BIOCHEMICAL STUDIES ON AMINOPEPTIDASE ACTIVITY IN THE KIDNEY OF SOME MAMMALS

DOAA ABD EL KHALEK EL HUSSINY DARWISH

تهدف هذه الدراسة إلى تنقية ودراسة خواص إنزيم الألانين أمينوبتيديـز من كلى الثدييات الأليفة والشائعة والمتوفرة محلياً فى مصر؛ وهى جاموس الماء والجمال والخراف. تمت مقارنة النشاط النوعى لإنزيم الألانين أمينوبتيديـز والليوسين أمينوبتيديز والجلايسين أمينوبتيديـز فى المستخلص الخام لكلى الثدييات الثلاثة، و أظهرت المقارنة أن النشاط النوعى لإنزيم الألانين أمينوبتيديـز هو الأعلى من النشاط النوعى لليوسين أمينوبتيديز والجلايسين أمينوبتيديـز. وحتى تكون الدراسة أكثر تخصصية، تم دراسة إنزيم الألانين أمينوبتيديـز فى منطقة القشرة ومنطقة النخاع للكلية وأظهرت منطقة القشرة أنها الأعلى نشاطا نوعيا فى كلى الثدييات الثلاث لذا اختيرت منطقة القشرة الكلوية فى الثديات الثلاثة كمصدر غنى لتنقية إنزيم الألانين أمينوبتيديـز. و استخدمت طرق تـنقية بسيطة قابلة للتكرار باستعمال تقنيات الأستخلاص بواسطة الكروماتوجرافى على عمود المبادل الأنيونى ثنائى إيثيل أمينو إيثيـ-لالسليولوز وترشيح الجـل على عمود السيفاكريل S-300 . 1 -أشكال إنزيم الألانين أمينوبتيديـز من كلى جاموس الماء : تم تنقية ثلاثة أشكال من إنزيم الألانين أمينوبتيديـز الثديى من قشرة كلى جاموس الماء لدرجة التجانس والتى تم تسميتهم الألانين أمينوبيبتيديز 1 (AAP1) والألانين أمينوبيبتيديز 2 (AAP2) والألانين أمينوبيبتيديز 3 (AAP3). و تم تنقية إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و 2 و 3 على الترتيب من قشرة كلى جاموس الماء 1.74 مرة بنسبة ناتج 5.18 % للألانين أمينوبيبتيديز1 و 2.36 مرة بنسبة ناتج 8.6 % للألانين أمينوبيبتيديز2 و 6.83 مرة بنسبة ناتج 51.31 % للألانين أمينوبيبتيديز3. وأثبتت نقاوة الإنزيمات المنقاة وتجانسها بواسطة تقنية الهجرة الكهربية على كل من البولى اكريلاميد جل الطبيعى و المعامل بكبريتات دوديسيل الصوديوم (SDS). وتم تقدير الوزن الجزيئى لإنزيمات الطبيعى الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى جاموس الماء بواسطة ترشيح الجـل فوجد أنه 120 و400 و350 كيلودالتون على الترتيب، والوزن الجزيئى للوحدة الثانوية بواسطة PAGE-SDS 60 ± 1 و 67 ± 1 و 58 ± 2 كيلودالتون ليتسق الإنزيم AAP1 مع التركيب الثنائى المتماثل لإنزيمات الألانين أمينوبتيديز و (AAP3 and AAP2) مع التركيب السداسى المتماثل لإنزيمات الألانين أمينوبتيديز. ووجد أن نقطة التعادل الكهربى لإنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى جاموس الماء تقع عند الرقم الهيدروچينى (6.4) و(6.2) و (6.6) على الترتيب. وتم تحديد أقصى نشاط نوعى لإنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى جاموس الماء عند الرقم الهيدروجينى 8 و 7.8 و 7.8 على الترتيب. وتبين أن ثابت ميخائيل (Km) لإنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 هو 0.15 و0.17 و0.125 ملى مولار على الترتيب من الألانين بيتا-نفثايل أميد هيدرو كلوريد. و لقد زاد نشاط إنزيم الألانين أمينوبيبتيديز 3 وفى وجود 0.5 و0.1 ملى مولار من كلوريد الماغنسيوم الى 112.5% و108.2%، بينما زاد نشاط الإنزيم فى وجود 0.5 ملى مولار كلوريد الكالسيوم الى 107.9%. وأظهرت عناصر النحاس والمنجنيز والنيكل والزنك تثبيط نشاط إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3، بينما لم يظهر عنصرا الكوبلت والحديد أى تاثير على إنزيم الألانين أمينوبيبتيديز 3 وفى نفس الوقت ثبطا نشاط إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2. وقد تسببت كل الأحماض الأمينية فى زيادة نشاط إنزيم الألانين أمينوبيبتيديز 2 فيما عدا التيروزين و الفنيل الانين و الليوسين أحدثوا تثبيط إما بسيطا أو متوسطا على نشاط الألانين أمينوبيبتيديز 2، بينما تم تثبيط نشاط الألانين أمينوبيبتيديز 1 و3 بنسبة 47.4% و32.9% فى وجود 1 ملى مولار تيروزين، وبنسبة30% و17.8% فى وجود 1 ملى مولار فينيل ألانين وبنسبة 25% و7.7% فى وجود 1 ملى مولار سيرين على الترتيب. وأظهرت كل إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3

من قشرة كلى جاموس الماء أنها خالية من أى نشاط لإنزيمات الإندوبيبتيديز التريبسين والكيموتريبسين. و قد أظهر تأثيرالمثبطات المختلفة على إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 أن البيستاتين هو المثبط الأكثر شدة لإنزيم الألانين أمينوبيبتيديز حيث أنه ثبط بنسبة 72%و 82% و 95% من نشاط الإنزيم عند تركيز 1.0 ميكرومولار. ووجد أن البيستاتين مثبط تنافسى ذو فعالية لنشاط إنزيم AAP3 وقيمة ثابت التثبيط 0.78 ميكرومولار وله موقع إرتباط واحد على الإنزيم. 2 -أشكال إنزيم الألانين أمينوبتيديـز من كلى الجمال : تم تنقية ثلاثة أشكال من إنزيم الألانين أمينوبتيديـز الثديى من قشرة كلى الجمال لدرجة التجانس والتى تم تسميتهم الألانين أمينوبيبتيديز 1 (AAP1) والألانين أمينوبيبتيديز 2 (AAP2) والألانين أمينوبيبتيديز 3 (AAP3). و تمت تنقية إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و 2 و 3 على الترتيب من قشرة كلى الجمال 1.84 مرة بنسبة ناتج 2.7 % للألانين أمينوبيبتيديز 1 و0.56مرة بنسبة ناتج 2.1 % للألانين أمينوبيبتيديز2 و19.6 مرة بنسبة ناتج 66.9 % للألانين أمينوبيبتيديز3. وأثبتت نقاوة الإنزيمات المنقاة وتجانسها بواسطة تقنية الهجرة الكهربية على كل من البولى اكريلاميد جل الطبيعى و المعامل بكبريتات دوديسيل الصوديوم (SDS). وتم تقدير الوزن الجزيئى الطبيعى لإنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى الجمال بواسطة ترشيح الچـل فوجد أنه 118 و 420 و 360 كيلودالتون على الترتيب، والوزن الجزيئى للوحدة الثانوية بواسطة PAGE-SDS 60 ± 1 ليتسق الإنزيم AAP1 مع التركيب الثنائى المتماثل لإنزيمات الألانين أمينوبتيديز 1، و70 ± 1 ليتسق الإنزيم AAP2 مع التركيب السداسى المتماثل لإنزيمات الألانين أمينوبتيديز 2، و60 ± 2 كيلودالتون ليتسق الإنزيم AAP3 مع التركيب السداسى المتماثل لإنزيمات الألانين أمينوبتيديز3. ووجد أن نقطة التعادل الكهربى لإنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى الجمال تقع عند الرقم الهيدروچينى (6.2) و(5.9) و (6.4) على الترتيب. وتم تحديد أقصى نشاط نوعى لإنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى الجمال عند الرقم الهيدروجين 7.6 و8 و7.8 على الترتيب. وتبين أن ثابت ميخائيل (Km) لإنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى الجمال هو 0.155 و0.16 و0.175 مللى مولار على الترتيب من الألانين بيتا-نفثايل أميد هيدرو كلوريد. و لقد زاد نشاط إنزيم الألانين أمينوبيبتيديز 3 وفى وجود 0.5 و0.1 مللى مولار من كلوريد الماغنسيوم الى 120.4% و110.7%، بينما زاد نشاط الإنزيم فى وجود 0.5 و0.1مللى مولار كلوريد الكوبلت الى 120.2% و105.79%، وزاد نشاط الإنزيم فى وجود 0.5 مللى مولار كلوريد الكالسيوم الى 106.7%. وزاد نشاط إنزيم الألانين أمينوبيبتيديز 2 فى وجود 1.0 مللى مولار كلوريد الحديد الى 108.05%، وأظهرت عناصر النحاس والمنجنيز والنيكل والزنك تثبيط نشاط إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3، بينما لم يظهر عنصر الكوبلت أى تاثير على إنزيم الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2. وقد تسببت كل الأحماض الأمينية فى إحداث تثبيط إما بسيطا أو متوسطا على نشاط إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى الجمال فيما عدا الألانين فقد أحدث زيادة طفيفة فى نشاط إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 2 و3 بنسبة 103.8% و101.9% عند تركيز 1 مللى مولار، السيرين الذى أحدث زيادة طفيفة فى نشاط إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 بنسبة 105.2% و101.6% عند تركيز 1 مللى مولار. وأظهرت كل إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى الجمال أنها خالية من أى نشاط لإنزيمات الإندوبيبتيديز التريبسين والكيموتريبسين. و قد أظهر تأثيرالمثبطات المختلفة على إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 أن البيستاتين هو المثبط الأكثر شدة لإنزيم الألانين أمينوبيبتيديز حيث أنه ثبط بنسبة 92%و 78.9% و 94.7% من نشاط الإنزيم عند تركيز 1.0 ميكرومولار. ووجد أن البيستاتين مثبط تنافسى ذو فعالية لنشاط إنزيم الألانين إنزيم أشكال- 3. الإنزيم على واحد إرتباط موقع وله ميكرومولار 0.8 التثبيط ثابت وقيمة AAP3 أمينوبتيديـز من كلى الأغنام : تم تنقية ثلاثة أشكال من إنزيم الألانين أمينوبتيديـز الثديى من قشرة كلى الأغنام لدرجة التجانس والتى تم تسميتهم الألانين أمينوبيبتيديز 1 (AAP1) والألانين أمينوبيبتيديز 2 (AAP2) والألانين أمينوبيبتيديز 3 (AAP3). وتمت تنقية إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و 2 و 3 على الترتيب من قشرة كلى الأغنام 0.845 مرة بنسبة ناتج 3.93% للألانين أمينوبيبتيديز 1 و0.48مرة بنسبة ناتج 3.58% للألانين أمينوبيبتيديز2 و13.05 مرة بنسبة ناتج 61.2 % للألانين أمينوبيبتيديز3. وأثبتت نقاوة الإنزيمات المنقاة وتجانسها بواسطة تقنية الهجرة الكهربية على كل من البولى اكريلاميد جل الطبيعى و المعامل بكبريتات دوديسيل الصوديوم (SDS). وتم تقدير الوزن الجزيئى الطبيعى لإنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى الأغنام بواسطة ترشيح الچـل فوجد أنه 120 و 420 و 380 كيلودالتون على الترتيب، والوزن الجزيئى للوحدة الثانوية بواسطة PAGE-SDS 60 ± 1 ليتسق الإنزيم AAP1 مع التركيب الثنائى المتماثل لإنزيمات الألانين أمينوبتيديز 1، و70 ± 1 ليتسق الإنزيم AAP2 مع التركيب السداسى

المتماثل لإنزيمات الألانين أمينوبتيديز 2، و63 ± 2 كيلودالتون ليتسق الإنزيم AAP3 مع التركيب السداسى المتماثل لإنزيمات الألانين أمينوبتيديز3. ووجد أن نقطة التعادل الكهربى لإنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى الأغنام تقع عند الرقم الهيدروچينى (6.6) و(5.4) و (6.2) على الترتيب. وتم تحديد أقصى نشاط نوعى لإنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى الأغنام عند الرقم الهيدروجينى 7.8 و7.6 و8.0 على الترتيب. وتبين أن ثابت ميخائيل (Km) لإنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى الأغنام هو 0.15 و0.17 و0.185 مللى مولار على الترتيب من الألانين بيتا-نفثايل أميد هيدرو كلوريد. و لقد زاد نشاط إنزيم الألانين أمينوبيبتيديز 3 الى 106.8% و118.5% و108.45% فى وجود 0.5 مللى مولار من كلوريد الماغنسيوم و كلوريد المنجنيز و كلوريد الكوبلت على الترتيب، بينما زاد نشاط إنزيم الألانين أمينوبيبتيديز1 فى وجود 0.5 و1.0 مللى مولار كلوريد الحديد الى 113.29% و118.42%، وزاد نشاط الإنزيم فى وجود 0.5 و1.0 مللى مولار كلوريد الماغنيسيوم الى 115.1% و109.36% على الترتيب، وأظهرت عناصر النحاس والمنجنيز والنيكل والكوبلت والكالسيوم تثبيط نشاط إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 ، بينما أظهر عنصر الزنك أنه مثبطا قويا لإنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3. وقد تسببت كل الأحماض الأمينية فى إحداث تثبيط إما بسيطا أو متوسطا على نشاط إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى الأغنام فيما عدا الهستدين فقد أحدث زيادة طفيفة فى نشاط إنزيم الألانين أمينوبيبتيديز 2 بنسبة 100.8% عند تركيز 1 مللى مولار، السيرين الذى أحدث زيادة طفيفة فى نشاط إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 بنسبة 102% عند تركيز 1 مللى مولار. وأظهرت كل إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 من قشرة كلى الأغنام أنها خالية من أى نشاط لإنزيمات الإندوبيبتيديز التريبسين والكيموتريبسين. و قد أظهر تأثيرالمثبطات المختلفة على إنزيمات الألانين أمينوبيبتيديز 1 و2 و3 أن البيستاتين هو المثبط الأكثر شدة لإنزيم الألانين أمينوبيبتيديز حيث أنه ثبط بنسبة 86.8%و 79 % و 93% من نشاط الإنزيم عند تركيز 1.0 ميكرومولار. ووجد أن البيستاتين مثبط تنافسى ذو فعالية لنشاط إنزيم AAP3 وقيمة ثابت التثبيط 0.82 ميكرومولار وله موقع إرتباط واحد على الإنزيم. وفى النهاية تمت فى هذه الدراسة فصل وتنقية ودراسة خواص الأمينوبتيديز الأكثر نشاطا على المستوى المعملى تمهيدا لإنتاج الإنزيم على نطاق أكبر. تهدف هذه الدراسة إلى إنتاج إنزيم الأمينوبتيديز لإستخدامه فىالتطبيقات المختلفة. و إنتاج هذا الإنزيم على نطاق واسع من كلى بعض الثدييات فى مصر مثل الجاموس المائى والجمال و الأغنام كمصدر محلى متوفر و آمن بهدف استخدامه فى التطبيقات المختلفة مثل صناعات المواد الغذائية و دراسة التركيب الأولى للبروتين.