

УДК: 577.152.344:577.15.072

**Виділення та очищення карбоксипептидази А з тканини злоякісного новоутворення
молочної залози методом електрофорезу
К.А.Філіпцова, І.Л.Вовчук**

Одеський національний університет імені І.І.Мечникова (Одеса, Україна)

Розроблена методика виділення та очищення карбоксипептидази А з тканини злоякісного новоутворення молочної залози, що складається з поступового осадження сульфатом амонію та препаративного електрофорезу. Методом нативного препаративного електрофорезу в ПААГ вивчені білкові спектри та ідентифіковані ізозими карбоксипептидази А досліджуваної тканини. Встановлено, що поступове осадження призводить до ефективного розподілу карбоксипептидази А по фракціях за її солерозчинністю. Аналіз електрофореграм білкового спектру показав наявність тканеспецифічного для тканини злоякісного новоутворення молочної залози білка, характерного для кожного насичення. Білковий спектр малігнізованої тканини молочної залози на 38% представлений білками, що мають ферментативну карбоксипептидазо-А-активність.

Ключові слова: *карбоксипептидаза А, молочна залоза, пухлина, електрофорез.*

Вступ

Одним з прогностичних критеріїв онкопроцесу є ензиматичні характеристики пухлинної тканини (Тарутинов, 1998). Відомо, що пухлинні клітини можуть збільшувати продукцію різних протеолітичних ферментів, які приймають участь в деградації білків позаклітинного матриксу (Веремеєнко, Кизим, 1964; Веремеєнко, 1994; Веремеєнко и др., 1987).

Протеолітичний потенціал клітин в значній мірі визначається лізосомальним апаратом. Карбоксипептидаза А (КФ 3.4.2.1) – лізосомальний фермент, що в значній мірі забезпечує протеолітичний потенціал клітини та приймає участь у клітинному метаболізмі звичайних та аномальних білків. Ряд даних, щодо інших органів, свідчать про включення карбоксипептидази А в процеси інвазії та метастазування пухлин (Hansen et al., 1981).

В попередніх дослідженнях нами було встановлено підвищення активності карбоксипептидази А в тканинах злоякісних новоутворень молочної залози порівняно з немалігнізованою тканиною (Вовчук та ін., 2004). Вивчення білкових спектрів нормальних та патологічних зразків дає можливість знайти біохімічні маркери певних патологічних станів.

Тому метою роботи було вивчення електрофоретичних характеристик водорозчинних білків та білків, фракціонованих з тканини злоякісного новоутворення молочної залози, а також ідентифікація ізозимів карбоксипептидази А безпосередньо в гелевому блоці.

Матеріали і методи

Досліджували зразки злоякісного новоутворення молочної залози, вилучені операційним шляхом у жінок, які не отримували медикаментозного доопераційного лікування. Патоморфологічний діагноз: помірнодиференційована форма інфільтруючого протокового раку молочної залози був верифікований за міжнародною класифікацією ВОЗ із визначенням морфологічного стану і ступеня диференціації трансформованих клітин пухлинної тканини (Всемирная Организация Здравоохранения, 1981). Зразки тканини доброякісного новоутворення молочної залози гомогенізували в дистильованій воді (у співвідношенні 1 : 10) і центрифугували при 9000 g/хв. при +4°C протягом 45 хв. Для очищення екстракту від низькомолекулярних домішок використовували метод діалізу проти двадцятикратного об'єму дистильованої води в присутності 2 мМ Zn⁺⁺ (Практическая химия белка, 1989). Розчини білків, отримані після діалізу, поетапно фракціонували сульфатом амонію (Практическая химия белка, 1989; Marks et al., 1981). Для очищення від надлишку (NH₄)₂SO₄, що заважав визначенню білка за методом Lowry (Lowry et al., 1951), фракції, отримані при 20%, 40%, 60% і 80% насиченні сульфатом амонію, піддавали повторному діалізу в тих же умовах. У фракціях визначали активність карбоксипептидази А за гідролізом синтетичного субстрату карбобензоксиглутамілфенілаланіну – 2 мМ (Bradshaw et al., 1969).

Вертикальний електрофорез проводили на пластинах 140 × 140 × 1 мм в лужному (тригліцеринний буфер, рН 8,3) середовищі в 10%-ому поліакриламідному гелі („Reanal”, Угорщина) при температурі 25°C протягом 3,5 годин (Остерман, 1982). Зразки вносили в слоти в об'ємі 30 мкл в 15 мкл 60%-го розчину сахарози. Початкове концентрування білків проводили протягом 20 хв. при 20 мА (з розрахунку на два гелевих блоки), а подальший розподіл білків – при 40 мА. В якості стартового

маркеру використовували 0,1%-ий розчин бромфенолового синього. Після закінчення електрофорезу гелеві блоки багаторазово відмивали дистильованою водою і фарбували протягом 30 хв. 0,25%-им розчином Кумасі R-250 („Serva”, Швеція) в 45,0%-му етанолі, що містить 9,0% оцтову кислоту.

Електрофореграми отримували скануванням вологих гелевих блоків з наступною комп'ютерною обробкою електрофореграм за допомогою програми ANAIS.

Методом препаративного електрофорезу (Шварцман, 1975) за допомогою зафарбованих Кумасі R-250 білкових смуг ідентифікували ділянки непофарбованого гелю, що містили іммобілізовані білки, в яких далі визначали активність карбоксипептидази А (Bradshaw et al., 1969). Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 570 нм, питому активність (ПА) ферменту виражали в мкмоль фенілаланіну на мг білка. В якості контролю брали ділянки гелевого блоку після електрофорезу в однакових умовах, в слоти якого проби не вносили. Результати дослідження були оброблені статистично з визначенням коефіцієнта Стьюдента (Рокицкий, 1967).

Результати та їх обговорення

Аналіз електрофореграм нативного лужного електрофорезу показав, що за злякисної патології в тканині молочної залози в білковому спектрі до діалізу 40% водорозчинних білків представлені «мінорними» малорухомими формами з Rf 0,011 і Rf 0,068. Ще 40% спектру водорозчинних білків приходить на «мінорні» помірнорухомі форми з Rf 0,120 і Rf 0,190, а 20%, відповідно, – на «мажорний» швидкорухомий білок з Rf 0,350 (табл. 1, рис. 1).

Таблиця 1.

Електрофоретична характеристика білкового спектру тканини злякисного новоутворення молочної залози, n=2

Електрофоретична рухливість білків (Rf)	Спектр водорозчинних білків		Фракціонування білків (NH ₄) ₂ SO ₄			
	до діалізу	після діалізу	20% насичення	40% насичення	60% насичення	80% насичення
0,011	+	+		+		
0,014					+	
0,023						
0,036				+		
0,050						
0,058				+		
0,062						
0,065			+	+	+	
0,066						
0,067		+				
0,068	+					
0,070						
0,073						
0,074						
0,075						
0,076						
0,085						
0,089					+	
0,090			+	+		
0,097						
0,100						
0,110		+		+	+	
0,120	+					
0,140						
0,160		+	+		+	
0,170				+		
0,180		+				
0,190	+			+	+	
0,200						
0,210						
0,230						

Продовження таблиці 1.

0,240						
0,350	+		+		+	+
0,360		+		+		
0,370						
0,390						
0,400						

Примітка: * – фракції, що мають ферментативну активність до субстрату карбоксипептидази А – карбобензоксиглутамілфенілаланіну.

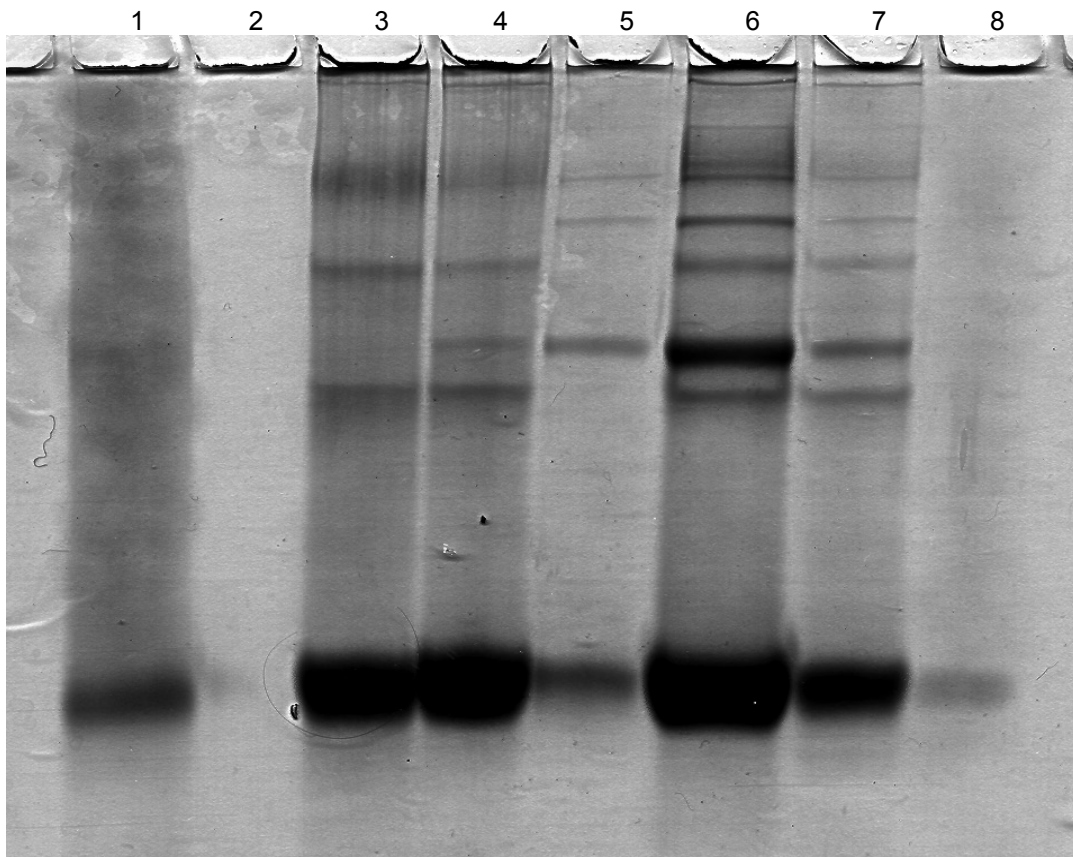


Рис. 1. Електрофореграма водорозчинних білків та білків, фракціонованих сульфатом амонію з тканини злоякісного новоутворення молочної залози

Примітка:

- 1 – сироватковий альбумін людини, M_r 66500 Да (нанесено 50,0 мкг білка);
- 2 – контрольний гель (без білка);
- 3 – водорозчинні білки (до діалізу, нанесено 25,2 мкг білка);
- 4 – водорозчинні білки (після діалізу, нанесено 23,1 мкг білка);
- 5 – фракція білків, осаджених при 20%-ному насиченні $(NH_4)_2SO_4$ (нанесено 2,1 мкг білка);
- 6 – фракція білків, осаджених при 40%-ному насиченні $(NH_4)_2SO_4$ (нанесено 21,3 мкг білка);
- 7 – фракція білків, осаджених при 60%-ному насиченні $(NH_4)_2SO_4$ (нанесено 3,0 мкг білка);
- 8 – фракція білків, осаджених при 80%-ному насиченні $(NH_4)_2SO_4$ (нанесено 1,2 мкг білка).

Умови діалізу призводили до збільшення кількості помірнорухомих білків у фракції водорозчинних білків досліджених зразків, що може свідчити про їх деградацію під час діалізу і очищення діалізату від низькомолекулярних домішок.

Так, після діалізу, як і до діалізу, спектр водорозчинних білків малігнізованої тканини на 50% був представлений малорухомими (R_f 0,011 і R_f 0,067) та швидкорухомим (R_f 0,360) білками, однак, кількість помірнорухомих білків (R_f 0,110, R_f 0,170 і R_f 0,190) збільшилась з 40% до 50% (табл. 1, рис. 1).

При аналізі електрофореграми білкового спектру поетапного сольового фракціонування 20%, 40%, 60% та 80% насичення були виявлені характерні для кожного етапу виділення «мажорні» та «мінорні» білки досліджуваної пухлинної тканини молочної залози.

Встановлено, що при 20% насиченні сульфатом амонію білковий спектр малігнізованої тканини представлений двома «мінорними» малорухомими формами з Rf 0,065 і 0,090 та одним «мажорним» швидкорухомим білком з Rf 0,350. Однак, на відміну від спектру водорозчинних білків до та після діалізу, при 20% насиченні фракціонується лише один «мінорний» помірнорухомий білок з Rf 0,160 (табл. 1, рис. 1).

Для білкового спектру тканини злоякісного новоутворення молочної залози, отриманого при 40% насиченні, характерно розширення білкового спектру з 5 до 9 білків, в порівнянні з білковим спектром вихідного розчину, за рахунок «мінорних» малорухомих білків з Rf 0,036 і Rf 0,058, що не ідентифікувалися раніше. Також при 40% насиченні спостерігається наявність білків, що зустрічаються в спектрі водорозчинних білків і 20% насичення, а саме «мінорних» малорухомих (Rf 0,011, Rf 0,065, Rf 0,090) і помірнорухомих (Rf 0,110, Rf 0,170 і Rf 0,190) білків та швидкорухомого «мажорного» білка з Rf 0,360 (табл. 1, рис. 1).

При 60% насиченні білковий спектр пухлинної тканини представлений «мінорними» малорухомими білками з Rf 0,014, Rf 0,065, Rf 0,090 і помірнорухомими білками з Rf 0,110, Rf 0,160, Rf 0,190, а також одним «мажорним» швидкорухомим білком з Rf 0,350, який був виявлений і при 80% насиченні сульфатом амонію (табл. 1, рис. 1).

Таким чином, білковий спектр тканини злоякісного новоутворення молочної залози в основному представлений «мінорними» як малорухомими білками з Rf 0,065–0,068 і Rf 0,089–0,090, так і помірнорухомими білками з Rf 0,110–0,120, Rf 0,160–0,170 і Rf 0,180–0,190, та «мажорними» швидкорухомими білками з Rf 0,350–0,360.

Методом нативного препаративного електрофорезу було встановлено, що білковий спектр тканини злоякісного новоутворення молочної залози на 38% представлений білками, що мають карбоксипептидазо-А-подібну активність (табл. 2).

Таблиця 2.

Виділення ізоферментів карбоксипептидази А з тканини злоякісного новоутворення молочної залози методом препаративного електрофорезу в поліакриламідному гелі, n=3

Фракція	Вихідна фракція білка та ізоформи	Вміст білка в фракції, г	ПА, мкмоль фен/мг білка	Коефіцієнт очищення
Розчинні білки до діалізу	Вихідна фракція білка	0,0252 ± 0,0025	0,129 ± 0,013	1,00
	Ізозим Rf 0,350	0,0125 ± 0,0013	0,085 ± 0,009	0,66
Розчинні білки після діалізу	Вихідна фракція білка	0,0231 ± 0,0023	0,138 ± 0,014	1,00
	Ізозим Rf 0,360	0,0125 ± 0,0013	0,074 ± 0,007	0,54
20% насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	Вихідна фракція білка	0,0021 ± 0,0002	1,571 ± 0,157	1,00
	Ізозим Rf 0,160	0,0005 ± 0,00005	1,754 ± 0,175	1,12
	Ізозим Rf 0,350	0,0012 ± 0,0001	0,694 ± 0,069	0,44
40% насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	Вихідна фракція білка	0,0213 ± 0,0021	0,173 ± 0,017	1,00
	Ізозим Rf 0,170	0,0031 ± 0,0003	0,297 ± 0,030	1,72
	Ізозим Rf 0,190	0,0013 ± 0,0001	0,641 ± 0,064	3,71
	Ізозим Rf 0,360	0,0115 ± 0,0012	0,073 ± 0,007	0,42
60% насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	Вихідна фракція білка	0,0030 ± 0,0003	1,150 ± 0,115	1,00
	Ізозим Rf 0,065	0,0002 ± 0,00002	4,390 ± 0,439	3,82
	Ізозим Rf 0,160	0,0004 ± 0,00004	2,333 ± 0,233	2,03
	Ізозим Rf 0,190	0,0004 ± 0,00004	2,325 ± 0,233	2,02
	Ізозим Rf 0,350	0,0015 ± 0,0002	0,615 ± 0,062	0,54
80% насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	Вихідна фракція білка	0,0012 ± 0,0001	4,800 ± 0,480	1,00
	Ізозим Rf 0,350	0,0008 ± 0,0001	1,166 ± 0,117	0,24

Метод препаративного електрофорезу дозволив отримати індивідуальні форми карбоксипептидази А з коефіцієнтом очищення від 1,12 до 3,82, в залежності від етапу фракціонування (табл. 2).

Отже, використання методу поетапного висолювання приводить до більш ефективного фракціонування білків, що мають карбоксипептидазо-А-активність, і дозволяє отримати високоочищені індивідуальні ізоформи карбоксипептидази А з високою питомою активністю ферменту.

В окремому досліді (варіант кислого електрофорезу) було показано відсутність лужних форм карбоксипептидази А у фракції водорозчинних та осаджених сульфатом амонію білків у досліджуваній пухлинній тканині.

Таким чином, встановлено наявність тканеспецифічності ферменту малігнізованої тканини молочної залози, електрофоретична рухливість якого (R_f 0,350–0,360) відрізняється від електрофоретичної рухливості ферменту, отриманого в аналогічних умовах з тканини яєчника (R_f 0,300) та ендометрію (R_f 0,290) (Вовчук, 2006; Вовчук и др., 2006).

Висновки

1. Спектр водорозчинних білків та білків злоякісного новоутворення молочної залози, осаджених сульфатом амонію, в основному представлений «мінорними» малорухомими (R_f 0,065–0,068, R_f 0,089–0,090) і помірнорухомими (R_f 0,110–0,120, R_f 0,160–0,170 і R_f 0,180–0,190) білками та «мажорними» швидкорухомими білками з R_f 0,350–0,360.
2. Білковий спектр тканини злоякісного новоутворення молочної залози на 38% представлений білками, що мають ферментативну карбоксипептидазо-А-активність.
3. Встановлено наявність тканеспецифічності ферменту злоякісного новоутворення молочної залози з електрофоретичною рухливістю R_f 0,350–0,360.

Список літератури

- Вовчук І.Л., Чернадчук С.С., Мотрук Н.В. та ін. Активність карбоксипептидази А в новоутвореннях молочної залози // Вісник ОНУ. – 2004. – Т.9, вип.5. – С. 29–37.
- Веремеенко К.Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы. Новые области применения в клинике // Врачебное дело. – 1994. – №1. – С. 8–13.
- Веремеенко К.Н., Зоболотный Д.И., Кизим А.И. Роль протеолиза в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей // Журн. АМН Украины. – 1987. – Т.8, №2. – С. 217–237.
- Веремеенко К.Н., Кизим А.И. О наличии двух ингибиторов трипсина в сыворотке крови человека // Биохимия. – 1964. – №29, вып.1. – С. 132–137.
- Вовчук И.Л. Выделение и идентификация изоферментов карбоксипептидазы А из опухолевых тканей яичников // Вісник ОНУ. – 2006. – Т.11, №1. – С. 34–50.
- Вовчук И.Л., Кучеров В.А., Петров С.А. Выделение и идентификация молекулярных форм карбоксипептидазы А опухолевой ткани эндометрия матки женщин // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2006. – Вип.4, №748. – С. 21–32.
- Всемирная Организация Здравоохранения // Материалы ежегодных отчетов. – Санкт-Петербург: Медицина, 1981. – 286с.
- Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). – М.: Наука, 1982. – 288с.
- Практическая химия белка. – М.: Мир, 1989. – С. 39–43.
- Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высш. школа, 1967. – 326с.
- Тарутинов В.И. Рак молочной железы // Лікування та діагностика. – №2. – 1998. – С.22.
- Шварцман А.Л. О структуре и функциях гексокиназы в раковых клетках человека. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Ленинград, 1975. – 28с.
- Bradshaw R.S., Ericsson L.H., Walsh K.A., Neurath H. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1969. – Vol.63, №4. – P. 1389–1394.
- Hansen L.J., Mangkornkanok/Mark M., Reddy J. Immunohistochemical localization of pancreatic exocrine enzymes in normal neoplastic pancreatic acinar epithelium of rat // J. Histochem. Cytochem. – 1981. – Vol.29, №2. – P. 309–313.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.I., Fan A.Z., Randol R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol.193. – P. 265–275.
- 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, №2. – P. 159–164.

Выделение и очистка карбоксипептидазы А из ткани злокачественного новообразования молочной железы методом электрофореза
Е.А.Филипцова, И.Л.Вовчук

Разработан метод выделения и очистки карбоксипептидазы А из ткани злокачественного новообразования молочной железы, который состоит из поэтапного осаждения сульфатом аммония и препаративного электрофореза. Методом нативного препаративного электрофореза в ПААГ изучены белковые спектры и идентифицированы изоцимы карбоксипептидазы А исследуемой ткани. Установлено, что поэтапное осаждение способствует эффективному разделению карбоксипептидазы А по фракциям. Анализ электрофореграмм белкового спектра показал наличие тканеспецифического для ткани злокачественного новообразования молочной железы белка, характерного для каждого насыщения. Белковый спектр малигнизированной ткани молочной железы на 38% представлен белками, которые имеют ферментативную карбоксипептидазо-А-активность.

Ключевые слова: *карбоксипептидаза А, молочная железа, опухоль, электрофорез.*

Extraction and purification of carboxypeptidase A from the malignant tumor tissue of the mammary gland by the method of electrophoresis
E.A.Filipstsova, I.L.Vovchuk

A method of extraction and purification of carboxypeptidase A from the malignant tumor tissue of mammary gland has been created. This method includes gradual sedimentation with the help of ammonium sulfate and preparative electrophoresis. The protein spectrum and isozymes of carboxypeptidase A from the malignant tumor tissue of mammary gland were studied and identified by the PAAG electrophoretic native and preparative method. It has been established that gradual sedimentation promotes effective separating of carboxypeptidase A to the fractions. Analysis of protein spectrum showed the presence of specific for malignant tumor tissue of mammary gland protein that is characteristic for all fractions. The protein spectrum of malignant tumor tissue of mammary gland by 38% is presented by proteins which have enzymatic carboxypeptidase-A-activity.

Key words: *carboxypeptidase A, mammary gland, tumor, electrophoresis.*

Представлено: М.Ф.Леусом
Рекомендовано до друку: П.А.Каліманом