

بررسی اثر متابولیت‌های فنیل آلانین بر میزان اتصال هگزوکیناز تیپ I به میتوکندری مغز موش صحرائی

چکیده

زمینه و هدف: هگزوکیناز تیپ I، عمده‌ترین ایزوآنزیم موجود در بافت مغز است که به طور برگشت‌پذیر به غشا خارجی میتوکندری متصل می‌شود. در شرایط طبیعی، مقدار زیادی از HK-I (Hexokinase-I) به غشا متصل است. فرم متصل آنزیم، فعال‌تر از فرم محلول آن است و با این مکانیسم، فعالیت آنزیم کنترل می‌شود. متابولیت‌هایی که بر روی نشستن و بلند شدن آنزیم از سطح میتوکندری موثرند، اثر تنظیمی بر روی مصرف گلوکز در مغز دارند. از آنجایی که در بیماری فنیل کتونوری (Phenylketonuria=PKU)، افزایش فنیل آلانین و متابولیت‌های آن منجر به عقب‌ماندگی ذهنی می‌شود، در این مطالعه، اثرات این متابولیت‌ها روی اتصال هگزوکیناز به میتوکندری و جداسدن آن مورد بررسی قرار گرفت تا رابطه متابولیسم گلوکز با اثر تخریبی این متابولیت‌ها بر روی سلول‌های مغزی مشخص شود.

روش بررسی: این بررسی از نوع مطالعات تجربی است. فعالیت هگزوکیناز با روش اسپکتروفتومتری و جفت شده با فعالیت G6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که فنیل آلانین و فنیل لاکتیک اسید، هیچ تاثیری بر فعالیت آنزیم و جداسدن آن از میتوکندری و همچنین اتصال مجدد آن به میتوکندری ندارند، در حالی که فنیل پیروویک اسید، فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهد و رها شدن آنزیم از میتوکندری را در غیاب گلوکز ۶- فسفات افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: بنابراین، این احتمال وجود دارد که فنیل پیروویک اسید با کاهش فعالیت هگزوکیناز و افزایش فرم محلول آن، باعث کاهش مصرف گلوکز و تولید ATP (Adenosine triphosphate) شود و در نتیجه سلول‌های مغز در اثر کمبود انرژی و عناصر ضروری دیگر، قادر به رشد و تکامل نگردند.

کلیدواژه‌ها: ۱- هگزوکیناز تیپ I ۲- فنیل کتونوری ۳- فنیل پیروویک اسید ۴- میتوکندری مغز

تاریخ دریافت: ۸۴/۴/۱۴، تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۲/۱

مقدمه

در پستانداران، آنزیم هگزوکیناز (ATP: D-hexose 6-phosphotransferase EC 2.7.1.1) چهار ایزوآنزیم دارد (I-IV) که علاوه بر اختلاف در تحرک الکتروفورتیکی، در توزیع بین بافتی و میزان K_m ، نسبت به گلوکز با هم متفاوتند.

I) کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی.
II) استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران (*مؤلف مسؤول).
III) دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

Merck از [(Potassium thiocyanate-broth)KSCN خریداری شدند.

تهیه میتوکندری بر اساس سانتریفیوژ تمایزی و بر اساس روش Chau و Wilson انجام شد.^(۱) مغز موش‌های صحرایی بلافاصله پس از سر بردن، از جمجمه، خارج و در داخل نیتروژن مایع قرار گرفتند. زمان تهیه میتوکندری، مغزهای منجمد در مدیوم (SHED 0.25M Sucrose، HEPES 10mM، EDTA 0.1mM و DTT 10mM با pH=7.4)، از حالت انجماد خارج شده و پس از هموژنیزه شدن، حجم هموژن با مدیوم SHED به ۱۰ برابر وزن مغز (از نظر عددی) رسانده شد. طی چند مرحله سانتریفیوژ (توسط اولترا سانتریفیوژ)، سوسپانسیون میتوکندری در حجم ۵ میلی‌لیتر به ازای هر گرم مغز، تهیه گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم هگزوکیناز، با استفاده از روش سنجش جفت شده با آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز (G6PD) انجام گرفت (G6PD-coupled assay). در این روش، محصول آنزیم، یعنی گلوکز-۶-فسفات (G6P)، سوبسترای آنزیم دوم (G6PD) قرار گرفت و تشکیل Reduced NADPH (form of nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate CECIL در واحد زمان، با اسپکتروفتومتر UV دو پرتوی مدل ۹۰۰۰ در طول موج ۳۴۰ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. یک واحد فعالیت آنزیم هگزوکیناز به صورت آن مقدار فعالیت آنزیمی تعریف گردید که یک میکرومول NADPH در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (معادل یک میکرومول گلوکز-۶-فسفات) و در طی یک دقیقه تولید کند.^(۸)

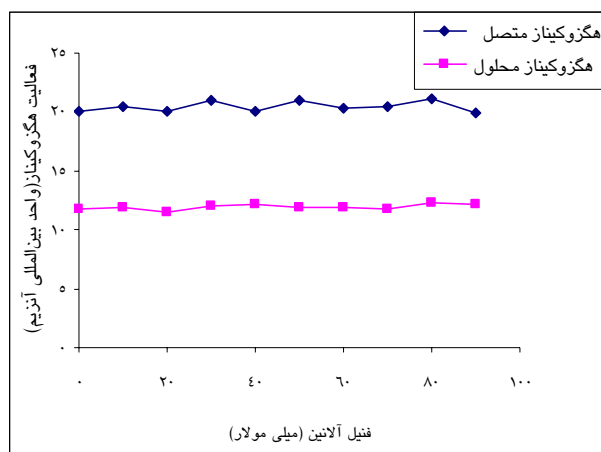
به سوسپانسیون میتوکندری با غلظت پروتئین ۳-۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، آنقدر گلوکز-۶-فسفات ۰/۱ مولار اضافه شد تا غلظت نهایی G6P، ۲ میلی‌مولار شد. بعد از انکوباسیون ۳۰ دقیقه‌ای در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ (۱۳۵۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و طی ۲۰ دقیقه) انجام شد. محلول رویی و رسوب، جدا شدند و فعالیت هگزوکیناز در هر یک از آنها، اندازه‌گیری شد، تا میزان جداسازی آنزیم توسط گلوکز-۶-فسفات یا درصد Release

است. در واقع فعالیت این ایزو آنزیم، با متصل شدن به سطح غشا میتوکندری و جدا شدن از آن، مورد تنظیم قرار می‌گیرد. فرم متصل به غشا آن به دلیل دسترسی آسان به ATP، فعال‌تر از فرم محلول (soluble) آن است. از آنجایی که HK-I اولین واکنش گلیکولیز را کاتالیز می‌کند، فعالیت آن در سلولهای مغز کاملاً تحت کنترل است. بنابراین تغییر در توزیع آنزیم بین حالت محلول و متصل، نقش اصلی در مصرف گلوکز و تولید ATP دارد.^(۲) گلوکز-۶-فسفات (Glucose-6-phosphate=G6P) که محصول آنزیم است با متصل شدن به جایگاه آلوستریک، می‌تواند آنزیم را از حالت متصل به غشاء به حالت محلول درآورده و فعالیت آن را کاهش دهد.^(۳) آنزیم محلول شده توسط G6P، به کمک یون منیزیم، مجدداً به غشا میتوکندری متصل می‌گردد.^(۴)

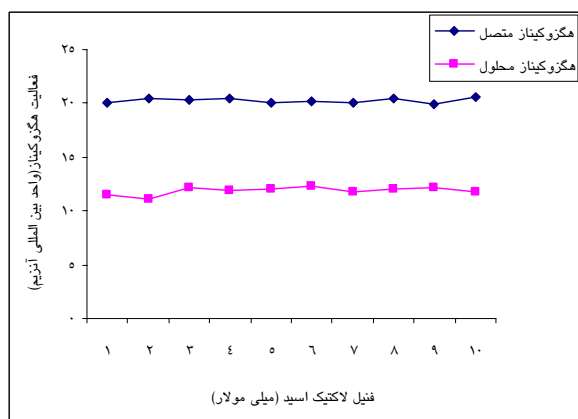
در بیماری فنیل‌کتونوری (Phenylketonuria=PKU)، غلظت فنیل‌آلانین خون و متابولیت‌های آن، یعنی فنیل‌پیروویک اسید و فنیل‌لاکتیک اسید افزایش می‌یابد که نتیجه آن، عقب‌ماندگی ذهنی در کودکان مبتلا می‌باشد.^(۵) در این مطالعه، به منظور پی بردن به علت بروز عقب‌ماندگی ذهنی، تاثیر این متابولیت‌ها بر تنظیم فعالیت آنزیم هگزوکیناز یا به عبارت دیگر، اثر آنها بر میزان اتصال و جدا شدن این آنزیم به میتوکندری در مغز موش صحرایی، مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع مطالعات تجربی است. قسمتی از مواد استفاده شده [HEPES (Hydroxyethylpiperazine Nicotinamide-adenine-)]NADP⁺، (ethanesulphonic acid dinucleotide phosphate)، G6PD، G6P، ATP، فنیل‌پیروویک اسید، تانیک اسید و آلبومین سرم گاوی] از شرکت Sigma تهیه شد و بقیه مواد [فنیل‌آلانین، (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid)EDTA، (Dithiothreitol)DTT، تریتون X-100، سوکروز، گلوکز، فسفات دی سدیک، کلرید منیزیم، فنل و



نمودار شماره ۱- اثر فنیل آلانین بر میزان فعالیت آنزیم هگزوکیناز در حالت‌های متصل و محلول (فعالیت آنزیم براساس واحد بین‌المللی آنزیم (International Unit) بیان شده است.



نمودار شماره ۲- اثر فنیل لاکتیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم هگزوکیناز در حالت‌های متصل به میتوکندری و محلول

در غلظت‌های مختلف فنیل پیروویک اسید (۹۰-۰ میلی‌مولار)، فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. همان طور که در نمودار مشخص است، فنیل پیروویک اسید باعث کاهش فعالیت هر دو شکل هگزوکیناز (متصل و محلول) می‌گردد. این اثر مهارکنندگی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت فنیل پیروویک، اثر مهارکنندگی افزایش می‌یابد (نمودار شماره ۳).

محاسبه شود. در صورت لزوم برای خارج کردن گلوکز-۶- فسفات از محیط، از دیالیز استفاده شد.^(۸)

هگزوکیناز محلول شده توسط گلوکز-۶- فسفات مجدداً قابل اتصال به میتوکندری‌های تخلیه شده از هگزوکیناز می‌باشد. برای این کار، یک واحد آنزیم محلول شده با سوسپانسیون میتوکندری (۲ میلی‌گرم پروتئین) در حضور کلرید منیزیم با غلظت نهایی ۲ میلی‌مولار به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس مورد سانتریفوژ (۱۳۵۰۰g) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و طی ۱۰ دقیقه) قرار گرفت. با اندازه‌گیری فعالیت هگزوکیناز در محلول رویی و رسوب، درصد اتصال مجدد (Rebinding) محاسبه گردید.^(۹،۸)

لازم به ذکر است که در تمام آزمایشات، یک کنترل در کنار تستها مورد آزمایش قرار می‌گرفت و همه به صورت دوتایی (Duplicated) انجام شدند. هر آزمایش حداقل ۳ بار تکرار شد.

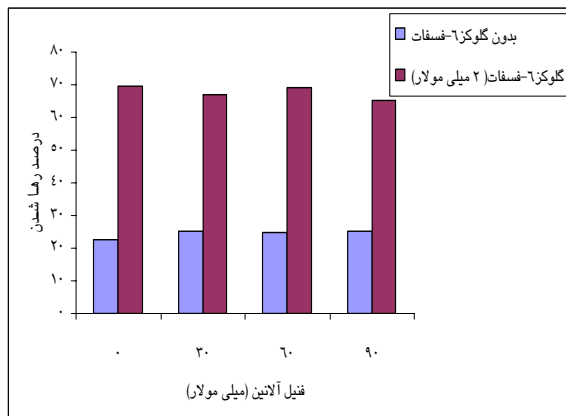
مقدار پروتئین در سوسپانسیون میتوکندری با روش تانیک اسید اندازه‌گیری شد.^(۱۰) استاندارد مورد استفاده، آلبومین سرم گاوی بود.

یافته‌ها

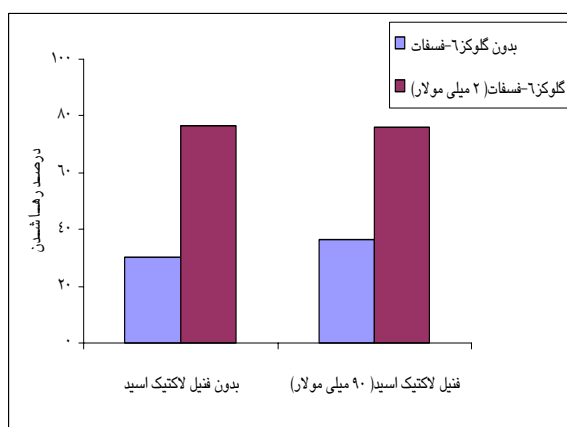
فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف فنیل آلانین (۹۰-۰ میلی‌مولار)، اندازه‌گیری شد. این آزمایش، هم با آنزیم متصل به میتوکندری و هم با آنزیم محلول انجام گرفت تا اثر مهارکنندگی یا فعال‌کنندگی این متابولیت بر هر دو شکل آنزیم، مشخص گردد. همان طور که در نمودار مشخص است، هیچ تغییری در فعالیت آنزیم در حالت متصل و محلول در مقایسه با عدم حضور این اسیدآمین، ایجاد نشده است (نمودار شماره ۱).

فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف فنیل لاکتیک اسید (۹۰-۰ میلی‌مولار)، اندازه‌گیری شد. این آزمایش نیز با هر دو شکل آنزیم انجام گرفت. همان طور که در نمودار مشخص شده است، فنیل لاکتیک اسید نیز اثری بر فعالیت آنزیم در اشکال مختلف آن ندارد (نمودار شماره ۲).

این دو متابولیت همان طور که بر فعالیت اشکال مختلف آنزیم تأثیری نداشتند، بر میزان جداسازی نیز تأثیری از خود نشان ندادند (نمودار شماره ۵ و ۶).

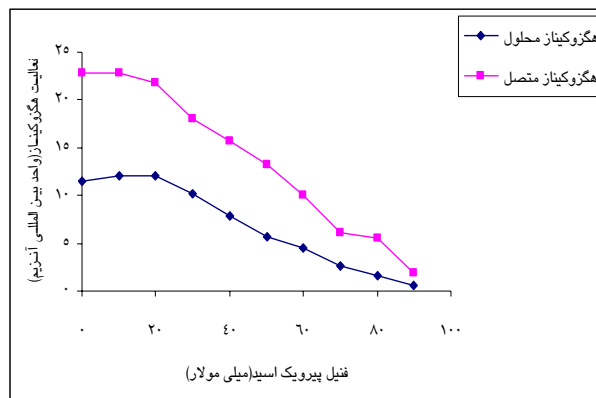


نمودار شماره ۵- اثر فنیل آلانین بر میزان رها شدن هگزوکیناز از میتوکندری



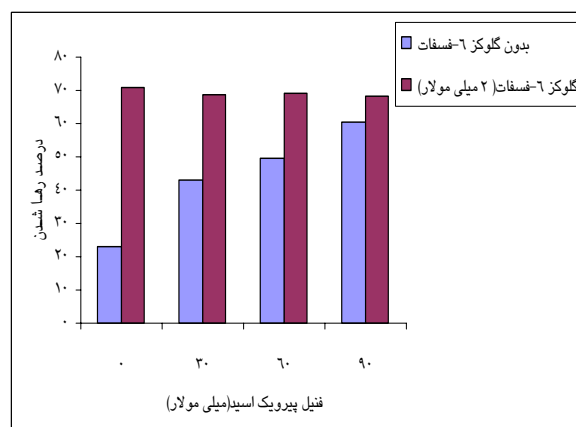
نمودار شماره ۶- اثر فنیل لاکتیک اسید بر میزان رها شدن هگزوکیناز از میتوکندری (PLA: فنیل لاکتیک اسید)

ابتدا در عدم حضور این متابولیت‌ها، میزان اتصال مجدد آنزیم محلول شده توسط گلوکز ۶- فسفات به میتوکندری‌های تقریباً تخلیه شده از آنزیم، بررسی شد، سپس در حضور هر یک از این متابولیت‌ها به تنهایی با غلظت ۹۰ میلی‌مولار، این اتصال بررسی شد. فنیل آلانین و فنیل لاکتیک اسید، هیچ تأثیری بر اتصال مجدد آنزیم نشان ندادند. تأثیر



نمودار شماره ۳- اثر فنیل پیروویک اسید بر میزان فعالیت آنزیم هگزوکیناز در حالت‌های متصل به میتوکندری و محلول

ابتدا در عدم حضور فنیل پیروویک اسید، میزان جدا شدن آنزیم در حضور و عدم حضور گلوکز ۶- فسفات تعیین گردید. سپس در حضور این متابولیت با غلظت‌های نهایی ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار نیز، میزان رها شدن آنزیم در حضور و عدم حضور G6P اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج بدست آمده که در نمودار نشان داده شده است، فنیل پیروویک اسید، میزان رها شدن آنزیم از میتوکندری را در حضور گلوکز ۶- فسفات تغییر نمی‌دهد، اما در عدم حضور گلوکز ۶- فسفات، میزان رها شدن آنزیم را متناسب با غلظت افزایش می‌دهد (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴- اثر فنیل پیروویک اسید بر میزان رها شدن آنزیم هگزوکیناز از میتوکندری

می‌دهد، پس در جهتی عمل می‌کند که فعالیت آنزیم در مغز، کاهش یابد. مقایسه نتایج بررسی اثر بر رهاسازی آنزیم، زمانی که گلوکز ۶- فسفات در محیط وجود دارد و زمانی که وجود ندارد، نشان می‌دهد که فنیل‌پیروویک اسید، اثر رهاسازی گلوکز ۶- فسفات را تشدید نمی‌کند ولی وقتی گلوکز ۶- فسفات وجود ندارد، رهاسازی را تقریباً به اندازه گلوکز ۶- فسفات انجام می‌دهد و به نظر می‌رسد که گلوکز ۶- فسفات و فنیل‌پیروویک اسید بر جمعیت مشترکی از آنزیم‌های متصل، اثر رهاسازی دارند و بر جمعیت اندکی که با گلوکز ۶- فسفات رها نمی‌شوند و تنها با KSCN از میتوکندری جدا می‌شوند، اثر ندارند^(۴)، پس فنیل‌پیروویک اسید همانند گلوکز ۶- فسفات روی سیستم تنظیمی آنزیم موثر است و به همین دلیل احتمال می‌رود که در بیماران مبتلا به فنیل‌کتونوری که این متابولیت افزایش می‌یابد، موجب کاهش فعالیت ایزوآنزیم اصلی سلولهای مغز شده و متابولیسم گلوکز را مختل کند، طوری که علاوه بر کاهش تولید انرژی، برخی از ترکیبات لازم برای رشد و تکامل سلولهای مغز کاهش یابد.

این بررسی، اثر بازدارندگی و بخصوص اثر رهاسازی فنیل‌پیروویک اسید را بر روی هگزوکیناز مغز موش صحرایی در *in vitro* نشان می‌دهد و می‌تواند مقدمه‌ای برای بررسی‌های *in vivo* در این زمینه جهت پی بردن به مکانیسم عقب‌ماندگی ذهنی در بیماران مبتلا به PKU باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این بررسی برای اولین بار نشان می‌دهد که فنیل‌پیروویک اسید با مکانیسم مشابه با گلوکز ۶- فسفات، باعث آزاد شدن هگزوکیناز I از سطح میتوکندری سلول مغز می‌شود و موجب کاهش فعالیت این آنزیم و در نتیجه کاهش مصرف گلوکز در این بافت می‌گردد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از پرسنل محترم مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی -

فنیل‌پیروویک اسید به دلیل اثر مهارکنندگی آن بر آنزیم محلول و افت شدید فعالیت پس از زمان انکوباسیون، قابل اندازه‌گیری نبود.

بحث

هگزوکیناز که اولین واکنش مسیر گلیکولیز را کاتالیز می‌کند، آنزیم مهمی در کنترل سرعت گلیکولیز و مصرف گلوکز می‌باشد. فعالیت هگزوکیناز تیپ I در سلولهای مغز، با متصل شدن به میتوکندری و جدا شدن از آن، تنظیم می‌شود. این ایزوآنزیم، در حالت متصل، کمتر تحت تاثیر عمل مهارکنندگی محصول واکنش (G6P) قرار می‌گیرد و فعال‌تر از فرم محلول می‌باشد.^{(۱۱) (۱۲)} با وجود چنین مکانیسم تنظیمی، هر متابولیتی که بتواند این بلند شدن و نشستن هگزوکیناز روی میتوکندری را تغییر دهد، می‌تواند روی فعالیت این آنزیم و مصرف گلوکز در بافت موثر باشد. اخیراً نشان داده شده است که فاکتورهای موثر در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نیز زمانی می‌توانند عمل کنند که هگزوکیناز از میتوکندری جدا شده باشد.^(۱۳)

اثر مهارکنندگی فنیل‌پیروویک اسید بر هگزوکیناز، اولین بار در سال ۱۹۶۹ توسط Weber نشان داده شد^(۵)، ولی در آن زمان وجود ایزوآنزیم‌های هگزوکیناز و اتصال برگشت‌پذیر برخی از این ایزوآنزیم‌ها (تیپ I و II) به غشا خارجی میتوکندری، معلوم نشده بود و اثر مهارکنندگی فنیل‌پیروویک اسید صرفاً بر کل فعالیت هگزوکینازی در هموژن بافتی گزارش شده بود. از آنجایی که فنیل‌پیروویک اسید و فنیل‌لاکتیک اسید، متابولیت‌هایی هستند که در بیماری فنیل‌کتونوری (هیپر فنیل‌آلانینمی کلاسیک) مقادیر آنها همراه با افزایش فنیل‌آلانین افزایش می‌یابد، در این مطالعه اثر این ترکیبات بر فعالیت آنزیم هگزوکیناز تیپ I و میزان اتصال و رها شدن آن در میتوکندری مغز موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

همان طور که نتایج نشان می‌دهد، فنیل‌پیروویک اسید فعالیت آنزیم را هم در حالت متصل و هم در حالت محلول کاهش داده و میزان رها شدن آنزیم از میتوکندری را افزایش

12- Beltrandel Rio H, Wilson JE. Coordinated regulation of cerebral glycolytic and oxidative metabolism, mediated by mitochondrially bound hexokinase dependent on intra mitochondrially generated ATP. Arch Biochem Biophys 1992; 296: 667.

13- Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits bax- induced cytochrome c release and apoptosis. J Biol Chem 2002; 277: 7610-18.

14- Rose IA, Warms JVB. Mitochondrial hexokinase: release, rebinding, and location. J Biol Chem 1976; 242: 1635-45.

درمانی ایران به علت همکاری خوب و صمیمانه ایشان در انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

فهرست منابع

1- Katzen HM, Schimke RT. Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. Proc Natl Acad Sci USA 1965; 54: 1218-25.

2- Wilson JE. Regulation of mammalian hexokinase activity. In: R. Beitner, editors. Regulation of carbohydrate metabolism. Vol 1. 1st ed. Boca Raton: FL CRC press; 1985. p. 45-85.

3- Lowry OH, Passoneau JV, Hasselberger FX, Schulz DW. Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. J Biol Chem 1964; 239: 18030.

4- Felgner PL, Wilson JE. Effect of neutral salts on the interaction of rat brain hexokinase with the outer mitochondrial membrane. Arch Biochem Biophys 1977; 232: 391-9.

5- Weber G. Inhibition of human brain pyruvate kinase and hexokinase by phenylalanine and phenylpyruvate: possible relevance to phenylketonuric brain damage. Proc Natl Acad Sci USA 1969; 63(4): 1365-9.

6- Chou AC, Wilson JE. Purification and properties of rat brain hexokinase. Arch Biochem Biophys 1972; 151: 48-55.

7- Arora KK, Pedersen PL. Glucose utilization by tumor cells: the enzyme autophosphorylates both its N- and C-terminal halves. Arch Biochem Biophys 1993; 304: 515-8.

8- Ehsani-Zonouz A, Golestani A, Nemat-Gorgani M. Interaction of hexokinase with the outer mitochondrial membrane and hydrophobic matrix. Mol Cell Biochem 2001; 223: 81-7.

9- 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.

10- Mejbaum-Katzenellenbogen W, Dobryszyccka WM. New method for quantitative determination of serum proteins separated by paper electrophoresis. Clinica Acta 1959; 4: 512-22.

11- De cerqueira Cesar M, Wilson JE. Functional characteristics of hexokinase bound to the type A and type B sites of bovine brain mitochondria. Arch Biochem Biophys 2002; 397: 106-12.

The Effect of Phenylalanine Metabolites on the Binding of HK-I (Hexokinase Type I) to Rat's Brain Mitochondria

N. Zia Majidi, MS^I *A. Ehsani-Zonouz, PhD^{II} M. Firoozrai, PhD^{III}

Abstract

Background & Aim: Hexokinase type I is the most predominant form of the enzyme in brain. It binds reversibly to the outer mitochondria membrane. In normal condition the major part of the enzyme binds to the membrane. Membrane bound form of the enzyme is more active than the soluble form, so this is more a control mechanism of the enzyme activity. Those metabolites that affect the binding or releasing of the enzyme from the mitochondria have regulatory effect on glucose consumption of the cell. Since an increase in phenylalanine and its metabolites causes mental retardation in patients with phenylketonuria, we have studied the effects of these metabolites on the activity, binding and releasing of the enzyme to determine the destructive effect of these metabolites in relation to glucose metabolism in brain.

Material & Method: This investigation was an experimental study in which hexokinase activity was determined spectrophotometrically by using G6PD (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase) coupled assay.

Results: The results show that phenylpyruvic acid decreases the enzyme activity in bound and soluble forms and increases the release of the enzyme from mitochondria whereas phenylalanine and phenyllactic acid have no effect on the enzyme activity, release and rebinding.

Conclusion: It is possible that phenylpyruvic acid causes the reduction of glucose consumption by decreasing hexokinase activity. Therefore, ATP (Adenosine Triphosphate) production declines in brain cells.

Key Words: 1) Hexokinase Type I 2) Phenylketonuria 3) Phenylpyruvic Acid
4) Brain Mitochondria

I) MS in Biochemistry.

*II) Assistant Professor of Biochemistry. Center of Basic Sciences. Hemmat Highway. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran. (*Corresponding Author)*

III) Associate Professor of Biochemistry. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.