

## مقایسه سینتیکی و ترمودینامیکی آنزیم

### آدنوزین دآمیناز روده و طحال

قاسم عطایی جعفری<sup>۱\*</sup>، فروزان زهوی<sup>۲</sup>، عادلہ دیوسالار<sup>۳</sup>، علی اکبر موسوی مومدی<sup>۴</sup>، علی اکبر مینوری<sup>۴</sup>، شاهرخ صفریان<sup>۵</sup>، مهران مینبی (ضای)<sup>۵</sup>، لطیف گچکار<sup>۶</sup>

سونیا مردانیان<sup>۷</sup>

#### چکیده

**سابقه و هدف:** آنزیم آدنوزین دآمیناز (ADA) یک آنزیم کلیدی در متابولیسم پورین‌ها می‌باشد. این آنزیم تنظیم کننده غلظت آدنوزین به عنوان یک پیام‌آور و هورمون عصبی بوده و نقش مهمی در سیستم ایمنی و عصبی ایفا می‌کند. برای درمان بیماران مبتلا به نقص در فعالیت آنزیم از روش آنزیم جایگزین استفاده می‌شود که از منابع مختلف (روده، طحال، مغز) استخراج می‌گردد. در این پژوهش دو منبع اصلی ADA جهت جایگزینی با یکدیگر مقایسه می‌شوند.

**مواد و روش‌ها:** نتایج سینتیکی و ترمودینامیکی اثر اینوزین به عنوان محصول واکنش آنزیمی و همچنین به عنوان یک مهارکننده روی آنزیم آدنوزین دآمیناز (ADA) روده و طحال در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با  $PH=7.5$  و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد بدست آمده و از روش‌های اسپکتروفتومتری و تیتراسیون میکروکالری متری هم‌دما استفاده شده است. به منظور مقایسه پایداری ترمودینامیکی دو آنزیم ADA روده و طحال تغییرات جذب در ۲۸۰ نانومتر در حضور غلظت‌های مختلف دودسیل تری متیل آمونیم برماید (DTAB) بعنوان غیر طبیعی کننده مورد بررسی قرار گرفته است.

**یافته‌ها:** اینوزین که محصول واکنش کاتالیتیکی آنزیم ADA بر روی سوبسترای اصلی خود آدنوزین می‌باشد، اثر مهارکنندگی بر فعالیت کاتالیتیکی آنزیم داشته و به عنوان یک مهار کننده رقابتی برای آنزیم ADA محسوب می‌شود. مطالعات سینتیکی نشان داده است که میزان ثابت اتصال اینوزین به آنزیم ADA روده و طحال به ترتیب برابر با ۱۴۳ و ۱۴۹ میکرومولار می‌باشد که به خوبی با مقدار ثابت اتصال بدست آمده از روش میکروکالری متری هم‌دما (۱۴۰ و ۱۵۲ میکرومولار) مطابقت دارد و بیانگر این است که ثابت اتصال اینوزین به آنزیم ADA روده، کوچکتر از ADA طحال می‌باشد. مقایسه پارامتر سینتیکی  $k_{cat}$  یا راندمان و همچنین ثابت ویژگی  $k_{cat}/K_m$  نشان می‌دهد که راندمان و ثابت ویژگی ADA روده بیش از دو برابر ADA طحال می‌باشد. مقایسه مطالعات ترمودینامیکی هر دو آنزیم ADA روده و طحال نشانگر پایداری بیشتر ADA روده نسبت به ADA طحال است زیرا،  $[DTAB]1/2$  و  $\Delta G^\circ(H_2O)$  برای ADA روده به ترتیب معادل ۳/۷۵ میلی‌مولار و ۱۷/۹ KJ/mol است در حالی که برای ADA طحال برابر با ۳/۲۵ میلی‌مولار و ۱۶/۸ KJ/mol می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** مقایسه پارامترهای سینتیکی و ترمودینامیکی بدست آمده برای آنزیم آدنوزین دآمیناز روده و طحال نشان می‌دهد که آنزیم آدنوزین دآمیناز روده از نظر سینتیکی فعال‌تر و از نظر ترمودینامیکی پایداری بیشتر از آنزیم آدنوزین دآمیناز طحال می‌باشد. بنابراین توصیه می‌شود برای درمان بیماران مبتلا به نقص در فعالیت آنزیم ADA در انسان به روش آنزیم جایگزین از ADA روده با پایداری و فعالیت کاتالیتیکی بیشتر استفاده شود.

**واژگان کلیدی:** آدنوزین دآمیناز روده، آدنوزین دآمیناز طحال، سینتیکی، ترمودینامیک، اینوزین، DTAB

\* نویسنده مسؤول: استادیار، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، آدرس پستی: میدان تجریش - ابتدای خیابان دربند - دانشکده پیراپزشکی - بخش شیمی

Email: ataie@ibb.ut.ac.ir

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد شیمی فیزیک

<sup>۳</sup> دانشجوی دکتری بیوفیزیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران

<sup>۴</sup> استادیار، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران

<sup>۵</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه تهران

<sup>۶</sup> عضو هیات علمی و مشاور پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۷</sup> استادیار، آکادمی علوم ارمنستان

## مقدمه

آنزیم آدنوزین دامیناز (E.C.3,5,4,4ADA) یک آنزیم کلیدی در متابولیسم پورین‌ها می‌باشد و به طور برگشت ناپذیر هیدرولیز داکسی آدنوزین را به داکسی اینوزین و آمونیاک کاتالیز می‌کند (۱). مقدار Km آنزیم برای آدنوزین ۴۵ و برای داکسی آدنوزین ۳۴ میکرومولار می‌باشد (۲،۳). PH مطلوب برای فعالیت آنزیم در ناحیه pH خنثی است (۴). این آنزیم در تکامل نژادی در انواع موجودات زنده به طور گسترده توزیع شده و توالی اسیدهای آمینه آن از باکتری تا انسان به شدت محافظت شده است (۵). بهمین دلیل ADA یک آنزیم کلیدی در متابولیسم پورین‌ها می‌باشد. ADA در گیاهان، باکتری، مهره‌داران و بی‌مهرگان و پستانداران به خصوص انسان یافت می‌شود (۶،۷) و در تمام بافت‌های انسانی وجود دارد ولی با بالاترین میزان در سیستم لنفوئیدی مانند lymph nodes، طحال، تیموس بروز می‌نماید (۸). فعالیت آن در سلول‌های T بیشتر از سلول‌های B و در بافت مغزی بیشتر از بافت عصبی می‌باشد (۹). در انسان فعالیت ADA به طور عمده توسط دو ایزو آنزیم مجزا صورت می‌گیرد که به صورت ADA1 و ADA2 نشان داده می‌شود (۱۰). ADA1 به دو صورت کلی وجود دارد، یکی به صورت مونومریک با جرم ملکولی ۳۳۰۰۰ (شکل کوچک) و دیگری به صورت کمپلکس دوتایی با پروتئین دارای وزن ملکولی ۲۸۰۰۰۰ (شکل بزرگ) که این کمپلکس تاثیری بر فعالیت کاتالیتیکی آنزیم ندارد (۱۱). ADA2 فقط به صورت مونومریک با وزن ملکولی ۱۰۰۰۰۰ وجود دارد (۱۰). سیستم سلولی مونوسیت - ماکروفاژ در انسان منبع عمده ADA2 می‌باشد.

تعیین توالی آنزیم ADA استخراج شده در انسان در سال ۱۹۸۴ (۱۲)، ADA موش در سال ۱۹۸۵ (۱۳)، E-coli ADA در سال ۱۹۹۱ (۵) و ساختمان اولیه ADA گوساله در سال ۱۹۹۶ نیز گزارش شده است (۱۴). همولوژی در سه آنزیم استخراج شده از پستانداران بسیار زیاد است. توالی ADA انسان و موش ۸۳٪ تشابه و بین ADA موش و گوساله ۸۵٪ می‌باشد. در حالی که ADA انسان و گوساله ۹۱٪ تشابه را نشان می‌دهد. به طور اختصاصی اسیدهای آمینه در اطراف جایگاه فعال به شدت محافظت شده است و فقط یک اسید آمینه در جایگاه فعال آنزیم ADA انسان با ADA موش اختلاف دارد و تمام اسیدهای آمینه اطراف جایگاه فعال در انسان و گوساله با یکدیگر مشابه است (۱۵). ساختمان کریستالی ADA موش برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ گزارش شده است (۱۶). تمام مطالعات کریستالوگرافی

توسط اشعه X فقط برای ADA موش صورت گرفته (۱۷،۱۸). اگرچه ADA گوساله به شدت به ADA انسان مشابه است ولی از نظر عملکرد می‌تواند متفاوت باشد (۱۵).

آنزیم آدنوزین دامیناز نقش مهمی در سیستم ایمنی و عصبی ایفا می‌کند. فقدان ارثی این آنزیم همراه با بیماری کمبود مختلط شدید سیستم ایمنی یا Severe Combined Immune (SCID) Deficiency می‌باشد (۱۹،۲۰). فعالیت کاتالیتیکی ویژه این آنزیم در بافت‌های لنفوئیدی عادی و در تیموس، طحال، لنفوسیت‌های T زیاد است (۲۱). کمبود ADA لنفوسیت موجب نقصان در هر دو سلول‌های B و T شده که در مراحل اولیه حیات به صورت عفونت‌های شدید ظاهر می‌گردد (۲۲). در بیماری ایدز (AIDS) غلظت آنزیم به صورت غیر عادی است (۲۳). برای درمان بیماران مبتلا به نقص در فعالیت آنزیم می‌توان از دو روش ژن درمانی Gene therapy (۲۴) و درمان توسط آنزیم جایگزین Enzyme- replacement therapy استفاده کرد. ADA گوساله که توسط پلی اتیلن گلیکول استخراج شده جهت جایگزین کردن کمبود ADA در انسان توصیه می‌شود (۲۵). ADA گوساله می‌تواند از منابع مختلف مانند مغز، طحال، روده استخراج گردد. با توجه به این که آنزیم فوق دارای ایزوآنزیم‌های متنوع با فعالیت‌های مختلفی می‌باشد در مطالعه حاضر به دلیل اهمیت خاص این آنزیم فعالیت سینتیکی و ترمودینامیکی همراه با پایداری آنزیم در مقابل مواد فعال سطحی به عنوان غیر طبیعی کننده را بر روی دو نمونه آنزیم روده گوساله Bovine intestinal و طحال گوساله Bovine spleen مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

تعیین پارامترهای سینتیکی (Km, Vmax, Ki) با استفاده از دیاگرام لاینویور-برک ویا ادی - هافستی با استفاده از طیف سنج UV مدل Shimadzu - ۳۱۰۰ و نرم افزار Trinity software در غلظت ۱/۴ نانو مولار از آنزیم و غلظت‌های متغیر از آدنوزین (۳-۵ Km) در حضور چندین غلظت متفاوت اینوزین در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار در pH=۷/۵ و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. تغییرات جذب با کاهش غلظت آدنوزین در طول موج ۲۶۵ نانومتر با ضریب جذب مولی ۱-۱cm-۱ mM-۸/۴ (۲۶) و یا افزایش غلظت اینوزین در طول موج ۲۳۵ نانومتر با ضریب جذب مولی ۱-۱cm-۱ mM-۳/۵ قابل اندازه‌گیری است (۱۸). حجم کل در تمام

مقادیر  $K_m$  ظاهری دو آنزیم روده و طحال در غلظت‌های مختلف اینوزین در جدول ۱ نشان داده شده است. همانگونه که در شکل (1a,b) مشاهده می‌شود محل برخورد نمودارها بر روی محور  $1/V$  روی یک نقطه متمرکز می‌باشد ( $V_{max}$  ثابت). بنابراین در حضور غلظت‌های مختلف اینوزین مقدار  $V_{max}$  تغییری نکرده در حالی که با افزایش غلظت اینوزین مقادیر  $K_m$  ظاهری ( $K'_m$ ) افزایش پیدا کرده است. اطلاعات بالا بیانگر این موضوع است که اینوزین به عنوان مهار کننده رقابتی برای آنزیم آدنوزین دامیناز عمل می‌کند.

برای تعیین ثابت بازدارندگی با ثابت اتصال اینوزین ( $K_i$ ) برای آنزیم آدنوزین دامیناز طحال و روده نمودار ثانویه مقادیر  $K_m$  ظاهری ( $K'_m$ ) در مقابل غلظت‌های ثابت اینوزین رسم شده است (نمودار 2a,b).  $K_i$  برای ADA روده برابر با ۱۴۳ میکرومولار و برای ADA طحال ۱۴۹ میکرومولار محاسبه شد. نتایج بدست آمده از برهم کنش آنزیم آدنوزین دامیناز روده و طحال با اینوزین توسط کالریمتری تیتراسیون هم دما نشان می‌دهد که این برهم کنش گرمازا بوده و گرمای مثبت شده آن منفی است. نمودار تغییرات  $\Delta H$  در مقابل  $K$  (ثابت تفکیک) مقادیر ثابت تفکیک بدست آمده از روش کالریمتری تیتراسیون هم دما برای ADA روده برابر با ۱۴۰ میکرومولار (نمودار 3a) و برای ADA طحال برابر با ۱۵۲ میکرومولار (نمودار 3b) می‌باشد که به مقادیر  $K_i$  بدست آمده از روش سینتیکی (به ترتیب ۱۴۳ و ۱۴۹ میکرومولار ADA روده و طحال) نزدیک است. بازدهی ( $k_{cat}$ ) محاسبه شده برای ADA روده و طحال با استفاده از رابطه  $k_{cat} = V_{max}/[E]_t$  به ترتیب  $1.9 \times 10^9 / 3.6$  و  $1.7 \times 10^9 / 4.7$  می‌باشد. نمودار (4a,b) به ترتیب نمودار دنا توره شدن تغییرات جذب برای ADA طحال و روده در مقابل افزایش غلظت DTAB را نشان می‌دهد. برای هر غلظت DTAB می‌توان انرژی آزاد استاندارد گیبس ( $\Delta G^\circ$ ) را محاسبه کرد. نمودار (5a,b) نمودار تغییرات  $\Delta G^\circ$  در مقابل غلظت DTAB می‌باشد که از برخورد آن با محور عرض‌ها  $\Delta G^\circ(H_2O)$  بدست می‌آید. کلیه پارامترهای سینتیکی و ترمودینامیکی آنزیم ADA روده و طحال در جدول ۲ خلاصه شده است.

آزمایش‌ها یک میلی‌لیتر بوده و مسیر عبور نور یک سانتی‌متر با استفاده از کووت کوارتز یک میلی‌لیتری انجام گرفت. غلظت آنزیم درون سلول در بافر فسفات ۷/۲ میکرومولار با  $pH = 7.5$  و افزایش غلظت DTAB در هر مرحله ۰/۵ میلی‌مولار بود.

برای مقایسه بازدهی دو آنزیم از  $k_{cat}$  (که سرعت حد در یک واکنش کاتالیتیکی آنزیمی است) و رابطه  $k_{cat} = V_{max} / [E]_t$  استفاده شد. پارامتر ترمودینامیکی با استفاده از میکرو کالری متری هم دما Isothermal titration microcalorimetry (I.T.C) در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد با  $pH = 7.5$  در بافر فسفات محاسبه شد. واکنش طی ۱۵ ساعت (هر ساعت یک تزریق) در حضور و عدم حضور اینوزین صورت گرفت. سیگنال‌های کالری متری توسط ولت‌متر دیجیتال اندازه‌گیری گردید. تغییرات آنتالپی توسط برنامه کامپیوتری Digitam محاسبه شده است (۲۷). با استفاده از این روش می‌توان آنتالپی پیوند شدن اینوزین به آنزیم و ثابت تفکیک آنزیم با اینوزین را محاسبه کرد (۲۸).

مقایسه پایداری دو آنزیم در مقابل عوامل غیر طبیعی کننده توسط اثر متقابل دودسیل تری متیل آمونیم برماید (DTAB) بر آنزیم به روش طیف سنجی در ۲۷۹ نانومتر انجام شد. برای محاسبه انرژی آزاد در غیاب دنا توره کننده ( $\Delta G^\circ(H_2O)$ ) و غلظتی از دنا توره کننده که موجب می‌شود ۵۰٪ دنا توره شدن صورت گیرد ( $[DTAB]1/2$ ) تغییرات جذب برای ADA طحال و روده در مقابل افزایش غلظت DTAB رسم شد و بر طبق معادلات Pace محاسبه گردید (۲۹).

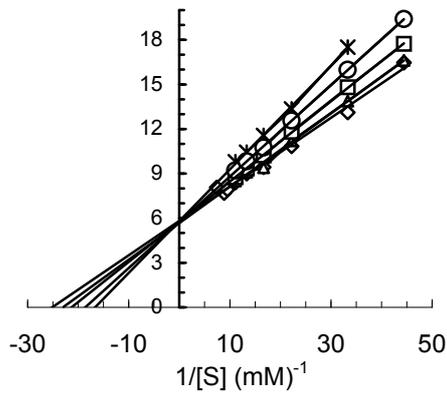
## یافته‌ها

نمودار (1a,b) به ترتیب نمودار لاینویور-برک برای آنزیم آدنوزین دامیناز طحال و روده را نشان می‌دهد که این نمودارها در غلظت‌های مختلف آدنوزین به عنوان سوبسترا ( $K_m$  ۲/۵ - ۰/۲۵) و در حضور غلظت‌های مختلف اینوزین در درجه حرارت ۲۷ درجه سانتی‌گراد و  $pH = 7.5$  رسم شده است.

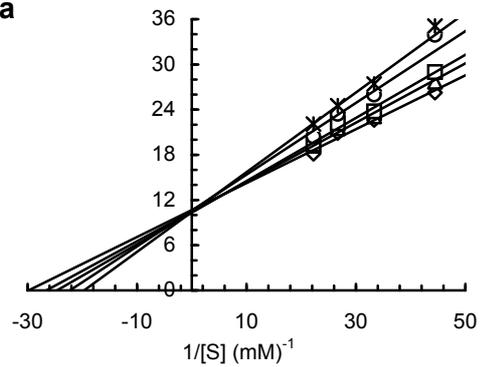
جدول ۱- مقادیر  $K_m$  ظاهری دو آنزیم روده و طحال در غلظت‌های مختلف اینوزین

[Inosine] ( $\mu M$ )	$K_m$ ( $\mu M$ ) Intestinal ADA	$K_m$ ( $\mu M$ ) Spleen ADA
0	38	33.54
18.75	43	37.62
37.5	46	40.55
56.25	53	44.86
75	59	50.77

**b**



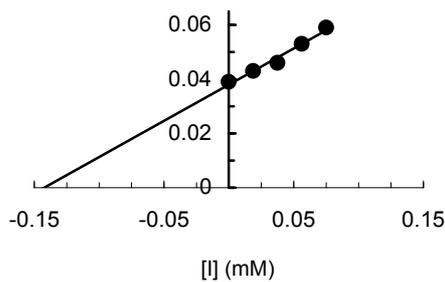
**a**



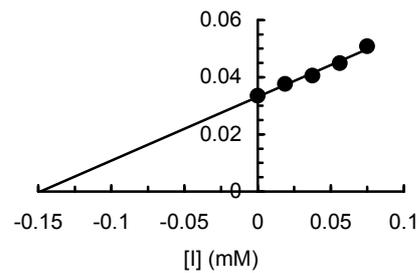
نمودار ۱- لاینویور برگ آنزیم آدنوزین دامیناز در مضمور غلظت های مختلف اینوزین (a) ADA طحال (b) ADA روده

•  $\mu M$  (•): ۱۸, ۷۵  $\mu M$  (x): ۳۷, ۵  $\mu M$  ( $\Delta$ ): ۵۶, ۲۵  $\mu M$  (o): ۷۵  $\mu M$  ( $\square$ )

**b**

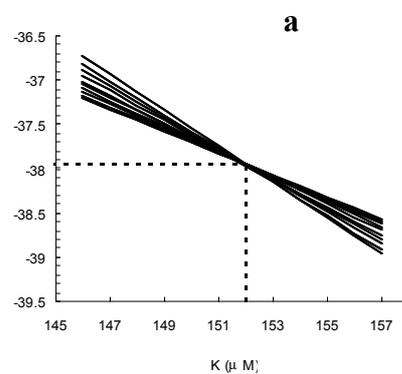
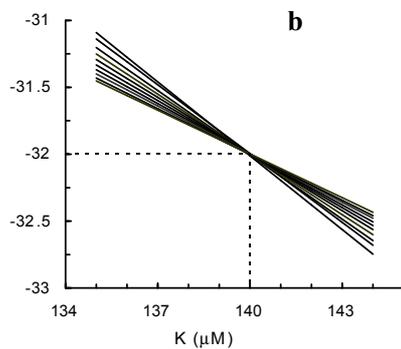


**a**



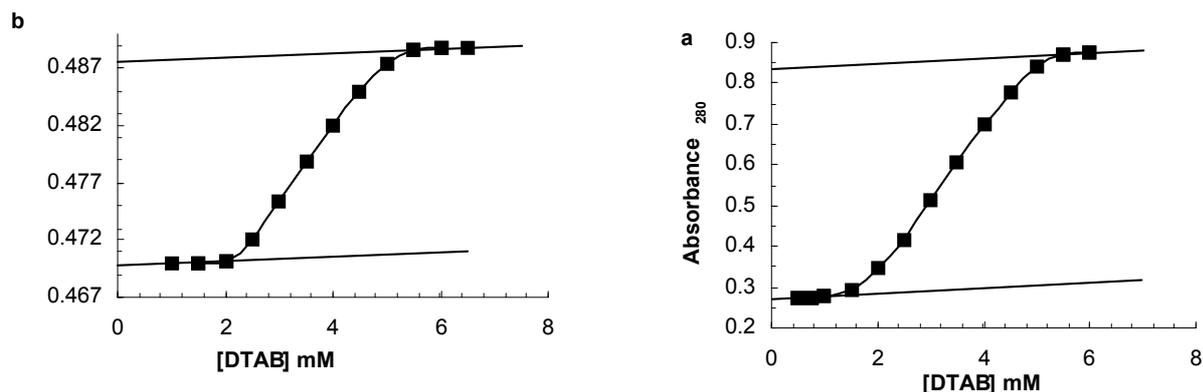
نمودار ۲- نمودار ثانویه  $K_m app$  در مقابل غلظت اینوزین بر اساس نتایج حاصل از شکل ۱- (a) ADA طحال (b) ADA روده

نمودار ۳-  $\Delta H$  علیه  $K$  برای ۱۰ تزریق اولیه اینوزین ۲mM به محلول آنزیمی ۰/۷۵ mg/ml ADA طحال (b) ADA روده

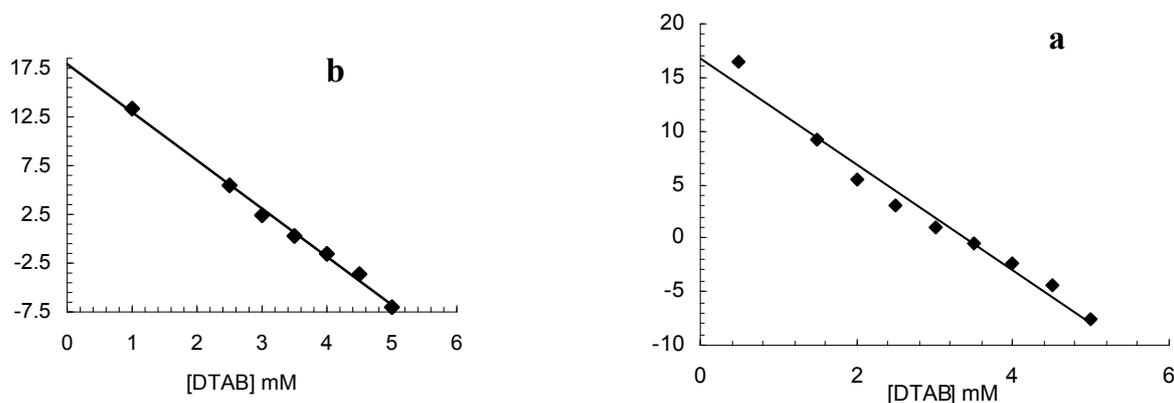


نمودار ۳-  $\Delta H$  علیه  $K$  برای ۱۰ تزریق اولیه اینوزین ۲mM به محلول آنزیمی ۰/۷۵ mg/ml ADA طحال (b) ADA روده

نمودار ۴-  $\Delta H$  علیه  $K$  برای ۱۰ تزریق اولیه اینوزین ۲mM به محلول آنزیمی ۰/۷۵ mg/ml ADA روده



نمودار ۴- تخییرات جذب در مقابل [DTAB] در ۳۷ درجه سانتیگراد (a) ADA طحال (b) ADA روده



نمودار ۵- تخییرات  $\Delta G$  در مقابل [DTAB] (a) ADA طحال (b) ADA روده

جدول ۲- پارامترهای سینتیکی و ترمودینامیکی آنزیم ADA روده و طحال

Kinetic, thermodynamic parameters	Intestinal ADA	Spleen ADA
Molecular Weight	34500	33000
$K_m$ ( $\mu M$ )	38	33.54
$K_i$ ( $\mu M$ )	143	149
$K_b$ (ITC)	140	152
$k_{cat} s^{-1}$	$19.36 \times 10^9$	$7.47 \times 10^9$
$k_{cat} / K_m (M^{-1} s^{-1})$	$50.92 \times 10^7$	$22.36 \times 10^7$
$V_{max}$ ( $\mu M/min$ )	18.2	11.2
$\Delta H$ (kJ/mol)	-32	-37.95
$\Delta G^\circ_{(H_2O)}$ kJ/mol	17.9	16.8
[DTAB] <sub>1/2</sub> mM	3.75	3.25
[E] <sub>total</sub> nM	0.94	1.5
Specific Activity (unit/mg.pr)	120	124

طحال است.

Km آنزیم آدنوزین دامیناز روده ۳۸ میکرومولار و طحال ۳۳/۵ میکرومولار بدست آمد که با مقادیر گزارش شده توسط مقالات هماهنگی دارد (۳۰). اینوزین به عنوان مهارکننده رقابتی برای آنزیم آدنوزین دامیناز محسوب می‌شود (۲۸) نتایج بدست آمده در این مطالعه برای ADA روده و طحال نیز تایید کننده این مطلب می‌باشد. مقایسه پارامترهای سینتیکی (Km و Ki) ADA روده و طحال نشان می‌دهد که Km حاصل از نتایج تجربی و مقادیر گزارش شده برای ADA روده با ADA طحال اختلاف جزئی داشته و این با توجه به تشابه ساختمانی (۳۱) و توالی جایگاه فعال هر دو شکل آنزیم (۳۲) چندان دور از انتظار نیست. مقایسه سرعت (Vmax) بازدهی (kcat) و ثابت ویژگی (kcat/Km) و همچنین مقایسه مقادیر  $[DTAB]^{1/2}$  و  $\Delta G^{\circ}(H_2O)$  دو آنزیم ADA روده و طحال نشان دهنده این است که ADA روده از نظر سینتیکی فعال‌تر و از نظر ترمودینامیکی پایدارتر از ADA طحال می‌باشد. البته بالاترین میزان ADA در تیموس و بخش اولیه روده یافت می‌شود (۸) و بیشترین فعالیت آنزیم ADA روده در بافت‌های پوششی مخاطی روده متمرکز شده (۳۳) به طوری که ADA بیش از ۲۰٪ کل پروتئین‌های محلول در دستگاه گوارش را تشکیل می‌دهد (۳۴). نتایج حاصل از مقایسه پارامترهای سینتیکی و ترمودینامیکی آنزیم آدنوزین دامیناز روده و طحال گوساله نیز تایید کننده اهمیت ADA روده می‌باشد.

در خاتمه مقایسه پارامترهای سینتیکی ADA روده با ADA طحال نشان می‌دهد که بازدهی کاتالیتیکی (kcat) و ثابت ویژگی (kcat/Km) ADA روده بیش از دو برابر ADA طحال می‌باشد. همچنین آنزیم آدنوزین دامیناز روده از نظر ترمودینامیکی نیز پایدارتر از آنزیم آدنوزین دامیناز طحال می‌باشد. بنابراین برای درمان بیماران مبتلا به نقص در فعالیت آنزیم ADA در انسان به روش آنزیم جایگزین توصیه می‌شود از ADA روده با پایداری و فعالیت کاتالیتیکی بیشتر استفاده گردد.

همانطور که از نمودار (۴ a,b) مشاهده می‌شود  $[DTAB]^{1/2}$  (نقطه ۵۰٪ دناتوره شدن) برای آنزیم روده معادل ۳/۷۵ میلی مولار و برای آنزیم طحال برابر با ۳/۲۵ میلی مولار می‌باشد و این بدان معنی است که برای غیر طبیعی کردن ADA روده بیشتری لازم است. مقادیر  $\Delta G^{\circ}(H_2O)$  بدست آمده از نمودار (۵ a,b) برای ADA روده ۱۷/۹ kJ/mol و برای ADA طحال ۱۶/۸ kJ/mol می‌باشد. این پارامتر نیز پایداری بیشتر ADA روده را نشان می‌دهد.

## بحث

نتایج حاصل از پارامترهای سینتیکی نشان می‌دهد هر دو آنزیم ADA روده و طحال توسط محصول خودش (اینوزین) به صورت رقابتی مهار می‌گردد (Vmax ثابت و Km متغیر). مقایسه ثابت اتصال یا ثابت باز دارندگی (Ki) ADA روده و طحال با ثابت تفکیک بدست آمده از مطالعات تیتراسیون میکروکالریمتری هم دما نشان می‌دهد که همخوانی قابل توجهی بین مقادیر بدست آمده برای Ki سینتیکی و K b ترمودینامیکی وجود دارد. این هماهنگی تایید کننده صحت نتایج حاصل از مطالعات سینتیکی و ترمودینامیکی آنزیم می‌باشد. مقایسه KI و KB آنزیم ADA روده با ADA طحال نشان می‌دهد که ADA روده در غلظت‌های کمتری از اینوزین مهار می‌گردد (جدول ۲). با توجه به نتایج به دست آمده از میکروکالریمتری هم دما و منفی بودن مقدار آنتالپی ( $\Delta H$ ) اتصال اینوزین به آنزیم ADA می‌توان نتیجه گرفت که نحوه اتصال اینوزین به آنزیم (مهار رقابتی) مشابه اتصال آدنوزین به ADA می‌باشد. مقایسه دو پارامتر سینتیکی مهم بازدهی kcat (به ترتیب  $1 \times 10^9$  و  $19/36 \times 10^9$  s<sup>-1</sup>) و طحال) و ثابت ویژگی kcat/Km (به ترتیب  $10^7$  s<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup> و  $50/92 \times 10^7$  s<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>) و ثابت ویژگی برای ADA روده و طحال) نشان می‌دهد بازدهی kcat و ثابت ویژگی (kcat/Km) ADA روده بیش از دو برابر ADA طحال می‌باشد. مقایسه پایداری دو آنزیم ADA روده و طحال در برابر دودسیل تری متیل آمونیوم بروماید ( $[DTAB]^{1/2}$ ) و همچنین مقایسه مقادیر  $\Delta G^{\circ}(H_2O)$  (فاکتور ارزیابی پایداری پروتئین) دو آنزیم نشان می‌دهد که از نظر ترمودینامیکی نیز ADA روده پایدارتر از ADA

## REFERENCES

- Hirchhorn R. and Ratech H. Isoenzymes of adenosine deaminase. Biol Med Res 1980; 4: 131- 157
- Wiginton DA. Coleman MS. and Hutton JJ. Purification, characterization and radioimmunoassay of adenosine deaminase from human leukaemic granulocytes. Biochem J 1981;195: 389-97.

3. Centelles JJ. and Bozal J. Purification and partial characterization of brain adenosine deaminase: inhibition by purine compound and by drugs. *J Neurosci Res* 1988; 19:158-267.
4. Van der Weyden MB, Kelley WN. Human adenosine deaminase: Distribution and properties. *J Biol Chem* 1976; 251: 5446-56.
5. Chang Z, Nygaard P, Chonault AC, Kellems RE. Deduced amino acid sequence of *Escherichia coli* adenosine deaminase reveals evolutionary conserved amino acid residues: implication for catalytic function. *Biochemistry* 1991; 30: 2273-80.
6. Brady TG, O' Donovan CJ. A study of the tissue distribution of adenosine deaminase in six mammal species. *Comp Biochem Physiol* 1965; 14: 101-119.
7. Doddona PE and Kelley W. Analysis of normal and mutants forms of human adenosine deaminase. *J Biol Chem* 1980; 252: 110-115.
8. Adams A and Harkness RA. Adenosine deaminase activity in thymus and other humane tissues. *Clin Exp Immunol* 1976; 26: 647-9.
9. Tung R, Silber R, Quagliara F, Conklyn M, Gottesman J and Hirschhorn R. Adenosine deaminase activity in chronic lymphocytic leukemia: relationship to B- and T-cell subpopulation. *J Clin Invest* 1976; 57: 756-61.
10. Ratech H, Thorbecke GJ, Meredith G and Hirschhorn R. Comparison and possible omology of isoenzymes of adenosine deaminase in aves and humans. *Enzyme* 1981; 26: 74-84.
11. Ungerer JPJ, Oosthuizen HM, Bissbort SH, Vermaak WJH. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. *Clin Chem* 1992; 38, 7: 1322-6.
12. Wiginton DA, Adrian GS and Hutton JJ. Sequence of adenosine deaminase cDNA including the coding region and a small intron. *Nucleic Acid Res* 1984; 12: 2439-46.
13. Yeung CY, Ingolia DE, Rot DB, Shoemaker C and Kellems RE. Identification of functional murine adenosine deaminase cDNA clones by complementation in *E. coli*. *J Biol Chem* 1985; 260: 10299-307.
14. Kelly MA, Vestling MM, Murphy CM, Hua S, Sumpter T, Fenselau C. Primary structure of bovine adenosine deaminase. *J Pharm Biomed Anal* 1996; 14: 1513-19.
15. Kinoshita T, Nishio N, Sato A and Murata M. Crystallization and preliminary analysis of bovine adenosine deaminase. *Acta Cryst* 1999; D55: 2031-32.
16. Wilson DK, Rudolph FB and Quioco FA. Atomic structure of adenosine deaminase with transition state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science* 1991; 252: 1278-84.
17. Wilson DK and Quioco FA. A pre-transition-state of an enzyme: X-ray structure of adenosine deaminase with Zinc- activated water. *Biochemistry* 1993; 32: 1689-94.
18. Sideraki V, Mohamedali K, Wilson DK, Chang Z, Kellems RE, Quioco FA, Rudolph FB. Probing the functional role of two conserved active site aspartates in mouse adenosine deaminase. *Biochemistry* 1996; 35: 7862-72.
19. Hirshhorn R. Overview of biochemical abnormalities and molecular genetics of adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Res* 1993; 33: S35-S41.(suppl1).
20. Giblett E, Anderson JE, Cohen F, Pollara B and Meuwissen HJ. Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* 1972; 2: 1067-69.
21. Meier J, Coleman MS and Huttan JJ. Adenosine deaminase activity in peripheral blood cells of patients with hematological malignancies. *Br J Cancer* 1976; 33: 312-19.
22. Cown MC, Brady RO and Widder KJ. Estimated erythrocyte adenosine deaminase activity in patient with acquired immunodeficiency syndrom. *Proc Nat Acad Sci* 1983; 85: 1089-91.
23. Salvatore D, Claudio MM and Anna PM. Adenosine deaminase activity and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Chem* 1987; 33: 1675-82.
24. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficie patients. *Science* 1995; 270: 470-5.
25. Hershfield MS, Buckley R, Greenberg ML, Melton AL, Schiff R, Hatem C, et al. A treatment of adenosine

- deaminase deficiency with polyethyleneglycol - modified adenosine deaminase. *New Eng J Med* 1987; 316: 589-95.
26. Kaplan NO. Specific adenosine deaminase from intestinal. *Methods in Enzymology* 1955; 2: 473-80.
27. Ataie, G, Moosavi-Movahedi AA, Saboury AA, Hakimelahi GH, Hwu J , Tsay SC. Enthalpy and enzyme activity of modified histidine residues of adenosine deaminase and diethyl pyrocarbonate complexes. *Int J Biol Macromol* 2000; 27: 29-33.
28. Saboury AA, Divsalar A, Ataie Jafari G, Moosavi-Movahedi AA, Housaindokht MR, Hakimelahi GH. A product inhibition study on adenosine deaminase by spectroscopy and calorimetry. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35: 302-5.
29. Moosavi-Movahedi AA, Samiee B, Hakimelahi GH. Thermal analysis of adenosine deaminase in the presence of dodecyl trimethyl ammonium bromide. *J Colloid Interface Sci* 1993; 161: 53-6.
30. Coddington A Some substrate and inhibitors of adenosine deaminase. *Biochem Biophys Acta* 1965; 99: 442-51.
31. Herrera C, Casado V, Ciruela F, Schofield P, Mallol J, Lluís C, et al. Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 127 -34.
32. Phelan J, Mcevoy F, Rooney S, Brady TG. Structural studies on adenosine deaminase from calf intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta* 1970; 200: 370 - 77.
33. Seegmiller JE, Thompson L, Blusein H, Willis R, Matsumoto S, Cartson D. Nucleoside metabolism and lymphocyte function in: EW Gelfand, HM Dosch (editors), *Biological basis of immunodeficiency*, New York: Raven Press: 1980, p251 -68.
34. Ping A, Xu, Rodney EK. Function of murine adenosine deaminase in the gastrointestinal tract. *Biochem Biophys Resear Communic* 2000; 269: 749-57.