مکانیسم اثر بازدارندگی کافئین چای ایرانی بر سینتیک سیگموئیدی فعالیت آنزیم آدنوزین دآمیناز

رویا مهین پور [*۱]، مجید قاسمی[۲]، سیده زهرا موسوی نژاد[*۳]، زهره زهرایی[۱]

تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۹/۱
تاریخ پذیرش :۱۳۹۷/۱۰/۴

چکیده

کافئین یکی‌از لیگاندهای مهم آنزیم آدنوزین‌دآمیناز (Adenosine Deaminase, ADA) است. در پژوهش حاضر، تغییرات فعالیت آنزیم آدنوزین‌دآمیناز در شرایط بافری Tris-HCl ۵۰ میلی مولار pH ۷/۳ و دمای ۳۷درجه سانتیگراد در حضور و عدم حضور کافئین و در غلظت‌های فزاینده سوبسترای آدنوزین (صفر تا ۵۰ میکرومولار) و در زمان‌های مختلف مجاورت با کافئین اندازه‌گیری شد. با توجه به تجزیه و تحلیل منحنی‌های اشباع به‌دست‌آمده، شکل سیگموئیدی آنها تفاوت چشمگیری با منحنی های اشباع گزارش های پیشین نشان می‌دهد و اولین بار است که گزارش می شود. این تفاوت را می توان به اختلاف در گستره غلظتی سوبسترا و زمان مجاورت با کافئین نسبت داد. بر پایه شکل سیگموئیدی منحنی اشباع، مکانیسم اثر کافئین قابل توجیه است. همچنین بر اساس یافته‌های این پژوهش اثر کافئین بر فعالیت آدنوزین دآمیناز تابعی از زمان مجاورت آنها است و پس‌از ۶ ساعت مجاورت آنزیم و کافئین به ثبات می‌رسد. این نکته در تفسیر نتایج حاصل ازبررسی‌های مربوط به آدنوزین‌دآمیناز و لیگاندهایش ارزشمند خواهد بود.

واژه های کلیدی: ***آدنوزین دآمیناز، سینتیک سیگموئیدی، کافئین، مکانیسم بازدارندگی.***

مقدمه

آدنوزین دآمیناز (Adenosine Deaminase, ADA) آنزیمی است که از طریق کاتالیز واکنش دآمیناسیون برگشت‌ناپذیر آدنوزین یا داکسی آدنوزین به اینوزین یا داکسی اینوزین درمتابولیسم پورین‌ها نقش دارد (Hirchhorn & Ratech, 1980). آدنوزین دآمیناز به عنوان یک گلیکوپروتئین، زنجیره‌ای پلی پپتیدی با ۳۱۱ آمینواسید دارد و توالی ژن آن در سال ۱۹۸۴ مشخص شده است (Doddona *et al.*, 1984). فعالیت آدنوزین دآمیناز سرم انسانی وجود سه شکل مولکولی از این آنزیم را نشان می دهد: یک شکل منومر با وزن مولکولی g/mol ۳۵۰۰۰ (ADA)، یک شکل تترامر با وزن مولکولی g/mol ۲۸۰۰۰۰ که از

۱- استادیار ،گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران
* (نویسنده مسئول:mahinpur@kashanu.ac.ir و z.moosavinejad@alzahra.ac.ir)
۲- کارشناسی ارشد ، گروه شیمی آلی ، دانشکده شیمی ،دانشگاه کاشان ، کاشان ، ایران
۳- دانشیار ، دانشکده علوم زیستی ، دانشگاه الزهرا (س)،تهران ، ایران

ترکیب دو منومر (ADA^1) و یک گلیکوپروتئین دایمر به نام پروتئین اتصالی تشکیل شده است و شکل سوم آن g/mol ۱۰۰۰۰۰ (ADA^2) وزن دارد (Doddona & Kelley, 1979). این اشکال مختلف از لحاظ خصوصیات سینتیکی و ایمونولوژیکی با هم متفاوت هستند (Edwards *et al.*, 1971).

در مقاله های مختلف از این اشکال با نام های شکل کوچک و بزرگ نیز یاد می شود. به عنوان مثال برخی از محققین شکل کوچک آن را فرم ۳۶ تا ۳۸ کیلودالتونی می‌دانند که از نظر سینتیکی فعال است و شکل بزرگ آن را کمپلکسی از شکل کوچک و یک نوع پروتئین در نظر می‌گیرند که به طور غیرآنزیمی به آنزیم متصل می‌شود (Doddona & Kelley, 1979). این پروتئین اتصالی از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی، قابل جداسازی است (Bota *et al.*, 2000). نقش پروتئین اتصالی، تنظیم تصفیه آدنوزین دآمیناز از سرم و کمک به اتصال آنزیم به سطح خارجی غشا سلول است. علاوه بر این پروتئین اتصالیADA را به صورت *in vivo* پایدارتر می‌کند. همچنین فرم بزرگ نسبت به فرم کوچک آن در برابر حرارت پایداری بیشتری دارد که دلیلی بر افزایش پایداری حرارتی آنزیم بر اثر پیوند به پروتئین اتصالی است (Daddona *et al.*, 1980). آدنوزین به عنوان سوبسترای آدنوزین دآمیناز متابولیت قابل جبران در همه سلول‌ها است که در فرآیندهای کلیدی مثل سنتز نوکلئیک اسید و بازهای پورین، متابولیسم آمینواسیدها و هموستاز متابولیسم سلولی نقش دارد (Boroweic *et al.*, 2006; Latini *et al.*, 1999).

با توجه به اهمیت آدنوزین دآمیناز در فرآیندهای زیستی مانند کاتابولیسم پورین (یک فرآیند شیمیایی برای تجزیه مواد به‌صورت *in vivo*) (Mills *et al.*, 1976)، تکثیر سلول های T، و تقویت سیستم ایمنی (Herrera *et al.*, 2001) ، نقش در رفع التهاب (از طریق سوبسترای آن، آدنوزین) و برخی از اختلال‌های دیگر مثل بیماری التهابی روده (Antonioli *et al.*, 2007)، این آنزیم بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. نقش این آنزیم‌ها در شرایط پاتولوژیکی مختلف و برخی از بیماری‌های خطرناک مورد مطالعه قرار گرفته است (Meier *et al.*, 1976; Antonioli *et al.*, 2007). علاوه براین، آزمایش‌های مختلف مثل خالص‌سازی و نیز تعیین فعالیت و ساختار در موجوداتی مثل موش و باکتری و همچنین فعالیت آن در اندام‌ها و بافت‌ها (Singh (Peters *et al.*, 1982; Kathiresan *et al.*, 2013; Pornbanluaalap & Chalopagorn, 2011; & Sharma, 2000، اثر لیگاندهای متفاوت مانند کافئین، آسپیرین، دیکلوفناک، داروهای پورینی، سورفاکتانت‌ها و نمک‌ها انجام شده است. گزارش‌های زیادی نیز بر روی فعالیت آدنوزین دآمیناز و مهار آن وجود دارد (Moosavi- Ataei *et al.*, 2000; Saboury *et al.*, 2002; Ataei *et al.*, 2005 (Saboury *et al.*, 2003; Alunni *et al.*,2008; Ajloo *et al.*,2007; Movahedi *et al.*, 1993;.

یکی از لیگاندهای آدنوزین دآمیناز، کافئین (۷،۳،۱ تری متیل زانتین) یک آلکالویید پورینی است و منابع اصلی آن شامل چای، قهوه و دانه‌های کاکائو است (Tello *et al.*, Icen & Guru, 2009; Senol & Aydin, 2006; Wang *et al.*, 2011; 2011). علاوه بر مزایای غذایی، کافئین می‌تواند در درمان انواع بیماری‌ها مثل چربی زیاد (Phillips *et al.*, 1981)، فشار خون (Nurminen *et al.*, 1999)، بیماری‌های قلبی (Katan & Schouten, 2005)، سرطان و ایدز (Nunnari *et al.*, Dreher, 2003

2005;) موثر باشد. علاوه بر این، کافئین باعث تنگ شدن عروق خونی مغز می‌شود و بنابراین می‌توان آن را برای درمان سردرد عروقی مورد استفاده قرار داد (Schwindinger *et al.*, 2010). این ماده همچنین برای رفع خستگی و خواب آلودگی مفید است (Pelligrino *et al.*, 2010). در بدن کافئین با انواع مولکول‌های زیستی مثل آدنوزین دآمیناز برهم‌کنش دارد که نقش اصلی را در متابولیسم پورین ایفا می‌کند (Moosavi-Movahedi *et al.*, Ataei *et al.*, 2000; Saboury *et al.*, 2002; Ataei *et al.*, 2005 Saboury *et al.*, 2003; Alunni; *et al.*,2008 Ajloo *et al.*,2007; 1993;). کافئین به عنوان مهارکننده چنین فرآیندی مورد بررسی قرار می‌گیرد (Saboury *et al.*, 2003; Saboury *et al.*, 2002). نکته مهم این است که در همه این گزارش‌ها فعالیت ADA در غلظت‌های بسیار زیاد آدنوزین (تا ۱۰۰ میکرومولار) اندازه گیری شده است که در شرایط طبیعی وجود ندارد. در واقع غلظت آدنوزین در بدن بسیار کمتر از این مقدار (در حالت سلامت در گستره ۰/۰۱-۱ میکرومولار و در حالت بیماری‌ها ۳۰ میکرومولار) است (Latini *et al.*, 1999).

در بررسی پیش رو، ضمن رعایت محدوده طبیعی غلظت آدنوزین، برای اولین بار سیگموئیدی بودن منحنی اشباع آدنوزین دآمیناز در این محدوده غلظتی آدنوزین گزارش شده است و بر همین اساس و با کمک تحلیل های تئوری مربوط به سینتیک آنزیمی، مکانیسمی پیشنهاد شده است که کافئین (استخراج شده از چای ایرانی) از آن طریق باعث بازدارندگی فعالیت آدنوزین دآمیناز می‌شود. همچنین تابعیت اثر بازدارندگی کافئین با زمان اثبات شده که در انطباق نتایج مقاله حاضر با گزارش پیشین ما بسیار مفید است.

مواد و روش‌ها

مواد و دستگاه‌ها

آدنوزین دآمیناز روده گاو از Roche (product no.1010210500) تهیه شد. آدنوزین (سوبسترا) و Tris-HCl هر دو از شرکت Sigma و کلسیم کلراید و دی‌کلرومتان ازشرکت Merck خریداری شدند. فعالیت آنزیم با استفاده از روش اسپکتروفتومتر (UV-Vis. Shimadzu-UV1800) مورد سنجش قرار گرفت. حمام اولتراسونیک (230/240V Hz Italy Soltec) و رفراکتومتر (DR201-95, Germany) نیز برای انجام آزمایش مورد استفاده قرارگرفتند.

استخراج و خالص‌سازی کافئین از چای ایرانی

استخراج و خالص‌سازی کافئین از چای ایرانی بر اساس روش امواج فراصوت انجام شد (Mason, 1990). رسوب حاصل از طریق تبلور مجدد در اتانل خالص شد و محصول به صورت جامد سفیدرنگ به دست آمد.

کیفیت محصول بر اساس اندازه‌گیری نقطه ذوب (۲۳۸ °C)، اندیس انکساری (۱/۳۳) و طیف NMR به مشخصات زیر تایید شد:

(400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3.991 (s, 3 H), 3.58 (s, 3 H), 3.403 (s, 3 H) , 7.512 (s).

سنجش فعالیت آنزیمی آدنوزین دآمیناز

فعالیت آدنوزین دآمیناز (19.5×10^{-3} Unit) از طریق سنجش کاهش جذب درطول موج ۲۶۵ nm ناشی از تبدیل آدنوزین (۵۰/۸ میکرو مولار) به اینوزین در بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار (pH ۷/۳) در دمای ۳۷ °C و با احتساب ضریب خاموشی برابر با $8400\ M^{-1}cm^{-1}$ اندازه گیری شد (Ataei *et al.*, 2004). یک واحد فعالیت آنزیم آدنوزین دآمیناز عبارت است از مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول آدنوزین را در مدت یک دقیقه در دمای ۳۷ °C و pH ۷/۳ به اینوزین تبدل کند.

رسم منحنی اشباع آنزیم آدنوزین دآمیناز

پس از تهیه غلظت‌های مختلف سوبسترا (0-50.8 µM) در بافر Tris-HCl در دمای ۳۷ °C واکنش آنزیمی با افزودن 19.5×10^{-3} U آنزیم ADA شروع و سرعت کاهش جذب در طول موج ۲۶۵ nm ثبت شد. سرعت‌های به‌دست آمده به عنوان تابعی از غلظت سوبسترا رسم شد. برای رسم منحنی اشباع در حضور کافئین، محلول‌های سوبسترا دقیقا مانند قبل تهیه شدند با این تفاوت که همگی حاوی مقدار ثابت ۱۰µM کافئین بودند. واکنش طبق روال پیشین، با افزودن همان مقدار آنزیم شروع شد و بقیه عملیات مانند قبل تکرار شد. غلظت‌های آنزیم، آدنوزین و کافئین همگی براساس تجربیات آزمایشگاه و نزدیک به شرایط فیزیولوژیک تنظیم شدند.

اندازه گیری پارامترهای سینتیکی

ضرایب هیل (Hill coefficients) از شیب نمودارهای خطی هیل و مقادیر $S_{1/2}$ به صورت طول از مبدا (محل قطع محور ایکس درمنحنی های هیل) اندازه گیری شد.

بررسی سینتیکی فعالیت ADA

حجم زیادی از محلول آنزیمی در دو حالت بدون کافئین و به همراه کافئین ۱۰ میکرو مولار، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد در بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار و pH ۷/۳ قرار داده شد. در فواصل زمانی مختلف، حجمی به اندازه یک سنجش آنزیمی برداشته شد و پس از دو دقیقه قرار گرفتن در دمای ۳۷ °C، به منظور برقراری تعادل دمایی، فعالیت آنزیم

مطابق روش سنجش فعالیت، با افزودن سوبسترای آدنوزین به غلظت نهایی ۵۰/۸ میکرو مولار که مربوط به ناحیه V_{max} است اندازه گیری شد.

روش‌های آماری

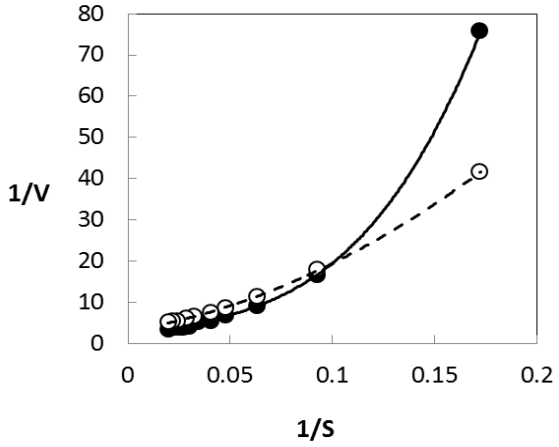
همه‌ی مقادیر آزمایشگاهی، میانگین دست کم سه بار تکرار آزمایش هستند. میانگین انحراف معیار، P-value، رسم منحنی‌ها و بدست آوردن معادلات خط، همگی با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

یکی از مواد موثر بر فعالیت آنزیم آدنوزین دآمیناز،کافئین است (Mahinpour Mazzotti *et al.*, 2011; Saboury *et al.*, 2003 ;*et al.*, 2016). کافئین بصورت خوراکی (در چای، قهوه و نوشیدنی‌های مشابه) یا دارویی (در انواع مسکن‌ها) مصارف زیادی دارد. رابطه مصرف کافئین و تاثیر آن بر خواب اشخاص، جزء تجارب فردی ما است. این تاثیر کافئین به واسطه اثر آن بر فعالیت آنزیم آدنوزین دآمیناز است (Mazzotti *et al.*, 2011). نشان داده شده است که گوناگونی ژنتیکی که در ژن سازنده آنزیم آدنوزین دآمیناز اشخاص مختلف وجود دارد موجب تفاوت اثر مصرف کافئین در روند خواب آن‌ها می گردد (Mazzotti *et al.*, 2012). بطور کلی، مصرف کافئین باعث افزایش مقدار فعالیت آدنوزین دآمیناز در بدن می‌شود (Retey *et al.*, 2005). در مطالعاتی که بر روی موشهای صحرایی (Rat) انجام شده است، مقدار فعالیت آدنوزین دآمیناز تیموس و طحال در اثر تیمار با کافئین افزایش می‌یابد (Peters *et al.*, 1982). از سوی دیگر در گزارش‌های کاملا متفاوتی اعلام شده که کافئین یکی از بازدارنده‌های فعالیت آنزیمی آدنوزین دآمیناز است (Mahinpour *et al.*, 2016; Saboury *et al.*, 2003) که این بازدارندگی به علت اتصال مولکول کافئین به مولکول‌های آنزیم آدنوزین دآمیناز رخ می‌دهد (Saboury *et al.*, 2003). به نظر می‌رسد تولید بیشتر این آنزیم، واکنش طبیعی بدن برای جبران کاهش فعالیت ناشی از اثر بازدارندگی کافئین است.

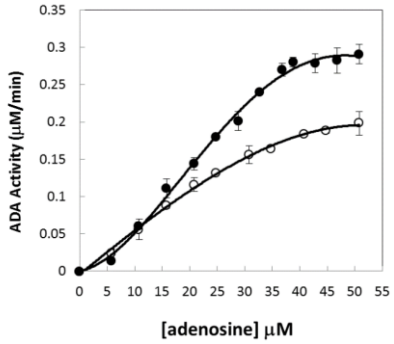
پیش از این، نشان داده شد که منحنی اشباع آنزیم آدنوزین دآمیناز بطور پیچیده‌ای در حضور کافئین تغییر می‌کند (Mahinpour *et al.*, 2016). در آن گزارش بنا بر نوع آزمایش و برای شیبه‌سازی حضور دراز مدت کافئین در بدن تحت شرایط بالینی، آنزیم آدنوزین دآمیناز به مدت ۲۴ ساعت در حضور کافئین انکوبه شد. نتیجه آن وجود منحنی‌های اشباع دو فازی بود. اما منحنی اشباع آنزیم آدنوزین دآمیناز بدون انکوباسیون دمایی دارای شکل سیگموییدی است. این شکل سیگموییدی در حضور کافئین (۱۰ میکرو مولار) تکرار می‌شود (شکل ۱). اگر چه این رفتار در حضور کافئین تکرار می‌شود اما در همین حال، کاهش شدیدی در فعالیت آنزیم ایجاد می‌شود. این کاهش سرعت، با افزایش غلظت سوبسترا (به سمت راست منحنی) حالت افزایشی

دارد؛ به طوری که، فعالیت حداکثر آنزیم (V_{max}) در غلظت حدود ۵۰ میکرومولار آدنوزین به‌طور معنی‌داری ($P<0.01$) به مقدار۳۱/۹۶ درصد کاهش یافته است (اثر بازدارندگی).



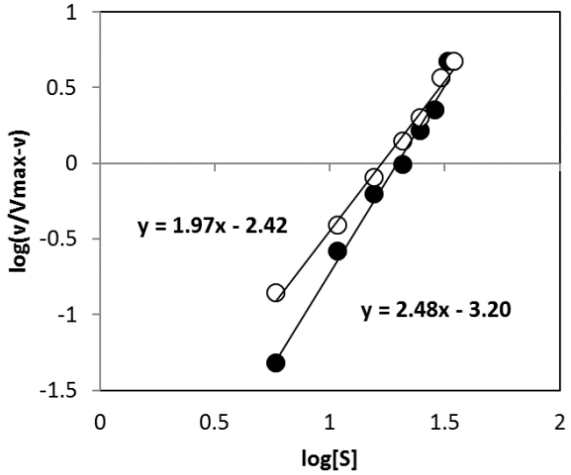
شکل۱: منحنی اشباع آدنوزین دآمیناز در بافر Tris-HCl ، ۷/۳ pH و دمای ۳۷ °C بدون کافئین (دایره توپر) و به همراه کافئین 10mM (دایره توخالی). مقدار آنزیم در همه‌ی سنجش‌ها، یکسان (19.5×10^{-3} U) و از محلول آنزیمی تازه، استفاده شده است. در این مجموعه آزمایش، هیچ انکوباسیونی بین آنزیم و کافئین انجام نشده است. (**ADA: Adenosine deaminase**)

نمودار لاینویور-برک در هر دو شرایطِ با و بدون کافئین انحنای رو به پایین نشان می‌دهد (شکل ۲). این شکل غیر خطی و انحنای رو به پایین آن، شاخص رفتار آلوستریک و مؤید شکل سیگموئیدی منحنی اشباع است (Bardsley *et al.*, 1980; Solano-Munoz *et al.*, 1981).



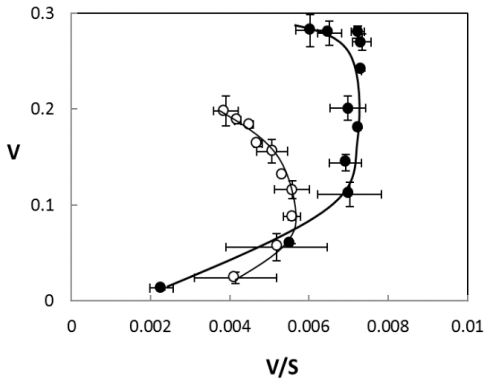
شکل ۲: منحنی لاینویور-برک آدنوزین دآمیناز بدون کافئین (دایره توپر) و به همراه کافئین 10mM (دایره توخالی).

در تایید این برداشت و برای تعیین نوع رفتارآلوستریک، نمودار ادی-هافستی (شکل ۳) رسم شد. انحنایِ به سمت راست در این نمودار وجود اثر آلوستریک از "نوع مثبت" را نشان می‌دهد. این اثر در آزمایش‌های پیشین درهمین محدوده از غلظت سوبسترا نیز گزارش شده بود (Mahinpour *et al.*, 2016). در مطالعه حاضر فقط یک فاز در تغییرات نمودارها مشاهده می‌شود؛ درحالی که در آزمایش‌های پیشین این تغییرات طی دو فاز رخ دادند. این تفاوت را می‌توان به اثر انکوباسیون ۲۴ ساعته آنزیم و کافئین نسبت داد.



شکل۳:منحنی ادی-هافستی آدنوزین دآمیناز بدون کافئین (دایره توپر) و به همراه کافئین 10mM (دایره توخالی).

با توجه به شکل ۳، وجود کافئین شدت اثر آلوستریک مثبت را تغییر داده است. برای کمی کردن شدت اثر آلوستریک مثبت، نمودار هیل (Hill Plot) رسم شد (شکل ۴).



شکل۴: منحنی هیل برای آنزیم آدنوزین دآمیناز بدون کافئین (دایره توپر) و به همراه کافئین 10mM (دایره توخالی).

با استفاده از شیب نمودار هیل (ضریب هیل) و طول از مبدا آن ($S_{1/2}$) مقدار اثر آلوستریک مثبت اندازه‌گیری و ارزیابی شد. نتیجه این اندازه‌گیری‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول۱: پارامترهای سینتیکی آدنوزین دآمیناز بدون کافئین و به همراه کافئین 10mM

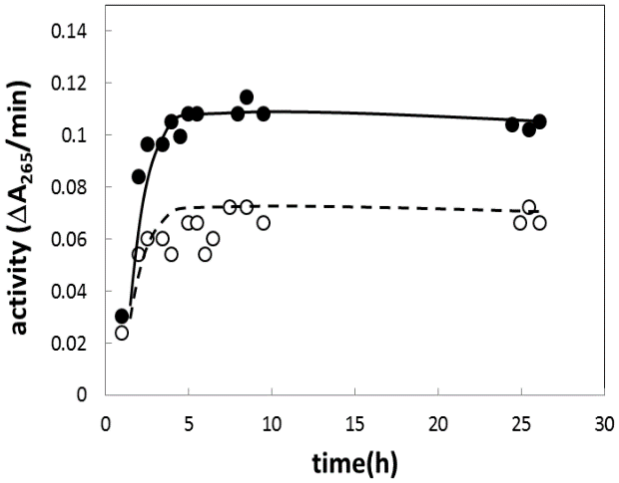
	V_{max} (µM/min)	$S_{1/2}$ (µM)	n_H
ADA	0.291±0.013	19.6	2.48
ADA+ Caffeine	0.198±0.016	16.9	1.97

(ADA: Adenosine deaminase)

همانطور که در جدول ۱ دیده می‌شود با آن که در حضور و عدم حضور کافئین مقدار آنزیم مساوی است اما به دلیل حضور کافئین مقدار V_{max} (در حداکثر مقدار سوبسترا) به طور معنی داری به مقدار ۳۱/۹۶ درصد کاهش یافته است ($P<0.01$) که با گزارش‌های پیشین مبنی بر اثر مهارکنندگی کافئین سازگار است (Saboury *et al.*, 2003). همچنین با توجه به سیگموئیدی

بودن هر دو منحنی در نمودار اشباع و وجود اثر آلوستریک، پارامتر سینتیکی $S_{1/2}$ به جای K_m برای آنزیم در هر دو حالت اندازه‌گیری شد. مقایسه مقادیر $S_{1/2}$ درجدول ۱ نشان می‌دهد که با حضور کافئین درغلظت‌های کمتری از سوبسترا، نیمی از ظرفیت عملکردی آنزیم آدنوزین دآمیناز اشغال می‌شود. اما مهم‌ترین یافته، کاهش ضریب هیل (مقدار تعاونی در اتصال آدنوزین به آنزیم) از مقدار ۲/۴۸ به مقدار ۱/۹۷ در حضور کافئین است. این مشاهده حاکی از این است که با اتصال کافئین شدت اثر آلوستریک مثبت در اتصال آدنوزین‌های متوالی به آنزیم ADA کاهش می‌یابد. به این ترتیب دست‌کم یک مکانیسم برای اثر بازدارندگی کافئین روی عملکرد آدنوزین دآمیناز، کاهش تعاونی مثبت ذاتی درون این مولکول است.

آزمایش بیشتر نشان داد که اثر کافئین بر فعالیت ADA با گذشت زمان متحمل تغییراتی می‌شود. شکل ۵ این تغییرات را با اندازه گیری فعالیت آنزیم در شرایط V_{max} به عنوان تابعی از زمان نشان داده است. این تغییرات به صورت افزایش فعالیت پس از حدود ۶ ساعت به ثبات می‌رسد. با توجه به این مشاهده توصیه می‌شود در پژوهش‌های مشابه، زمان‌های انکوباسیون ADA در شرایط مورد تحقیق به عنوان یک پارامتر موثر بر مقادیر اندازه گیری شدهٔ فعالیت ADA توجه شود.



شکل ۵: تغییرات V_{max} آنزیم آدنوزین دآمیناز به عنوان تابعی از زمان انکوباسیون، بدون کافئین (دایره توپر) و به همراه کافئین 10 mM (دایره تو خالی).

نتیجه گیری

در مجموع، با تحلیل شکل سیگموئیدی منحنی های اشباع به دست آمده، پیشنهاد می‌شود دست کم یک مکانیسم برای اثر بازدارندگی کافئین بر ADA، کاهش اثر آلوستریک مثبت در رابطه بین ADA و سوبسترایش آدنوزین است. یافته های این پژوهش همچنین نشان می‌دهد اثر کافئین بر فعالیت این آنزیم، با زمان افزایش می‌یابد و پس از ۶ ساعت مجاورت، ثابت می ماند. توجه به این نکته در تفسیر بررسی‌های مربوط به آدنوزین دآمیناز اهمیت دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی دانشگاه کاشان سپاسگزار هستند.

منابع

Ajloo, D., Saboury, A.A., Haghi-Asli, N., Ataei-Jafarai, G., Moosavi-Movahedi, A.A., Ahmadi, M., Mahnam, K. and Namaki, S. (2007) Kinetic, thermodynamic and statistical studies on the inhibition of adenosine deaminase by aspirin and diclofenac. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 22: (4) 395-406.

Alunni, S., Orrù, M. and Ottavi, L. (2008) A study on the inhibition of adenosine deaminase. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 23: (2) 182-189.

Antonioli, L., Ataie, G., Moosavi-Movahedi, A.A., Saboury, A.A., Hakimelahi, G.H., Hwu, J.R. and Tsay, S.C. (2000) Enthalpy and enzyme activity of modified histidine residues of adenosine deaminase and diethyl pyrocarbonate complexes. International Journal of Biological Macromolecules, 27: (1) 29-34.

Ataie, G., Safarian, S., Divsalar, A., Saboury, A.A., Moosavi-Movahedi, A.A., Ranjbar, B., Cristalli, G. and Mardanian, S. (2004) Kinetics and structural analysis of the inhibition of adenosine deaminase by acetaminophen. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 19: (1) 71-78.

Ataei, G., Zonoozi, F., Divsalar, A., Moosavi-Movahedi, A.A., Saboury, A.A., Safarian, S. and Habibi, M. (2005) Comparative kinetic and thermodynamic studies on intestinal and spleen adenosine deaminase. Pejuhandeh Journal, 10: (44), 65-72. (In Persian)

Bardsley, W.G., Leff, P., Kavanagh, J. and Waight, R.D. (1980) Deviations from Michaelis-Menten kinetics. The possibility of complicated curves for simple kinetic schemes and the computer fitting of experimental data for acetylcholinesterase, acid phosphatase, adenosine deaminase, arylsulphatase, benzylamine oxidase, chymotrypsin, fumarase, galactose dehydrogenase, beta-galactosidase, lactate dehydrogenase, peroxidase and xanthine oxidase. Biochemical Journal, 187: (3) 739–765.

Boroweic, A., Lechward, K., Tkacz-Stachowska, K.A. and Sktadanowski, C. (2006) Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. Acta Biochima Polonica, 53: 269-278.

Bota, A., Gella, F. and Canalias, F (2000) Purification of human adenosine deaminase for the preparation of a reference material. Journal of Chromatography B, 737: 237-244.

Daddona, P.E., Frohman, M.A. and Kelley, W.N. (1980) Human adenosine deaminase and its binding protein in normal and adenosine deaminase-deficient fibroblast cell strains. The Journal of Biological Chemistry, 255: (12) 5681-5687.

Daddona, P.E. and Kelley, W.N. (1979) Characteristics of an aminohydrolase distinct from adenosine deaminase in cultured human lymphoblasts. Biochimica et Biophysica Acta- Protein Structure, 580: (2) 302-311.

Doddona, P.E., Schewach, D.S., Kelly, W.N., Argos, P., Markham, A.F. and Orkin, S.H. (1984) Human adenosine deaminase. cDNA and complete primary amino acid sequence. The Journal of Biological Chemistry, 259: 12101-12106.

Dreher, H.M. (2003) The effect of caffeine reduction on sleep quality and well-being in persons with HIV. Journal of Psychosomatic Research, 54: (3) 191-198.

Edwards, Y., Hopkinson, D. and Harris, H. (1971) Adenosine deaminase isozymes in human tissues. Annals of Human Genetics- London, 35: 207-219.

Herrera, C., Casado, V., Ciruela, F., Schofield, P., Mallol, J., Lluis, C. and Franco, R. (2001) Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. Molecular Pharmacology, L59: 127-134.

Hirchhorn, R. and Ratech, H. (1980) Isozymes of adenosine deaminase. Isozymes. Current Topics in Biological and Medical Research, 4: 131-157.

Icen, H. and Guru, M. (2009) Effect of ethanol content on supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes. Journal of Supercritical Fluids, 50: 225-228.

Katan, M.B. and Schouten, E. (2005) Caffeine and arrhythmia. American Journal of Clinical Nutrition, 81: (3) 539-540.

Kathiresan, K., Saravanakumar, K., Sahu, S.K. and Sivasankaran, M. (2014) Adenosine deaminase production by an endophytic bacterium (Lysinibacillus sp.) from Avicennia marina. 3biotech. 4: 235-239.

Latini, S., Bordoni, F., Pedata, F. and Corradetti, R. (1999) Extracellular adenosine concentrations during in vitro ischaemia in rat hippocampal slices. Brirtish Journal of Pharmacology, 127: (3) 729-39.

Mahinpour, R., Ghasemi, M., Moosavi-Nejad, S.Z. and Zahraie, Z. (2016) Caffeine effect on adenosine deaminase catalysis: A new look at the effect of caffeine on adenosine deaminase activity. Iranian Journal of Catalysis, 6: (5) 475-480.

Mason, T.J. (1990) Critical reports on applied chemistry.1st edn. vol. 28, Society for Chemical Industry, Pp. 1-25, London & New York, NY.

Mazzotti, D.R., Guindalini, C., De Souza, A.A., Sato, J.R., Santos-Silva, R., Bittencourt, L.R. and Tufik. S. (2012) Human genetics and sleep behavior. Plos One,7: (8) E 44154.

Mazzotti, D. R., Guindalini, C., Pellegrino, R., Barrueco, K.F., Santos-Silva, R., Bittencourt, L.R. and Tufik, S. (2011) Effects of the adenosine deaminase polymorphism and caffeine intake on sleep parameters in a large population sample. Sleep, 34: (3) 399–402.

Meier, J., Coleman, M.S. and Hutton, J.J. (1976) Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. British Journal of Cancer, 33: 312-319.

Mills, G.C., Schmalstieg, F.C., Trimmer, K.B., Goldman, A.S. and Goldblum, R.M. (1976) Purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 73: 2867-2871.

Moosavi-Movahedi, A.A., Samiee, B. and Hakimelahi, G.H. (1993) Thermal analysis of adenosine deaminase in the presence of dodecyl trimethyl ammonium bromide. Journal of Colloid and Interface Science 161: (1) 53-56.

Nunnari, G., Argyris, E., Fang, J., Mehlman, K.E., Pomerantz, R.J. and Daniel, R. (2005) Inhibition of HIV-1 replication by caffeine and caffeine-related methylxanthines. Virology, 335: (2) 177-184.

Nurminen, M.L., Niittynen, L., Korpela, R. and Vapaatalo, H. (1999) Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. European Journal of Clinical Nutrition, 53: (11) 831-839.

Pelligrino, D.A., Xu, H.L. and Vetri, F. (2010) Caffeine and the control of cerebral hemodynamics. Journal of Alzheimer's Disease, 20: S51-S62.

Peters, G.J., Oosterhof, A. and Veerkamp, J.H. (1982) Age-dependency of adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase activities in rat spleen and thymus. Biology of Neonate,42: (3-4) 195-200.

Phillips, N.R., Havel, R.J. and Kane, J.P. (1981) Levels and interrelationships of serum and lipoprotein cholesterol and triglycerides. Association with adiposity and the consumption of ethanol, tobacco, and beverages containing caffeine. Arteriosclerosis, 1: (1) 13-24.

Pornbanlualap, S. and Chalopagorn, P. (2011) Adenosine deaminase from Streptomyces coelicolor: recombinant expression, purification and characterization. Protein Expression and Purification, 78: (2) 167-173.

Rétey , J.V., Adam , M., Honegger, E., Khatami, R., Luhmann, U.F., Jung, H.H., Berger, W. and Landolt, H.P. (2005) A functional genetic variation of adenosine deaminase affects the duration and intensity of deep sleep in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102: (43) 15676-81.

Saboury, A.A., Divsalar, A., Ataie, G., Amanlou, M., Moosavi-Movahedi, A.A. and Hakimelahi, G.H. (2003) Inhibition study of adenosine deaminase by caffeine using spectroscopy and isothermal titration Calorimetry. Acta Biochimica Polonica, 50: 849-855.

Saboury, A.A., Divsalar, A., Ataie Jafari, G., Moosavi-Movahedi, A.A., Housaindokht, M.R. and Hakimelahi, G.H. (2002) A product inhibition study on adenosine deaminase by spectroscopy and calorimetry. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 3: 302-305.

Schwindinger, W.F., Mihalcik, L.J, Giger, K.E., Betz, K.S., Stauffer, A.M., Linden, J., Herve, D. and Robishaw, J.D. (2010) Adenosine A2A receptor signaling and golf assembly show a specific requirement for the gamma7 subtype in the striatum. The Journal of Biological Chemistry, 285: 29787-29796.

Senol, A. and Aydin, A. (2006) Solid–liquid extraction of caffeine from tea waste using battery type extractor: Process optimization. Journal of Food Engineering, 75: 565-573.

Singh, L.S. and Sharma, R. (2000) Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. Molecular and Cellular Biochemistry, 204: (1-2) 127-134.

Solano-Muñoz, F., Mcginlay, P.B., Woolfson, R. and Bardsley W.G. (1981) Deviations from Michaelis-Menten kinetics. Computation of the probabilities of obtaining complex curves from simple kinetic schemes. Biochemical Journal, 193: (1) 339-52.

Tello, J., Viguera, M. and Calvo, L. (2011) Extraction of caffeine from Robusta coffee (Coffea canephora var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide. The Journal of Supercritical Fluids, 59: 53-60.

Wang, H., Chen, L., Xu, Y., Zeng, Q., Zhang, X., Zhao, Q. and Ding, L. (2011) Dynamic microwave-assisted extraction coupled on-line with clean-up for determination of caffeine in tea. LWT– Food Science and Technology, 44: 1490-1495.

The mechanism of inhibitory effect of caffeine from Iranian tea on sigmoidal kinetics of adenosine deaminase enzyme activity

R. Mahinpour[1*], M. Ghasemi[2], Z. Moosavi-Nejad[3*], Z. Zahraei[1]

Received: 2016.11.21
Accepted:2018.12.25

Abstract

Caffeine is one of the most important ligand of adenosine deaminase (ADA). In the present study, changes in adenosine deaminase activity were measured in Tris-HCl buffer 50mM, pH 7.3 at 37^{o}C in the presence and absence of caffeine in increasing concentrations of adenosine as a substrate (0-50µM) and in various incubation times with caffeine. Regarding the analysis of the saturation curves, for the first time, their sigmoidal shape shows considerable differences with previous reports which can be referred to differences in concentration range of substrate and incubation time with caffeine. Based on the sigmoidal shape of saturation curve, mechanism of caffeine effect is explainable. Moreover, based on finding of this study, the effect of caffeine on ADA activity is a function of incubation time and stabilized after 6 hours incubation of enzyme with caffeine. This is noteworthy when interpreting the results of the studies on ADA and its ligands.

Key words: Adenosine deaminase, caffeine, mechanism of inhibition, sigmoidal kinetics.

1- Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, Kashan University, Kashan, Iran Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, IRAN

2- M.Sc, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, Kashan University, Kashan, Iran

3- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran

* (Corresponding Author: mahinpur@kashanu.ac.ir and z.moosavinejad@alzahra.ac.ir)

4- Assistant Professor, Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Kashan University, Kashan, Iran