

فعالیت آنزیمی و ویژگی سوبسترای آنزیم کالیکرین انسانی ۱۳

دکتر علی اوسط ملتی^۱، دکتر الفتریاس دیامندیس^۲

خلاصه

سابقه و هدف: کالیکرین انسانی ۱۳ (hK13) آنزیمی است که توسط ژن hK13 از خانواده‌ی کالیکرین کد می‌شود. مطالعات متعددی وجود hK13 را در مایع منی، مایع آسیتی بیماران با سرطان تخمدان و شیر مادران گزارش کرده‌اند. در این مطالعه فعالیت آنزیمی و ویژگی سوبسترای hK13 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: دی ان آی نو ترکیب ویژه‌ی آنزیم hK13 در داخل سیستم ژنوم *Pichia Pastoris* قرار داده و تکثیر شد. سپس از محلول رویی پس از سانتریفوژ با استفاده از کروماتوگرافی مایع با قدرت سریع آنزیم فوق جدا شده و با استفاده از اولترا فیلتراسیون تغلیظ شد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفلورومتر و یکتور سرعت اولیه‌ی کاتالیزوری آنزیم تعیین شده و برای تعیین ضریب ثابت میکائیلیس و متون از نرم‌افزار کینتیک آنزیمی مدل ۱/۱ متصل به برنامه‌ی گرافی سیگما استفاده شد.

یافته‌ها: دو تری پپتید والینیل - پرولینیل - آرژنین و فنیل آلانینیل - سرینیل - آرژنین متصل به ۷-آمینو ۴-متیل کومارین (AMC) بسیار سریع‌تر از سایر سوبستراها توسط hK13 هیدرولیز شدند و میزان ضریب ثابت میکائیلیس و متون بر ضریب ثابت کاتالیتیکی محاسبه شده برای آن‌ها، نسبت به سایر سوبستراها بسیار بالاتر بود. آنزیم مذکور به سختی قادر به هیدرولیز پیوندهای پپتیدی از طرف عامل کریوکسیل لیزین بود. میزان ضریب ثابت کاتالیتیکی بر ضریب ثابت میکائیلیس و متون برای هیدرولیز سوبسترای والینیل - پرولینیل - آرژنین توسط تریپسین ۱/۵ برابر هیدرولیز این سوبسترا توسط آنزیم hK13 بود.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: تری پپتید والینیل - پرولینیل - آرژنین متصل به ۷-آمینو ۴-متیل کومارین بهترین نوع سوبسترا (در بین ۶ نوع تری پپتید مختلف) برای این آنزیم است. بنابراین شاید بتوان از افزایش اندک میزان hK13 به عنوان یک شاخص تومور برای کمک به تشخیص بیماری‌های سرطان (به ویژه سرطان پستان و تخمدان) استفاده نمود. استفاده از تکنیک‌های پیشرفته‌ی آزمایشگاهی جهت ساختن سوبستراهای ویژه hK13 و مرتفع نمودن مهار فعالیت آنزیم در جریان خون توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: کالیکرین، hK13، تریپسین، سوبسترا، فعالیت آنزیمی

مقدمه

کالیکرین‌ها^۱ زیر مجموعه‌ای از سرین پروتئازها بوده که در بافت‌ها و مایعات بیولوژیکی مختلف یافت می‌شوند. واژه‌ی کالیکرین که اولین بار در سال ۱۹۳۰ به وسیله ورله و هم‌کاران وی به کار برده شد (۱) آنزیمی است که تبدیل مولکول پیش‌ساز کاینینوژن^۲ غیر فعال را به مولکول پپتیدی فعال کینین که وازواکتیو می‌باشد، تسریع می‌کند (۲،۳). مکان ژنی کالیکرین انسان بر روی کروموزوم ۱۳/۴ ۱۹q قرار دارد.

در گذشته در این مکان فقط سه نوع ژن شناسایی شده بود که سه نوع پروتئین کالیکرین ۱ و کالیکرین ۲ و کالیکرین ۳ یا آنتی ژن اختصاصی پروستات^۳ را کد می‌کنند. در بین این سه نوع کالیکرین معروف‌ترین آن‌ها آنتی ژن اختصاصی پروستات می‌باشد که به طور گسترده‌ای برای تعیین کمک به تشخیص بیماران با سرطان پروستات مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). اما در سه سال اخیر تعداد بیشتری ژن در این مکان کشف شده است.

^۱ Kallikreins

^۲ Kininogen

^۳ Prostate - Specific Antigen (PSA)

^۱ دکتر بیوشیمی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

^۲ فوق تخصص بیوشیمی، استاد دپارتمان پاتولوژی، دانشگاه تورنتو، کانادا

مواد و روش‌ها

تری‌پتیدهای متصل به ماده‌ی فلوروژنیک ۷ - آمینو ۴ - متیل کومارین مربوط به کمپانی BACHEM Bioscience به عنوان سوبسترا در این مطالعه به کار برده شدند. سوبستراهای فوق در حلال دی متیل سولفواکسید با غلظت نهایی ۸۰ میلی مول تهیه شده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد. سدیم دو دسیل سولفات - پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز^۱ از شرکت Invitrogen، تریپسین و ۷- آمینو - ۴- متیل کومارین و مابقی مواد از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم از دستگاه اسپکتروفلورومتر (Wallac Victor Fluorometer (Perkin- Elmer) استفاده شد.

خالص سازی hK13: دی ان آی نو ترکیب^۲ ویژه‌ی آنزیم hK13 در داخل سیستم ژنوم Pichia Pastoris قرار داده شده و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در محیط کشت مخصوص تکثیر داده شد. سپس محلول رویی^۳ آن که حاوی hK13 بود به وسیله‌ی سانتریفوژ جدا شد. خالص سازی hK13 با استفاده از کروماتوگرافی مایع با قدرت سریع^۴ انجام گرفت. آنزیم خالص شده با استفاده از اولترافیلتراسیون (Millipore filter device) تغلیظ شد. برای تأیید درجه خلوص آنزیم از تکنیک الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز استفاده شد که باند واحد مشاهده شده، دلیل بر خالص بودن آنزیم بود (شکل ۱). آنزیم خالص شده را در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرده و در مواقع لازم جهت آزمایشات مختلف از آن استفاده می‌شد.

سنجش فعالیت آنزیم و تعیین ثابت‌های کینتیکی: بعد از آزمایشات متعدد بهترین سیستم تامپونی برای حداکثر فعالیت آنزیمی سیستم حاوی ۵۰ میلی مول تریس، کلرور سدیم ۰/۱ مولار و ۰/۲ درصد آلبومین سرم گاوی با پی‌اچ برابر ۷/۴ تعیین شد.

به طوری که تعداد آن‌ها به ۱۵ ژن رسیده و آن‌ها را به ترتیب از کالیکرین ۱ تا ۱۵ نام گذاری کرده‌اند. این ژن‌ها پروتئین‌های کالیکرین انسانی ۱ تا ۱۵ را کد می‌کنند که اغلب فعالیت‌های آنزیمی دارند (۵،۶). فعالیت کاتالیزوری بیشتر کالیکرین‌ها شبیه تریپسین بوده و پیوندهای پپتیدی بعد از عامل کربوکسیل آرژینین ولیزین را هیدرولیز می‌کنند (۷،۸). تعداد معدودی نیز فعالیت کاتالیزوری شبیه به کیموتریپسین داشته و پیوندهای پپتیدی از طرف عامل کربوکسیل اسیدهای آمینه با ریشه‌ی جانبی حلقوی را هیدرولیز می‌کنند (۹). هم‌چنین آنزیم‌های کالیکرین شبیه به پروتئازها ابتدا به صورت زیموژن غیر فعال ترشح شده و با عمل اتولیز و جدا شدن یک پپتید از آن‌ها به صورت آنزیم‌های فعال تغییر شکل می‌دهند. KLK13 که KLK-L4 نیز نامیده می‌شود یکی از ۱۵ ژنی است که به تازگی از خانواده‌ی کالیکرین و بر روی کروموزوم ۱۳/۴q ۱۹ کشف شده و سپس کلون شده است (۱۰). این ژن آنزیم کالیکرین انسانی (hK13) را کد می‌کند که تقریباً ۴۵ تا ۴۷ درصد از لحاظ ردیف اسید آمینه‌ای، شبیه به آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (hk3) و hK2 می‌باشد. محققان با به کار بردن تکنیک‌ها و وسایل آزمایشگاهی پیشرفته در مقالات متعددی وجود hK13 را در مایع سمینال، مایع آسیتی بیماران با سرطان تخمدان و شیر مادران گزارش کرده‌اند (۱۲،۱۳). در مورد ویژگی سوبسترای آنتی‌ژن اختصاصی پروستات و hK2 مطالعات جامعی انجام گرفته و کیت‌هایی نیز بر این اساس ساخته شده است (۸،۱۱). اما برای تعیین فعالیت hK13 به طور معمول از سوبستراهای ویژه تریپسین استفاده شده و فعالیت آن با hK13 مورد مقایسه قرار گرفته است (۷،۸). هم‌چنان که hK2 و hK3 به عنوان شاخص‌هایی در کمک به تشخیص سرطان پروستات مورد استفاده قرار می‌گیرند، ما نیز در این مطالعه فعالیت آنزیمی و ویژگی سوبسترای آنزیم hK13 را مورد مطالعه قرار داده تا شاید بتوان در آینده از آن برای کمک به تشخیص بیماری‌های سرطانی (به ویژه سرطان پستان و تخمدان) استفاده کرد. این مطالعه در سال ۱۳۸۱ در دانشگاه تورتو، بیمارستان ماونت سینایی انجام شد.

^۱ SDS-PAGE

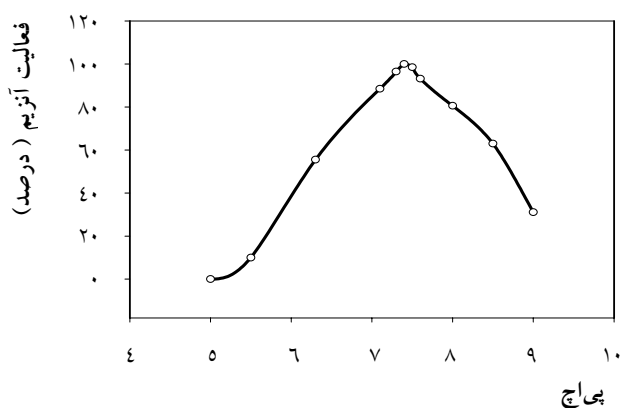
^۲ Recombinant DNA

^۳ Supernatant

^۴ Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)

یافته‌ها

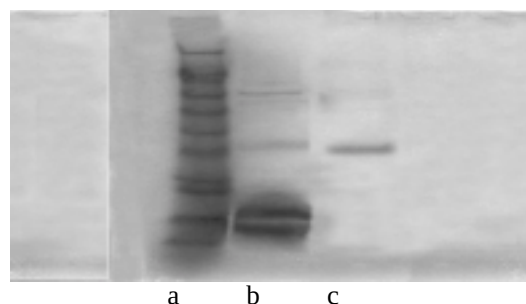
تعیین بهترین پی‌اچ برای آنزیم hK13: وابستگی فعالیت آنزیم hK13 به پی‌اچ در نمودار (۱) ارایه شده است. هم‌چنان‌که مشاهده می‌شود از محلول‌های با پی‌اچ برابر با ۵ تا پی‌اچ ۹، حداکثر فعالیت این آنزیم در پی‌اچ برابر با ۷/۴ بوده که می‌تواند برای فعالیت آنزیمی فوق پی‌اچ مطلوب باشد.



نمودار ۱ - فعالیت آنزیم hK13 در محیط‌های با پی‌اچ متفاوت

سوبسترای مناسب برای آنزیم hK13: فعالیت کاتالیزوری hK13 با به کار بردن تری‌پتیدهای متعدد که از طرف اسید آمینه‌ی آرژینین یا لیزین به ماده‌ی فلورسانس ۷-آمینو-۴-متیل کومارین پیوند کوالانسی داشتند، مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول شماره‌ی (۱) مشاهده می‌شود.

این آنزیم دو سوبسترای والینیل - لوسینیل - لیزین متصل به ۷-آمینو-۴-متیل کومارین (VPR-AMC) و فنیل آلانین - سرینیل آرژینین متصل به ۷-آمینو-۴-متیل کومارین (FSR-AMC) را بسیار سریع‌تر از بقیه‌ی سوبستراها هیدرولیز کرد. هم‌چنان‌که در جدول شماره‌ی (۱) مشاهده می‌شود میزان ضریب ثابت کاتالیتیکی و نسبت ضریب ثابت کاتالیتیکی بر ضریب ثابت میکائیلیس و منتون (K_{cat}/K_m) محاسبه شده برای سوبستراهای فوق نسبت به سایر سوبستراها بسیار بالاتر است. hK13 سوبستراهایی را که از طرف اسید آمینه‌ی لیزین به ۷-آمینو-۴-متیل کومارین متصل بودند به سختی هیدرولیز می‌کرد، زیرا که تنها بعد از



شکل ۱ - تصویر الکتروفورزی بعد از خالص سازی hK13

(a) مارکرهای پروتئینی با وزن مولکولی مختلف
(b) پروتئین‌های محلول رویی
(c) hK13 خالص شده

تمامی حجم محلول به کار برده شده شامل سوبسترا، تامپون، آنزیم و غیره در کووت (چاهک میکروپلیت) برابر ۱۰۰ میکرولیتر بود که در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اسپکتروفلورومتر انکوبه می‌شد. میزان فلورسانس در محدوده‌ی طول موج ۴۸۵ نانومتر و ۵۳۵ نانومتر خوانده می‌شد. فلورسانس زمینه‌ای (بدون حضور آنزیم) اندازه‌گیری شده و از تمامی فلورسانس در حضور آنزیم کسر می‌شد. تمامی آزمایشات در سه نوبت تکرار شد.

با انکوباسیون ۸/۲ نانو مولار آنزیم hK13 و غلظت‌های متفاوت (۰/۰۶۲۵ تا ۳ میلی مولار) از سوبستراهای مختلف سرعت عمل کاتالیزوری آنزیم hK13 اندازه‌گیری و میزان ضریب ثابت کاتالیتیکی و ضریب ثابت میکائیلیس و منتون تعیین شد. لازم به ذکر است که ضریب ثابت کاتالیتیکی با میزان فعالیت آنزیم رابطه‌ی مستقیم و ضریب ثابت میکائیلیس و منتون با فعالیت آنزیم، رابطه‌ی معکوس دارد. مقدار سوبستراهای به کار برده شده ۰/۲ تا ۵ برابر ضریب ثابت میکائیلیس و منتون بوده و مقدار ثابت‌های کینتیکی با استفاده از منحنی لینیور-برگ محاسبه شد.

برای تعیین ضریب ثابت میکائیلیس و منتون از نرم‌افزار کینتیک آنزیمی مدل ۱/۱ متصل به برنامه گرافی سیگما (plot, SSPS Inc) استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات هیدرولیز سوبستراهای مختلف به وسیله آنزیم کالیکرین انسانی ۱۳ (hK13)

سوبسترا	حداکثر سرعت هیدرولیز	حداکثر سرعت (تغییرات فلورسانس در دقیقه)	غلظت کالیکرین انسانی شماره ۱۳ (نانو مولار)	ضریب ثابت کاتالیتیکی (دقیقه ^{-۱})	ضریب ثابت میکائیلیس و متون (میلی مولار)	ضریب ثابت کاتالیتیکی بر ضریب ثابت میکائیلیس و متون (دقیقه ^{-۱} × میلی مولار)
^۱ VPR-AMC	۱۵۹۲۹	۰/۶۱۷	۸/۲	۷۵/۲۴	۰/۲۱۳	۳۵۳/۲
^۲ QGR-AMC	۲۳۶۳	۰/۰۷۸	۱۲/۳	۶/۳۴	۰/۳۷۸	۱۶/۸
^۳ FSR-AMC	۵۳۱۵	۰/۱۷۱	۸/۲	۲۰/۸۵	۰/۱۸۶	۱۱۲/۱
^۴ DPR-AMC	۴۶۱۴	۰/۱۴۹	۸/۲	۱۸/۱۷	۰/۳۰۵	۵۹/۵
^۵ VLK-AMC	۱۷۳۶۰	۰/۶۸۸	۶۵/۶	۱۰/۵	۳	عدم واکنش
^۶ EKK-AMC	عدم واکنش	عدم واکنش	عدم واکنش	عدم واکنش	عدم واکنش	عدم واکنش

^۱ والینیل - پرولینیل - آرژنین، ۷- آمینو - ۴ - متیل کومارین
^۲ گلوتامینیل - گلیسینیل - آرژنین، ۷- آمینو - ۴ - متیل کومارین
^۳ فنیل آلانینیل - سرینیل - آرژنین، ۷- آمینو - ۴ - متیل کومارین
^۴ آسپارتاتیل - پرولینیل - آرژنین، ۷- آمینو - ۴ - متیل کومارین
^۵ والینیل - لوسینیل - لیزین، ۷- آمینو - ۴ - متیل کومارین
^۶ گلوتاماتیل - لیزینیل - لیزین، ۷- آمینو - ۴ - متیل کومارین

مقایسه‌ی هیدرولیز دو نوع سوبسترا به وسیله‌ی تریپسین و hK13: هیدرولیز دوسوبسترای والینیل - پرولینیل - آرژنین متصل به AMC (Val-Pro-Arg-AMC) و والینیل - لوسینیل - لیزین متصل به AMC (Val-Leu-Lys-AMC) توسط آنزیم‌های تریپسین و hK13 و مقدار ثابت‌های کینتیکی آن‌ها در جدول شماره‌ی (۲) خلاصه شده است. هم‌چنان که مشاهده می‌شود میزان ضریب ثابت کاتالیتیکی به ضریب ثابت میکائیلیس و متون برای هیدرولیز سوبسترای والینیل - پرولینیل - آرژنین متصل به AMC توسط تریپسین و والینیل - پرولینیل - آرژنین، ۷- آمینو - ۴ - متیل کومارین برابر هیدرولیز این سوبسترا توسط آنزیم hK13 است.

۸ برابر نمودن غلظت آنزیم (۶۵/۰۶ نانو متر) توانست والینیل - لوسینیل - لیزین متصل به AMC (Val-Leu-Lys-AMC) را هیدرولیز کرده و حتی در غلظت بسیار بالا قادر به هیدرولیز سوبسترای گلوتاماتیل - لیزینیل - لیزین متصل به ۷- آمینو - ۴ - متیل کومارین (Glu-Lys-Lys-AMC) نبود، به طوری که امکان محاسبه‌ی ضریب ثابت کاتالیتیکی برای آن وجود نداشت. هیدرولیز سوبسترای ویژه‌ی کیموتریپسین یعنی آلانینیل - آلانینیل - پرولینیل - فنیل آلانینیل متصل به AMC (Ala-Ala-Pro-Phe-AMC) توسط آنزیم hK13 میسر نشد.

جدول ۲- مقایسه‌ی هیدرولیز سوبستراها به وسیله آنزیم کالیکرین انسانی ۱۳ (hK13) و تریپسین

آنزیم	سوبسترا	حداکثر سرعت هیدرولیز (تغییرات فلورسانس در دقیقه)	حداکثر سرعت هیدرولیز (میکرو مولار در دقیقه)	غلظت کالیکرین انسانی شماره ۱۳ (نانو مولار)	ضریب ثابت کاتالیتیکی (دقیقه ^{-۱})	ضریب ثابت میکائیلیس و متون (میلی مولار)	ضریب ثابت کاتالیتیکی بر ضریب ثابت میکائیلیس و متون (دقیقه ^{-۱} × میلی مولار)
تریپسین	^۱ VPR-AMC	۲۵۲۰۰	۱/۰۱	۸/۲	۱۲۳/۲	۰/۱۵	۸۲۱
تریپسین	^۲ VLK-AMC	۳۳۵۰۰	۱/۳	۸/۲	۱۵۹/۷	۰/۱۲	۱۳۳۱
hK13	VPR-AMC	۱۵۹۲۹	۰/۶۲	۸/۲	۷۵/۲	۰/۲۱	۳۵۳/۲
hK13	VLK-AMC	۱۷۳۶۰	۰/۶۹	۶۵/۶	۱۰/۵	۳/۵	۳/۵

^۱ والینیل - پرولینیل - آرژنین، ۷- آمینو - ۴ - متیل کومارین
^۲ والینیل - لوسینیل - لیزین، ۷- آمینو - ۴ - متیل کومارین

فوق (حتی در غلظت بسیار بالا) قادر به هیدرولیز سوبسترای گلوتاماتیل - لیزینیل - لیزین (EKK) متصل به AMC (حاوی اسید آمینه‌ی لیزین) نبود. بنابراین در مقایسه با مطالعات دیگر محققین (۷، ۱۶) که معتقدند آنزیم‌های خانواده‌ی کالیکرین شبیه به تریپسین و سرین پروتازها پیوندهای پپتیدی از طرف عامل کربوکسیل آرژنین (Arg) و لیزین (Lys) را هیدرولیز می‌کنند، آنزیم hK13 نیز پیوندهای پپتیدی از طرف عامل کربوکسیل آرژنین را به خوبی هیدرولیز کرده اما به سختی قادر به هیدرولیز پیوندهای پپتیدی از طرف عامل کربوکسیل لیزین می‌باشد. لازم به ذکر است که قدرت عمل کاتالیزوری hK13 به مراتب کمتر از تریپسین است. به طوری که میزان ضریب ثابت کاتالیتیکی نسبت به ضریب ثابت میکائیلیس و متون برای هیدرولیز سوبسترای والینیل - پرولینیل - آرژنین متصل به AMC توسط تریپسین ۱/۵ برابر هیدرولیز این سوبسترا توسط آنزیم hK13 است، هم‌چنین میزان Kcat/Km برای هیدرولیز سوبسترای حاوی لیزین (VLK-AMC) توسط تریپسین تقریباً ۴۵۰ برابر Kcat/Km برای هیدرولیز همین سوبسترا توسط hK13 است.

به جز کالیکرین ۱ که کاینینوژن را تبدیل به برادی کینین می‌کند و در روند فعال سازی هورمون رشد و هورمون‌های لپیدی نقش دارد (۱۷)، نقش بیولوژیکی سایر کالیکرین‌ها به خوبی شناخته نشده است. اما مطالعات مختلف ارتباط افزایش بعضی از کالیکرین‌ها را با سرطان مورد تایید قرار داده‌اند (۱۸، ۱۹). کاربردی ترین کالیکرین‌ها (در بین ۱۵ نوع) hK3 یا همان آنتی ژن اختصاصی پروستات است که به عنوان شاخص برای کمک به تشخیص سرطان پروستات مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). کالیکرین دیگر hK2 بوده که هم‌راه آنتی ژن اختصاصی پروستات در سرطان پروستات افزایش می‌یابد و به علت عدم اختصاصی بودن آن نسبت به سوبسترا به عنوان شاخص تشخیص به کار برده نمی‌شود (۲۰). آنتی ژن اختصاصی پروستات ویژگی سوبسترای شبیه کیموتریپسین داشته، در صورتی که hK2 عمل کاتالیزوری شبیه تریپسین دارد. به تازگی دریافته‌اند که دوکالیکرین hK6

هم‌چنین آنزیم تریپسین سوبسترای والینیل - لوسینیل - لیزین متصل به AMC (Val-Leu-Lys-AMC) را به خوبی هیدرولیز می‌کند، در صورتی که آنزیم hK13 به سختی موجب هیدرولیز این سوبسترا می‌شود.

بحث

نتایج این بررسی نشان‌گر آن است که hK13 آنزیم فعالی بوده و تری پپتیدهای فلوروژنیک را از طرف عامل کربوکسیل آرژنین هیدرولیز می‌نماید و تری پپتید والینیل - پرولینیل - آرژنین متصل به AMC (Val-Pro-Arg-AMC) بهترین نوع سوبسترا (در بین ۶ نوع تری پپتید مختلف) برای hK13 است. در این مطالعه با مشاهده‌ی باند واحدی که بر روی صفحه الکتروفورز (SDS-PAGE) نمایان شد خالص بودن آنزیم مورد تایید قرار گرفت. برای تعیین فعالیت آنزیمی و ویژگی سوبسترای hK13 از ۶ نوع تری پپتید با خاصیت فلورسانس استفاده شد. چهارنوع از این سوبستراها از طرف عامل کربوکسیل اسید آمینه‌ی آرژنین و ۲ نوع آن از طرف عامل کربوکسیل اسید آمینه‌ی لیزین به ماده‌ی فلورسانس AMC متصل بودند. سوبسترای والینیل - پرولینیل - آرژنین متصل به (VPF-AMC) به عنوان بهترین نوع سوبسترا (در بین ۶ نوع تری پپتید) برای hK13 تعیین شد، زیرا که به راحتی توسط آنزیم هیدرولیز شده و بالاترین میزان ضریب ثابت کاتالیتیکی و ضریب ثابت کاتالیتیکی نسبت به ضریب ثابت میکائیلیس و متون برای آن محاسبه شد. لازم به ذکر است که سوبسترای فوق بهترین نوع سوبسترا برای آنزیم‌های hK2 و hK8 نیز شناخته شده است (۱۴، ۱۵). هم‌چنین سوبسترای فیل آلانینیل - سرینیل - آرژنین متصل به AMC (FSR) نیز به خوبی توسط hK13 هیدرولیز شده اما مقدار ضریب ثابت کاتالیتیکی و ضریب ثابت کاتالیتیکی نسبت به ضریب ثابت میکائیلیس و متون مربوطه به آن کمتر از سوبسترای VPR بود. hK13 به سختی (با ۸ برابر نمودن غلظت) توان هیدرولیز والینیل - لوسینیل - لیزین (VLK) متصل به AMC (تری پپتید حاوی لیزین) را داشته، اما آنزیم

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر خانی ریاست محترم دانشگاه که با فرصت مطالعاتی اینجانب موافقت نموده‌اند و هم‌چنین از همکاران محترم دکتر ابوالفضل نظریان و دکتر داود سهرابی، در این مدت مرا یاری نموده‌اند قدردانی می‌گردد. هم‌چنین از راهنمایی‌های ارزنده‌ی سرکار خانم دکتر شریفی و سرکار خانم نمدیان در تهیه و تنظیم این مقاله سپاس گزارم.

و hK₁₀ می‌توانند شاخص بیولوژیکی بالقوه برای سرطان تخمدان باشند (۲۱،۲۲). وجود hK₁₃ نیز در پستان و بعضی از اندام‌های دیگر محرز شده (۱۲،۱۳) اما تاکنون به عنوان یک تومور مارکر برای یک بافت ویژه از آن نام برده نشده است. بنابراین با استفاده از تکنیک‌های پیشرفته آزمایشگاهی و پیدا کردن سوبسترای ویژه و مرتفع نمودن مهار فعالیت آنزیم در جریان خون شاید بتوان از افزایش اندک میزان hK₁₃ به عنوان یک تومور مارکر در کمک به تشخیص سرطان استفاده نمود.

منابع

- 1 - Werle E. Zur kenntnis des haushalts des Kallikreins. *Biochem Z* 1934;269: 415-35.
- 2 - Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of Kinins: Kallikreins, Kininogens, and Kininases. *Pharmacol Rev* 1992;44:1-80.
- 3 - Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue Kallikrein gene family: structure, function and association to disease. *Endocrinology Rev* 2001;22:184-204.
- 4 - Diamandis EP, YU H. New biological function of prostate-specific antigen. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1515-7.
- 5 - Evans BA, Yun zx, Close JA, et al. Structure and chromosomal localization of the human renal Kallikrein gene. *Biochemistry* 1988;27:3124-9.
- 6 - Liu xl, Wazer DE, Watanabe K, Band V. Identification of a novel serine protease-like gene, the expression of which is down regulated during breast cancer progression. *Cancer Res* 1996;56:3371-9.
- 7 - Yamashiro K, Tsuruoko N, Kodama S, et al. Molecular cloning of a novel trypsin-like serine protease (neurosin) preferentially expressed in brain. *Biochim Bioshys Acta* 1997;1350:11-4.
- 8 - Ban Y, Wang MC, Watt KW, Loo R, Chu TM. The proteolytic activity of human prostate-specific antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:482-8.
- 9 - Hansson L, Stromqvist M, Backman A, Wallbrant A, Egelrud T. Cloning, expression and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme, a skin-specific human serine proteinase. *J Biol Chem* 1994;269:19420-6.
- 10 - Yousef GM, Chang A, Diamandis EP. Identification and characterization of KLK-L4, a new Kallikrein-Like gene which appears to be down-regulated in breast cancer tissues. *J Biol Chem* 2000;275:11891-8.
- 11 - Lovgren J, Airas K, Lilja H. Enzymatic action of human glandular Kallikrein2 (hK2) substrate specificity and regulation by zn²⁺ and extracellular protease inhibitors. *Eur J Biochem* 1999;262:781-9.
- 12 - Matsumura Y, Kimura M, Yamamoto T, Maeda H. Involvement of the kinin generating cascade in enhanced vascular permeability in tumor tissue. *Jpn J Cancer Res* 1988;79:1327-34.
- 13 - Roberts RA, Gullick WJ. Bradykinin receptor number and sensitivity to ligand stimulation of mitogenesis by expression of mutant ras. *Oncogene* 1989;94:527-35.

- 14 - Little SP, Dixon EP, Norris F, Buckley W, Becker GW. Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain. **J Biol Chem** 1997;272:25135-42.
- 15 - Yoshida S, Taniguchi M, Hirata A, Shiosaka S. Sequence analysis and expression of human neuropsin cDNA and its genom. **Gene** 1998;213:9-16.
- 16 - Watt KW, Lee PJM, Timkulu T, Chan WP, Loo R. Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986;83:3166-70.
- 17 - Mason AJ, Evans BA, Cox Dh, Shine J, Richards RI. Structure of mouse Kallikrein gene family suggests a role in specific processing of biological active peptides. **Nature** 1983; 303:300-7.
- 18 - Matsumara Y, Kimura M, Yamaoto T, Maeda H. Involvement of the kinino generating cascade in enhanced vascular permeability in tumour tissue. **JPN J Cancer Res** 1988; 79: 1327-34.
- 19 - Jones TH, Figueroa CD, Smith C, Cullen DR, Bhoola KD. Characterization of a tissue Kallikrein in human prolactin-Secreting adenomas. **J Endocrinology** 1990; 124: 327-31.
- 20 - Rittenhouse HG, Finlay JA, Mikolajczyk SD, Partin AW. Human kallikrein 2 (hk2) and prostate - specific antigen (PSA): two closely related but distinct, Kallikreins in the prostate. **Crit Rev Clin Lab Sci** 1998; 35: 275-368.
- 21 - Diamandis EP, Yousef GM, Soosaipillai AH. Human Kallikrein 6: a new serum biomaker of ovarian carcinoma. **Clin Biochem** 2000; 33:579-83.
- 22 - Luo LY, Bunting P, Scorilas A, Diamandis ET. Human Kallikrein 10: a novel tumor marker for ovarian carcinoma. **Clin Chim Acta** 2001; 306: 111-8.