УДК 577. 156., 616. 006
©Коллектив авторов

АМИНОПЕПТИДАЗЫ В ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Т.А.ГУРЕЕВА, Н.В.ГОЛУБЕВА, О.Н.ЛУБКОВА

Институт биомедицинской химии РАМН,
119832 Москва, Погодинская 10, факс (095)245-08-57.

В лейкозных клетках, полученных от больных разными формами лимфопролиферативных заболеваний, обнаружены аминопептидазы по крайней мере двух видов: металло- и SH-зависимые ферменты. Фермент с оптимумом pH 8,5-9,0, для функционирования которого важны SH-группы, является, по-видимому, представителем малоизученного семейства аминопептидаз и в лимфоидных клетках человека обнаружен впервые.

Ключевые слова: аминопептидазы, лейкозные лимфоидные клетки.

ВВЕДЕНИЕ. Интерес к изучению протеолитических ферментов в отдельных популяциях лимфоидных клеток значительно возрос в связи с установлением идентичности антигенов CD10, CD13, CD26 с протеиназами плазматической мембрано-нейтральной эндопептидазой, аминопептидазой N, дипептидилпептидазой 1У соответственно [1]. Аминопептидаза N (CD13) является широкораспространенной Zn-металлопротеиназой, которая присутствует во многих типах клеток. В кроветворных клетках аминопептидаза N (CD13) была обнаружена, главным образом, в популяциях миелоидно-моноцитарного ряда, находящихся на разных стадиях дифференцировки, и рассматривалась как маркер этих клеток [1,2]. Вопрос о присутствии аминопептидазы N (CD13) в клетках лимфоидного ряда до последнего времени оставался открытым [3,4].

На протяжении ряда лет нами проводятся исследования разных классов протеиназ в различающихся по иммунологическому фенотипу лимфоидных клетках, находящихся на разных стадиях дифференцировки [5-9]. Можно предположить, что эти ферменты вовлечены в реализацию и регуляцию специализированных функций лимфоидных клеток. В настоящем сообщении представлены данные по выявлению нескольких аминопептидаз в лейкозных клетках человека.

МЕТОДИКА. В работе использованы клетки периферической крови и селезенки больных различными формами В- и Т- клеточных лимфопролиферативных заболеваний. Выделение клеток, их иммунологическую характеристику и уровень дифференцировки проводилось в ВГНЦ РАМН.

Полученные клетки отмывали 0,15 М NaCl pH 7,2, число клеток подсчитывали, доводили до концентрации $(20\text{-}30)\times10^6$ клеток на 1мл, лизировали 0,1%-ным тритоном Х-100 и экстрагировали в течении 12 часов при $+4^0$ С. Лизат центрифугировали 40 мин. при 16000g, и супернатант использовали для определения активности аминопептидаз.

Для определения активности в качестве субстрата использовали β-нафтиламид лейцина (Leu-NA), а также в ряде опытов β-нафтиламиды аланина, аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты фирмы «Serva» (ФРГ) (Ala-NA, Arg-NA, Lys-NA, Asp-NA). Гидролиз Leu-NA (10^{-4} М) и других субстратов проводили в 0,05М

фосфатном буфере pH7,5 при 37⁰ в течение 60 минут. В ряде опытов гидролиз Leu-NA исследовали в широком диапозоне pH (6-9,5) в присутствии и отсутствии ЭДТА и ДТТ. После остановки реакции (pH 4,0) измеряли флуоресценцию образовавшегося β- нафтиламина при возбуждении 335 нм и излучении 410 нм. Активность выражали в нмоль продукта, освобожденного за 1мин. на 1 мг белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В первой серии экспериментов в различающихся по фенотипу лейкозных лимфоидных клетках, относящихся к Т- и В- ряду, была обнаружена активность по гидролизу Leu-NA, что свидетельствовало о присутствии аминопептидаз. Величины активности фермента существенно различались (табл.).

Наиболее высокая активность отмечалась в Т-клетках, фенотип которых соответствовал промежуточной тимической стадии дифференцировки, и в зрелых В-клетках (клетки N7 и N5, табл.). Однако, в других близких по фенотипу В-клетках активность была низкой (клетки N2 и N3 , табл.). Различался также и характер влияния ЭДТА и ДТТ. Как видно из табл, в присутствии указанных соединений при pH 6,0 отмечалось снижение активности во всех клетках, а при pH 7,2 отмечалось некоторое ее повышение, за исключением клеток N4. Это могло служить указанием на присутствие нескольких видов аминопептидаз, соотношение которых в исследованных клетках также различалось.

Таблица. Активность аминопептидаз по гидролизу Leu-NA в лейкозных В- и Т- клетках человека.

Клетки		Активность, (нмоль/мин на 1 мг белка)			
		pH 6.0		pH7.2	
N	Характеристика	без добавок	ЭДТА+ДТТ	без добавок	ЭДТА+ДТТ
1	**В-клетки** зрелые	3,6	2,9	6.4	8,2
2*	-"-	1,4	0,8	2,5	3,0
3	-"-	0,56	0,32	1,14	1,44
4*	активированные	5,7	1,6	10,4	7,5
5	-"-	9,1	4,2	15,0	17,0
6*	поздние	2,1	1,36	4,0	4,8
7	**Т-клетки** промежуточная тимическая стадия	8,6	6,2	24,0	34,0
8	зрелые	7,5	6,3	11,3	15,3
9	-"-	2,5	0,8	5,8	7,5

Примечания. Иммунологический фенотип и стадии дифференцировки представлены в работах [5,7,8]. *-клетки селезенки, без обозначений - клетки периферической крови.

Для более детальной характеристики аминопептидаз были отобраны пять образцов клеток: миелоидные клетки N1, которые экспрессировали CD13, т.е содержали аминопептидазу N, и лимфоидные клетки N2, N3, N4, N5, фенотип которых соответствовал разным уровням дифференцировки В-клеток (нумерация клеток из рис.1) Был исследован оптимум pH для гидролиза Leu-NA Как видно из рис.1, расщепление субстрата происходило в широком диапозоне pH 6,5-8,0. В клетках N1 и поздних В-клетках N2 оптимум pH для гидролиза Leu-NA находился при pH 7,0-7,5. Активность ферментов тормозилась в присутствии ЭДТА, однако степень торможения в зависимости от pH существенно отличалась. Как видно из рис. 1а, при pH 7,0 в обоих лизатах наблюдалось 50% торможение активности; при pH 8,0 в миелоидных клетках N1 торможение составляло всего 10-15%, а в В-клетках N2 в присутствии ЭДТА и ДТТ отмечалась более высокая активность, чем в пробе без добавок. Как видно из рис.1б, при pH 8,5 в зрелых В- клетках N3, а также в предшественниках лимфоидных клеток N4 наблюдалась более высокая активность в присутствии ЭДТА, чем в его отсутствии. При анализе активности аминопептидазы в области pH 8,0-9,5, как видно из рис.1в, в активированных промежуточных

В-клетках N5 в присутствии ЭДТА и особенно ЭДТА и ДТТ наблюдалось значительное увеличение активности фермента. Это указывало на наличие в клетках аминопептидаз, для функционирования которых важны SH-группы.

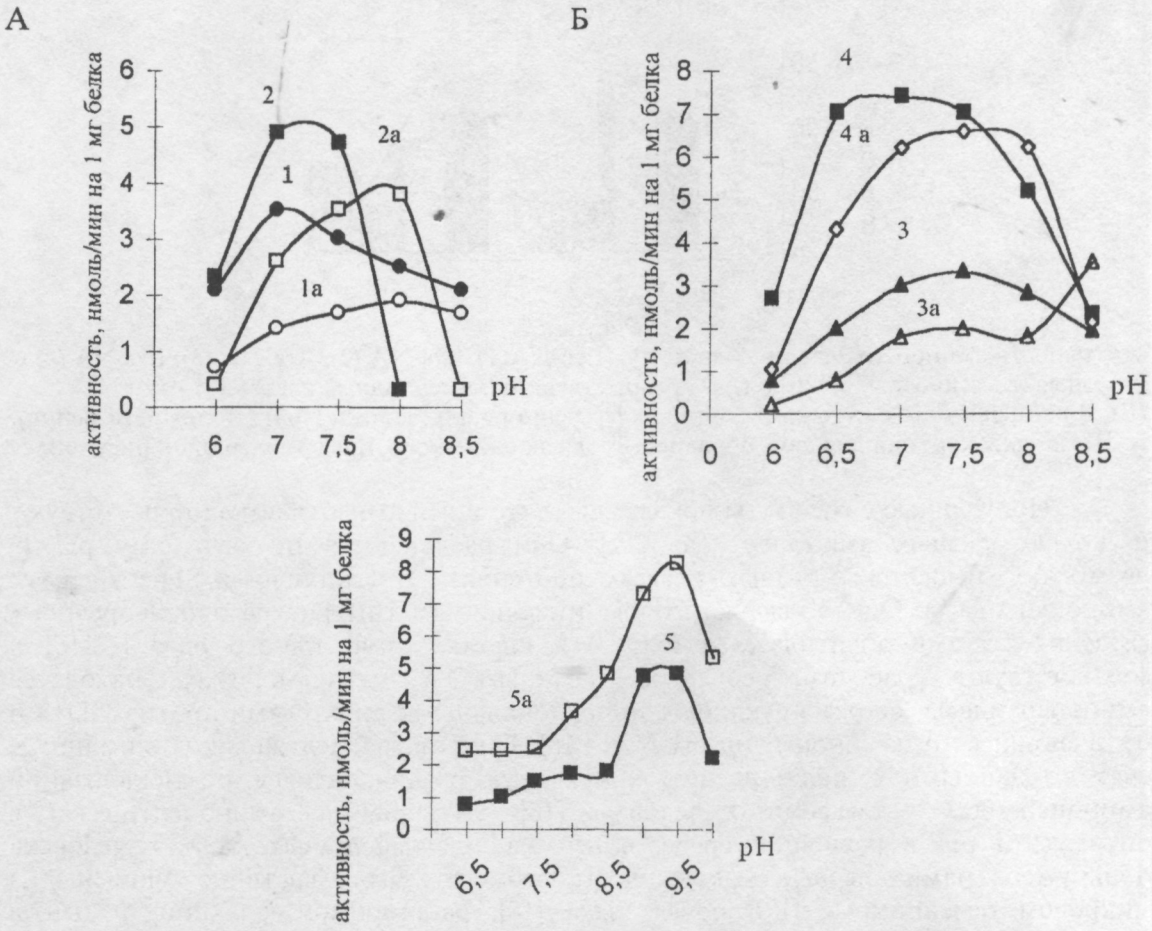

Рисунок 1.
Зависимость гидролиза Leu-NA от pH в лизатах из разных лейкозных клеток. (А):1, 1а-предшественники миелоидных клеток (клетки N1), 2,2а- В клетки поздней стадии дифференцировки (клетки селезенки N2); (Б): 3,3а-предшественники лимфоидных клеток (клетки крови N3), 4,4а- зрелые В-клетки (клетки селезенки N4);(В): 5,5а- активированные В-клетки промежуточной стадии дифференцировки (клетки периферической крови N5), Опыты проводили в 0.05М фосфатном буфере pH 6,0-8,0. Пробы с pH 8,5-9,0 доводили до соответствущего значения pH 2М раствором Na_3PO_4. Концентрация ЭДТА-10^{-3}М (рис.3а и 3в), концетрация ЭДТА и ДТТ -$5x10^{-4}$М (рис.3б); темные значки- без добавок, светлые- в присутствии ЭДТА или ЭДТА и ДТТ.

Для дальнейшей характеристики аминопептидаз было проведено сравнительное исследование гидролиза β-нафтиламидов ряда аминокислот. Было установлено, что в лизатах трех типов лейкозных клеток: предшественниках миелоидных клеток и в двух образцах В-клеток (ранние и промежуточные В-клетки) присутствуют аминопептидазы, расщепляющие наряду с Leu-NA, Ala-NA, Arg-NA и Lys-NA. Соотношение активности по гидролизу разных субстратов в миелоидных и лимфоидных В-клетках отличалось (рис. 2). По сравнению с аминопептидазой N, которая характеризуется более высокой активностью по гидролизу Ala-NA и угнетается пуромицином и бестатином [10, 11], и которая присутствует в исследованных миелоидных клетках N1, ферменты из лимфоидных клеток (N6 и N7, рис.2) лучше гидролизовали Leu-NA и слабо тормозились указанными соединениями. Эти данные указывали на то, что в исследованных клетках

содержатся аминопептидазы, имеющие разную специфичность. Активность по гидролизу Asp-NA, характерная для аминопептидазы А, в исследованных лизатах не была обнаружена.

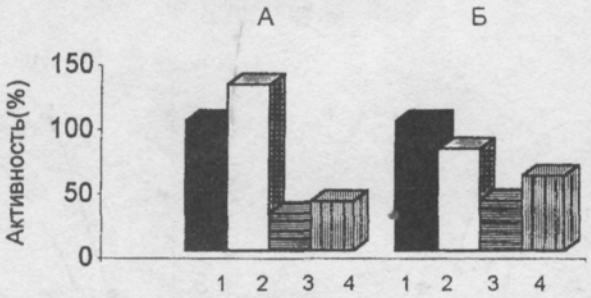

Рисунок 2.
Активность аминопептидаз по гидролизу - Leu-NA(1), Ala-NA (2), Arg-NA (3), Lys-NA (4) в лизатах лейкозных клеток. (А)- предшественники миелоидных клеток (клетки N1); (Б)- В ранней и промежуточной стадии дифференцировки (клетки N6 и N7 соответственно). Поскольку картина для двух образцов В-клеток одинакова, представлен один рисунок.

Полученные результаты показывают, что в лейкозных клетках присутствуют несколько разных аминопептидаз [12]. Они различаются по оптимуму pH и, возможно, относятся к разным классам протеиназ. Это металло- и SH-зависимые аминопептидазы. Они объясняют также имеющиеся в литературе противоречивые сведения об аминопептидазе N (CD13) в клетках лимфоидного ряда [13-15] и соответствуют работам, согласно которым в этих клетках находятся аминопептидазы, не реагирующие с моноклональными антителами против CD13 и отличающиеся от аминопептидазы N [14,15]. Они также заслуживают внимания в связи с данными о наличии нескольких трех различающихся по локализации аминопептидаз в лимфоцитах человека [16]. SH-зависимая аминопептидаза с оптимумом pH в щелочной среде, в лейкозных лимфоидных клетках человека обнаружена нами впервые. Аналогичные ферменты были частично очищены из микросом печени крыс [17], почек быка [18], растворимой фракции плаценты человека [19].

При сопоставлении активности аминопептидаз в серии иммунологически охарактеризованных лейкозных лимфоидных клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки, которые тестировали по гидролизу Leu-NA при pH 7,5 без добавок ЭДТА и ДТТ, нами ранее не было обнаружено соответствия между активностью фермента и определенной стадией дифференцировки В- и Т-клеток [8]. По-видимому, это обусловлено присутствием в клетках в разных соотношениях нескольких аминопептидаз и имеющих, возможно, разную внутриклеточную локализацию Вопрос о том, сколько и какие аминопептидазы присутствуют в различающихся по фенотипу лейкозных лимфоидных клетках и чем они отличаются от аминопептидазы N (CD13), является актуальным и требует дальнейших исследований, так как в последнее время возникают сомнения о целесообразности определения CD13 для диагностики лейкозов [10].

Выражаем благодарность вед. научному сотр. ВГНЦ РАМН Р.С.Самойловой за определение иммунологического фенотипа клеток и д. б. н. Л.А. Локшиной за обсуждение работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shipp M.A., Look A.T.* (1993) Blood, **82,** 1052-1070.
2. *Ashmun R.A and Look A.T.* (1990) Blood, **75**, 462-469.
3. *Lendeckel U.,. Wex Th..,Reinhold D., Kahne Th.., Frank K.., Faust J., Neubert K and Ansorge S.* (1996) Biochem.J., **319**, 817-821.
4. *Rieman D., Kehlen A., Thiele K., Lohn M., Vogel L.K. and Langner J.*(1997) J.Immunol., **158**, 3425-3432.
5. *Локшина Л. А., Былинкина В.С., Самойлова Р.С., Гуреева Т.А., Голубева Н.В., Полянская А.М.* (1993) Биохимия, **58**, 1103-1115.
6. *Гуреева Т.А., Голубева Н.В.,Былинкина В.С., Локшина Л.А., Позднев В.Ф.* (1993) Биохимия, **58**, 1116-1125.
7. *Lokshina L.A., Preobrazhenskaya M.E., Samojlova R.S., Bylinkina V.S., UshakovaN.A.,Gureeva T.A., Golubeva N.V.* (1991) Biochem. Intern., **24**, 31-39.
8. *Локшина Л.А., Гуреева Т.А., ЕлисееваЮ.Е., Голубева Н.В., Кугаевская Е.В., Лубкова О.Н., Самойлова Р.С.* (1999) Биохимия, **64**, 533-542..
9. *Локшина Л.А., Голубева Н.В., Гуреева Т.А., Лубкова О.Н., Палкина Т.Н., Полосухина Е.Р., Барышников А.Ю.* (1998) Гематол. и трансфузиол., **43**, 30-33.
10. *Rieman D., Kehlen .A.. and Langner J.* (1999) Review Immunology Today, **20**, 83-88.
11. *Kenny A.J., Stephenson S.L., Turner A.J..*(1987) in Mammalian ectoenzymes. *(Kenny A.J., Turner A.J.* ,eds.), Elsevier, Amsterdam., pp.169-207.
12. *Favaloro B.J., Browning T., Nandurkar H., Sartor M., Bradstock K.F., Routs J.* (1995) Leukemia Res., **19**, 659-666.
13. *Saito M., Kumagai M., Okazaki T., Nakazava S., Shapiro L.H., Look A.T., Campana D.* (1995) Leukemia, **9**, 1508-1516.
14. *Murray H., Turner A.J., Mcclaren H., Kenny A.J.* (1995) Leukemia & Lymphoma, **17**, 501-595.
15. *Wex T., Lendeckel U., Kahne T., Ittenson A., Frank K., Ansorge S.* (1997) Biochem. & Biophys. Acta , **1355**, 147-154.
16. *Kohno H., Kanno T.* (1985) Int. J. Biochem., **17**, 1143-1148.
17. *Freitas, J.O.Termignoni C, Guimaraes J.A.* (1985.) Int. J. Biochem., **12**.,.1285-1291.
18. *Чулкова Т.М., Орехович В.Н.* (1982) Биохимия, **47**, 1091-1095.
19. *Lampelo S., Lalu K., Vanha-Perttula T.* (1983) J. Biochem., **15**, 709-714.

Поступила 12.04.99.

AMINOPEPTIDASES IN HUMAN LEUKEMIC LYMPHOID CELLS.

T.A. GUREEVA, N.V. GOLUBEVA, O.N. LUBKOVA.

Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya str., 10, Moscow, 119832, fax: (095) 245-08-57

Aminopeptidase activity in lymphoid cells of patients with various lymphoproliferative diseases was studied. The enzyme activity was detected in lysates of all leukemic B- and T-cells. The lymphoid cells contained aminopeptidases of at least two classes: metallo- and SH-dependent enzymes. The SH-dependent aminopeptidase with pH optimum 8,5-9,0 was revealed in lymphoid cells for the first time, and it seems to belong to a poorly studied aminopeptidase family.

Key words: Aminopeptidases, leukemic lymphoid cells.