

УДК 577.156:577.15.072

Г. Лабунець, пошукач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Одеса

СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ КАТЕПСИНУ *H* НЕТРАНСФОРМОВАНОЇ ТКАНИНИ ТА ТКАНИНИ ПОМІРНО ДИФЕРЕНЦІЙОВАНОЇ ФОРМИ ІНФІЛЬТРУЮЧОГО ДОЛЬКОВОГО РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Досліджено субстратну специфічність катепсину H нетрансформованої тканини та тканини помірно диференційованої форми інфільтруючого долькового раку молочної залози. Катепсин H нетрансформованої тканини молочної залози гідролізує синтетичні субстрати в ряду: Vz-Gly-Phe→Z-Phe-Ala→Z-Glu-Tyr→окситоцин на відміну від ферменту злроякісного новоутворення, який не гідролізує синтетичний дипептид Z-Glu-Tyr та проявляє субстратну специфічність в ряду: Z-Phe-Ala→Vz-Gly-Phe→окситоцин. Катепсин H володіє ендопептидазною протеолітичною активністю по відношенню до субстрату казеїну, більш виражену для ферменту нетрансформованої тканини молочної залози.

Ключові слова: катепсин *H*, пухлина, молочна залоза, субстратна специфічність.

Вступ. У даний час до числа найбільш актуальних напрямків сучасної медичної патохімії та патофізіології відносяться дослідження активності цистеїнових катепсинів за пухлинного росту. Катепсин *H* (ЕС 3.4.22.16) належить до групи цистеїнових лізосомальних протеїназ, що беруть участь у регуляції внутрішньоклітинного метаболізму протеїнів, посттрансляційній модифікації білків, диференціюванні клітин, процесах росту та старіння, активації та інактивації гормонів і нейропептидів, процесі імунної відповіді та інші [1, 2]. Катепсин *H* є амінопептидазою, однак проявляє також й ендопептидазну активність [2, 3, 4]. В екзопептидаз доступ до субстрат-зв'язуючої ділянки обмежений додатковими структурами: "заступаючими" петлями в катепсинах В [3, 5] та Х [6] або пептидними ділянками в амінопептидазах - катепсині *H* [7]. Крім того, катепсини здійснюють процесинг різних пробілків та прогормонів таких, як наприклад, проренін [8], тиреоглобулін [9, 10] та, як припускають, залучені в утворення ендостатину під час ангіогенезу [11].

Як було показано, високий вміст катепсину *H* характерний для ряду пухлинних тканин, таких як гліобластома та анапластична аastroцитомома [12], колоректальна карцинома [13] і рак молочної залози [14].

Мета роботи полягала у дослідженні субстратної специфічності катепсину *H*, який був виділений з нетрансформованої тканини та тканини помірно диференційованої форми інфільтруючого долькового раку молочної залози.

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження служили зразки нетрансформованої тканини та помірно диференційованої форми інфільтруючого долькового раку молочної залози.

Патоморфологічну та гістологічну верифікацію діагнозів за міжнародною класифікацією ВООЗ (Женева, 2003) з визначенням морфологічного стану та ступеню диференціювання трансформованих клітин пухлинної тканини здійснювали спеціалісти сертифікованої та ліцензійованої патоморфологічної лабораторії обласного онкологічного диспансеру м. Одеси [15]. Збереження етичних та правових норм згідно: Хельсінської декларації (1964 р.), Конвенції про захист прав та достоїнств людини в зв'язку з використанням досягнень біології та медицини (Конвенція про права людини та біомедицини 1996 р.), закону України "Про трансплантацію органів та інших анатомічних матеріалів людини (1999 р.)

забезпечувалося медичним закладом, згідно договору про сумісні дослідження. Зразки тканин заморожували при -18°C безпосередньо після взяття їх при оперативному втручанні. Зразки гомогенізували у 0,9% розчині NaCl (у співвідношенні 1:10) та центрифугували при 9000g за хв (при $+4^{\circ}\text{C}$) протягом 30 хв.

Розчини білків, що були отримані з гомогенатів досліджуваних тканин, після діалізу (проти 10-кратного об'єму дистильованої води) піддавали поетапному фракціонуванню сульфатом амонію, при зростаючій концентрації $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ від 20% до 40%, 60% і 80% насичення. Для очищення від надлишку $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, фракції, що були отримані за 20%, 40%, 60% і 80% насичення сульфатом амонію, піддавали повторному діалізу проти 10-кратного об'єму дистильованої води.

Хроматографічний розподіл білкових розчинів нетрансформованої тканини молочної залози та тканини злроякісного новоутворення, отриманих при 80,0% насиченні сульфатом амонію, що володів максимальною активністю катепсину *H* проводили методом гель-хроматографії з використанням сефадексу - G 75.

Субстратну специфічність катепсину *H* визначали по гідролізу: 1,0 % альбуміну, 1,0 % нативного гемоглобіну [16], 2,0 % казеїну [17, 18, 19], 0,04 мМ окситоцину та 2,0 мМ розчинів синтетичних субстратів: Vz-Gly-Phe, Z-Phe-Ala, Z-Glu-Tyr. Кількість відщеплюваної амінокислоти визначали за допомогою нінгідринового реактиву [20,21].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили у відповідності з *t*-критерієм Стьюдента [22]. За статистично достовірну різницю приймали рівень достовірності більше 95% ($p < 0,05$).

Результати та їх обговорення.

Субстратна специфічність є унікальною властивістю ферментів, що відрізняє їх від інших каталізаторів. Катепсин *H*, будучи типовою ендопептидазою та амінопептидазою, гідролізує пептидні зв'язки, відщеплюючи один N-термінальний залишок від поліпептидного ланцюга [7]. Відомо, що специфічність протеолітичних ферментів може значно змінюватися в залежності від природи досліджуваного субстрату [23].

У дослідженнях субстратної специфічності (табл. 1) було виявлено, що катепсин *H* нетрансформованої тканини та злроякісного новоутворення молочної залози гідролізує низькомолекулярні субстрати, деякі нативні білки та окситоцин (Gly-Leu-Pro-Cys-Cys-Asn-Gln-Ile-Tyr [24]).

Було показано, що фермент злякисного новоутворення володіє незначно більшою ферментативною активністю до окситоцину, ніж фермент нетрансформованої тканини молочної залози.

З літературних джерел відомо, що катепсин *H* переважно гідролізує пептидні зв'язки основних та гідрофобних амінокислот та не розщеплює зв'язки дикарбонових амінокислот [25]. Катепсин *H* нетрансформованої тканини молочної залози гідролізував синтетичні субстрати у ряду:

Bz-Gly-Phe—> Z-Phe-Ala—>Z-Glu-Tyr—>окситоцин.

На відміну від ферменту нетрансформованої тканини,

фермент злякисного новоутворення не гідролізував синтетичний дипептид Z-Glu-Tyr та проявляв субстратну специфічність у ряду:

Z-Phe-Ala—>Bz-Gly-Phe—>окситоцин.

Отримані результати свідчать про те, що катепсин *H* нетрансформованої тканини молочної залози та фермент злякисного новоутворення володіє дипептидил-пептидазною активністю, що частково співпадає з результатами інших дослідників [26]. Отримані результати дослідження співпадають з літературними даними, в яких вказано, що катепсин *H* відщеплює гідрофобні N-термінальні амінокислоти [25].

Таблиця 1. Субстратна специфічність катепсину *H* нетрансформованої тканини та злякисного новоутворення молочної залози (n=3)

Субстрат	Оптична щільність продуктів гідролізу субстратів, ΔE	
	нетрансформована тканина	*злякисне новоутворення
Окситоцин	0,023 ± 0,0001	0,024 ± 0,0001
Bz-Gly-Phe (2,0 мМ розчин)	0,005 ± 0,0007	0,007 ± 0,0005
Z-Phe-Ala (2,0 мМ розчин)	0,007 ± 0,0005	0,008 ± 0,0007
Z-Glu-Tyr (2,0 мМ розчин)	0,013 ± 0,002	0,008 ± 0,0007
альбумін (1,0% розчин), 4 год інкубації	0	0
альбумін (1,0% розчин), 20 год інкубації	0,012 ± 0,002	0,017 ± 0,005
казеїн (2,0% розчин), 4 год інкубації	0,242 ± 0,020	0,207 ± 0,018
казеїн (2,0% розчин), 20 год інкубації	0,272 ± 0,024	0,370 ± 0,040
гемоглобін неденатурований (2,0% розчин), 4 год інкубації	0,012 ± 0,002	0,006 ± 0,0005
гемоглобін неденатурований (2,0% розчин), 20 год інкубації	0,007 ± 0,0005	0,005 ± 0,0003

Примітка:

* - помірно диференційована форма інфільтруючого долькового раку молочної залози.

Продукти гідролізу казеїну, гемоглобіну та альбуміну визначали при довжині хвилі 750 нм.

Продукти гідролізу окситоцину та синтетичних субстратів визначали за нінгидриновим методом при довжині хвилі 570 нм

Було встановлено, що білки з великою молекулярною масою гідролізуються катепсином *H* нетрансформованої тканини молочної залози та злякисного новоутворення вибірково, що співпадає з результатами інших авторів [25].

Фермент нетрансформованої тканини молочної залози і злякисного новоутворення не гідролізував альбумін сироватки крові на протязі 4 год інкубації при 37 °C (за рН інкубаційного середовища 6,5), а збільшення терміну інкубації до 20 год призводило до прояву активності ферменту. Отримані результати частково співпадають з результатами інших дослідників, в яких було встановлено, що катепсин *H* не розщеплює фібронектин сироватки бика та курей [25].

За результатами дослідження було встановлено, що досліджуваній фермент володіє ендопептидазною загальною протеолітичною активністю по відношенню до субстрату казеїну (за рН інкубаційного середовища 6,5), більш виражену для ферменту нетрансформованої тканини молочної залози.

Фермент як нетрансформованої тканини молочної залози, так і злякисного новоутворення незначно гідролізував неденатурований гемоглобін (за рН інкубаційного середовища 6,5), а збільшення часу інкубації до 20 год призводило до 50% втрати активності ферменту нетрансформованої тканини. Отримані результати частково співпадають з результатами досліджень інших авторів, які свідчать про те, що катепсин *H* слабо розщеплює азоказеїн, колаген та ламінін [26].

Висновки

1. Катепсин *H* нетрансформованої тканини молочної залози та фермент злякисного новоутворення володіє дипептидил-пептидазною активністю.

2. Катепсин *H* нетрансформованої тканини молочної гідролізує синтетичні субстрати у ряду:

Bz-Gly-Phe—> Z-Phe-Ala—>Z-Glu-Tyr—>окситоцин,

3. Катепсин *H* злякисного новоутворення не гідролізує синтетичний дипептид Z-Glu-Tyr та проявляє субстратну специфічність в ряду: Z-Phe-Ala—>Bz-Gly-Phe—>окситоцин.

4. Досліджуваний фермент володіє ендopeптидазною загальною протеолітичною активністю по відношенню до субстрату казеїну, більш виражену для ферменту нетрансформованої тканини молочної залози.

Список використаних джерел

1. Васильева О. С. Изучение механизма аутокаталитической активации прокатепсина H in vitro / О. С. Васильева, В. Ю. Серебров, Б. Турк, В. Турк // Исследовано в России. – 2002. – С. 1092 – 1102.
2. Turk B. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers / B. Turk, D. Turk, V. Turk. // Biochimica et Biophysica Acta. – 2000. – Vol. 1477. – P. 98 – 111.
3. Дилакян Э. А. Лизосомные цистеиновые протеиназы при неопластической трансформации / Э. А. Дилакян, И. В. Цветкова // Биомедицинская химия. – 2005. – №5. – С. 485 – 500.
4. Otto H. H. Cysteine Proteases and Their Inhibitors / H. H. Otto, T. Schirmeister // Chemical Reviews. – 1997. – Vol. 97, №1. – P. 133 – 172.
5. Musil D. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity / D. Musil, D. Zucic, D. Turk, R. Engh, I. Mayr, R. Huber, T. Popovic, V. Turk, T. Towatari, N. Katunuma, et al. // Embo Journal. – 1991. – Vol. 10, №9. – P. 2321 – 30.
6. Klemencic I. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase / I. Klemencic, A. K. Carmona, M. N. Cezari et al. // European Journal of Biochemistry. – 2000. – Vol. 267. – P. 5404 – 5412.
7. Guncar G. Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 Å resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function / G. Guncar, M. Podobnik, J. Pungercar, B. Strukelj, V. Turk, D. Turk // Structure. – 1998. – Vol. 6. – P. 51 – 61.
8. Jutras I. Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells / I. Jutras, T. L. Reudelhuber // FEBS Letters. – 1999. – Vol. 443. – P. 48 – 52.
9. Dunn A. D. Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsin B, D and L / A. D. Dunn, H. E. Crutchfield, J. T. Dunn // Journal of Biological Chemistry. – 1991. – Vol. 266. – P. 20198 – 20204.
10. Tepel C. Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin / C. Tepel, D. Bromme, V. Herzog, K. Brix // Journal of Cell Science. – 2000. – P. 4487 – 4498.
11. Felbor U. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII / U. Felbor, L. Dreier, R. A. Bryant et al. // Embo Journal. – 2000. – Vol. 19, №6. – P. 1187 – 1194.
12. Sivaparvathi M. Expression and the role of cathepsin H in human glioma progression and invasion / M. Sivaparvathi, R. Sawaya, Z. Gokaslan, S. K. Chintala, J. S. Rao, K. S. Chintala // Cancer Letters. – 1996. – Vol. 104. – P. 121 – 126.
13. Del Re E. C. Alterations in cathepsin H activity and protein patterns in human colorectal carcinomas / E. C. del Re, S. Shuja, J. Cai, M. J. Murnane // The British Journal of Cancer. – 2000. – Vol. 82. – P. 1317 – 1326.
14. Gabrijelčić D. Cathepsins B, H and L in human breast carcinoma / D. Gabrijelčić, B. Svetic, D. Spaić et al. // European Journal of Clinical Chemistry and Biochemistry. – 1992. – Vol. 30. – P. 69 – 74.
15. Всемирная Организация Здравоохранения / Материалы ежегодных отчетов. Санкт-Петербург. 1981. – 286 с.
16. Anson M. L. The estimation of pepsin with hemoglobin / M. L. Anson, A. E. Mirsky // The Journal of General Physiology. – 1932. – Vol. 16, № 1. – P. 59 – 67.
17. Веремеенко К. Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы в клинической диагностике / К. Н. Веремеенко // Ферменты в лабораторной диагностике. – М. – 1973. – Т. 1. – С. 37 – 39.
18. Веремеенко К. Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы в медицине / К. Н. Веремеенко // Биохимия животных и человека. – Киев: Здоровье. – 1981. – 216 с.
19. Kunitz M. I. The determination of kaseine in the blood and urine / M. I. Kunitz // Biological Chemistry. – 1946. – Vol. 164. – P. 563 – 571.
20. Чижова Х. Значение аминокислот в пивоварении и новые методы их определения / Х. Чижова, П. Хофта, И. Колоухова, П. Досталек // Пиво и жизнь. – 2005. – № 2. – С. 22 – 27.
21. Олешко Г. И. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах / Г. И. Олешко, Т. И. Ярыгина, Е. В. Зорина, М. Д. Решетникова // Фармация. – 2011. – № 3. – С. 14 – 17.
22. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич // – К.: Морион. – 2000. – 320 с.
23. Виноградова Р. П. Молекулярные основы действия ферментов / Р. П. Виноградова. – Київ: Вища школа. – 1978. – 279 с.
24. Панков Ю. А. Биохимия гормонов и гормональной регуляции. М. – 1976. – С. 44 – 93.
25. Локшина Л. А. Изучение свойств и специфичности катепсина H из селезенки быка / Л. А. Локшина, О. Н. Лубкова, Т. А. Гуреева, В. Н. Орехович // Вопросы медицинской химии. – 1985. – Т. 31, № 5. – С. 125 – 130.
26. Jevnikar Zala. CTSH (cathepsin H) / Zala Jevnikar, Janko Kos // Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. – 2008. – Vol. 12, № 2, P. 130 – 133.

Надійшла до редколегії 22.12.15

Г. Лабунец, соискатель

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, Одесса, Украина

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ КАТЕПСИНА H НЕТРАНСФОРМИРОВАННОЙ ТКАНИ И ТКАНИ УМЕРЕННО ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ФОРМЫ ИНФИЛЬТРАТИВНОГО ДОЛЬКОВОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Исследована субстратная специфичность катепсина H нетрансформированной ткани и ткани умеренно дифференцированной формы инфильтративного долькового рака молочной железы. Катепсин H нетрансформированной ткани молочной железы гидролизует синтетические субстраты в ряду: Bz-Gly-Phe→Z-Phe-Ala→Z-Glu-Tyr→окситоцин в отличие от фермента злокачественного новообразования, который не гидролизует синтетический дипептид Z-Glu-Tyr и проявлял субстратную специфичность в ряду: Z-Phe-Ala→Bz-Gly-Phe→окситоцин. Катепсин H обладает эндопептидазной протеолитической активностью по отношению к субстрату казеину, более выраженной для фермента нетрансформированной ткани молочной железы.

Ключевые слова: катепсин H, опухоль, молочная железа, субстратная специфичность.

G. Labunets applicant

Odessa National Mechnikov University, Odessa, Ukraine

SUBSTRATE SPECIFICITY OF CATHEPSIN H IN UNTRANSFORMED TISSUES OF MAMMARY GLAND AND IN TISSUES OF MODERATELY DIFFERENTIATED FORM OF LOBULAR INFILTRATING BREAST CANCER

The substrate specificity of cathepsin H in untransformed tissues of mammary gland and in tissues of moderately differentiated form of lobular infiltrating breast cancer has been investigated.

Cathepsin H from untransformed tissues of mammary gland hydrolyzed synthetic substrates in a row: Bz-Gly-Phe→Z-Phe-Ala→Z-Glu-Tyr→oxytocin unlike enzyme from malignant tumor that did not hydrolyze the synthetic dipeptide Z-Glu-Tyr and revealed the substrate specificity in a row: Z-Phe-Ala→Bz-Gly-Phe→oxytocin. Cathepsin H has proteolytic endopeptidase activity to the substrate casein more pronounced for enzyme from untransformed tissue of mammary gland.

Key words: cathepsin H, tumor, mammary gland, substrate specificity.