

دراسة بعض الصفات الحركية لإنزيم بايروفيت كابينيز M2 PKM2 المنقى من امصال مرضى سرطان الثدي

ميثاق نزهان محمود^{1*}، اسماء هاشم شاكر²، عطاالله برجس دخيل²

1- قسم الكيمياء التطبيقية، كلية العلوم التطبيقية، جامعة سامراء، العراق

2- قسم الكيمياء، كلية التربية بنات، جامعة تكريت، العراق



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

<https://doi.org/10.54153/sjpas.2024.v6i4.787>

الخلاصة:

معلومات البحث:

تمت تنقية إنزيم بايروفيت كابينيز M2 عن طريق ترسيب بروتين المصل لمرضى سرطان الثدي باستخدام $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 65%، وتم استخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني CM-Cellulose لتنقية إنزيم البايروفيت كابينيز M2، إذ تم الحصول على قمة بروتين واحدة من خطوة الغسل وقمة أخرى بعد الاسترداد، وقد أشارت النتائج أن الفعالية لإنزيم PKM2 17.5U/mL والفعالية النوعية كانت 145.8U/mg وكان تركيز البروتين 0.12mg/mL، اما مقدار الاسترجاع فبلغ 42% وعدد مرات التنقية كانت 3 مرة، وأشارت نتائج تنقية إنزيم البايروفيت كابينيز M2 لعمود الترشيح الهلامي Sephadex G-200 إلى ظهور حزمة بروتينية واحدة فقط ذات فعالية عالية لإنزيم البايروفيت كابينيز M2 المنقى وصلت إلى 20U/mL وكانت الفعالية النوعية 400U/mg وتركيز البروتين 0.05 mg/L، اما مقدار الاسترجاع فبلغ 40% وعدد مرات التنقية كانت 8 مرة، و تم دراسة الظروف المثلى لإنزيم البايروفيت كابينيز M2 المنقى من امصال مرضى سرطان الثدي من خلال استخدام عدة تراكيز للمادة الاساس الفوسفواينول بايروفيت EPE، و عدة قيم مختلفة من pH ودرجات حرارية مختلفة متدرجة إذ سجلت النتائج قيم كانت للتركيز الأمثل للمادة الاساس 3mM، ورقم هيدروجيني 7 pH ودرجة حرارة مثلى 37°C، ووقت تفاعل 30min وكذلك استخرجت قيم ثبات او استقرار الإنزيم بحامضية ودرجات حرارية مختلفة، إذ كان إنزيم PKM2 أكثر استقراراً عند الرقم الهيدروجيني 7-9 وسجل الإنزيم فعالية متبقية بنسبة ثبات 80-100%، وكان إنزيم PKM2 مستقرا ويحافظ على فعاليته بنسبة 100% عند درجة الحرارة من 37-30°C، وسجل الإنزيم فعالية متبقية بنسبة ثبات 82-100% لدرجة حراة تصل 52°C، و تم دراسة الخواص الحركية من خلال حساب قيمة السرعة القصوى Vmax وثابت ميكيلس Km لإنزيم PKM2 المنقى من امصال مرضى سرطان الثدي من تطبيق العلاقة الخطية للينوفر – بيرك Line Weaver-Burk plot، إذ وجد أن Vmax 20.5 و Km 0.66.

تاريخ الاستلام: 2023/12/30

تاريخ التعديل: 2024/02/15

تاريخ القبول: 2024/02/20

تاريخ النشر: 2024/12/30

الكلمات المفتاحية:

سرطان الثدي، إنزيم PKM2، تنقية إنزيم

معلومات المؤلف

الايميل:

Charter61@uosamarra.edu.iq

الموبايل:

المقدمة:

التسرطن عملية متعددة العوامل يتم تحفيزها بشكل أساسي من خلال كل من الاستعدادات الجينية والأسباب البيئية، يتزايد عدد الوفيات المرتبطة بالسرطان كل عام ويصنف كأحد الأسباب الرئيسية للوفاة في جميع أنحاء العالم، على الرغم من أن عددا كبيرا من السرطانات لا تؤدي دائما إلى الموت، إلا أنها تقلل بشكل كبير من جودة الحياة وتتطلب بشكل عام تكاليف أكبر، ويعد سرطان الثدي حاليا أحد أكثر أنواع السرطان انتشارا والسبب الخامس للوفيات المرتبطة بالسرطان مع عدد يقدر بنحو 2.3 مليون حالة جديدة ما يمثل 11.6% من جميع السرطانات الجديدة وتوفي بسببه 684996 حالة في جميع أنحاء العالم وفقا لبيانات [1]. Globocan 2020 تشير التوقعات الحالية إلى إنه بحلول عام 2030 سيصل عدد الحالات الجديدة المشخصة على مستوى العالم إلى 2.7 مليون سنويا بينما عدد الوفيات 0.87 مليون [2]. ترتبط بعض الانزيمات والمركبات الوسطية في عملية تحلل الكلوكونز

الهوائي Aerobic Glycolysis pathway ارتباطا وثيقا بتطور الورم من خلال اعادة البرمجة الأيضية للورم الخبيث إذ يعد تحلل السكر مسار إنتاجي أولي حتى في حالة وجود كمية كافية من الأكسجين، التي تلعب دورا مهما في النمو السريع للخلايا السرطانية [3,4,5]. بايروفيت كاينيز PKM2 M2 إنزيم مهم يحد من المعدل في مسار تحلل السكر لكونه يتحكم في الخطوة النهائية من مسار تحلل السكر، في الوقت ذاته يتم التعبير عنه بشكل كبير في الخلايا التكاثرية وخاصة في الخلايا السرطانية، ويلعب دورا مهما في تكوين تأثير واربورغ وتكوين الأورام [6,7,8]. إذ يحفز فوسفواينول بيروفات لإنتاج البايروفيت وإطلاق الطاقة، ويدخل في تنظيم نشاط التمثيل الغذائي للخلايا ونمو الورم [9,10]. وكشفت الدراسات السريرية أن سوء التشخيص الطبي للعديد من أنواع السرطان يرتبط ارتباطا وثيقا بالإفراط في التعبير PKM2 الذي يعد علامة تشخيصية محتملة للأورام الخبيثة [8,11]. وذكرت الدراسات السابقة وجود إنزيم PKM2 بشكل مفرط overexpressed في العديد من أنواع السرطانات البشرية بشكل رئيسي سرطان الثدي والبروستات والرئة والقولون والمستقيم وسرطان الكبد، و أظهرت أيضا أن تحلل السكر بواسطة PKM2 يلعب دورا مهما في تطور الورم وانتشاره والبقاء على قيد الحياة وهجرة الخلايا السرطانية وبالتالي، فإن تثبيط PKM2 لديه القدرة على تثبيط نمو الخلايا السرطانية بشكل انتقائي [12]. وذكرت الدراسات الحديثة أن تثبيط إنزيم PKM2 يحفز موت الخلايا المبرمج في الخلايا السرطانية [13]. وبذلك فإن استهداف إنزيم PKM2 يكون بمثابة هدف دوائي مثالي للسرطان [14]. يوفر فرصة ممتازة لعلاجات السرطان وتطوير الأدوية، وبما ان التمثيل الغذائي للخلايا السرطانية يعد نقطة محورية للسعي لإيجاد اساليب جديدة تستهدف علاج مرضى السرطان، فضلا عن إن هناك اهتمام كبير بتعديل إنزيم PKM2 كهدف محتمل لعلاج مرض سرطان الثدي [15]. لذلك هدفت الدراسة الحالية إلى تنقية وفصل إنزيم PKM2 من امصال المرضى المصابين بسرطان الثدي ودراسة الظروف المثلى وخواصه الحركية.

المواد وطراق العمل:

فصل وتنقية إنزيم بايروفيت كاينيز M2 من مصلى الدم لمرضى سرطان الثدي

جمعت 50 عينة من الدم من النساء المصابات بسرطان الثدي وبعد الرخصة الاخلاقية من المرضى تم اخذ العينات من النساء بعد تشخيص المرض حديثا، من مستشفى الاورام السرطانية التعليمي في مدينة الطب ومستشفى هيووا في محافظة السليمانية إذ تم تشخيص المرض من قبل الاطباء المختصين، تراوحت اعمار المريضات من (25-70) سنة، للفترة من 2021 /2/9 إلى 2021 /4/14، تم تنقية إنزيم بايروفيت كاينيز M2 من مصلى الدم لمرضى سرطان الثدي حسب الخطوات الاتية:

الترسيب بواسطة كبريتات الامونيوم

أضيفت اوزان معينة من بلورات كبريتات الأمونيوم الصلبة تدريجياً إلى 3mL من الإنزيم الخام (المصل) عند 4 درجة مئوية في حمام ثلجي مع التحريك المستمر لمدة 45 دقيقة للحصول على نسبة اشباع 65%، ثم نبذ المحلول بالطرد المركزي 6000 دورة في الدقيقة لمدة 20min وعند درجة حرارة 4 درجة مئوية، تم التخلص من المحلول الرائق، وإذابة الراسب بكمية مناسبة من محلول الفوسفات المنظم pH 7 وتركيز 0.5M، ثم قدرت الفعالية الانزيمية والبروتين لتحديد أفضل نسبة تشبع [16].

كروماتوغرافيا التبادل الايوني

استعمل عمود زجاجي بأبعاد (2.5×40)cm ووضع في نهايته قليل من الصوف الزجاجي لمنع حبيبات الراتنج من التسرب خارج العمود، سُكب المحلول العالق للراتنج حتى ارتفاع 35cm بصورة بطيئة ومتجانسة في العمود لمنع تكون فقاعات هوائية تعيق عملية الفصل، بعد ذلك تم غسل عمود الراتنج CM-Cellulose بمحلول العمل Column buffer المحضر في محلول بوتاسيوم فوسفات المنظم بتركيز 50mM و pH 5.2 ، حتى تم الحصول على سرعة تدفق بمقدار 30 mL/hr، ثم إضافة محلول الإنزيم المحتوي على 3mL تقريبا من البروتين المذاب بكمية من محلول المنظم ، إلى عمود CM-Cellulose ويترك داخل العمود لدقائق قليلة ليتشرب في العمود، تم استرداد الأنزيم من العمود باستعمال التدرج الخطي linear gradient بواسطة المحلول المحضر من 500mL محلول العمل Column buffer المحضر مسبقا بمحلول الفوسفات المنظم بتركيز 50mM و pH 5.2 و المحلول الثاني للتدرج الخطي محضر من 500mL من محلول العمل ذاته ولكن عند pH 7.6 إذ تم ضبط او معايرة الدالة الحامضية له مع 2M من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH، وجمعت الاجزاء الناضحة من العمود بحجم 3mL للجزء الواحد [17]. تم قياس فعالية كل جزء عند 280nm و 340 باستخدام مقياس الطيف المرئي للأشعة فوق البنفسجية، لتحديد تركيز البروتين و فعالية إنزيم بايروفيت كاينيز M2 لأجزاء الذروة، ثم تم تجميع الأجزاء المفصولة التي تظهر فعالية إنزيم بايروفيت كاينيز M2 للاحتفاظ بها لخطوات التنقية بالترشيح الهلامي.

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

استعمل عمود زجاجي بقطر (2.5×45)cm ووضع في نهايته قليل من الصوف الزجاجي لمنع حبيبات الهلام من التسرب خارج العمود، سكب المحلول العالق للهلام في العمود بصورة بطيئة ومتجانسة لمنع تكون الفقاعات الهوائية التي تعيق الفصل حتى ارتفاع 40 cm، غُسل العمود بكميات كافية من محلول العمل Column buffer المحضر في المحلول المنظم لفوسفات البوتاسيوم pH 7.4 حتى تم الحصول على سرعة تدفق بمقدار 30mL/hr، أُضيف 3mL من محلول الأنزيم ببطيء فوق سطح هلام Sephadex-G.200 وترك لمدة خمسة دقائق ليتشرب في عمود الهلام، تم البدا بعملية الفصل باستخدام 250mL من محلول العمل المحضر في المحلول المنظم لفوسفات البوتاسيوم 50M و pH=7.4، اذ جمع 3mL للجزء الواحد [17]. بعد جمع الاجزاء الناضحة من عمود الفصل تم تقدير فعالية انزيم البايروفيت كإينيز M2 عند 340nm وتركيز البروتين 280nm.

قياس فعالية إنزيم بايروفيت كإينيز M2 المنقى

اتبعت طريقة Gui حضرت الكواشف يدويا، إذ تم مزج 200µl من الكاشف الاول R1 المتكون من (المحلول المنظم تريس pH7.5 HCl بتركيز 80mM، إنزيم LDH بتركيز 1820 U/L، NADH بتركيز 0.26mM مع 50µl الكاشف الثاني R2 المتكون من (كلوريد البوتاسيوم KCl بتركيز 1.04M، وكلوريد المغنيسيوم MgCl2 بتركيز 78mM، الادنيوسين ثنائي الفوسفات ADP بتركيز 26mM، والمحلول المنظم تريس- HCl pH7.5 بتركيز 80mM، فوسفواينول بايروفيت PEP بتركيز 1.7mM، فركتور ثنائي الفوسفات FBP بتركيز 2mM) و 10µl من إنزيم PKM2 المنقى أو الماء المقطر للمحلول الكفاء، حُضن المزيج عند درجة حرارة 37°C لمدة 10 دقائق، تم مراقبة التفاعل بشكل مستمر كل دقيقة عن طريق قياس الفعالية عند 340nm [18].

تم حساب فعالية إنزيم بايروفيت كإينيز M2 بوحدة U/mL من المعادلة الآتية:

$$\text{PKM2 enzyme activity in U/mL} = (\Delta A / 6.22) \times 1/\text{min} \times (TV/SV) \times 10^3$$

A: absorbance
TV: total volume
SV: sample volume
Extinction Coefficient: 6.22

تقدير تركيز البروتين لأنزيم بايروفيت كإينيز M2

اتبعت طريقة Bradford، اخذ 0.05mL من عينة محلول البروتين واطيف إلى 0.45mL من محلول الفوسفات pH7 بتركيز 0.5M و 2.5mL من محلول الصبغة الزرقاء Comassie blue G-250، ثم قيست شدة اللون عند الطول الموجي 595nm لمحتوى البروتين واعتماداً على المنحني القياسي لبروتين البقر BSA [19].

الدراسات الحركية لإنزيم البايروفيت كإينيز M2 المنقى

تمت دراسة الصفات الحركية لإنزيم بايروفيت كإينيز M2 في الأجزاء الناضحة التي تم تنقيتها من امصال مرضى سرطان الثدي.

تأثير المادة الأساس (فوسفواينول بايروفيت)

تم دراسة تأثير التراكيز المختلفة للمادة الأساس فوسفواينول بايروفيت على سرعة التفاعل للإنزيم بايروفيت كإينيز M2 باستعمال تراكيز مختلفة من مادة الفوسفواينول بايروفيت 1, 2, 3, 4, 5 mM لحساب التركيز الأمثل لأنزيم PKM2، وقد اتبعت الطريقة المذكورة في قياس فعالية PKM2 عند درجة حرارة 73°C، لحساب نشاط الإنزيم بايروفيت كإينيز M2 المنقى من أمصال المرضى المصابين بسرطان الثدي، ومن رسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتركيز المادة الأساس تم حساب التركيز الأمثل، التي تصل عنده سرعة التفاعل إلى السرعة القصوى [20].

تعيين قيم ثابت ميكاليس – منتن Km و Vmax

تم تعيين قيم الثابت Km للمادة الأساس المستخدمة فوسفواينول بايروفيت، وتم الحصول على قيم الثابت Km و Vmax باستعمال طريقة لينوفر – بيرك التي تربط بين القيم العكسية لكل من السرعة وتركيز المادة الأساس [21].

تأثير الدالة الحامضية على إنزيم البايروفيت كإينيز M2

تم إضافة الإنزيم بايروفيت كإينيز M2 المنقى إلى محلول المادة الأساس عند ارقام حامضية مختلفة تتراوح من pH 5-10، التي تتضمن الرقم الهيدروجيني للمحلول المنظم صوديوم اسيتيت 5-6.5 pH، ومحلول تريس المنظم 7-10 pH، بوجود المادة الأساس بتركيز 3mM وتم التفاعل في حمام مائي بدرجة حرارة 37°C، وحضنت الأنابيب لمدة 10 min عند كل قياس حتى تم

الحصول اعلى فعالية , قيست فعالية الإنزيم عند الطول الموجي 340nm وتم رسم العلاقة بين الرقم الهيدروجيني وفعالية الإنزيم [22].

تأثير الدالة الحامضية على قيمة الثابت Km لإنزيم البايروفيت كابينيز M2

تم تحديد تأثير الدالة الحامضية على قيمة الثابت Km لإنزيم البايروفيت كابينيز M2 باستخدام قيم مختلفة لاس الهيدروجيني (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5) وبدرجة حرارة 37°C بوجود تراكيز مختلفة من المادة الاساس فوسفوا ينول بايروفيت 3mM, 2mM تم قياس فعالية إنزيم بايروفيت كابينيز M2، ومن ثم باستخدام رسم لينوفر- بيرك لحساب قيمة ثابت Km, Vmax [21].

تأثير الزمن على فعالية إنزيم البايروفيت كابينيز M2

تم دراسة تأثير المدة الزمنية على فعالية إنزيم بايروفيت كابينيز M2 من خلال إضافة الإنزيم بايروفيت كابينيز M2 المنقى إلى محلول المادة الاساس عند pH 7.0 ، ودرجة حرارة 37°C ، بوجود المادة الأساس بتركيز 3mM وحضنت الأنابيب في فترات زمنية مختلفة تتراوح بين (5-60 min) ، ثم تم قياس فعالية إنزيم بايروفيت كابينيز M2 عند طول موجي 340nm ، وتم رسم فعالية الإنزيم مقابل الزمن [23].

تأثير درجة الحرارة على فعالية إنزيم البايروفيت كابينيز M2

تم إضافة الإنزيم بايروفيت كابينيز M2 المنقى إلى محلول المادة الاساس عند pH 7.0 ، بوجود المادة الأساس فوسفواينول بايروفيت بتركيز 3mM وحضنت الأنابيب لمدة 10 min عند كل قياس حتى تم الحصول اعلى فعالية ، ثم قيست فعالية إنزيم بايروفيت كابينيز M2 في درجات حرارة مختلفة تتراوح بين 25- 49 درجة مئوية عند طول موجي 340nm ، وتم رسم فعالية الإنزيم مقابل درجة الحرارة [23].

تأثير درجة الحرارة على قيمة الثابت Km لإنزيم البايروفيت كابينيز M2

تم تحديد تأثير درجة الحرارة على قيمة الثابت Km لإنزيم البايروفيت كابينيز M2 باستخدام درجات حرارية مختلفة 50, 10°C, 20, 30, 40، وبدالة حامضية pH 7.0 بوجود تراكيز مختلفة من المادة الاساس فوسفوا ينول بايروفيت 1mM, 2mM, 3mM وحضنت لمدة 10min وتم قياس فعالية إنزيم بايروفيت كابينيز M2، ومن ثم باستخدام رسم لينوفر- بيرك لحساب قيمة ثابت Km Vmax عند كل درجة حرارية [21].

النتائج والمناقشة:

عزل وتنقية إنزيم بايروفيت كابينيز M2 (PKM2) من مصل دم مرضى سرطان الثدي

تم تنقية إنزيم بايروفيت كابينيز M2 من مصل المرضى المصابين بسرطان الثدي الذي تم جمعها قيد الدراسة، بعدة طرائق وقدرت فعالية الإنزيم المنقى والبروتين و تم حساب الفعالية النوعية للإنزيم والفعالية الكلية وعدد مرات التنقية والحصيلة الإنزيمية لكل طريقة مستخدمة وكما موضح بالجدول (1)، وقدرت فعالية الإنزيم الخام Crude enzyme، وتركيز البروتين للإنزيم الخام قبل عملية التنقية، إذ اشارت النتائج ان فعالية الإنزيم الخام كانت 15U/mL، والفعالية النوعية للإنزيم الخام 50U/mg، وتركيز البروتين للإنزيم الخام 0.3mg/mL، والبروتين الكلي للإنزيم الخام 15mg، والفعالية الكلية للإنزيم 750U. استخدمت ثلاث طرائق مختلفة لتنقية إنزيم بايروفيت كابينيز M2 من مصل المرضى المصابين بسرطان الثدي لغرض إزالة احتمال تداخل البروتينات وغيرها من المواد الموجودة في المصل في أثناء دراسة خصائص الإنزيم.

الجدول (1) خطوات التنقية لإنزيم البايروفيت كابينيز M2 (PKM2) من مصل مرضى سرطان الثدي

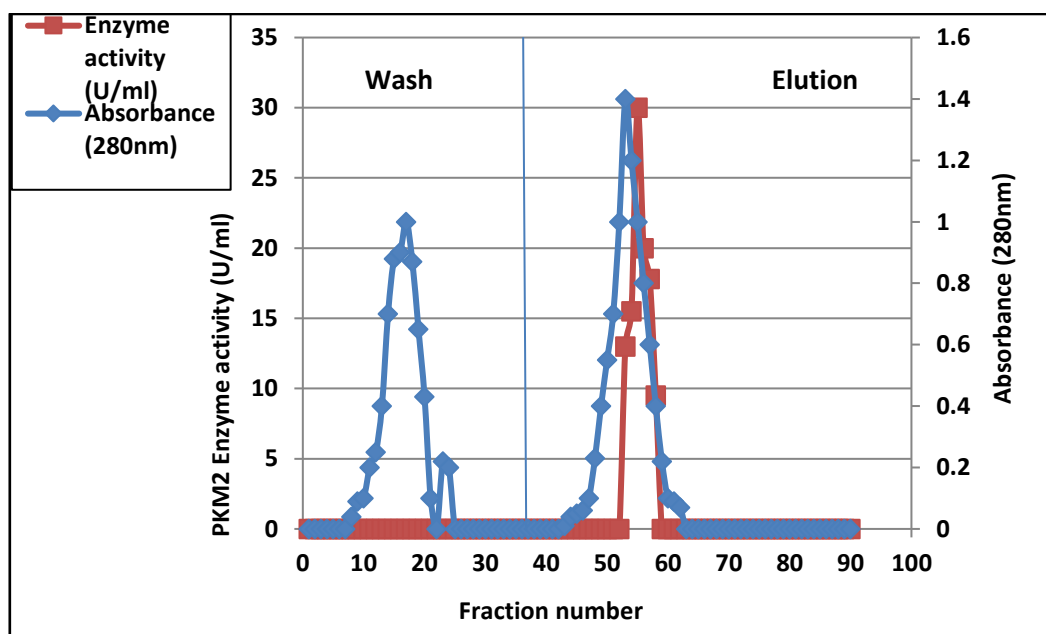
Purification steps	Elute (ml)	Enzyme activity (U/ml)	Protein concentration (mg/ml)	Total Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Total activity (U)	Purification (folds)	Yield (%)
Crude enzyme	14	15	0.3	15	50	750	1	100
Ammonium sulphate precipitation 65%	13	26.5	0.2	2.6	132.5	344.5	2	45.9
CM-cellulose	18	17.5	0.12	2.16	145.8	315	3	42
Sephadex- G200	15	20	0.05	0.75	400	300	8	40

الترسيب باستخدام كبريتات الأمونيوم

يعد التلميح أو الترسيب بالأملاح المتعادلة من أكثر العمليات استخداما على نطاق واسع في تنقية الإنزيم للتخلص من البروتينات غير المرغوب فيها والموجودة مع الإنزيم وتقليص حجم المصل والحصول على الإنزيم بدرجة من النقاوة، الذي يعتمد على الترسيب بملح كبريتات الأمونيوم نظرا لقابلية ذوبانه العالية فضلا عن انعدام تأثيره في البروتينات وقلة تكلفته عند مقارنته بالمذيبات العضوية البديلة [25,24]. فيحدث الترسيب بالأملاح بفعل معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين والاختلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتين مما يؤدي ذلك إلى انخفاض ذائبيتها وترسيبها وتسمى هذه العملية بالتلميح الخارجي **Salting out**, إذ تشكل البروتينات في المحلول روابط هيدروجينية مع جزيئات الماء عن طريق تعريض مجموعاتها القطبية والأيونية، وعندما تضاف الأيونات الصغيرة عالية الشحنة مثل كبريتات الأمونيوم بتركيز عالية فإن هذه المجموعات تتنافس مع البروتين لترتبط بجزيء الماء، مما يؤدي إلى إزالة جزيئات الماء من البروتين ويقلل من قابليته للذوبان مما ينتج عنه عملية ترسيب البروتين [26]. أظهرت النتائج أن الفعالية لإنزيم PKM2 26.5 U/mL والفعالية النوعية كانت 132.5U/mg في مصل دم المرضى بعد الترسيب بكبريتات الأمونيوم التي تم الحصول عليها في نسبة تشبع كبريتات الأمونيوم 65%، مقارنة بالفعالية النوعية لإنزيم PKM2 في مصل دم المرضى قبل الترسيب التي كانت 50U/mg وكان تركيز البروتين 0.2mg/mL، اما مقدار الاسترجاع فبلغ 45.9% وعدد مرات التنقية كانت 2 مرة كما في الجدول (1).

كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

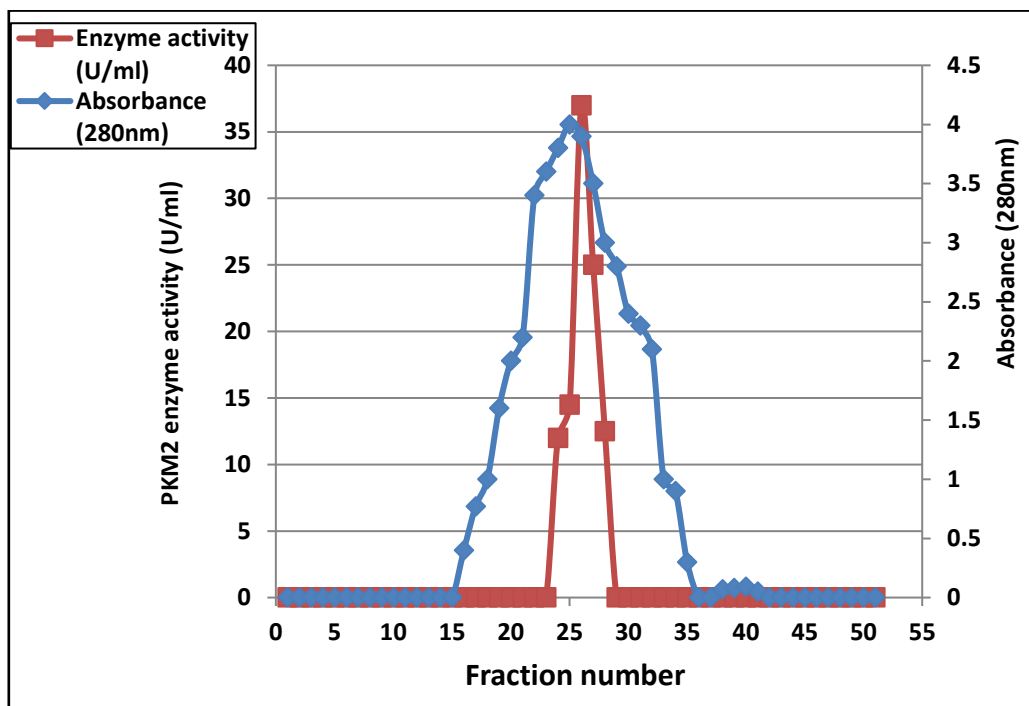
ربما تكون هذه التقنية هي الأكثر استخداما على نطاق واسع لفصل البروتين وتنقيته اعتمادا على الامتزاز القابل لانعكاس الجزيئات الذائبة المشحونة لمجموعات التبادل الأيوني الثابتة ذات الشحنة المعاكسة، إن قابلية التطبيق الواسع للتبادل الأيوني، وفصله العالي للمواد، وسعته التبادلية العالية وسهولة تحضيره، وإمكانية إعادة تنشيط المبادل واستعماله لمرات عديدة، وبساطة الأساليب وإمكانية التحكم، كلها عوامل تساهم في نجاحه [27]. وكما موضح في الشكل (1)، عند فصل إنزيم PKM2 من مصل مرضى سرطان الثدي بتقنية كروماتوغرافيا التبادل الأيوني تم الحصول على قمة بروتين واحدة من خطوة الغسل **Washing** وقمة أخرى بعد الاسترداد **Elution**، وقد أشارت النتائج في الجدول (1) أن الفعالية لإنزيم PKM2 17.5U/mL والفعالية النوعية كانت 145.8U/mg وكان تركيز البروتين 0.12mg/mL، اما مقدار الاسترجاع فبلغ 42% وعدد مرات التنقية كانت 3 مرة.



الشكل 1: كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية لإنزيم PKM2 من امصال مرضى سرطان الثدي.

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

أشارت النتائج الموضحة في الجدول (1) و الشكل (2) إلى ظهور حزمة بروتينية واحدة فقط ذات فعالية عالية لإنزيم الباريفيت كاينيز M2، وعند تتبع فعالية الانزيم تبين أن الحزمة تعطي فعالية عالية لإنزيم PKM2 المنقى وصلت إلى 20U/mL وأن الفعالية النوعية كانت 400U/mg وكان تركيز البروتين 0.05 mg/L، اما مقدار الاسترجاع فبلغ 40% وعدد مرات التنقية كانت 8 مرة.



الشكل 2: كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية لإنزيم PKM2 من امصال مرضى سرطان الثدي

لا تتطابق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة اجراها الباحث Yilmaz لمقارنة مستويات نشاط بيروفات كايينز من أنسجة الثدي الطبيعية وأنسجة اورام الثدي، ومن خلال تنقية وفصل الإنزيم إذ وجد شكلين من بيروفات كايينز في أنسجة الثدي البشرية الطبيعية والورمية، واطهر إنزيم PKM2 في خلايا الثدي الورمية عند الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة 30-70% فعالية نوعية 1.14U/mg وفعالية كلية 18.6U وبروتين كلي 18.6mg وحصيلة إنزيمية 68.6 وعدد مرات تنقية 2، و اجرى الباحث خطوات تنقية اخرى بوساطة تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام DEAE Sephadex A-50 وتنقية الترشيح الهلامي S-200 إذ اظهر إنزيم بايروفيت كايينز M2 في أنسجة الثدي الورمية فعالية نوعية 3.7 U/mg, 5.3U/mg وبروتين كلي 3mg، وفعالية كلية 11.2 U، 7.2U وحصيلة انزيمية 41.3%، 27%، وعدد مرات تنقية 6.5 مرة و9.3 مرة على التوالي [28]. و اجرى الباحث Harkins تنقية وعزل لنظائر إنزيم البايروفيت كايينز M1, M2 من أنسجة الكلى والدم البشري وأنسجة العضلة القطنية وعند ترسيب الإنزيم بكبريتات الامونيوم بنسبة من 50-65% كانت الفعالية النوعية للإنزيم PKM2 0.46 U/mg، والبروتين الكلي 37.760mg، وحصيلة إنزيمية 75%، وعدد مرات التنقية 1.7مرة، و استكمل خطوات التنقية بوساطة كروماتوغرافيا التبادل الايوني بوساطة عمود CM-cellulose وكانت الفعالية النوعية 26.0 U/mg، والبروتين الكلي 294mg، وحصيلة إنزيمية 33%، وعدد مرات تنقية 963 مرة، وفي الخطوة الثالثة من التنقية استخدم الباحث كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بعمود Sephadex G-200 وكانت الفعالية النوعية 127 U/mg، والبروتين الكلي 6.7mg، وحصيلة إنزيمية 7.3%، وعدد مرات تنقية 470 مرة [29].

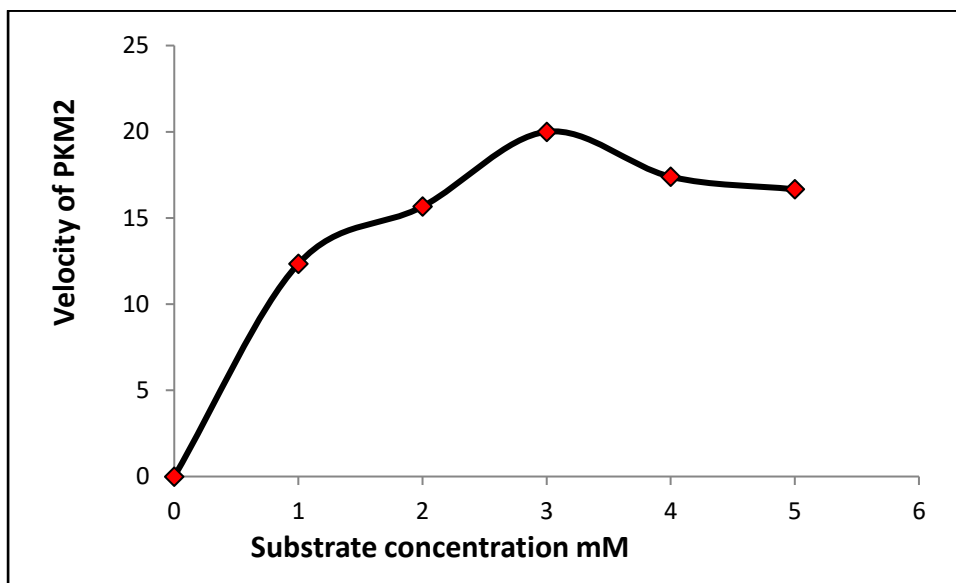
وفي دراسة قام بها Mellati لتنقية إنزيم بايروفيت كايينز من النوع M2 من الورم السحائي البشري من خلال الترسيب بكبريتات الأمونيوم، متبوعا بالتبادل الأيوني وكروماتوغرافيا الالفة، إذ كانت الفعالية النوعية للإنزيم المنقى 33.4U/mg وبحصيلة إنزيمية 6.5% [30]. وتمت تنقية إنزيم بيروفات كايينز M2 من رئة الفئران بمقدار عدد مرات تنقية 840 مرة مع حصيلة انزيمية 20%، وكانت الفعالية النوعية 1340 U/mg [31]. كذلك قام الباحث Harkins بتنقية إنزيم بيروفات كايينز M2 من أنسجة الكلى البشرية بوساطة خطوات التنقية فضلا عن كروماتوغرافيا الالفة، إذ نتج فعالية نوعية 127U/mg من البروتين وعدد مرات تنقية 470 مرة اكثر من المستخلص الخام [32].

الخواص الحركية لإنزيم PKM2 المنقى من أمصال مرضى سرطان الثدي

التركيز الامثل لبايروفيت كايينز M2 وايجاد Km و Vmax

تزداد سرعة التفاعل كلما ازداد تركيز المادة الاساس إلى ان يصل إلى اقصى سرعة عندها يسمى تركيز المادة الاساس بالتركيز الامثل Optimum substrate concentration، وعند زيادة التركيز تبقى سرعة التفاعل ثابتة، إي عندما تكون تراكيز المادة الاساس قليلة تتناسب سرعة التفاعل طرديا مع تركيز المادة الاساس ولكن عندما يزداد تركيز المادة الاساس اكثر وتصبح عالية فعندئذ تصل إلى نقطة لا يحدث بعدها اي زيادة في سرعة التفاعل وتبقى ثابتة لا تزيد بعدها سرعة التفاعل مهما زاد

تركيز المواد المتفاعلة وتسمى هذه السرعة بالسرعة القصوى V_{max} يكون الإنزيم مشبعاً بالمادة الأساس ولا يستطيع ان يزيد من سرعة التفاعل اكثر [33]. ولمعرفة العلاقة بين إنزيم PKM2 وتركيز المادة الأساس (فوسفواينول بايروفيت) تم قياس فعالية الإنزيم بوجود تراكيز مختلفة من المادة الأساس تتراوح بين 1-5mM، والشكل (3) يبين أن سرعة التفاعل الإنزيمي تزداد بزيادة تركيز المادة الأساس اللازمة للوصول إلى السرعة القصوى V_{max} للتفاعل الإنزيمي، إذ بدأت فعالية الإنزيم بالزيادة من تركيز 2mM إلى 3mM، وبعد ذلك بدأت في الانخفاض إذ لوحظ انخفاض فعالية الإنزيم عند تركيز المادة الأساس 4mM و 5mM، وبذلك فإن أقصى فعالية للإنزيم المنقى البايروفيت كاينيز M2 كانت 20U/ml وظهرت عند تركيز المادة الأساس 3mM، وهذا مطابق لما أثبتته العالمان ميكليس ومنتن إذ أوضحوا أن استخدام تراكيز واطئة من المادة الأساس يجعل المواقع الفعالة للإنزيم غير مشبعة بالمادة الأساس، لكن عند زيادة تركيز مادة الأساس بشكل كبير تصبح المواقع الفعالة للإنزيم مشبعة بالمادة الأساس أي يتم التوصل إلى السرعة القصوى للتفاعل بعد هذا التركيز فان سرعة التفاعل الإنزيمي لا تعتمد على تركيز المادة الأساس [34]. ومن الشكل (3) نلاحظ ان الإنزيم PKM2 يخضع لمعادلة ميكليس - منتن Michaelis-Menten والشكل هو زائدي المقطع.

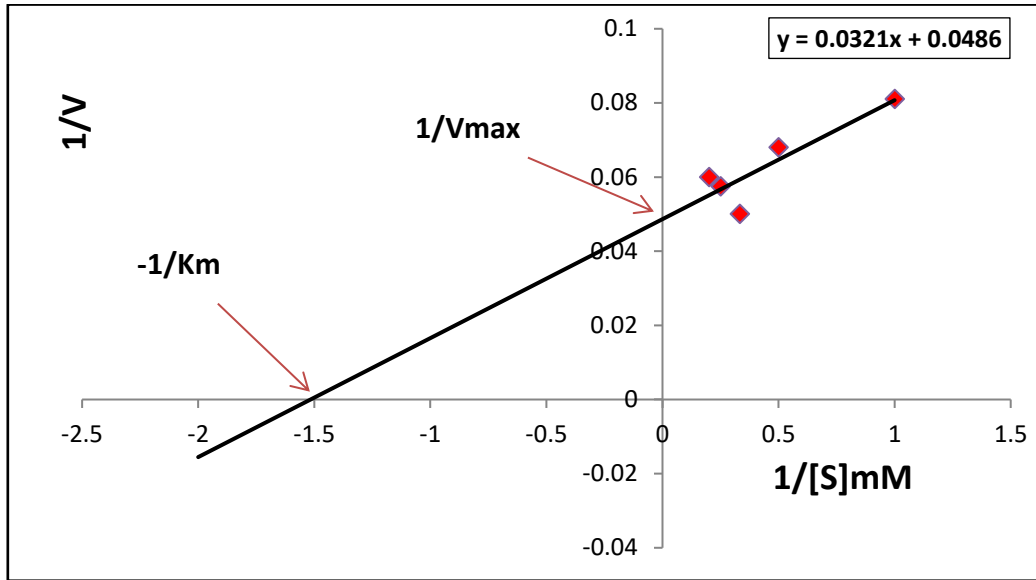


الشكل 3: رسم معادلة ميكليس منتن لتأثير المادة الأساس على فعالية إنزيم PKM2 في أمصال مرضى سرطان الثدي

وقد تم حساب قيمة السرعة القصوى V_{max} وثابت ميكليس K_m لإنزيم PKM2 المنقى من امصال مرضى سرطان الثدي وكما موضح في الجدول (2) والشكل (4) من تطبيق العلاقة الخطية للينوفر - بيرك Lineweaver-Burk plot، وجد أن V_{max} و K_m 0.66. وقد وجد الباحث Guan في دراسة له على مرضى سرطان الثدي أن التركيز الأمثل للمادة الأساس الفوسفواينول بايروفيت لإنزيم PKM2 كان 2.40mmol/L، وقيمة V_{max} 220، K_m 2.31 [35].

الجدول 2: السرعة القصوى V_{max} وثابت ميكليس K_m لإنزيم PKM2 المنقى من امصال مرضى سرطان الثدي

PKM2 Enzyme	Michaelis-Menten mM	Line weaver-Burke mM
K_m	1.5	0.66
V_{max}	20	20.5

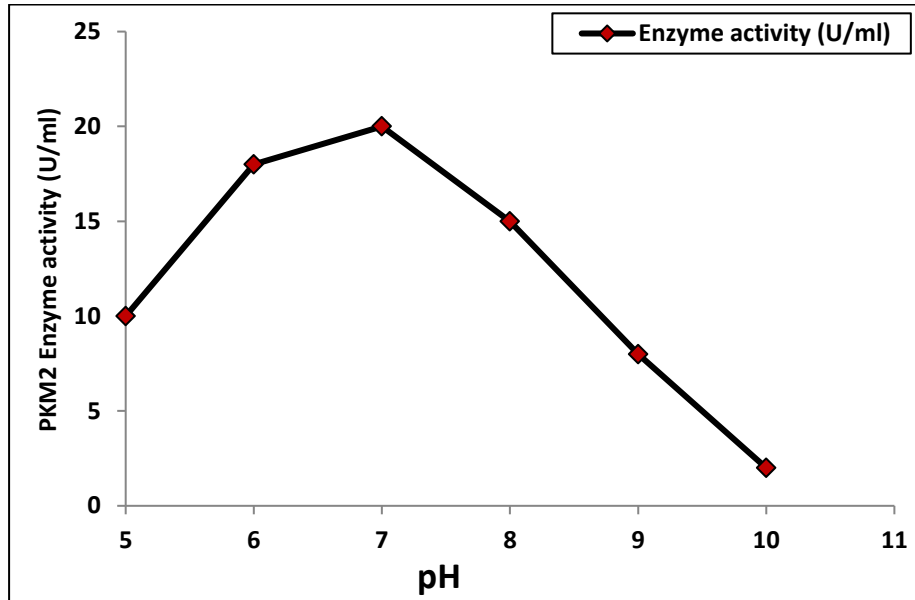


الشكل 4: رسم لينوفر-بيرك لحساب V_{max} و K_m لإنزيم PKM2 في أمصال مرضى سرطان الثدي

تأثير الدالة الحامضية على فعالية إنزيم بايروفيت كابينز M2

الإنزيمات هي مواد تتأثر بتغيير قيمة الدالة الحامضية pH اعتماداً على طبيعة مجموعتها التحفيزية catalytic group ومصدر الإنزيم enzyme source [36]. وتتأثر فعالية العديد من الإنزيمات بشدة بالرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل على الرغم من أن بعض الإنزيمات تظهر نشاطاً في نطاق واسع من الرقم الهيدروجيني [37]. إلا أن العديد منها يظهر أقصى نشاطاً عند نطاق ضئيل للرقم الهيدروجيني [38]. ويطلق عليه الرقم الهيدروجيني الأمثل وبذلك يكون معامل رئيسي يجب تحديده بدقة إذ يمكن في كثير من الأحيان تنظيم الفعالية الإنزيمية بواسطة بقايا الأحماض الأمينية الرئيسية القابلة للتأين [39]. يعد تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنزيم أمراً مهماً لتوصيف الخصائص الإنزيمية [40]. إن معرفة ما إذا كان الإنزيم له نطاق ضيق أو واسع من نشاط الأس الهيدروجيني ليس فقط اعتباراً مهماً للدراسات الحركية ولكن يمكن أيضاً استخدامه لثبات أو استقرار درجة الحموضة للإنزيم [41].

قيم تأثير الدالة الحامضية على فعالية إنزيم البايروفيت كابينز M2 PKM2 باستخدام عدة قيم مختلفة من pH في المدى من 5 إلى 10، وكما موضح في الشكل (5) أظهرت النتائج أن فعالية إنزيم البايروفيت كابينز M2 PKM2 زاد بزيادة قيمة الدالة الحامضية، إذ بدأت فعالية الإنزيم بالزيادة من pH 5 حتى وصل إلى الرقم الهيدروجيني 7 pH، وبعد ذلك بدأت في الانخفاض إذ لوحظ انخفاض فعالية الإنزيم عند الأرقام الهيدروجينية التي هي أعلى من 8 pH وانعدامها تماماً في الأرقام الهيدروجينية المتطرفة 10 pH أو أكثر، وبذلك فإن أقصى فعالية للإنزيم المنقى من أمصال مرضى سرطان الثدي البايروفيت كابينز M2 PKM2 كانت 20U/mL وظهرت عند 7 pH.

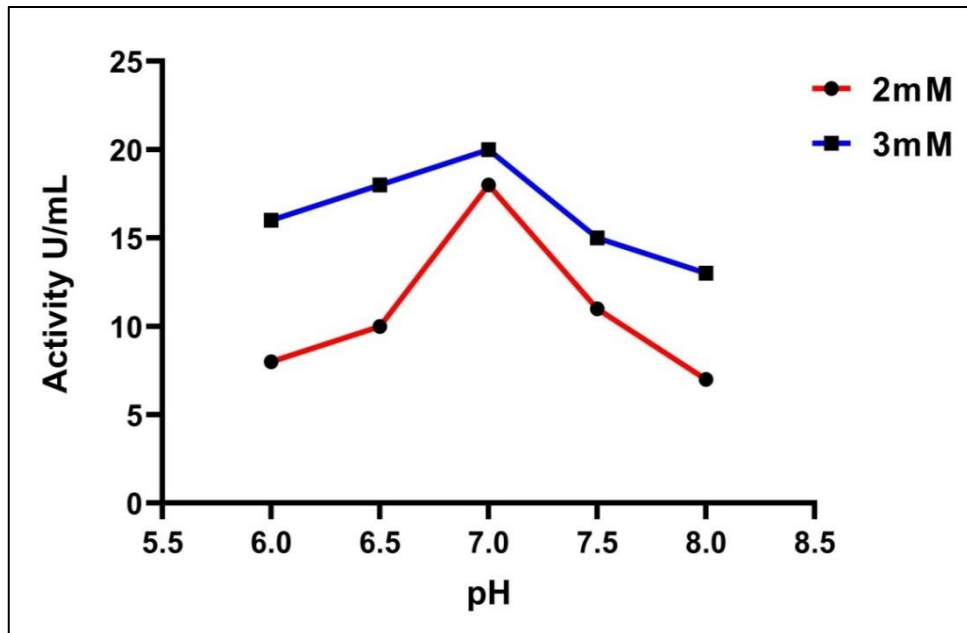


الشكل 5: تأثير الدالة الحامضية على فعالية إنزيم PKM2 المنقى من مصلى مرضى سرطان الثدي

إن النتيجة في هذه الدراسة تؤيد ما ورد في العديد من الدراسات فقد وجد Schering وجماعته يكون لإنزيم PKM2 المنقى من أنسجة رئة الفئران درجة حموضة أمثل عند الرقم الهيدروجيني pH 6.5 [31]. و وجد الباحث Nandi أن فعالية إنزيم PKM2 في الخلايا السرطانية تتناقص مع زيادة الدالة الحامضية من 7.0 إلى 8.0، وأن إنزيم PKM2 نشط على النحو الأمثل عند الرقم الهيدروجيني pH 7.5 [42]. أما الإنزيم المنقى من نسيج أورام الثدي للإنسان أظهر أعلى فعالية عند pH 7.1 [28].

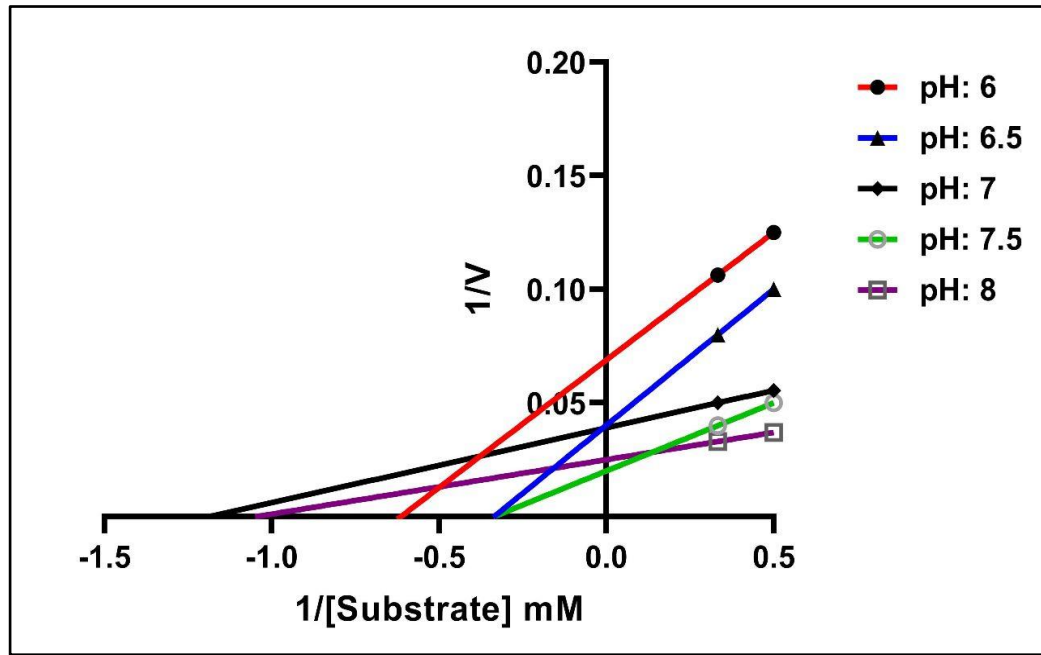
تأثير التغير في الدالة الحامضية على فعالية إنزيم بايروفيت كابينيز M2 عند تراكيز مختلفة من المادة الاساس

تم دراسة تأثير التغير في الدالة الحامضية على فعالية الإنزيم بايروفيت كابينيز M2 المنقى من امصال مرضى سرطان الثدي عند تراكيز مختلفة من المادة الاساس فوسفو اينول بايروفيت PEP 3mM, 2mM وعند قيم مختلفة من الدالة الحامضية كما في الشكل (6)، إذ ان ثابت ميكليس- منتن يتأثر بتغير الدالة الحامضية ، وبالتالي تتغير الفة المادة الاساس بتغير الدالة الحامضية.



الشكل 6: تأثير الدالة الحامضية على فعالية إنزيم PKM2 المنقى من مصلى مرضى سرطان الثدي عند تراكيز مختلفة من المادة الاساس PEP

ومن خلال معادلة لينوفر بيرك الخطية الموضحة بالشكل (7) ، تم حساب قيم V_{max} و K_m عند درجات مختلفة من الدالة الحامضية (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0) pH، والقيم موضحة في الجدول (3).



الشكل 7: رسم لينوفر بيرك لتأثير الدالة الحامضية على فعالية إنزيم PKM2 المنقى من مصلى سرطاني عند تراكيز مختلفة من المادة الأساس PEP

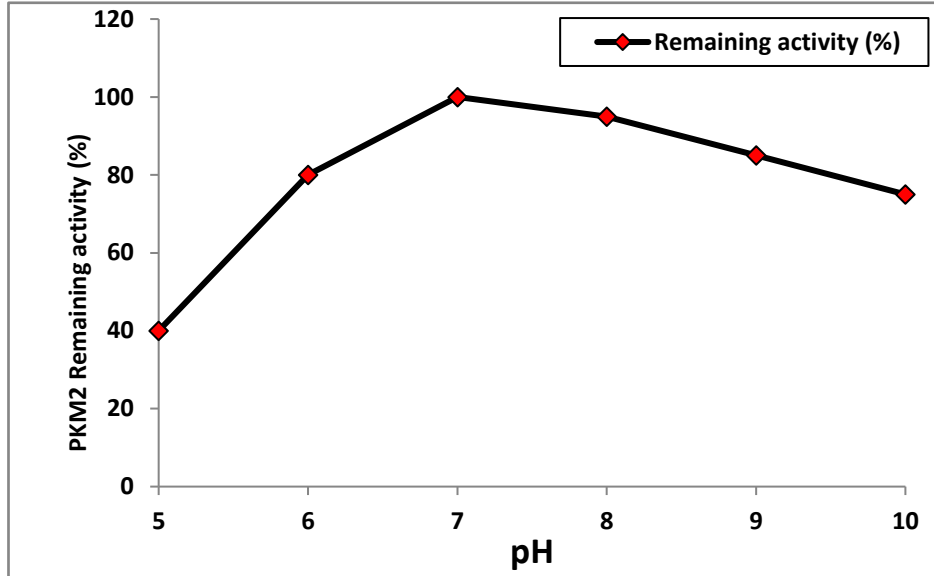
الجدول 3: يبين قيم V_{max} و K_m لإنزيم البايروفيت كابينيز M2 (PKM2) المنقى من مصلى سرطاني عند درجات مختلفة من الدالة الحامضية

pH	pH: 6	pH: 6.5	pH: 7	pH: 7.5	pH: 8
V_{max}	12.82	20.49	21.50	22.67	28.16
K_m	1.47	2.45	0.688	2.52	0.956
slop	$Y = 0.115 * X + 0.078$	$Y = 0.120 * X + 0.0488$	$Y = 0.0320 * X + 0.0465$	$Y = 0.01115 * X + 0.0441$	$Y = 0.0338 * X + 0.0355$

تأثير الدالة الحامضية على استقرار إنزيم البايروفيت كابينيز M2 (PKM2)

يمكن من خلال دراسة تأثير الدالة الحامضية على استقرار الإنزيم معرفة المدى للدالة الحامضية التي يكون فيها الإنزيم فعال ويحافظ على نشاطه، تم حضن إنزيم البايروفيت كابينيز M2 المنقى عند $37^{\circ}C$ لمدة 30 دقيقة لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لاستقراره، توضح النتائج في الشكل (8) أن إنزيم البايروفيت كابينيز M2 كان مستقرًا في نطاق واسع من الأس الهيدروجيني-10 إلى 6 ، لكنه كان أكثر استقرارًا عند الرقم الهيدروجيني 7-9 ، وكان يحتوي على أعلى فعالية متبقية 100% عند درجة الحموضة 7 ومن ثم بدأ ثبات الإنزيم بالانخفاض إذ احتفظ الإنزيم بحوالي 75% من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 10، أما أعلى انخفاض في فعالية الإنزيم كان عند الرقم الهيدروجيني 5 pH إذ احتفظ الإنزيم بحوالي 40% من فعاليته، وهذا يعني أن إنزيم البايروفيت كابينيز M2 يمكنه تحمل الظروف الحمضية.

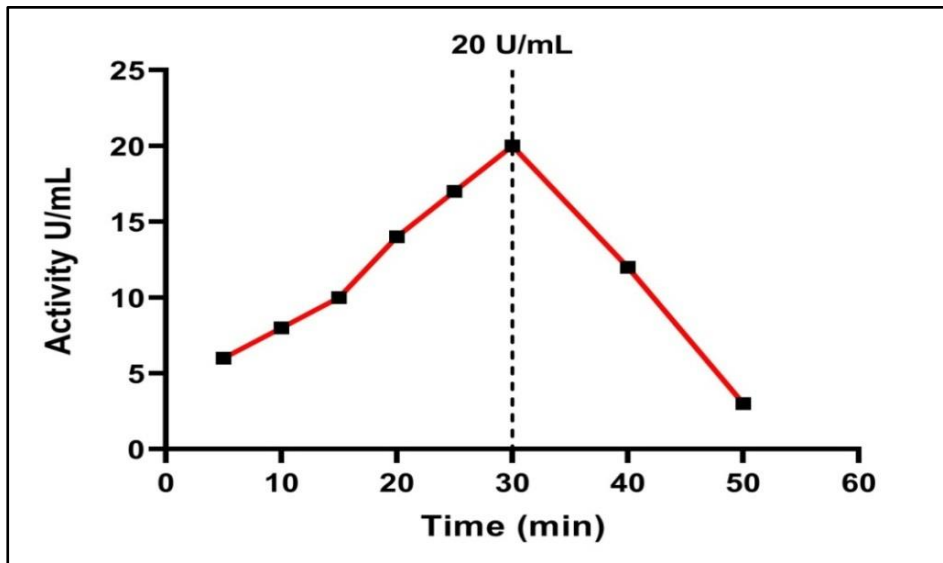
تكون الأحماض الأمينية في المواقع الفعالة للإنزيمات مشحونة وبحالات تأين مختلفة وهي مطلوبة لإكمال الوظائف المهمة للإنزيم فضلا عن ذلك المحافظة على بنية البروتين، تؤثر التغيرات في درجة الحموضة على الشحنة الكهربائية للمجموع الوظيفية للإنزيم مما يؤدي إلى تعديل بنيته إذ يتأثر تركيب جزيئة الإنزيم ويتغير تركيبه الثانوي والثلاثي وتغير الهيئة المتأينة للموقع الفعال وبالتالي يؤدي إلى مسخ الإنزيمات، مع احتمال تخضع الإنزيمات إلى مسخ لا عكسي في المحاليل شديدة الحمضية أو القاعدي [44,43].



الشكل 8: تأثير الدالة لحمضية على استقرار إنزيم PKM2 المنقى من مصلى مرضى سرطان الثدي

تأثير زمن التفاعل على فعالية إنزيم البايروفيت كابينز PKM2 M2

تم دراسة تأثير المدة الزمنية لحضن مزيج التفاعل على فعالية إنزيم بايروفيت كابينز PKM2 باستخدام تركيز 3mM من المادة الاساس PEP وبفترات زمنية (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50) دقيقة ، وبدرجة حرارة 37°C وعند الدالة الحامضية pH 7 باستخدام محلول الفوسفات المنظم 0.5mM، إذ تبين من النتائج حصول ارتفاع ملحوظ في فعالية الإنزيم المنقى مع زيادة مدة الحضن إذ لوحظ استقرار فعالية الإنزيم من المدة 5-15 min ثم تبدأ بالارتفاع إلى ان تصل لأعلى فعالية 20U/ml عند زمن التفاعل 30min، ثم تبدأ فعالية الإنزيم بالانخفاض بزيادة الزمن ، كما موضح بالشكل (9).

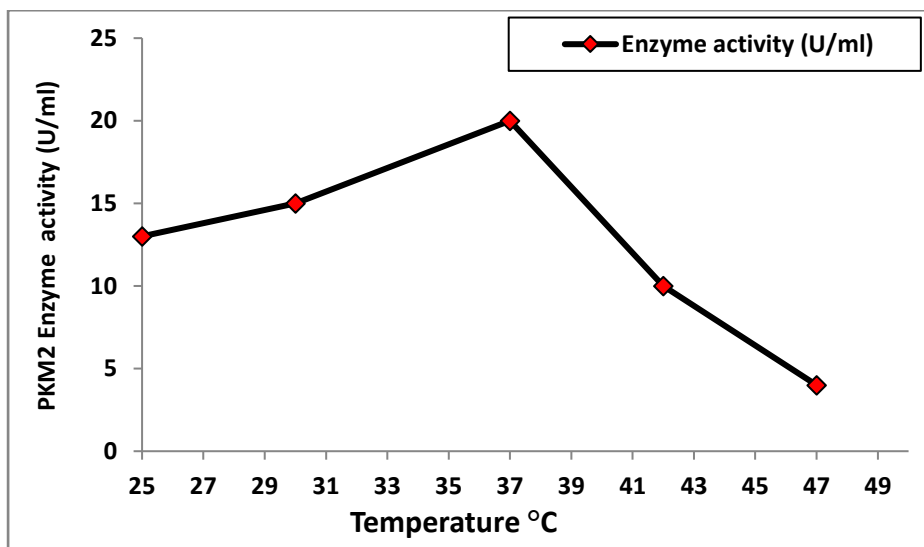


الشكل 9: تأثير الزمن على سرعة التفاعل لإنزيم PKM2 المنقى من مصلى مرضى سرطان الثدي

تأثير درجة الحرارة على فعالية إنزيم البايروفيت كابينز M2 (PKM2)

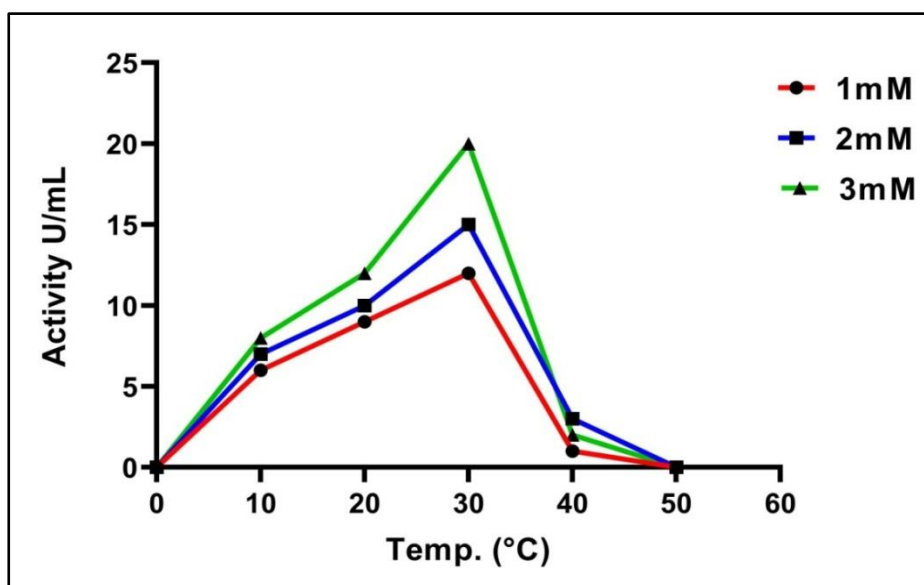
تعد درجة الحرارة عاملاً أساسياً يؤثر على فعالية الإنزيم، وكما موضح في الشكل (10) إنزيم البايروفيت كابينز M2 المنقى كان نشط على نطاق واسع في درجة الحرارة التي تراوحت من 25°C-49°C، واطهرت النتائج ازدياد فعالية إنزيم البايروفيت كابينز M2 بزيادة درجة الحرارة حتى تصل إلى درجة الحرارة المثلى إذ بلغت اقصاها عند درجة الحرارة 37°C فكانت الفعالية الإنزيمية عند هذه الدرجة 20U/ml، ثم بدأت بعدها بالانخفاض تدريجياً بزيادة درجة الحرارة لتصل عند درجة حرارة 47°C إلى 4U/ml. ان زيادة سرعة التفاعل الإنزيمي مع ارتفاع درجة الحرارة وإلى حد معين يعزى إلى زيادة التصادمات بين

جزيئات الإنزيم والمادة الاساس نتيجة زيادة الطاقة الحركية للجزيئات بفعل زيادة درجة الحرارة، بينما تسبب درجات الحرارة العالية انخفاضاً في فعالية الإنزيم بشدة بسبب ما يحدث للإنزيم من مسخ Denaturation نتيجة تأثير درجة الحرارة في تركيب الإنزيم وتغير هيئة الموقع الفعال مما يؤدي إلى فقدان فعاليته [45].



الشكل 10: تأثير درجة الحرارة على فعالية إنزيم PKM2 المنقى من مصلى مرضى سرطان الثدي

تأثير التغير في درجة الحرارة على فعالية إنزيم بايروفيت كابينيز M2 عند تراكيز مختلفة من المادة الاساس تم دراسة تأثير درجات الحرارة المختلفة وبوجود تراكيز مختلفة من المادة الاساس فوسفواينول بايروفيت PEP إذ تبين ان سرعة التفاعل الإنزيمي V_{max} تبلغ اقصاها عند الدرجة الحرارية $37^{\circ}C$ وتركيز $3mM$ التركيز الامثل للمادة الاساس PEP وكما موضح في الشكل (11)

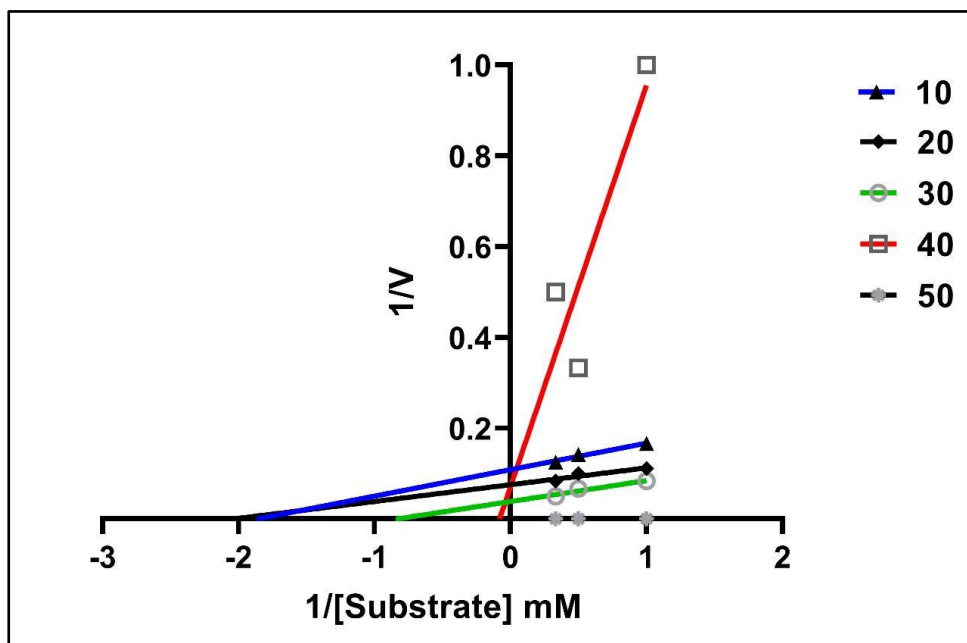


الشكل 11: تأثير درجة الحرارة على سرعة تفاعل إنزيم البايروفيت كابينيز M2 المنقى من مصلى مرضى سرطان الثدي عند تراكيز مختلفة من المادة الاساس PEP

ومن خلال رسم لينوفر-بيرك تم الحصول على قيم K_m و V_{max} عند درجات حرارية مختلفة كما مبينة في الجدول (4) والشكل (12)

الجدول 4: يبين قيم V_{max} و K_m لإنزيم البايروفيت كاينيز M2 المنقى من مصلى مرضى سرطان الثدي عند درجات حرارة مختلفة

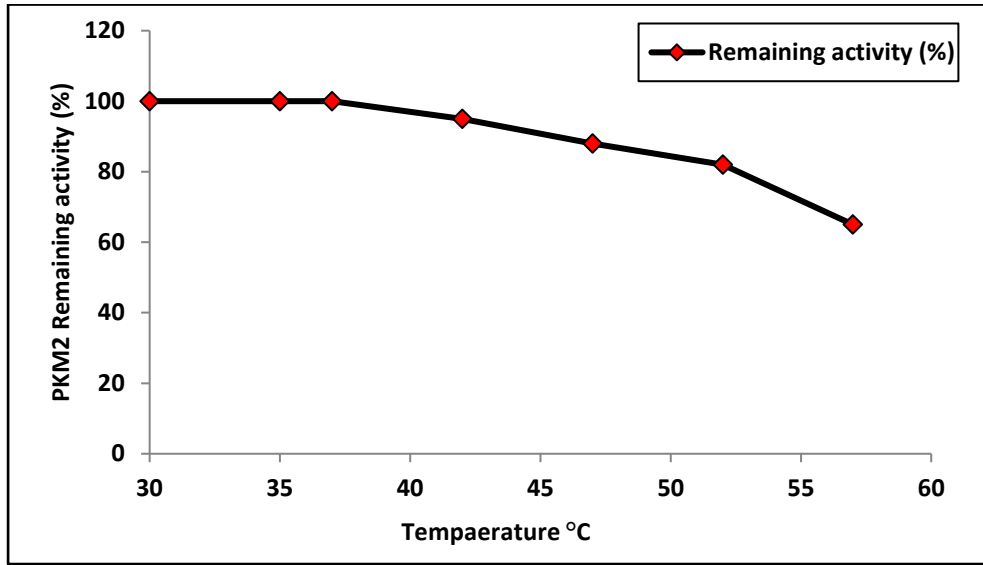
Temp. °C	10	20	30	40
V_{max}	9.19	13.25	19.04	14.14
K_m	0.536	0.490	1.163	4.046
Slop	$Y = 0.05837 * X + 0.1087$	$Y = 0.03703 * X + 0.07547$	$Y = 0.06111 * X + 0.05251$	$Y = 0.2861 * X + 0.07071$



الشكل 12: رسم لينوفر بيرك لتأثير الدالة درجات الحرارة المختلفة على فعالية إنزيم البايروفيت كاينيز M2 المنقى من مصلى مرضى سرطان الثدي عند تراكيز مختلفة من المادة الاساس PEP

تأثير درجة الحرارة على استقرار إنزيم البايروفيت كاينيز M2 PKM2

يمكن من خلال دراسة تأثير درجة الحرارة على استقرار الإنزيم معرفة المدى لدرجات الحرارة التي يكون فيها الإنزيم فعال ويحافظ على نشاطه، بينت نتائج حضان إنزيم البايروفيت كاينيز M2 بدرجات حرارة مختلفة ما بين 30-60°C ولمدة 30 دقيقة ومن ثم حساب الفعالية المتبقية بعد قياس فعالية الإنزيم، وكما موضح في الشكل (13) إنزيم البايروفيت كاينيز M2 كان مستقرا ويحافظ على فعاليته بنسبة 100% عند درجة الحرارة من 30-37°C، ثم بدأت الفعالية بعدها بالانخفاض التدريجي مع ارتفاع درجة الحرارة إذ احتفظ الإنزيم بحوالي 95% من فعاليته عند حوضه بدرجة 42°C، وبلغت الفعالية اوطأ مستوى لها إذ بلغت 65% من الفعالية المتبقية عند درجة الحرارة 57°C، يزداد معدل التفاعل في البداية مع ارتفاع درجة الحرارة بسبب زيادة الطاقة الحركية للجزيئات المتفاعلة وبالتالي بعد الوصول إلى درجة الحرارة المثلى يبدأ المعدل بالتقلص إلى ان تتجاوز الطاقة الحركية للإنزيم في نهاية الأمر حاجز الطاقة الخاص بتحطيم الروابط الهيدروجينية والكارهة للماء الضعيفة التي تحافظ على بنيته الثانوية والثالثية، إذ يبدأ الإنزيم بنقص النشاط التحفيزي نتيجة المسخ [45].



الشكل 13: تأثير درجة الحرارة على استقرار إنزيم PKM2 المنقى من مصلى مرضى سرطان الثدي.

الاستنتاجات:

نستنتج من الدراسة الحالية إن تنقية إنزيم البايروفيت كابينيز M2 من مرضى سرطان الثدي، باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني CM-Cellulose، كانت نتيجة الفعالية لإنزيم PKM2 17.5U/mL والفعالية النوعية كانت 145.8U/mg وتركيز البروتين 0.12mg/mL، أما مقدار الاسترجاع فبلغ 42% وعدد مرات التنقية كانت 3 مرة، وظهرت نتائج تنقية إنزيم البايروفيت كابينيز M2 لعمود الترشيح الهلامي Sephadex G-200 إلى ظهور حزمة بروتينية واحدة فقط ذات فعالية عالية لإنزيم البايروفيت كابينيز M2 المنقى وصلت إلى 20U/mL وكانت الفعالية النوعية 400U/mg وتركيز البروتين 0.05 mg/L، أما مقدار الاسترجاع فبلغ 40% وعدد مرات التنقية كانت 8 مرة، ونستنتج إن أقصى فعالية لإنزيم البايروفيت كابينيز M2 المنقى من امصال مرضى سرطان الثدي كانت 18U/ml وظهرت عند تركيز المادة الأساس 3mM، وكان الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنزيم 7 ودرجة الحرارة المثلى 37°C، وزمن التفاعل 30min وظهرت خواص حركية من قيمة السرعة القصوى وثابت ميكيلس كانت 22.3 Vmax و1.17 Km. ومن هذا يمكن ان نستنتج ان إنزيم PKM2 ممكن ان يعد علامة تشخيصية من جانب ومن جانب اخر هدف علاجي لمرض سرطان الثدي او ربما امراض سرطانية اخرى مما يجدر إلى اجراء المزيد من البحوث على هذا الإنزيم.

References

1. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin*, 71(3):209–249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
2. Ferlay, J., Laversanne, M., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., Bray, F. (2020). International Agency for Research on Cancer; Lyon, France: [accessed on 9 July 2021]. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Available online: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>.
3. Almouhanna, F., Blagojevic, B., Can, S., Ghanem, A., Wöfl, S. (2021). Pharmacological activation of pyruvate kinase M2 reprograms glycolysis leading to TXNIP depletion and AMPK activation in breast cancer cells. *Cancer Metab*, 22;9(1):5. doi: 10.1186/s40170-021-00239-8. PMID: 33482908; PMCID: PMC7821649.

4. Zhu, S., Guo, Y., Zhang, X., Liu, H., Yin, M., Chen, X., Peng, C. (2021). Pyruvate kinase M2 (PKM2) in cancer and cancer therapeutics. *Cancer Lett*,10;503:240-248. doi: 10.1016/j.canlet.2020.11.018. Epub 2020 Nov 24. PMID: 33246091.
5. Chen, X., Chen, S., Yu, D. (2020). Protein kinase function of pyruvate kinase M2 and cancer. *Cancer Cell Int*, 29;20(1):523. doi: 10.1186/s12935-020-01612-1. PMID: 33292198; PMCID: PMC7597019.
6. Guo, W., Zhang, Z., Li, G., Lai, X., Gu, R., Xu, W., Chen, H., Xing, Z., Chen, L., Qian, J., Xu, S., Zeng, F., Deng, F.(2020). Pyruvate Kinase M2 Promotes Prostate Cancer Metastasis Through Regulating ERK1/2-COX-2 Signaling. *Front Oncol*, 29;10:544288. doi: 10.3389/fonc.2020.544288. PMID: 33117682; PMCID: PMC7550821.
7. Liu, B., Song, M., Qin, H., Zhang, B., Liu, Y., Sun, Y., Ma, Y., Shi, T.(2020). Phosphoribosyl Pyrophosphate Amidotransferase Promotes the Progression of Thyroid Cancer via Regulating Pyruvate Kinase M2. *Oncotargets Ther*, 3;13:7629-7639. doi: 10.2147/OTT.S253137. PMID: 32801776; PMCID: PMC7413720.
8. Yu, M., Chen, S., Hong, W., Gu, Y., Huang, B., Lin, Y., Zhou, Y., Jin, H., Deng, Y., Tu, L., Hou, B., Jian, Z.(2019). Prognostic role of glycolysis for cancer outcome: evidence from 86 studies. *J Cancer Res Clin Oncol*, 145(4):967-999. doi: 10.1007/s00432-019-02847-w. Epub 2019 Mar 1. PMID: 30825027.
9. Clower, CV., Chatterjee, D., Wang, Z., Cantley, LC., Vander Heiden, MG., Krainer, AR. (2010). The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2;107(5):1894-9. doi: 10.1073/pnas.0914845107. Epub 2010 Jan 19. PMID: 20133837; PMCID: PMC2838216.
10. Liang, J., Cao, R., Wang, X., Zhang, Y., Wang, P., Gao, H., Li, C., Yang, F., Zeng, R., Wei, P., Li, D., Li, W., Yang, W.(2017). Mitochondrial PKM2 regulates oxidative stress-induced apoptosis by stabilizing Bcl2. *Cell Res*, 27(3):329-351. doi: 10.1038/cr.2016.159. Epub 2016 Dec 30. PMID: 28035139; PMCID: PMC5339831.
11. Amin, S., Yang, P., Li, Z.(2019).Pyruvate kinase M2: A multifarious enzyme in non-canonical localization to promote cancer progression. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1871(2):331-341. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.02.003. Epub 2019 Feb 28. PMID: 30826427.
12. Zahra, K., Dey, T., Ashish, Mishra, SP., Pandey, U.(2020). Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Front Oncol*, 2;10:159. doi: 10.3389/fonc.2020.00159. PMID: 32195169; PMCID: PMC7061896.
13. Suzuki, A., Puri, S., Leland, P., Puri, A., Moudgil, T., Fox, BA., Puri, RK., Joshi BH. (2019). Subcellular compartmentalization of PKM2 identifies anti-PKM2 therapy response in vitro and in vivo mouse model of human non-small-cell lung cancer. *PLoS One*, 23;14(5):e0217131. doi: 10.1371/journal.pone.0217131. PMID: 31120964; PMCID: PMC6532891.
14. Sun, X., Wang, M., Wang, M., Yu, X., Guo, J., Sun, T., Li, X., Yao L., Dong, H., Xu, Y. (2020). Metabolic Reprogramming in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol*, 31;10:428. doi: 10.3389/fonc.2020.00428. PMID: 32296646; PMCID: PMC7136496.

15. Vander Heiden, MG., Christofk, HR., Schuman, E., Subtelny, AO., Sharfi, H., Harlow, EE., Xian, J., Cantley, LC.(2010). Identification of small molecule inhibitors of pyruvate kinase M2. *Biochem Pharmacol*, 15;79(8):1118-24. doi: 10.1016/j.bcp.2009.12.003. Epub 2009 Dec 11. PMID: 20005212; PMCID: PMC2823991.
16. Dawson, RMC., Elliott, DC., Elliott, WH., Jones, KM.(1969). *Data for Biochemical Research*, 2nd edn. 1969.London: Oxford University Press.
17. Richard, NH.(1975). Purification and Characterization of Human M1 and M2-Pyruvate Kinase Isoenzymes, Athesis. Oregon University,Medical School, P 111-113.
18. Gui, DY., Lewis, CA., Vander Heiden, MG.(2013). Allosteric regulation of PKM2 allows cellular adaptation to different physiological states. *Sci Signal*, 19;6(263):pe7. doi: 10.1126/scisignal.2003925. PMID: 23423437
19. Bradford, MM.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*,7;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999. PMID: 942051.
20. Berk, Z.(2009). Reaction Kinetics, Chapter 4, Kinetics of Biological Processes, Enzyme-catalyzed reaction , *Food Science and Technology*, 115-127. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373660-4.00004-1>
21. Liu, S.(2017). Bioprocess Engineering (Second Edition), Chapter 7 – Enzymes, Specific Activity. Kinetics, Sustainability, and Reactor Design,297-373 <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63783-3.00007-1>.
22. Bowman, L., Motamed, R., Lee, P., Aleem, K., Berawala, AS., Hayden, KL., Bzik, DJ., Chattopadhyay, D.(2020). A simple and reliable method for determination of optimum pH in coupled enzyme assays. *Biotechniques*, 68(4):200-203. doi: 10.2144/btn-2019-0126. Epub 2020 Feb 14. PMID: 32056453.
23. Harvey, RA., Ferrier, DR.(2011). Biochemistry (Lippincott's Illustrated Review) Fifth Edition, Enzyme. Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wilkins. 2011 ;57-58.http://www.ifect.org/files/Richard_A._Harvey,_Denise_R._Ferrier-_Biochemistry.pdf
24. Whitaker, J R.(1972). Principles of enzymology for the Food Science (ed. Oen, R. F.). Marcel Dekker INC. New York, 1972;44(7): 648.
25. Clive, D.(2002). A guide protocol to protein isolation. Kluwer Academic Publisher, Newyork, 2002;3:13-19.
26. Wingfield, P.(2001). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Curr Protoc Protein Sci*. Appendix 3:Appendix 3F. doi: 10.1002/0471140864.psa03fs13. PMID: 18429073; PMCID: PMC4817497.
27. Feba, G., Nishad, VM., Prasobh, G R. (2023). ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY. *Indo Am. J. P. Sci*, 10 (05): 555-565. doi.org/10.5281/zenodo.8016288.

28. Yilmaz, S., Temüzer, SO., Hanifi, ÜÖ.(2004). Purification and Characterization of Pyruvate Kinase from Normal and Tumor Breast Tissues. *Turk J Vet Anim Sci*, 28(6):1087-1096.
29. Harkins, RN.(1975). The purification and characterization of human M1and M2-pyruvate kinase Isoenzymes. A thesis presented of the University of Oregon Medical School.
30. Mellati, AA., Yücel, M., Altınörs, N., Gündüz, U.(1993). Purification and characterization of human meningioma M2-type pyruvate kinase. *Clin Biochem*, 26(5):383-8. doi: 10.1016/0009-9120(93)90114-1. PMID: 8299208.
31. Schering, B., Eigenbrodt, E., Linder, D., Schoner, W.(1982). Purification and properties of pyruvate kinase type M2 from rat lung. *Biochim Biophys Acta*, 6;717(2):337-47. doi: 10.1016/0304-4165(82)90188-x. PMID: 7115773.
32. Harkins, RN., Black, JA., Rittenberg, MB.(1977). M2 isozyme of pyruvate kinase from human kidney as the product of a separate gene: its purification and characterization. *Biochemistry*, 16(17): 3831–3837. <https://doi.org/10.1021/bi00636a018>
33. Ball, DW., Hill, JW., Scott, RJ.(2023). The Basics of General, Organic, and Biological Chemistry. 18:Amino Acid, Proteins, and Enzymes, 18.7: Enzyme Activity. LibreTexts libraries are Powered by NICE CXOne and are supported by the Department of Education Open Textbook Pilot Project, the UC Davis Office of the Provost, the UC Davis Library, 2023:1-2.
34. Murray, RK., Bender, DA., Botham, KM., Kennelly, PJ., Rodwell, VW.(2009). Harper's Illustrated Biochemistry. 28 ed. The McGraw-Hill Companies, Chapter 8, 2009.
35. Guan, M., Tong Y., Liu, X., Dong, D., Zhou, Y.(2017). Enzyme Kinetic Assay to Measure the Activity of Tumor M2 Pyruvate Kinase in Breast Cancer Patients. *Ann Clin Lab Sci*, 47(6):676-686. PMID: 29263041.
36. Robyte, JF., White, BJ.(1987) Biochemical technique: theory and practice. Inc. Belmont, California, USA.1987: 88-95.
37. Bhunia, B., Dutta, D., Chaudhuri, S.(2011) Extracellular alkaline protease from *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: improving enzyme activity assay and characterization. *Eng. Life Sci.* 11(2): 207–215.doi.org/10.1002/elsc.201000020.
38. Grouneva, I., Jakob, T., Wilhelm, C., Goss, R.(2006). Influence of ascorbate and pH on the activity of the diatom xanthophyll cycle-enzyme diadinoxanthin de-epoxidase. *Physiol. Plant*, 126(2): 205–211. doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00613.
39. Cronk, JD., Endrizzi, JA., Cronk, MR., O'neill ,JW., Zhang, KY.(2001). Crystal structure of *E. coli* beta-carbonic anhydrase, an enzyme with an unusual pH-dependent activity. *Protein Sci*,10(5):911-22. doi: 10.1110/ps.46301. PMID: 11316870; PMCID: PMC2374203.
40. Bisswanger, H.(2014). Enzyme assays. *Perspect. Sci*, 1(1–6):41–55. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>.

41. Mohamed Ahmed, IA., Babiker, EE., Mori, N.(2010). pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. *LWT-Food Sci. Technol*, 43(5): 759–764. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.011>.
42. Nandi, S., Razzaghi, M., Srivastava, D., Dey, M.(2020). Structural basis for allosteric regulation of pyruvate kinase M2 by phosphorylation and acetylation. *J Biol Chem*, 18;295(51):17425-17440. doi: 10.1074/jbc.RA120.015800. PMID: 33453989; PMCID: PMC7762928.
43. Segal, J., J.(1976). Biochemical calculation edition. John Wiley and Sons. Newyork.
44. Sawheney, S., K.(2008). Introductory partical biochemistry, Narosa Publishing House, Mumbari. Pp. 362.
45. Robinson ,PK.(2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Bioche*,59:1-41. doi: 10.1042/bse0590001. Erratum in: *Essays Biochem*. 2015;59:75. PMID: 26504249; PMCID: PMC4692135.

Study of some kinetic characteristics of the enzyme pyruvate kinase M2 (PKM2) purified from the sera of breast cancer patients

Methaq Nazhan Mahmood^{1*}, Asmaa Hashim Shaker², Atallah Burjes Dakheel²

1- Department of Applied Chemistry, College of Applied Science, University of Samarra, Iraq

2- Department of Chemistry, Faculty of Education for Women, University of Tikrit, Iraq

Article Information

Received: 30/12/2023

Revised: 15/02/2024

Accepted: 20/02/2024

Published: 30/12/2024

Keywords:

Breast cancer, PKM2 enzyme, enzyme purification

Corresponding Author

E-mail:

Charter61@uosamarra.edu.iq

Mobile:

Abstract

Pyruvate Kinase M2 was purified through precipitating serum protein from breast cancer patients using 65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ion exchange chromatography was used CM-Cellulose to purify the enzyme pyruvate kinase M2, one protein peak was obtained from the washing step and another peak after recovery elution the results indicated that the enzyme activity 17.5U/mL, specific activity 145.8U/mg, protein concentration 0.12mg/mL, yield 42% and the number of purification times 3 time. Purification results indicated pyruvate kinase M2 enzyme for gel filtration column Sephadex G-200 to the emergence of only one protein band with high activity for the enzyme pyruvate kinase M2 the purifier has arrived 20U/mL and that specific activity 400U/mg, concentration protein 0.05 mg/L, yield 40%, and number times purification was 8 time. The optimal conditions were studied for the enzyme pyruvate kinase M2 purified from the sera of breast cancer patients through the use of several concentrations of substrate phosphoenol pyruvate EPE, several valuable different from pH, and different temperatures. The results record values that were optimum concentration of the substrate 3mM, pH7, optimal temperature 37°C, and reaction time 30min. The stability of the PKM2 enzyme was also evaluated at different acid values and different temperatures. The enzyme PKM2 was more stable when the number pH was 7-9, and the enzyme recorded a remaining activity at a stable rate of 80-100%. It was stable and maintained its activity 100% at the temperature of 30-37°C, and the enzyme recorded a remaining activity at a stable rate 28-100% up to temperature 52°C. As V_{max} and Michaelis constant K_m were accounted for for enzyme PKM2 purified from the sera of breast cancer patients, via the application of the relationship Lineweaver-Burke plot, it was found that V_{max} was 20.5 and k_m 0.66.