

УДК 577.156:577.15.072

И. Л. Вовчук, канд. биол. наук, доц., **С. А. Петров**, д-р биол. наук, проф.
Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
кафедра биохимии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина.
Тел: (0482)687875, e-mail: irvov@mail.ru

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А ЯИЧНИКА ЖЕНЩИН НЕКОТОРЫМИ ИНГИБИТОРАМИ И АКТИВАТОРАМИ

Установлено, что ингибирование карбоксипептидазы А (КА) фенилаланином – ингибитором КА – происходит по смешанному типу. Анализ соответствующих констант ингибирования показал, что максимальная степень ингибирования наблюдается для КА из злокачественной ткани, а наименьшая – для фермента из доброкачественной опухоли. Исследование влияния ингибиторов и активаторов показало, что в катализе принимают участие не только гидроксильные группы серина активного центра КА, но и карбоксильная группа глутаминовой кислоты, а также тиоловая группа цистеина.

Ключевые слова: карбоксипептидаза А, опухоль, яичник.

Согласно данным литературы карбоксипептидазы, в отличие от других протеаз, нельзя четко разделить на тиоловые, сериновые, металлсодержащие и карбоксильные [1, 2]. Почти все карбоксильные карбоксипептидазы являются SH-зависимыми и в некоторых случаях – сериновыми. В то же время щелочные ферменты содержат металл и в некоторых случаях представляют собой SH-зависимые белки. Классические карбоксипептидазы А и В содержат в активном центре цинк, а SH-группы являются его лигандами [3].

Указанные ферменты осуществляют катализ посредством ограниченного числа различных функциональных групп: карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот (ω -COOH) и C-концевых остатков аминокислот (α -COOH); аминогрупп лизина (ϵ -NH₂) и N-концевых остатков аминокислот (α -NH₂); гуанидиновых групп аргинина; индольных групп триптофана; имидазольных групп гистидина; гидроксильных группы серина и треонина; фенольных групп тирозина; сульфгидрильных (тиоловых) групп цистеина; дисульфидных групп цистина; тиоэфирных групп метионина; алифатических цепей других аминокислот и ароматического кольца фенилаланина [4].

Несмотря на то, что гомогенный препарат карбоксипептидазы А был получен из некоторых органов и тканей человека: легких [5], поджелудочной железы [6], плаценты [7], почек [8], семенной жидкости [9], культуры клеток карциномы легких [10] биохимические свойства выделенных ферментов не были всесторонне изучены.

Цель данного исследования состояла в изучении влияния активаторов и ингибиторов на активность карбоксипептидазы А, полученной из немалигнизированной и опухолевых тканей яичника.

Материалы и методы

Исследования проводили с препаратами карбоксипептидаз А, полученными из немалигнизированной и опухолевых тканей яичника. Гомогенность выде-

ленных ферментов была подтверждена методом электрофореза в системе SDS. Влияние ингибиторов и активаторов на активность фермента исследовали, предincuбируя равные объемы: 0,1 мл реагента и 0,1 мл фермента (концентрация белка – 20 мкг в 0,1 мл) в течение 1 часа при 37°C. Конечные концентрации реагентов в пробе составляли: 2-меркаптоэтанола – 4,27, 8,54 и 12,81 мМ; ПХМБ – 0,17 и 0,33 мМ); тритона X-100 – 8,33 и 16,7 мкг/мл; ингибитора трипсина из сои – 0,017 и 0,034 мкг /мл; лейпептина – 0,017 и 0,034 мкг/мл; пепстатина – 0,017 и 0,034 мкг/мл; ФМСФ – 0,17 и 0,34 мМ; ЭДТА – 0,085, 0,17 и 0,34 мМ; 1,10-фенантролина – 0,17, 0,34 и 0,67 мМ; метиленовой сини – 0,17 мМ; цистеина – 0,008 и 0,017 мМ; дитиотреитола – 0,17 и 0,34 мМ; уксусно-кислого цинка – 0,08, 0,17 и 0,34 мМ и добавки аминокислот – гистидина, триптофана и тирозина до 0,17 мМ в пробе. Соответствующие количества ингибиторов растворяли в 0,2 М уксусно-ацетатном буфере pH 5,2, а ПХМБ – в минимальном количестве 10%-ного метилцеллюлозья. Активность определяли по гидролизу 2,0 мМ карбобензоксиглутамилфенилаланина за 30 мин инкубации при 37°C. Ингибирование и активирование выражали в процентах по отношению к активности пробы без добавления ингибиторов или активаторов.

Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата (карбобензоксиглутамилфенилаланина) и кинетику торможения ферментативной реакции фенилаланином анализировали в координатах Лайнуивера-Берка [4].

Статистическую обработку результатов проводили по общепринятой схеме с использованием методов вариационного анализа [11].

Результаты и их обсуждение

Для выяснения характера ингибирования карбоксипептидазы А немалигнизированной и опухолевых тканей яичника L-фенилаланином были приняты кинетические исследования данного процесса (рис. 1, 2, 3). Характер пересечения кинетических прямых свидетельствует о том, что фенилаланин характеризуется смешанным типом ингибирования для карбоксипептидазы А как немалигнизированной, так и опухолевых тканей яичника. Анализ соответствующих констант ингибирования показал, что максимальная степень ингибирования наблюдается для карбоксипептидазы А злокачественной ткани яичника ($K_i = 0,97$ мМ), а наименьшая – для фермента ткани доброкачественной опухоли яичника ($K_i = 4,35$ мМ). Характер ингибирования свидетельствует о том, что фенилаланин может реагировать как со свободным ферментом в разных точках его белковой молекулы, так и с фермент-субстратным комплексом на разных стадиях превращения этого комплекса. Следует отметить, что данный тип ингибирования, по мнению некоторых авторов [4], является достаточно распространенным.

Для качественного определения функционально-активных группировок, участвующих в биокатализе, был проведен ингибиторный анализ с применением специфических ингибиторов.

Как показали исследования, детергент Тритон X-100 практически не влиял на активность пептидазы, выделенной из немалигнизированной ткани и незначительно снижал активность препаратов фермента опухолевых тканей (рис. 4, 5, 6).

Активность карбоксипептидазы А, выделенной из немалигнизированного яичника (рис. 4), в большей степени снижалась под действием синтетическо-

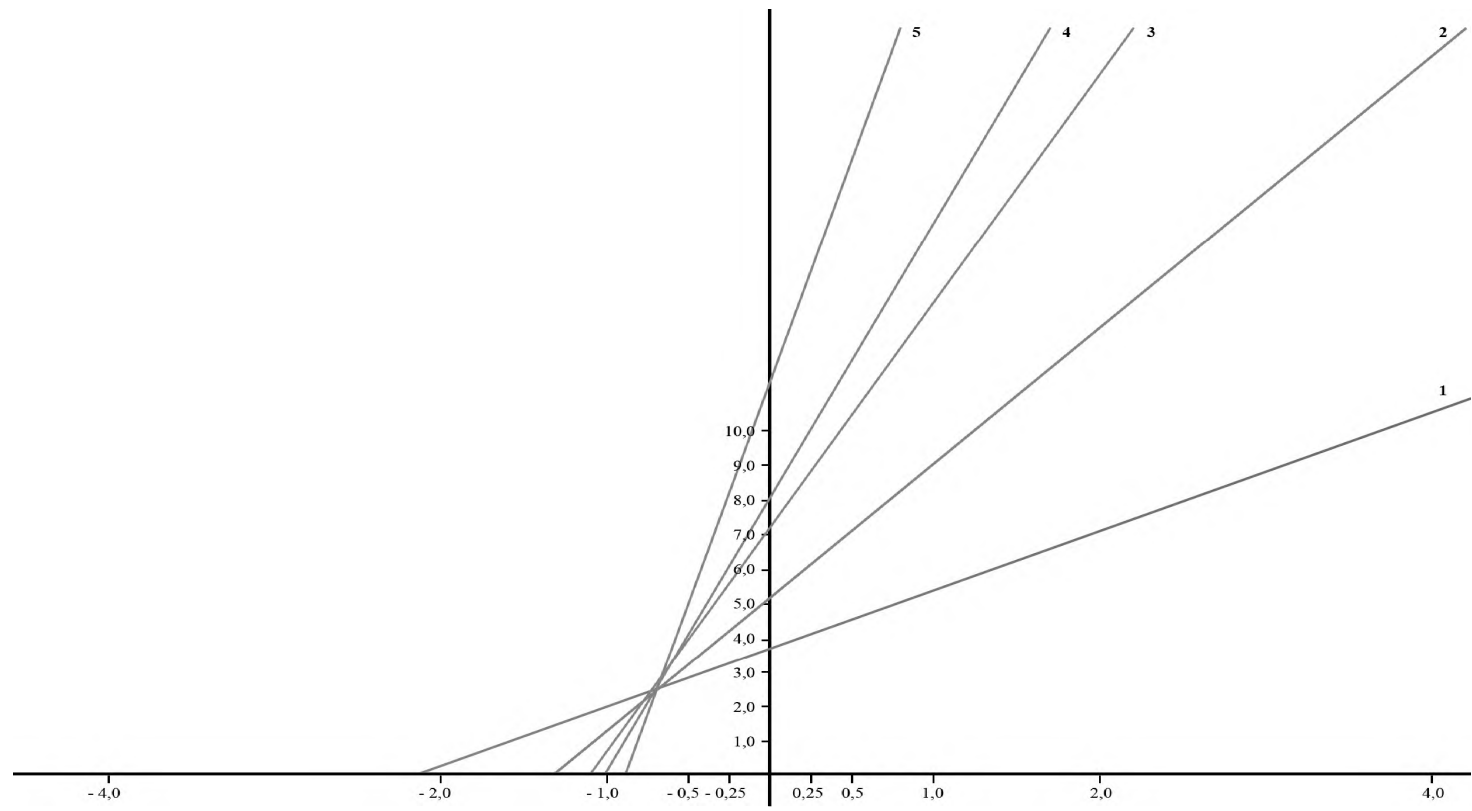


Рис. 1. Тип ингибирования карбоксипептидазы А немалигнизированного яичника фенилаланином (по Лайнуверу-Берку).
Примечания: 1 – активность фермента без ингибитора. Концентрации фенилаланина: 2 – 0,25 мМ; 3 – 0,5 мМ; 4 – 1,0 мМ;
5 – 2,0 мМ

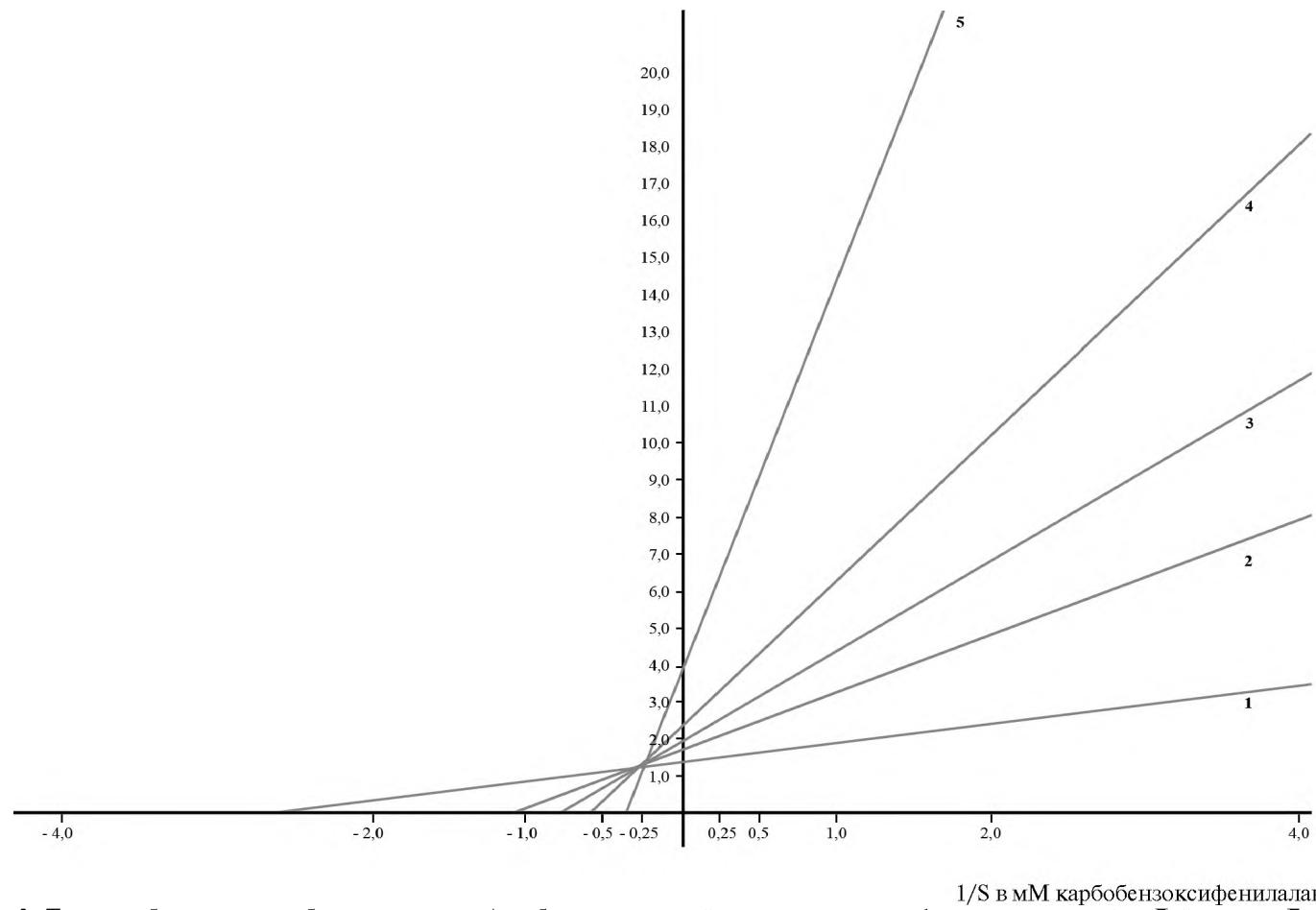


Рис. 2. Тип ингибирования карбоксипептидазы А доброкачественной опухоли яичника фенилаланином (по Лайнуверу-Берку).
Примечания: 1 - активность фермента без ингибитора. Концентрации фенилаланина: 2 - 0,25 мМ; 3 - 0,5 мМ; 4 - 1,0 мМ; 5 - 2,0 мМ

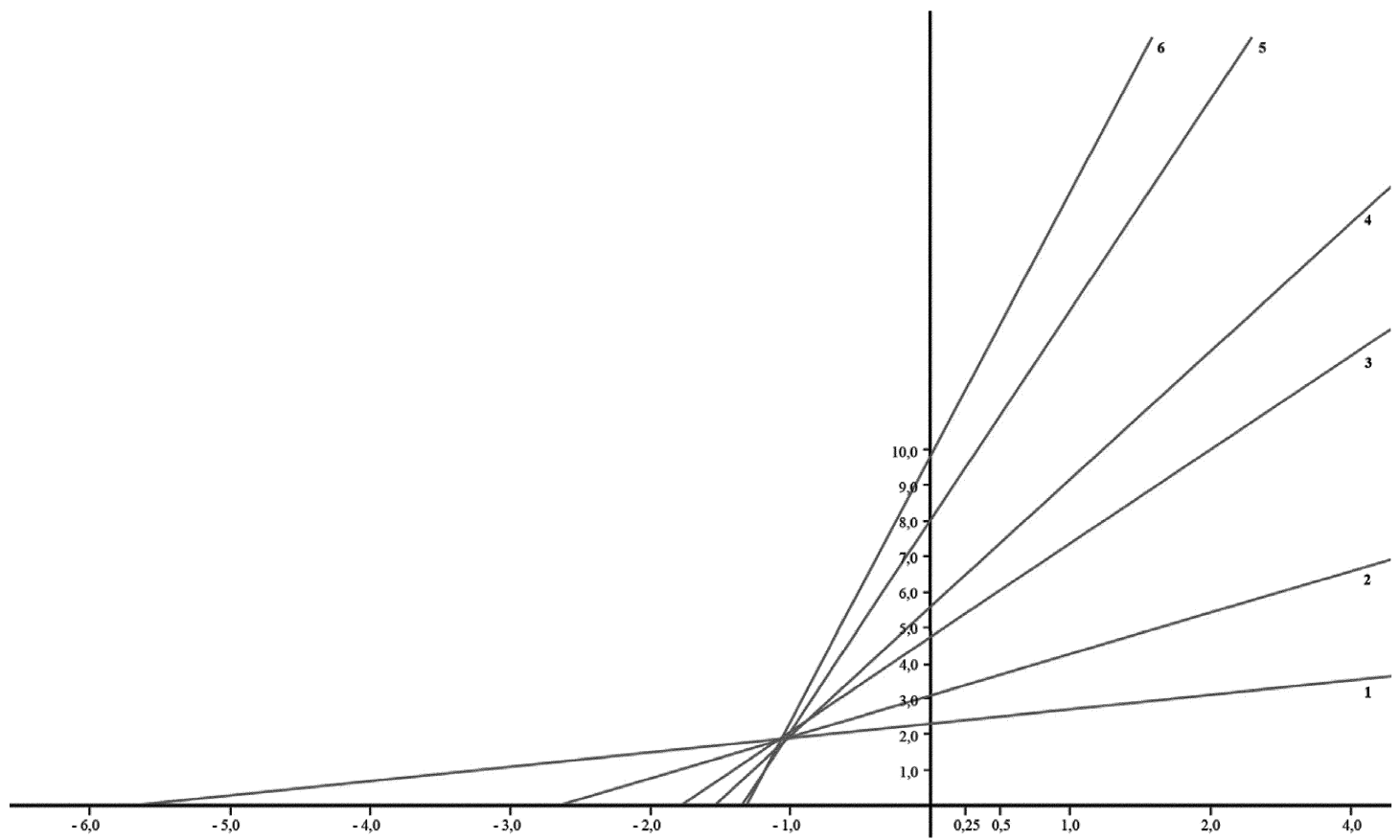


Рис. 3. Тип ингибирования карбоксипептидазы А злокачественной опухоли яичника фенилаланином (по Лайнуверу-Берку).
Примечания: 1 – активность фермента без ингибитора. Концентрации фенилаланина: 2 – 0,25 мМ; 3 – 0,5 мМ; 4 – 1,0 мМ; 5 – 2,0 мМ;
6 – 4,0 мМ

го ингибитора сериновых протеиназ – ФМСФ, менее – под действием пепстатина – ингибитора аспартильных протеаз и незначительно – при добавлении ПХМБ (на 50,0; 72,2 и 20,0%, соответственно). В то же время прединкубация с дитиотреитолом и в большей степени с цистеином приводила к повышению активности фермента на 23,0 и 61,3%, соответственно (рис. 7 а).

Полученные результаты позволяют предположить, что в каталитической функции карбоксипептидазы А немалигнизированного яичника принимают участие гидроксильная группа серина и карбоксильная группа, вероятно, глутаминовой кислоты. Немаловажное значение в обеспечении каталитической функции этого фермента также могут иметь тиоловые группы. По всей видимости карбоксипептидаза А немалигнизированного яичника представляет собой сериновую карбоксипептидазу, как и многие карбоксипептидазы животного происхождения [1, 2, 3].

В отличие от карбоксипептидазы А немалигнизированного яичника, мало чувствительной к действию ингибитора трипсина из сои, активность карбоксипептидазы А опухолевых тканей на 20–40% подавлялась этим ингибитором (рис. 5, 6). Карбоксипептидаза А злокачественной опухоли, в отличие от других исследованных пептидаз, была более чувствительна также к действию лейпептина – ингибитора как цистеиновых, так и сериновых ферментов и пепстатина – ингибитора аспартильных ферментов. В отличие от фермента немалигнизированного яичника и фермента доброкачественной опухоли, активность карбоксипептидазы А злокачественной опухоли не подавлялась ФМСФ в концентрации 0,017 мкг/мл и незначительно подавлялась возрастающей концентрацией этого синтетического ингибитора. Фотоокисление гистидина метиленовой синью приводило к ингибированию ферментативной активности, более выраженному в случае пептидазы немалигнизированного яичника, что предполагает участие данной аминокислоты в акте катализа (рис. 4–6). В тоже время, прединкубация фермента с гистидином приводила к значительному снижению (на 76%) активности карбоксипептидазы А немалигнизированного яичника и наоборот – к увеличению (на 53%) активности пептидазы доброкачественной опухоли (рис. 4, 5).

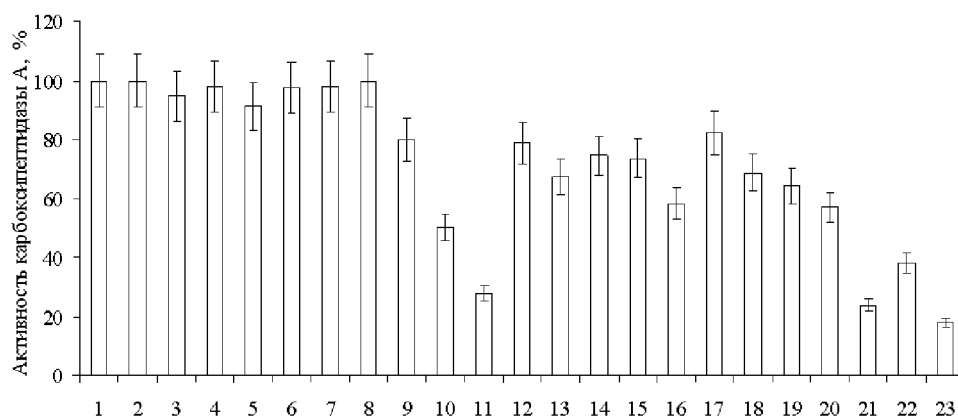


Рис. 4. Влияние ингибиторов на активность карбоксипептидазы А немалигнизированного яичника ($M \pm m$, $n = 4$)

Примечание: 1 – контроль; 2 – Тритон X-100 8,33 мкг; 3 – Тритон X-100 16,7 мкг; 4 – Ингибитор трипсина из сои 0,017 мкг; 5 – Ингибитор трипсина из сои 0,034 мкг; 6 – Лейпептин 0,017 мкг; 7 – Лейпептин 0,034 мкг; 8 – Пепстатин 0,017 мкг; 9 – Пепстатин 0,034 мкг; 10 – ФМСФ 0,17 мМ; 11 – ФМСФ 0,34 мМ; 12 – ПХМБ 0,17 мМ; 13 – ПХМБ 0,34 мМ; 14 – ЭДТА 0,085 мМ; 15 – ЭДТА 0,17 мМ; 16 – ЭДТА 0,34 мМ; 17 – 1,10 – фенантролин 0,17 мМ; 18 – 1,10 – фенантролин 0,34 мМ; 19 – 1,10 – фенантролин 0,68 мМ; 20 – метиленовая синь 0,17 мМ; 21 – гистидин 0,17 мМ; 22 – триптофан 0,17 мМ; 23 – тирозин 0,17 мМ.

Остаточная активность фермента представлена в % по отношению к показаниям контроля, принятым за 100%.

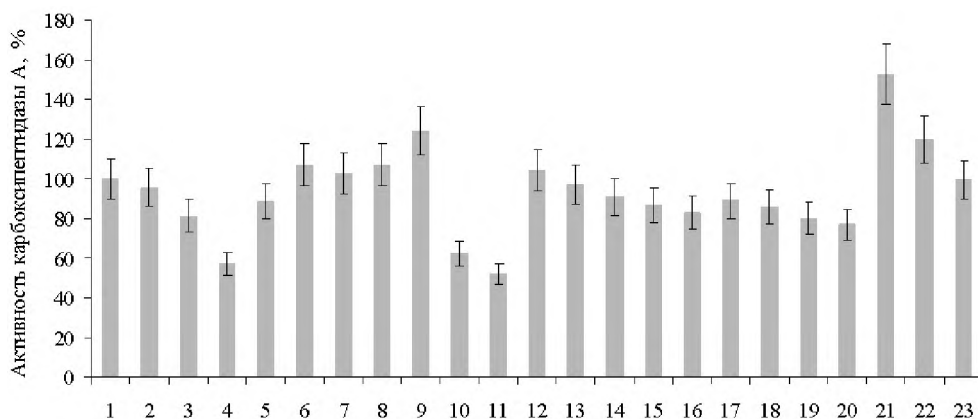


Рис. 5. Влияние ингибиторов на активность карбоксипептидазы А доброкачественной опухоли яичника ($M \pm m$, $n = 4$)

Примечание: 1 – контроль; 2 – Тритон X-100 8,33 мкг; 3 – Тритон X-100 16,7 мкг; 4 – Ингибитор трипсина из сои 0,017 мкг; 5 – Ингибитор трипсина из сои 0,034 мкг; 6 – Лейпептин 0,017 мкг; 7 – Лейпептин 0,034 мкг; 8 – Пепстатин 0,017 мкг; 9 – Пепстатин 0,034 мкг; 10 – ФМСФ 0,17 мМ; 11 – ФМСФ 0,34 мМ; 12 – ПХМБ 0,17 мМ; 13 – ПХМБ 0,34 мМ; 14 – ЭДТА 0,085 мМ; 15 – ЭДТА 0,17 мМ; 16 – ЭДТА 0,34 мМ; 17 – 1,10 – фенантролин 0,17 мМ; 18 – 1,10 – фенантролин 0,34 мМ; 19 – 1,10 – фенантролин 0,68 мМ; 20 – метиленовая синь 0,17 мМ; 21 – гистидин 0,17 мМ; 22 – триптофан 0,17 мМ; 23 – тирозин 0,17 мМ.

Остаточная активность фермента представлена в % по отношению к показаниям контроля, принятым за 100%.

Известно, что активность многих ферментов угнетается аминокислотами, которые являются аналогами субстратов или продуктами реакции [12]. Ароматические аминокислоты триптофан и в большей степени тирозин снижали активность карбоксипептидазы А немалигнизированного яичника и злокачественной опухоли и не влияли на активность фермента доброкачественной опухоли (рис. 4–6).

Также как и в случае пептидазы немалигнизированного яичника, активность карбоксипептидазы А доброкачественной и злокачественной опухолей увеличилась в присутствии цистеина и дитиотреитола (рис. 5, 6).

Возрастающие концентрации ионов цинка (рис. 7 а, б, в) на 14,7–29,1% снижали активность фермента немалигнизированного яичника и злокачественной опухоли и в меньшей степени влияли на активность карбоксипептидазы А, выделенной из ткани доброкачественной опухоли яичника.

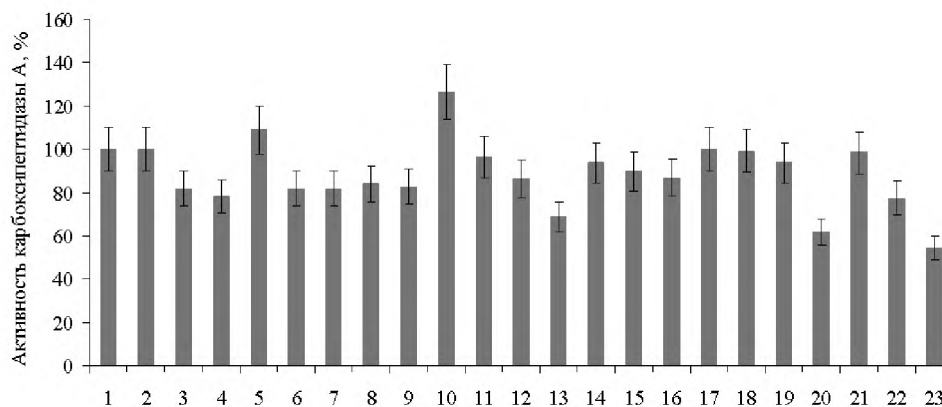


Рис. 6. Влияние ингибиторов на активность карбоксипептидазы А злокачественной опухоли яичника ($M \pm m$, $n = 4$)

Примечание: 1 - контроль; 2 - Тритон X-100 8,33 мкг; 3 - Тритон X-100 16,7 мкг; 4 - Ингибитор трипсина из сои 0,017 мкг; 5 - Ингибитор трипсина из сои 0,034 мкг; 6 - Лейпептин 0,017 мкг; 7 - Лейпептин 0,034 мкг; 8 - Пепстатин 0,017 мкг; 9 - Пепстатин 0,034 мкг; 10 - ФМСФ 0,17 мМ; 11 - ФМСФ 0,34 мМ; 12 - ПХМБ 0,17 мМ; 13 - ПХМБ 0,34 мМ; 14 - ЭДТА 0,085 мМ; 15 - ЭДТА 0,17 мМ; 16 - ЭДТА 0,34 мМ; 17 - 1,10 - фенантролин 0,17 мМ; 18 - 1,10 - фенантролин 0,34 мМ; 19 - 1,10 - фенантролин 0,68 мМ; 20 - метиленовая синь 0,17 мМ; 21 - гистидин 0,17 мМ; 22 - триптофан 0,17 мМ; 23 - тирозин 0,17 мМ.

Остаточная активность фермента представлена в % по отношению к показаниям контроля, принятым за 100%.

Добавление редуцирующего реагента 2-меркаптоэтанола, вне зависимости от концентрации, приводило к полному подавлению ферментативной активности ферментов как немалигнизированной, так и опухолевых тканей, что может свидетельствовать об участии SH-групп в каталитической функции этих ферментов, т.к. тиоловые группы способны образовывать с 2-меркаптоэтанолом смешанные дисульфиды.

Следует отметить, что процесс усиления малигнизации характеризуется снижением чувствительности препаратов фермента к действию хелатных реагентов: ЭДТА и 1,10-фенантролина, что может свидетельствовать о том, что в молекулах ферментов из опухолевых тканей металл расположен либо в глубине белковой молекулы, либо экранирован другими частями молекулы, что делает его менее доступным для действия хелатного реагента (рис. 4, 5, 6). В то же время карбоксипептидаза А немалигнизированного яичника более чувствительна к действию ЭДТА, что предполагает менее глубокое расположение металла в молекуле белка (рис. 4).

Следует отметить, что в каталитической активности карбоксипептидазы А немалигнизированного яичника и особенно опухолевых тканей определенную роль могут играть тиоловые группы. На это обстоятельство указывают результаты активирующего действия дитиотреитола на активность данной пептидазы. С другой стороны, эти реакции во многом могут быть неспецифичными и наиболее выражены для карбоксипептидазы А доброкачественной опухоли, так как ингибирующее действие ПХМБ на пептидазу этой опухоли было незначительным.

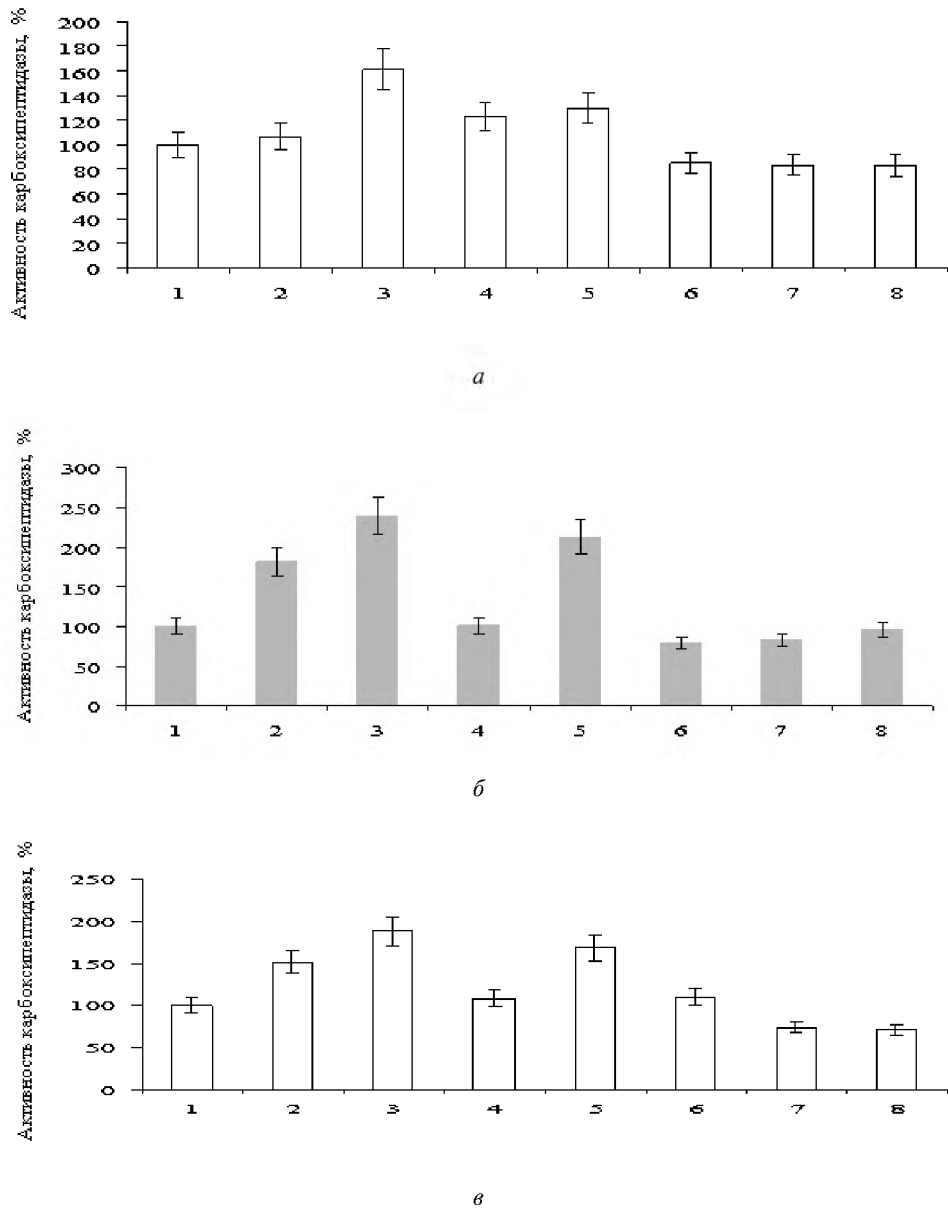


Рис. 7. Влияние активаторов на активность карбоксипептидазы А немалигнизированного яичника (а), доброкачественной (б) и злокачественной (в) опухоли яичника (В) ($M \pm m$, $n = 4$)

Примечание: 1 - контроль; 2 - цистеин 0,008 мМ; 3 - цистеин 0,017 мМ; 4 - дитиотреитол 0,17 мМ; 5 - дитиотреитол 0,34 мМ; 6 - Zn^{++} 0,08 мМ; 7 - Zn^{++} 0,17 мМ; 8 - Zn^{++} 0,34 мМ.

Остаточная активность фермента представлена в % по отношению к показаниям контроля, принятым за 100%.

Таким образом, изучение действия ингибиторов на активность карбокси-пептидазы А немалигнизированного яичника и опухолевых тканей яичника показало, что между физико-химическими свойствами этих пептидаз имеются некоторые различия. В гидролизе карбобензоксиглутамилфенилаланина карбокси-пептидазой А немалигнизированного яичника и опухолевых тканей яичника принимают участие: гидроксильные группы серина, карбоксильная группа глутаминовой кислоты и тиоловая группа цистеина, которая имеет немаловажное значение для проявления ферментативной активности карбокси-пептидазы А этих тканей.

Таким образом повышение активности карбокси-пептидазы А в тканях со злокачественными новообразованиями может быть связано с изменением аминокислотного состава в сторону увеличения содержания аминокислот с функционально значимыми для реализации ферментативной функции группировками.

В конечном счете складывается впечатление, что образование доброкачественных и злокачественных опухолей происходит принципиально разными путями, так как большинство исследованных нами показателей у этих опухолей оказываются противоположными.

Выводы

1. Для карбокси-пептидазы А немалигнизированного яичника и опухолевых тканей яичника женщин характерен смешанный тип ингибирования фермента фенилаланином.

2. Максимальная степень ингибирования наблюдается для карбокси-пептидазы А злокачественной опухоли яичника ($K_i = 0,97$ мМ), наименьшая – для фермента доброкачественной опухоли ($K_i = 4,35$ мМ).

3. Усиление процесса малигнизации яичника характеризуется снижением чувствительности карбокси-пептидазы А к хелатным реагентам.

4. Активность карбокси-пептидазы А как немалигнизированного яичника, так и опухолевых тканей яичника полностью подавляется в присутствии 2-меркаптоэтанола и увеличивается в присутствие цистеина и дитиотреитола.

5. Ароматические аминокислоты триптофан и в большей степени тирозин снижают активность карбокси-пептидазы А немалигнизированного яичника и злокачественной опухоли и не влияют на активность фермента доброкачественной опухоли яичника.

6. Карбокси-пептидаза А немалигнизированного яичника и опухолевой тканью яичника является сериновой карбокси-пептидазой, в каталитической функции которой принимают участие карбоксильная группировка глутаминовой кислоты, гистидин и SH-группа цистеина.

Литература

1. Колодзейская М. В., Пилявская А. С. Пептидазы. – К.: Наук. Думка, 1982. – 176 с.
2. Пилявская А. С. Выделение и свойства карбокси-пептидазы *Streptomyces Griseus*. – К., 1977. – 133 с.
3. Неорганическая биохимия. Т. 1. – М.: Мир, 1978. – С. 504– 505.
4. Виноградова Р. П. Молекулярные механизмы действия ферментов. – К.: Вища школа; 1978. – 280 с.
5. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization / S. M. Goldstein, C. E. Kaempfer, J. T. Kealey, B. U. Wintroub // J. Clin. Invest. – 1989. – Vol. 83, N 5. – P. 1630– 1636.

6. Purification and properties of five different forms of human procarboxy-peptidases / R. Pascual, F. J. Burgos, M. Salva, F. Soriano, E. Mendez, F. X. Aviles // Eur. J. Biochem. – 1989. – Vol. 179, N 3. – P. 609–616.
7. Skidgel R. A., Davis R. M., Tan F. Human carboxypeptidase M. Purification and characterization of a membranebound carboxypeptidase that cleaves peptide hormones // J. Biol. Chem. – 1989. – Vol. 264, N 4. – P. 2236–2241.
8. Cleavage of atrial natriuretic peptide by a kidney membrane-bound carboxypeptidase A / A. Michel, J. Nortier, A. Humblet, C. Paradis, E. De Prez, M. Deschodt-Lanckman // Peptides. – 1998. – Vol. 19, N 5. – P. 907–912.
9. Skigel R. A., Deddish P. A., Davis R. M. Isolation and characterization of a basic carboxypeptidase from human seminal plasma // Arch. Biochem. Biophys. – 1988. – Vol. 267, N 2. – P. 660–667.
10. Construction and chemotherapeutic potential of carboxypeptidase A/mono-clonal antibody conjugate / A. Esswein, E. Hanseler, Y. Montejano, K. S. Vitols, F. M. Huennekens // Adv. Enzyme. Regul. – 1991. – Vol. 31. – P. 3–12.
11. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1967. – 326 с.
12. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1966. – С. 388–389.

I. L. Vovchuk, S. A. Petrov

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра биохимии,
вул. Дворянская, 2, Одеса, 65082, Україна. Тел: (0482)687875; e-mail: irvov@mail.ru

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А ЯИЧНИКА ЖІНОК ІНГІБІТОРАМИ ТА АКТИВАТОРАМИ

Резюме

Встановлено, що інгібування карбоксипептидази А (КА) фенілаланіном – інгібітором КА – відбувається за змішаним типом. Аналізом відповідних констант інгібування встановлено максимальний ступінь інгібування КА із злоякісної тканини, а найменший – для ферменту із доброякісної пухлини. Дослідження впливу інгібіторів та активаторів показало, що у каталізі приймають участь не тільки гідроксильні групи серину активного центру КА, а також карбоксильна група глутамінової кислоти та тіолова група цистеїну.

Ключові слова: карбоксипептидаза А, пухлина, яєчник.

I. L. Vovchuk, S. A. Petrov

Odessa National I. I. Mechnikov University, Department of Biochemistry,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65082, Ukraine. Tel: (0482)687875; e-mail: irvov@mail.ru

ACTIVATORS AND INHIBITORS REGULATION OF CARBOXYPEPTIDASE A ACTIVITY FROM WOMEN'S OVARIA

Summary

It is established that the inhibition of carboxypeptidase A (CA) by phenilalanine, the CA inhibitor, occurs by compound type. Analysis of appropriate constants has shown that maximal range of inhibition was observed for CA from malignant tissue and the lowest range was observed for the enzyme from benign tumor. The investigation of inhibitors and activators effects has shown that it is not not only serine hydroxo groups of active center of CA that take part in catalysis but also carboxo group of glutamic acid and tiol group of cysteine.

Keywords: carboxypeptidase A, tumour, ovary.