.* 1995, 270(11): 5786-5792.

7- Wiegand, 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.

ADENYLYL CYCLASE ASSAY TO MEASURE MACROPHAGE CHEMOTACTIC PROTEIN-1 RECEPTOR FUNCTION

*D. Qujeq, Ph.D^I M. Ahmadi, MD^{II}

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to determine the adenylyl cyclase activity for evaluating the role of macrophage chemotactic protein. Adenylyl cyclase is a membrane-bound enzyme that catalyzes the conversion of ATP to cAMP. The inhibition of adenylyl cyclase was carried out by measuring the ability of the macrophage chemotactic protein-1 to inhibit the forskolin-induced enzyme activity. Measurement of adenylyl cyclase activity was performed according to the procedure described by Wiegn.

Adenylyl cyclase activity in the present macrophage chemotactic protein-1 was decreased compared to that in controls [2.11 ± 0.15 (mean \pm SD.) vs. 6.83 ± 0.45 , activity ($\mu\text{mol cAMP/mg protein/min}$)].

Macrophage chemotactic protein significantly reduced adenylyl cyclase activity by 79.9%.

Key Words: 1) adenylyl cyclase 2) Macrophage chemotactic protein-1

Presented in the 5th congress of Immunology and Allergy, Tehran, 2000. Also this research has been done under the financial support of department of biochemistry-biophysics of Babol University of Medical Sciences and Health Services.

*I) Associate professor of department of biochemistry & biophysics, school of medicine, Ghanj Afrooz st., Babol University of Medical Sciences and Health Services, Babol, Iran (*Corresponding author)*

II) General physician