تنظیم آیزوزیم نوع M2 پیروات کیناز از منتژیومای انسان

ع.ا.ملتی[1]، م.یوجل[2]، ن.آلتینیورس[2]، او.گیندیز[2]

خلاصه

در این مطالعه ، مکانیسم عمل پیروات کیناز نوع M2 از منتژیومای انسان در حضور فروکتوز ۱و۶ دی‌فسفات و ال-آلانین مورد بررسی قرار گرفته است .فعالیت پیروات کیناز تخلیص شده از منتژیومای انسان در کاتالیز سوبستراهای PEP و ADP بصورت آلوستریکی توسط فروکتوز ۱،۶دی‌فسفات و ال-آلانین مهار می‌گردد . اثرات مهاری ال - آلانین بطور نسبی توسط فروکتوز ۱،۶ دی‌فسفات برداشته می‌شود . آنزیم تخلیص شده توسط ATP بطور جزئی مهار می‌گردد.

(مجله دانشگاه علوم پزشکی زنجان-سال اول-شماره ۲ -صفحات ۴۲-۳۵)

مقدمه

پیروات کیناز یکی از آنزیم‌های قابل تنظیم کلیدی است که در راه گلیکولیز عمل می‌کند .این آنزیم در حضور فسفوانول پیروات (PEP) و Mg^{2+} فسفوریلاسیون ADPو تبدیل آن به ATP را کاتالیز می‌نماید . در بافتهای مختلف پستانداران چهار نوع آیزوزیم پیروات کیناز شناسایی شده است (۱۶،۷،۵) که خصوصیات ویژه و توزیع این آیزوزیم بستگی به نوع بافت دارد.نوع L آیزوزیم در هپاتوسیت‌ها و قشرکلیه و نوع R پیروات کیناز در اریتروسیت‌ها (۷) یافت می‌شوند . ماهیچه مخطط بازو دارای آیزوزیم M1 و عاری از آیزوزیم‌های نوع دیگر بوده ، در صورتی که نسوج مغز و ماهیچه قلب دارای مقدار زیاد و قابل ملاحظه‌ای از آیزوزیم M1 و مقدار جزئی از انواع آیزوزیمهای دیگر می‌باشند (۱۸،۸،۲) . آیزوزیم نوع M2 به مقدارهای متفاوت ، در بافتهای مختلف افراد بالغ و بطور گسترده‌ای در جنین و انواع تومورها (۱۷،۸،۷) موجود می‌باشد . با وجودی که از لحاظ ایمونولوژی نوع M1 و M2 پیروات کیناز خصوصیات نزدیک به هم داشته و واکنش آنتی‌ژنی مشترک از خود نشان می‌دهند (۲۳،۱۲،۴) ، اما دارای خواص کینتیکی متفاوت می‌باشند . ال -آلانین هیچ تأثیری بر روی آیزوزیم M1 نداشته (۱۱،۸،۲) ، در صورتی که آیزوزیم نوع M2 به وسیله فروکتوز ۱ و ۶ دی‌فسفات فعال شده (۱۵) و به وسیله ال-آلانین به شدت مهار می‌شود (۵،۲) .

در تومورهای منتژیوما و گلیوما یک دگرگونی از نوع M1 پیروات کیناز که مخصوص افراد بالغ می‌باشد به نوع M2

۱- هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

۲- دانشگاه خاور میانه -آنکارا

پیروات کیناز (مخصوص جنین) گزارش شده است (۱۳،۲۱،۲۳) . با تعیین درصد مهار پیروات کیناز (نوع M2) به وسیله ال-آلانین درجه بدخیمی تومورهای مغزی تخمین زده شده است (۲۱،۲۲،۲۳) . با مقایسه دسته‌بندی هیستولوژیکی در گلیوما و مهار آنزیم به وسیله ال-آلانین(۱۳) ، انطباق درجه بدخیمی و تغییرات M1 به M2 مورد تأیید قرار گرفته است .
در این مطالعه و پژوهش تحقیقی ، اثر همزمان فروکتوز ۱ و ۶ دی‌فسفات وال-آلانین را بر روی پیروات‌کیناز تخلیص شده از منینژیومای انسان مورد آزمایش قرار داده ، همچنین مکانیزم عمل ال-آلانین روی آنزیم تخلیص شده در غلظت‌های ثابت و متغیر PEP و ADP به عنوان دو سوبسترا بررسی شده است .

مواد و روشها

نوع M2 پیروات کیناز ، از منینژیومای انسان با اکتیویته مخصوص ۱۱۲/۵ U/mg تخلیص شده (۱۲) و این نمونه تخلیص شده برای تمام آنالیزهای کینتیکی به کار برده شد.
فسفوانول پیروات (نمک منوپتاسیم آن) ، ال-آلانین ، MOPS (۳-(ال-مورفولینو) پروپان سولفونیک اسید) از کمپانی شیمیائی سیگما خریداری شد . آدنوزین ۵- دی‌فسفات (نمک دی‌سدیم آن) ،NADH (نمک دی‌سدیم آن) لاکتات دهیدروژناز (به دست آمده از ماهیچه مخطط خرگوش) ، فروکتوز ۱ و ۶ دی‌فسفات (نمک تری سدیم آن) از شرکت مانهیم آلمان خریداری شد . مواد شیمیایی عمومی از کمپانی آمریکایی سیگما خریداری شد . تمام مواد شیمیائی ، دارای درجه استاندارد عوامل شیمیائی بودند .
نمونه‌های تومورمغزی (منینژیوما)، باهمت و همکاری دکتر آلتینیورس از بیمارستان دیشکاپی (SSK) در آنکارا تهیه شد .

سنجش آنزیم

فعالیت پیروات کیناز با استفاده از تغییرات جذب نوری NADH در ۳۴۰ نانومتر در یک واکنش وابسته به لاکتات‌دهیدروژناز ، (۳) به وسیله اسپکتروفتومتر (Spectronic 21 Bauch and and Lomb) که به یک دستگاه ثبت‌کننده مجهز شده بود اندازه‌گیری می‌شد. ترکیب مورد آزمایش درون کووت برای سه دقیقه در ۳۲°C انکوباسیون اولیه انجام می‌گرفت و واکنش با اضافه کردن ده میکرولیتر آنزیم شروع می‌شد . درجه حرارت (۳۲°C) درون سیستم به وسیله ترموستات با گردش آب کنترل می‌شد .
محلول داخل کووت (۰/۶ml) از ترکیبات شیمیائی زیر تشکیل شده بود : ۲۵ mM از تامپون تریس HCL (PH=۷/۲) ، ۱/۵ واحد لاکتات دهیدروژناز ، ۱۰ mM بتا -مرکاپتواتانول ، ۰/۶mM فروکتوز ۱ و ۶ دی‌فسفات ، غلظت‌های مختلف PEP(۰/۰۵-۵mM)، ۰/۵ mM ال-آلانین ، [NADH]=۰/۱۲۱mM ، [Mgcl۲]=۵ mM ، [ADP]=۲mM و تامپون [MOPS_KOH]=۵mM .

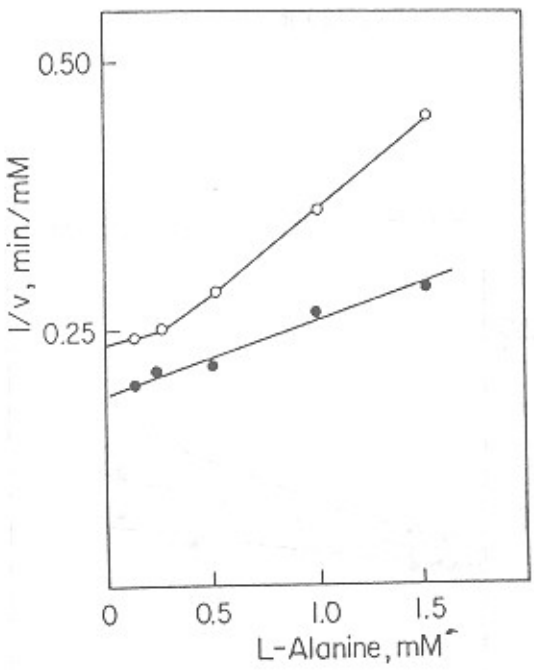
واحد فعالیت آنزیم: مقداری از آنزیم که در مدت یک دقیقه و درجه حرارت°C ۳۲ یک میکرومول از سوبسترا (PEP) را تبدیل به محصول می‌نماید به‌عنوان یک واحد فعالیت آنزیم تعریف می‌شود و همچنین فعالیت مخصوص به صورت Units/mg of protein بیان می‌شود.

نتایج

تأثیر ال-آلانین بر روی هیدرولیز فسفوانول پیروات و ADP:
آنزیم تخلیص شده در غلظت‌های مختلف PEP ، به عنوان سوبسترا و در حضور ۰/۵ و ۱ mM آلانین و ۰/۶ mM فروکتوز ۱ و ۶ دی‌فسفات مورد سنجش قرار گرفت . منحنی میکائیلیس و منتن در شکل ۱ نشان داده شده است . رفتار کینتیکی آنزیم در نبود آلانین و حضور ۰/۵mM آن هایپربول بوده ، که وجود ۱mM آلانین باعث مقدار کمی سیگموئید شدن منحنی شده است . طرح دیکسون برای غلظت‌های ال-آلانین (از صفر تا ۱/۵ mM) در دو غلظت متفاوت PEPدر شکل-۲ نشان داده شده است که با اضافه کردن غلظت آلانین در ۲ میلی‌مولار یک خط مستقیم مشاهده شد ، در صورتی که در یک میلی‌مولار PEP یک خط غیر مستقیم با شیب معکوس به سمت بالا به دست آمد . این منحنی دلالت بر این دارد که اثر مهارکنندگی آلانین بستگی به غلظت PEP دارد . مقدار ظاهری Ki در حضور ۰/۶ mM فروکتوز ۱ و ۶ دی‌فسفات تقریباً ۲/۵ میلی‌مولار محاسبه شد .
طرح دیکسون [غلظتهای ال-آلانین (صفر تا ۱/۵ میلی‌مولار) در مقابل عکس سرعت واکنش] برای سه غلظت متفاوت ADP(۰/۵،۱،۲ mM) در غلظت ثابت PEP (۲mM) در شکل ۳ نشان داده شده است . یک سری از خطهای مستقیم که تقاطع

آنها روی محور طولها می‌باشد دیده می‌شود ، که دلالت بر وابستگی آن به غلظت ADP می‌کند . یعنی چنانچه غلظت ADP کاهش یابد ، اثر مهارکننده بیشتر مؤثر واقع می‌شود . مقدار Ki برای مهار آنزیم توسط آلانین با توجه به تغییرات غلظت ADP برابر ۴/۶ mM(درحضور ۰/۶ mM فروکتوز ۱ و ۶ دی‌فسفات) محاسبه شد .

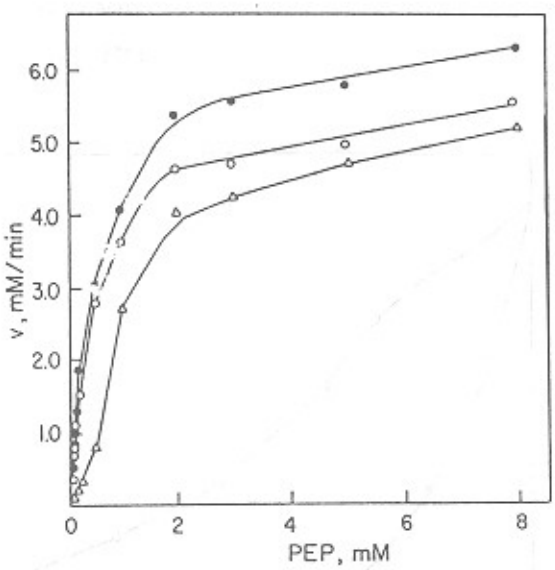
شکل ۱ : فعالیت پیروات‌کیناز تخلیص شده از منینژیومای انسان ، تابعی از غلظتهای مختلف فسفوانول پیروات در نبود (●) و حضور ۰/۵ mM (○) و ۱ mM(△) آلانین .
[F-1/6-DP]=۰/۶mM,[ADP]=۲mM



شکل -۲ :طرح دیکسون برای مهار پیروات کیناز توسط ال-آلانین در ۱ mM (○) و ۲ mM (●) فسفوانول‌پیروات .
[F-1,6-DP]=0.6 mM/ [ADP]=2 mM

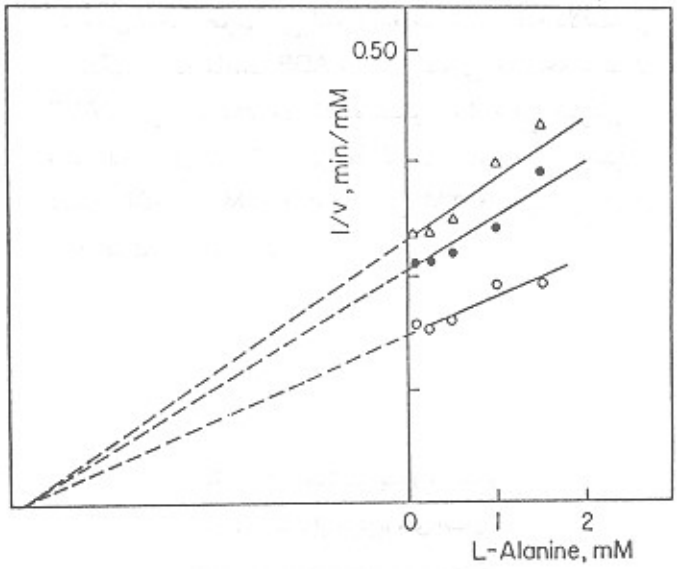
مهار آنزیم توسط ال-آلانین و تأثیر مثبت ۱و۶ دی‌فسفات بر آن :

فعالیت آنزیم در غلظتهای مختلف ال-آلانین (صفر تا ۵ mM) با ۲ میلی‌مولار PEP به عنوان سوبسترا مورد آزمایش قرار گرفت . در غلظت ۱ mM آلانین (بدون فروکتوز ۱و۶ دی‌فسفات) مهار آنزیم ۵۴٪ بوده و در ۵mM آلانین به ۸۴٪ افزایش پیدا می‌کند

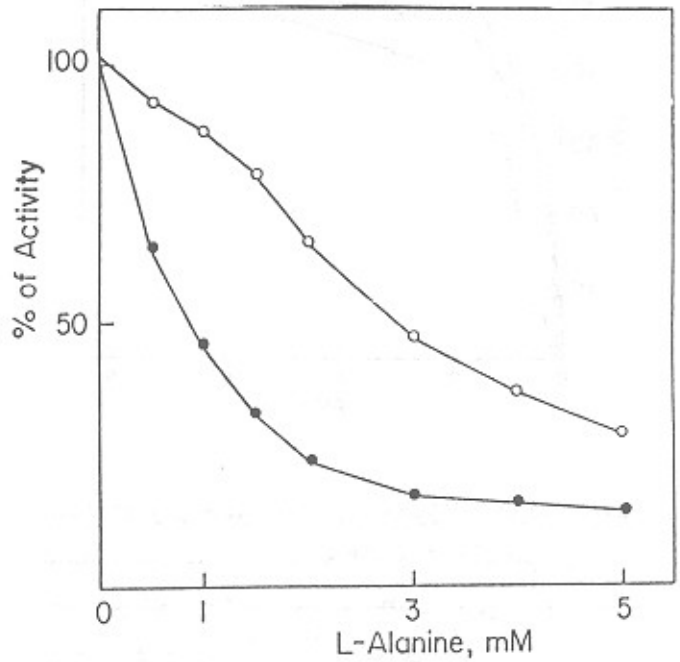


(شکل ۴) . و در حضور ۰/۶ mM فروکتوز ۱و۶ دی‌فسفات مهار توسط مقدارآلانین ذکر شده به ۱۴٪ و ۷۲٪ کاهش می‌یابد . یعنی فروکتوز ۱و۶ دی‌فسفات بطور جزئی از مهار آنزیم توموری توسط ال-آلانین جلوگیری می‌کند .

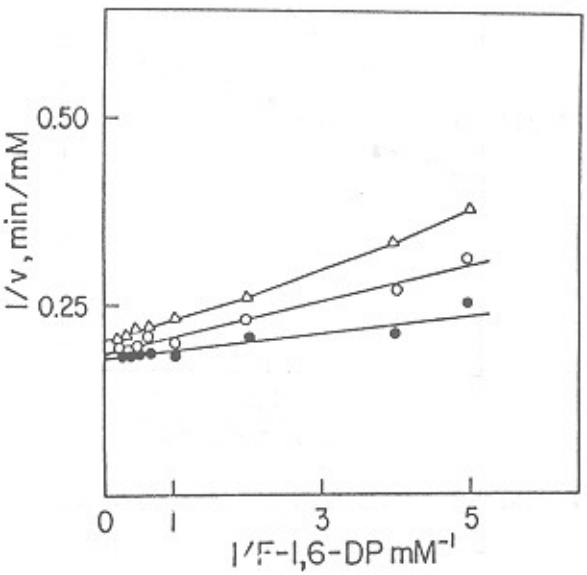
رفتار کینتیکی پیروات کیناز تخلیص‌شده از منینژیوما در غلظتهای مختلف فروکتوز ۱و ۶ دی‌فسفات نسبت به دو غلظت متفاوت آلانین (۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) و غلظت ثابت PEP (۲ میلی‌مولار) به عنوان سوبسترا مورد مطالعه قرار گرفت . در شکل-۵ طرح محورهای معکوس (عکس غلظت سوبسترا در مقابل عکس سرعت واکنش) نشان داده‌شده است . فروکتوز ۱ و ۶ دی‌فسفات ، آنزیم را بطور هایپربول فعال کرده و مقدار Ka آن برابر با ۰/۱۵ mM تعیین شد . (مقدار Ka با استفاده از طرح لینویور -برک و تغییرات طرح ذکر شده ارزشیابی شد). افزایش غلظت آلانین به ۱ mM مؤثرتر بوده و همانگونه که در شکل دیده می‌شود خط غیر مستقیم با شیب معکوس به سمت بالا استنتاج شد. تقاطع خطوط بر روی محور عرض‌ها(۱/V) سه نقطه مختلف می‌باشد . طبق شیب ، سه منحنی متفاوت و نقاط



شکل -۳ : طرح دیکسون برای مهار آنزیم پیروات کیناز توسط ال-آلانین در غلظتهای مختلف ADP :
(△) ۰/۵ mM،
(●) ۱ mM
(○) ۲ mM.

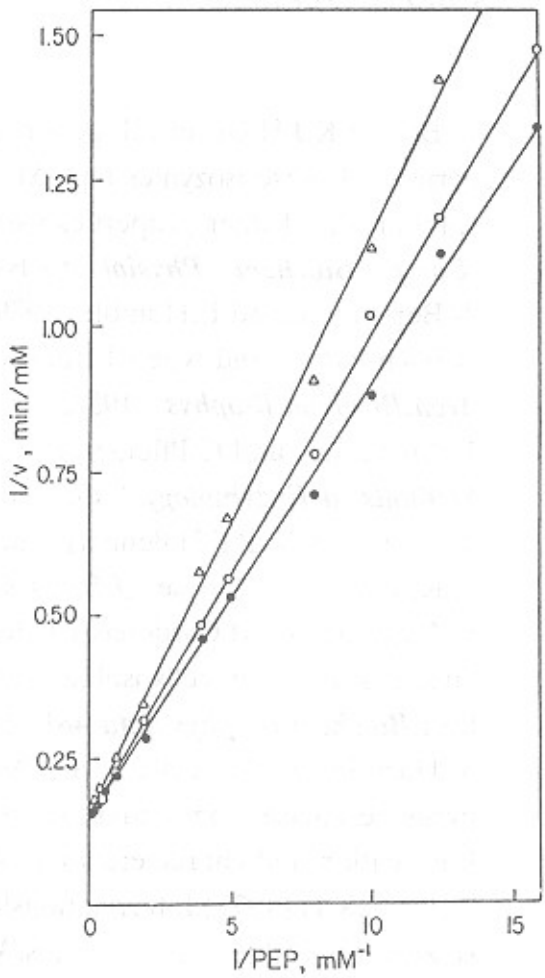


شکل -۴ : تاثیر غلظتهای مختلف آلانین بر روی فعالیت پیروات کیناز تخلیص شده از منینژیوما در عدم حضور (●) و حضور (○) ۰/۶ mM فروکتوز ۱،۶ دی‌فسفات، [PEP]=2 mM, [ADP]=2 mM



شکل -۵ : عکس سرعت واکنش در مقابل عکس غلظت ۱،۶ دی‌فسفات، در عدم حضور (●) حضور ۰/۵ (○) ۱ میلی‌مولار (△) غلظت ال-آلانین . [PEP]=2 mM, [ADP]=2 mM

تقاطع متفاوت آنها بر روی محور عرضها، نتیجه‌گیری می‌شود، که آلانین به عنوان یک فاکتور آلوستری منفی بر روی آنزیم تخلیص شده عمل‌کرده و پاره‌ای از این اثر مهارکنندگی به وسیله افزایش غلظت فروکتوز ۱و۶ دی‌فسفات خنثی می‌شود.



شکل -۶ :طرح محورهای معکوس برای آنزیم مهار شده به وسیله ATP
در عدم حضور (●)،حضور ۱ میلی‌مولار (○)،
۳ میلی‌مولار(△) ATP
[ADP]=2 mM F-1/6-DP]=0.6 mM -

به طور جزئی آنزیم تخلیص شده توسط مهار ATP، حساس بوده و منحنی لینویور-برک (شکل ۶) یک سری خط مستقیم که بر روی محور عکس سرعت تقاطع دارند را نشان می‌دهد. در حضور ۳ میلی‌مولار ATP مقدارKmبرای PEP به مقدار۱/۲ برابر افزایش و از ۰/۵۴ به ۰/۶۷ mM تغییر یافته است.

بحث

طبق گزارشات و تحقیقات مختلف ال -آلانین یک مهارکننده مؤثر، برای نوعM2 پیروات کیناز از منابع مختلف و همچنین منینژیومای انسان(۱۰،۱۳،۱۵،۱۷،۲۱،۲۲) می‌باشد. از نقطه‌نظر بالینی تعیین درصد مهار آنزیم توسط آلانین، می‌تواند یک کمک آزمایشگاهی برای تشخیص تومور باشد (۱،۲۱،۲۲). در این تحقیقات ارائه شده، مکانیزم عمل ال-آلانین بر فعالیت نوع M2 پیروات در غلظت‌های مختلف PEP و ADP مورد رسیدگی و مطالعه قرارگرفته است.

نتایج دلالت بر این دارند که ال -آلانین به عنوان یک مهارکننده آلوستری بر آنزیم توموری عمل کرده و مهار آلوستری آن در غلظت زیاد آلانین و غلظت‌های کم PEP محرزتر و آشکارتر است (شکل ۲). همچنین شکل ۳ اشاره به این دارد که ال-آلانین در غلظت ثابت PEP (۲mM) و غلظتهای مختلف ADP بطور غیر رقابتی آنزیم را مهار می‌کند. حضور همزمان فروکتوز ۱ و۶ دی‌فسفات و آلانین باعث کاهش تمایل ظاهری آلانین به‌طرف آنزیم می‌شود. شکل-۵ نشان می‌دهد که ۰/۵mM آلانین مقدار Ka را برای فروکتوز ۱و ۶ دی‌فسفات از ۰/۱۵ به ۰/۳۶ mM افزایش می‌دهد. بطور کلی، نتایج دلالت بر این دارند که فروکتوز ۱و۶ دی‌فسفات و آلانین دو فاکتور آلوستری مثبت و منفی برای آنزیم منینژیومای انسان می‌باشند. و بطور جزئی اثر آلوستری منفی آلانین به وسیله فروکتوز ۱و۶دی‌فسفات برداشته می‌شود. این نتایج با اطلاعات به دست آمده توسط دیگر محققین از آنزیمهای سلولهای توموری آسیت‌های ارلیخ (۱۶) و آنزیم مربوط به قشر کلیه راست (۸) که فروکتوز ۱و ۶ دی‌فسفات تماماً" اثر مهارکنندگی آلانین را برطرف می‌کند، تا اندازه‌ای تفاوت دارد. فسفریلاسیون پیروات‌کیناز از تومورمغزی، کاملا" به وسیله فروکتوز ۱و۶ دی‌فسفات مهار می‌شود(۲۴).

از مجموع نتایج این پژوهش و تحقیقات و استفاده از گزارشات محققین دیگر می‌توانیم این امکان را به خود بدهیم و بگوئیم که پیروات کیناز از تومور مغز انسان یک آنزیم ناظم می‌باشد که به وسیله فاکتورهای آلوستری کنترل میشود و این از خصایص

آیزوزیم نوع M2 می‌باشد . فاکتورهای ال -آلانین و فروکتوز ۱و۶ دی‌فسفات به وسیله مکانیزم تعادل دیمر-تترامر فعالیت پیروات کیناز آسیت‌ها را تنظیم میکند (۱۶،۶). در مطالعات قبلی ما(۱۲)، نشان داده شده است که نوع M2 پیروات کیناز یک آنزیم آلوستری می‌باشد . همچنین در این مطالعه اطلاعات بیشتری راجع به رفتار آلوستری آنزیم تخلیص شده که از خصایص آیزوزیم نوع M2 می‌باشد ارائه شده است .

REFERENCES:

1- Becker.K.J.H.Geyer,F.Eigenbrodt and W.Schoner(1986).Purification of pyruvate Kinase isozymes type M1 and M2 from dog (Canis Familaris) and comparison of thier properties with those from chicken and rat .
Comp . Biochem . Physiol . 83 B (4),823-329.

2- Berglund.L.and E.Humble (1979).Kinetic properties of pig pyruvate kinase type A from kidney and type M from muscle.
Arch.Biochem.Biophys . 195(2),347-361.

3- Bucher .T. and G.Pfleiderer(1955). Pyruvate kinase from muscle .
Methods in Enzymology 1;435-440.

4- Cottam .G.L.P.F.Halenberg.and M.J.Coon (1969).Subunit structure of rabbit muscle pyruvate kinase . ***J.Biol.Chem***.244,1481-1486.

5- Dyson.R.D.J.M.Cardenas,T.C.Richardes .and M.E.Garnett(1977).Pyruvate kinase isozymes in cells isolated from fetal and regenerating rat liver.***Biochem.Biophys.Acta*** 481,115-126.

6- Harrkins .R.N.J.A.Black. and M.B.Rittenberg(1977).M2 type isozyme of pyruvate kinase from human kidney as the product of a separate gene:Its Purification and characterization .***Biochemistry*** 16(17),3821-3837.

7- Ibsen.K.H.(1977).Interrelationship and functions of the pyruvate kinase isozymes and thier variant forms.A Review .***Cancer Res***.37,341-353.

8- Ibsen ,K.H.and P.Trippett(1973).A comparison of kinetic parmeters obtained with three major noninterconvertible isozymes of rat pyruvate kinase.***Arch.Biochem.Biophys.***156,730-744.

9-Imammura .K.and T.Tanak(1972a).Multimolecular forms of pyruvate kinase from rat and and other mammalian tissues.***J.Biochem.***71-1043-1051.

10-Imammura.K,Taniuchi.and T.Tanaka(1971b).Multimolecular forms of pyruvate kinase H.Purification of M2-type pyruvate kinase from Yoshida ascites hepatoma 130 cells and comparative studies on the enzymological and immunological

properties of the three types of pyruvate kinases L,M1 and M2 ***J.Biochem.*** 72,1001-1015.

11- Jimenez De Asua.L.E.Rozengurt.J.J.Davalle and H.Carminatti(1970). Some kinetic differences between the isozymes of pyruvate kinase from liver and muscle . ***Biochem.Biphys.Acta*** 235,326-334.

12- Mellati.A.A.M.Yucel. and U.Gundtiz(1991).Purification and characterization of M2-type pyruvate kinase from human menigioma Ph.D. Thesis, Biology Department .Middle East Technical University .

13- Mostert,H.W.M.J,de Both,E.H.Rhijrsburger ,W.M.Mackay,J.H.Van den Berge and S.Z.Stefanko(1986).Pyruvate kinase inhibition in the diagnosis of gliomas with an intermediate degree of malignancy ***Acta Neuropathol.*** 70,169-301.

14- Saheki.S,Saheki.K. and T.Tanaka (1982),Peptide Structures of pyruvate isozymes. ***Biochem.Biophys Acta*** 704,484-193.

15- Schering , B,E,Eingenbrodt, D.Linder and W.Schoner(1982).Purification and properties of pyruvate kinase type M2 from rat luag.
Biochem.Biophys Acta 717.337-347.

16- Sparmann,G,C,Schulz and E.Hoffmann(1973). Effects of L-alanine and fructose 1.6 diphosphate kinase from Ehrlich ascites tumor cells .
FEBS Lett. 38(3);305-308.

17- Spellman,C.M.and P.F.Fottrell(1973).Similarties between pyruvate kinase from human placenta and tumors ***FEBS Lett.*** 37(2),281-284.

18- Susor,W.A. and W.J.Rutter (1968). some distinctive properties of pyruvate kinase purified from rat liver.
Biochem.BioPhys.Res.Comm. 30, 14-20.

19- Tanaka ,T.Y.Harano,F.Sue.and H.Morimura (1967).
Crystalization,characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinase isolated from rat tissuse ***J.Biochem.*** 62(1),71-90.

20- Terlecki,G.(1989).Purification and properties of pyruvate kinase type Ml from boving brain.***Int.J.Biochem.*** 21(9),1053-1060.

21-van veelen , C.W.M.H.Verbiest.M.C.Y.Annie,G.E.J.Staal(1978).Isozymes of pyruvate kinase from human brain meningiomas and malignant gliomas .
Cancer Res. 38,4681-4687.

22- Van Veelen,C.W.M,G.Rijksen,A.M.C. Vlug and G.E.J.Staal(1981). Correlation between alanine inhibition of pyruvate kinase and composition of K-M hybrids.
Clin.Chem.Acta 110,113-120.

23- Van Veelen ,C.W.M.G.Rijksen and G.E.J.Staal(1988).Discrimination between neuronal and glial cell tumors by pyruvate kinase electrophoresis.
Acta Neurochem. 91,126-129.

24- Weernink , P.A.O,G.Rijksen,M.C.Heijden and G.E.J.Staal(1990).Phosphorylation of pyruvate kinase type K in human gliomas by a cyclic adenosine 5-monophosphate-independent protein kinase.
Cancer Res .50,4604-4610.
25-Weernink,P.A.O.G.Rijksen and G.E.J. Staal(1988). Production of a specific antibody against pyruvate kinase type M2 using a synthetic peptide .
FEBS lett.236(2),391-395.

اخلاق پزشکی

رسول اکرم صلی الله علیه وسلم : عیادت تام بیمار آن است که دست خود را بر سر او بگذاری و بپرسی که چگونه‌ای ، چگونه شب را گذراندی ؟ امروز حالت چطور است ؟