

УДК 577.15:591.466(043.5)

РЕГУЛЯЦІЯ ТІАМІНОМ І ЙОГО ПОХІДНИМИ АКТИВНОСТІ КАТЕПСИНУ L

Устьянська О.В.¹, Бокал І.І.², Шварцова О.В.¹, Петров С.А.¹

¹Одеський національний університет ім. І.І.Мечникова, Одеса, Україна

²Військово-медичний центр Південного регіону м. Одеси, Одеса, Україна

E-mail: ustjansky_olga@ukr.net

В роботі вивчений вплив тіаміну і деяких його метаболітів на активність частково очищеного препарату катепсину L. Встановлено, що тіамін і тіохром можуть служити ефекторами для катепсину L шляхом специфічного приєднання по тіолдисульфідному механізму, що призводить до активації ферменту.

Ключові слова: тіамін та його метаболіти, сірковміщуючі сполуки, частково очищений препарат катепсину L.

ВСТУП

Доведено, що багатопланові фізіологічні і біохімічні ефекти тіаміну не можуть бути пов'язані тільки з його коферментними функціями. Завдяки численним роботам вітчизняних і зарубіжних вітамінологів і нашої лабораторії [1–4], встановлені деякі біохімічні процеси, які підлягають некоферментній регуляції самим тіаміном і такими його метаболітами як ТПФ, тіохром та 4-метил-5β-оксиріттиазол.

Менш за все дослідженим питанням в цій проблемі є некоферментна регуляція тіаміном і його метаболітами активності протеолітичних ферментів.

Особливе місце в сучасних уявленнях про роль тіолових груп у ферментативному каталізі належить тіоловим ферментам. Ці ферменти каталізують багато біохімічних реакцій, які визначають стан основних шляхів обміну речовин – вуглеводного, білкового та ліпідного [5].

Серед тіолових ферментів особлива роль належить катепсинам. Це пов'язано з декількома їх властивостями. Насамперед, саме цей клас протеїназ запускає каскад протеолітичних процесів в клітині; вони являються протеїназами, які здатні розщеплювати великий спектр клітинних білків. Катепсини є регуляторними ферментами, які здатні реагувати на зміну хімічного складу клітини [6–8].

Катепсин L в системі катепсинів є одним з найактивніших ферментів, що вносить вирішальний вклад до ініціації протеолізу [9–11]. Крім того можна припустити, що тіолові протеїнази, активність яких залежить від наявності сульфгідрильних груп в структурі молекули, можуть бути регульованими тіаміном і його метаболітами, оскільки відомо, що один із способів протеїдизації тіаміну полягає в розкритті його тіазолового кільця з утворенням тіамінтіолу і надалі змішаних тіаміндисульфідів [1, 12].

Метою нашої роботи було вивчити вплив тіаміну і деяких його метаболітів на активність частково очищеного препарату катепсину L.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У досліджах було використано щурів-самців лінії Вістар із масою тіла 180 – 200 г. Піддослідних тварин утримували в стандартних умовах віварію. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист тварин, які використовуються для експериментальної наукової мети.

З тканини нирок щурів методами екстракції, діалізу, фракціонування сульфатом амонію, хроматографії на сефадексі G – 50 були отримані препарати частково очищеного катепсину L за допомогою стандартної методики [7, 15], яка була модифікована в нашій лабораторії [6, 14].

Білок визначали за методом Лоури [16]. Активність ферменту вимірювали за методом Чорної [10] в модифікації Вовчук [6]. Основа методу полягає у визначенні кількості продуктів гідролізу білкового субстрату – азоказеїну, які не осідають при додаванні 10 % трихлороцтової кислоти. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 366 нм, на спектрофотометрі СФ – 26.

Питому активність виражали в мкМ тирозину на мг білка.

Для визначення вмісту сульфгідрильних і дисульфідних груп в очищеному ферменті до і після додавання тіолвмісних сполук був використаний метод зворотного амперометричного титрування [5].

Для розрахунку отриманих результатів застосовували методи статистичного аналізу з використанням параметричних критеріїв оцінки розбіжності між вибірками за допомогою програми Microsoft Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Для досягнення поставленої мети необхідно було дослідження розбити на декілька етапів.

Для дослідження були взяті тканини нирок, оскільки в нирках, які є органом виділення, катепсинам належить особлива роль, що полягає в деструкції олігопептидів. По-друге, в цьому органі, активність катепсинів висока. І крім того, відомо, що в нирках концентрується достатня кількість вільного тіаміну і його катаболитів [13], що забезпечує їх максимальну взаємодію з катепсинами.

У попередніх роботах в нашій лабораторії було показано, що більшість некоферментних функцій тіаміну пов'язана з вільною його формою і тіохромом [1, 2]. Тому в першій серії досліджень ми вивчили вплив тіаміну і його похідних на активність виділеного ферменту. Для того, щоб з'ясувати питання про можливу участь різних фосфорильованих форм тіаміну в такій регуляції і виключити коферментну функцію були взяті тіамінпірофосфат і бенфотіамін.

В експерименті *in vitro* активність частково очищеного катепсину L визначали в інкубаційній суміші після додавання еквімолярних розчинів тіаміну, його похідних і тіолвмісних сполук. В контрольні проби додавали такі ж об'єми дистильованої води, як і в дослідні проби.

Для співставлення усі дані були перераховані в мкмолі амінокислот, що утворюються в результаті протеолізу, на 1 міліграм білка за хвилину.

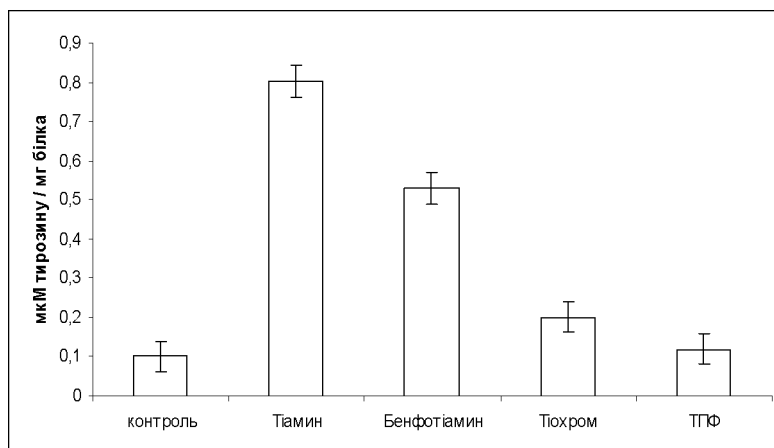


Рис. 1. Вплив тіаміну і його похідних на активність частково очищеного препарату катепсину L (мкМ / мг білка за хвилину), $n = 10$.

Дані, які приведені на рисунку 1, свідчать, що всі досліджені метаболіти тіаміну (бенфотіамін, тіохром) і сам тіамін виявляли активуючу дію на катепсин L. ТПФ не мав достовірно значущого активуючого ефекту.

Щоб визначити чи має в цьому випадку місце неспецифічна взаємодія між тіаміном та його похідними з одного боку і сульфгідрильними групами ферменту з іншого, ми вивчили вплив інших SH-вмісних сполук (ліпоевої кислоти, відновленого глутатіону та цистеїну) на активність досліджуваного ферменту.

На Рисунку 2 зазначено, що застосування тіолвмісних сполук призводило до зворотнього ефекту. Усі досліджені сполуки, окрім відновленого глутатіону, інгібували активність ферменту. Відновлений глутатіон не впливав на реєстрований показник.

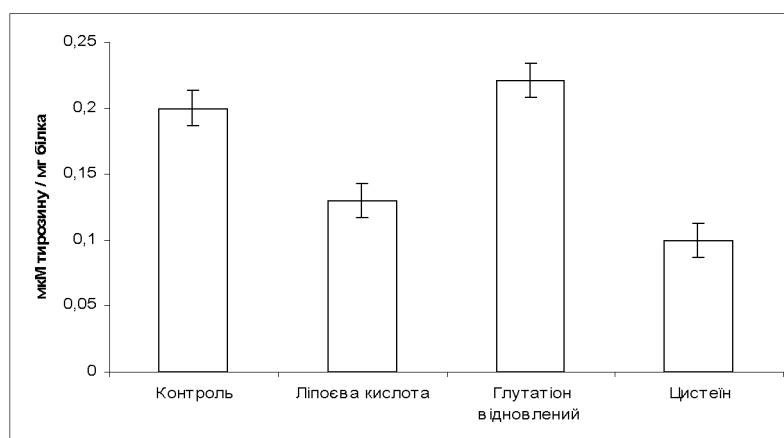


Рис. 2. Вплив тіолових сполук на активність частково очищеного препарату катепсину L (мкМ тирозину / мг білка за хвилину), $n = 10$.

Таким чином, взаємодія тіаміну, тіохрому і інших метаболітів тіаміну з катепсином L не може бути віднесено за рахунок тіолдисульфідної взаємодії.

Наступним етапом нашої роботи було дослідження вмісту SH- та S-S- груп в частково очищеному препараті катепсину L після його обробки тіаміном, його метаболітами і тіолвмісними сполуками.

Для з'ясування ролі стану SH- груп в молекулі ферменту при взаємодії з тіаміном і його похідними іншими SH- вмісними сполуками, ми провели серію експериментів, в якій визначили рівень SH- груп у ферменті після його обробки тіаміном і його похідними.

Таблиця 1.
Вміст SH- і -S-S- груп в частково очищеному препараті катепсину L після його обробки тіаміном та його похідними (мкмоль/мл)

Експеримент 0,1 мл ферменту + 0,01 мл реагенту			
Реакційна суміш	SH	SS	SH + SS
0,1 мл ферменту	0,0174	0,0626	0,08
0,01 мл тіаміну	0,0057	0,0036	0,0093
Всього реакц. суміш	0,0231	0,0662	0,0893
Інкубація 120 хв. при 37 °C	0,0092	0,0708	0,08
0,1 мл ферменту	0,0174	0,0626	0,08
0,01 мл бенфотіаміну	0,0004	0,0049	0,0053
Всього реакц. суміш	0,0178	0,0675	0,0853
Інкубація 120 хв. при 37 °C	0,0172	0,0418	0,059
0,1 мл ферменту	0,0174	0,0626	0,08
0,01 мл тіохрому	0,0004	0,0056	0,006
Всього реакц. суміш	0,0178	0,0682	0,086
Інкубація 120 хв. при 37 °C	0,0142	0,0458	0,06

Дані, які приведені в Таблиці 1, свідчать, що тіамін і частково тіохром знижували рівень SH- груп у ферменті. Бенфотіамін не мав такого ефекту.

Для з'ясування питання про те, чи є цей ефект специфічним для тіаміну чи він властивий іншим тіолвмісним сполукам, ми досліджували вплив ліпоєвої кислоти, відновленого глутатіону і цистеїну на вміст SH- і -S-S- груп у ферменті (таблиця 2).

Таблиця 2.

Вміст SH- і -S-S- груп в частково очищеному препараті катепсину L після його обробки тіолвмісними сполуками (мкмоль/мл)

Експеримент 0,1 мл ферменту + 0,01 мл реагенту			
Реакційна суміш	SH	SS	SH + SS
0,1 мл ферменту	0,0174	0,0626	0,08
0,01 мл ліпоевої кислоти	0,0056	0,0011	0,0067
Всього реакц.суміш	0,023	0,0637	0,0867
Інкубація 120 хв. при 37 °C	0,0148	0,0684	0,0832
0,1 мл ферменту	0,0174	0,0626	0,08
0,01 мл глутатіону	0,136	0,064	0,02
Всього реакц.суміш	0,1534	0,1266	0,28
Інкубація 120 хв. при 37 °C	0,19	1,17	1,36
0,1 мл ферменту	0,0174	0,0626	0,08
0,01 мл цистеїну	0,0667	0	0,0667
Всього реакц.суміш	0,084	0,626	0,1466
Інкубація 120 хв. при 37 °C	0,096	0,0528	0,1488

Наведені в Таблиці 2 дані показують що, ні в одному з випадків не спостерігається зменшення вмісту SH- груп. Рівень SH- груп в усіх випадках різко збільшувався, що свідчить про взаємодію цих сполук з ферментом з відновленням його SH- груп.

Наші дослідження свідчать про те, що присутність тіаміну та його метаболітів призводить до активації ферменту, а тіолвмісні сполуки – до його інгібування. SH-групи досліджуваного фермента при заданих умовах поведуться таким чином: при додавання тіаміну та його метаболітів ми спостерігали зниження кількості вільних SH- груп у ферменті, тоді як додавання тіолвмісних сполук призводило до збільшення кількості цих груп. Це говорить про те, що в останньому випадку відбувалося тільки відновлення -S-S- груп ферменту до SH- груп, тоді як присутність тіаміну та його метаболітів призводить до зниження кількості вільних SH- груп, можливо, за рахунок відкриття тіазолового кільця тіаміну або, відповідно його метаболіту з утворенням змішаного дисульфідіду. Таке приєднання, вирогідно, провокує структурні зміни в молекулі ферменту, внаслідок чого фермент активується.

ВИСНОВКИ

Таким чином, можна вважати встановленим, що взаємодія тіаміну і тіохрому з катепсином L відбувається по специфічному тіолдисульфідному механізму, який властивий тільки для цих сполук.

Наші дані свідчать про те, що вільний тіамін та тіохром можуть служити ефекторами для катепсину L шляхом специфічного приєднання до нього по тіолдисульфідному механізму, що призводить до активації ферменту.

Список літератури

1. Петров С. А. Некоферментные эффекты тиамин и его метаболитов / С. А. Петров // Биомедицина химия. – 2006. – Т. 52. – С. 335–345.
2. Петров С.А. Регуляция тиамин и его метаболитами процессов образования и обмена аминокислот в организме: автореф. дисс. на соискание учен. степени докт. биол. наук : спец. 03.00.04. «Биохимия» / Петров Сергей Анатольевич ; Институт радиобиологии Академии наук Беларуси. – Минск, 1992. – 32, [1] с., включая обл. : с. 12.
3. Взаємодія тіамінкінази мозку щурів із тіаміном і його похідними / С.Ю. Пилипчук, Ю.М. Пархоменко, З.С. Протасова [и др.] // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т. 73, № 2. – С. 51–56.
4. Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals / I. E. Gulyai, A.F. Makarchikov, B. Lakaye [et al.] / Cell. Mol. Life Sci. – 2003. – V. 60. – P. 1477–1148.
5. Костюшов В. В. Амперотитриметричний імуноаналіз тіолопривних механізмів взаємодій антигена з антитілами / В.В. Костюшов // Одеський медичний журнал. – 1998. – № 6. – С. 11–14.
6. Вовчук І.Л. Активність тканинних катепсин-L-подібних протеїназ у жінок онкопатології тіла матки / І.Л. Вовчук, С.С. Чернадчук // Укр. біохім. журн. – 2004. – № 2. – С. 56–60.
7. Жлоба А.А. Очищення, ідентифікація і властивості цистеїнових катепсинів тканин тварин / А. А. Жлоба // Укр. біохім. журн. – 1986. Т. 58, № 4. – С. 100–111.
8. Руденська Г. Н. Цистеїнові протеїнази мікроорганізмів і вірусів / Г. Н. Руденська, Д. В. Пупов // Біохімія. – 2008. – Т. 73. – С. 3–17.
9. Жанаева С.Я. Прогностическая значимость цистеиновых протеаз лизосом в определении эффективности противоопухолевой терапии / С.Я. Жанаева, А.И. Дьяков, Т.А. Алексеенко // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55. – С. 89–97.
10. Черная В.И. Катепсина L из опухоли мозга человека. Очистка и содержание / В.И. Черная // Укр. біохім. журн. – 1998. – Т. 70, № 5. – С. 97–103.
11. Pfizer J.M. Primed-site Probing of Papain-like Cysteine Proteases / J.M. Pfizer, I. Assfalg-Machleidt, W. Machleidt [et al.] // International Journal of Peptide Research and Therapeutics formerly known as "Letters in Peptide Science". – 2006. – P. 44–67.
12. Степуро А.И. Роль тиольной формы тиамин в обмене оксида азота / А.И. Степуро, Т.П. Пилецкая, И.И. Степуро // Биохимия. – Т. 70. – 2005. – С. 416–429.
13. Янчий О. Р. Внутриклеточная локализация тиаминсвязывающих белков печени и почек крыс / О. Р. Янчий, Ю.М. Пархоменко, Г.В. Донченко // Укр. біохім. журн. – 2003. – Т. 75, № 6. – С. 111–114.
14. Пат. № 46633 Україна, МПК (2009), С 12 N 9/50, С 12 N 9/64. Спосіб визначення активності матричної металопротеїнази-2 / Вовчук І.Л. ; заявник та патентодержатель Вовчук І.Л. – № u 2009 08087 ; заявл. 31.07.2009 ; опубл. 25.12.2009, Бюл. № 24.
15. Практическое руководство по энзимологии / Под ред. Г. А. Кочетова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. школа, 1980. – 272 с.
16. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. I. Rosenbrough, A. Z. Fan [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P. 265–275.

Устьянская О.В. Регуляция тиамином и его производными активности катепсина L / О.В. Устьянская, И.И. Бокал, О.В. Шварцова, С.А. Петров // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С.291-297

В статье изучается влияние тиамин и некоторых его метаболитов на активность очищенного препарата катепсина L. Установлено, что свободный тиамин и тиохром могут служить эффекторами для катепсина L путем специфического присоединения к нему по тиолдисульфидному механизму, что приводит к активации фермента.

Ключевые слова: тиамин и его метаболиты, серосодержащие соединения, частично очищенный препарат катепсина L.

Ustjansky O.V. Cathepsin L Activity Adjusting by Thiaminum and Its Derivatives / O.V. Ustjansky, I.I. Bokal, O.V. Shvartcova, S.A. Petrov // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No. 2. – P. 291-297.

In the article the influence of Thiaminum and some its metabolites on the activity of the cleared preparation of cathepsin L are studied. It is determined that free Thiaminum and thiochrome can serve as effectors for the cathepsin L by the specific joibing to it on a thioldisulfide mechanism, that results in activation of enzyme.

Keywords: Thiaminum and some its metabolites, sulphurcontained compounds. cleared preparation of cathepsin L.

Поступила в редакцию 23.05.2011 г.