

УДК 577.152.344:577.15.072

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А НЕМАЛІГНІЗОВАНОЇ ТКАНИНИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Філіпцова К.А.

*Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, Одеса, Україна
E-mail: kafil-bio@mail.ru*

Досліджено фізико-хімічні властивості карбоксипептидази А (КА) немалігнізованої тканини молочної залози. Молекулярна маса КА становила 44293 Да. Температурний оптимум КА встановлено при 37 °С, оптимум рН – в області від рН 5,0 до 5,5. Негативний вплив іонів двовалентних металів на активність КА знижується в ряду: Cu > Mn = Pb > Zn = Co = Ba > Hg > Fe > Mg > Ca > Ni > Cd. За дією більшості досліджуваних металів та температурною залежністю КА немалігнізованої тканини молочної залози подібна, а за молекулярною масою, оптимумом рН та дією таких іонів, як Zn⁺⁺ і Ca⁺⁺, - відрізняється від карбоксипептидази А з інших біологічних об'єктів.

Ключові слова: карбоксипептидаза А, молочна залоза, фізико-хімічні властивості.

ВСТУП

Карбоксипептидаза А (КФ 3.4.2.1) широко розповсюджений і багатофункціональний фермент, що відіграє важливу роль в життєдіяльності організмів [1–3]. Карбоксипептидаза А приймає участь в клітинному катаболізмі звичайних та аномальних білків, токсинів, пептидів лікарських препаратів [4, 5], в пост-трансляційній модифікації білків [1, 6].

Карбоксипептидаза А відіграє важливу роль в патогенезі багатьох хвороб [7–11].

На сьогоднішній час даний фермент виділений з різних біологічних об'єктів [12–17]. Однак, у світовій літературі нами не виявлено досліджень, присвячених вивченню фізико-хімічних властивостей карбоксипептидази А молочної залози.

Метою роботи було вивчення фізико-хімічних властивостей карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження були резектовані зразки прилеглої до новоутворення немалігнізованої тканини молочної залози жінок, в яких за результатами гістологічного дослідження не було встановлено наявності атипичних клітин. Морфологічний стан тканини був верифікований гістологічними дослідженнями за міжнародною класифікацією ВОЗ [18]. Матеріал для дослідження та гістологічна верифікація забезпечувалися обласним онкологічним диспансером м. Одеси, згідно договору про сумісні дослідження.

З гомогенату зразків, за допомогою поетапного фракціонування $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [19], діалізу в присутності 2 мМ Zn^{++} [19] та гель-хроматографії та сефадексі – G 75 (“Pharmacia”, Швеція) [19], була отримана пептидаза, яка гідролізувала специфічний для карбоксипептидази А синтетичний субстрат – каробензоксиглутамілфенілаланін [20].

Активність карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози визначали по гідролізу 2,0 мМ синтетичного субстрату каробензоксиглутамілфенілаланіну за методом Bradshawa [20].

Молекулярну масу карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози визначали з використанням маркерних білків з відомою молекулярною масою: білок сироватки крові людини – 66500 Да, овальбумін – 43000 Да, хімотрипсиноген А – 25000 Да, лізоцим – 17500 Да та РНК-аза – 13700 Да за методом Ендрюса [19].

Температурний оптимум карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози визначали по гідролізу 2,0 мМ розчину каробензоксиглутамілфенілаланіну за 30-хвилинної інкубації ферменту при температурі від 20 °С до 60 °С. За 100 % (контроль) були прийняті найвищі показники каталітичної активності ферменту, що були встановлені при температурі 37 °С.

Оптимум – рН карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози визначали по гідролізу 2,0 мМ розчину каробензоксиглутамілфенілаланіну при 37 °С з використанням стандартних буферних розчинів з рН 3,0, рН 4,0, рН 5,2, рН 7,4 та 9,0. За 100 % (контроль) було прийнято максимальну активність ферменту, отриману при рН 5,2 і температурі 37 °С.

Вплив металів на активність карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози визначали за інкубації ферменту в присутності 0,05 мМ розчинів йонів двовалентних металів: ртуті (Hg^{++}), заліза (Fe^{++}), нікелю (Ni^{++}), барію (Ba^{++}), магнію (Mg^{++}), кадмію (Cd^{++}), міді (Cu^{++}), кобальту (Co^{++}), кальцію (Ca^{++}), свинцю (Pb^{++}), марганцю (Mn^{++}), цинку (Zn^{++}) при температурі 37 °С. За 100% (контроль) була прийнята активність карбоксипептидази А, отримана при інкубації ферменту без додавання йонів двовалентних металів.

Результати дослідження були оброблені статистично з визначенням коефіцієнта Ст'юдента [21].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Молекулярна маса карбоксипептидази А, що була отримана з немалігнізованої тканини молочної залози, становила 44293 Да (рис. 1).

Відповідно до літературних даних, карбоксипептидаза А немалігнізованої тканини молочної залози відрізнялася за молекулярною масою від карбоксипептидази А з інших біологічних об'єктів. Виділений фермент мав більшу молекулярну масу, ніж карбоксипептидаза А підшлункової залози людини і ссавців [15, 16]; підшлункової залози великої рогатої худоби [12]; епідермальних клітин дводенних щурів [13]; морського кільчатого червяка [22]; легень людини [17];

кісткового мозку мишей [23]; мозку людини [9]; немалігнізованої тканини яєчників і доброякісного та злоякісного новоутворень яєчників людини [24].

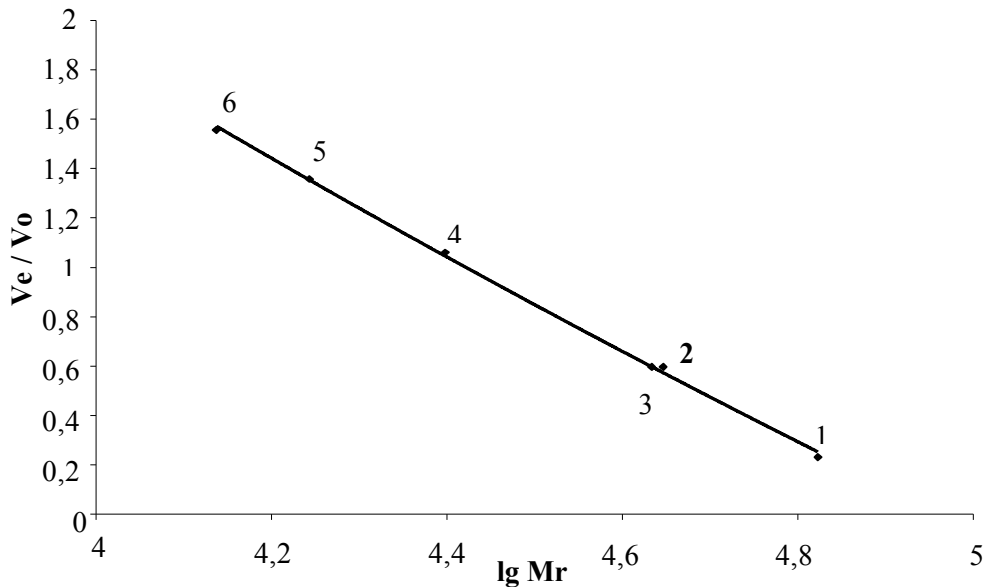


Рис. 1. Молекулярна маса карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози (n = 3)

Примітка:

- 1 – альбумін сироватки людини (66500 Да);
- 2 – карбоксипептидаза А немалігнізованої тканини молочної залози (44293 Да);
- 3 – овальбумін (43000 Да);
- 4 – хімотрипсिनоген (25000 Да);
- 5 – лізоцим (17500 Да);
- 6 – РНК-аза (13700 Да).

Карбоксипептидаза А немалігнізованої тканини молочної залози мала меншу молекулярну масу, ніж карбоксипептидази А концентрованої сечі людини [14] і мононуклеарних клітин периферійної крові людини [5].

Залежність активності карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози від температури описувалась типовою куполоподібною кривою, а найвищі показники каталітичної активності були встановлені при температурі 37 °С. При зниженні або підвищенні температури відносно встановленого температурного оптимуму (37 °С) спостерігалось зниження каталітичної активності ферменту, в порівнянні з контролем (рис. 2).

Було встановлено, що зниження температури до 30 °С призводить до незначного, в порівнянні з контролем, пониження каталітичної активності карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози на 12,0%-ки.

Однак, при зниженні температури до 20 °С спостерігалось стрімке зниження активності ферменту на 45,0%-ки, в порівнянні з контролем (рис. 2).

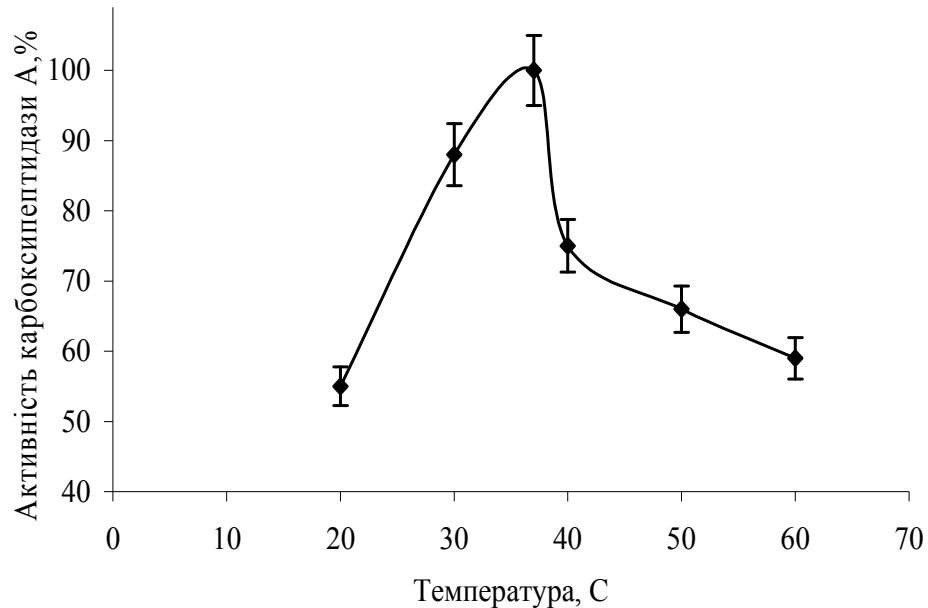


Рис. 2. Вплив температури на активність карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози (n = 3)

Примітка: Контроль - за 100 % було прийнято активність карбоксипептидази А, отриману при 37 °С.

В результаті підвищення температури до 40 °С було встановлено зниження активності карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози на 25,0%-ки, в порівнянні з контролем, а подальше підвищення температури до 50 °С і 60 °С приводило до втрати, відповідно, 34,0%-ків і 41,0%-ків карбоксипептидазної активності (рис. 2).

Отже, температурний оптимум карбоксипептидази А доброякісного новоутворення молочної залози знаходиться в межах 37 °С, що співпадає з температурним оптимумом карбоксипептидази А концентрованої сечі людини [14], карбоксипептидазо-А-подібного ферменту нирок щурів [25], водоемульсійної моделі карбоксипептидази А [26].

При дослідженні залежності активності карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози від рН середовища було встановлено, що крива, яка описує залежність активності ферменту від рН середовища, має куполоподібну форму, а оптимум рН знаходиться в інтервалі від рН 5,0 до 5,5 (рис. 3).

У порівнянні з оптимумом рН, підвищення концентрації іонів водню (H^+) в середовищі призводило до значного зниження активності карбоксипептидази А

немалігнізованої тканини молочної залози на 39,0%-ки при рН 4,0 і 54,0%-ки при рН 3,0. Пониження концентрації іонів водню в середовищі, також призводило до зниження активності досліджуваного ферменту на 42,0%-ки при рН 7,4 та на 60%-ки при рН 9,0 (рис. 3).

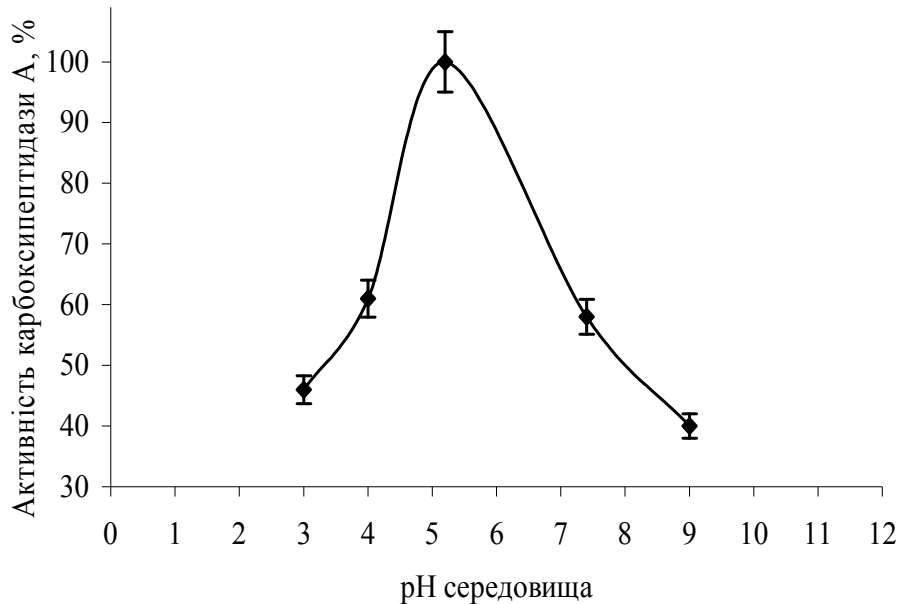


Рис. 3. Вплив рН середовища на активність карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози (n = 3)

Примітка: Контроль – за 100% було прийнято активність карбоксипептидази А, отриману при рН 5,2 і температурі 37 °С.

Отримані результати дослідження рН-залежності карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози відрізняються від літературних даних, отриманих при дослідженні карбоксипептидази А великої рогатої худоби оптимум – (рН 6,0) [12]; карбоксипептидази А водних екстрактів підшлункової залози свавців і людини – (рН 7,5) [15, 16]; карбоксипептидази А сечі людини – (рН 7,0) [14]; карбоксипептидазо-А-подібного ферменту з епідермальних клітин дводенних щурів – (рН 8,5) [13] і нирок щурів – (рН 7,4) [25].

За результатами дослідження впливу іонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози було встановлено, що інкубація ферменту в присутності всіх розчинів іонів металів, в порівнянні з контролем, приводила до пониження активності ферменту, а їх негативний вплив змінювався в ряду: Cu > Mn = Pb > Zn = Co = Ba > Hg > Fe > Mg > Ca > Ni > Cd (рис 4).

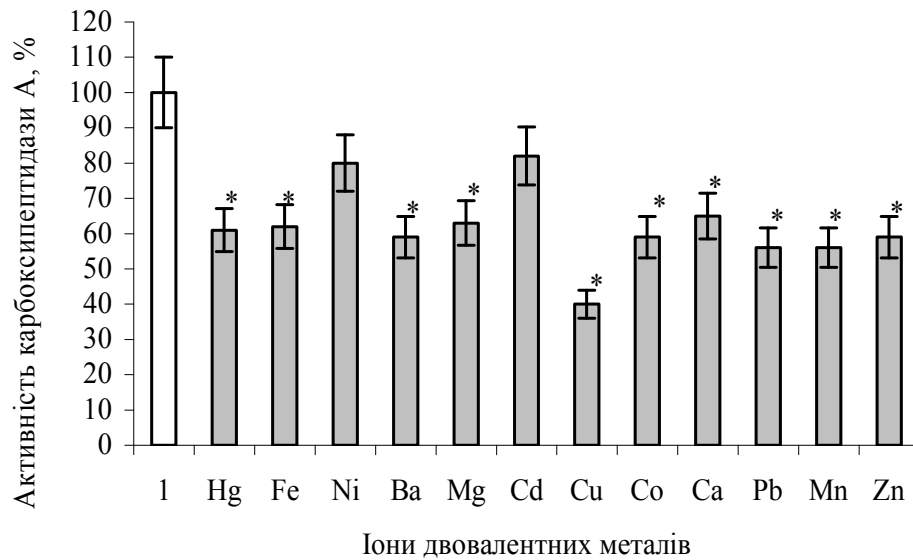


Рис. 4. Вплив іонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози (n = 3)

Примітка:

1 – контроль – за 100% прийнята активність карбоксипептидази А без додавання іонів двовалентних металів;

* – вірогідне пониження активності карбоксипептидази А відносно контролю, $p < 0,05$.

При інкубації карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози в присутності Cd^{++} і Ni^{++} було встановлено зниження активності ферменту на 18,0%-ки і 20,0%-ки, в порівнянні з контролем, що співпадає з даними літератури і свідчать про те, що абсорбція іонів цих металів на поверхні молекули карбоксипептидази А приводить до зниження її пептидазної активності [27–29] (рис. 4).

Присутність в інкубаційному середовищі іонів Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Hg^{++} , Zn^{++} , Co^{++} , Ba^{++} , Mn^{++} і Pb^{++} , в порівнянні з контролем, призводила до втрати від 35,0%-ків до 45,0%-ків активності карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози (рис. 4).

Отримані результати дослідження впливу більшості іонів двовалентних металів співпадають з даними літератури, що свідчать про їх негативну дію на активність досліджуваного ферменту [28, 30]. Однак, результати впливу таких металів, як Ca^{++} і Zn^{++} , що є активаторами карбоксипептидази А, виділеної з інших біологічних об'єктів, відрізняються від літературних даних щодо їх позитивного впливу, який сприяє стабілізації структури карбоксипептидази А [22, 24, 28, 31, 32]. Негативний вплив іонів цинку знаходить своє пояснення в деяких роботах, результати яких свідчать про те, що перенасичення молекули карбоксипептидази А при абсорбції надлишком Zn^{++} приводить до інгібування її пептидазної активності [22, 31].

Найбільший негативний вплив металу для карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози був встановлений при інкубації з Cu^{++} , що приводило до втрати, в порівнянні з контролем, 60,0%-ків активності ферменту (рис. 4). Надлишок іонів Cu^{++} , за даними літератури, може викликати інгібіторну дію та зниження активності карбоксипептидази А в результаті абсорбції металу на поверхні молекули ферменту, що приводить до зміни просторової конформації [22].

Отримані результати свідчать про те, що за дією більшості досліджуваних металів та температурною залежністю карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози подібна до карбоксипептидази А інших біологічних об'єктів, однак, відрізняється – за молекулярною масою, оптимумом рН та дією таких іонів, як Ca^{++} і Zn^{++} , які понижували пептидазну активність ферменту.

ВИСНОВКИ

1. Молекулярна маса карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози становить 44293 Да.
2. Температурний оптимум карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози встановлено при 37 °С.
3. Оптимум рН карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози встановлено в області від рН 5,0 до 5,5.
4. Активність карбоксипептидази А немалігнізованої тканини молочної залози знижується в присутності іонів у ряду $\text{Cu} > \text{Mn} = \text{Pb} > \text{Zn} = \text{Co} = \text{Ba} > \text{Hg} > \text{Fe} > \text{Mg} > \text{Ca} > \text{Ni} > \text{Cd}$.

Список літератури

1. Lysosomal carboxypeptidase A / M. Gacko, A. Worowska, A. Wozniak [et al.] // *Postepy Biochem.* – 2005. – Vol. 51, № 2. – P. 162–170.
2. Kilshtain A.V. On the origin of the catalytic power of carboxypeptidase A and other metalloenzymes / A.V. Kilshtain, A. Warshel // *Proteins.* – 2009. – Vol. 77, № 3. – P. 536–550.
3. Reznik S.E. Carboxypeptidases from A to z: implications in embryonic development and Wnt binding / S.E. Reznik, L.D. Fricker // *Cell. Mol. Life. Sci.* – 2001. – Vol. 52, № 12-13. – P. 1790–1804.
4. Bernkop-Schnürch A. Presystemic metabolism of orally administered peptide drugs and strategies to overcome it / A. Bernkop-Schnürch, T. Schmitz // *Curr Drug Metab.* – 2007. – Vol. 8, № 5. – P. 509–517.
5. Cathepsin A is the major hydrolase catalyzing the intracellular hydrolysis of the antiretroviral nucleotide phosphonoamidate prodrugs GS-7340 and GS-9131 / G. Birkus, R. Wang, X. Liu [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2007. – Vol. 51, № 2. – P. 543–550.
6. Raybin D. Modification of tubulin by tuosylation in cells and extracts and its effect on assembly in vitro / D. Raybin, M. Flavin // *J. Cell. Biol.* – 1977. – Vol. 73, № 2. – P. 492–504.
7. The X-ray structure of carboxypeptidase A inhibited by a thiirane mechanism-based inhibitor / D. Fernández, S. Testero, J. Vendrell [et al.] // *Chem Biol Drug Des.* – 2010. – Vol. 75, № 1. – P. 29–34.
8. Kadl A. Induction of CCR2-dependent macrophage accumulation by oxidized phospholipids in the air-pouch model of inflammation / A. Kadl, E. Galkina, N. Leitinger // *Arthritis Rheum.* – 2009. – Vol. 60, № 5. – P. 1362–1371.
9. Lyons P.J. Characterization of carboxypeptidase A6, an extracellular matrix peptidase / P.J. Lyons, M.B. Callaway, L.D. Fricker // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 11. – P. 7054–7063.
10. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis / Q. Zhou, A.C. Law, J. Rajagopal [et al.] // *Dev Cell.* – 2007. – Vol. 13, № 1. – P. 103–114.

11. Novel insights into the biological function of mast cell carboxypeptidase A / G. Pejler, S.D. Knight, F. Henningson [et al.] // *Trends Immunol.* – 2009. – Vol. 30, № 8. – P. 401–408.
12. Неорганическая биохимия: в 2 т. / [под ред. Г. Эйхгорна]. – М.: Изд-во «Мир», 1978. – Т. 1. – С. 504–560.
13. Purification and characterization of carboxypeptidase from terminally differentiated rat epidermal cell / M. Kikuchi, K. Fukuyama, K. Hirayama [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – Vol. 991, № 1. – P. 19–24.
14. Skidgel R.A. Purification of a human urinary carboxypeptidase distinct from carboxypeptidases A, B or N / R.A. Skidgel, R.M. Davis, E.G. Erdos // *Anal. Biochem.* – 1984. – Vol. 140, № 2. – P. 520–531.
15. Single – step isolation and resolution of pancreatic carboxypeptidase A and B / T.J. Bazzone, M. Sokolovsky, L.B. Cueni [et al.] // *Biochem.* – 1979. – Vol. 18, № 20. – P. 4362–4366.
16. Биологическая химия: учебник / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин; – [3 –е изд.]. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
17. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization / S.M. Goldstein, C.E. Kaempfer, J.T. Kealey [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1989. – Vol. 83, № 5. – P. 1630–1636.
18. Всемирная Организация Здравоохранения // Материалы ежегодных отчетов. – Санкт-Петербург. – 1981. – 286 с.
19. Практическая химия белка. – М.: Мир, 1989. – С. 39–43.
20. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A / R.S. Bradshaw, L.H. Ericsson, K.A. Walsh [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1969. – Vol. 63, № 4. – P. 1389–1394.
21. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика / Рокицкий П.Ф. – Минск: Высш. Школа. – 1967. – 326с.
22. A novel metalcarboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica* – a step into the invertebrate world of proteases / M. Alonso-del-Rivero, S.A. Trejo, M. Rodriguez de la Vega [et al.] // *FEBS J.* – 2009. – Vol. 276, № 17. – P. 4875–4890.
23. Altered storage of proteases in mast cells from mice lacking heparin: a possible role for heparin in carboxypeptidase A processing / F. Henningson, J. Ledin, C. Lunderius [et al.] // *Biol Chem.* – 2002. – Vol. 383, № 5. – P. 793–801.
24. Вовчук И.Л. Физико-химические свойства карбоксипептидазы А выделенной из немалигнизированной и опухолевой тканей яичника женщин / И.Л. Вовчук, С.А. Петров // Материалы IX Українського біохімічного з'їзду (24–27 жовтня 2006 р.). – Харків: Харківський націон. ун-т ім. В.Н. Каразіна, 2006. – С. 35.
25. Localization of carboxypeptidase A-like enzyme in rat kidney / R. Igc, S. Garber, M. Sekosan [et al.] // *Peptides.* – 2003. – Vol. 24, № 8. – P. 1237–1240.
26. Thompson J.S. Structure and function of carboxypeptidase A alpha in supercooled water / J.S. Thompson, H. Gehring, B.L. Vallee // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1980. – Vol. 77, № 1. – P. 132–136.
27. Changes in carboxypeptidase A, dipeptidase and Na⁺/K⁺ ATPase activities in the intestine of rats orally exposed to different doses of cadmium / G.E. Eriyamremu, S.O. Asagba, E.C. Onyeneke [et al.] // *Biometals.* – 2005. – Vol. 18, № 1. – P. 1–6.
28. Funakoshi T. Effect of nickel on enzymatic activities in the mouse pancreas / T. Funakoshi, K. Kuromatsu, S. Kojima // *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* – 1996. – Vol. 92, № 2. – P. 245–252.
29. Shimada H. Acute, nontoxic cadmium exposure inhibits pancreatic protease activities in the mouse / H. Shimada, T. Funakoshi, M.P. Waalkes // *Toxicol Sci.* – 2000. – Vol. 53, № 2. – P. 474–480.
30. Carboxypeptidase A: native, zinc-removed and mercury-replaced forms / H.M. Greenblatt, H. Feinberg, P.A. Tucker [et al.] // *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* – 1998. – Vol. 54, № 3. – P. 289–305.
31. Li X. Zinc-mediated thermal stabilization of carboxypeptidase A / X. Li, B. Solomon // *Biomol. Eng.* – 2001. – Vol. 18, № 4. – P. 179–183.
32. Hedemann M.S. Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs / M.S. Hedemann, B.B. Jensen, H.D. Poulsen // *J Anim Sci.* – 2006. – Vol. 84, № 12. – P. 3310–3320.

Филиппова Е.А. Физико-химические свойства карбоксипептидазы А немалигнизированной ткани молочной железы / Е.А. Филиппова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 1. – С. 305-313.

Исследовано физико-химические свойства карбоксипептидазы А (КА) немалигнизированной ткани молочной железы. Молекулярная масса КА составляла 44293 Да. Температурный оптимум КА установлен при 37 °С, оптимум рН - в области от рН 5,0 до 5,5. Негативное влияние ионов двухвалентных металлов на активность КА снижается в ряду: Cu > Mn = Pb > Zn = Co = Ba > Hg > Fe > Mg > Ca > Ni > Cd. По действию большинства исследованных металлов и температурной зависимостью КА подобна, а по молекулярной массе, оптимумом рН и действием таких ионов, как Zn⁺⁺ и Ca⁺⁺, – отличается от карбоксипептидазы А с других биологических объектов.

Ключевые слова: карбоксипептидаза А, молочная железа, физико-химические свойства.

Filipova E.A. Physicochemical properties of carboxypeptidase A from the non-malignized tissue of the mammalian gland / E.A. Filipova // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 1. – P. 305-313.

Physicochemical properties of carboxypeptidase A (CA) from the non-malignized tissue of mammalian gland were studied. Molecular mass of this CA is 44293 Da. Optimum of temperature of this CA is presented at 37 °С, optimum pH - in region of the pH 5,0 – 5,5. The negative influence of bivalent metal ions on the activity of this CA is reduced in series: Cu > Mn = Pb > Zn = Co = Ba > Hg > Fe > Mg > Ca > Ni > Cd. By the influence majority of bivalent metal ions and optimum of temperature this carboxypeptidase A from the non-malignized tissue of mammalian gland is not differentiation, and by the molecular mass, optimum pH and influence of this metal ions, as the Zn⁺⁺ and Ca⁺⁺, – is differentiation of the carboxypeptidase A from the other of biological objects.

Keywords: carboxypeptidase A, mammalian gland, physicochemical properties.

Поступила в редакцию 20.01.2012 г.