---- مجلة علوم الرافدين، المجلد 20، العدد 2، ص58-77، 2009----

عزل أنزيمي كلوتامين سنثيتيز وكلوتاميت ديهيدروجينيز من نسيج كلى إنسان سليم وأخر مصاب بسـرطان خلايا الكلى

طارق يونس احمد محمود احمد محمد

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 26/ 2 / 2008 ؛ تاريخ القبول 30/ 3/ 2009)

الملخص

يتضمن البحث عزل أنزيمي كلوتامين سنثيتيز وكلوتاميت ديهيدروجينيز من نسيج كلى إنـسان سـليم وأخر مصاب بسـرطان خلايا الكلى باستخدام تقنيات حياتية مختلفة تضمنت الترسيب بكبريتات الامونيـوم والفرز الغشـائي والترشيح الهلامي باستخدام هلامي Sephadex G-75 وSephadex G-200 .

وقدر الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية الترشيح الهلامي للحزمة البروتينية (الحاوية علـى فعاليـة كـلا الأنزيمين GS وGDH) للنسـيج السـليم والمـصاب والناتجـة مـن عمـود Sephadex G-200 بحـدود (304,000 ± 3,000 Da) و(297,000 ± 3,000 Da) على التوالي ، وان مقدار التنقية لكلا الأنـزيمين GS وGDH في هذه الحزمة بلغ (42.48) و(42.29) مرة على التوالي للنسيج السليم و(92.23) و(86.13) مرة على التوالي للنسيج المصاب.

ومن خلال استخدام تقنية الهجرة الكهربائية الحاوية على Sodium dodecyl sulfate تبين أن الـوزن الجزئي التقريبي للوحدة الفرعية للكلوتامين سنثيتيز المعزول من نسيج الكلى السليم والمصاب متشابه وبحدود (42,600 Da) وكذلك الوزن الجزيئي التقريبي للوحدة الفرعية للكلوتاميت ديهيدروجينيز المعزول من نـسيج الكلى السليم والمصاب متشابه وبحدود (53,900 Da).

وبدراسة الظروف المثلى لقياس فعالية كلوتامين سنثيتيز المنقى جزئياً من نسيج الكلى السليم ، تبـين أن الأنزيم يعمل في ظروف مثلى باستخدام المحلول المنظم Imidazole-HCl بتركيز (100 mM) وبدالـة حامضية (7.2) ودرجة حرارة (45 C°) و(15 mM) من الكلوتاميت كمادة أساس، وبلغت قيمة ثابت ميكيلس والسرعة القصوى للأنزيم باستخدام رسم لاينويفر-برك (11.97 mM) و(0.0818 U/ml) علـى التـوالي. ودرس تأثير تركيز كلوريد الامونيوم وأدينوسين-5- ثلاثي الفوسفات على فعالية كلوتـامين سـنثيتيز وكـان التركيز الأمثل لكل منها (1 mM) و(4 mM) على التوالي ، وبلغت قيمة السرعة القـصوى لهمـا (0.065

U/ml) و(0.0609 U/ml)على التوالي بينما بلغت قيمة ثابت ميكيلس لهما (0.419 mM) و(1.64 mM) على التوالي باستخدام رسم لاينويفر-برك .

كما تبين أن كلوتاميت ديهيدروجينيز المنقى جزئياً من نسيج الكلى السليم يعمل في ظروف مثلى باستخدام المحلول المنظم Tris-HCl بتركيز(100 mM) وبدالة حامضية (8.8) ودرجة حرارة(40 C°) و(50 mM) الكلوتاميت كمادة أساس ، وبلغت قيمة ثابت ميكيلس والسرعة القصوى للأنزيم باستخدام رسم لاينويفر– برك(29.5 mM) و(0.6916 U/ml) على التوالي. ودرس تأثير تركيز نيكوتين أمايد أدينين ثنائي النيوكليوتيد على فعالية كلوتاميت ديهيدروجينيز وكان التركيز الأمثل له(4 mM) ، وبلغت قيمة ثابت ميكيلس والسرعة القصوى لنيكوتين أمايد أدينين ثنائي النيوكليوتيد(0.91 mM) و(0.424 U/ml) على التوالي .

Isolation of Glutamine Synthetase and Glutamate Dehydrogenase from Normal and Renal Cell Carcinoma Human kidney's Tissue

Tareq Y. Ahmad **Mahmoud A. Mohammad**

Department o f Chemistry
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The research included isolation of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase from normal & tumor human kidney's tissue using different biological techniques, These included ammonium sulfate precipitation, dialysis, gel filtration chromatography on sephadex G-75 and sephadex G-200 .

It was shown that, the comparative molecular weight of the second proteinous peak (produced from sephadex G-200 colum, also it contain glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase activity) for normal & tumor kidney's tissue was found to be (304,000 ± 3,000 Da) and (297,000 ± 3,000 Da) respectively, And the purification of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in this peak was (42.48 fold) and (42.29 fold) respectively for normal kidney's tissue, (92.23 fold) and (86.13 fold) respectively for tumor kidney's tissue.

Further more, the comparative molecular weight of the subunit of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase were determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis techniques for normal and tumor kidney's tissue and found to be (42,600 Da) and (53,900 Da) respectively .

The results also showed that the optimum conditions of glutamine synthetase were obtained using imidazole-HCl (100 mM) as a buffer at pH (7.2), (45 C°) and (15 mM) of glutamate as a substrate. Using Linweaver-Burk plot, it was found that V_{max} and K_m have the values of (0.0818 U/ml), (11.97 mM) respectively. The effect of ammonium chloride

and adenosine-5́-triphosphate concentration on the enzyme activity were also preformed. The optimum concentration of ammonium chloride is (1 mM) with V_{max} (0.065 U/ml)and K_m (0.419 mM). On the other hand, the optimum concentration of adenosine-5́-triphosphate is (4 mM) with V_{max} (0.0609 U/ml) and K_m (1.64 mM) .

Finally, The optimum conditions of glutamate dehydrogenase were obtained using Tris-HCl (100 mM) as a buffer at pH (8.8), (40 C°) and (50 mM) of glutamate as a substrate. Using Linweaver-Burk plot, it was found that V_{max} and K_m have the values of (0.6916 U/ml), (29.5 mM) respectively. The effect of nicotinamide adenine dinucleotide concentration on the enzyme activity was also preformed. The optimum concentration of nicotinamide adenine dinucleotide is (4 mM) with V_{max} (0.424 U/ml) and K_m (0.91 mM) .

المقدمة

السرطان ليس مرحلة من تحول أو نمو مرتب لمركب أو عضو في الجسم، بل هو إخفاق عضوي تام (كارثة عضوية)، ويمكن القول بأنه مجموعة خلايا حقيقية النواة Eukaryotes مع مجموعة خلايا منقسمة منها (Zubay, 1998). إن أنواعاً من أمراض السرطان يرافقها إنتاج غير طبيعي للأنزيمات Enzymes والبروتينات والهرمونات والتي يمكن قياسها والتعرف عليها في مصل الدم Serum أو بلازما الدم Plasma أو النسيج Tissue، وهذه الجزيئات تعد مؤشراً أو دليلاً للورم السرطاني Tumor markers ، وبينت الأبحاث إنه ليس جميع المرضى أو جميع أنواع السرطان تعطي المؤشر نفسه (أو المتغير) وغالباً ما تكشف المؤشرات عن المراحل المتقدمة أكثر من المراحل الأولية للسرطان. (Edwards and Bouchier, 1991; Murray *et al.*, 2000) إن أنزيم كلوتامين سنثيتيز(GS ، EC 6.3.1.2) يلعب دوراً مهماً في أيض النايتروجين في كل الأحياء من البكتريا مروراً بالنباتات والحيوانات، وهو أنزيم متعدد الوحدات ، يحفز تحول الكلوتاميت والامونيا إلى كلوتامين إعتماداً على الادينوسين-5′- ثلاثي الفوسفات ATP (Tateno, 1994). وتعزى وظيفة الأنزيم إلى ثمانية وحدات فرعية متماثلة مع بعض الإختلافات النوعية الطفيفة بين هذه الوحدات (Smirnov *et al.*, 2000). ولقد استطاع أنزيم GS أن يجذب إنتباه الباحثين في الطب بسبب الدلائل المؤشرة على إختلال دور الأنزيم في عـدة أمـراض (Boksha *et al.*, 2000) مثل مـرض الزهايمر (LePince *et al.*, 1995) وحالات تضرر دماغ الثدييات(Krajnc *et al.*, 1996). ولقد تمت تنقية أنزيم كلوتامين سنثيتيز من دماغ الإنسان وحدد الوزن الجزيئي التقريبي للوحدة الفرعية للأنزيم بتقنية(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE وكانت بحدود(44,000 Da) (Tumani *et al.*, 1995 ; Boksha *et al.*, 1995). وأشارت الدراسات إلى أن أعلى فعالية للأنزيم في جسم الإنسان تكون في الدماغ والكبد (Suarez *et al.*, 2002). وأظهرت الدراسات وجود ثلاثة مواقع في كل وحدة فرعية من الوحدات الثمانية المكونة لأنزيم كلوتامين سنثيتيز الإنسان يرتبط من خلالها الكلوتاميت والأمونيا والـ ATP (Shin *et al.*, 2003).

أما أنزيم كلوتاميت ديهيدروجينيز(GDH ، EC1.4.1.2-4)، فيحفز إما إضافة الأمين الاختزالية للألفا-كيتوكلوتاريت أو إزالـة الأمين التـأكسدية للكـلوتاميت (Vallorani *et al.*, 2002). إن أنزيمات كلوتاميت ديهيدروجينيز تتكون من أكثر من وحدة أنزيمية Subunit واحدة، حيث تتكـون جميعها من ست وحدات فرعية متماثلة Homohexameric، عدا أنزيمـات كلوتاميت ديهيدروجينيز الموجودة في الفطريات والمعتمدة على إستخدام NAD^+ فقط بوصفه مرافقاً أنزيمياً حيث يتكون من أربع وحدات فرعية متماثلة Homotetrameric. ويبلغ الوزن الجزيئي التقريبي Comparative molecular weight لكل وحدة أنزيمية من الوحدات الست لأنزيمات كلوتاميت ديهيدروجينيز السداسية (55,000-47,000 Da) (Dean *et al.*, 1997 ; Britton *et al.*, 1992). إن أنزيم كلوتاميت ديهيدروجينيز الثدييات Mammalian GDH (E.C.1.4.1.3) موجود في حشوة المايتوكوندريا Mitochondrial matrix ويحفز إزالة الأمين التأكسدية العكسية للكلوتاميت مستخدماً الـ $NAD(P)^+$، ويتكون من ستة وحدات فرعية متماثلة يبلغ الوزن الجزيئي التقريبي لكل وحدة فرعية (56,000 Da) (Smith *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002). ويظهر الأنزيم فعالية عالية في الكبد والدمـاغ والبنكرياس والكلى بينما لا يـلاحظ ذلك في العضـلات (Fang *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2003)، فضلاً عن ذلك تم تشخيص فعالية الأنزيم في حالات فسلجية مختلفة كتشخيصه في المشيمة وكبد الأجنة Fetal liver (Timmerman *et al.*, 2003).

ويهدف البحث الحالي إلى عزل أنزيمي كلوتامين سنثيتيز وكلوتاميت ديهيدروجينيز من نسج كلى سليم وأخر مصاب بسرطان خلايا الكلى باستخدام التقنيات الحياتية المختلفة ودراسة خواص الأنزيمين في الحالـة السليمة.

المواد وطرائق العمل

نماذج الأنسجة:

تم الحصول على عينة نسيج كلى إنسان سليم من ذكر سليم ظاهرياً من دائرة الطب العدلي في الموصل، أما عينة نسيج كلى إنسان المصاب بسرطان خلايا الكلى فتم الحصول عليها من كلى ذكر مصاب بسرطان خلايا الكلى عندما أجريت له عملية رفع الكلى المصابة بسرطان خلايا الكلى في صالة عمليات مستشفى الزهراوي الأهلي (وكانت العينة المأخوذة حاويةً على الورم).

تحضير نماذج الأنسجة:

بعد الحصول على القطع النسيجية من صالة العمليات والطب العدلي غسلت جيداً بالماء المقطر ثم غسلت بعد ذلك بالماء المقطر المزال الايونات ثم وضعت في حاوية تحتوي على ماء مقطر مزال الايونات ثم نقلت بعد ذلك إلى المختبر. وتم في المختبر تجفيف العينة النسيجية باستخدام عدة أوراق ترشيح ومن ثم

وزنها بالميزان الحساس. إن فقدان أو عدم وجود جدار خلوي صلب في الخلية الحيوانية يجعلها سهلة السحق، لذلك تم تقطيع العينة إلى قطع صغيرة جداً، وبعد أن أضيف الماء المقطر المزال الايونات إلى العينة النسيجية المقطعة بنسبة (1:3) عرض النموذج إلى ثلاث دورات من التجميد والتذويب، ومن ثم عرض النموذج للسحق بجهاز السحق الذاتي، بعد ذلك نقل المستخلص الخلوي إلى جهاز السحق في حوض الترددات فوق الصوتية لمدة (40 min) ثم حرك بعد ذلك بواسطة المحرك المغناطيسي لمدة ساعتين مع مراعاة التبريد باستخدام حمام ثلجي، بعد ذلك رشح المستخلص الخلوي خلال عدة طبقات من الشاش لغرض الحصول على المستخلص الخام الذي أجرى له طرد مركزي بسرعة(2000 xg) لمدة (20 min) للتخلص من المواد غير الذائبة، إن الراشح الناتج يمثل المستخلص الرائق، ولقد تمت جميع الخطوات السابقة في ظروف مبردة، وبعد الحصول على المستخلص الرائق لكل عينة نسيجية تم قياس فعالية أنزيمي كلوتاميت سنثيتيز وكلوتاميت ديهيدروجينيز في ذلك المستخلص إضافة إلى قياس تركيز البروتين.

قياس البروتين والفعالية الأنزيمية:

تم قياس فعالية أنزيم كلوتامين سنثيتيز في مستخلص أنسجة الكلى طيفياً بواسطة قياس كمية الفوسفات (P_i) المتحررة من تفاعل تخليق الكلوتامين، من خلال تفاعل الفوسفات المتحررة مع موليبدات الامونيوم Ammonium molybdate الموجودة في محيط حامضي حيث يتكون معقد الموليبدونيوم الأزرق الذي يمكن قياس امتصاصه عند طول موجي (600 nm) في جهاز المطياف الضوئي (Shapiro and Stadtman, 1970). ولغرض حساب كمية الفوسفات المتحررة استعمل منحني قياسي للفوسفات (HPO_4^{-2}). وللتخلص من الفوسفات الموجودة في مستخلص الأنزيم تم استعمال محلول السيطرة ضمن طريقة العمل.كما قيست فعالية أنزيم كلوتاميت ديهيدروجينيز في مستخلص أنسجة الكلى طيفياً بقياس مقدار الزيادة في الامتصاصية لمحلول تفاعل إزالة الأمين التأكسدية عند طول موجي (340nm) اعتماداً على طريقة الباحثين(Hadži and Šukalović, 1990). وقدرت كمية البروتين في مستخلص الأنزيم وكذلك محاليل الأنزيم الناتجة خلال عملية التنقية باستخدام طريقة فولن - لاوري (Lowry *et al.*, 1951) والمحورة من قبل الباحثّين (Schacterle and Pollack, 1973) .

تنقية أنزيمي كلوتامين سنثيتيز وكلوتاميت ديهيدروجينيز من مستخلص أنسجة الكلى:

أجريت نفس خطوات التنقية لفصل أنزيمي كلوتامين سنثيتيز وكلوتاميت ديهيدروجينيز من نسيجي الكلى السليم والمصاب بسرطان خلايا الكلى والتي تضمنت الأتي:

1. فصل البروتين الكلي: تم فصل البروتين الكلي الترسيب بكبريتات ألامونيوم وبتشبع (75%) (Dioxin and Weeb, 1961)، وكانت إضافة كبريتات الامونيوم بصورة تدريجية مع التحريك المستمر بالمحرك الكهربائي لمدة (60 min) عند درجة حرارة (4 C°)، ومن ثم ترك المحلول ليستقر لمدة (24h) في

الثلاجة عند درجة حرارة (4C°)، ثم فصل الراسب عن الراشح بجهاز الطرد المركزي بسرعة (3600 xg) ولمدة (35 min)، بعد هذه العملية تم الحصول على راسب أذيب في اقل كمية من المـاء المقطـر المـزال الايونات وأجري له فرز غشائي Dialysis باسـتخدام محلـول بيكاربونـات الامونيـوم بتركيـز(0.1 M) (Plummer, 1978)، وأجريت عملية الفرز الغشائي عند درجة حـرارة (4 C°) مـع التحريـك بـالمحرك المغناطيسي ، واستمرت عملية الفرز الغشائي لمدة (48h). بعد ذلك تم تجفيف العينة باستخدام جهاز التجفيد حيث تم الحصول على مسحوق بروتيني حفظ في درجة حرارة (20 C°-) لحين استعماله.

2. تجزئة البروتين الكلي: تم تجزئة البروتين الكلي الناتج من الخطوة الـسابقة باسـتخدام كروماتوغرافيـا الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography باستعمال عمود الفصل ذي الإبعـاد (6.4 × 66.5 cm) والذي يحتوي على هلام السفدكس من نوع (Sephadex G-75) على ارتفـاع (58 cm) وباسـتخدام المـاء المقطر المزال الايونات كمحلول روغان. وحدد الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية الأولى(الحاويـة على فعالية كلا الأنزيمين GS وGDH) حسب طريقة الباحث (Andrews, 1965) من خلال مقارنـة حجـم استرداد هذه الحزمة مع حجوم استرداد مركبات أخرى معلومة الوزن الجزيئي تم إمرارها في نفس عمـود الفصل أعلاه.

3. تجزئة الحزمة البروتينية الأولى: تم تجزئة الحزمة البروتينية الأولى(الحاوية على فعالية كلا الأنـزيمين GS وGDH) والناتج من الخطوة السابقة باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال عمود الفـصل ذي الأبعاد (2 × 97 cm) والذي يحتوي على هلام السفدكس من نوع (Sephadex G-200) علـى ارتفـاع (94.5 cm) وباستخدام الماء المقطر المزال الايونات كمحلول روغان. وحدد الـوزن الجزيئـي التقريبـي للحزمة البروتينية الثانية(الحاوية على فعالية كلا الأنزيمين GS وGDH)حسب طريقة الباحـث (Andrews, 1965) من خلال مقارنة حجم استرداد هذه الحزمة مع حجوم استرداد مركبـات أخـرى معلومـة الـوزن الجزيئي تم إمرارها في نفس عمود الفصل أعلاه.

4. تحديد الوزن الجزيئي التقريبي للوحدة الفرعية لكل مـن أنزيمـي كلوتـامين سـنثيتيز وكلوتاميـت ديهيدروجينيز: استخدمت طريقة الباحث (Laemmli, 1970) لفصل البروتينات بالهجرة الكهربائية المتقطعة Discontinuous Electrophoresis ، إذ استخدم هلام متعدد الاكريلامايد (Poly acrylamide gel) بوجـود مادة الـ SDS (Sodium dodecyl sulphate) وباستعمال تيار كهربائي مقداره (40 mA) ومحلول مـنظم الكتروليتي (Tris-glycine, pH=8.3). وحدد الوزن الجزيئي التقريبي للوحدة الفرعية لكـل مـن أنزيمـي كلوتامين سنثيتيز وكلوتاميت ديهيدروجينيز من خلال مقارنة المسافة المقطوعة من قبل الوحدة الفرعية مـع المسافات المقطوعة من قبل مركبات أخرى معلومة الوزن الجزيئي .

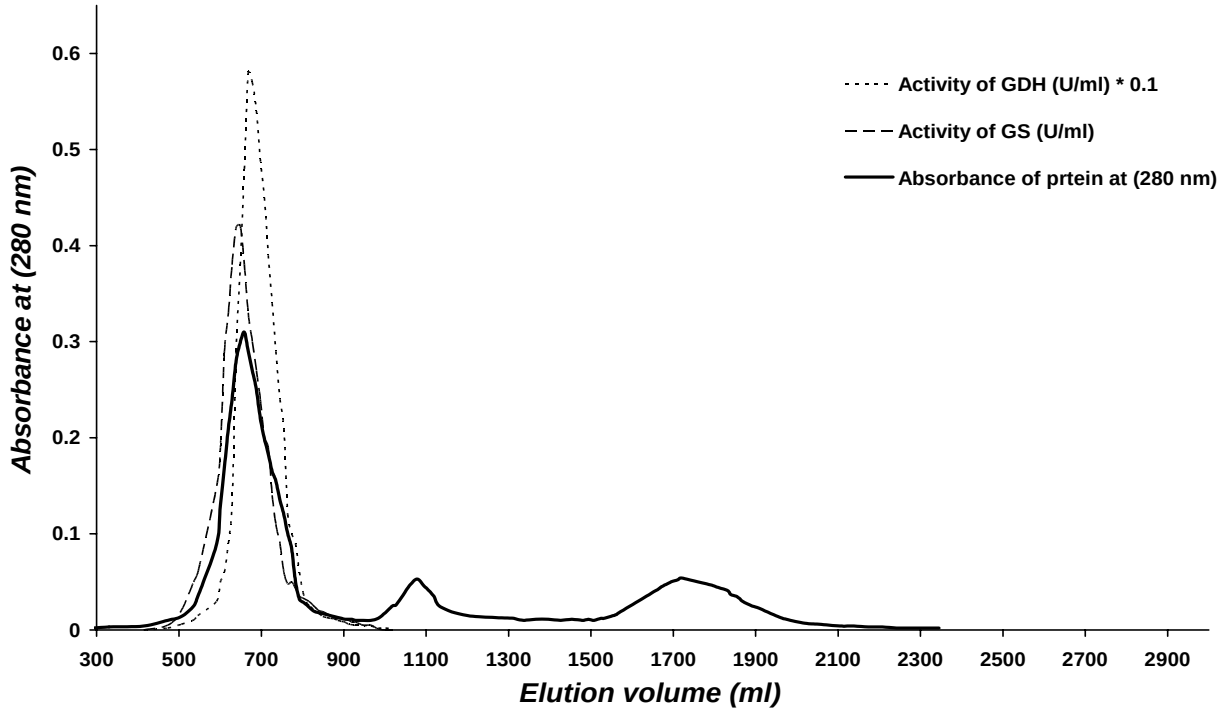
النتائج والمناقشة

تنقية أنزيمي كلوتامين سنثيتيز وكلوتاميت ديهيدروجينيز من مستخلص أنسجة الكلى:

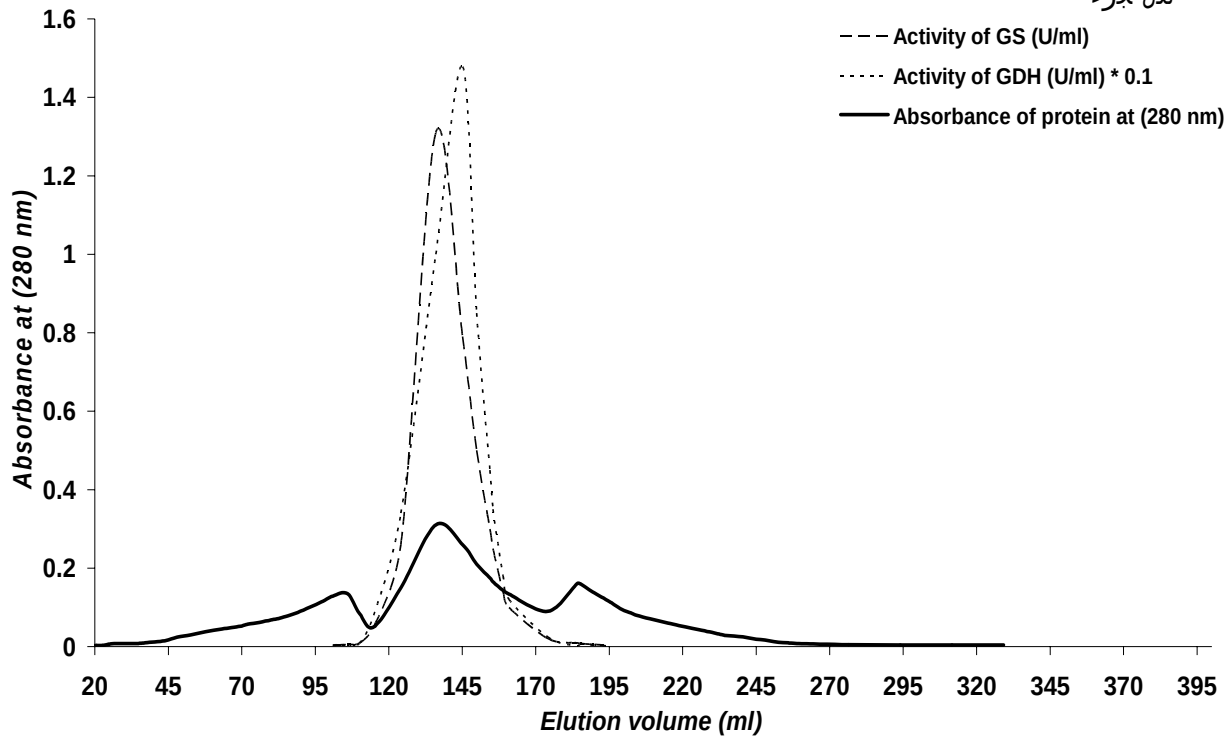
إن نتائج التنقية الجزئية للأنزيمين (GS وGDH) من نسيج الكلى السليم والمصاب بسرطان خلايا الكلى موضحة في الجدول(1) و(2)على التوالي. حيث أعطى روغان محلول البروتين الكلي العائد لنسيج الكلى السليم على عمود الفصل الأول الحاوي على هلام Sephadex G-75 ثلاث حزم بروتينية (ومن خلال متابعة فعالية أنزيمي GS وGDH وجد أن فعالية كلا الأنزيمين تتركز في الحزمة الأولى)، وكما هو موضح في الشكل(1)، وكان مقدار التقنية لكلا الأنزيمين GS وGDH(12.12 مره) و(11.91 مره) على التوالي وكما هو مبين في الجدول (1). بينما أعطى روغان محلول البروتين الكلي العائد لنسيج الكلى المصاب على عمود الفصل الأول الحاوي على هلام Sephadex G-75 ثلاث حزم بروتينية (ومن خلال متابعة فعالية أنزيمي GS وGDH وجد أن فعالية كلا الأنزيمين تتركز في الحزمة الأولى) وكما هو موضح في الشكل (3) وان مقدار التنقية لكلا الأنزيمين GS وGDH بلغ (13.34 مره) و(12.51 مره) على التوالي وكما هو مبين في الجدول (2).

وباستخدام عمود الفصل الثاني الحاوي على هلام Sephadex G-200 أعطى روغان الحزمة البروتينية الأولى الناتجة من عمود الفصل الأول والعائدة لنسيج الكلى السليم (بعد إن تم تقليص حجمها) ثلاث حزم بروتينية (ومن خلال متابعة فعالية أنزيمي GS وGDH وجد أن فعالية كلا الأنزيمين تتركز في الحزمة الثانية) وكما هو موضح في الشكل (2) وان مقدار التنقية لكلا الأنزيمين GS وGDH بلغ (42.48 مره) و(42.29 مره) على التوالي وكما هو مبين في الجدول (1). بينما أعطى الفصل بعمود الفصل الثاني الحاوي على هلام Sephadex G-200 للحزمة البروتينية الأولى الناتجة من عمود الفصل الأول والعائدة لنسيج الكلى المصاب (بعد أن تم تقليص حجمها) ثلاث حزم بروتينية (ومن خلال متابعة فعالية أنزيمي GS وGDH وجد أن فعالة كلا الأنزيمين تتركز في الحزمة الثانية) وكما هو موضح في الشكل (4) وان مقدار التنقية لكلا الأنزيمين GS وGDH بلغ (92.23 مره) و(86.13 مره) على التوالي وكما هو مبين في الجدول (2).

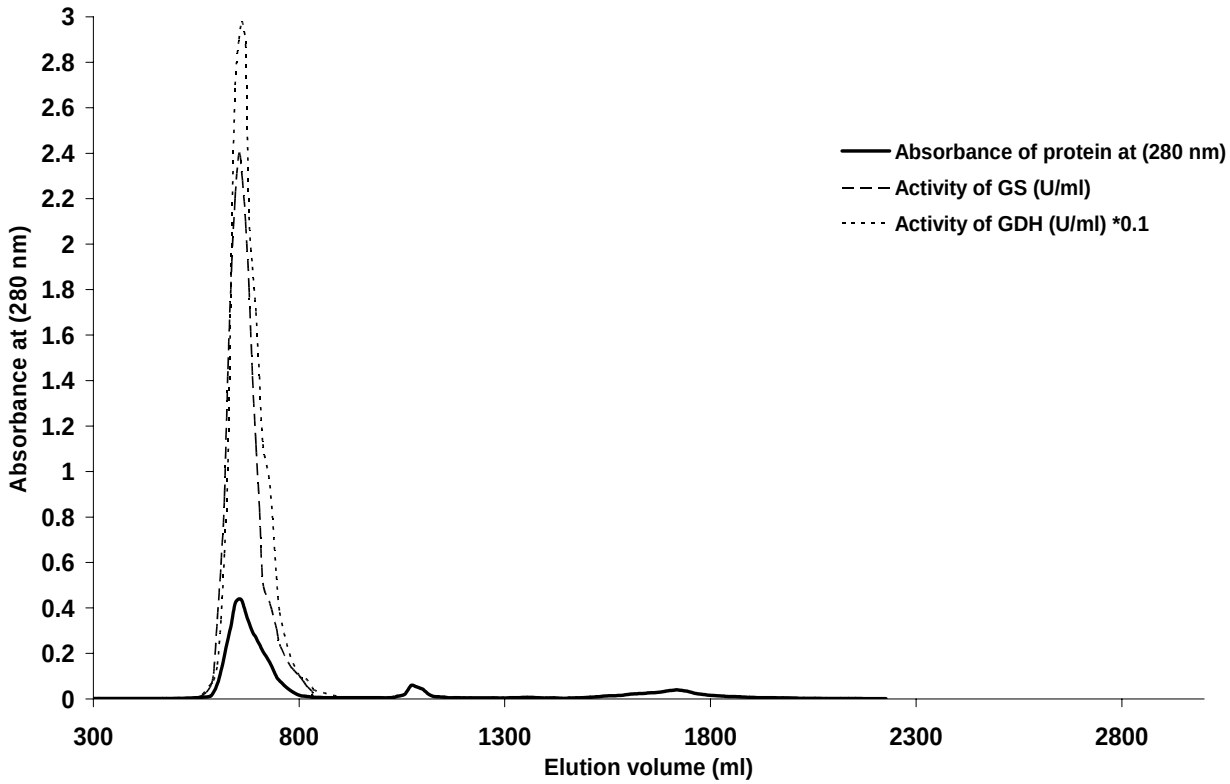
كما تم تقدير الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية الثانية والحاوية على فعالية الأنزيمين GS وGDH والناتجة من عمود الفصل الثاني للنسيج السليم والمصاب باستخدام تقنية الترشيح الهلامي، حيث بلغ وزنها الجزيئي التقريبي (304,000 ± 3,000 Da) و(297,000 ± 3,000 Da) على التوالي اعتماداً على حجم روغان الحزمتين (136 ml) و(137 ml) على التوالي. ويوضح الشكل (5) المنحني القياسي لتحديد الوزن الجزيئي التقريبي باستخدام عمود الفصل الثاني (Sephadex G-200). وهذه النتيجة تبين أن الوزن الجزيئي للحزمة الثانية للنسيج السليم الناتجة من عمود الفصل الثاني والوزن الجزيئي للحزمة الثانية للنسيج المصاب الناتجة من عمود الفصل الثاني يكون متشابهاً.



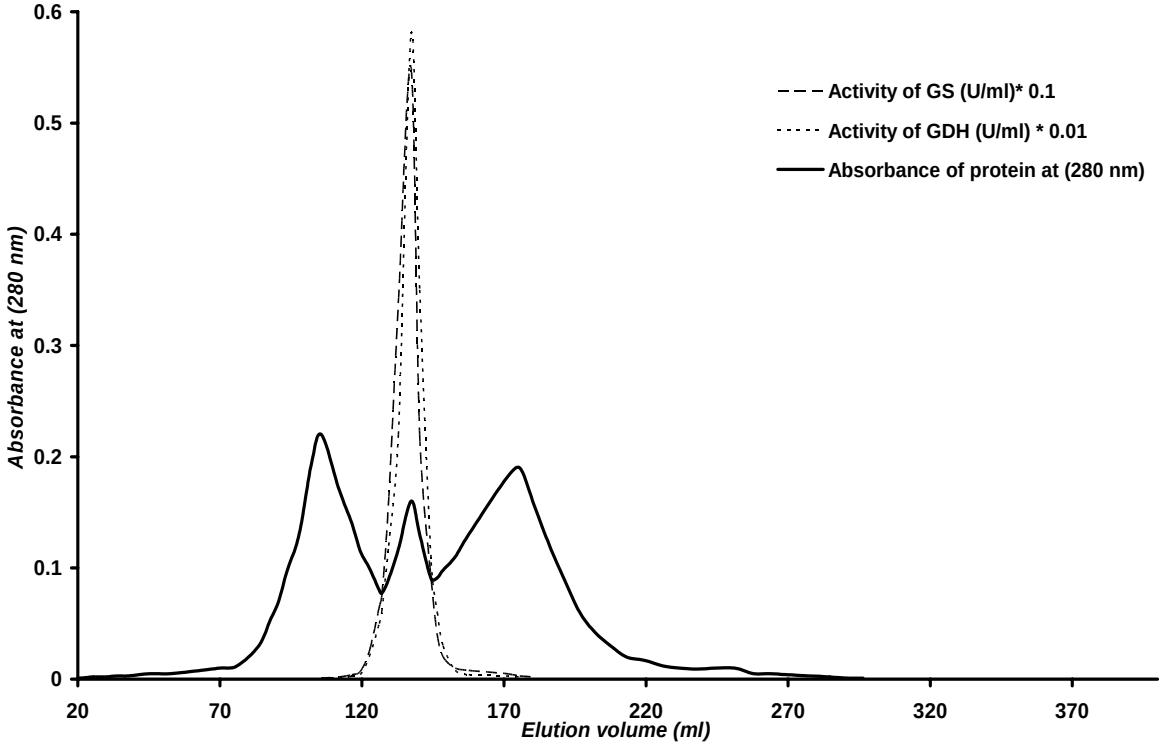
الشكل1: المظهر الجانبي لروغان محلول البروتين الكلي العائد لنسيج الكلى السليم على عمود الفصل الأول ذي الإبعاد (6.4 × 66.5 cm) والحاوي على هلام Sephadex G -75 على ارتفاع (58 cm) ،وتمت عملية الجمع بمعدل جريان (120 ml/h) وبمعدل(5 min) لكل جزء



الشكل 2: المظهر الجانبي لروغان محلول الحزمة البروتينية الأولى الناتجة من عمود الفصل الأول والعائدة لنسيج الكلى السليم على عمود الفصل الثاني ذي الإبعاد (2 × 97 cm) والحاوي على هلام Sephadex G -200 على ارتفاع (94.5 cm) ،وتمت عملية الجمع بمعدل جريان (15 ml/h) وبمعدل(12 min) لكل جزء



الشكل 3: المظهر الجانبي لروغان محلول البروتين الكلي العائد لنسيج الكلى المصاب على عمود الفصل الأول ذي الإبعاد(6.4 × 66.5 cm) والحاوي على هلام Sephadex G -75 على ارتفاع (58 cm) ،وتمت عملية الجمع بمعدل جريان (120 ml/h) وبمعدل(5 min) لكل جزء



الشكل4: المظهر الجانبي لروغان محلول الحزمة البروتينية الأولى الناتجة من عمود الفصل الأول والعائدة لنسيج الكلى المصاب على عمود الفصل الثاني ذي الإبعاد (2 × 97 cm) والحاوي على هلام Sephadex G -200 على ارتفاع (94.5 cm) ،وتمت عملية الجمع بمعدل جريان (15 ml/h) وبمعدل(12 min) لكل جزء

الجدول1: خلاصة نتائج مراحل تنقية أنزيمي كلوتلمين سنثيتيز وكلوتاميت ديهيدروجنيز من نسيج الكلى السليم

مراحل التنقية	الحجم الكلي ml	البروتين الكلي mg	الفعالية الكلية لأنزيم GS * U	الفعالية النوعية** لأنزيم GS U/mg	عدد مرات التنقية	%الاستعادة	الفعالية الكلية لأنزيم GDH # U	الفعالية النوعية## لأنزيم GDH U/mg	عدد مرات التنقية	%الاستعادة
المستخلص الخام	85.1	809.5	11.89	0.0147	1.00	100.0	122.04	0.1508	1.00	100.0
المستخلص الرائق	60.5	450.1	10.90	0.0242	1.65	91.7	109.84	0.2440	1.62	90.0
الترسيب بكبريتات الامونيوم	11.5	185.3	9.65	0.0521	3.54	81.2	94.12	0.5079	3.37	77.1
الفرز الغشائي	13.7	103.4	8.70	0.0841	5.72	73.2	85.29	0.8249	5.47	69.9
الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex (G-75) (القمة الأولى)	460.5	39.2	6.98	0.1781	12.12	58.7	70.41	1.7962	11.91	57.7
الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex (G-200) (القمة الثانية)	58.6	8.6	5.37	0.6224	42.48	45.2	54.84	6.3767	42.29	44.9

* U : كمية الأنزيم التي تعمل على تحرير (1 µmol) من الفوسفات في الدقيقة الواحدة .

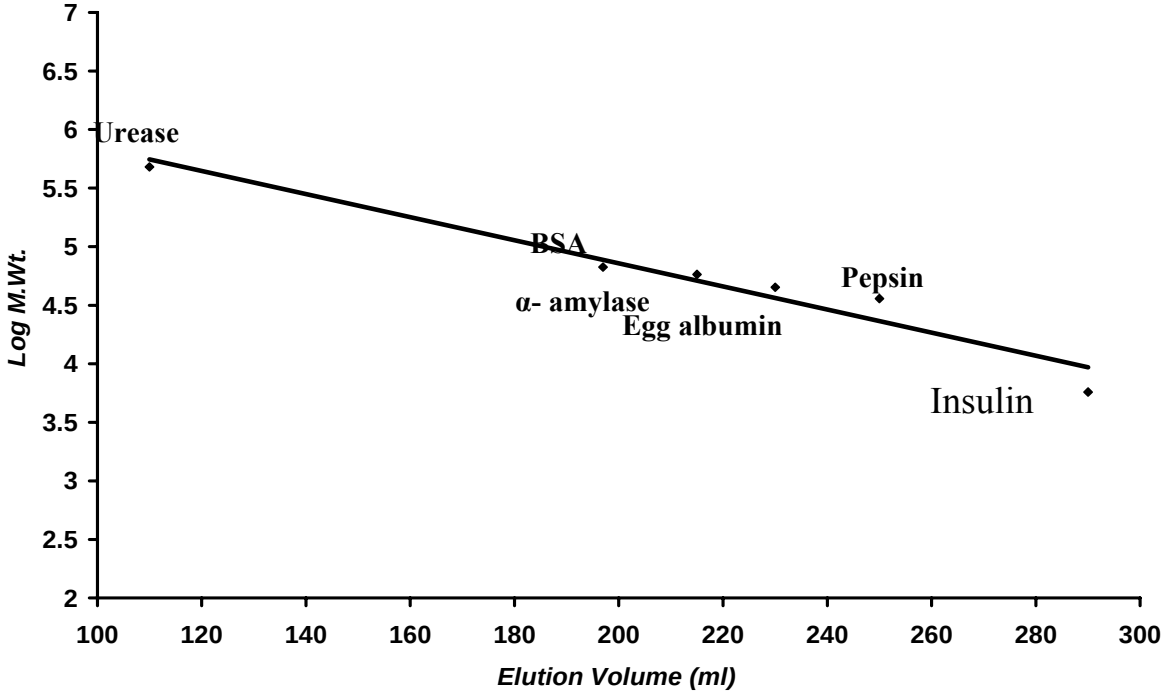
** الفعالية النوعية: عدد وحدات الأنزيم الموجود في (1.0 mg) من البروتين وتكون وحدتها (µmol of Pi/min/mg of protein) .

U : بأنها كمية الأنزيم اللازمة لاختزال (1 µmol) من الـ NAD^+ في الدقيقة الواحدة .

الفعالية النوعية: عدد وحدات الأنزيم الموجودة في (1 mg) من البروتين وتكون وحدتها µmol of (NADH/min/mg of protein).

الجدول 2: خلاصة نتائج مراحل تنقية أنزيمي كلوتلمين سنثيتيز وكلوتاميـت ديهيـدروجنيز مـن نـسيج الكلـى المصاب

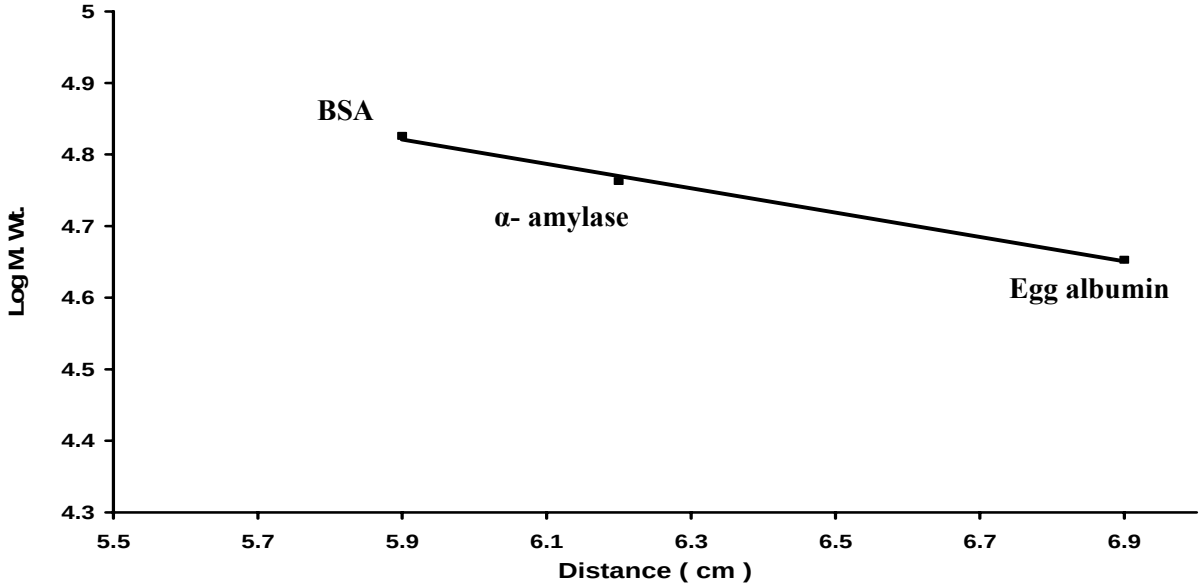
مراحل التنقية	الحجم الكلي ml	البروتين الكلي mg	الفعالية الكلية لأنزيم GS * U	الفعالية النوعية** لأنزيم GS U/mg	عدد مرات التنقية	%الاستعادة	الفعالية الكلية لأنزيم GDH # U	الفعالية النوعية## لأنزيم GDH U/mg	عدد مرات التنقية	%الاستعادة
المستخلص الخام	65.5	781	46.31	0.0593	1.00	100.0	467.74	0.5988	1.00	100.0
المستخلص الرائق	53.8	367.3	43.19	0.1176	1.98	93.3	426.58	1.1614	1.94	91.2
الترسيب بكبريتات الامونيوم	10.6	160.1	39.76	0.2483	4.19	85.9	385.88	2.4102	4.03	82.5
الفرز الغشائي	13.1	89.9	36.84	0.4098	6.91	79.6	353.14	3.9281	6.56	75.5
الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G-(75) (القمة الأولى)	160.6	40.4	31.95	0.7908	13.34	69.0	302.63	7.4908	12.51	64.7
الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G-(200) (القمـة الثانية)	18.3	3.9	21.33	5.4692	92.23	46.1	201.13	51.578	86.13	43.0



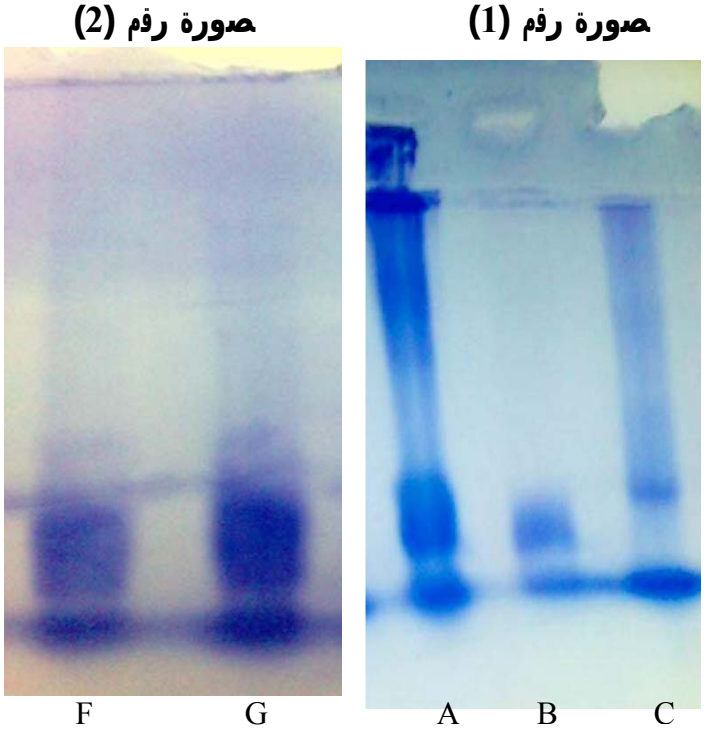
الشكل 5: المنحني القياسي لتحديد الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام العمود الفصل الثاني (Sephadex G-200)

ولغرض معرفة الوزن الجزيئي التقريبي للوحدة الفرعية لأنزيمي GS وGDH المعزولين من نسيج الكلى السليم والمصاب(الحزمة الثانية المعزولة بعمود الفصل الثاني) والمقارنة بينهما، تم استخدام تقنية الهجرة الكهربائية الحاوية علىSDS (SDS-PAGE) حيث يتحلل معقد أنزيم GS إلى (8) وحدات فرعية متماثلة(Kumada *et al.*, 1993 ; Brown *et al.*, 1994) بينما يتحلل معقد أنزيم GDH إلى (6) وحدات فرعية متماثلة (Britton *et al.*, 1992 ; Dean *et al.*, 1997). ولقد قدر الوزن الجزيئي التقريبي للوحدة الفرعية لأنزيمي GS وGDH المعزولين من نسيج الكلى السليم (الحزمة البروتينية الثانية) بمدد لـ(42,600 ± 200 Da) و(53,900 ± 1,000 Da) على التوالي بينما قدر الوزن الجزيئي التقريبي للوحدة الفرعية لأنزيمي GS وGDH المعزولين من نسيج الكلى المصاب (الحزمة البروتينية الثانية) بحدود (42,600 ± 300 Da) و(53,900 ± 1,500 Da) على التوالي. ويوضح الشكل(6) المنحني القياسي لتحديد الوزن الجزيئي التقريبي باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية الحاوية علىSDS بينما يوضح الشكل (7) صور الهجرة لكهربائية وبذلك يكون الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم GS المعزول من نسيج الكلى السليم والمصاب بسرطان خلايا الكلى متشابهة وبحدود (336,000)، ولقد أشارت الأدبيات إلى أن الوزن الجزيئي للوحدة الفرعية لأنزيم GS المعزول من دماغ الإنسان بحدود (44,000 ± 1,000 Da) (Boksha *et al.*, 2000) والوحدة الفرعية لأنزيم GS المعزول من كبد الإنسان بحدود (42,000 ± 500 Da) (Gibbs *et al.*, 1987). كما يكون

الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم GDH المعزول من نسيج الكلى السليم والمصاب بـسرطان خلايـا الكلـى متشابهة وبحدود (315,000 Da) ، ولقد أشارت الأدبيات إلى أن الوزن الجزيئي للوحـدة الفرعيـة لأنـزيم GDH المعزول من كبد الإنسان بحـدود (47,000 - 55,000 Da) (Britton *et al.*, 1992 ; Dean *et al.*, 1997) ويصل الوزن الجزيئي لأنزيم GDH المعزول من كبد الإنسان إلى (332,674 Da) (Garrett and Grisham, 2005).



الشكل 6: المنحني القياسي لتحديد الوزن الجزيئي بتقنية الهجرة الكهربائية الحاوية على SDS



الشكل7: صور الهجرة لكهربائية الحاوية على SDS حيث أن:

A:ألبومين مصل البقر

B:α-أميليز

C:ألبومين البيض

F:الحزمة الثانية(G-200) نسيج سليم

G:الحزمة الثانية(G-200) نسيج مصاب

دراسة بعض العوامل المؤثر على فعالية الأنزيميGS وGDH المعزولين من نسيج الكلى السليم:

تم الحزمة البروتينية الثانية (الناتجة من عمود الفصل الثاني) لنسيج الكلى السليم كمصدر لكل من أنزيم كلوتامين سنثيتيز وكلوتاميت ديهيدروجينيز.

1. دراسة تأثير بعض العوامل على فعالية أنزيم GS المنقى جزئياً من نسيج الكلى السليم:

من خلال دراسة تأثير تركيز الأنزيم وزمن التفاعل والتركيز والأس الهدروجيني للمحلول المنظم ودرجة حرارة التفاعل وتركيز المادة الأساس وتركيز الـ ATP وتركيز الـ NH_4Cl ، حددت الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم GS المنقى جزئياً من نسيج الكلى السليم وكما هو موضح في الجدول(3).

الجدول3: الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم كلوتامين سنثيتيز المنقى جزئياً من نسيج الكلى السليم

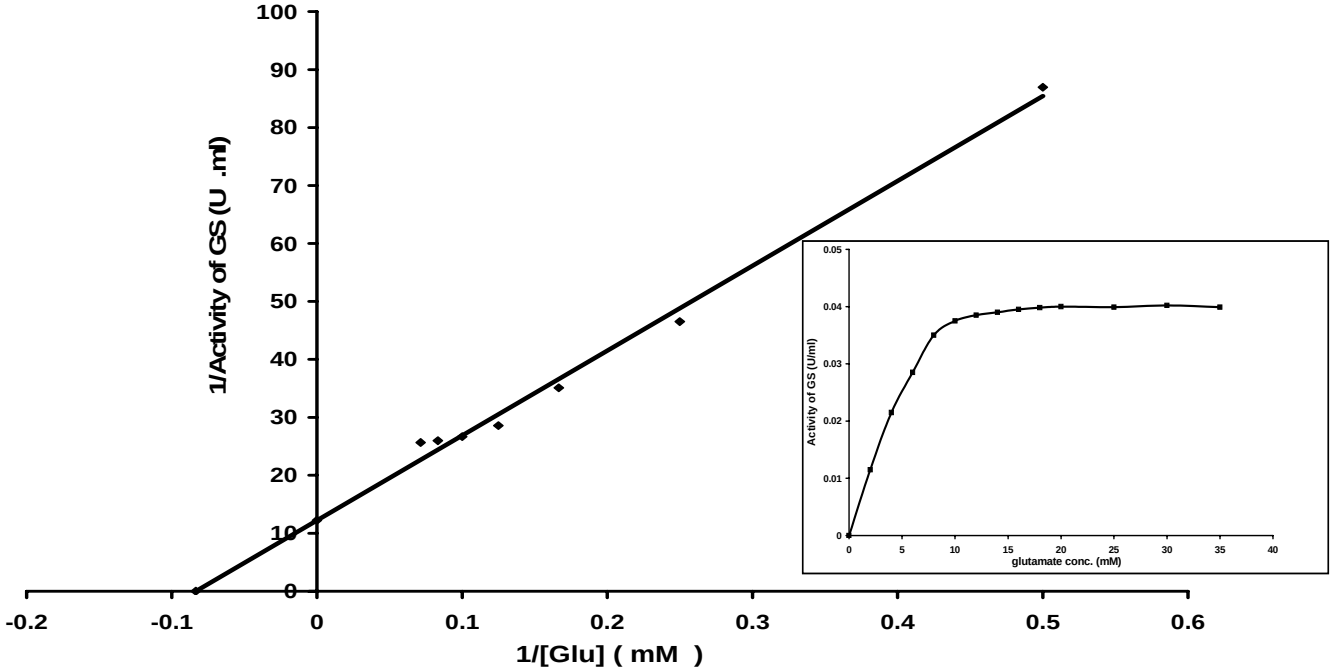
تركيز مادة NH_4Cl (mM)	تركيز مادة ATP (mM)	تركيز مادة الأساس (mM)	درجة الحرارة (C °)	التركيز والأس الهدروجيني للمحلول المنظم (Imidazol-HCl)	زمن التفاعل (min)	تركيز الأنزيم (µg/ml)
1	4	15	* 37	(100 mM) , pH =7.2	15	60

*درجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم في المختبر (in vitro) هي (45 C°) لكن تم اختيار درجة حرارة (37 C°) لقياس فعالية الأنزيم في جميع التجارب اللاحقة .

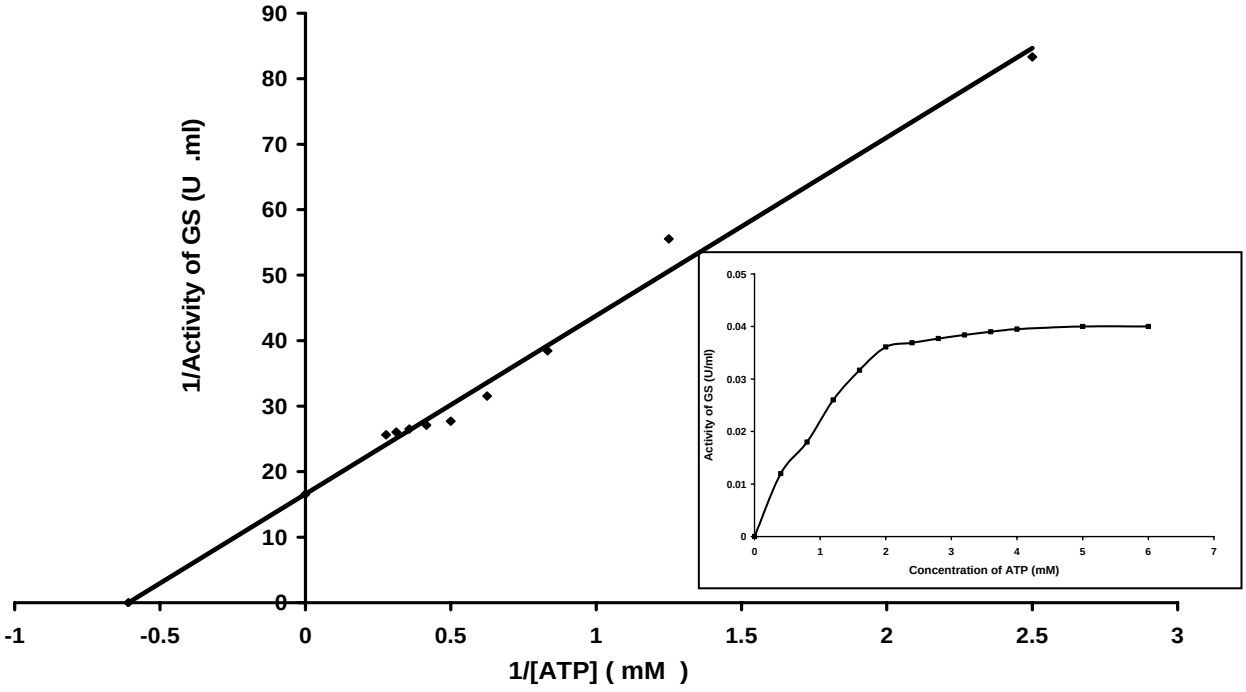
حيث أشارت الأدبيات إلى أن التركيز الأمثل والأس الهدروجيني الأمثل للأنزيم باستخدام المحلول المنظم (Imidazol-HCl) هو (100 mM) و(7.2) على التوالي(McCormik *et al.*, 1982)، وكذلك يعمل الأنزيم في أس هدروجيني امثل (7.0-7.4) (Iqbal and Ottaway,1990). كما بينت الأدبيات أن أعلى فعالية للأنزيم تظهر عند (42 C°) (Listrom *et al.*, 1997)، كما إن درجة الحرارة المثلى لأنزيم GS المعزول من *Rhizobium Melilti* بلغت (50 C°) (Shatters *et al.*, 1993).

وباستخدام رسم لاينويفر- برك(Lineweaver-Burk plot) وجد أن قيمة السرعة القصوى ($\mathbf{V}_{max}$) وثابت ميكيلس ($\mathbf{K}_m$) للمادة الأساس لأنزيم GS المنقى جزئياً من نسيج الكلى السليم هي(0.0818 U/ml) و(11.97 mM)على التوالي وكما موضح في الشكل (8) .

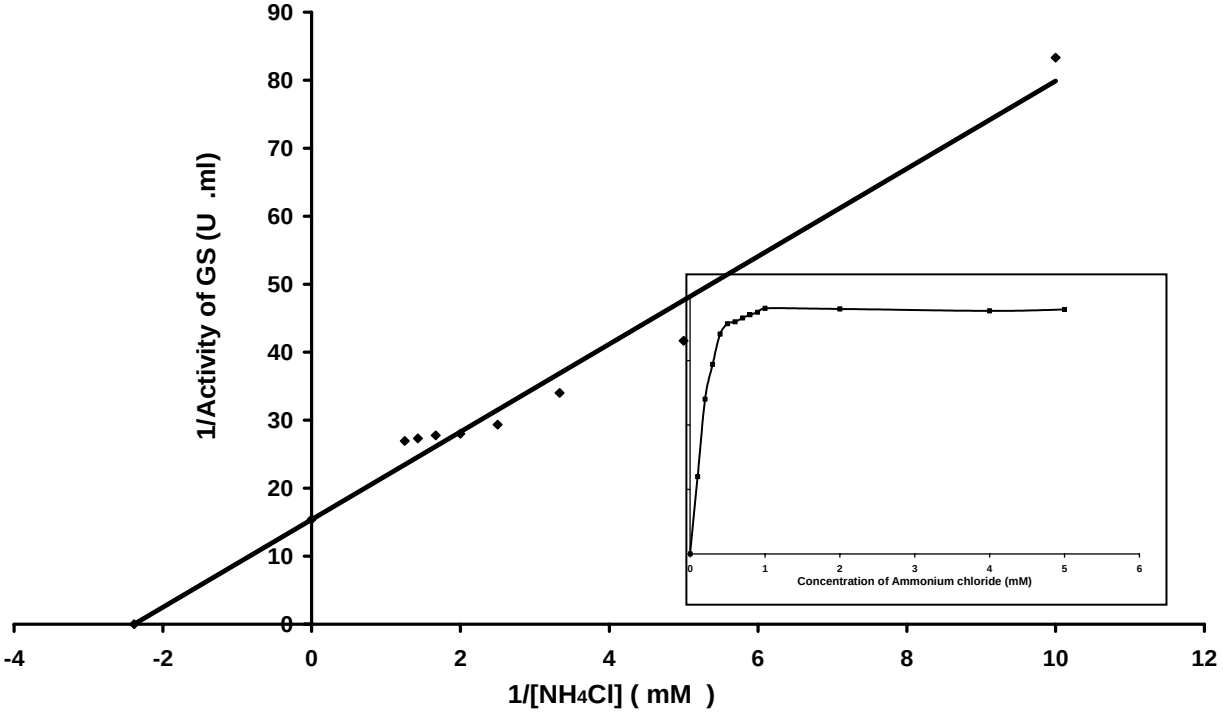
ولغرض معرفة تأثير تركيز كل من الـ ATP والـNH_4Cl على فعالية أنزيم GS تم تحديد قيمة $\mathbf{V}_{max}$وK_m لكل من الـ ATP والـ NH_4Cl والتي بلغت (0.0603 U/ml) و(1.64 mM) على التوالي للـ ATP(الشكل(9))،بينما بلغت (0.065 U/ml)و(0.419 mM) على التوالي للـNH_4Cl (الشكل (10)).



الشكل 8: رسم لاينويفر-برك لتوضيح ثابت ميكيلس والسرعة القصوى للمادة الأساس



الشكل9 : رسم لاينويفر- برك لتوضيح ثابت ميكيلس والسرعة القصوى للـ ATP



الشكل 10: رسم لاينويفر- برك لتوضيح ثابت ميكياس والسرعة القصوى للـ NH_4Cl

2. دراسة تأثير بعض العوامل على فعالية أنزيم GDH المنفى جزئياً من نسيج الكلى السليم:

من خلال دراسة تأثير تركيز الأنزيم وزمن التفاعل والتركيز والأس الهدروجيني للمحلول الـمنظم ودرجـة حرارة التفاعل وتركيز المادة الأساس وتركيز الـ NAD^+ ، حددت الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم GDH المنفى جزئياً من نسيج الكلى السليم وكما هو موضح في الجدول (4).

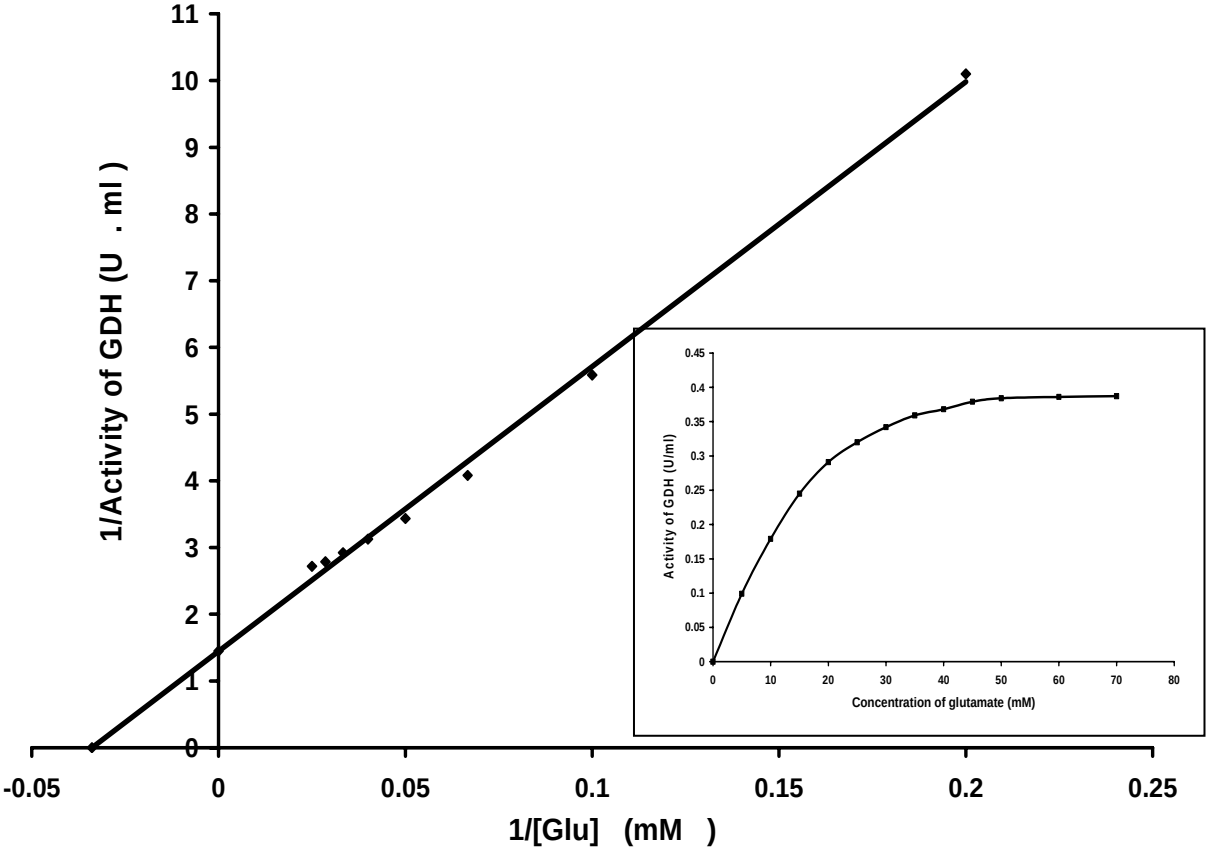
الجدول4: الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم كلوتاميت ديهيدروجينيز المنفى جزئياً من نسيج الكلى السليمة

تركيز مادة NAD^+ (mM)	تركيز مادة الأساس (mM)	درجة الحرارة (C °)	التركيز والأس الهدروجيني للمحلول المنظم (Tris - HCl)	زمن التفاعل (min)	تركيز الأنزيم (µg/ml)
4	50	* 37	(100 mM) , pH =8.8	1.0	50

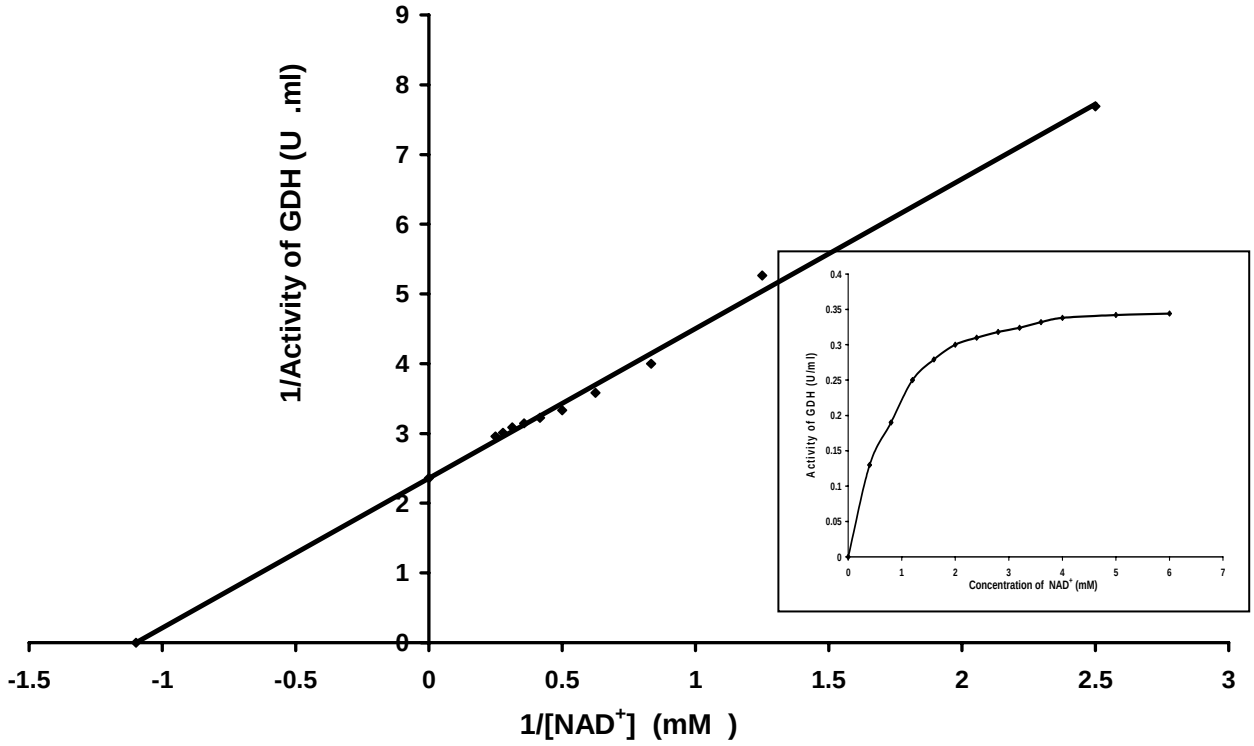
*درجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم في المختبر (in vitro) هي (40 C°) لكن تم اختيار درجة حرارة (37 C°) لقياس فعالية الأنزيم في جميع التجارب اللاحقة.

حيث أشارت الأدبيات إلى أن التركيز الأمثـل للمحلـول المـنظم (Tris - HCl) هـو (100 mM) (Schlee *et al.*, 1994) ، وكذلك يعمل أنزيم GDH في أس هدروجيني امثـل (8.8) (Vallorani *et al.*, 2002). كما بينت الأدبيات أن الأنزيم يكون ذو استقرارية حرارية عالية تصل إلى (70-50 C°) (Ramirez *et al.*, 1977) والى حد (70 C°) (Schlee *et al.*, 1994) .

وباستخدام رسم لاينويفر- برك(Lineweaver-Burk plot) وجد أن $\mathbf{V}_{max}$ و $\mathbf{K}_m$ لأنزيم GDH المنقى جزئياً من نسيج الكلى السليم هـي(0.6916 U/ml) و(29.5 mM) علـى التـوالي وكمـا موضـح فـي الشكل(11). ولغرض معرفة تأثير تركيز الـNAD^+على فعالية أنزيم GDH تم تحديد قيمة $\mathbf{V}_{max}$ و K_m للـ NAD^+والتي بلغت (0.424 U/ml) و(0.91 mM) على التوالي الشكل (12).



الشكل11: رسم لاينويفر-برك لتوضيح ثابت ميكيلس والسرعة القصوى للمادة الأساس



الشكل12: رسم لاينويفر-برك لتوضيح ثابت ميكيلس والسرعة القصوى للمادة الـ NAD^+

المصادر الأجنبية

Andrews, P., 1965. The Gel Filtration Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weight Over a Wide Range**.** J. Biol. Chem., 96: 595p.

Boksha, I. S.; Burbaeva. G. S. and Tereshkina, E. B.,1995. Purification and some Properties of Glutamine Synthetase from Human Brain. Biochem., 60: pp.1299-1303.

Boksha, I. S.; Tereshkina , E. B. and Burbaeva, G. S., 2000. Glutamine Synthetase and Glutamine Synthetase-Like Protein from Human Brain: Purification and Comparative Characterization. J. Neurochem., 75(6): pp.2574-2582 .

Britton, K. L.; Baker, P. J.; Rice, D. W. and Stillman, T. J., 1992. Structural Relationship Between the Hexameric and Teterameric Family of Glutamate Dehydrogenase. Eur. J. Biochem., 209: pp.851-859 .

Brown, J. R., Masuchi, Y., Robb, F. T. and Doolittle, W. F., 1994. Evolutionary Relationships of Bacterial and Arehaeal Glutamine Synthetase Genes**.** J .Mol. Evol., 38 (6): pp.566-576 .

Dean, J. L. E., Cölfen, H., Harding, S. E., Rice, D. W. and Engel, P. C., 1997. Alteration of the Quaternary Structure of Glutamate Dehydrogenase from Clostridium Symbiosum by a Single Mutation Distant from the Subunit. Interfaces. Eur. Biophy. J., 25: pp.417-422 .

Dioxin, M. and Weeb, E. C., 1961. Tools of Biochemistry., John Wiley and Sons, Inc., New York, 370p.

Edwards, C. R. W. and Bouchier, J. A. D., 1991. Davidson's Principles and Practice of Medicine a Textbook for Students and Doctors. 16th Edn., ELBS with Churchill Livingstone, pp. 230 – 246.

Fang, J., Hsu, B. Y. L., MacMullen, C. M., Poncz, M., Smith, T. J. and Stanley, C. A., 2002. Expression, Purification and Characterization of Human Glutamate Dehydrogenase (Gdh) Allosteric Regulator Mutations. Biochem. J., 363: pp. 81-87.

Garnick, M. B. and Richie, J. P., 1996. Renal Neoplasia. in Brenner, B. M., the Kidney. Vol. 2 , 5th Edn., W. B. Saunders Comp., U.S.A., Philadelphia, pp. 1959-1977.

Garrett, R. H. and Grisham, C. M., 2005. Biochemistry. 3rd Edn, Thomson Leaving, Inc., Belmont U.S.A., 107: pp. 815-816.

Gibbs, C. S., Campbell, K. W. and wilson, R. H.,1987. Sequence of Human Glutamine Synthetase Cdna**.** Nucleic Acid Res., 15: 6293p.

Hadži, V. and ŜuKaloviĉ, T., 1990. Properties of Glutamate Dehydrogenase from Developing Maize Endosperm. Physiol. Plant., 80: pp. 238-242 .

Iqbal, K. and Ottaway, J. H., 1970. Glutamine Synthetase in Muscle and Kidney. Biochem. J., 119: pp. 145-158.

Kim, D. W., Eum, W. S., Jang, S. H., Yoon , C. S., Kim, Y. H., Choi, S. H., Choi, H. S.;Kim, S. Y., Kwon, H. Y., Kang, J. H., Kwon, O. S., Cho, S. W., park, J. and Choi, S.Y., 2003. Molecular Gene Cloning, Expression, and Characterization of Bovine Brain Glutamate Dehydrogenase. J. Biochem. Mol. Biol., 36: pp. 545-551.

Krajnc, D., Neff , N. H. and Hadjiconstantinou, M., 1996. Glutamate, Glutamine and Glutamine Synthetase in the Neonatal Rat Brain Following Hypoxia. Bran Res., 707: pp. 134-137 .

Kumada , Y., Benson, D. R., Hillemann, D., Hosted, T. J., Rochefort, D. A., Thompson, C. J., Wohlleben, W. and Tateno, Y.,1993. Evolution of the Glutamine Synthetase Gene, one of the Oldest Existing and Functioning Genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90:pp. 3009-3013 .

Laemmli, U. K.,1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227: pp. 680- 685.

LePrince, G., Delaere, P., Fages, C., Lefrancois, T., Touret, M., Salanon, M. and Tardy M.,1995. Glutamine Synthetase Expression is Reduced in Senile Dementia of the Al-Zheimer Type. Nearochem. Res., 20 : pp. 859-862 .

Listrom, C. D., Morizono, H., RaJagopal, B. S., MeCann, M. T., Tuchman, M. and Allewell, N. M.,1997. Expression, Purification and Pharacterization of Recombinant Haman Glutamine Synthetase . Biochem. J., 328: pp.159-163 .

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.,1951. Protein measurement with Folin-Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193: pp. 265-275 .

McCormick, D.A., Clark, G.A., Lavond, D.G. and Thompson, R.F.,1982. Initial localization of the Memory Trace for a Basic form of Learning. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79: pp. 2731-2735.

Murray, R. K., Granner, D. K. and Mayes, P. A.,2000. A Lange Medical Book Harper's Biochemistry. 25th Ed,., McGraw-Hill Comp., New York, pp. 809, 568, 787 .

Plummer, T. D.,1978. An Introduction to Practical Biochemistry. 2nd Ed., McGraw - Hill Book Comp., U. K.

Ramirez, H., Delagado, J. M. and Garcia Peregmin, E., 1977. Some Properties of Glutamate Dehydrogenase from Agave Americana (l.) Leaves. Pfanzenphysiol., 84: pp.109-119.

Schacterle, G. R. and Pollack, R. L.,1973. A Simplified Method for the Quantitative Assay of Small Amount of Protein in Biological Material. Anal. Biochem., 51: pp.654-655 .

Schlee, D., Thöringer, C. and Tintemann, H.,1994. Purification and Properties of Glutamate Dehydrogenase in Scots pine Pinus Sylvestris Needles. Physiol. Plant., 92: pp. 467-472 .

Shapiro, B. M. and Stadtman, E. R.,1970. Glutamine Synthetase (Escherichia coli). in Tabor, h. and Tabor, W. C. (Eds.), Methods in Enzymology. Vol.17A, Academic Press, New York and London, pp.910-912.

Shatters, R. G., Liu, Y. and kahn, M. L.,1993. Isolation and Charactevization of Novel Glutamine Synthetase from Rhizobium Meliloti. J. Biol. Chem., 268 (1): pp.469-475.

Shin, D.; Park, S. and Park, C., 2003. A Splice Variant Acquiring an Extra Transcript Leader Region Decreases the Translation of Glutamine Synthetase Gene. Biochem. J., 374: pp.175-184 .

Smirnov, A. V., Tumani, H., Henne, S., Barchfed, S., Olgemoller, U., Wiltfang, J., Lange, P., Mader, M. and Nau, R.,2000. Clin. Chem. Acta, 292: pp.1-12 .

Smith, T. J., Peterson, P. E., Schmidt, T., Fang, J and Stanley, C., 2001. Structures of Bovine Glutamate Dehgdrogenase Complexes Elucidate the Mechanism of Purine Regulation. J. Mol. Biol., 307: pp.707-720 .

Smith, T. J., Schmidt, T., Fang, J., Wu, J., Siuzdak,G. and Stanley,C. A., 2002. The Structure of Apo Human Glutamate Dehydrogenase Details Subunit Communication and Allostery. J. Mol. Biol., 318: pp.765-777 .

Suarez, I., Bodega, G. and Fernandez, B.,2002. Glutamine Synthetase in Brain Effect of Ammonia. Neurochem. Int., 41: pp.123-142 .

Tateno, Y., 1994. Evolution of Glutamine Synthetase Gene is an Accordance with the Neutral Theory of Molecular Evolution. Jpn. J. Genet., 69: pp. 489-502 .

Timmerman, M., Wilkening, R. B and Regnault, P.,2003. Induction of Glutamate Dehydrogenase in the Ovine Fetal Liver by Dexamethasone in Fusion During Late Gestation. Exp. Biol. Med., 228: pp.100-105.

Vallorani, L., Polidori, E., Sacconi, C., Agostini, D., Pierleoni, R., Piccoli, G., Zeppa, S. and Stocchi, V., 2002. Biochemical and Molecular Characterization of Nadp-Glutamate Dehydrogenase from the Ectomycorrhizal Fungus Tuber Borchii. new phytol., 154: pp.779-790.

Zubay, G. L., 1998. Biochemistry.4th Ed, McGraw-Hill Comp. Inc., U.S.A., pp. 964-1962.