تهیه یک لیگاند حساس به نور برای گیرنده‌های برادی کنین

دکتر بهرام سلطانی* - دکتر چارلز ایی اودییا**

* استادیار گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان گیلان

** استادیار گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه ایندیانا آمریکا

چکیده

برادی کنین با اثر بر روی گیرنده‌های B2 مسئول اکثر اثرات فیزیولوژیکی آن میباشد. تاکنون تهیه یک کونژوگه برادی کنین فعال شونده با نور که میل ترکیبی گیرنده‌های برادی کنین B2 بصورت محلول را داشته باشد گزارش نشده است. با رادیو اکتیو کردن این کونژوگه‌ها میتوان از آنها جهت نشاندار کردن گیرنده‌ها استفاده کرد. گیرنده‌های رادیو اکتیو در مراحل خالص سازی بسیار مفید هستند.

هدف این مطالعه تهیه یک لیگاند برادی کنین فعال شونده با نور است که قابلیت ترکیب با گیرنده‌های برادی کنین B2 را دارد. در این مطالعه تجربی جهت کونژوگاسیون با لایزیل برادی کنین (یکی از آنالوگهای برادی کنین) از Sulfosuccimidyl (SASD) ethyl-1,3'-dithiopropionate (p-azidosalicylamido)-2 استفاده شد. پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون SASD باLBKدر نور بی‌خطر (نور قرمز با لامپ ۲۵ وات) کونژوگه LBK-SASD بدست آمد. آزمایشات HPLC نشان داد که زمان نگهداری کونژوگه در ستون HPLC ۲۶ دقیقه بود. و این با زمان نگهداری مواد شروع کننده واکنش LBK (۱۷ دقیقه) و SASD (۲۴ دقیقه) متفاوت بود. همچنین آزمایشات مهار اتصال آنتی بادی علیه برادی کنین به پلیتهای لعاب داده شده با LBK-glut-BSA نشان داد که کونژوگه تهیه شده در مقایسه با SASD و LBK فعالیت ایمنولوژیکی خود را حفظ کرده است. آزمایشات پیوند با گیرنده محلول (soluble binding assay) نشان دادند که کونژوگه LBK-SASD با گیرنده‌های برادی کنین B2 در میومتر رحم گاو که بصورت محلول در آمده است میل ترکیبی دارد.

با اضافه کردن I125 به کونژوگه میتوان از آن برای رادیو اکتیو کردن گیرنده استفاده کرد. بدین ترتیب که ابتدا کونژوگه رادیو اکتیو به گیرندهٔ بصورت محلول در آمده متصل می‌شود، پس از آن با تابیدن نور یک پیوند کووالانسی بین گیرنده و لیگاند ایجاد میشود. بدین ترتیب میتوان مراحل مختلف خالص سازی گیرنده را با دنبال کردن رادیو اکتیویته پیگیری کرد.

کلید واژه‌ها: برادی کنین / گیرنده‌های برادی کنین

مقدمه

کنین‌ها گروهی از پلی‌پپتیدها میباشند که تزریق وریدی آنها درکنار سایر اثرات فیزیولوژیک، باعث افت فشار خون موقتی میشوند. نامگذاری کنین‌ها تا حدودی گیج کننده است. پپتید نه(۹) آمینو اسیدی برادی‌کنین و پپتید ده(۱۰) آمینو اسیدی لایزیل برادی‌کنین، کالیدین نامیده میشوند. بطور گروهی تمام موادی که فعالیت آنها شبیه برادی کنین است کنین نامیده میشوند. کنین‌ها از آلفا۲ گلوبولین هایی بنام کینینوژن توسط کالیکریین آزاد میشوند. در انسان دو نوع کنینوژن پیدا میشود، یکی کینینوژن با وزن ملکولی زیاد(heavy molcular wight kininogen)و دیگری کینینوژن با وزن ملکولی کم (low molecular weight kininogen)، همچنین دو گونه کالیکریین وجود دارد، کالیکریین پلاسمایی و کالیکریین بافتی(plasma kalikrin and tissue kalikrin). در نتیجه اثر کالیکریین پلاسمایی

بر روی کینینوژن با وزن ملکولی زیاد برادی کنین بوجود می‌آید و کالیدین در نتیجه اثر کالیکرپین بافتی بر روی کینینوژن با وزن ملکولی زیاد یا کینینوژن با وزن ملکولی کم بدست می‌آید(۱). علیرغم آنکه وجود برادی کنین احتمالاً از سال ۱۹۰۹ (۲) شناخته شده است اما حدود ۷۰ سال بعد انواع گیرنده‌های برادی کنین توصیف شدند(۳). بر اساس آزمایشات متعدد دو نوع گیرندهٔ B1 و B2 برای برادی کنین شناخته شده‌است. توزیع گیرنده‌های B1 نسبتاً محدود است و بیشتر بصورت de novo ظاهر می‌گردند، این نشان میدهد که عوامل پاتوفیزیولوژیکی باعث ظهور آنها میشود. از طرف دیگر تعداد گیرنده‌های فیزیولوژیکی B2 بیشتر است و در بسیاری از بافتها یافت میشوند و مسئول اکثر اثرات فیزیولوژیکی برادی کنین می‌باشند. یک انتاگونیست گیرندهای برادی کنین B2 نشان داده شده است که قادر است میزان ورم مغزرا در نتیجه ضربه به سر در موشهای صحرایی کاهش دهد(۴). تورنل و همکارانش نشان دادند که از طریق تغیر در میزان جریان خون papilary و دفع سدیم در کنترل طولانی مدت فشار خون نقش دارند(۵). تلاشهای زیادی برای خالص سازی این گیرنده‌ها با امید سنتز انتاگونیستهای مناسب جهت مصارف درمانی صورت گرفته است.

یکی از راههایی که میتوان مراحل مختلف خالص سازی را دنبال کرد نشاندار کردن گیرنده‌ها میباشد.

طی سالهای متمادی بسیاری از گیرنده‌های غشایی توسط ماکرومالکولهای حساس به نور علامت گذاری شده‌اند(۱۴-۶). با استفاده از این ملکولها مراحل مختلف خالص سازی گیرنده قابل پیگیری میباشد. یک مادهٔ فعال شونده در اثر نور باید دارای خصوصیتهای زیر باشد: ۱)قبل از تابش نور بصورت محلول پایدار باشد، ۲)در نتیجهٔ تابش نور باید مواد سریع ترکیب شونده بوجود آید، ۳)تجزیه در اثر نور باید با طول موجهای بیشتر از ۳۰۰nm صورت گیرد، بعلت اینکه طول موجهای کمتر ممکن است باعث غیر فعال شدن گیرنده‌ها شود. در حال حاضر مفیدترین و پر مصرفترین مواد برای این منظور آنهایی هستند که دارای گروه اریل آزید (aryl azide) میباشند. گروه اریل آزید در نتیجهٔ تابش نور تبدیل به یک واسطهٔ شیمیایی بنام نیترین (nitrene) میشود که قابلیت جاگیری در آمینواسیدهای شاخه‌های جانبی تمام پروتیئن‌ها را داراست. ویژگی مفید دیگر اریل آزید پایداری آن در تاریکی است که امکان ارزیابی لیگاندهای تهیه شده را در تاریکی میدهد. مواد شیمیایی فعال شونده در اثر نور به دو گروه تقسیم می‌شوند: گروه اول مواد homobifunctional هستند که بطور غیراختصاصی با پروتئینها کونژوگه میشوند، گروه دوم مواد heterobifunctionalهستند(۸). این مواد دارای یک گروه فعال میباشند که میتواند با گروه آمین اولیه پروتئنها در تاریکی ترکیب شود و در اثر تابش نور یک پیوند کووالانسی با ملکول مورد نظر ایجاد نماید. یکی از مواد فعال شونده (photoactivatable) که بصورت تجاری موجود است Sulfosuccimidyl 2 (SASD) (P-azidosalicylamido) ethyl-1,3'dithioprionate است. با وجود آنکه SASD رادیو اکتیو نیست اما قبل یا بعد از کونژوگه شدن میتوان آنرا با I125 نشاندار کرد. گروه فعال SASD به آمین اولیه لیگاند متصل می‌شود و پس از ترکیب لیگاند با گیرنده‌میتوان آنرانشاندارکرد. پس از تاباندن نور یک اتصال‌کووالانسی‌بین‌گیرنده و لیگاندایجادمیشودکه‌این منجر به رادیواکتیوشدن‌گیرنده‌میگردد.پس‌ازرادیواکتیوکردن‌گیرنده دنبال کردن مراحل مختلف خالص سازی آن به سهولت قابل پیگیری است. سورنسن و همکارانش از SASD جهت نشاندار کردن گیرندههای انترلوکین ۳ استفاده کردند(۹).

در مورد تهیه آنالوگهای برادی کنین فعال شونده با نور که قابلیت ترکیب با گیرنده‌های برادی کنین B2 را داشته باشند گزارشهای کمی وجود دارد. اسچر و همکارانش تعدادی آنالوگ برادی کنین تهیه کردند که با گیرنده‌های B2 در ورید مزانتری (mesenteric vein) خرگوش میل ترکیبی داشتند(۱۵). با این حال آنها کاهشی حدود ۴۴٪ در حساسیت برادی کنین برای ترکیب با گیرنده‌های B2 نشان دادند. با این وجود تاکنون تهیه آنالوگهای برادی کنین فعال شونده با نور که میل ترکیبی برای گیرنده‌های برادی کنین B2 که بصورت محلول در آمده‌اند گزارش نشده‌است.

هدف این مطالعه تهیه یک آنالوگ فعال شونده با نور برادی کنین با (SASD) بود.

سئوال مشخصی که آزمایشات قصد پاسخگویی آنرا داشت این بود که آیا کونژوگه از نظر ایمنولوژیکی فعالیتی دارد، و اینکه آیا با گیرنده‌های برادی کنین که بصورت محلول در آمده‌اند میل ترکیبی دارد.

مواد و روشها

SASD از شرکت شیمیایی پیرس Pierce خریداری گردید. تری اتیل آمین، 8-12 mesh beads mlecular

sieves از شرکت سیگما خریداری گردید. استونیتریل از شرکت مرک و I125 از شرکت امرشم Amersham تهیه شدند. LBK آنالوگ برادی کنین که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت از شرکت سیگماتهیه شد. آزمایشهای HPLC بااستفاده از یک پمپ کروماتوگرافی مدل ۵۰۰۰ وارین(Varian) متصل به یک Varian detector انجام پذیرفت. ستون Zobrax ODS 4.6mmx2.5cm شرکت دوپانت تهیه گردید. سایر مواد شیمیایی از شرکتهای تجاری تهیه گردیدند.

تهیه کونژوگه LBK SASD

تمام واکنشهای کونژوگاسیون در اطاق تاریک مجهز به نور قرمز ۲۵ وات با روش آلن و همکارانش انجام پذیرفت(۷). به اختصار محلول ۲/۷ میلی گرم در میلی لیتر SASD در دی متیل فورمامید خشک (خشک شده توسط molcular seives در لوله بوروسیلیکات ۵ میلی لیتری تهیه گردید. به یک ویال حاوی ۵ میلی گرم LBK، ۰/۷ میلی لیتر دی متیل فورمامید اضافه شد، به این محلول ۳/۳۳ میکرولیتر محلول ۱:۱۰تری اتیل آمین در دی متیل فورمامید اضافه شد. قبل از شروع واکنش کونژوگاسیون نمونه‌هایی از محلول LBK و SASD جهت انجام آزمایشهای ELISA و HPLC برداشته شد. به ۵ میلی لیتر از محلول SASD مقدار ۵ میلی لیتر LBK (۲/۵ میکرومول) اضافه گردید. پیشرفت واکنش بوسیلهٔ HPLC با استفاده از ستون C8 reverse phase دنبال شد. نمونه‌های محلولهای LBK, SASD و مخلوط واکنش (۵میکرو لیتر) در دی متیل فورمامید به HPLC تزریق شد. نمونه‌ها از ستون کروماتوگرافی با استفاده از محلول از تری فلورواستیک اسید ۰/۰۵٪ (محلول ۱) و استونیتریل(محلول ۲) با ویژگی ازدیاد محلول ۲ از ۲۰٪ به ۱۰۰٪ طی ۳۰ دقیقه صورت پذیرفت. سرعت جریان از ستون۱/۵ میلی لیتر در دقیقه بود و نمونه‌های جدا شده از ستون کروماتوگرافی در هر دقیقه در لوله‌های ۵ میلی لیتری پلی‌پروپیلن لعاب داده شده با کازوئین جمع آوری ش۴د. شناسایی LBK,SASD و LBK-SASD با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۲۰۵nm صورت پذیرفت.

آزمایشات ELISA بر روی نمونه‌های جمع آوری شده از HPLC پلیتهای الیزا برای وجود میل انتخابی با کنین تهیه گردید. برای این منظور پلیتها با محلول ۱:۳۰۰۰ LBK-glut-BSA با غلظت۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر برای مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس یک بار با ۱۰۰ میکرولیتر محلول Triton-PBS شستشو داده شدند. پس از آن به هر چاهک ۱۵۰میکرولیتر محلول ۰/۱٪ کازوئین در بافر فسفات سدیم PH7 اضافه شد. پس از یک ساعت پلیتها دو بار با Triton-PBS شستشو داده شدند. پس از آماده سازی پلیتهای الیزا به هر چاهک مقدار ۵ میکرولیترتری اتانول آمین(محلول ۱:۱۰ در دی متیل مورمامید)،LBK, SASD یاLBK-SASD بعلاوه ۴۵ میکرولیتر محلول ۱:۳۰۰۰ یک آنتی بادی برادی کنین OLNBK-7 با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر اضافه شد. پس از یک ساعت‌پلیتها سه بار با Triton-PBS شسته شدند. پس از آن مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول ۱:۳۰۰ goat-antimouse polyvalent immunoglobulinبرای مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه اضافه شد، پس از سه بار شستشو با محلول Triton-PBS ۵۰ میکرولیتر از یک محلول ۱:۱۰۰۰ پروتئین A نشاندار با الکالین فسفتاز برای مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه به چاهکها اضافه شد. پس از هفت بار شستشو ۵۰ میکرولیتر محلول سوبسترا نیتروفنیل فسفات,Na2Co3 (50mM 1mM Mgcl2, 2.7mM P-nitophenyl phosphate) به چاهکها اضافه شد. پس از ۱ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه تفاوت جذب نوری در ۴۰۵nm و ۴۹۰nm توسط دستگاه الیزا ریدر Bio-Tek مدل ۳۰۹ EL اندازه‌گیری شد. بعنوان شاهد مقدار ۳/۳میکرولیتر از یک محلول ۱:۱۰تری اتیل آمین در DMF به HPLC تزریق شد ونمونه‌های جمع آوری شده برای توانایی آنها در جلوگیری از اتصال آنتی بادی برادی کنین به پلیتهای لعاب داده شده با LBK-glut-BSA مورد آزمایش قرار گرفتند.

آزمایش پیوندباگیرنده‌محلول Solubale binding assay

این آزمایشات با متد فردریک و اودیبا (۱۶) در نور بی ضرر (نور قرمز با لامپ ۲۵ وات) انجام گرفت. آزمایشات در لوله‌های پترو (Petro tubes) و بصورت سه‌تایی انجام شد. بافری که در این آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت حاوی ۲۰mM PIPES، ۱mM EDTA بود، و PH آن بوسیله ۱M KOH تنظیم شده بود. PH بافر ۶/۸بود و از آن برای رقیق کردن در تمام مراحل آزمایش استفاده شد. آنالوگ رادیو اکتیو (T1K) در بافر PIPES بعلاوه (DFP) ۷mM

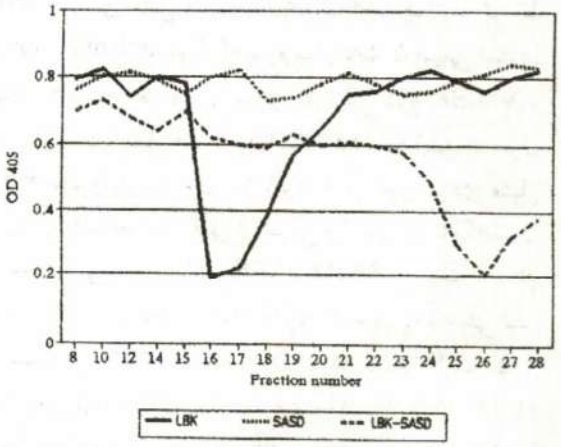
Diisopropylflorophosphateبه نحوی رقیق شد که ۱۰۰ میکرولیتر آن حاوی ۱۰۰۰۰۰cmp بود. محلول واکنش حاوی غلظتهای مختلف برادی‌کنین (۱۰ng،۱۰۰،۵۰۰۰)، SASD(۱۰ng،۱۰۰)، LBK-SASD(۱۰ng،۱۰۰)، و یا بافر (۱۰۰میکرولیتر)، آنالوگ رادیو اکتیو ۱۰۰ میکرولیتر و ۵۰۰ میکرولیتر میومتر رحم گاو محلول شده با CHAPS برای مدت ۳ ساعت در حمام یخ انکوبه شدند.

رادیو اکتیو متصل از غیرمتصل بوسیله زغال فعال لعاب داده شده با دکستران(Dextran coated charcoal) طبق روش زیر جدا شدند. پنج گرم دکستران T-70 در یک لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱M با PH مساوی ۷/۶ حل شد. بیست‌وپنج گرم زغال فعال (Nordit A) به محلول دکستران اضافه شد و برای مدت ۱۶ ساعت در اتاق یخچالی بوسیله مگنت بهم زده شد. این محلول زغال فعال برای توقف واکنش binding assay مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور ۰/۸ میلی‌لیتر از محلول زغال فعال به هر لوله اضافه شد، و لوله‌ها بلافاصله برای مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه (۱۰۰۰g) در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شدند. پس از آن مقدار ۱ میلی لیتر از محلول شفاف روی لوله (حاوی رادیواکتیویته متصل) به لوله‌های ۵ میلی لیتری پلی استایرین منتقل شدند. فعالیت رادیو اکتیویته با استفاده از گاماکانتر Beckman (GAM 4000) برای مدت ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد. اتصال اشباع شدنی تفاوت بین کل رادیواکتیویته (در غیاب برادی کنین) و اتصال غیر اشباع شدنی (در حضور ۵۰۰۰ng) محاسبه شد.

نتایج

پیشرفت واکنش کونژوگاسیون توسط HPLC دنبال شد. در زمانهای صفر، ۴ و ۱۸ ساعت پس از شروع واکنش مقدار ۵ میکرولیتر مخلوط کونژوگاسیون به دستگاه HPLC تزریق شد. تزریق LBK به HPLC منجر به پیدایش یک پیک در طول موج ۲۰۵nm پس از ۱۷ دقیقه شد. تزریق ۵ م۰یکرولیتر SASD به HPLC منجر به پیدایش یک پیک پس از ۲۴ دقیقه (طول موج ۲۰۵ nm) شد. تزریق ۵ میکرولیتر از محلول کونژوگاسیون در زمانهای صفر و ۴ ساعت منجر به پیدایش پیک جدیدی نشد، اما وقتیکه ۵ میکرولیتر از محلول کونژوگاسیون ۱۸ ساعت پس از شروع واکنش به HPLC تزریق شد در زمانهای ۱۷ و ۲۴ دقیقه پیکی مشاهده نشد، اما در دقیقه ۲۶ یک پیک جدید قابل رؤیت بود.

تشخیص میل ترکیبی باکنین در نمونه‌های جدا شده از HPLC برای نشان دادن میل ترکیبی باکنین با روش ELISA مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌های ۲۶،۲۷،۲۸ از محلول واکنشی که به مدت ۱۸ ساعت نکوبه شده بودند نشان دادند که قادر هستند از اتصال آنتی بادی علیه برادی کنین به پلیتهای الیزا لعاب داده شده با LBK-glut-BSA جلوگیری کنند. هیچ کدام از نمونه‌های جمع‌آوری شده وقتیکه محلول SASD به HPLC تزریق شد قابلیت مهار اتصال آنتی‌بادی برادی کنین به پلیت الیزا را نشان ندادند. زمانیکه محلول LBK به HPLC تزریق شد نمونه‌های ۱۷،۱۸،و۱۹ اتصال آنتی‌بادی برادی‌کنین را به پلیت الیزا مهار کردند. نمودار شماره ۱ نتایج این آزمایشات را نشان میدهد.



نمودار ۱: فعالیت ایمنولوژیکی نمونه‌های جدا شده از HPLC با آنتی بادی علیه برادی کنین

آزمایش پیوند باگیرنده محلول

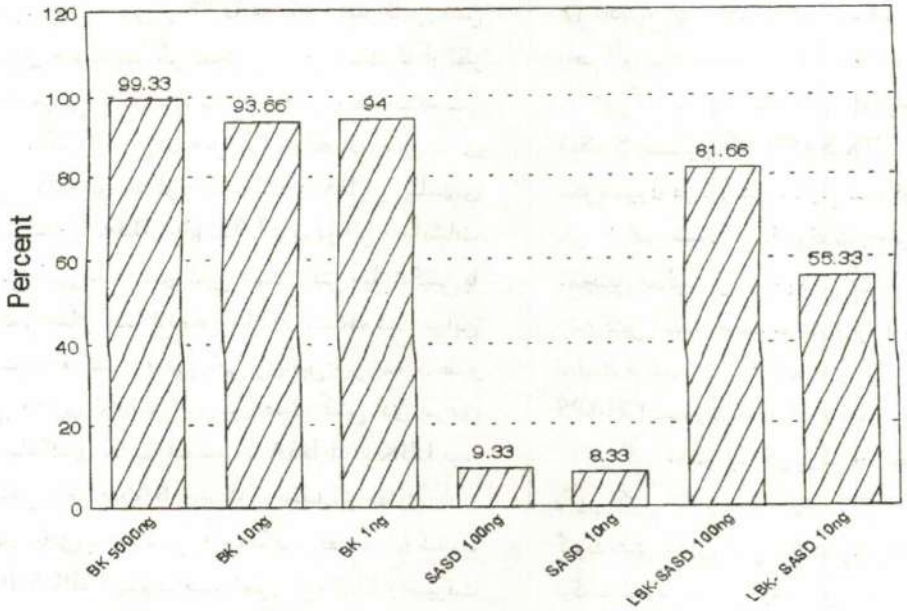
در این آزمایشات مهار اتصال T1K به میومتر محلول شده رحم گاو مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایشات نشان دادند که وقتی ۱۸ ساعت از شروع واکنش گذشته بود نشان داد که کونژوگه تهیه شده نمایانگر این بود که ۱۰۰ng و ۱۰ng از LBK-SASD در مقایسه با کنترل (۵۰۰۰ngBK) قادر بودند که به ترتیب ۸۸٪ و ۵۵٪ از اتصال T1K به میومتر رحم گاو محلول شده با CHAPS جلوگیری کند.

همچنین این آزمایشات نشان دادند که غلظتهای ۱۰ng و ۱ BK به میزان ۹۳٪ و ۹۴٪ از اتصال T1K جلوگیری کنند. این آزمایشات همچنین نشان دادند که میزان مهار اتصال T1K برای غلظتهای ۱۰۰ngو ۱۰ ۹/۳٪ و ۸/۳٪

است. از این آزمایشات میتوان نتیجه گرفت که کونژوگه تهیه شده فعالیت بیولوژیکی خود را برای ترکیب با میومتر رحم گاو محلول شده با CHAPS حفظ کرده‌است. نمودار شماره ۲ نتایج این آزمایشات را نشان میدهد.

بحث

یکی از مشکلاتی که در سر راه خالص سازی گیرندهای غشاء وجود دارد دنبال کردن مراحل مختلف خالص سازی است. یکی از متداولترین روشها برای ارزیابی موفقیت



نمودار۲: مهار اتصال T1K به میومتر رحم گاو محلول شده توسط CHAPS با غلظتهای مختلف برادی کنین، SASD و LBK-SASD

BK= Bradykinin

SASD= Sulfosuccimidyl 2-(p-azidosalicylamido) ethyl-dithiopropionate

LBK-SASD= bradykinin- sulfosuccimidyl 2-(p-azidosalicylamido) ethyl-dithiopropionate

مراحل خالص سازی انجام ligand binding assay است. این متد نیاز به فعال بودن بخشی از ملکول گیرنده که لیگاند به آن متصل میشود دارد. در آزمایشات خالص سازی گیرنده‌های ممبران تعیین بعضی از خصوصیات گیرنده مثل تعیین وزن ملکولی یا پیدا کردن توالی اسید آمینه‌های گیرنده‌ها نیاز به فعال بودن گیرنده از نظر اتصال به لیگاند نیست. در طی مراحل مختلف خالص سازی امکان از دست رفتن قابلیت اتصال گیرنده به لیگاند و در نتیجه نا مشخص بودن موفقیت هر مرحله وجود دارد. هدف از این مطالعه تهیه لیگاندی از برادی کنین بود که قابلیت اتصال با گیرنده‌های B2 دارد و این میل ترکیبیی به فعال بودن گیرنده وابسته نباشد بود. با این کار پس از آنکه پروتکل خالص سازی گیرنده مشخص شد میتوان در جهت خالص سازی گیرنده بصورت فعال اقدام کرد. یکی از گیرنده‌هایی که مراحل خالص سازی آن با دنبال کردن فعالیت گیرنده گزارش نشده است و مطالعات ما نیز در این زمینه به نتیجه نرسیده است گیرنده‌های برادی کنین B2 می‌باشد. هدف این مطالعه تهیه یک لیگاند برادی کنین که قابلیت ترکیب با گیرنده‌های برادی کنین B2 را داشته باشد و همچنین بتوان به کمک آن گیرنده‌ها را نشاندار کرد بود. با نشاندار کردن گیرنده‌های برادی کنین B2 دنبال کردن فعالیت رادیو اکتیویته گیرنده بجای قابلیت اتصال آن به لیگاند در مراحل مختلف خالص سازی آن امکانپذیر خواهد بود.

در این آزمایشات از HPLCجهت جدا کردن اجزاء مختلف ,LBK, SASDو LBK-SASD استفاده شد. برای دنبال کردن تشکیل کونژوگه LBK-SASD سه راه وجود داشت. ۱.دنبال کردن فعالیت ایمنولوژیکی لیگاند تهیه شده، ۲. اندازه‌گیری جذب نوری نمونه‌های بدست آمده از HPLC، ۳. بررسی توانایی ترکیب کونژوگه با گیرنده‌های مورد نظر. برای اطمینان از تشکیل کونژوگه ابتدا زمان جدا شدن LBK و SASDاز ستون HPLC مشخص شد.

مشاهده شد که LBK پس از ۱۷ دقیقه و SASD پس از

۲۴ دقیقه از ستون جدا شدند. آزمایشات نشان دادند که در زمانهای صفر و ۴ ساعت پس از شروع واکنش تغییری در زمان جدا شدن مواد از HPLC صورت نپذیرفت اما وقتیکه مخلوط واکنش پس از ۱۸ ساعت به HPLC تزریق شد یک جذب نوری جدید پس از ۲۶ دقیقه ظاهر شد. ظهور این جذب نوری جدید نشانگر تشکیل ماده‌ای است که از نظر خواص شیمیایی با دو مادهٔ شروع واکنش متفاوت است.

روش دیگر دنبال کردن میل مهاری اتصال آنتی بادی علیه برادی کنین توسط کونژوگه LBK-SASD با پلیتهای لعاب داده شده با LBK-glut-BSA بود. در این آزمایشات از یک آنتی بادی علیه برادی کنین جهت یافتن میل ترکیبی با کنین در نمونه‌های جدا شده از HPLC استفاده شد. در این آزمایشات از دو کنترل منفی یکی تری‌اتیل‌آمین به منظور حذف اثر مهاری تری‌اتیل‌آمین بر اتصال آنتی‌بادی برادی کنین به چاهکهای لعاب داده شده با LBK-glut-BSA بود. کنترل منفی دیگر SASD به منظور حذف اثر مهاری آن بر اتصال آنتی بادی برادی کنین به چاهکهای لعاب داده شده با LBK-Sglut-BSA بود. همانطور که انتظار میرفت تری‌اتیل‌آمین و SASD اثر مهاری از خود نشان ندادند. همچنین به عنوان کنترل مثبت ۵ میکرو لیتر محلول LBK 1mg/ml مورد استفاده قرار گرفت. مهار اتصال آنتی بادی برادی کنین به چاهک در حضور LBKمناسب بودن آزمایش جهت بررسی وضعیت تمایل واکنشی نمونه‌های جدا شده از HPLC را نشان داد. نتایج نشان داد که تمایل واکنش نمونه‌های جدا شده از HPLC از نمونه ۱۷ (دقیقه ۱۷) به نمونه ۲۶ (دقیقه ۲۶) منتقل شد. این انتقال نشان دهنده تشکیل کونژوگه LBK-SASD میباشد، و اینکه با این انتقال میل ترکیبی با برادی کنین از بین نرفته‌است. منطقی خواهد بود اگر تصور شود که این کونژوگه میتواند با گیرنده‌های برادی کنین میومتر رحم‌گاو نیز ترکیب شود. بر این اساس قابلیت مهار اتصال T1Kآنالوگ رادیواکتیو برادی‌کنین به گیرنده‌های B2 در میومتر رحم گاو که با CHAPS صورت محلول در آمده توسط نمونه ۲۶ مورد آزمایش قرار گرفت. این آزمایشات نیز نشان دادند که نمونه ۲۶ قادر به مهار اتصال T1K به گیرنده‌های B2 درمیومتر رحم گاو است، عملی که با SASD مشاهده نشد.

این آزمایشات نشان دادند که در نتیجه ترکیب LBK با SASD کونژوگه LBK-SASD پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در نور کم تشکیل شد. کونژوگه بدست آمده از نظر خواص شیمیایی با مواد شروع واکنش متفاوت است. همچنین فعالیت ایمنولوژیکی آن در آزمایشات الیزا شبیه برادی‌کنین است. خصوصیت ویژه کونژوگه بدست آمده قابلیت ترکیب آن با گیرنده های برادی‌کنین B2 که توسط CHAPS بصورت محلول در آمده است میباشد.

ویژگی خاص این کونژوگه جدید این است که قابل رادیو اکتیو شدن است. میتوان کونژوگه رادیو اکتیو را با گیرنده‌های برادی کنین B2 که بصورت محلول در آمده‌اند ترکیب نمود پس از تابش نور پیوندی کووالانسی بین کونژوگه و گیرنده ایجاد کرد. مراحل مختلف خالص سازی گیرنده‌های برادی کنین B2 را با دنبال کردن رادیواکتیویته پیگیری کرد. ویژگی این روش این است که دارا بودن فعالیت بیولوژیکی گیرنده برای ارزیابی متدهای اتخاذ شده ضروری نیست، پس از آنکه پروتکل خالص سازی مشخص شد میتوان در جهت خالص سازی گیرنده به نحوی که فعالیت بیولوژیکی حفظ شود اقدام کرد.

نتایج نشان دهندهٔ اطلاعات بدست آمده از یک آزمایش نمونه است. نمونه‌های جدا شده از HPLC برای قابلیت ترکیب آنهاباآنتی‌بادی علیه برادی کنین و در نتیجه عدم اتصال آنتی بادی به پلیت الیزا وکاهش جذب نوری مورد آزمایش قرار گرفتند.

منابع

1. Proud D. Production and Metabolism of Kinins. In: Crystal R G, West J B, et al. the Lung. New Yourk: Raven Press, 1991: 61-68.
2. Abelous J E, Bardie E. Lessubstance de L'urine Humanic Normal. CR Seance Sos Biol 1909: 66: 511-512.
3. Regoli D, Barabe J. Pharmacology of Bradykinin and Related Kinins. Pharmacol Rev 1980: 32: 1-46.
4. Yip C C, Yeung C W T, Moul M L. Characterization of Insulin Receptor Proteins of liver Plasma Membrane Proteins. Biochemistry 1980: 19:76-80.

5. Stover JF, Dohse NK, Unterberg AW. Identifiaction in a Ligand Free form. Biochemistry 1991: 30: 329-335.
Significant Reduction in Brain Swelling by Administration of Nonpeptide Kinin B2 Receptor Antagonist I,F 16-0687Ms after Contolled Cortical Impact Ingury in Rats. J Neurosurg 2000: 92(5): 853-9.
6. Toenel J, et al. Role of Kinins in the Control of Renal Papilary Blood Flow, Pressure Naturessis, and Atrial Pressure. Circ Res 2000: 86(5): 589-95.
7. Langer JA. Radiolabeling of the Interferon-alfa Receptor.Biochem Biophys Res Commun 1988: 157: 1264- 1270.
8. Hosoi T, Swyer S T, Krantz S B. Photoaffinity Labelling of the Erythropoietin Receptor and its Identifiaction in a Ligand Free form. Biochemistry 1991: 30: 329-335.
9. Allen R A, Tolley J O, Jesaitis A J. Preperation and Properties of an Improved Photoaffinity Ligand for the N-formyl Peptide Receptor. Biochem Biophys Acta 1986: 882:271-280.
10. Hazum H. Photoaffinity Labelling of Peptide Hormon Receptors. Endocrine Rev 1983: 4:352-362.
11. Sorensen P, Farber N M, Krystal G. Identification of the Interleukin-3 Receptor using an Iodinatable Cleavable Photoreactive Crosslinking Agent.J Biol Chem 1986: 261:9094-9097.
12. Ueno H, Masuko T, Wang J, Hashimoto Y. Epitop Mapping of Bovine Serum Albumin Using Monoclonal Antibodies Coupled with a Photoreactive Crosslinker. J Biochem 1994: 115(6): 1119-27.
13. Chen II, Marjan J, Cox AD, Devine, DV. Characterization of a Novel Complement C3dg- binding Protein of Human Platlets. J Immunol 1994 152(3): 1332-8.
14. Mazurier J, Legrand D, et al. Study on the Binding of Lactotransferin (Lactoferrin) to Human PHA-activated Lymphocytes and Non-activated Platlets: Localisation and Description of the Receptor Binding Site. Adv Exp Med Biol 1994: 357:111-9.
15. Escher E, Laczko E, et al. Biological Activities of Photoaffinity Labelling Analogues of Kinin and their Irriversible Effects an Kinin Receptors. J Med Chem 1981: 24:1409-1413.
16. Fredrick M J,Odya C E.Characterization of Soluble Bradykinin Receptor-likeBinding site. Eur J Pharmacol 1987:134: 45-52.

Preparation of a Photoactivable Ligand for Bradykinin Receptors

B. Soltani Ph. D
CH .E. Odia Ph. D

ABSTRACT

Most of physiological effects of bradykinin is due to its effect on bradykinin B2 receptors. There is no reports of preparation of a photoactivatable analogue of bradykinin reactive with sloubilized bradykinin B2 recpetors. Photoactivatable radioactive ligands are powerful tools in purification of receptors.

In this study we report preparation of a photoactivatable iodinatable analogue of bradykinin reactive with soluble bradykinin B2 receptors. For conjugation with lysyl-bradykinin (LBK) a photoactivatable compound sulfosuccimidyl 2-(p-azidosalicylamido ethyl-1,3-dithiopropionate (SASD) was used. Eigtheen hours after incubation in safe light(25 watt red light) LBK-SASD cojugate was prepared. HPLC experiments showed that retention time for conjugate on the HPLC column was 26 minutes. This was different from retention time of starting materials (for LBK 17 and for SASD 24 minutes). Also inhibition studies showed that LBK-SASD conjugate is capable of inhibiting binding of an antibody against bradykinin to ELISA plates coated with LBK-glut-BSA.This shows that in comparison with SASD and LBK the conjugate retained its immunoreactivity. Solublc binding assay showed that the LBK-SASD conjugate is reactive with solubilized bovine uterin myometrium bradykinin B2 receptors.

With the addition of I_{125} to the conjugate it is possible to radiolabel the receptors. In the first step radioactive conjugate is reacted with the solubilized receptor, then upon exposure of the light a covalent bond is formed between receptor and the ligand. With monitoring the radioactivity it will be possible to check the success of the purification procedures.

key words: Bradykinin / Receptors, Bradykinin