

УДК 577.152.344:577.15.072

К. А. Філіпцова¹, канд. біол. наук, старший викладач

І. Л. Вовчук², д-р біол. наук, професор

¹Державний заклад «Південноукраїнський педагогічний університет імені К. Д. Ушинського», кафедра біології і основ здоров'я, вул. Старопортофранківська, 26, Одеса, 65020, Україна, тел.: (048) 705-46-68, e-mail: kafil-bio@mail.ru

²Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра біохімії, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: (0482) 68-78-75.

БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А НЕТРАНСФОРМОВАНОЇ ТКАНИНИ ТА ДОБРОЯКІСНОГО НОВОУТВОРЕННЯ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Досліджено біохімічні властивості карбоксипептидази А (КА) нетрансформованої тканини та доброякісного новоутворення молочної залози. Ферменти отримували за допомогою поетапного фракціонування $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, діалізу в присутності 2 мМ Zn^{++} та гель-хроматографії та сефадексі – G 75. Встановлено, що КА нетрансформованої тканини та доброякісного новоутворення молочної залози подібні за субстратною специфічністю, неконкурентним типом інгібування фенілаланіном та впливом інгібіторів і активаторів, за винятком лейпептину, тозилгептанолу і диметилмоліемідангідриду, але відрізняються за спорідненістю до карбобензоксиглутамілфенілаланіну та чутливістю до фенілаланіну. Для КА нетрансформованої тканини молочної залози встановлено $K_m = 0,24$ мМ і $K_i = 0,40$ мМ, а для КА доброякісного новоутворення – $K_m = 0,14$ мМ і $K_i = 0,16$ мМ.

Ключові слова: карбоксипептидаза А; біохімічні властивості; молочна залоза; новоутворення.

В останні роки науковий інтерес акцентований на вивченні протеїназно-інгібіторної системи, що пояснюється високою біологічною активністю протеолітичних ферментів при різних фізіологічних процесах, одним із яких є пухлиноутворення [14, 38]. Порушення в системі протеолізу, який є основою багатьох життєво важливих фізіологічних процесів в організмі, можуть стати причиною серйозних змін структури та функції тканин, бути первинними етіологічними факторами або важливими ланками генезу багатьох патологічних процесів [4, 17, 23]. Оскільки процес розвитку новоутворення відбувається на фоні порушень білкового обміну, вивчення лізосомальної карбоксипептидази А [КФ 3.4.17.1], яка бере участь на заключних етапах протеолізу [15, 20], в посттрансляційній модифікації білків [15], катаболізмі аномальних білків [28], в регуляції метаболізму клітин [31, 32, 33, 34], є актуальним. В останні роки КА

використовується як складова частина в моноклональних препаратах, оскільки знижує цитотоксичність препаратів в хіміотерапії онкозахворювань [9, 13, 36]. Однак, на сьогоднішній день механізми регуляції активності КА за процесу новоутворення в молочній залозі не досліджені. Не вивчені фізико-хімічні і біохімічні властивості КА за пухлинного процесу в молочній залозі жінок. В сучасній літературі існують одиничні роботи порівняльного дослідження протеолітичних ферментів, виділених з нетрансформованих та пухлинних тканин.

Метою роботи було вивчення біохімічних властивостей карбоксипептидази А нетрансформованої тканини та доброякісного новоутворення молочної залози.

Матеріали і методи дослідження

Матеріалом дослідження були резектовані зразки доброякісного новоутворення молочної залози жінок, які не отримували медикаментозного дооперативного лікування, та резектовані зразки прилеглої до новоутворення нетрансформованої (фенотипово незміненої) тканини, в яких за результатами гістологічного дослідження не було встановлено наявності атипичних клітин. Патоморфологічний діагноз: проліферуюча форма фіброзно-кістозної хвороби молочної залози був верифікований за міжнародною класифікацією ВООЗ із визначенням морфологічного стану трансформованих клітин пухлинної тканини [39]. Матеріал для дослідження та гістологічна верифікація були надані сертифікованою патоморфологічною лабораторією обласного онкологічного диспансеру м. Одеси з дотриманням етичних норм, згідно договору про сумісні дослідження.

За допомогою поетапного фракціонування $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, діалізу в присутності 2 мМ Zn^{++} та гель-хроматографії на сефадексі – G 75 (“Pharmacia”, Швеція), була отримана пептидаза, яка гідролізувала специфічний для КА синтетичний субстрат – карбобензоксиглутамілфенілаланін. Активність КА визначали за гідролізом 2,0 мМ карбобензоксиглутамілфенілаланіну за методом Bradshaw [11], вміст білка визначали за методом Lowry [25].

Субстратну специфічність КА визначали за гідролізом субстратів: 2,0 мМ карбобензоксиглутамілфенілаланіну, фенілаланілаланіну, глутаміл-тирозину, пролілаланіну [11], 2 % нативного та денатурованого гемоглобіну [7] та 2 % казеїну [21].

Для визначення впливу інгібіторів та активаторів 0,1 мл розчину ферменту інкубували 60 хвилин при температурі 37 °С в присутності 0,1 мл: 2,0 мМ дитіотрейтолу (ДТТ), 2,0 мМ цинку (Zn^{++}), 1,0 мМ цистеїну, 0,1 % тритону X-100, 2,0 мкг соєвого інгібітору трипсину, 2,0 мкг лейпептину, 2,0 мкг пепстатину, 2,0 мМ парахлормеркурійбензоату (ПХМБ), 2,0 мМ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ), 2,0 мМ диметилмоліемідангідриду, 2,0 мМ тозілгептанолу, 60 % меркаптоетанолу, 2,0 мМ етилендіамінтетраацетатної кислоти (ЕДТА), 4,0 мМ 1,10 – фенатроліну.

Швидкість реакції (V_{\max}) і константу Міхаеліса (K_m) аналізували в зворотних координатах за Лайнуівером – Берком [1, 2]. Для визначення типу інгібування та константи інгібування (K_i) фермент та інгібітор у співвідношенні 1:1 інкубували 20 хвилин при температурі 37 °С. Тип інгібування і K_i аналізували в зворотних координатах за Лайнуівером – Берком [1, 2].

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням програми *Microsoft Excel*, використовуючи t-критерій Стьюдента [5].

Результати дослідження та їх обговорення

Субстратна специфічність є унікальною властивістю ферментів, що відрізняє їх від інших каталізаторів [2]. Було встановлено, що КА нетрансформованої тканини і доброякісного новоутворення молочної залози є типовою екзопептидазою, оскільки практично не гідролізує нативні та денатуровані білкові субстрати, що є типовими субстратами для ендопептидаз (табл. 1).

Таблиця 1

Субстратна специфічність карбоксипептидази А нетрансформованої тканини та доброякісного новоутворення молочної залози (n = 3)

Субстрат	Активність карбоксипептидази А (ΔE)	
	нетрансформована тканина	доброякісне новоутворення
карбобензоксиглутамілфенілаланін (2,0 мМ розчин)	0,332 ± 0,050	0,526 ± 0,079
фенілаланілаланін (2,0 мМ розчин)	0,388 ± 0,058	0,399 ± 0,060
пролілаланін (2,0 мМ розчин)	0,175 ± 0,026	0,382 ± 0,057
глутаміл – тирозин (2,0 мМ розчин)	0,138 ± 0,021	0,245 ± 0,037
гемоглобін неденатурований (2,0 % розчин)	0,000	0,006 ± 0,001
гемоглобін денатурований (2,0 % розчин)	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001
казеїн (2,0 % розчин)	0,003 ± 0,001	0,009 ± 0,001

Серед дипептидів КА нетрансформованої тканини і доброякісного новоутворення молочної залози найкраще гідролізувала карбобензоксиглутамілфенілаланін, або дипептиди, до складу яких входив фенілаланілаланін. КА нетрансформованої та пухлинної тканин молочної залози краще розщеплює субстрати, які містять гідрофобні та ароматичні амінокислоти. Гідроліз проходить

швидше, якщо боковий ланцюг залишку на С – кінці має гідрофобний характер, та повільніше, якщо субстрати містять гідрофільні амінокислоти.

Результати дослідження субстратної специфічності КА нетрансформованої тканини і доброякісного новоутворення молочної залози відповідають даним літератури, в яких вказано, що КА відщеплює гідрофобні С-термінальні амінокислоти, а саме: фенілаланін, лейцин, ізолейцин, метіонін, тирозин і валін, та частково: гістидин, лізин і аргінін [6, 10, 26, 30, 35].

На процес відщеплення С-кінцевих амінокислот з гідрофобними боковими ланцюгами також впливають інші амінокислотні залишки пептиду. При дослідженні активності КА нетрансформованої та пухлинної тканин молочної залози з використанням пролілаланіну і глутаміл – тирозину було виявлено негативний вплив на процес гідролізу кислого бокового ланцюгу глутамілу і проліну (табл. 1). За літературними даними відомо, що аліфатичні, ароматичні і основні залишки в позиції P1 мають позитивний вплив на специфічність розриву, а кислі бокові ланцюги амінокислот, пролін і гліцин проявляють негативний вплив в позиції P1 на гідроліз пептиду [10, 26, 30, 35].

Для визначення реакційних груп, що беруть участь у каталізі, було проведено дослідження впливу активаторів та інгібіторів на активність КА нетрансформованої тканини і доброякісного новоутворення молочної залози. Встановлено, що інкубація КА нетрансформованої тканини та доброякісного новоутворення молочної залози з ДТТ приводила до незначного, у порівнянні з контролем, підвищення активності ферменту на 20,0 % та 29,0 % відповідно. Активність КА нетрансформованої тканини підвищувалася на 34,0 %, у порівнянні з контролем, а доброякісного новоутворення, навпаки, – знижувалася на 18,0 %, у присутності цистеїну (рис. 1).

Отримані результати співпадають з результатами досліджень інших авторів, які вказують на можливість використання цистеїну і його похідних як природних інгібіторів КА [12, 27, 37].

Було встановлено, що інкубація КА з Zn^{++} призводила до зниження активності ферменту нетрансформованої тканини на 38,0 %, у порівнянні з контролем, та на 85,0 % – для ферменту доброякісного новоутворення молочної залози (рис. 1), що співпадає з результатами досліджень інших авторів, які свідчать про те, що надлишок Zn^{++} приводить до інгібування пептидазної активності КА [6, 16, 22, 24].

При дослідженні впливу інгібіторів було встановлено, що порівняно з контролем, активність КА нетрансформованої тканини молочної залози в присутності соєвого інгібітору трипсину, лейпептину, пепстатину, ПХМБ, ФМСФ і тозилгептанолу знижується на 40,0–50,0 %, а в присутності тритону X-100 і диметилмоліемідангідриду – на 60,0 %. Предінкубація КА доброякісного новоутворення молочної залози із тритоном X-100 і пепстатином приводила до втрати 55,0–60,0 % активності ферменту, порівняно з контролем (рис. 1).

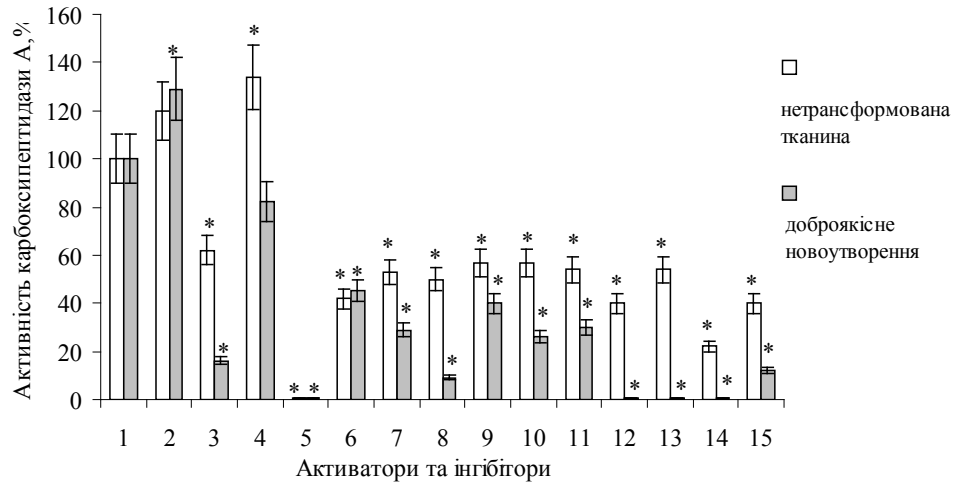


Рис. 1. Вплив активаторів та інгібіторів на активність карбоксипептидази А нетрансформованої тканини та доброякісного новоутворення молочної залози (n=3)

Примітка:

* – $P < 0,05$ вірогідна різниця відносно контролю в межах однієї тканини;

1 – контроль – за 100 % для кожної тканини прийнята активність карбоксипептидази А, отримана без додавання реагентів;

2 – 2,0 мМ ДТТ;

3 – 2,0 мМ Zn^{2+} ;

4 – 1,0 мМ Цистеїн;

5 – 60 % Меркаптоетанол;

6 – 0,1 % Тритон Х-100;

7 – 2,0 мкг Соевий інгібітор трипсину;

8 – 2,0 мкг Лейпептин;

9 – 2,0 мкг Пепстатин;

10 – 2,0 мМ ПХМБ;

11 – 2,0 мМ ФМСФ;

12 – 2,0 мМ Диметилмоліемідангідрид;

13 – 2,0 мМ Тозилгептанол;

14 – 4,0 мМ 1,10-фенантролін;

15 – 2,0 мМ ЕДТА.

На відміну від результатів дослідження ферменту нетрансформованої тканини, в присутності соєвого інгібітору трипсину, ПХМБ і ФМСФ спостерігалось зниження активності КА доброякісного новоутворення молочної залози на 70,0–75,0 %, у порівнянні з контролем, що свідчить про наявність в активному центрі цього ферменту ОН – груп серину і – SH груп цистеїну. В підтвердження цього припущення також свідчать результати дослідження інгібіторного впливу лейпептину, предінкубація з яким приводила до втрати активності досліджуваного ферменту на 90,0 %, у порівнянні з контролем.

Також, на відміну від КА нетрансформованої тканини молочної залози, було встановлено повну втрату активності ферменту доброякісного новоутворення в присутності тозилгептанолу і диметилмоліемідангідриду (рис. 1).

Предінкубація КА з β -меркаптоетанолом приводила до повної інактивації як ферменту нетрансформованої тканини, так і ферменту доброякісного новоутворення молочної залози (рис. 1), що свідчить про наявність в структурі обох ферментів дисульфідних зв'язків та співпадає з даними літературних джерел [2, 8, 30].

Додавання таких хелатуючих речовин, як 1,10 – фенантролін та ЕДТА, що зв'язуються координаційним зв'язком з атомом Zn^{2+} , приводило до значного зниження активності КА досліджуваних тканин, що співпадає з літературними даними [17, 18, 19, 29]. Слід відмітити, що КА нетрансформованої тканини та доброякісного новоутворення молочної залози проявляла більшу чутливість до 1,10-фенантроліну, ніж до впливу ЕДТА. Так, 1,10-фенантролін приводив до зниження активності КА нетрансформованої тканини молочної залози на 78,0 % та до повної втрати активності ферменту доброякісного новоутворення. Під впливом ЕДТА каталітична активність КА нетрансформованої тканини знижувалась на 60,0 %, порівняно з контролем, а ферменту доброякісного новоутворення молочної залози – на 88,0 % (рис. 1).

Отримані результати свідчать, що для проявлення каталітичних властивостей КА нетрансформованої тканини і доброякісного новоутворення молочної залози необхідні: SH – група цистеїну, OH – група серину та імінова група гістидину.

При дослідженні швидкості реакції та константи Міхаеліса КА тканини молочної залози за гідролізом специфічного синтетичного субстрату карбобензоксиглутамілфенілаланіну (з концентрацією 0,5 мМ, 1,0 мМ, 2,0 мМ і 4,0 мМ) було встановлено, що КА нетрансформованої тканини розщеплює даний субстрат з K_m 0,24 мМ і з V_{max} = 0,35, а КА доброякісного новоутворення – з K_m 0,14 мМ і з V_{max} = 0,69. Тобто, КА доброякісного новоутворення молочної залози, має більшу спорідненість до даного субстрату, ніж КА нетрансформованої тканини молочної залози (рис. 2).

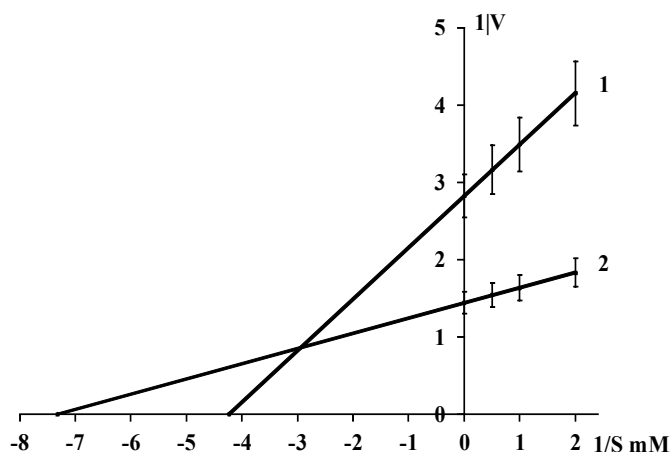


Рис. 2. Вплив концентрації субстрату на швидкість гідролізу карбобензоксиглутамілфенілаланіну в присутності карбоксипептидази А тканини молочної залози (за Лайнуївером – Берком, $n=3$)

Примітка: 1 – нетрансформована тканина ($-1/K_m = -4,23$ мМ, $1/V_{max} = 2,82$);
2 – доброякісне новоутворення ($-1/K_m = -7,31$ мМ, $1/V_{max} = 1,44$).

Карбоксипептидаза А, виділена з нетрансформованої тканини і доброякісного новоутворення молочної залози, має більшу спорідненість до субстрату карбобензоксиглутамілфеніланіну, ніж КА з тканини немалігнізованого яєчника ($K_m = 0,46$ мМ) та доброякісного новоутворення яєчника ($K_m = 0,37$ мМ) [3].

Для КА нетрансформованої тканини і доброякісного новоутворення молочної залози встановлено неконкурентний тип інгібування феніланіном, з величиною $K_i = 0,40$ мМ та $K_i = 0,16$ мМ відповідно. Однак, чутливість КА доброякісного новоутворення ($K_i = 0,16$ мМ) до феніланіну більша, ніж у ферменту нетрансформованої тканини ($K_i = 0,40$ мМ) молочної залози (рис. 3).

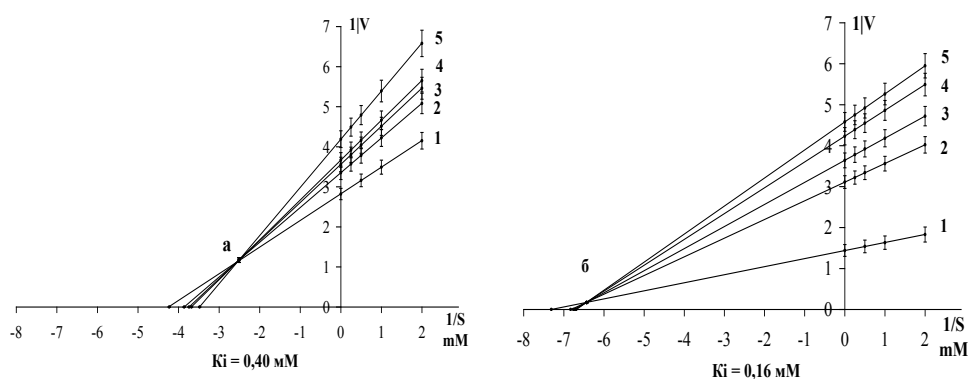


Рис. 3. Тип інгібування карбоксипептидази А нетрансформованої тканини (а) та доброякісного (б) новоутворення молочної залози у присутності феніланіну (за Лайнуївером – Берком) ($n=3$)

Примітка: а – нетрансформована тканина ($-1/K_m = -2,51$ мМ, $1/V_{max} = 1,17$); б – доброякісне новоутворення ($-1/K_m = -6,43$ мМ, $1/V_{max} = 0,17$); 1 – у відсутності феніланіну; 2 – у присутності 0,5 мМ феніланіну; 3 – у присутності 1,0 мМ феніланіну; 4 – у присутності 2,0 мМ феніланіну; 5 – у присутності 4,0 мМ феніланіну.

Чутливість КА нетрансформованої тканини та доброякісного новоутворення молочної залози до феніланіну значно більша, ніж у КА з підшлункової залози бика ($K_i = 2$ мМ) [30].

Висновки

1. Досліджено біохімічні властивості карбоксипептидази А, виділеної з нетрансформованої тканини та проліферуючої форми фіброзно-кістозної хвороби молочної залози. Встановлено, що карбоксипептидаза А нетрансформованої тканини та доброякісного новоутворення молочної залози подібна за субстратною специфічністю та впливом активаторів й інгібіторів, за винятком лейпептину, тозилгептанолу і диметилмоліемідангідриду.

2. Карбоксипептидаза А доброякісного новоутворення молочної залози має більшу спорідненість до субстрату карбобензоксиглутамілфенілаланіну ($K_m = 0,14$ мМ), ніж карбоксипептидаза А нетрансформованої тканини молочної залози ($K_m = 0,24$ мМ).

3. Інгібування карбоксипептидази А нетрансформованої тканини та доброякісного новоутворення молочної залози фенілаланіном відбувається за неконкурентним типом. Чутливість карбоксипептидази А доброякісного новоутворення ($K_i = 0,16$ мМ) до фенілаланіну більша, ніж у карбоксипептидази А нетрансформованої тканини ($K_i = 0,40$ мМ) молочної залози.

Список використаної літератури

1. *Биохимия человека*: в 2-х т. Т. 1: Пер. с англ. / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл. – М.: Мир, 2004. – 381 с.
2. *Виноградова Р. П.* Молекулярные основы действия ферментов / Р. П. Виноградова. – К.: Вища школа, 1978. – 260 с.
3. *Вовчук И. Л.* Физико-химические свойства карбоксипептидазы А выделенной из немалигнизированной и опухолевой тканей яичника женщин / И. Л. Вовчук, С. А. Петров // Матеріали ІХ Українського біохімічного з'їзду (24-27 жовтня 2006 р.). – Харків: Харківський націон. ун-т ім. В.Н. Каразіна, 2006. – С. 35.
4. *Копильчук Г. П.* Активність ядерних гістоспецифічних протеїназ лімфоцитів селезінки попередньо опромінених щурів з трансплантованою карциномою герена / Г. П. Копильчук, Г. В. Яковишин, І. В. Чорна // Молодь та поступ біології: Збірник тез третьої Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (23-27 квітня 2007 р.). – Львів: Львівський націон. ун-т ім. Івана Франка, 2007. – С. 64–65.
5. *Лапач С. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel: 2-е изд., перераб. и доп. / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К.: МОРИОН, 2001. – 408 с.
6. *Alonso-del-Rivero M.* A novel metallo-carboxypeptidase-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. – V. 276, № 17. – P. 4875-4890.
7. *Anson M. L.* The estimation of pepsin with hemoglobin / M. L. Anson, A. E. Mirsky // Journal of General Physiology. – 1932. – V. 16, № 1. – P. 59–67.
8. *Arolas J. L.* Study of a major intermediate in the oxidative folding of leech carboxypeptidase inhibitor: contribution of the fourth disulfide bond / J. L. Arolas, G. M. Popowicz, S. Bronsoms [et al] // J Mol Biol. – 2005. – V. 352, № 4. – P. 961–975.
9. *Arolas J. L.* Metallo-carboxypeptidases: emerging drug targets in biomedicine / J. L. Arolas, J. Vendrell, F. X. Aviles, L. D. Fricker // Curr Pharm Des. – 2007. – V. 13, № 3. – P. 347–364.
10. *Austin B. P.* The substrate specificity of Metarhizium anisopliae and Bos Taurus carboxypeptidases A: Insights into their use as tools for the removal of affinity tags / B. P. Austin, J. Tozser, P. Bagossi [et al] // Protein Expr Purif. – 2010. – V. 24, № 2. – P. 102–109.
11. *Bradshaw R. S.* The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A / R. S. Bradshaw, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, H. Neurath // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1969. – V. 63, № 4. – P. 1389–1394.
12. *Chong C. R.* Catalysis of zinc transfer by D-penicillamine to secondary chelators / C. R. Chong, D. S. Auld // J Med Chem. – 2007. – V. 50, № 22. – P. 5524–5527.
13. *Deckert P. M.* Specific tumour localisation of a huA33 antibody--carboxypeptidase A conjugate and activation of methotrexate-phenylalanine / P. M. Deckert, W. G. Bormmann, G. Ritter [et al] // Int J Oncol. – 2004. – V. 24, № 5. – P. 1289–1295.
14. *Fan S. Q.* Expression and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in breast carcinoma / S. Q. Fan, Q. Y. Wei, M. R. Li [et al.] // Chinese Journal of Cancer (Ai Zheng). – 2003. – V. 22, № 9. – P. 968–973.
15. *Gacko M.* Lysosomal carboxypeptidase A / M. Gacko, A. Worowska, A. Wozniak [et al.] // Postepy Biochem. – 2005. – V. 51, № 2. – P. 162–170.
16. *Gomez-Ortiz M.* Inhibition of carboxypeptidase A by excess zinc: analysis of the structural determinants by X-ray crystallography / M. Gomez-Ortiz, F. X. Gomis-Ruth, R. Huber, F. X. Aviles // FEBS Lett. – 1997. – V. 400, № 3. – P. 336–340.

17. *Harbeck N.* u-Plasminogen activator (urinary plasminogen activator, urokinase) (uPA) and its PA-1 type 1 inhibitor are not only prognostically but also predictively significant and support clinical decisions on therapy in primary carcinoma of the breast / N. Harbeck, C. Thomssen // *Zentralblatt fur Gynakologie*. – 2003. – V. 12, № 9. – P. 362–367.
18. *Igic R.* Localization of carboxypeptidase A-like enzyme in rat kidney / R. Igic, S. Garber, M. Sekosan [et al.] // *Peptides*. – 2003. – V. 24, № 8. – P. 1237–1240.
19. *Janecki D. J.* Denaturation of metalloproteins with EDTA to facilitate enzymatic digestion and mass fingerprinting / D. J. Janecki, J. P. Reilly // *Rapid Commun Mass Spectrom*. – 2005. – V. 19, № 10. – P. 1268–1272.
20. *Kilshtain A. V.* On the origin of the catalytic power of carboxypeptidase A and other metalloenzymes / A. V. Kilshtain, A. Warshel // *Proteins*. – 2009. – V. 77, № 3. – P. 536–550.
21. *Kunitz M. I.* The determination of kaseine in the blood and urine / M. I. Kunitz // *Journal of Biological Chemistry*. – 1946. – V. 164. – P. 563–571.
22. *Larsen K. S.* Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A / K. S. Larsen, D. S. Auld // *Biochemistry*. – 1991. – V. 30, № 10. – P. 2613–2618.
23. *Levicar N.* Comparison of potential biological markers cathepsin B, cathepsin L, stefin A and stefin B with urokinase and plasminogen activator inhibitor-1 and clinicopathological data of breast carcinoma patients / N. Levicar, J. Kos, A. Blejec [et al.] // *Cancer Detection and Prevention*. – 2002. – V. 26, № 1. – P. 42–49.
24. *Li X.* Zinc-mediated thermal stabilization of carboxypeptidase A / X. Li, B. Solomon // *Biomol. Eng.* – 2001. – V. 18, № 4. – P. 179–183.
25. *Lowry O. H.* Protein measurement with the Folin-Phenol reagent / O. H. Lowry, N. I. Rosenbrough, A. Z. Fan, R. J. Randol // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 194, № 1. – P. 265–271.
26. *Lyons P. J.* Substrate specificity of human carboxypeptidase A6 / P. J. Lyons, L. D. Fricker // *J. Biol Chem.* – 2010. – V. 285, № 49. – P. 38234–38242.
27. *Park J. D.* Cysteine derivatives as inhibitors for carboxypeptidase A: synthesis and structure-activity relationships / J. D. Park, D. H. Kim // *J. Med. Chem.* – 2002. – V. 45, № 4. – P. 911–918.
28. *Pejler G.* Novel insights into the biological function of mast cell carboxypeptidase A / G. Pejler, S. D. Knight, F. Henningson, S. Wernersson // *Trends Immunol.* – 2009. – V. 30, № 8. – P. 401–408.
29. *Pereira H. J.* Angiotensin processing is partially carried out by carboxypeptidases in the rat mesenteric arterial bed perfusate / H. J. Pereira, L. L. Souza, M. C. Salgado, E. B. Oliveira // *Regul Pept.* – 2008. – V. 151, № 1–3. – P. 135–138.
30. *Petra P. H.* The heterogeneity of bovine carboxypeptidase A. The chromatographic purification of carboxypeptidase A / P. H. Petra, H. Neurath // *Biochem.* – 1969. – V. 8, № 6. – P. 2466–2475.
31. *Reddanna P.* Carboxypeptidase A-catalyzed direct conversion of leukotriene C4 to leukotriene F4 / P. Reddanna, K. S. Prabhu, J. Whelan, C. C. Reddy // *Arch Biochem Biophys.* – 2003. – V. 413, № 2. – P. 158–163.
32. *Schmidt D.* Modified form of the fibrinogen Bbeta chain (des-Gln Bbeta), a potential long-lived marker of pancreatitis / D. Schmidt, S. O. Brennan // *Clin Chem.* – 2007. – V. 53, № 12. – P. 2105–2111.
33. *Spyroulias G. A.* Structural features of angiotensin-I converting enzyme catalytic sites: conformational studies in solution, homology models and comparison with other zinc metallopeptidases / G. A. Spyroulias, A. S. Galanis, G. Pairs [et al.] // *Curr Top Med Chem.* – 2004. – V. 4, № 4. – P. 403–429.
34. *Steiner D. F.* On the discovery of precursor processing / D. F. Steiner // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – V. 768. – P. 3–11.
35. *Tanco S.* Characterization of the substrate specificity of human carboxypeptidase A4 and implications for a role in extracellular peptide processing / S. Tanco, X. Zhang, C. Morano [et al.] // *J. Biol Chem.* – 2010. – V. 285, № 24. – P. 18385–18396.
36. *Ton G. N.* Methoxypoly(ethylene glycol)-conjugated carboxypeptidase A for solid tumor targeting: part II: pharmacokinetics and biodistribution in normal and tumor-bearing rodents / G. N. Ton, J. P. Weichert, M. A. Longino [et al.] // *J. Control Release.* – 2005. – V. 104, № 1. – P. 155–166.
37. *Van Aalten D. M.* Crystal structure of carboxypeptidase A complexed with D-cysteine at 1.75 Å – inhibitor-induced conformational changes / D. M. van Aalten, C. R. Chong, L. Joshua-Tor // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39, № 33. – P. 10082–10089.
38. *Vinothini G.* Correlation of matrix metalloproteinases and their inhibitors with hypoxia and angiogenesis in premenopausal patients with adenocarcinoma of the breast / G. Vinothini, C. Aravindraj, K. Chitrathara, S. Nagini // *Clinical Biochemistry.* – 2011. – V. 44, № 12. – P. 969–974.
39. *World Health Organization Classification of Tumors* / F. A. Tavassoli, P. Devilee [et al.] // *Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs*. – Lion: IARCPress 2003. – 432 p.

Стаття надійшла до редакція 20.08.2016

Е. А. Филипцова¹, И. Л. Вовчук²

¹Государственное учреждение «Южноукраинский национальный педагогический университет имени К. Д. Ушинского», кафедра биологии и основ здоровья, ул. Старопортофранковская, 26, Одесса, 65020, Украина, тел.: (048) 705-46-68, e-mail: kafil-bio@mail.ru

²Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра биохимии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: (0482) 68-78-75.

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А НЕТРАНСФОРМИРОВАННОЙ ТКАНИ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме

Проблема. Лизосомальная карбоксипептидаза А [КФ 3.4.17.1] – цинксодержащая протеаза, которая принимает активное участие на заключительных этапах протеолиза и регуляции метаболизма клеток при многих физиологических и патологических процессах. **Цель.** Изучение биохимических свойств карбоксипептидазы А нетрансформированной ткани и доброкачественного новообразования молочной железы. **Методы.** Отбор анатомического материала для исследований проводили с соблюдением этических и правовых норм. Ферменты получали с помощью поэтапного фракционирования $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, диализа в присутствии 2 мМ Zn^{++} и гель-хроматографии на сефадексе – G 75. Исследования субстратной специфичности ферментов проводили по гидролизу субстрата карбо-бензоксиглутамилфенилаланина, фенилаланилаланина, глутамил – тирозина, пролилаланина (2,0 мМ), гемоглобина и казеина (2,0 %). Влияние ингибиторов и активаторов определяли в присутствии: ДТТ, Zn^{++} , цистеина, тритона X-100, соевого ингибитора трипсина, лейпептина, пепстатина, ПХМБ, ФМСФ, диметилмолиэмидангидрида, тозилгептанола, меркаптоэтанола, ЕДТА и 1,10 – фенатролина. Скорость реакции (V_{max}), константу Михаэлиса (K_m), тип ингибирования и константу ингибирования (K_i) анализировали по Лайнуиверу – Берку. **Результаты.** Карбоксипептидаза А нетрансформированной и опухолевой ткани молочной железы лучше расщепляет субстраты, которые имеют гидрофобные и ароматические аминокислоты. Активность карбоксипептидазы А доброкачественного новообразования молочной железы больше всего ингибируется под влиянием лейпептина, тозилгептанола и диметилмолиэмидангидрида, в отличие от нетрансформированной ткани. Для карбоксипептидазы А нетрансформированной ткани молочной железы установлено $K_m = 0,24$ мМ и $K_i = 0,40$ мМ, а для карбоксипептидазы А доброкачественного новообразования – $K_m = 0,14$ мМ и $K_i = 0,16$ мМ. **Выводы.** Карбоксипептидаза А нетрансформированной ткани и доброкачественного новообразования молочной железы сходны по субстратной специфичности, неконкурентному типу ингибирования фенилаланином и по влиянию ингибиторов и активаторов, за исключением лейпептина, тозилгептанола и диметилмолиэмидангидрида, но отличаются по средству к карбо-бензоксиглутамилфенилаланину и чувствительности к фенилаланину.

Ключевые слова: карбоксипептидаза А, биохимические свойства, молочная железа, новообразование.

K. A. Filiptsova¹, I. L. Vovchuk²

¹South Ukrainian National Pedagogical University named after K. D. Ushynskiy,
Department of Biology and Bases of Health

26, Staroportofrankivska str., Odesa, 65020, Ukraine, e-mail: kafil-bio@mail.ru

²Odesa National Mechnykov University, Department of Biochemistry

2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine.

BIOCHEMICAL PROPERTIES OF CARBOXYPEPTIDASE A FROM NON-TRANSFERRED TISSUE AND BENIGNANT TUMOR TISSUE OF THE MAMMALIAN GLAND

Abstract

Introduction. Lysosomal carboxypeptidase A [KE 3.4.17.1] is a zinc-dependent protease that participates actively at the terminal stages of proteolysis and regulation of metabolism of cells in many physiological and pathological processes. **Purpose.** To study biochemical properties of carboxypeptidase A from non-transformed tissue and benignant tumor tissue of the mammalian gland. **Methods.** Sampling of anatomical materials for research was conducted with compliance of ethical and legal standards. Excretion of the enzymes included gradual fractionation with the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dialysis in presence of 2.0 mM Zn^{++} and gel chromatography on the sephadex – G 75. The investigation of the substrate specificity of the enzymes was held by hydrolysis of the substrate of carbobenzoxypheylalanine, phenylalanylalanine, glutamyl-tyrosine, prolylalanine (2.0 mM), haemoglobin and casein (2.0 %). The influence of inhibitors and activators was determined in presence of: DTT, Zn^{++} , cysteine, triton X-100, soybean trypsin inhibitor, leupeptin, pepstatin, PHMB, FMSF, dimethylmolyemydanhydride, tozylheptanol, mercaptoethanol, EDTA and 1.10 – phenanthroline. The maximal velocity (V_{max}), Mihaelis constant (K_m), inhibition type and inhibition constant (K_i) analysed by Laynuiveru – Berku method. **Results.** Carboxypeptidase A from non-transformed tissue and benignant tumor of the mammalian gland better splits the substrates, which have hydrophobic and aromatic amino acids. The activity of carboxypeptidase A from the benignant tumor of the mammalian gland is inhibited most of all under influence of leupeptin, tozylheptanol and dimethylmolyemydanhydride, in contrast to non-transformed tissue. For carboxypeptidase A from non-transformed tissue of the mammalian gland $K_m = 0.24$ mM and $K_i = 0.40$ mM were determined, for carboxypeptidase A from the benignant tumor tissue of the mammalian gland – $K_m = 0.14$ mM and $K_i = 0.16$ mM. **Conclusion.** Carboxypeptidase A from non-transformed tissue and benignant tumor of the mammalian gland is identical as to the substrate specificity, inhibition by phenylalanine for non-competitive type, inhibition and activation effect by reagent with the exclusion of leupeptin, tozylheptanol and dimethylmolyemydanhydride, but differ as to affinity to carbobenzoxypheylalanine and sensitivity to phenylalanine.

Key words: carboxypeptidase A, biochemical properties, mammalian gland, tumor.

References:

1. Marri R, Grenner D, Mejes P, Roduell V (2004) *Biochemistry of the person* [Биохимија чело века], Moskva: Mir, 381 p.
2. Vinogradova RP (1978) *Molecular bases of the action enzymes* [Молекулярне основи дејствија ферментов], Kiev: Vyshcha shkola, 260 p.
3. Vovchuk IL, Petrov SA (2006) "Physicochemical properties of carboxypeptidase A from the non-malignized tissue and tumors ovarian of women" ["Фізико-хімічні властивості карбокси-peptidazy A виділеної із немалігнізованої і опухолової тканини яєчника жінки"], Material IX Ukrainian biochemical convention, 24-27 October 2006, Harkiv, p 35.
4. Kopylchuk GP, Yakovyshyn GV, Chorna IV (2007) "The activity of nucleus histonespecific proteinases the lymphocytes of the spleen beforehand irradiated rats with transportation Heren carcinoma" ["Активність ядерних гістоспецифічних протеїназ лімфоцитів селезінки попередньо опроміненої шчурів з трансплантованою карциномою герена"], Collection thesis to third International scientific conference student and graduate student, 23-27 April 2007, Lviv, pp 64-65.
5. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN (2001) *Statistical methods in physician-biological study with use Excel* [Статистичні методи в медико-біологічних дослідженнях з використанням Excel], Kiev, MORION, 408 p.
6. Alonso-del-Rivero M, Trejo SA, Rodriguez de la Vega M (2009) "A novel metallo-carboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica* – a step into the invertebrate world of proteases", *FEBS J*, No 17, 276, pp 4875-4890.
7. Anson ML, Mirsky AE (1932) "The estimation of pepsin with hemoglobin", *Journal of General Physiology*, No 1, 16, pp 59-67.
8. Arolas JL, Popowicz GM, Bronsoms S (2005) "Study of a major intermediate in the oxidative folding of leech carboxypeptidase inhibitor: contribution of the fourth disulfide bond", *J Mol Biol*, No 4, 352, pp 961-975.
9. Arolas JL, Vendrell J, Aviles FX, Fricker LD (2007) "Metallo-carboxypeptidases: emerging drug targets in biomedicine", *Curr Pharm Des*, No 3, 13, pp 347-364.
10. Austin BP, Tozser J, Bagossi P (2010) "The substrate specificity of *Metarhizium anisopliae* and *Bos Taurus* carboxypeptidases A: Insights into their use as tools for the removal of affinity tags", *Protein Expr Purif*, No 2, 24, pp 102-109.
11. Bradshaw RS, Ericsson LH, Walsh KA, Neurath H (1969) "The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, No 4, 63, pp. 1389-1394.
12. Chong CR, Auld DS (2007) "Catalysis of zinc transfer by D-penicillamine to secondary chelators", *J Med Chem*, No 22, 50, pp 5524-5527.
13. Deckert PM, Bornmann WG, Ritter G (2004) "Specific tumour localisation of a huA33 antibody-carboxypeptidase A conjugate and activation of methotrexate-phenylalanine", *Int J Oncol*, No 5, 24, pp 1289-1295.
14. Fan SQ, Wei QY, Li MR (2003) "Expression and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in breast carcinoma", *Chinese Journal of Cancer (Ai Zheng)*, No 9, 22, pp 968-973.
15. Gacko M, Worowska A, Wozniak A (2005) "Lisosomal carboxypeptidase A", *Postepy Biochem*, No 2, 51, pp 162-170.
16. Gomez-Ortiz M, Gomis-Ruth FX, Huber R, Aviles FX (1997) "Inhibition of carboxypeptidase A by excess zinc: analysis of the structural determinants by X-ray crystallography", *FEBS Lett*, No 3, 400, pp 336-340.
17. Harbeck N, Thomssen C (2003) "u-Plasminogen activator (urinary plasminogen activator, urokinase) (uPA) and its PA-1 type 1 inhibitor are not only prognostically but also predictively significant and support clinical decisions on therapy in primary carcinoma of the breast", *Zentralblatt fur Gynakologie*, No 9, 12, pp 362-367.
18. Igic R, Garber S, Sekosan M (2003) "Localization of carboxypeptidase A-like enzyme in rat kidney", *Peptides*, No 8, 24, pp 1237-1240.
19. Janecki DJ, Reilly JP (2005) "Denaturation of metalloproteins with EDTA to facilitate enzymatic digestion and mass fingerprinting", *Rapid Commun Mass Spectrom*, No 10, 19, pp 1268-1272.
20. Kilshtain AV, Warshel A (2009) "On the origin of the catalytic power of carboxypeptidase A and other metalloenzymes", *Proteins*, No 3, 77, pp 536-550.
21. Kunitz MI (1946) "The determination of kaseine in the blood and urine", *Journal of Biological Chemistry*, 164, pp 563-571.
22. Larsen KS, Auld DS (1991) "Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A", *Biochemistry*, No 10, 30, pp 2613-2618.

23. Levicar N, Kos J, Blejec A (2002) "Comparison of potential biological markers cathepsin B, cathepsin L, stefin A and stefin B with urokinase and plasminogen activator inhibitor-1 and clinicopathological data of breast carcinoma patients", *Cancer Detection and Prevention*, No 1, 26, pp 42–49.
24. Li X, Solomon B (2001) "Zinc-mediated thermal stabilization of carboxypeptidase A", *Biomol. Eng.* No 4, 18, pp 179-183.
25. Lowry OH, Rosenbrough NI, Fan AZ, Randol RJ (1951) "Protein measurement with the Folin-Phenol reagent", *J. Biol. Chem.*, No 1, 194, pp 265-271.
26. Lyons PJ, Fricker LD (2010) "Substrate specificity of human carboxypeptidase A", *J Biol Chem*, No 49, 285, pp 38234-38242.
27. Park JD, Kim DH (2002) "Cysteine derivatives as inhibitors for carboxypeptidase A: synthesis and structure-activity relationships", *J. Med. Chem.*, No 4, 45, pp 911-918.
28. Pejler G, Knight SD, Henningsson F, Wernersson S (2009) "Novel insights into the biological function of mast cell carboxypeptidase A", *Trends Immunol*, No 8, 30, pp 401-408.
29. Pereira HJ, Souza LL, Salgado MC, Oliveira EB (2008) "Angiotensin processing is partially carried out by carboxypeptidases in the rat mesenteric arterial bed perfusate", *Regul Pept*, No 1-3, 151, pp 135-138.
30. Petra PH, Neurath H (1969) "The heterogeneity of bovine carboxypeptidase A. The chromatographic purification of carboxypeptidase A", *Biochem*, No 6, 8, pp 2466-2475.
31. Reddanna P, Prabhu KS, Whelan J, Reddy CC (2003) "Carboxypeptidase A-catalyzed direct conversion of leukotriene C4 to leukotriene F4", *Arch Biochem Biophys*, No 2, 413, pp 158-163.
32. Schmidt D, Brennan SO (2007) "Modified form of the fibrinogen Bbeta chain (des-Gln Bbeta), a potential long-lived marker of pancreatitis", *Clin Chem*, No 12, 53, pp 2105-2111.
33. Spyroulias GA, Galanis AS, Pairs G (2004) "Structural features of angiotensin-I converting enzyme catalytic sites: conformational studies in solution, homology models and comparison with other zinc metallopeptidases", *Curr Top Med Chem*, No 4, 4, pp 403-429.
34. Steiner DF (2011) "On the discovery of precursor processing", *Methods Mol. Biol.*, 768, pp 3-11.
35. Tanco S, Zhang X, Morano C (2010) "Characterization of the substrate specificity of human carboxypeptidase A4 and implications for a role in extracellular peptide processing", *J Biol Chem*, No 24, 285, pp 18385-18396.
36. Ton GN, Weichert JP, Longino MA (2005) "Methoxypoly(ethylene glycol)-conjugated carboxypeptidase A for solid tumor targeting: part II: pharmacokinetics and biodistribution in normal and tumor-bearing rodents", *J Control Release*, No 1, 104, pp 155-166.
37. Van Aalten DM, Chong CR, Joshua-Tor L (2000) "Crystal structure of carboxypeptidase A complexed with D-cysteine at 1.75 Å – inhibitor-induced conformational changes", *Biochemistry*, No 33, 39, pp 10082-10089.
38. Vinothini G, Aravindraja C, Chitrathara K, Nagini S (2011) "Correlation of matrix metalloproteinases and their inhibitors with hypoxia and angiogenesis in premenopausal patients with adenocarcinoma of the breast", *Clinical Biochemistry*, No 12, 44, pp 969–974.
39. Tavassoli FA, Devilee P (2003) "World Health Organization Classification of Tumors", *Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs*, Lion: IARC Press, 432 p.