

«مکان‌های اتصال» هگزوکیناز در میتوکندری بافت طبیعی و تومورال مغز انسان

ابوالفضل گلستانی^۱، محسن نعمت گرگانی^۲

۱- دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB)

۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

چکیده

اتصال هگزوکیناز نوع I (HK I) به میتوکندری بافت‌های طبیعی و تومورال مغز انسان مورد مطالعه قرار گرفته است. این بررسی با هدف یافتن تفاوت‌های احتمالی در چگونگی اتصال این آنزیم به غشای خارجی میتوکندری در بافت‌های مذکور انجام شده و نتایج آن نشان می‌دهد که مشابه مغز موش صحرایی، دو جایگاه اتصال برای آنزیم HK بر روی میتوکندری مغز انسان وجود دارد. این امر با تهیه میتوکندری از بافت‌های مورد نظر به روش اولتراسانتریفوگاسیون تمایزی و بررسی قابلیت جدا شدن آنزیم به وسیله G6P و KSCN و همچنین اتصال مجدد آن به میتوکندری مغز و کبد موش صحرایی و مغز سالم و سرطانی انسان، انجام گرفت. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به عنوان ابزاری برای بررسی تغییرات سطح غشای خارجی میتوکندری بافت‌های مورد نظر، مورد استفاده قرار گرفتند. اختلافات مشاهده شده در ویژگی‌های مکان اتصال آنزیم به غشاء می‌تواند در تنظیم فعالیت کاتالیتیکی آنزیم متصل، نقش قابل ملاحظه‌ای داشته باشد. به منظور درک اهمیت متابولیک و فیزیولوژیک این اتصال و نقش آن در سرطان مغز، تحقیقات دامنه‌داری در دست انجام است.

واژه‌های کلیدی: هگزوکیناز نوع I، جایگاه‌های اتصال، میتوکندری بافت طبیعی و تومورال مغز انسان، آنتی‌بادی مونوکلونال، پورین

مقدمه

پروتئین «پورین» (Porin) موجود در نقاط تماس دو غشای میتوکندری متصل شود [۴، ۶، ۹، ۱۱]، پیشنهاد شده است که «پورین» و یا پروتئین همراه آن در منافذ مذکور، در تنظیم اتصال HK I دخالت دارند [۸، ۱۲]. اتصال آنزیم برگشت‌پذیر است و توزیع این فعالیت آنزیمی بین حالت‌های متصل و آزاد به غلظت برخی متابولیت‌های درون

در برخی از بافت‌ها بخش عمده‌ای از ایزوآنزیم نوع I هگزوکیناز پستانداران (HK I; ATP: D-hexose 6-phosphotransferase; EC 2.7.1.1)، بر منافذ موجود بر روی غشای خارجی میتوکندری قرار گرفته است [۵-۱]. این امر به ویژه در نقاط اتصال غشاهای داخلی و خارجی اتفاق می‌افتد [۸-۶]. از آنجا که آنزیم ترجیح می‌دهد به

Archive of SID

مواد و روش‌ها

مواد بیوشیمیایی مورد نیاز از شسرکت (St. Louis, MO) Sigma و مواد شیمیایی از شرکت (Darmstadt, Germany) Merck Affi-Gel Blue از شرکت (Richmond-CA) Bio-Rad تهیه گردید. بیوپسی از بافت‌های طبیعی و تومورال از بخش‌های جراحی اعصاب بیمارستان امام خمینی، سینا و لقمان (تهران) اخذ و بلافاصله در ازت مایع قرار گرفت. میتوکنندری کبد موش صحرایی به روش Bustamante et al. [۱۵] تهیه و سنجش پروتئین به روش Katzenellenbogen et al. [۱۶] انجام شد.

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و مهارکننده 5-Anhydroglucitol-6-P و 1 از سوی پروفیسور John E. Willson استاد دانشگاه ایالت میشیگان - آمریکا، اهدا گردید.

هگزوکیناز مغز موش به روش کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از Affi-Gel Blue طبق روش Wilson تخلیص شد [۱۷] و غلظت آن بر مبنای میزان جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر و ضریب خاموشی (مولار) برابر $0.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه گردید [۱۸]. از فیلترهای Amicon نوع YM10 (Amicon Corp. Ma) استفاده و SDS-PAGE طبق روش laemmli انجام گردید [۱۹]. فعالیت ویژه آنزیم خالص شده حدود ۵۰ U/mg بود و خلوص آن به کمک الکتروفورز تأیید گردید.

فعالیت هگزوکیناز به روش اسپکتروفوتومتری با واکنش کمکی گلوکوز-۶-فسفات دهیدروژناز اندازه‌گیری شد [۲۰]. طبق تعریف، یک واحد آنزیمی عبارت از مقدار آنزیمی است که در شرایط مشخص، یک میکرومول از محصول واکنش (گلوکوز-۶-فسفات) را در

سلولی، خصوصاً گلوکز-۶-فسفات (Glc 6-P) بستگی دارد [۱۳، ۱۲]. علاوه بر این، نوع دومی از مکان‌های اتصال در میتوکنندری پستانداران مشاهده شده است که ممکن است پورین در آن وجود نداشته باشد [۱۳، ۳]. اتصال آنزیم به این مکان‌ها، غیر ویژه بوده و توسط برخی نمک‌های کائوتروپ (Chaotropic salts) نظیر پتاسیم تیوسیانات (KSCN)، تحت تأثیر قرار می‌گیرد [۱۴، ۱۳]. HK_{KSCN} از نظر خصوصیات آنزیمی هیچ تفاوتی با یکدیگر ندارند [۱۳]. بر اساس نتایج حاصل از مطالعات جدا شدن آنزیم از این دو «جایگاه» در میتوکنندری مغز گونه‌های مختلف، پیشنهاد شده است. جمعیت‌های متفاوت از آنزیم متصل که به اثر Glc 6-P پاسخ‌های متفاوت می‌دهند، بر روی میتوکنندری وجود دارد. در این خصوص، حساسیت به اثر Glc 6-P به طبیعت جایگاه اتصال میتوکندریایی نسبت داده می‌شود [۸، ۹، ۱۱، ۱۴].

با توجه به اهمیت آنزیم HK I در کنترل متابولیسم گلوکز، بررسی وجود دو جایگاه متفاوت اتصال بر روی غشای خارجی میتوکنندری بافت‌های سالم و سرطانی مغز انسان و مقایسه ویژگی‌های آنها به عنوان هدف تعیین گردید.

در این مطالعه، حساسیت هگزوکیناز برای جدا شدن به وسیله Glc 6-P و KSCN و نیز تأثیر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (Mabs) در ممانعت از اتصال مجدد آنزیم به میتوکنندری بافت‌های طبیعی و تومورال مغز انسان، مورد بررسی قرار گرفته است.

یافته‌ها نشان می‌دهد که نظیر مغز موش صحرایی، در میتوکنندری این بافت‌ها نیز دو جایگاه اتصال متفاوت برای آنزیم وجود دارد و نواحی ساختمانی ویژه‌ای از آنزیم در این اتصال نقش اساسی دارند.

Archive of SID

جداشدن در اثر Glc 6-P در بافت‌های طبیعی و تومورال مغز انسان، در (جدول ۱) نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که آنزیم بافت طبیعی انسان در مقایسه با مغز موش صحرایی، به اثر Glc 6-P نسبتاً غیر حساس است. در نمونه‌های بیوپسی، آستروسایتوما (Astrocytoma) رفتاری شبیه به بافت طبیعی دارد. حال آنکه نمونه‌های دیگر حساسیت بیشتری نشان دادند. گلیوبلاستوما (Glioblastoma) که از تومورهای high grade [۲۳] شناخته می‌شوند، از آستروسایتوما به عنوان تومورهای low grade، کاملاً متمایزاند [۲۳]. هگزوکیناز میتوکندریایی در بافت‌های منژیوما (Meningioma) و نورینوما (Neurinoma)، هر دو با منشاء سلول‌های پوششی مغز - بیشترین حساسیت را به جداشدن در اثر Glc 6-P نشان می‌دهد.

جدا شدن هگزوکیناز میتوکندریایی توسط KSCN : HKI به کمک دو نوع نیروی ضعیف به غشای خارجی میتوکندری متصل می‌شوند. نیروهای الکتروستاتیک که

یک دقیقه تولید کند. مطالعات سینتیک نیز در همان شرایط سنجش فعالیت آنزیم لکن با غلظت‌های متغیر از سوستر (ATP) و در حضور مهارکننده انجام شد. ۱ و ۵- انیدروگلوستول -۶- فسفات، نظیر Glc 6-P، مهارکننده نسبتاً قوی هگزوکیناز است ولی سوسترای آنزیم گلوکوز -۶- فسفات دهیدروژناز نبوده و لذا می‌توان از روش معمول برای سنجش فعالیت آنزیم در حضور آن استفاده کرد [۲۰]. تحلیل نتایج سینتیک به کمک برنامه EZ-Fit [۲۱]، آزمایش‌های جداشدن آنزیم از میتوکندری و اتصال مجدد آن طبق روش Kabir و Wilson [۱۳] و مطالعه تأثیر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بر اتصال HK مغز موش صحرایی به میتوکندری طبق روش Wilson و Smith [۲۲] انجام شد.

نتایج

جدا شدن هگزوکیناز میتوکندریایی (mHK) توسط Glc 6-P : حساسیت HK میتوکندریایی به

جدول ۱- قابلیت جداشدن هگزوکیناز متصل به میتوکندری بافت‌های طبیعی و تومورال مغز انسان به وسیله Glc 6-P

نوع بافت	مغز طبیعی	گلیوبلاستوما	آستروسایتوما	منژیوما	نورینوما	مغز موش صحرایی
درصد جداشدن	۳۴/۳±۵/۳	۶۵/۸±۳/۵	۳۱±۰/۸	۶۵/۷±۰/۴۲	۷۳/۹±۰/۶	۷۴/۲±۱/۸
	۱۵/۳±۱/۹	۳۱/۸±۰/۳۵	۳۴/۴±۱/۵	۷۲/۱±۰/۳	۸۳/۷±۱/۶	۶۶/۷±۲/۳
	۳۲/۶±۲/۷	۸۱/۵±۰/۳۵	۲۸/۹±۰/۸	۶۸/۳±۰/۷	۷۰/۵±۰/۱۴	۶۴±۰/۲۶
میانگین ± SE	۳۰/۴±۱۰/۶	۵۹/۷±۱۸	۳۱/۴±۲/۳	۶۹/۸±۲/۹	۷۶±۶/۹	۶۸/۳±۴/۳

اندازه‌ها، میانگین ± SE برای ۳ آزمایش است که داده‌های مربوط به هر نوع بافت جداگانه ذکر شده است. پس از تأثیر Glc 6-P فعالیت موجود در محلول رویی به اضافه فعالیت رسوب که در همان حجم اولیه هموزن گردید، معادل ۱۰۰ در نظر گرفته شد و مقدار فعالیت جدا شده (یعنی فعالیت در محلول رویی) به صورت درصدی از کل فعالیت محاسبه شد.

Archive of SID

میتو کندری، نسبت به بافت‌های تومورال، با سهولت کمتری از این جایگاه جدا می‌شوند. افزایش میزان کنده شدن در بافت تومورال ناشی از تغییرات در ترکیب غشای میتو کندریایی آنها است که در نتیجه آن بار و هیدروفوبی سیتی غشاء تغییر می‌کند. غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار از همین نمک، بخش اعظم فعالیت متصل در نمونه‌های مورد آزمایش را احتمالاً به علت تخریب ساختمان غشاء، از میتو کندری جدا می‌کند.

تأثیر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بر اتصال مجدد HK I: در تحقیقاتی که تاکنون انجام شده جدا شدن هگزوکیناز میتو کندریایی از جنبه‌های گوناگون مورد بررسی قرار گرفته ولی در عین حال مطالعه اتصال مجدد آن به غشای خارجی میتو کندری نیز از نظر دور نمانده است [۲۵، ۲۲، ۱۳]. در تحقیق حاضر، موضوع اتصال مجدد هگزوکیناز خالص شده از مغز موش صحرایی به میتو کندری بافت‌های طبیعی و

تحت تأثیر نمک‌های غیر کاترئوپ قرار می‌گیرند و نیروهای هیدروفوب که در اثر نمک‌های کاترئوپ گسسته می‌شوند [۱۴]. بافت مغز در گونه‌های مختلف پستانداران دارای دو جمعیت متمایز هگزوکیناز میتو کندریایی است که از اتصال یک نوع آنزیم به مکان‌های متفاوت بر روی میتو کندری ایجاد شده است [۲۴، ۱۳]. نتایج حاصل از تأثیر محلول ۱۵۰ میلی‌مولار KSCN بر جدا شدن آنزیم میتو کندریایی از میتو کندری بافت‌های مورد آزمایش در (جدول ۲) نشان داده شده است. KSCN یک نمک کاترئوپ است که اندرکنش‌های هیدروفوب بین مولکول آنزیم و جایگاه اتصال نوع دوم بر روی غشای خارجی میتو کندری را تضعیف کرده و باعث جدا شدن آنزیم از آن می‌گردد [۱۴، ۱۳]. همان‌طور که دیده می‌شود HK I میتو کندریایی بافت طبیعی مغز به علت فزونی نیروهای جاذبه بین آنزیم و اجزای تشکیل دهنده جایگاه دوم در غشای

جدول ۲- قابلیت جدا شدن هگزوکیناز متصل به میتو کندری در بافت‌های طبیعی و تومورال مغز انسان به وسیله KSCN

نوع بافت	مغز طبیعی	گلیوبلاستوما	آستروسایتوما	منژیوما	نورینوما	مغز موش صحرایی
درصد جدا شدن با ۱۵۰ میلی‌مولار KSCN	۲۴/۷	۷۱	۷۲/۵	۸۱	۷۲/۴	۵۵/۲
	۵۷/۲	۶۱/۳	۶۶	۳۵/۵	۷۰/۳	۵۵/۱
	۴۷/۴	۴۴/۸	۶۵	۶۳/۶	۷۴	۵۲/۸
	۳۶/۸	۵۳/۸		۶۶/۷		
میانگین \pm SE	۴۳ \pm ۱۲	۵۷/۷ \pm ۹/۷	۶۷/۸ \pm ۳/۳	۶۶/۲ \pm ۹/۸	۷۲/۲ \pm ۱/۵	۵۵/۴ \pm ۲/۲
درصد جدا شدن با ۵۰۰ میلی‌مولار KSCN	۹۹	۸۱/۸	۹۱	۸۷/۸	۱۰۰	۸۶
	۹۱/۴	۹۳/۸	۹۶/۷	۱۰۰	۱۰۰	۹۱/۲
	۷۸/۴	۷۵/۴	۹۱/۸	۹۲/۲	۹۵	۸۵/۴
	۹۱/۵	۷۹/۴		۸۴/۳		
میانگین \pm SE	۹۰/۱ \pm ۷/۴	۸۲/۶ \pm ۶/۹	۹۳/۲ \pm ۲/۵	۹۱/۱ \pm ۵/۹	۹۸/۳ \pm ۲/۴	۸۷/۵ \pm ۲/۶

اندازه‌ها، میانگین \pm SE ۳ آزمایش برای هر بافت است. فعالیت باقی مانده در رسوب برای محاسبه درصد جدا شدن مورد استفاده قرار گرفت (KSCN موجود در محلول رویی، آنزیم را غیر فعال می‌کند).

Archive of SID

میزان اتصال مقدار ثابتی از آنزیم به مقدار (تعداد) معینی از میتو کندری - تعریف شده بر مبنای غلظت پروتئین میتو کندریایی - در (جدول ۳) نشان داده شده است. در مقایسه با بافت نرمال، مقادیری کمتری از آنزیم به میتو کندری بافت‌های تومورال متصل می‌شود. این نشان می‌دهد که در بافت‌های مذکور، مکان‌های حساس به Glc 6-P در سطح مولکولی و خصوصیات فیزیکی سطح اتصال، متحمل تغییرات عمده‌ای گردیده‌اند.

تومورال مغز انسان که آنزیم متصل به آنها قبلاً در اثر مجاورت با Glc 6-P تخلیه گردیده، بررسی شده است. بر اساس اطلاعات موجود راجع به تطابق توالی اسیدهای آمینه هگزوکیناز نوع I مغز موش صحرایی و مغز انسان [۲۶]، تشابه بسیار زیادی بین دو ساختمان پروتئینی دیده می‌شود. به همین دلیل می‌توان انتظار داشت که آنزیم خالص شده از مغز موش صحرایی بتواند به طور ویژه به میتو کندری مغز انسان متصل شود. آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق، این نظر را اثبات نمود.

جدول ۳- اتصال مجدد هگزوکیناز تخلیص شده از مغز موش صحرایی به میتو کندری بافت طبیعی و تومورال مغز انسان

نوع بافت	مغز طبیعی	گلیوبلاستوما	آستروسایتوما	منژیوما	نورینوما
درصد اتصال مجدد	۱۰۰	۸۳	۶۸/۳	۶۴/۷	۴۴/۲

U ۰/۱ هگزوکیناز تخلیص شده از مغز موش صحرایی به میتو کندری که قبلاً با Glc 6-P مجاور شده است، متصل شد. در تمام موارد، مقدار مساوی از میتو کندری معادل یک میلی گرم پروتئین، در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفت. اندازه فعالیت متصل به نمونه بافت طبیعی معادل ۱۰۰ در نظر گرفته شد و مقادیر مربوط به نمونه‌های تومورال نسبت به آن محاسبه گردید.

جدول ۴- تأثیر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بر اتصال آنزیم به میتو کندری بافت‌های طبیعی و تومورال مغز انسان

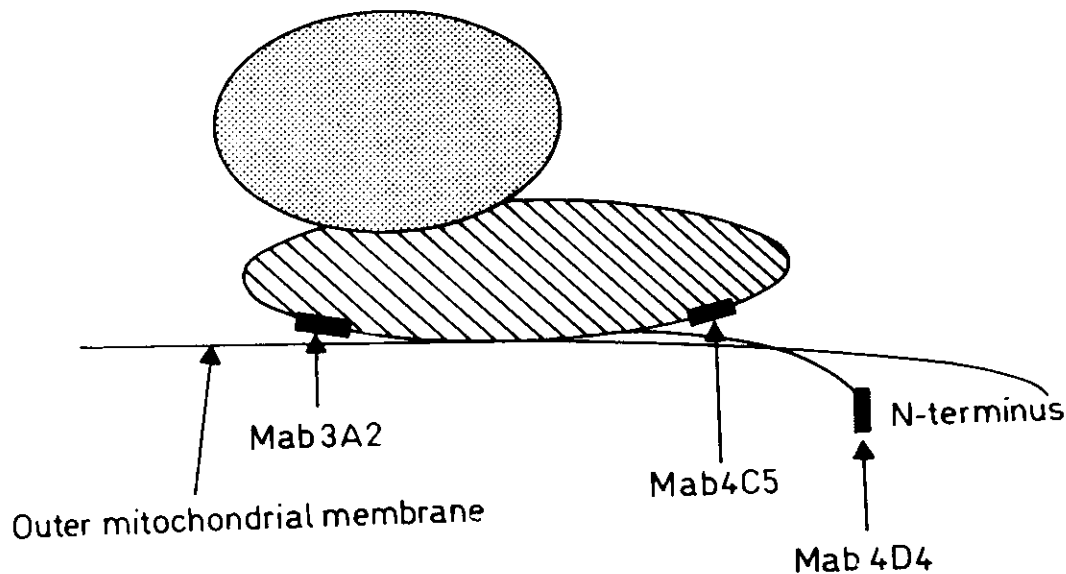
نوع بافت	مغز موش صحرایی	مغز طبیعی (n=۹)	گلیوبلاستوما (n=۷)	آستروسایتوما (n=۱۰)	منژیوما (n=۸)	نورینوما (n=۸)
کنترل	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
Mab 4D4	۵۰	۵۰/۱	۶۳/۲	۵۴/۷	۶۲/۵	۷۰
Mab 3A2	۴۹	۵۲/۴	۷۷/۸	۶۶/۴	۶۷/۵	۷۶/۴
Mab 4C1	۵۰/۵	۵۳/۷	۶۹/۸	۶۱/۴	۶۸	۷۸/۱

در هر آزمایش، هگزوکیناز مغز موش صحرایی (U ۰/۱) با مقداری از آنتی‌بادی که اتصال آنزیم بر روی میتو کندری کبد موش صحرایی (یک میلی گرم پروتئین) را در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر، به میزان ۵۰٪ ممانعت می‌کند، انکوبه شد. غلظت‌هایی از آنتی‌بادی‌ها که به این طریق تعیین شد، در آزمایش‌های مربوط به نمونه‌های بیوبسی حاوی همان مقدار فعالیت هگزوکیناز مغز موش صحرایی و سوسپانسیون پروتئین میتو کندریایی به کار رفت. میزان اتصال در عدم حضور آنتی‌بادی (کنترل)، ۱۰۰ در نظر گرفته شد و نتایج مربوط به اتصال در حضور هر یک از آنتی‌بادی‌ها، نسبت به آن محاسبه گردید.

جدول ۵- اندازه Km و Ki ظاهری HK^۱ میتوکندریایی بافت‌های مختلف

منبع میتوکندری	Km برای ATP (میلی مولار)	Ki برای مهار کننده (میکرومولار)
مغز موش صحرائی	۰/۳(۰/۳-۰/۵)	۱۹/۴
مغز طبیعی انسان	۰/۴۳±۰/۰۲۷ (n=۲)	۵۹/۳±۷/۵ (n=۲)
آستروسایتوما	۰/۳۷±۰/۰۰۸ (n=۲)	۳۴±۲/۵ (n=۲)
منژیوما	۰/۵۶±۰/۰۵۶ (n=۲)	-

اندازه Km و Ki به روش‌های تعریف شده در متن مقاله با استفاده از مقادیر مناسب از سوسپانسیون میتوکندریایی هر نمونه، تعیین گردید. تعداد آزمایش‌های مربوط هر نوع از بافت و اندازه‌های گزارش شده Km برای آنزیم متصل [۴۳، ۴۷] در پرانتز نشان داده شده است. مقادیر ذکر شده میانگین ± SE است.



تصویر ۱- نمایش شماتیک هگزوکیناز متصل بر غشای خارجی میتوکندری که در آن فقط N-انتهایی درگیر در اتصال نشان داده شده است. این قسمت از دو بخش «کوچک» (نقطه چین) و «بزرگ» (هاشور زده) تشکیل می‌شود. به هنگام اتصال، بخش «بزرگ» بر سطح غشای میتوکندری واقع شده و قطعه هیدروفوب N-انتهایی به عمق لایه لیپیدی غشاء فرو می‌رود [۲۷]. اپی‌توپ‌هایی که توسط آنتی‌بادی‌های مونوکلونال شناسایی می‌شوند، با مستطیل‌های سیاه رنگ مشخص شده‌اند [بر گرفته از ۲۲].

(تصویر ۱).

اثر این آنتی‌بادی‌ها بر ممانعت از اتصال مجدد آنزیم به غشای خارجی میتوکندری در بافت‌های مورد آزمایش در

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مورد استفاده در این تحقیق، اپی‌توپ‌های متفاوتی را در هگزوکیناز نوع I مغز موش صحرائی شناسایی کرده و به آن متصل می‌شوند

Archive of SID

				10	30	40	50	
Human	Type I	N	1	MIAAQLLAYYFTELKDD	-----AMRLSDETLIDIMTRFRKEMKNG			
Rat	Type I	N	1	MIAAQLLAYYFTELKDD	-----AMRLSDE I LIDI LTRFKKEMKNG			

				Mab 4D4		Mab 3A2		
				60	70	80	90	
		N	51	LSRDFNPTATVKMLPTFVRSIPDGSEKGFIALDLGGSSFRIL	-----			
		N	51	LSRDYNPTASVKMLPTLLRSIPDGSEKGFIALDLGGSSFRIL	-----			

				Mab 3A2 cont.				
				360	370	380	390	
		N	355	ILTRLGVEPSDDDCVSVQHVCTIVSFRSANI.VAATLGAILNR	-----			
		N	355	ILTRLGVEPSDVCVSVQH ICT IVSFRSANI.VAATI.GAILNR	-----			

				Mab 4C5				

تصویر ۲- مقایسه توالی اسیدهای آمینه نیمه N- انتهایی هگز و کیناز نوع I مغز انسان و مغز موش صحرایی و توالی اپی توپ‌هایی که آنتی‌بادی‌های مورد استفاده آنها را تشخیص می‌دهند. اسید آمینه ۹-۱، اپی توپ تشخیصی Mab 4D4، اسید آمینه ۶۰-۳۶، اپی توپ تشخیصی Mab 3A2 و اسید آمینه ۳۸۵-۳۶۵، اپی توپ تشخیصی Mab 4C5.

افزایش سرعت گلیکولیز در سلول‌های تومورال صورت گرفته است. ارتقای سطح گلیکولیز در تومورهای انسانی نشانه آن است که گلوکوز منبع اصلی تأمین انرژی در سلول‌های نوپلازیک بوده و در این میان HK نقش بسیار مهمی بر عهده دارد [۲۹، ۲۸]. از سوی دیگر، در تومورهای مغز انسان، کاهش سطح HK I گزارش شده است [۳۰، ۳۱]. چنین پیشنهاد می‌شود که در این بافت‌ها علی‌رغم کاهش مقدار تام HK، اتصال آنزیم به میتوکندری پتانسیل بالای گلیکولیز را تضمین می‌کند.

اعتقاد بر این است که اتصال آنزیم به «پورین» میتوکندریایی، حالت «باز» را در این منافذ القا می‌کند که در نتیجه آن، جریان پیوسته ATP برای فسفریلاسیون گلوکز برقرار می‌شود [۳۳]. از دیگر تبعات مهم این اتصال، می‌توان به دسترسی ترجیحی آنزیم به ATP تولید شده در

(جدول ۴) نشان داده شده است. مطالعات اولیه نشان می‌دهد که آنتی‌بادی‌های مذکور، مانع اتصال HK به میتوکندری مغز (تخلیه شده از آنزیم متصل در اثر مجاورت با Glc 6-P) و یا کبد موش صحرایی (فاقد آنزیم متصل) می‌شوند [۲۲]. در ابتدا به منظور فراهم کردن شرایط یکسان و قابل مقایسه، غلظت خاصی از هر آنتی‌بادی که مانع از اتصال آنزیم به میتوکندری کبد موش صحرایی به میزان ۵۰٪ می‌شود، تعیین گردید. در مرحله بعد، توانایی میتوکندریای تهیه شده از بافت‌های طبیعی و تومورال مغز انسان در تأمین جایگاه اتصال برای قسمت‌های آزاد سطح تماس آنزیم در حالت کمپلکس با سه نوع Mab، مقایسه گردید (جدول ۴).

بحث

تاکنون تلاش‌های بسیاری برای توضیح مکانیسم‌های

Archive of SID

بافت طبیعی خیلی بیشتر است. جالب است بدانیم که چنین تفاوت‌هایی در جدا شدن آنزیم از میتوکنندری در انواع گونه‌های پستانداران نیز مشاهده شده است [۱۳]. تحقیقات Moller و Wilson نشان داد که نواحی مختلفی با ترکیب لیپیدی متفاوت در غشای خارجی میتوکنندری وجود دارد و لذا پیشنهاد نمودند که ترکیب لیپیدی غشاء در سطح تماس آنزیم و میتوکنندری، حساسیت HK میتوکندریایی را به کنده شدن توسط Glc 6-P تحت تأثیر قرار می‌دهد [۴۲]. فسفولیپیدهای اسیدی تأثیر Glc 6-P را جدا کردن آنزیم از میتوکنندری مغز موش صحرایی تشدید می‌کنند [۴۲]. این اثر به افزایش نیروهای دافعه الکتروستاتیک مابین آنزیم و غشاء و در نتیجه تضعیف پیوندهای ضعیف بین آنها و تقویت خاصیت جداکنندگی Glc 6-P نسبت داده می‌شود [۱۳].

اگر چه تفاوتی در تأثیر ۵۰۰ میلی‌مولار KSCN بر کندن آنزیم از غشاء در بین نمونه‌های طبیعی و تومورال مشاهده نشد (جدول ۲)، غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار این نمک، باعث جدا شدن مقدار بیشتری از فعالیت آنزیم متصل به میتوکنندری در نمونه‌های تومورال نسبت به بافت نرمال گردید. رهاسازی HK_{Glc 6-P} و HK_{KSCN} متصل، به روش انکوباسیون میتوکنندری در حضور عوامل مورد نظر، تأیید یافته‌های قبلی مبنی بر وجود دو جمعیت هگزوکیناز میتوکندریایی است که از اتصال یک آنزیم به دو جایگاه مختلف بر میتوکنندری حاصل می‌شود [۱۳].

تحقیق حاضر نشان می‌دهد که شیبه میتوکنندری بافت مغز پستانداران دیگر [۱۳]، دو مکان مجزای اتصال برای HK I در میتوکنندری بافت طبیعی و تومورال مغز انسان وجود دارد. مقایسه خواص سینتیکی آنزیم میتوکندریایی در بافت‌های طبیعی و تومورال نشان می‌دهد که این آنزیم‌ها (app) Km نسبتاً مشابه ولی (app) Ki متفاوتی دارند (جدول ۵). بر اساس آنچه تاکنون گزارش شده است، با

میتوکنندری، کاهش قابلیت مهارشوندگی توسط محصول واکنش و بالاخره محافظت در برابر پروتولیز اشاره نمود [۳۵، ۳۱، ۳۰، ۲۴]. به علاوه نشان داده شده است که HK میتوکندریایی، مقادیر کافی ADP را که برای روند فسفریلاسیون اکسیداتیو ضروری است، تأمین می‌کند [۳۶]. از میان این عوامل، کاهش اثر مهارکنندگی محصول واکنش بر روی mHK و نیز سرعت زیاد کاتالیز واکنش فسفریلاسیون، علت‌های مهم افزایش سطح گلیکولیز - علی‌رغم کاهش فعالیت HK در بافت تومورال، به شمار می‌روند [۳۱]. نکته قابل توجه آن است که کلیه مقالات منتشره، آنها که افزایش [۳۲، ۲۸، ۲۵، ۸، ۵] و یا کاهش [۳۹، ۳۸، ۳۷، ۳۰] فعالیت HK را در سلول‌های تومورال گزارش کرده‌اند، بدون استثنا معتقدند که اتصال میتوکندریایی آنزیم نقش محوری در تنظیم فعالیت کاتالیتیکی آن به عهده دارد [۴۰، ۸].

این موضوع مبنای تحقیق حاضر قرار گرفت و آزمایش‌ها در جهت روشن شدن تفاوت‌های احتمالی «دو جایگاه» اتصال برای HK I که چگونگی ارتباط آنزیم با میتوکنندری را تحت تأثیر قرار می‌دهند، طراحی و اجرا شد. همچنین تلاش شد با تهیه نمونه‌های بیوسی که بلافاصله پس از عمل جراحی در ازت مایع قرار می‌گرفتند، خواص فیزیوشیمیایی غشای خارجی میتوکنندری و نیز HK I به شرایط طبیعی آنها نزدیک باشد. مجموعاً بیش از ۵۰٪ مبتلایان به تومور مغز در انسان، به چهار نوع تومور مورد مطالعه (گلیوبلاستوما، آستروسایتوما، منژیوما و نورینوما) مبتلا هستند [۴۱].

نتایج ارایه شده در (جدول ۱) مربوط به جدا شدن HK I از میتوکندریای نمونه‌های طبیعی و تومورال، به وضوح نشان می‌دهد که در تمام موارد، تنها بخشی از آنزیم توسط Glc 6-P از میتوکنندری جدا می‌شود ولی حساسیت به جدا شدن آنزیم از تومورها نسبت به

Archive of SID

بافت‌های تومورال شوند. هر چند تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای نیز در این خصوص وجود دارد. از جمله آنکه آنتی‌بادی 4D4، از دیگر آنتی‌بادی‌ها در ممانعت از اتصال موثرتر است. این آنتی‌بادی اپی‌توبی را در قطعه N- انتهایی آنزیم شناسایی می‌کند که به هنگام اتصال، در عمق هیدروفوب غشای میتوکنندری فرو می‌رود [۲۲]. قبلاً ثابت شده است که وجود قطعه هیدروفوب مذکور برای اتصال آنزیم به غشاء الزامی است [۸، ۸، ۶]. قابل ذکر است که اپی‌توب تشخیصی این آنتی‌بادی در HK I مغز موش صحرایی، از نظر توالی اسیدهای آمینه ۱۰۰٪ با اپی‌توب نظیر آن در آنزیم بافت نرمال مغز انسان مشابه است [۲۶، ۲۲]. درصد این تشابه برای اپی‌توب تشخیصی آنتی‌بادی‌های 3A2 و 4C5 به ترتیب ۸۸ و ۹۹ است (تصویر ۲).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد دو «جایگاه» اتصال برای HK I که بر اساس مطالعات طولانی بر روی اندرکنش آنزیم با غشای خارجی میتوکنندری گونه‌های مختلف پستانداران به اثبات رسیده است، در میتوکنندری بافت‌های طبیعی و تومورال مغز انسان نیز وجود دارد. هر گونه برداشت کاربردی از تفاوت‌های موجود نظیر کاربردهای درمانی، مستلزم مطالعات بیشتر بر روی بافت‌های مورد نظر اعم از طبیعی و غیر طبیعی است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی شورای پژوهشی دانشگاه تهران انجام گردیده است.

اتصال آنزیم به غشای میتوکنندری مغز موش صحرایی، Km آن (برای ATP) کاهش می‌یابد [۱۴، ۱۲، ۴۵] و گرچه Ki آن اندازه‌گیری نشده، اعتقاد عمومی [۴۳، ۲۰] بر این است که با توجه به مقایسه میزان مهار شونده گی [۴۶، ۲۵]، اندازه آن در اثر اتصال، افزایش می‌یابد [۴۷، ۳۵].

در این تحقیق، محدودیت ناشی از تهیه تعداد کافی نمونه‌های نرمال و تومورال، کسب نتایج اقناع‌کننده را با دشواری مواجه می‌کرد. با وجود این می‌توان گفت پیامدهای اتصال HK به میتوکنندری مغز موش صحرایی، یعنی کاهش Km (app) برای ATP و افزایش Ki (app) برای Glc 6-P، در مورد HK میتوکنندریایی مغز انسان نیز صدق می‌کند. قابل ذکر است که در شرایط آزمایشی به کار رفته، Ki (برای 1,5-Anhydroglucitol-6-P) آنزیم میتوکنندریایی بافت طبیعی مغز انسان به میزان قابل ملاحظه‌ای نسبت به مغز موش صحرایی بیشتر است (جدول ۵).

همان‌طور که قبلاً گفته شد، برای ارزیابی تفاوت‌های احتمالی در قابلیت اتصال میتوکنندری بافت طبیعی و تومورال مغز انسان، از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده گردید. آنتی‌بادی‌های مذکور که بر علیه هگزوکیناز نوع I مغز موش صحرایی تهیه شده‌اند، اپی‌توب‌های مختلفی را در سطح مولکول آنزیم شناسایی می‌کنند که تاکنون به کمک آنها اطلاعات مفیدی در باره چگونگی اتصال آنزیم به میتوکنندری به دست آمده است [۲۲]. (تصویر ۴) نشان می‌دهد که آنزیم بافت طبیعی مغز انسان در حضور آنتی‌بادی، رفتاری شبیه آنزیم مغز موش صحرایی دارد. به طور کلی می‌توان گفت که آنتی‌بادی‌های مورد استفاده می‌توانند به نسبت، مانع اتصال آنزیم به میتوکنندری

منابع

- [1] Linden, M., Gellerfroes, P., Nelson, B.D., Pore protein and hexokinase-binding protein from the outer membrane of rat liver mitochondria are identical, *FEBS Lett.*, 141 (1982) 189-192.
- [2] Fiek, C., Benz, E., Roos, N. and Brdiczka, D. Evidence for identity between the hexokinase-binding protein and the mitochondrial porin in the outer membrane of rat liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, 688 (1982) 429-440.
- [3] Wilson, J.E. Homologous and heterologous interactions between hexokinase and mitochondrial porin: evolutionary implication's, *J. Bioenerg. And Biomembr.*, 29 (1997) 97-102.
- [4] Wicker, U., Bucheler, K., Gellerich, F.N., Wagner, M., Kapischke, M., Brdiczka, D. Effect of macromolecules on the structure of the mitochondrial inter-membrane space and the regulation of hexokinase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1142 (1993) 228-239.
- [5] Nakashima, R.A., Mangan, P.S., Colombini, M., Pedersen, P.L. Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC, *Biochemistry*, 25 (1986) 1015-1021.
- [6] Polakis, P.G., Wilson, J.E. An intact hydrophobic N-terminal sequence is critical for binding of rat hexokinase to mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.*, 236 (1985) 328-337.
- [7] Denis-Pouxviel, C., Riesinger, I., Buehler, C., Brdiczka, D., Murat, J.C. Regulation of mitochondrial hexokinase in cultured HT29 human cancer cells. An ultrastructure and biochemical study, *Biochim. Biophys. Acta*, 902 (1987) 335-348.
- [8] Gelb, B., Adams, V., Jones, S., Griffin, L., McGregor, G., McCabe, E. Targeting of hexokinase I to liver and hepatoma mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (1992) 202-206.
- [9] Beltrandelrio, H., Wilson, J.E. Coordinated regulation of cerebral glycolytic and oxidative metabolism mediated by mitochondrially bound hexokinase dependent on intramitochondrially generated ATP, *Arch. Biochem. Biophys.*, 296 (1992) 667-677.
- [10] Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., Ewelte, W., Brdiczka, D. Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore, *FEBS Lett.*, 396 (1996) 189-195.
- [11] Dorbani, L., Jancsik, V., Linden, M., Leterrier, J.F., Nelson, B.D., Rendon, A. Subfractionation of the outer membrane of rat brain mitochondria: evidence for the existence of a domain containing the porin-hexokinase complex, *Arch. Biochem. Biophys.*, 252 (1987) 188-196.
- [12] Bustamante, E., Pedersen, P.L. Mitochondrial hexokinase of rat hepatoma cells in culture: solubilization and kinetic properties, *Biochemistry*, 19 (1980) 4972-4977.
- [13] Kabir, F., Wilson, J.E. Mitochondrial hexokinase in brain of various species: differences in sensitivity to solubilization by glucose 6-phosphate, *Arch. Biochem. Biophys.*, 300 (1993) 641-650.
- [14] Felgner, P.L., Wilson, J.E. Effect of neutral salts on the interaction of rat brain hexokinase with the outer mitochondrial membrane, *Arch. Biochem. Biophys.*, 182 (1977) 282-294.
- [15] Bustamante, E., Soper, J.W., Pedersen, P.L. A high-yield preparation method for isolation of rat liver mitochondria, *Analytical Biochemistry*, 80 (1977) 401-408.
- [16] Mejbaum-katzenellenbogen, W., Dobryszczyka, W.M. New method for quantitative determination of serum proteins separated by paper electrophoresis, *Clinica Chimica. Acta.*, 4 (1959) 515-522.
- [17] Wilson, J.E. Rapid purification of mitochondrial hexokinase from rat brain by a

Archive of SID

- single affinity chromatography step on Affi-Gel Blue, *Perp. Biochem.*, 19 (1989) 13-21.
- [18] Chou, A.C., Wilson, J.E. Purification and properties of rat brain hexokinase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 151 (1972) 48-55.
- [19] Jaemli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature (London)*, 227 (1970) 680-686.
- [20] Wilson, J.E., Chung, V. Rat brain hexokinase: further studies on the specificity of the hexose and hexose 6-phosphate binding sites, *Arch. Biochem. Biophys.*, 269 (1999) 517-525.
- [21] Perrella, F.W. A practical curve-fitting microcomputer program for the analysis of enzyme kinetics data on IBM-PC computers, *Anal. Biochem.*, 174 (1988) 437-447.
- [22] Smith, A.D., Wilson, J.E. Disposition of mitochondrially bound hexokinase at the membrane surface, deduced from reactivity with monoclonal antibodies recognizing epitopes of defined location, *Arch. Biochem. Biophys.*, 287 (1991) 357-366.
- [23] Vogel, F.S., Bouldin, T.W. The nervous system, In: E. Rubin and J.L. Farber (Eds.), *Pathology*, J.R. Lippincott Company, Philadelphia (1994) 1373-1455.
- [24] Pary, D.M., Pedersen, P.L. Intracellular localization and properties of particulate hexokinase in Novikoff ascites tumor, *The J. Biol. Chem.*, 258 (1983) 10904-10912.
- [25] Nakashima, R.A., Paggi, M.G., Scott, L.J., Pedersen, P.L. Purification and characterization of a bindable form of mitochondrial bound hexokinase from the highly glycolytic AS-30D hepatoma cell line, *Cancer Res.*, 48 (1988) 913-919.
- [26] Wilson, J.E. Hexokinases, *Reviews of Physiology, Biochem. and Pharmacol.*, 126 (1995) 65-198.
- [27] Xie, G., Wilson, J.E. Rat brain hexokinase: the hydrophobic N-terminus of the mitochondrially bound enzyme is inserted in the lipid bilayer, *Arch. Biochem. Biophys.*, 267 (1988) 803-810.
- [28] Mathupala, S.P., Rempel, A., Pedersen, P.L. Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: a remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role of type II hexokinase, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 29 (1997) 339-343.
- [29] Floridi, A., Paggi, M.G., Fanciulli, M. Modulation of glycolysis in neuroepithelial tumors, *J. Neurosurg. Sci.*, 33 (1989) 55-64.
- [30] Oudard, S., Miccoli, L., Guthauser, B., Vassault, A., Magdelenta, H. et al. Glycolytic profile in normal brain tissue and gliomas determined by a micro-method analysis, *Oncology Reports*, 3 (1996) 165-170.
- [31] Oudard, S., Arvelo, F., Miccoli, L., Apiou, F., Dutrillaux, A.M. et al. High glycolysis in gliomas despite low hexokinase transcription and activity correlated to chromosome 10 loss, *Br. J. Cancer*, 74 (1996) 839-845.
- [32] Bustamante, E., Morris, H.P., Pedersen, P.L. Energy metabolism of cells, requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding, *J. Biol. Chem.*, 256 (1981) 8699-8704.
- [33] McCabe, E. Microcompartmentation of energy metabolism at the outer mitochondrial membrane: role in diabetes mellitus and other diseases, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 26 (1995) 307-315.
- [34] Arora, K.K., Pedersen, P.L. Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism: evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP, *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 17422-17428.
- [35] Wilson, J.E. Regulation of mammalian hexokinase activity, In: R. Beitner (Eds.), *Regulation of Carbohydrate Metabolism*, 1, CRC Press, Boca Raton, FL (1984) 45-85.
- [36] Beltrandelrio, H., Wilson, J.E. Hexokinase of rat brain mitochondria: relative importance of adenylate kinase and oxidation phosphorylation as source of substrate ATP and interaction with intramitochondrial compartments of ATP and ADP, *Arch. Biochem. Biophys.*, 286 (1991) 183-194.
- [37] Oudard, S., Poirson, F., Miccoli, L., Bourgeois, Y., Vassault, A. et al.

Archive of SID

- Mitochondria-bound hexokinase as target for therapy of malignant gliomas, *Int. J. Cancer*, 62 (1995) 216-222.
- [38] Board, M., Humm, S., Newsholme, E.A. Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells, *J. Biochem.*, 265 (1990) 503-509.
- [39] Oudard, S., Boitier, E., Miccoli, L., Rousset, S., Dutrillaux, B. et al. Gliomas are driven by glycolysis: putative roles of hexokinase, oxidative phosphorylation and mitochondrial ultrastructure, *Anticancer Res.*, 17 (1997) 1903-1912.
- [40] Board, M., Colquhoun, A., Newsholme, E.A. High K_m glucose-phosphorylating (glucokinase) activities in a range of tumor cell lines and inhibition of rates of tumor growth by the specific enzyme inhibitor mannoheptulose, *Cancer Res.*, 55 (1995) 3278-3285.
- [41] Adams, R.D., Hochberg, F.H. Neoplastic disease of the brain, In: R. Petersdorf, R.D., Adams, F., Braunwald, K.J., Lsselbacher, J.B., Martin and J.D. Wilson (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill International Book Company, Singapore, (1983) 2072-2084.
- [42] Moller, F., Wilson, J.E. The influence of specific phospholipids on the interaction of hexokinase with the outer mitochondrial membrane, *J. Neurochem.*, 41 (1983) 1109-1118.
- [43] Bustamante, E., Pedersen, P.L. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (1977) 3735-3739.
- [44] Tsai, H.J., Wilson, J.E. Functional organization of mammalian hexokinases: characterization of chimeric hexokinases constructed from the N- and C-terminal domains of the rat type-I and type-II isozymes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 316 (1995) 206-214.
- [45] Wilson, J.E. Brain hexokinases: A proposed relation between soluble-particulate distribution and activity in vivo, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 3640-3647.
- [46] Tuttle, J.P., Wilson, J.E. Rat brain hexokinase: A kinetic comparison of soluble and particulate forms, *Biochem. Biophys. Acta*, 212 (1970) 185-188.
- [47] Rose, I.A., Warms, J.V.B. Mitochondrial hexokinase: release, rebinding, and location, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 1635-1645.
- [48] Wilson, J.E., Smith, A.D. Monoclonal antibodies against rat brain hexokinase, *J. Biol. Chem.*, 260 (1985) 12838-12843.