

УДК 577.152.344:577.15.072

К. А. Філіпцова, асп., **І. Л. Вовчук**, канд. біол. наук, докторант
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра біохімії,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна. Тел: (0482) 68-78-75,
e-mail: irvov@mail.ru

ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А З ТКАНИН МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ МЕТОДОМ ВИСОЛЕННЯ СУЛЬФАТОМ АМОНІЮ

Розроблено метод виділення та очищення карбоксипептидази А, який складається з поетапного осадження сульфатом амонію з наступним діалізом в присутності іонів Zn^{++} . Встановлено, що поетапне осадження сульфатом амонію сприяє більш ефективному фракціонуванню карбоксипептидази А, а іони Zn^{++} сприяють збереженню активності ферменту в процесі діалізу. Частково очищені препарати карбоксипептидази А отримано з немалігнізованої тканини, а також з тканин доброякісних та злоякісних новоутворень молочної залози.

Ключові слова: карбоксипептидаза А, виділення ферменту, молочна залоза.

Лізосомальна карбоксипептидаза А (КФ 3.4.2.1) в значній мірі забезпечує протеолітичний потенціал клітини [1] та приймає участь у клітинному метаболізмі звичайних та аномальних білків: гемоглобіну, імуноглобуліну, антигену гепатиту В, нейротоксину ІІІ; в протеолітичному процесингу брадикініну, інсуліну, агоністів опіоїдних гормонів; обмеженому протеолізі попередників ферментів, а також в анаболізмі дипептидів та глюкозону.

На сьогоднішній час даний фермент виділений з різних біологічних об'єктів. Так, за допомогою іонообмінної хроматографії була виділена і очищена карбоксипептидаза А з головного мозку щурів [2], підшлункової залози свині [3] і великої рогатої худоби [4]. Метод гель-фільтрації використовували для очищення карбоксипептидази А з епідермальних клітин дводенних щурів [5] та концентрованої сечі людини [6]. Методом афінної хроматографії, за допомогою якої можна одночасно виділяти і очищати вибраний адсорбований фермент, була отримана очищена карбоксипептидаза А з культури клітин мишей [7], водних екстрактів підшлункової залози ссавців [8], сечі [6] і легень людини [9]. Однак, у світовій літературі нами не виявлено досліджень, присвячених виділенню карбоксипептидази А з тканин молочної залози.

Мета роботи — розробити метод виділення і очищення карбоксипептидази А з немалігнізованої тканини молочної залози, а також з тканин доброякісних і злоякісних новоутворень цієї залози.

Матеріали і методи

Досліджували зразки немалігнізованої тканини та зразки новоутворень молочної залози, вилучених операційним шляхом у жінок, які не отримували медикаментозного доопераційного лікування. Патоморфологічні діагнози — фіброзно-кістозна хвороба, проліферуюча і помірно диференційована форма інфільтруючого протокового раку молочної залози — були верифіковані за міжнародною класифікацією ВОЗ із визначенням морфологічного стану і ступеня диференціації трансформованих клітин пухлинної тканини [10].

Зразки тканин гомогенізували в дистильованій воді (у співвідношенні 1 : 10) і центрифугували при 9000 g/хв за +4 оС протягом 45 хв. Для очищення екстракту від низькомолекулярних домішок використовували метод діалізу проти 20-кратного об'єму дистильованої води в присутності 2 мМ Zn^{++} та без його додавання [11]. Розчини білків, отримані після діалізу, піддавали поетапному фракціонуванню сульфатом амонію [11]. Для очищення від надлишку $(NH_4)_2SO_4$, що заважав визначенню білка по методу Lowry [12], фракції, отримані за 20%, 40%, 60% і 80% насичення сульфатом амонію, піддавали повторному діалізу за вище зазначених умов. У фракціях визначали активність карбоксипептидази А по гідролізу синтетичного субстрату карбобензоксифенілаланіну — 2 мМ [13]. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 570 нм, відносну активність ферментів виражали в ммоль фенілаланіну на мг тканини за 30 хв інкубації при 37 оС, питому активність — в мкмоль фенілаланіну на мг білка.

Результати та їх обговорення

Етапи виділення та очищення карбоксипептидази А з немалігнізованої тканини молочної залози, тканин доброякісного і злоякісного новоутворень молочної залози представлені в табл. 1, 2, 3. За результатами обох варіантів діалізу встановлено, що від 7 до 14% загального вмісту білка представлено низькомолекулярними компонентами. Умови звичайного діалізу (без розчину Zn^{++}) практично не впливали на відносну та питому активність карбоксипептидази А немалігнізованої тканини (табл. 1) та приводили до зниження відносної (в 1,2 рази) і питомої (в 1,1 рази) активності ферменту з тканин доброякісного і злоякісного новоутворень молочної залози (табл. 2, 3). Діаліз за додавання 2 мМ розчину Zn^{++} , на відміну від звичайного діалізу, приводив до незначного збільшення питомої активності ферменту (в 1,1 рази) в усіх трьох досліджуваних зразках тканин молочної залози (табл. 1, 2, 3). Отримані результати свідчать про те, що атом Zn^{++} в молекулі карбоксипептидази А, виділеної з тканин доброякісного і злоякісного новоутворень молочної залози, ймовірно, недостатньо міцно зв'язаний з апоферментом і втрачається під час діалізу, який провадили без додавання Zn^{++} ,

що, за даними інших дослідників, може призвести до часткового протеолізу [14]. В протилежність цьому, можна очікувати, що використання іонів Zn^{++} в процесі діалізу приводить до стабілізації зв'язку атома Zn^{++} з апоферментом. В зв'язку з цим подальше поетапне фракціонування карбоксипептидази А сульфатом амонію проводили, використовуючи діалізат, отриманий за додавання іонів Zn^{++} .

За даними літератури, карбоксипептидаза А осаджується за 60–80% насичення [14]. Нами при поетапному висоленні білків сульфатом амонію було виявлено наявність не менш 4 фракцій карбоксипептидази А, які осаджувались при різних ступенях насичення.

Щодо показників діалізованого розчину білка, то за 20% насичення сульфатом амонію осаджується 11,3%, 7,8% і 8,3% загального білка та 19%, 22% і 19% ферментативної активності немалігнізованої тканини молочної залози, тканин доброякісного і злоякісного новоутворень молочної залози відповідно. Загальна активність карбоксипептидази А цієї фракції в досліджуваних зразках тканин зменшується від 4,6 раза до 5,3 раза, але питома активність та коефіцієнт очищення збільшуються приблизно в 8,0 разів в немалігнізованій тканині молочної залози та в 13,3 і 11,8 рази в тканинах з доброякісною і злоякісною патологією молочної залози (табл. 1, 2, 3). Отримані результати свідчать про втрату під час фракціонування факторів, які регулюють ферментативну активність, серед яких можуть бути ендogenousні інгібітори карбоксипептидази А.

За 40% насичення сульфатом амонію, в порівнянні з іншими етапами висолення, в досліджуваних зразках тканин молочної залози осаджується від 82,2 до 90% загального білка та від 25 до 30% ферментативної активності (табл. 1, 2, 3). Однак, коефіцієнт очищення та питома активність незначно відрізняються (підвищуються в 1,1–1,3 рази) від показників діалізованого розчину.

Щодо показників діалізованого розчину білка, то за 60% насичення сульфатом амонію в досліджуваних зразках тканин молочної залози осаджується від 6 до 12% загального білка та від 23 до 51% ферментативної активності (табл. 1, 2, 3). Коефіцієнт очищення карбоксипептидази А з тканин доброякісного та злоякісного новоутворень молочної залози становив 9,2 та 8,3 рази відповідно, а з немалігнізованої тканини — 37,3 рази.

Максимальний вихід ферменту — 68, 102 і 98% — був отриманий за 80% насичення сульфатом амонію при найнижчому вмісті загального білка (до 4%) в усіх трьох досліджуваних зразках тканин молочної залози (табл. 1, 2, 3). Ступінь очищення та питома активність ферменту немалігнізованої тканини, тканин доброякісного і злоякісного новоутворень молочної залози на даному етапі становили 32,1, 40,8 і 34,8 разів відносно показників діалізованого розчину (табл. 1, 2, 3).

Таблиця 1
Активність карбоксипептидази А на різних етапах виділення і очищення ферменту з немалігнізованої тканини молочної залози

Етапи виділення	V, мл	Концентрація білка, г білка / г тканини	Активність карбоксипептидази А		Загальна активність (ВА•V)	К очищення	% виходу
			ммоль фено / мг тканини	мкмоль фено / мг білка			
Екстракт до діалізу	36,0	0,080 ± 0,008	0,00353 ± 0,0004	0,044 ± 0,004	0,127 ± 0,013	1	100
Екстракт після діалізу без 2 мМ Zn ⁺⁺	36,0	0,074 ± 0,007	0,00333 ± 0,0003	0,045 ± 0,005	0,120 ± 0,012	1,02	95
Екстракт після діалізу з 2 мМ Zn ⁺⁺	36,0	0,074 ± 0,007	0,00350 ± 0,0004	0,047 ± 0,005	0,126 ± 0,013	1,07 (1)	99 (100)
20% насичення	7,0	0,009 ± 0,001	0,00340 ± 0,0003	0,378 ± 0,038	0,024 ± 0,002	8,04	19
40% насичення	9,0	0,072 ± 0,001	0,00352 ± 0,0004	0,049 ± 0,005	0,032 ± 0,003	1,04	25
60% насичення	7,3	0,005 ± 0,001	0,00877 ± 0,0009	1,754 ± 0,175	0,064 ± 0,006	37,32	51
80% насичення	19,0	0,003 ± 0,0003	0,00452 ± 0,0005	1,507 ± 0,151	0,086 ± 0,009	32,06	68

Таблиця 2

**Активність карбоксипептидази А на різних етапах виділення і очищення ферменту з тканини
проліферуючої форми фіброзно-кістозної хвороби молочної залози**

Етапи виділення	V, мл	Концентрація білка, г білка / г тканини	Активність карбоксипептидази А		Загальна активність (BA•V)	К очищення	% виходу
			ммоль фен / мг тканини	мкмоль фен / мг білка			
Екстракт до діалізу	39,0	0,090 ± 0,009	0,01055 ± 0,0011	0,117 ± 0,012	0,412 ± 0,041	1	100
Екстракт після діалізу без 2 мМ Zn ⁺⁺	39,0	0,077 ± 0,008	0,00873 ± 0,0009	0,113 ± 0,011	0,341 ± 0,034	0,97	83
Екстракт після діалізу з 2 мМ Zn ⁺⁺	39,0	0,077 ± 0,008	0,00960 ± 0,0010	0,125 ± 0,013	0,375 ± 0,038	1,07 (1)	91 (100)
20% насичення	7,0	0,007 ± 0,001	0,01160 ± 0,0012	1,657 ± 0,166	0,081 ± 0,008	13,26	22
40% насичення	10,5	0,074 ± 0,007	0,01085 ± 0,0011	0,147 ± 0,015	0,114 ± 0,011	1,18	30
60% насичення	8,7	0,010 ± 0,001	0,01155 ± 0,0012	1,155 ± 0,116	0,101 ± 0,010	9,24	27
80% насичення	25,0	0,003 ± 0,0003	0,01530 ± 0,0015	5,100 ± 0,510	0,383 ± 0,038	40,80	102

Таблиця 3

Активність карбоксипептидази А на різних етапах виділення і очищення ферменту з тканини помірnodиференційованої форми інфільтруючого протокового раку молочної залози

Етапи виділення	V	Концентрація білка, г білка / г тканини	Активність карбоксипептидази А		Загальна активність (BA•V)	К очищення	% виходу
			ммоль фено / мг тканини	мкмоль фено / мг білка			
Екстракт до діалізу	39,0	0,084 ± 0,008	0,01085 ± 0,0011	0,129 ± 0,013	0,423 ± 0,042	1	100
Екстракт після діалізу без 2 mM Zn ⁺⁺	39,0	0,077 ± 0,008	0,00879 ± 0,0009	0,114 ± 0,011	0,343 ± 0,034	0,88	81
Екстракт після діалізу з 2 mM Zn ⁺⁺	39,0	0,077 ± 0,008	0,01060 ± 0,0011	0,138 ± 0,014	0,414 ± 0,041	1,07 (1)	98 (100)
20% насичення	7,1	0,007 ± 0,001	0,01100 ± 0,0011	1,571 ± 0,157	0,078 ± 0,008	11,84	19
40% насичення	9,2	0,071 ± 0,007	0,01225 ± 0,0012	0,173 ± 0,017	0,113 ± 0,011	1,25	27
60% насичення	8,4	0,010 ± 0,001	0,01150 ± 0,0012	1,150 ± 0,115	0,097 ± 0,010	8,33	23
80% насичення	28,0	0,003 ± 0,0003	0,01440 ± 0,0014	4,800 ± 0,480	0,403 ± 0,040	34,78	98

Взагалі, в порівнянні з вихідним діалізованим розчином білка за поступового осадження сульфатом амонію питома активність карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози становила 163%, а з тканин доброякісного і злоякісного новоутворень молочної залози — 181 і 167% відповідно (табл. 1, 2, 3).

Зростання активності ферменту під час поетапного фракціонування можна пояснити або активацією прокарбоксипептидази А під впливом трипсиноподібних протеїназ, або наявністю ендогенного інгібітора карбоксипептидази А, але це припущення потребує подальших досліджень.

Таким чином, в протилежність даним літератури [14], в результаті поетапного фракціонування ми отримали частково очищений препарат карбоксипептидази А з високим процентом виходу за 80% насичення. Встановлено, що фермент з немалігнізованої тканини молочної залози в однаковій мірі осаджується як за 60%, так і за 80% насичення, що співпадає з даними літератури [14]. Таким чином, фракції карбоксипептидази А, отримані за 80% насичення сульфатом амонію, доцільно використовувати для подальшого порівняльного дослідження фізико-хімічних та біохімічних властивостей карбоксипептидази А.

Висновки

1. Використання методу поетапного висолення приводить до ефективного фракціонування карбоксипептидази А за її солерозчинністю.
2. Наявність іонів Zn^{++} в діалізаті сприяє збереженню карбоксипептидазної активності під час діалізу.
3. За 80% насичення сульфатом амонію з немалігнізованої тканини, доброякісного та злоякісного новоутворень молочної залози отримані частково очищені препарати карбоксипептидази А з коефіцієнтом очищення від 32,1 до 40,8 разів і активністю ферменту від 68 до 102%, у порівнянні з вихідними екстрактами тканин.

Література

1. Peterson L. M., Holmgvist B. Human serum procarboxypeptidase A // *Biochemistry*. — 1983. — Vol. 22. — N 13. — P. 3077–3082.
2. Marks N., Sachs L., Stern F. Conversion of Met-enkephalin-Arg 6-Phe 7 by a purified brain carboxypeptidase (cathepsin A) // *Peptides*. — 1981. — Vol. 2, N 2. — P. 159–164.
3. Koide A., Yoshizawa M., Kurachi K. Crystallization and properties of carboxypeptidase A gamma from porcine pancreas // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1981. — Vol. 659, N 2. — P. 390–400.
4. Неорганическая биохимия / Под ред. Г. Эйхгорна. — Том 1. — М.: Мир, 1978. — С. 504–560.
5. Purification and characterization of carboxypeptidase from terminally differentiated rat epidermal cell / M. Kikuchi, K. Fukuyama, K. Hirayama, W. Epstein // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1989. — Vol. 991, N 1. — P. 19–24.

6. Skidgel R. A., Davis R. M., Erdos E. G. Purification of a human urinary carboxypeptidase distinct from carboxypeptidases A, B or N // *Anal. Biochem.* — 1984. — Vol. 140, N 2. — P. 520–531.
7. *Carboxypeptidase A* in mouse mast cells. Identification, characterization and use as a differentiation marker / W. E. Serafin, E. T. Dayton, P. M. Gravallesse, K. F. Austen, R. L. Stevens // *J. Immunol.* — 1987. — Vol. 139, N 11. — P. 3771–3776.
8. *Single-step* isolation and resolution of pancreatic carboxypeptidase A and B / T. J. Bazzone, M. Sokolovsky, L. B. Cueni, B. L. Vallee // *Biochem.* — 1979. — Vol. 18, N 20. — P. 4362–4366.
9. *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.
10. *Всемирная* Организация Здравоохранения // Материали ежегодных отчетов. — С.Пб. — 1981. — 286 с.
11. *Практическая* химия Белка. — М.: Мир, 1989. — С. 39–43.
12. *Protein* measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. I. Rosenbrough, A. Z. Fan, R. J. Randol // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.
13. Bradshaw R. S., et all. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* — 1969. — Vol. 63. — P. 1389–1394.
14. *Пептидазы* / М. В. Колозейская, А. С. Пилявская. — К.: Наук. думка, 1982. — С. 176.

Е. А. Филиппова, И. Л. Вовчук

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра биохимии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина. Тел: (0482) 68-78-75,
e-mail: irvov@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А ИЗ ТКАНЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДОМ ВЫСАЛИВАНИЯ СУЛЬФАТОМ АМОНИЯ

Резюме

Разработан метод выделения и очистки карбоксипептидазы А, который состоит из поэтапного осаждения сульфатом аммония с последующим диализом в присутствии ионов Zn^{++} . Установлено, что поэтапное осаждение сульфатом аммония способствует эффективному фракционированию карбоксипептидазы А, а ионы Zn^{++} способствуют сохранению активности фермента в процессе диализа. Частично очищенные препараты карбоксипептидазы А получено из немалигнизированой ткани, а также из тканей доброкачественных и злокачественных новообразований молочной железы.

Ключевые слова: карбоксипептидаза А, выделение фермента, молочная железа.

E. A. Filipcova, I. L. Vovchuk

Odessa National I. I. Mechnikov University,

Department of Biochemistry,

Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine. Tel: (0482) 68-78-75,

e-mail: irvov@mail.ru

**EXTRACTION AND PURIFICATION OF MAMMALIAN GLAND
TUMOR CARBOXYPEPTIDASE A FROM THE ГИШТИ THE METHOD
OF AMMONIUM SULFATE SEDIMENTATION**

Summary

The method of extraction and purification of carboxypeptidase A has been created. This method includes gradual sedimentation with the help of ammonium sulfate and further dialysis at the presence of Zn^{++} . It has been established that gradual sedimentation with ammonium sulfate promotes effective fractionating of carboxypeptidase A, while Zn^{++} ions promote preserving of activity of the enzyme at the process of dialysis. Partialy purified preparations of carboxypeptidase A has been purified from non-malignized tissue, tissues of benignant and malignant tumors of the mammal gland.

Keywords: carboxypeptidase A, extraction of enzyme, mammalian gland.