مقاله پژوهشی

بررسی جایگاه اتصال آنزیم هگزوکیناز روی غشای خارجی میتوکندری در سلول‌های سرطانی مغز

حسن رامشینی[1]

[1] استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ٤٦٩٧-١٩٣٩٥، تهران، ایران

نشانی نویسنده مسؤول: سبزوار، دانشگاه پیام نور مرکز سبزوار، گروه زیست شناسی، دکتر حسن رامشینی
E-mail: hramshini@ibb.ut.ac.ir

وصول:۹۱/۱/۲۱، اصلاح:۹۱/۳/۶، پذیرش:۹۱/۴/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: در سرطان‌های مغز، منبع اصلی انرژی از مسیر گلیکولیز تأمین می‌شود. آنزیم شروع‌کننده این مسیر نیز هگزوکیناز نوع یک (HKI) می‌باشد. این آنزیم در دو جایگاه متفاوت به غشای خارجی میتوکندری متصل می‌شود. آنزیم متصل به جایگاه A به‌وسیله محصولش یعنی گلوکز ٦-فسفات (G6P) از جایگاه خود آزاد می‌گردد. آنزیم متصل به جایگاه B به G6P غیرحساس است ولی به‌وسیله غلظت بالایی از نمک کائوتروپ KSCN از جایگاه خود رها می‌گردد. در مطالعه حاضر تغییرات احتمالی این جایگاه‌ها در سلول‌های سرطانی مغز انسان مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی برای رهاسازی آنزیم از جایگاه A از G6P ۲ میلی‌مولار و جایگاه B از مخلوط ٤٥ میلی مولار KSCN و KCl استفاده شد. هم‌چنین برای مسدود کردن جایگاه A از دی سیکلو هگزیل کربودی ایمید (DCCD) استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد DCCD که در میتوکندری مغز طبیعی با اتصال به گلوتامات ۷۲ پورین میتوکندریایی، مانع اتصال هگزوکیناز به آن می‌گردد، در سلول‌های سرطانی گلیوما و آستروسایتوما قادر به اتصال به گلوتامات ۷۲ نیست. براساس یافته‌های این پژوهش احتمالاً به دو دلیل، DCCD قادر نیست جایگاه A را در سلول‌های سرطانی مسدود نماید: ۱- محل گلوتامات ۷۲ پورین غشای خارجی میتوکندری در اثر سرطانی شدن تغییر کرده است و احتمالاً از یک محیط آب گریز به یک محیط آب دوست جابه‌جا شده است. بنابراین، DCCD قادر به مسدودکردن آن در محیط جدید نیست.۲- با توجه به این‌که مطالعات نشان می‌دهد در غشای خارجی میتوکندری سلول‌های سرطانی نسبت به نوع طبیعی آن میزان خیلی زیادی کلسترول رسوب می‌کند؛ لذا سیالیت آن کاهش یافته و DCCD قادر به نفوذ در غشا نمی‌باشد.

نتیجه‌گیری: در مجموع هر دو استدلال بالا نشان می‌دهد که غشای خارجی میتوکندری سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی هم به لحاظ میزان سیالیت آن و هم به لحاظ محل اتصال آنزیم هگزوکیناز دچار تغییر شده است. ***(مجله دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۱۹/شماره ۳/ صص ۲۴۸-۲۳۸).***

واژه‌های کلیدی: *میتوکندری، آستروسایتوما، گلیوما، جایگاه‌های اتصال هگزوکیناز، پورین.*

مقدمه

هگزوکیناز مغز به‌طور برگشت‌پذیر به غشای خارجی میتوکندری متصل می‌شود و این اتصال نقش مهمی در تنظیم مصرف گلوکز دارد. اتصال هگزوکیناز به

غشای میتوکندری تحت تأثیر غلظت محصول آن یعنی گلوکز ٦-فسفات (G6P) است (۱,۲). در غلظت بالای G6P این متابولیت به آنزیم متصل و با تغییر بنای فضایی آن باعث رهاشدن آنزیم از غشا و مهار فعالیت آن می-گردد. مطالعات نشان داد که این آنزیم به یک پروتئین ویژه در سطح غشای خارجی میتوکندری متصل می‌شود که در ابتدا به آن، پروتئین اتصالی هگزوکیناز (Hexokinase binding protein) می‌گفتند (۵-۳). مطالعات بعدی نشان داد که این پروتئین در حقیقت همان پورین میتوکندریای است که به آن همچنین کانال آنیونی وابسته به ولتاژ (VDAC) نیز می‌گویند (٦). این VDAC ها علاوه بر هگزوکیناز به پروتئین‌های دیگری از جمله گلیسرول کیناز و پروتئین‌های پیش آپاپتوزی نیز متصل می‌شوند (۷,۸). بنابراین، محل اتصال هگزوکیناز در حقیقت کانال‌های میتوکندریای است که از طریق آن نوکلئوتیدها از جمله ADP و ATP از طریق آن جابه‌جا شده و دسترسی هگزوکیناز به یکی از سوبستراهایش یعنی ATP را تسهیل می‌کند (۲) .مطالعات نشان می‌دهد که آنزیم هگزوکیناز در دو جایگاه متفاوت A و B به غشای خارجی میتوکندری متصل است. آنزیم متصل به جایگاه A به‌وسیله محصولش یعنی G6P از جایگاه خود آزاد می‌گردد ولی آنزیم متصل به جایگاه B به G6P غیر حساس است ولی به‌وسیله غلظت بالایی از نمک کائوتروپ KSCN از جایگاه خود رها می‌گردد. از دیگر ویژگی‌های میتوکندری این است که غشای داخلی و خارجی آن در سلول‌های طبیعی نسبت به سایر غشاهای سلولی مثل گلژی، شبکه آندوپلاسمی دارای سطح کلسترول پایینی است (۸) ولی محتوای کلسترول میتوکندری سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های طبیعی ۱۰-۲ برابر افزایش می‌یابد (۸,۹). بیشتر این افزایش در غشای خارجی به‌وقوع می‌پیوندد (۱۰,۱۱). گلوتامات ۷۲ VDAC نقش اساسی در اتصال هگزوکیناز به غشا دارد (۱۲,۱۳). جهش در VDAC که مانع اتصال هگزوکیناز به آن می‌شود به طرز جالبی محتوی کلسترول غشا را کاهش می‌دهد؛ و این مسأله نشان می‌دهد که VDAC در انتقال کلسترول از سیتوسل به میتوکندری نقش دارد (١٤). هم‌چنین اتصال هگزوکیناز به VDAC ممکن است به جذب کلسترول به غشا کمک کند. بر اساس مطالعات انجام گرفته یک قطعه ۱۵ اسید آمینه‌ای کاملاً آبگریز از آنزیم هگزوکیناز در اتصال آن به غشای میتوکندری کاملاً ضروری است (۱۵). ماده شیمیایی دی سیکلو هگزیل کربو دی ایمید (DCCD) در دوز خیلی کم مانع اتصال هگزوکیناز به میتوکندری می‌گردد (۱۲,۱۳,١٦). DCCD که یک ماده آبگریز است؛ به گلوتامات ۷۲ VDAC که آن‌هم در محیط آبگریز غشا قرار گرفته است متصل و مانع اتصال هگزوکیناز به آن می‌شود (۱۲,۱۳). بر اساس تحقیقات انجام گرفته در سلول‌های سرطانی نیز مانند سلول‌های طبیعی این دو جایگاه وجود دارد. بنابراین، بررسی اساس مولکولی اتصال هگزوکیناز به میتوکندری طبیعی و سرطانی ممکن است فهم ما را در زمینه عملکرد این آنزیم در روند سرطانی شدن و احتمالاً راه‌های درمان سرطان افزایش دهد. تعداد زیادی از مقالات نشان می‌دهد که سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های طبیعی مصرف گلوکز بالایی دارند (۱۹-۱۷). این افزایش مصرف گلوکز هم برای تولید انرژی و هم تولید پیش‌سازهای آنابولیکی سلول‌های سرطانی مورد نیاز است (۱۹). در میان آنزیم-های گلیکولیز فعالیت آنزیم هگزوکیناز در سلول‌های سرطانی افزایش فوق‌العاده زیادی پیدا کرده است (بیشتر از ۱۰۰ برابر سلول‌های طبیعی) (۲۰). این افزایش فعالیت، هم‌زمان با تغییر محل آنزیم از سیتوسل به حالت اتصال به غشای میتوکندری در جایگاه‌های A و B می‌باشد (۲۱,۲۲). این اتفاق به دلیل آن است که در اثر اتصال به میتوکندری دسترسی آن به ATP تولیدی میتوکندری افزایش می‌یابد (۲۳). ارتباط مستقیمی بین فعالیت هگزوکیناز متصل به تومور، میزان گلیکولیز تومور و

سرعت رشد تومور وجود دارد (۲٤,۲۵). به همین دلیل در مطالعه حاضر به بررسی جایگاه اتصالی هگزوکیناز روی غشای میتوکندری و تغییر احتمالی آن در اثر توموری شدن و هم‌چنین مکانیسم احتمالی این تغییرات پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

همه مواد بیوشیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت سیگما خریداری شد. بافت مغزی طبیعی و سرطانی از بخش‌های جراحی مغز و اعصاب بیمارستان-های امام خمینی، شریعتی و سینا تهیه و بلافاصله در نیتروژن مایع نگهداری شد. میتوکندری بافت‌های طبیعی و سرطانی مغز انسان و هم‌چنین مغز موش و گوساله براساس مقاله قبلی نویسنده تهیه شد. به‌طور خلاصه مغز موش‌های نر صحرایی پس از سر بریدن در هوای مایع قرار داده شد. سپس مغزها توزین شدند و در محلول سوکروز ۰/۲۵ مولار ذوب شدند. پس از شست و شوی مغزها با سوکروز توسط دستگاه هموژنایزر هموژن گردیدند. مخلوط هوموژن شده در دمای ٤ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۰ دقیقه در ٤۰۰۰ دور (RPM) سانتریفوژ شدند. پس از دور ریختن رسوبات، محلول‌رویی به مدت ۲۰ دقیقه در ۲٤۰۰۰ دور (RPM) سانتریفوژ شد. رسوبات حاصل که محتوی میتوکندری خالص است از محلول-رویی جدا و دو بار دیگر با همین شرایط سانتریفوژ شدند. .رسوب مرحله آخر در حجم مورد نیاز در سوکروز ۲۵/. مولار هوموژن گردید (۲٦). تعیین غلظت پروتئین بر اساس روش Katzenellenbogen انجام گرفت. در این روش از تانیک اسید برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌های سطحی میتوکندری استفاده می‌شود و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، ابتدا میزان جذب نوری نمونه‌های استاندارد آلبومین سرم گاوی در طول موج ٦۵۰ نانومتر خوانده شده وپس از رسم منحنی استاندارد جذب میتوکندری‌ها قرائت و غلظت آنها محاسبه می‌گردد (۲۷).

فعالیت آنزیم هگزوکیناز از طریق جفت‌کردن واکنش آن با واکنش آنزیم گلوکز ٦- فسفات دهیدروژناز و تشکیل NADPH در واحد زمان با دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۳٤۰ نانومتر مطابق روش توصیف شده در مقاله قبلی نویسنده به‌دست آمد (۲٦).

محلول‌سازی و رهاسازی هگزوکیناز متصل به میتوکندری، تعیین درصد رهاسازی، اتصال مجدد آنزیم روی غشا و تعیین درصد اتصال مجدد دقیقاً براساس روش‌های ارائه شده توسط کبیر و ویلسون انجام گرفت (۲۸). مطابق این روش ۰/۱ واحد فعالیت آنزیم (U) و ۸- ٤ میلی‌گرم میتوکندری در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر به مدت ۳۰ دقیقه و در حضور ۲ MgCl دو میلی مولار بر روی یخ انکوبه شد. سپس این محلول به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ و محلول‌رویی آن جدا گردید. رسوب حاصل در یک میلی‌لیتر سوکروز ۰/۲۵ مولار حاوی ۵ درصد ترایتون ۱۰۰ X– به‌صورت سوسپانسیون درآمد.

اثر DCCD روی مهار اتصال آنزیم روی غشا نیز مطابق روش کبیر و ویلسون انجام گرفت (۲۸). به‌طور خلاصه سوسپانسیون میتوکندریای با G6P ۲ میلی‌مولار در دمای ۳۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در g ۱۳۰۰۰ و در دمای ٤ درجه سانتریفوژ گردید. محلول‌رویی از رسوب جدا و با سوکروز ۰/۲۵ مولار دوباره محلول گردید. این محلول به چند قسمت تقسیم و به هریک غلظت‌های متفاوتی از DCCD اضافه گردید. بعد از ۱۵ دقیقه در g ۲۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب حاصل دو بار دیگر شست و شو داده شد؛ در نهایت در سوکروز ۰/۲۵ مولار محلول شدند.

یافته‌ها

بنا به پژوهش‌های قبلی مؤلف، اتصال مجدد آنزیم فقط در جایگاه A انجام می‌شود و این جایگاه، محل تنظیم فعالیت آنزیم هگزوکیناز است؛ و جایگاه B یک

جایگاه ذخیره‌ای برای جایگاه A است. این مطالعات روی مغز موش صحرایی و گوساله انجام شد (۲۶). در مطالعه حاضر هدف اولیه اثبات فرضیه بالا در روی مغز انسان بود. به دلیل این که رهاسازی آنزیم از روی جایگاه B توسط KSCN ٤٥ میلی‌مولار که در مطالعه قبلی استفاده گردید کم بود و استفاده از غلظت‌های بالاتر آن نیز باعث تخریب غشا می‌شد؛ لذا راهکارهایی که به‌وسیله آن بتوان آنزیم بیشتری را از جایگاه B بدون تخریب غشا رها کرد را مورد ارزیابی قرار دادیم.میزان رهاسازی آنزیم از جایگاه B توسط KSCN وابسته به دما است. فلگنر و همکارانشان نشان داده بودند که ΔH محلول سازی آنزیم از غشا توسط KSCN منفی است (۲۹). براساس این گزارش رهاسازی آنزیم توسط KSCN ٤٥ میلی‌مولار در دماهای مختلف انجام گرفت. براساس جدول ۱ میزان رهاسازی در دماهای پایین افزایش می‌یابد. بهترین دما برای این عمل ۱۰ درجه سانتی‌گراد است؛ ولی با این وجود میزان رهاسازی از جایگاه B پایین بود و ناچار شدیم با روش دیگری میزان رهاسازی را افزایش دهیم.

اثر نمک‌های ترکیبی روی رهاسازی هگزوکیناز از غشای میتوکندری: یکی از روش‌های دیگری که ممکن است میزان رهاسازی آنزیم را از روی جایگاه B افزایش دهد؛ استفاده از خاصیت هم‌افزایی احتمالی نمک‌های مختلف است. برای این منظور از تعدادی نمک از سری هافمیستر استفاده شد. در سری هافمیستر نمک‌ها به-

جدول۱: رهاسازی هگزوکیناز متصل به جایگاه B میتوکندری مغز گوساله به‌وسیله KSCN ٤٥ میلی‌مولار در دماهای مختلف. هر آزمایش حداقل سه بار تکرار و نتیجه به‌صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شده است

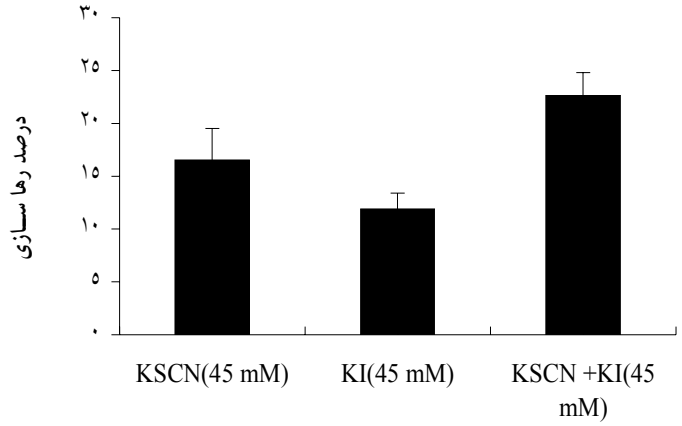
دما(درجه سانتی گراد)	۰	۱۰	۲۰	۳۰	٤۰
درصد رهاسازی	۱۲/۲±۲	۱۶/۵±۱/۷	۸/۶±۰/۸	۷/۸±۱/٤	۷/۳±۲/۱
کنترل	۲/۳±۰/۷	۲/۰۵±۱/۳	۱/۱±۰/۸	۱/۶±۰/۸۵	۲/۷±۱/۹

جدول۲: اثر DCCD بر اتصال مجدد هگزوکیناز روی میتوکندری‌های طبیعی و سرطانی مغز انسان. هر آزمایش حداقل سه بار تکرار و به‌صورت Mean ±SD گزارش شده است

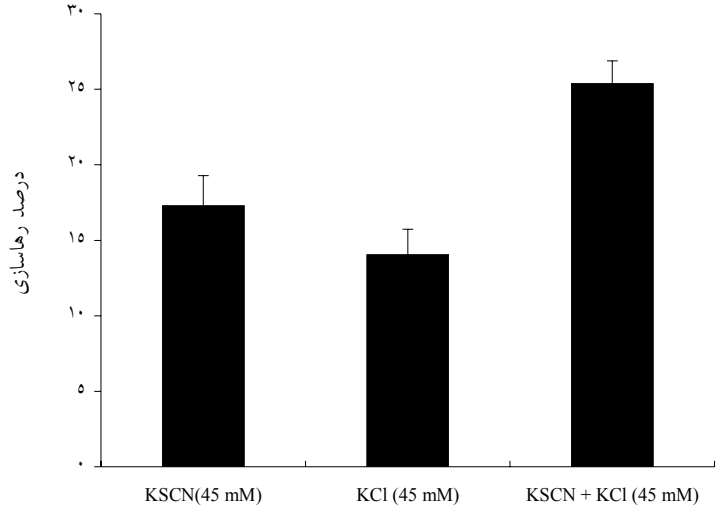
مراحل	۱ درصد رها سازی با G6P	۲ مسدود سازی با DCCD	۳ درصداتصال مجددآنزیم به غشا
مغز طبیعی انسان	۲/۶۸±٤۸/۵	+	۲۰/۳±۱/۲۷
		-	۳۷/۹±۲/۷
گلیوما	۵۳±۱/۷۵	+	۲۶/۶±٤/۵
		-	۳۲/۶±۲/۹
آستروسایتوما	۶۳/۵±۲/۹	+	۳۰/۲±۱/۱
		-	۳۰/۹±۰/۷

جدول ۳ : اثر DCCD بر اتصال مجدد آنزیم هگزوکیناز روی غشای میتوکندری طبیعی و سرطانی مغز انسان که جایگاه A آن با G6P و جایگاه B آن با مخلوط ٤٥ میلی‌مولار KSCN و KCl تخلیه شده است . هر آزمایش حداقل سه بار تکرار و به‌صورتMean ±SD گزارش شده است.

مراحل	۱ درصد رها سازی با G6P	۲ مسدود سازی با DCCD	۳ درصد رها سازی با مخلوط ٤٥ میلی مولار KSCN و KCl	٤ درصد اتصال مجدد آنزیم به غشا
مغز طبیعی انسان	٤۸/۵ ± ۲/۶۸	+	۱۷/۵۶±۱/۲۳	۲۱/۲±۳/۷
		-	۱۶/۱±۲۱/۲	۳۶±۲/۲
گلیوما	۵۳±۱/۷۵	+	۲۷/۳±۱/٤۶	۲۸/۵±۳/۹۸
		-	۲٤/۵±۳/۲	۳۰±۳/۲
آستروسایتوما	۶۳/۵±۲/۹	+	۲۲/۷±۲/۶۳	۲۹/۵±۲/۳۱
		-	۲۱/۵۳±۱/۳۸	۳۱/٤±۱/۳



شکل ۱ : اثر مخلوط ٤٥ میلی‌مولار نمک‌های KSCN و KI بر رهاسازی هگزوکیناز از جایگاه دوم مغز گوساله

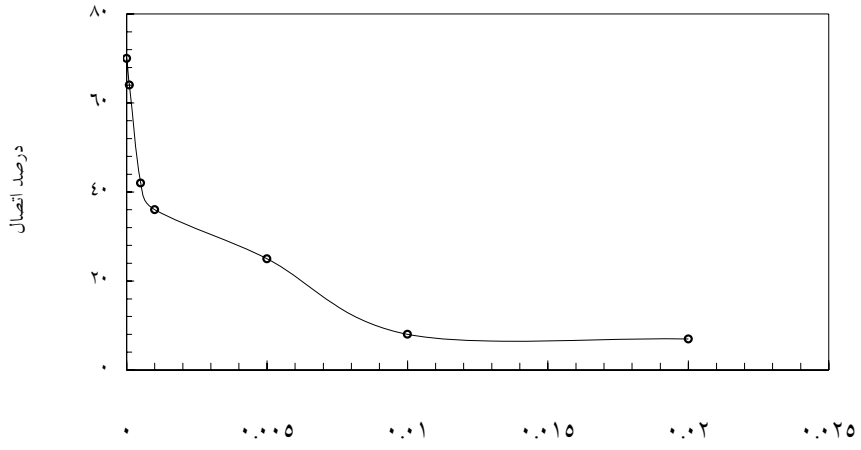


شکل ۲ :اثر مخلوط ٤٥ میلی‌مولار نمک‌های KSCN وKCl بر رهاسازی هگزوکیناز از جایگاه دوم مغز گوساله

صورت کائوتروپ، کوسموتروپ و خنثی طبقه‌بندی می‌شوند. در این مطالعه از مخلوط یک نمک کائوتروپ و یک نمک خنثی و یا مخلوط دو نمک کائوتروپ استفاده شد. غلظت نهایی مخلوط دو نمک برابر ٤٥ میلی‌مولار انتخاب گردید؛ تا با اطمینان به غشای میتوکندری آسیب نرساند (٢٦). نتایج ارایه شده در شکل ۱ نشان می‌دهد که مخلوط یک نمک کائوتروپ KSCN و یک نمک خنثی KCl نسبت به مخلوط دو نمک کائوتروپ KSCN و KI هم‌افزایی بهتری را نشان می‌دهد؛ و میزان آنزیم بیشتری را می‌تواند از روی غشا جدا کند (شکل ۲).

اثر DCCD روی مهار اتصال آنزیم هگزوکیناز روی غشای میتوکندری: تعداد زیادی از گزارش‌ها نشان می‌دهد که DCCD می‌تواند به‌صورت کووالانسی به VDAC متصل و باعث مسدود کردن جایگاه اتصال هگزوکیناز گردد (۱۲,۱۳). در این مطالعه برای پیدا کردن غلظت مناسب DCCD برای مسدود کردن جایگاه اتصال هگزوکیناز روی غشای میتوکندری، ابتدا توسط G6P ۲ میلی‌مولار در pH=۲ آنزیم‌های متصل به جایگاه A از روی میتوکندری رها گردید و درصد جدا شدن آنزیم از روی میتوکندری با سنجش فعالیت باقی‌مانده آنزیم متصل به آن بعد از تیمار با G6P در مقایسه با قبل تیمار شدن آن محاسبه شد .

آنزیم‌های رها شده از روی میتوکندری توسط دستگاه سانتریکان تغلیظ و G6P آن جدا شد. سپس



شکل ۳: اثر DCCD بر مسدود سازی جایگاه اتصال آنزیم هگزوکیناز در میتوکندری مغز موش صحرایی

میتوکندری‌هایی که فاقد آنزیم روی جایگاه A خود بودند (میتوکندری‌های تیمار شده با G6P) تحت تأثیر غلظت-های مختلف DCCD قرار گرفتند. در نهایت هگزوکیناز تغلیظ شده و فاقد G6P روی میتوکندری‌های تیمار شده با غلظت‌های متفاوت DCCD مجاور شدند. درصد اتصال مجدد هگزوکیناز روی هر یک از میتوکندری‌ها محاسبه شد. همان‌طور که شکل ۳ نشان می دهد غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار و یا بالاترDCCD توانست به‌خوبی محل اتصل آنزیم هگزوکیناز را مسدود نموده و مانع اتصال آنزیم روی میتوکندری گردند.

برای مطالعه جایگاه B، ابتدا آنزیم جایگاه A میتوکندری مغز طبیعی سه گونه موش صحرایی، گوساله و انسان توسط G6P ۲ میلی‌مولار با pH=۲ رها گردید و در مرحله بعد هر سه نوع میتوکندری (حاصل از مغز موش، گوساله و انسان) با DCCD ۰/۰۱ میلی‌مولار تیمار شدند و بدین وسیله جایگاه A آنها مسدود شد. تمام میتوکندری-های مرحله قبل تحت تأثیر مخلوط KSCN وKCl با غلظت ٤٥ میلی‌مولار قرار گرفتند؛ تا آنزیم‌های جایگاه B آنها رها گردد. در نهایت تمام میتوکندری‌های مرحله قبلی که جایگاه A آنها تخلیه و مسدود شده و جایگاه B آنها نیز تخلیه شده ولی مسدود نیست تحت تأثیر آنزیم هگزوکیناز تغلیظ شده قرار گرفتند؛ تا توانایی اتصال آن به جایگاه B مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج این مطالعه اثبات کرد که جایگاه B قابلیت اتصال مجدد را ندارد.

مطالعه اتصال آنزیم روی میتوکندری بافت سرطانی مغز انسان: مطالعات نشان می‌دهد که مشابه میتوکندری مغز طبیعی، میتوکندری‌ها در مغز سرطانی نیز دارای دو جایگاه A و B هستند، که اولی با G6P و دومی با KSCN رها می‌گردد (رجوع شود به بخش مقدمه). مانند آزمایش قبلی ابتدا میتوکندری‌های سرطانی مغز انسان تحت تأثیر G6P قرار گرفته و جایگاه A آنها تخلیه شدند. این میتوکندری‌ها به دو بخش تقسیم گردیدند: یک بخش تحت تأثیر DCCD قرار گرفته و قاعدتاً باید مشابه میتوکندری مغز نرمال این جایگاه مسدود شده باشد. دسته دیگر تحت تأثیر DCCD قرار نگرفتند. هر دو نوع میتوکندری تحت اثر هگزوکیناز تغلیظ شده قرار گرفتند. اما نتیجه غیر منتظره این بود که در هر دو دسته میتوکندری به یک نسبت آنزیم به جایگاه A متصل شد. این نتیجه نشان می‌دهد که DCCD قابلیت مسدودسازی جایگاه A در میتوکندری بافت سرطانی را بر عکس میتوکندری‌های طبیعی ندارد (جدول ۲). برای تأیید این نظریه در آزمایش دیگر ابتدا میتوکندری‌های مغز سرطانی انسان تحت تأثیر G6P گرفت. این میتوکندری‌ها به دو دسته تقسیم شدند: یک دسته از آنها با DCCD مجاور

نشدند؛ ولی دسته دوم با این ماده مجاور شدند. سپس هر دو نوع میتوکندری تحت تأثیر مخلوط دو نمک KSCN و KCl با غلظت ٤٥ میلی‌مولار قرار گرفتند. بنابراین، دو نوع میتوکندری به‌دست آمد که عبارت بودند از میتوکندری-هایی که آنزیم‌های هر دو جایگاه آن آزاد شده ولی جایگاه A آن به‌وسیله DCCD مسدود نیست. دسته دوم میتوکندری‌های بودند که جایگاه A و B آن تخلیه شده، ولی جایگاه A آن بایستی با DCCD مسدود شده باشد. نتیجه جالب این آزمایش این بود که اولاً مشابه میتوکندری‌های طبیعی جایگاه B میتوکندری‌های سرطانی قابلیت اتصال مجدد را ندارند و از طرف دیگر مشابه آزمایش قبلی DCCD قادر به مسدودسازی جایگاه A در میتوکندری‌های سرطانی نیست (جدول ۳).

بحث

مهم‌ترین ویژگی بیوشیمیایی سرطان‌های با رشد سریع، توانایی آنها در مصرف بالای گلوکز است (۳۰,۳۱). محققین زیادی امروزه در تلاشند که مکانیسم افزایش سرعت گلوکز را در این دسته از سرطان‌ها پیدا کنند. توانایی بالای میتوکندری سلول‌های سرطانی مغز به-علت افزایش کمی جایگاه‌های اتصال آنزیم روی میتوکندری است. امروزه دانشمندان معتقدند که هگزوکیناز نقش بسیار مهمی در تنظیم سرعت گلیکولیز دارد. این مسأله در مغز پستانداران که وابستگی مطلق به گلوکز دارند نمود بیشتری دارد.مطالعات نشان می‌دهد که اتصال آنزیم به کانال VDAC باعث باز شدن آن و در نتیجه ATP به‌طور مداوم در دسترس آنزیم قرار می‌گیرد (۱۵). از طرف دیگر اتصال آنزیم به میتوکندری نقش محوری در تنظیم فعالیت آن دارد.

در مطالعه حاضر تغییرات احتمالی غشای میتوکندری در اثر سرطانی شدن سلول‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. ویلسون و همکاران برای اولین بار وجود دو جایگاه در میتوکندری و اهمیت جایگاه A را در سلول-های طبیعی نشان دادند (۲۸). مطالعات قبلی مؤلف وجود این دو جایگاه را دوباره تأیید نموده و نشان داده شد که جایگاه A به علت این‌که آنزیم‌های متصل به آن قادرند تحت شرایط خاص سلول از روی میتوکندری رها شده و یا دوباره به آن متصل گردند از لحاظ فیزیولوژیک از اهمیت زیادی برخوردار هستند و جایگاه B احتمالاً نقش ذخیره‌ای برای جایگاه A را دارد (۲٦).

از طرف دیگر نشان داده شد که KSCN ٤٥ میلی-مولار بدون آسیب رساندن به غشا می‌تواند آنزیم متصل به جایگاه B میتوکندری را رها نماید؛ ولی میزان رها-سازی آن در این غلظت اندک است. هم‌چنین استفاده از غلظت‌های بالاترآن نیز معمولاً باعث تخریب غشا می-گردد (۲٦).

در مطالعه حاضر رهاسازی آنزیم از جایگاه B در شرایط جدیدی انجام گرفت؛ که ضمن این‌که میزان رهاسازی را به مقدار قابل ملاحظه‌ای افزایش داد در عین حال به غشا نیز آسیبی وارد نکرد. مشخص شد که میزان رهاسازی هم وابسته به دما (جدول۱) و هم وابسته به نوع نمک مورد استفاده است (شکل‌های ۲ و ۱). بنابراین، بهترین شرایط برای رهاسازی آنزیم از جایگاه B استفاده از مخلوط دو نمک KSCN و KCl با غلظت ٤٥ میلی-مولار در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. مطالعات اتصال مجدد آنزیم روی غشای میتوکندری سلول‌های سرطانی نشان داد که همانند سلول‌های طبیعی بعد از برخاستن آنزیم‌های جایگاه B دوباره نمی‌تواند روی این جایگاه متصل گردد؛ ولی این عمل در جایگاه A هم سلول‌های طبیعی و هم سرطانی به سهولت اتفاق می‌افتد (جدول ۲ و ۳). بر اساس مطالعات انجام شده در سلول-های طبیعی، DCCD به راحتی در غشا میتوکندری نفوذ کرده و با ایجاد پیوند کووالان با گلوتامات ۷۲ VDAC که در بخش هیدروفوب داخل غشا در جایگاه A قرار دارد محل اتصال آنزیم را مسدود می‌کند ولی در سلول‌های سرطانی قادر به انجام این عمل نیست (جدول ۳ و ۲).

علت این‌که DCCD قادر نیست در سلول‌های سرطانی جایگاه A را مسدود کند اینگونه قابل توجیه است که CCD یک ماده شیمیایی کاملاً آبگریز است و می‌تواند با گروه‌های کربوکسیلی که در محیط آبگریز قرار داشته باشند یک پیوند کووالانسی کاملاً پایدار ایجاد نماید (۱۲,۱۳). در سلول‌های طبیعی مطالعات نشان می-دهد که کانال VDAC با ساختار بشکه مانند خود در درون غشای خارجی میتوکندری قرار گرفته است. گلوتامات ۷۲ آن در قسمت کناره کانال در داخل غشا و در محیط کاملاً آبگریز قرار دارد. آنزیم هگزوکیناز به-شکلی روی جایگاه A قرار می‌گیرد که یک قطعه ۱۵ اسید آمینه‌ای آن در کنار VDAC نفوذ و اسید آمینه لایزین آن با گلوتامات ۷۲ در محیط آب گریز غشا پیوند یونی تشکیل می‌دهد.

یکی از دلایلی که در سلول‌های سرطانی DCCD نمی‌تواند با گلوتامات ۷۲ واکنش داده و این محل را مسدود کند؛ احتمالاً به‌خاطر تغییر ساختار غشا و تغییر محل گلوتامات ۷۲ از محیط آبگریز به محیط آبدوست است. تغییر دیگری که در سلول‌های سرطانی اتفاق می-افتد و ممکن است مانع این واکنش شود محتوای بالای کلسترول در غشای میتوکندری آنها نسبت به سلول‌های طبیعی است. افزایش کلسترول روی غشاهای بیولوژیک باعث تغییر در سیالیت غشا می‌گردد و کاهش سیالیت غشا عملکرد بیولوژیک غشا را تغییر می‌دهد (۳۲).

افزایش کلسترول غشا باعث کاهش توانایی نفوذپذیری غیر انتخابی غشا می‌گردد. کاهش نفوذ مولکول‌های کوچک در غشا به دلیل افزایش کلسترول و به تبع آن افزایش فشردگی و کاهش سیالیت غشا قبلاً گزارش شده است (۳۲). با توجه به مطالب گفته شده دلیل دیگر برای عدم مسدود سازی جایگاه A توسط DCCD این است که به دلیل تراکم بالای کلسترول در سلول‌های سرطانی غشای این سلول‌ها سیالیت خود را از دست داده و به‌شدت متراکم شده‌اند. لذا، DCCD قادر به نفوذ در غشا نیست که بتواند با گلوتامات۷۲ VDAC ارتباط بر قرار نماید. در مجموع نتایج ارایه شده در این پژوهش به‌وضوح تغییر غشای سلول‌ها را در اثر سرطانی شدن نشان داده (تغییر در سیالیت و تغییر بنای فضایی پروتئین سازنده کانال) و این تغییرات روی عملکرد آنزیم هگزوکیناز تأثیر می‌گذارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل اجرای پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد مؤلف در مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران می‌باشد. بدین‌وسیله از زحمات استاد راهنمای پایان‌نامه جناب آقای دکتر محسن نعمت – گرگانی سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Wilson J E. Hexokinase. Rev. Physiol Biochem Pharmacol 1995; 126: 65-198.
2. Wilson JE (1984) in Regulation of carbohydrate Metabolism (Beitner, R.,Ed.), pp.45-85, CRC Press, Buca Raton, FL.
3. Felgner PL, Messer JL, Wilson JE. Purification of a hexokinase- binding protein from the outer membrane of rat liver mitochondria. J Biol Chem 1979; 254: 4946-9.
4. Linden M, Gellerfors P, Wilson JE. Pore protein and the hexokinase-binding protein from the outer membrane of rat liver mitochondria are identical. FEBE Lett 1982; 141: 189-192.
5. Fiek C, Benz R, Roos, N, 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 1982; 688: 429-440.
6. Vyssokikh MY, Brdizczka D. The function of complex between the outer mitochondrial membrane pore

(VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. Acta Biochimica Polonica 2003; 50: 389-404.

7. Kroemer G, Galluzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev 2007; 87: 99-163.
8. Pastorino JG, Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. J Bioenerg Biomembr 2008; 40: 171-82.
9. Baggetto LG, Clottes E, Vial C. Low mitochondrial proton leak due to high membrane cholesterol content and cytosolic creatine kinase as two features of the deviant bioenergetics of Ehrlich and AS30-D tumor cells. Cancer Res 1992; 52: 4935–41.
10. Thomson M. Does cholesterol use the mitochondrial contact site as a conduit to the steroidogenic pathway? Bioessays 2003; 25: 252–8.
11. Papadopoulos V, Liu J, Culty M. Is there a mitochondrial signaling complex facilitating cholesterol import? Mol Cell Endocrinol 2007; 265-266: 59–64.
12. De Pinto V, Benz R, Palmieri, F. The 35 kDa DCCD-binding protein from pig heart mitochondria is the mitochondrial porin. Biochim Biophys Acta 1985; 813: 230-242.
13. Nakashima RA, Mangan PS, Colombini M, Pedersen PL. Hexokinase receptor copmlex in hepatoma mitochondria: Evidence from N, N-Dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC. Biochemistry 1986; 25: 1015-1021.
14. Campbell AM, Chan SH. The voltage dependent anion channel affects mitochondrial cholesterol distribution and function. Arch Biochem Biophys 2007; 466: 203–10.
15. McCabe ERB. Microcompartmentation of energy metabolism at the outer mitochondrial membrane: Role in diabetes mellitus and other diseases. J Bioenerg Biomembr 1994, 26: 317-26.
16. Singh VN, Singh M, August JT, Horecker BL. Alteration in glucose metabolism in chick-embryo cells transformed by Rous sarcoma virus: intracellular levels of glycolytic intermediates. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71: 4129-4132.
17. Bustamante E, Pedersen PL. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 3735-3739.
18. Nakashima RA, Paggi MG, Pedersen PL. Contribution of glycolysis and oxidative phosphorylation to adnosine 5-triphosphate production in AS-30D hepatoma cell. Cancer Res. 1984; 44: 5702-5706.
19. Nakashima RA, Paggi MG, Acott LJ, Pedersen PL. Purification and characterization of binidable form of mitochondrial bound hexokinase from the highly glycolytic AS-30D rat hepatoma Cell line. Cancer Res 1988; 48: 913-919.
20. Gumaa KA, McLean PA. possible interrelationship between binding of hexokinase and the site of ATP formation in Krebs ascites cells. Biochem Biophys Res Commun 1969; 36: 771-779.
21. Parry DM, Pedersen PL. Intracellular localization and properties of particulate hexokinase in the Novikoff ascites tumor. J Biol Chem 1983; 258: 10904-10912.
22. Rose IA, Warms JVB. Mitochondrial hexokinase: Release, rebinding, and location. J Biol Chem 1967; 242: 1635-1645.
23. Pedersen PL. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. Prog Exp Tumor Res 1978; 22: 190-274.
24. Bustamante E, Morris HP, Pedersen PL. Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a from of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. J Biol Chem 1981; 256: 8699-8704.
25. Lee MG, Pedersen PL. Glucose Metabolism in cancer importance of transcription factor-DNA interactions within a short segment of the proximal region of the type II hexokinase promoter. J Biol Chem 2003; 278: 41047-58.
26. Golestani A, Ramshini H, Nemat-Gorgani M. A study on the two binding sites of hexokinase on brain Mitochondria. BMC Biochemistry 2007; 8: 20.
27. Mejbaum-Katzenellenbogen W, Dobryszycka WM. New method for quantitative determination of serum proteins separated by paper electrophoresis. Clinica Chimica Acta 1959; 4: 515-22.
28. Kabir F, Wilson JE. Mitochondrial hexokinase in brain of various species: differences in sensitivity to

solubilization by glucose 6-phosphate. Arch Biochem Biophys 1993; 300: 641-50.

29. Felgner PL, Wilson JE. Effect of neutral salts on the interaction of rat brain hexokinase with the outer mitochondrial membrane. Arch Biochem Biophys 1977; 182: 282-294.
30. Denis-Pouxviel C, Riesinger I, Buehler C, Brdiczka D, Murat JC. Regulation of mitochondrial hexokinase in cultured HT29 human cancer cells. An ultrastructure and biochemical study. Biochim Biophys Acta 1987; 902: 335-48.
31. Oudard S, Miccoli L, Guthauser B. Vassault A., Magdelenta H, Dutrillaux B, Poupon M-F.Glycolytic profile in normal brain tissue and glioma determined by a micromethod analysis. Oncology Reports 1996; 3:165-70.
32. pand RM. Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains. Prog Lipid Res 2006; 45: 279-294.

Study of hexokinase binding site on mitochondrial outer membrane in brain tumor cells

Ramshini H., Ph.D
Department of Biology, Payam Noor University,19395-4697, Tehran, I.R. of Iran.

Received:09/04/2012**, Revised:**25/05/2012**, Accepted:**15/07/2012

Corresponding author:
Dr. Hassan Ramshini, Department of Biology, Payam Noor University of Sabzevar, Sabzevar, Iran.
E-mail: hramshini@ibb.ut.ac.ir

Abstract

Background: In brain tumors, the main source of energy is from glycolysis, which is initiated by hexokinase type I (HK-I), an enzyme bound to the outer mitochondrial membrane, involving two sets of binding sites. In addition to the glucose-6-phosphate (G6P)-sensitive site (Type A), the enzyme is bound on a second set of sites (Type B) which are insensitive to G6P, but totally releasable by high concentrations of chaotropic salts such as KSCN. In the present study, we investigate possible changes in HK-I binding to the outer mitochondrial membrane during malignancy.

Methods: In this experimental study, 2 mM G6P was used for releasing enzyme from site A, while site B was depleted using a mixture of KSCN and KCl with a total concentration of 45 mM. For blocking binding sites in site A, dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) was used.

Results: DCCD, which normally has the capacity to block HK-I binding at site A, was found ineffective for mitochondria obtained from astrocytoma and glioma specimens, presumably due to changes in the microenvironment of Glu 72 of porin with which it interacts. It also appears that increased incorporation of cholesterol, reported to occur in the mitochondria of cancer cells, may influence HK binding due to changes in mitochondrial membrane fluidity.

Conclusion: Taken together, these results support earlier conclusions on possible changes in the microenvironment of bound HK-I and also fluidity of membrane upon malignancy. ***(Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, Volume 19, Number 3, pp.238-248).***

Keywords: *Mitochondria, Astrocytoma, Glioma, Hexokinase binding sites, Porins*