Partial Purification of phenylalanine hydroxylase from urine of patients with chronic renal failure

Al-Salihi, F. G.* ; Shaker, A. H.* and AL-Taie, A. K.**

***Department of chemistry, college of education for women, University of Tikrit, Tikrit, Iraq.**

**** Department of chemistry,College of Education , University of Tikrit , Tikrit. Iraq**

Keyword:

(Received : , Accepted :)

Abstract:

This study include purification of Phenylalanni hydroxylase (PAH) from patients urine with chronic renal failure. The purification steps include,protein precipitation with ammonium sulphate solution. And ion exchange chromatography by using (DEAE – Cellulose A – 50) as anionic exchanger . Then two isoenzymes (I,II) were seperated through gel filtration by using (sephadex G-200) with purification folds 20.5 & 23.7 respectivily .

the research also include the kinetics studies of the two partially purified isoezymes (I&II) . The Km values were 4 mM .The two isoenzymes shown an optimum pH at 7.2, and optimum temperature at 25 Cº.

تنقية جزئية لأنزيم الفنيل الالنين هيدروكسيلز من ادرار المصابيين بالفشل الكلوي المزمن

فراح غالي الصالحي اسماء هاشم شاكر عبدالرحمن خضير

قسم الكيمياء / كلية التربية للبنات قسم الكيمياء /كلية التربية

جامعة تكريت جامعة تكريت

الملخص:

تضمن البحث فصل وتنقية انزيم الفنيل الالنين هيدروكسيلز (PAH) جزئياً من ادرار المصابيين بالفشل الكلوي المزمن ، حيث شملت التنقية عدة خطوات ابتداءاً بالترسيب بأضافة محلول كبريتات الامونيوم وثم التخلص من الاملاح بأستخدام G Sephadex – 25 وثم استخدام الجزء البروتيني المفصول من Sephadex G-25 وتنقيته باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الايوني (DEAE – Cellulose A – 50) ، وثم تم اعادة الترسيب بمحلول كبريتات الامونيوم ، وثم اخذ الجزء المفصول وفصلة باستخدام Sephadex G – 200 حيث تم الحصول على متناظريين لـ (PAH) وبدرجات نقاوة متفاوتة (20.5 و23.78 مرة).

وشمل البحث ايضاً الدراسات الحركية للمتناظرات المفصولة اعلاه قييم الثابت Km للمتناظريين المنقاة من ادرار مرضى الفشل الكلوي المزمن ، و كان التركيز الامثل للمادة الاساس لكل المتناظرين I, II (4) ملي مولار : كما درس تاثير الاس الهيدروجيني للمتناظريين حيث كانت pH المثلى (7.2) في حين كانت درجة الحرارة المثلى 25 Cº .

مفتاح البحث : فنيل الالنين هيدروكسيلز Phenylalanine hydroxylase ، تنقية Purification

المقدمة:

يعد انزيم الفنيل الالنين هيدروكسليز (PAH) (EC 1.14.16.1) الانزيم المنظم والمحدد لسرعة المسار الايضي لتحويل الفنيل الالنين ،حيث يعمل على تحوله الى التايروسين ويستخدم المرافق الانزيمي BH_4 (Tetrahydrobiopterin) والحديد non-heme iron كعامل مرافق [1][2]. وبالتالي يعتبر مهماً في توليد هرمونات الكاتيكول امين مثل الدوبامين والادرينالين والنورادرينالين [3].

ويعد هذا الانزيم مهماً في المجال الطبي حيث يؤدي نقصه الى الاصابة بمرض الفنيل كيتون يوريا الذي يعد من الامراض الوراثية الناتجة من نقص انزيم الفنيل الالنين هيدروكسيلز [4][5] ، ويكون السبب في هذا النقص هو عن طريق حصول طفرة في الكروموسوم رقم 12 وقد تم العثور على مئات الطفرات المسببة للامراض المختلفة في الجين المسؤول عن التخليق الحيوي لأنزيم الـ PAH ، واي خلل في هذا الانزيم يسبب الاضطراب في التمثيل الغذائي للفنيل الالنين الذي يولد التيروسين [6][7] كما يؤثر على معدل الترشيح الكبيبي GFR حيث يمكن قياس نسبة تدفقه في البلازما الكلوية [8].

يوجد انزيم PAH في الانسان وبالاخص في الكبد والكلية بصورة اساسية وهناك بعض المؤشرات التنظيمية المختلفة التي تشير الى وجوده في بعض الانسجة الاخرى[9] . كما يوجد في الحيوانات ، وكذلك في بعض البكتريا ولم يحدد وجوده في النباتات مقارنة بالجينومات مثل الطحالب وحيدة الخلية chlamydomonas reinhardtii (Singl – Celled atya) والصنوبريات taeda الذي ادت الى الاقتراح لوظيفته في النباتات [10].

ولقد شلمت الدراسات السابقة تنقية الانزيم (PAH) من المصادر المختلفة ودراسة خواصه فقد تم تنقيتة من كلية الجرذ [11] وكذلك من كبد الجرذ والانسان وتم الحصول على متناظرات لهذا الانزيم وباوزان جزيئية متباينة [12]

وحيث لم تشر الدراسات الى تنقية هذا الانزيم من ادرار المرضى المصابيين بالفشل الكلوي المزمن . لذا فأن هدف البحث هو دراسة الصفات الحركية لمتناظري الانزيم (PAH) المنقاة من ادرار المرضى المصابيين بالفشل الكلوي المزمن .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

تم الحصول على النماذج المرضية للمصابين بالفشل الكلوي من مستشفى تكريت التعليمي بعد تشخيصها من قبل الاطباء الاخصائيين ، حيث جمعت 50 عينة ادرار قبل عملية الديلزة تتراوح اعمارهم بين 20 – 75 سنة ولكلا الجنسين (الذكور والاناث) .

التنقية الجزئية لأنزيم الفنيل الالنين هيدروكسسيلز من ادرار المرضى المصابيين بالفشل الكلوي المزمن

طريقة تقدير فعالية متناظرات انزيم الفنيل الالنين هيدروكسيلز

تم قياس فعالية انزيم **PAH** اعتماداً على طريقة الباحث Bublitze (1969)[13] بعد تطوير الطريقة اللونية للوصول لفعالية جيدة للانزيم ، والمتضمنة اضافة المرافق الانزيمي $DMBH_4$ والمادة الاساس الفنيل الالنين التي تتحول الى التيروسين بوجود انزيم **PAH** حيث يقدر التيروسين الناتج باستخدام كاشف 1-Nitroso -2- naphtol ليتكون معقد ذات لون اصفر – برتقالي تقاس شدة الامتصاصية بطول موجي 450 نانوميتر.

تقدير تركيز البروتين

اتبعت طريقة لوري Lowry method [14] لقياس تركيز البروتين في الادرار او الجزء الناضح وبإستعمال البومين مصل البقر Bovin serum albumin (BSA) كبروتين قياسي.

تنقية انزيم الفنيل الالنين هيدروكسيلز من الادرار

تم استخدام الخطوات التالية لتنقية انزيم الفنيل الالنين هيدروكسيلز من الادرار:

1. **اضافة المحلول المنظم لكبريتات الامونيوم: Addtion of ammonium sulphate buffer solution**
تم ترسيب بروتينات الادرار باستخدام تراكيز متغيرة من المحلول المنظم لكبريتات الامونيوم والمحضرة من محلول مشبع من كبريتات الامونيوم في درجة حرارة الغرفة مع محلول الامونيا المركزة بنسبة 1:20 وتخفف وصولاً الى PH=7.5 .اذ تم اضافة من هذا المحلول المنظم لكبريتات الامونيوم 0.5 مل / دقيقة ليصل الى 26 % من المحلول باستخدام حمام ثلجي مع التحريك المتواصل في درجة حرارة الغرفة خلال مدة 15 دقيقة ، ثم نضعه في الجهاز الطرد المركزي لمدى عشرة دقائق ثم ناخذ الراشح ونضيف عليه 44% من المحلول المنظم لكبريتات الامونيوم لمدة عشرة دقائق ، ثم نكرر وضعه في الجهاز الطرد المركزي ونفصله لمدة عشرة دقائق ،ثم ناخذ الراسب وندوبة بـ 8 مل من المحلول المنظم A والمحضر (من 0.1 مولاريTris- HCl PH= 7.2 ، ويحتوي على 0.1 مولاري من KCl ، 0.1 ملي مولار من Dithiothreitol ، 10 ملي مولار من phenylalanine، 5% من Glycerol) ، ثم يحفظ بالتجميد لمدة ليلة overnight[15].

2 . **الترشيح الهلامي Gel filtration**

اساس عمل هذه التقنية الاختلاف في الوزن الجزيئي ، اذ استعملت هنا كخطوة مبدئية للتخلص جزئياً من الاملاح والبروتينات المرافقة للانزيم حيث استخدمت عمود ترشيح هلام Sephadex G-25 بابعاد (2 ×22) سم ، واضيف اليه البروتين المعزول من الخطوة.

3. تركيز البروتين المذاب

تم جمع الجزء الناضح من خطوة الترشيح الهلامي اعلاه وتركيزه بوضعه في كيس الفصل الغشائي وغُمس في بلورات السكروز لمدة تتراوح بين 30 – 45 دقيقة .

4. كروماتوغرافيا التبادل الايوني Ion exchange chromatography

استعملت تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام عمود الراتنج DEAE – Cellulose A50 لتنقية PAH من الجزء البروتيني المركز. واجريت عمليــة الفصــل بدرجات حرارية منخفضة (12- 8)°م.

5. اعادة ترسيب البروتين :

يتم اخذ الجزء الناضح االمفصول بواسطة استخدام **DEAE – Cellulose A50** واضفة الية كمية متساوية من **ammonium sulphate buffer solution** ثم يوضع في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000دورة / دقيقة لمدة 10دقيقة ، ثم اخذ الراسب واضيف اليه 2 مل من المحلول المنظم A .

6. الترشيح الهلامي Gel filitration

تم تنقية متناظرات انزيم PAH جزيئاًمن خلال امرار الجزء المفصول بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الايوني في عمود الترشيح الهلام Sephadex G – 200 بأبعاد (3x 30 cm). حيث جمعت الاجزاء الناضحة من عمود الفصل و قُدرت فعالية انزيم PAH وتركيز البروتين لتلك الاجزاء.

7. **الترحيل الكهربائي Electrophoresis**

اتبعت طريقة Laemmli في تحضير هلام الفصل والترحيل الكهربائي مع بعض التحويرات[16].حيث تم الفصل على هلام الاكريل امايد بوجود صوديوم دوداسيل سلفيت (SDS-PAGA) ذو تركيز 10 % باستعمال صبغة كوماسي الزرقاء

CBB R250 لمتناظرات الانزيم (I,II) المنقاة جزئياً لانزيم PAH من طريقة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Sephadex G- 200 وبامرار التيار الكهربائي 250 فولت واستمرت عملية الفصل 8-9 ساعه تقريبا.

دراسة الصفات الحركية لمتناظرات الفنيل الالنين هيدروكسيلز (PAH) I,II

تمت دراسة الصفات الحركية لمتناظرات الانزيم (**I,II**) في الاجزاء الناضحة وشملت مايلي :

أ. تأثير تركيز المادة الاساس phenylalanine (Phe)

تم دراسة تأثير التراكيز المختلفة للمادة الاساس (**Phe**) على فعالية انزيم PAH للمتناظرين (I , II)، اذ استعملت التراكيز (0.5 , 1 , 1.5 , 2 , 2.5 , 3 , 3.5, 4, 4.5 , 5) ملي مولار لايجاد تركيز المادة الاساس الامثل لعمل متناظرات انزيم PAH (**I,II**) .

ب . . تعيين قيم ثابت ميكاليس – منتن (Km)

تم الحصول على قيم Km الخاصة بمتناظرات انزيم PAH باستعمال طريقة لينوفر – بيرك البيانية والتي تربط بين القيم العكسية لكل من السرعة وتركيز Phe (1/v vs. 1/[S]) .

ج. تاثير الدالة الحامضية

دُرس تأثير الاس الهيدروجيني للمحلول المنظم (200 mM Tris HCL) على سرعة تفاعل المتناظرين (I , II) لانزيم PAH ، اذ استعملت محاليل ذات pH مختلفة (6.2 ، 6.4، 6.6، 6.8 ، 7 ، 7.2 ، 7.4 ، 7.6 ، 7.8 ، 8) بوجود المادة الاساس Phe بتركيز 4mM ودرجة حرارة 25 °م ، وقُيست فعالية الانزيم كما موضح اعلاه اذ تم تعيين pH الامثل من خلال رسم العلاقة بين سرعة التفاعل والاس الهيدروجيني.

د. تأثير درجة الحرارة

كما تم استخدام الطريقة في الفقرة اعلاه في قياس فعالية انزيم PAH حيث تم اجراء التفاعل في درجات حرارية مختلفة (0 , 10 , 20 , 25 , 30 , 40 , 50 , 60)°م بوجود المحلول المنظم (200 mM Tris HCl) ذو pH 7.2 وتركيز المادة الاساس(Phe) 4mM ، ومن ثم رسمت العلاقة بين سرعة التفاعل ودرجة الحرارة للمتناظرين (I,II).

النتائج والمناقشة

شملت هذه الدراسة عملية فصل وتنقية جزئية لأنزيم PAH ومتناظراته من ادرار مرضى الفشل الكلوي المزمن ، حيث رسب الانزيم في الخطوة الاولى بأستخدام تراكيز متزايدة من المحلول المنظم لكبريتات الامونيوم ، وتم التخلص من الملح الزائد بطريقة الترشيح الهلامي وبأستخدام عمود الهلام Sephadex G-25 حيث بلغت درجة التنقية للانزيم بهذه المرحلة 14.2 وبحصيلة انزيمية 36.6% . وبعدها تم فصل متناظرات انزيم PAH بطريقتي كروماتوغرافيا التبادل الايوني بأستخدام الراتنج DEAE – Cellulose A50 والترشيح الهلامي بأستخدام عمود الهلام Sephadex G-200 حي تم الحصول على متناظرين I و II كما موضح في الشكل (1) وبدرجات نقاوة , اذ بلغت درجة التنقية للمتناظر I (20.562) مرة والمتناظر (II) (23.71) مرة كما موضح في الجدول (1) .

وجاءت نتائج هذه الدراسة بالحصول على متناظرين متطابقة مع ماتوصل اليه Kufman و Fisher (1970)[17] في فصل متناظرين من كبد الانسان البالغ لانزيم الفنيل الالنين هيدروكسيلز باستخدام تقنية كروماتوغرافية الترشيح الهلامي

Step	Elute (ml)	Activity (I U/ml)	Total activity (I U)	Protein conc. (mg/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (I U/mg)	Purification (Fold)	Yield %

Sephadex G- 200 , ويخالف Charles Y وجماعته (1972)[18] باستخدام Sephadex G100 لفصل متناظر واحد من كبد الفأر ، ومتناظر واحد من مصل الدم عند اصحاء ومرضى الفشل الكلوي المزمن لـ Clive Stonier وجماعته (1984)[19].

عند استخدام طريقة الفصل بالترحيل الكهربائي على هلام SDS-PAGA ذو تركيز 10 % باستعمال صبغة كوماسي الزرقاء CBB R250 حيث اظهر حزمة منفردة لكل المتناظرين (I , II) المنقاة جزئياً لانزيم PAH بطريقة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Sephadex G- 200 وبالتالي يتضح من مواقع هذه الحزم بأن للمتناظرين وزن جزيئي يقع بين بروتيني BSA و Ovalbumine (66.5 و 45) KDa وهذا مايتوافق ماتوصل اليه كل من Flatmark T و Stevens PC (1999)[20] و Makoto Yamashita وجماعته (1985)[21] كماموضح في الشكل (2) .

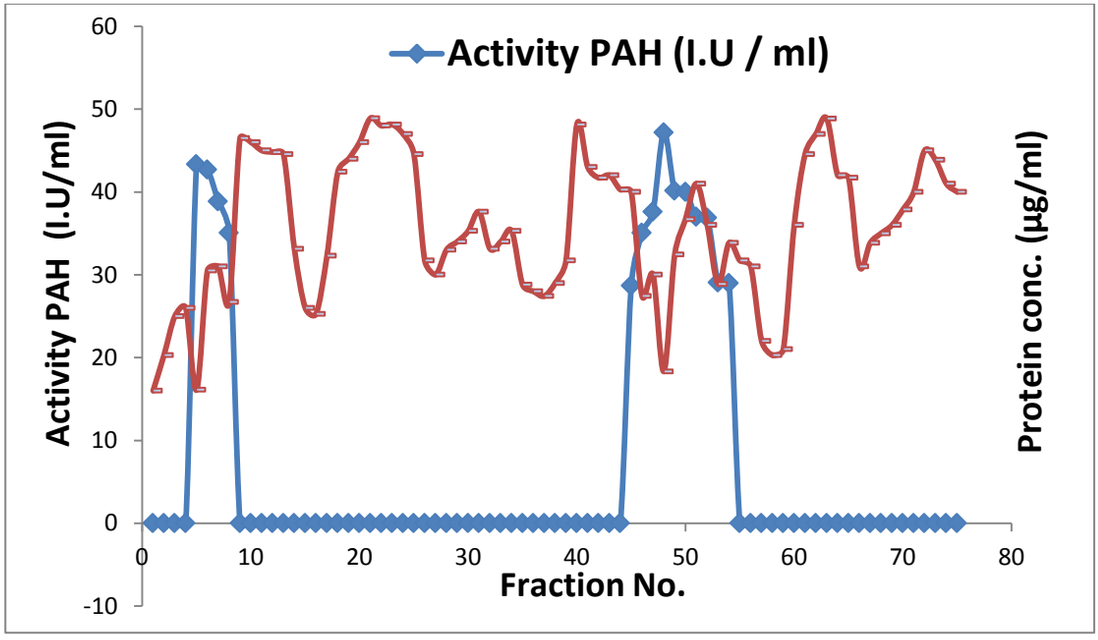
لقد اوضحت نتائج الدراسة تأثير تركيز المادة الاساس (Phe) في سرعة التفاعل الانزيمي للمتناظرين (I , II) مع ارتفاع تركيز المادة الاساس حتى يصل الى السرعة القصوى عند التركيز (4) ملي مولار ، ومن ثم يبدأ بالانخفاض عند التراكيز العالية نتيجة لحدوث التثبيط كما موضح في الشكل رقم (3) . وتم تعيين الثابت Km بالاعتماد على معادلة لينوفر بيرك كما موضح في الشكل رقم 4 و 5 للمتناظرين (I, II) حيث بلغت قيمة Km للمتناظر I (1.25) ملي مول والمتناظر II (1.66) ملي مولار

كما اوضحت الدراسة حدوث تغيير في سرعة تفاعل المتناظرات لانزيم PAH (I , II) مع تغيير في الدالة الحامضية الى ان يصل الى السرعة القصوى عند الدالة الحامضية 7.2 للمتناظرين (I , II) كما موضح في الشكل رقم (6)

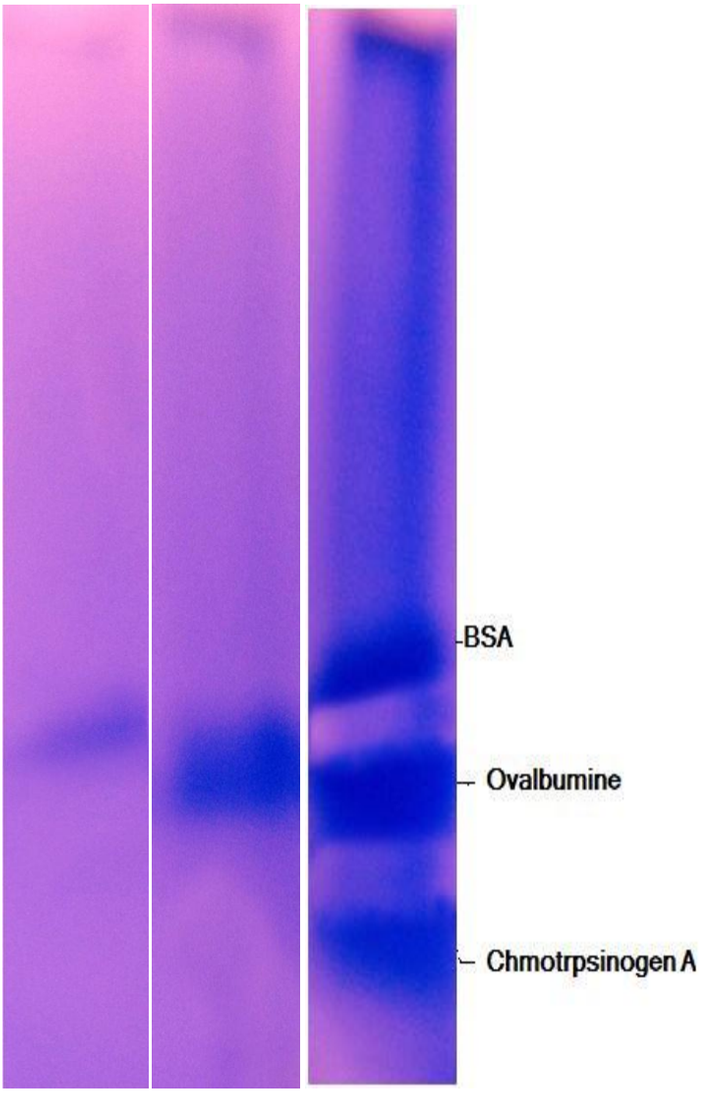
كما اظهرت نتائج الدراسة تاثير درجة الحرارة في سرعة تفاعل متناظرات انزيم PAH (I, II) كما موضح في الشكل (7) حيث ترتفع سرعة التفاعل بارتفاع درجات الحرارة الى حد الوصول الى السرعة القصوى عند درجة الحرارة 25 م˚ وثم تبدأ سرعة التفاعل بالانخفاض مع ارتفاع درجة الحرارة .

جدول (1) : فصل وتنقية متناظرات الانزيم PAH من ادرار مرضى المصابيين بالفشل الكلوي المزمن

Crud Urine	**20**	**24.2**	**482**	**0.186**	**3.72**	**130.107**	**1**	**100**
Ammonium sulphate	**8**	**33.16**	**265.28**	**0.1324**	**1.0592**	**250.453**	**1.93**	**55.037**
Sephadex G25	**2**	**88.626**	**177.252**	**0.0481**	**0.096**	**1842.53**	**14.1617**	**36.622**
(Ion exchange) **DEAE-Cellulose A50**	**4**	**67.59**	**270.36**	**0.03528**	**0.1411**	**1915.816**	**14.725**	**56.09**
Ammonium sulphate	**4**	**70.1**	**280.4**	**0.0301**	**0.1204**	**2328.9**	**17.899**	**58.174**
(Gel filtration) Sephadex G200 **Isoenzyme -I**	**2**	**43.34**	**86.68**	**0.0162**	**0.0324**	**2675.31**	**20.562**	**18**
Isoenzyme - II	**2**	**47.19**	**94.38**	**0.0153**	**0.0306**	**3084.313**	**23.71**	**20**

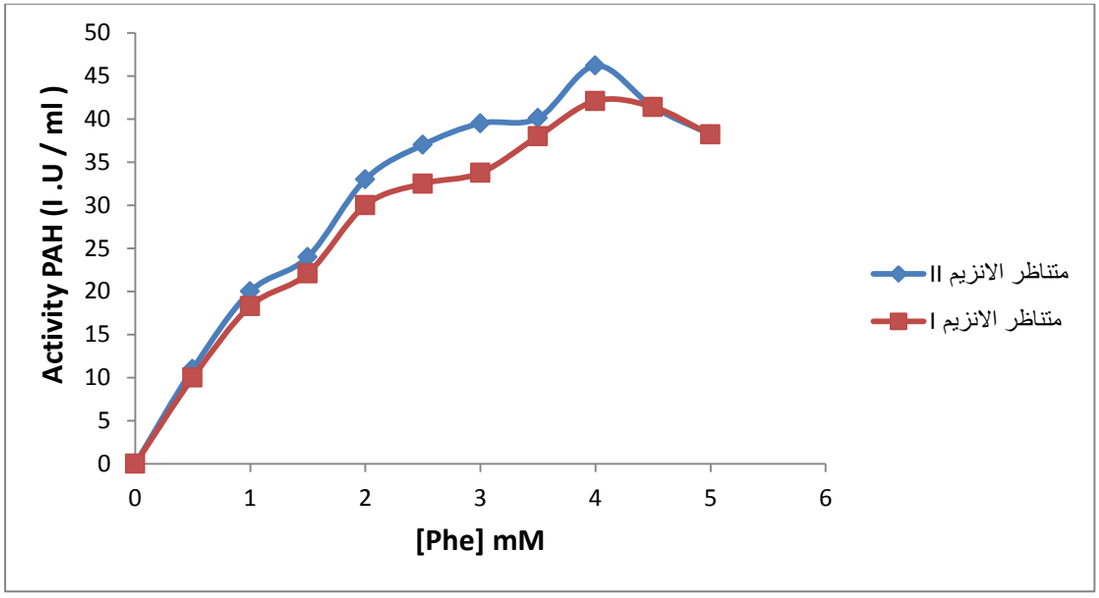


شكل 1 : فصل وتنقية متناظرات انزيم (PAH) (I, II) المنقاة من ادرار مرضى المصابيين بالفشل الكلوي المزمن باستخدام تقنية Sephadex G- 200 .

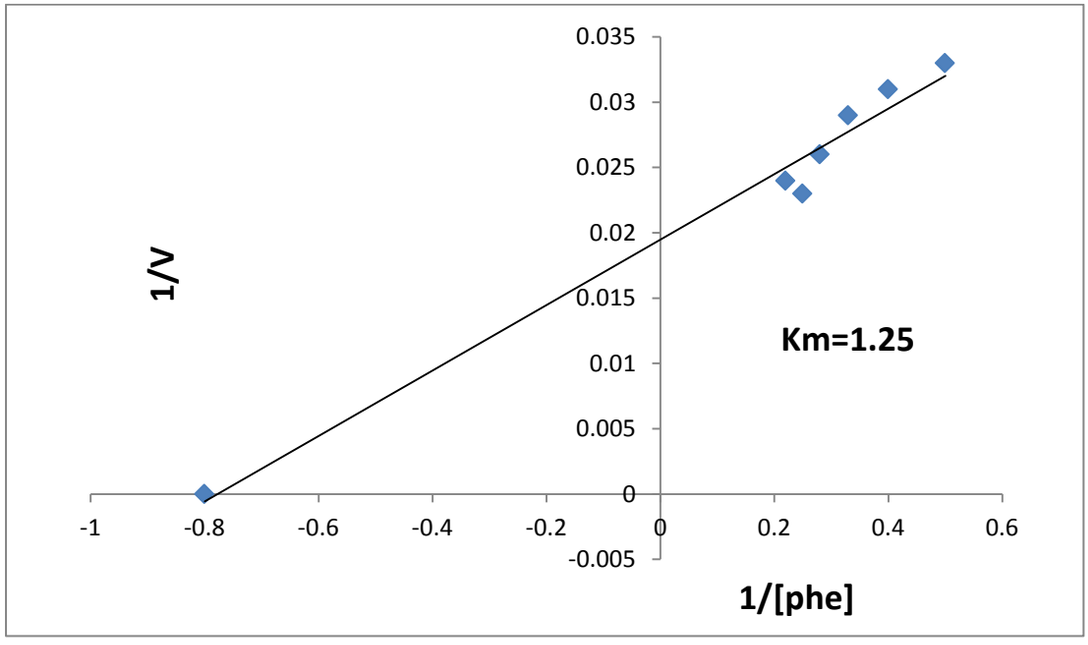


19. البروتينات القياسية (2) المتناظر (II) للانزيم المنقى بخطوة Sephadex G -200 (3) المتناظر (I) للانزيم المنقى بخطوة Sephadex G -200 .

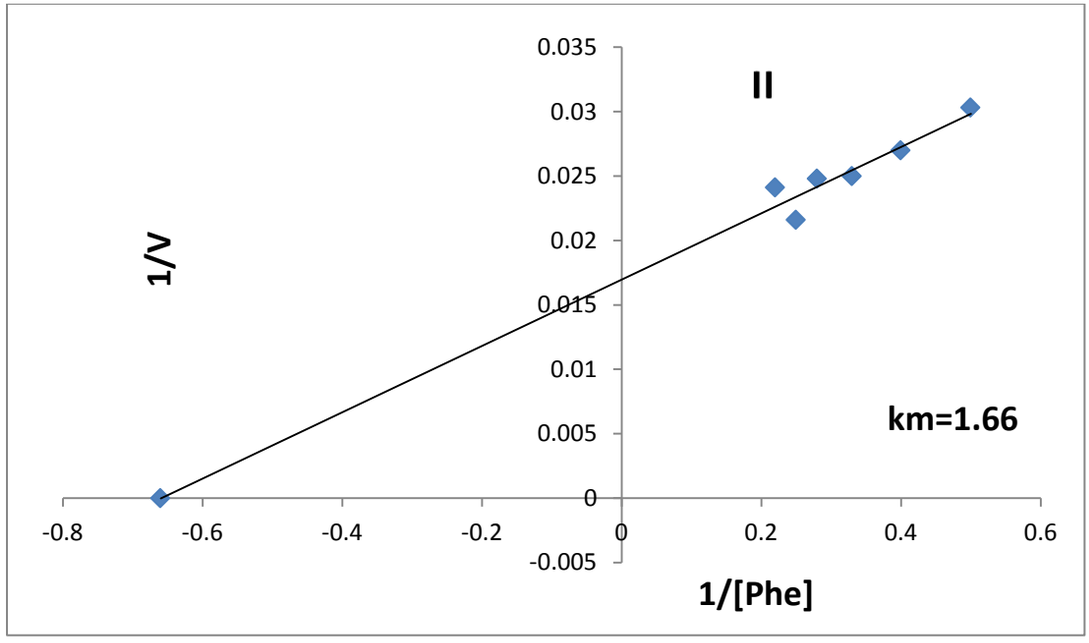
شكل (2) الترحيل الكهربائي لأنزيم PAH المنقى من ادرار مرضى الفشل الكلوي المزمن .



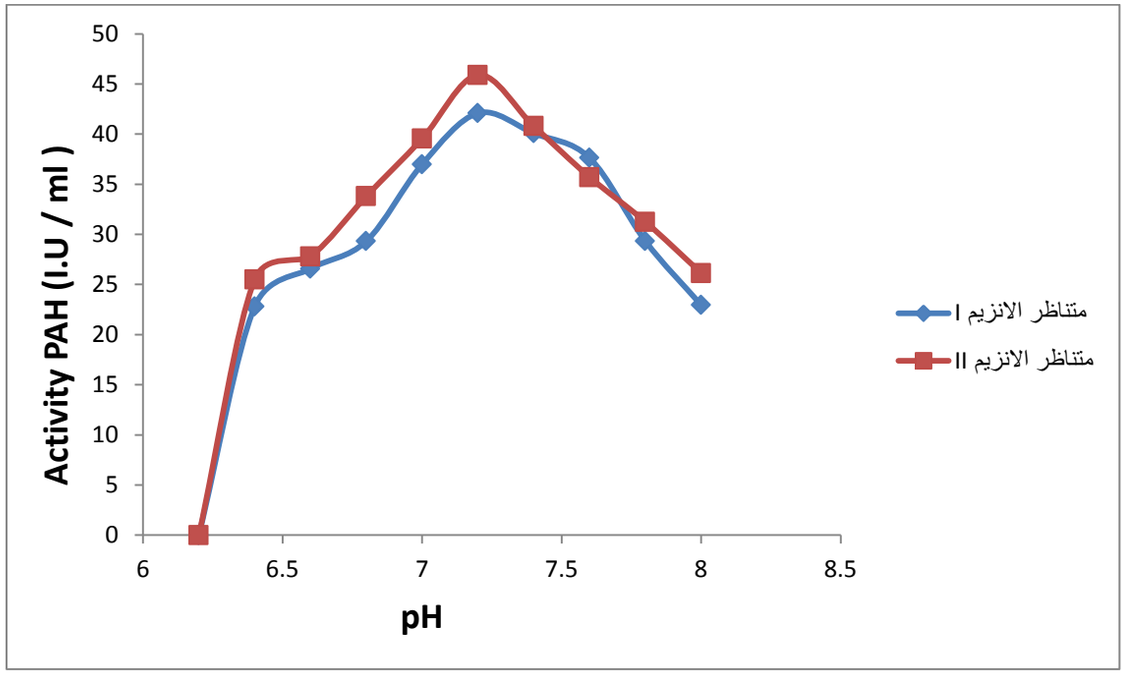
شكل (3) : العلاقة بين تراكيز مختلفة للفنيل الالنين (Phe) وسرعة تفاعل المتناظرات (I, II) المنقاة من ادرار مرضى المصابيين بالفشل الكلوي المزمن .



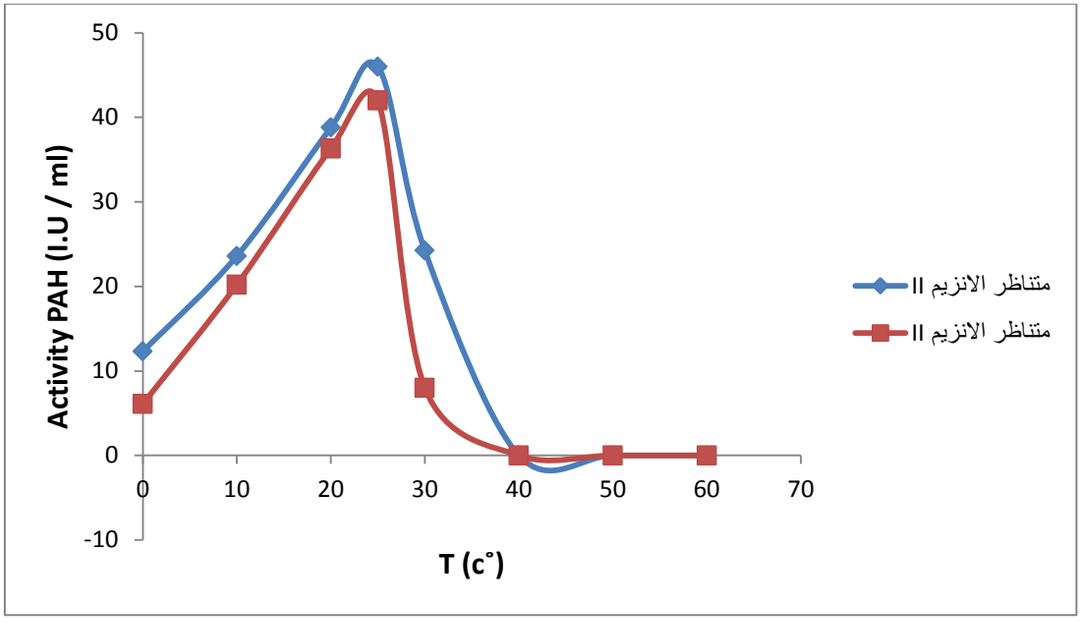
شكل (4) : رسم Lineweaver-Burk لحساب ثابت ميكلس منتن للمتناظر I المنقى من ادرار المصابيين بالفشل الكلوي المزمن.



شكل (5) : رسم Lineweaver-Burk لحساب ثابت ميكلس منتن للمتناظر II المنقى من ادرار المصابيين بالفشل الكلوي المزمن



شكل (6) : تاثير الدالة الحامضية على سرعة تفاعل متناظرات انزين PAH (I, II) المنقاة من ادرار مرضى المصابيين بالفشل الكلوي المزمن .



شكل (7): تاثير درجة الحرارة على سرعة تفاعل متناظرات انزين PAH (I,II) المنقاة من ادرار مرضى المصابيين بالفشل الكلوي المزمن .

Reference

1 . Fitzpatrick PF. , Annu. Rev. Biochem., (68), 355–81,(1999).

2. Kaufman S. , J. Biol. Chem. , 230, (2) , 931–9 , (1958).

3. Flatmark T, Stevens RC. , Chem. Rev. , 99 (8), 2137–2160, (1999).

4. www.medterms.com "Definition of Phenylalanine hydroxylase deficiency" Medicine net .com, (2011).

5. http://www.genenames.org Phenylalanine hydroxylase (PAH) gene summary, (2006).

6. Oh, H. J., Park, E. S., Kang, S., Jo, I., Jung, S. C., Pediatric Research 56 (2), 278–284, (2004).

7. Gibbs, Richard A., Jeffrey Rogers, Michael G. Katze, Roger Bumgarner, George M. Weinstock, Elaine R. Mardis et al., Science , 316 (5822), 222–234, (2007).

8. Wiseman, M.J., Mangili, R., Alberetto, M., Keen, H., Viberti, G. Kidney Int. , (1987).

9. Lichter-Konecki U, Hipke CM, Konecki DS. , Mol. Genet. Metab., 67 (4), 308–16, (1999).

10. Naponelli V, Noiriel A, Ziemak MJ, Beverley SM, Lye LF, Plume AM, Botella JR, Loizeau K, Ravanel S, Rébeillé F, de Crécy-Lagard V, Hanson AD, Plant Physiol., 146(4), 1515-27, (2008).

11.Desirazu . Narasiha Rao &Seymour , The Journal of Biological Chemistry , 261, (19),. 8866-8876, (1986).

12. John A. Barranger, Paul J. Geiger, A. Huzino and Samuel P. Bessman , Science, New Series, 175,(4024) , 903-905, (1972).

13. Bublitz, C . , Biochim.Biophys.Acta , 191, 249-256, (1969).

14. Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, L. and Randall, J. , J. Biol. Chem., 193, 265 – 275,(1951).

15.Sa vio L. C. Woo , Shirley SU Gillamt and Louis I . Woolf. , Biochem . J. 139,741-749, (1979).

16. Laemmli, U.K, Nature, 227, 680 – 685 ,(1970).

17. Kaufman and D. B. Fisher ,J. Biol. Chem., 245, 4745-4750 , (1970).

18.Charles Y. Huang, Edward E. Max , and Seymour Kaufman, The Journal of Biological Chemistry . 248, (12), 8866-8876 ,(1972).

19.Clive Stonier , Eddward H . Mcgale and Geoffrey M. Aber. , Clinca chemical Acta , 143, 115-122. (1984)

20. Flatmark T, Stevens RC. , Chem. Rev. 99, (8) , 2137–2160 ,(1999).

21.Makoto Yamashita , sadamasa minato , Mamoru Arai , Yukichi Kishida , Toshiharu Nagatsu and Hamao Umezawa, Biochemical and Biophysical Research Communication , 133 , (1) , 202-207, (1985).