

М.Л. ГЕВОРКЯН, М.А. ДАВТЯН

ВЛИЯНИЕ ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ НА АКТИВНОСТЬ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Исследование влияния ряда двухвалентных катионов на активность аргиназы печени крупного рогатого скота показало, что, кроме ионов марганца, активаторами этого фермента являются ионы кобальта и кадмия. Эти катионы также стабилизируют структуру аргиназы. Однако, как показали эксперименты, ионы марганца снижают термостабильность фермента. Небольшой избыток этих катионов в растворе вызывает инактивацию аргиназы даже при незначительном нагревании. Полученные данные свидетельствуют об особой специфичности связывания ионов марганца с аргиназой и подтверждают имеющиеся представления о том, что эти катионы не участвуют непосредственно в каталитической реакции этого фермента.

Важная роль ионов марганца в проявлении активности аргиназы обнаружена уже давно [1]. Многочисленные исследования, проведенные на аргиназе печени разных млекопитающих, позволили установить, что эти катионы активируют аргиназу, регулируют оптимум pH, стабилизируют структуру фермента, участвуют в связывании его субъединиц [2-4]. Удаление этих ионов диализом или в присутствии хелатирующих реагентов приводит к потере активности [5,6]. Мнения большинства исследователей сходятся на том, что присоединение ионов Mn^{2+} к молекуле аргиназы вызывает конформационные изменения, которые создают благоприятные условия для образования фермент-субстратного комплекса [7-9]. С помощью методов ЭПР и ЯМР показано, что нативная аргиназа печени крыс содержит 4 моля марганца на моль белка [7].

Печеночная аргиназа млекопитающих активируется также и некоторыми другими двухвалентными катионами, причем ферменты, выделенные из печени разных млекопитающих отличаются друг от друга по способности активироваться разными ионами. Так, фермент из печени лошади активируется ионами кобальта и никеля [10]. Ионы кадмия активируют аргиназу печени быка, а на фермент из печени лошади влияния не оказывают [5]. Обнаружено также активирующее влияние на аргиназу печени быка и крыс ионов железа [9].

В настоящей работе проведено изучение влияния ионов Mn^{2+} и ряда двухвалентных катионов на активность аргиназы печени крупного рогатого скота, а также на ее термостабильность.

Материал и методика. Исследования проводились на коммерческом препарате аргиназы печени крупного рогатого скота фирмы Reanal (Венгрия). Аргиназную активность определяли по методу Ратнер, как описано ранее [11]. Мочевину определяли микродиффузионным методом Зелигсона в модификации Силаковой и сотр. [12]. Диализ проводили в течение 24 часов при $4^{\circ}C$ и постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки против 5 объемов дистиллированной воды (10 мл водного раствора аргиназы против 1 л H_2O). Перед определением активности раствор фермента разбавляли глициновым буфером (0,05M) при pH 9,6.

Термообработку проводили следующим образом: исследуемый раствор нагревали в течение 10 минут на водяной бане при соответствующей температуре, затем

охлаждали до комнатной температуры и определяли остаточную аргиназную активность. Растворы белка готовили на 0,05 M глициновом буфере при pH 9,5. В работе использовали L-аргинин, глицин фирмы Reanal (Венгрия). Остальные реактивы отечественного производства с маркой ЧДА. Катионы металлов использовали в виде хлоридов в концентрации 12,5 мМ.

Результаты и обсуждение. Было исследовано влияние двухвалентных катионов на активность аргиназы печени крупного рогатого скота. На рис. 1 показаны результаты этих экспериментов. Из рисунка видно, что добавление 12,5 мМ $MnCl_2$ к раствору аргиназы приводит к некоторому увеличению активности фермента. Аналогичным действием обладают ионы кобальта. Ионы никеля, кадмия и кальция в используемых концентрациях в данных условиях не влияют на активность аргиназы, а ионы магния и железа несколько снижают ее. В присутствии ионов цинка наблюдается снижение активности фермента на 20%. Увеличение концентрации марганца в 2 раза (25 мМ) приводит к снижению активности аргиназы. Как было отмечено выше, нативная аргиназа содержит определенное количество ионов марганца, необходимое для поддержания ее нативной конформации. Дополнительное количество этих ионов, по-видимому, лишь увеличивает число активных молекул в растворе. Это подтверждают также кинетические данные: после добавления 12,5 мМ $MnCl_2$ или $CoCl_2$ величина K_m аргиназы не изменяется - 6,8 мМ (pH 9,5). При удалении ионов марганца с помощью диализа или в присутствии ЭДТА активность аргиназы снижается. При длительном диализе или достаточно высокой концентрации ЭДТА (25 мМ) наблюдается полная инактивация. Добавление ионов Mn^{2+} к диализованной аргиназе восстанавливает активность. Аналогичное действие оказывают ионы Co^{2+} и Cd^{2+} . В присутствии ионов никеля, магния и железа в той же концентрации остаточная активность диализованной аргиназы уменьшается, а ионы цинка и кальция снижают ее на 50% и 70% соответственно (рис. 1). Можно заметить, что ионы кальция в

данном случае оказывают большее ингибирующее влияние, чем ионы цинка, хотя на недиализованый фермент почти влияния не оказывают.

Присутствие двухвалентных катионов в растворе аргиназы влияет и на ее термостабильность. Температура полуйнактивации аргиназы при нагревании в течение 10 минут при pH 9,5 равна 70°C (рис. 2). Как видно из рисунка, в присутствии ионов Co^{2+} и Ni^{2+} термочувствительность аргиназы не изменяется. Присутствие ионов цинка приводит к резкому снижению активности при нагревании в данных условиях (рис. 2). Возможно, связывание этих ионов в аргиназе происходит в области активного центра, а нагревание делает этот процесс более эффективным. Особый интерес представляет влияние на термостабильность аргиназы ионов марганца. Из рисунка видно, что повышение температуры раствора аргиназы в присутствии 12,5 мМ $MnCl_2$ приводит к резкому снижению активности. Инактивация при 50°C составляет 40%, как и в присутствии ионов цинка. Таким образом, небольшой избыток ионов марганца в растворе вызывает инактивацию аргиназы при нагревании.

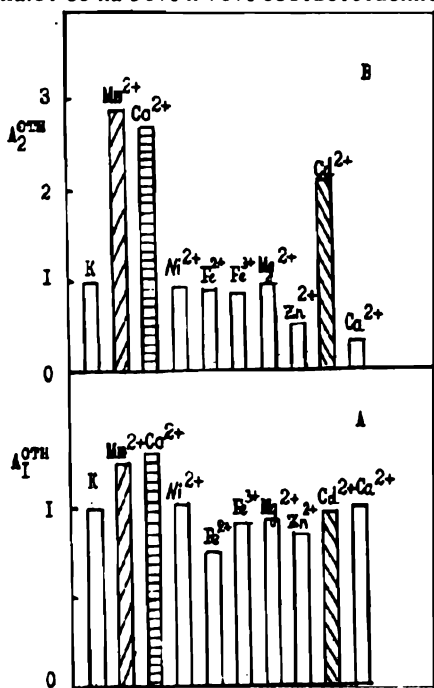


Рис. 1. Влияние двухвалентных катионов на активность аргиназы до (А) и после (В) диализа. Концентрация ионов в растворе - 12,5 мМ.

Термочувствительность диализованного фермента значительно увеличивается. Температура полуинактивации снижается на 5-6°C по сравнению с недиализованым ферментом (рис. 2). В результате диализа молекула аргиназы теряет, кроме марганца, и другие ионы и частицы, а происходящие при этом изменения, очевидно, делают фермент значительно более чувствительным к воздействию повышенных температур. Добавление ионов Co^{2+} и Cd^{2+} стабилизирует фермент, возвращая термочувствительность аргиназы к уровню недиализованного фермента. Ионы никеля не

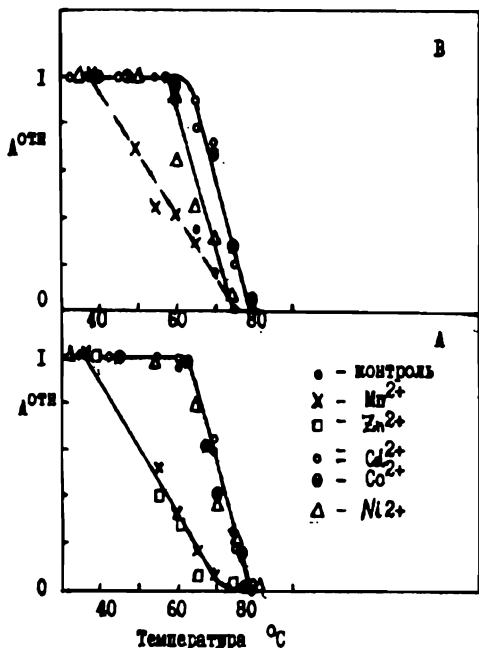


Рис. 2. Термочувствительность аргиназы в присутствии двухвалентных катионов до (А) и после (В) диализа. Концентрация ионов в растворе - 12,5 мМ, концентрация аргиназы - $4 \cdot 10^{-7}$ М.

вливают на термостабильность диализованной аргиназы. Наиболее неожиданным оказался результат, полученный после добавления ионов марганца. Эти ионы не стабилизируют аргиназу, как можно было предположить, а наоборот, нагревание диализованного фермента после добавления ионов Mn^{2+} при 50°C в течение 10 минут снижает активность на 30%. По-видимому, нагревание растворов аргиназы в присутствии этих ионов приводит к образованию неактивных комплексов. Таким образом, для обеспечения функционирования аргиназы необходимо весьма ограниченное количество ионов Mn^{2+} . Присутствие избытка этих ионов в растворе при pH 9,5 делает фермент чрезвычайно чувствительным даже к незначительному повышению температуры, т.е. дестабилизирует его. Поэтому при использовании ионов Mn^{2+} в качестве активатора необходимо осторожно выбирать концентрацию, учитывая особую специфичность взаимодействия этих ионов с аргиназой.

Активирование аргиназы печени крупного рогатого скота ионами Co^{2+} и Cd^{2+} подтверждает тот факт, что ионы Mn^{2+} не участвуют непосредственно в каталитическом акте реакции, они, как и предполагалось, необходимы для обеспечения нативной конформации аргиназы. Ионы Co^{2+} и Cd^{2+} не только восстанавливают активность диализованного фермента, но и стабилизируют его структуру в отличие от ионов марганца. Очевидно, в ряде случаев катионы кобальта и кадмия можно с успехом использовать в качестве активаторов при определении активности этой аргиназы. Факт повышения чувствительности к нагреванию в присутствии избытка ионов Mn^{2+} в растворе указывает на то, что имеется, по-видимому, несколько участков связывания этих ионов с ферментом, участков, специфичных для ионов марганца и недоступных для других катионов. Механизм взаимодействия Mn^{2+} с молекулой аргиназы представляет значительный интерес, а определение участков связывания и идентификация лигандов являются задачей наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hellerman L., Perkins M.E. J. Biol. Chem., 1935, v. 112, № 1, p. 175.
2. Hosoyama Y. Eur. J. Biochem., 1972, v. 27, № 1, p. 48.
3. Baranczyk-Kuzma A., Porembka Z., Mochnaeka I. Acta biochim. polon., 1976, v. 23, № 2-3, p. 151.
4. Dahlig E., Porembka Z. Acta biochim. polon., 1977, v. 24, № 3, p. 187.
5. Greenberg D.M. The enzymes. Acad. Press., 1960, v. 4, p. 257.
6. Palacios R., Hulttron C., Soberon C. Biochem. J., 1969, v. 114, № 3, p. 449.
7. Hirsch-Kolb H., Kolb H.J., Greenberg D.M. J. Biol. Chem., 1971, v. 240, № 3, p. 395.
8. Muszynska G., Ber E. Int. J. Biochem., 1978, v. 9, № 10, p. 757.
9. Tarrab R., Rodriques J., Hulttron C., Palacios R. Soberon G. Eur. J. Biochem., 1974, v. 49, № 2, p. 457.
10. Hirsch-Kolb H., Heine J.P., Kolb H.J., Greenberg D.M. Comp. Biochem. Physiol., 1970, v. 37, № 3, p. 345.
11. Геворкян М.Л., Закарян А.Е., Давтян М.А. Биол. ж. Армении, 1974, т. 27, № 9, с. 44.
12. Сялакова А.И., Труш Г.П., Являкова А. Вopr. мед. химии, 1962, т. 8, № 5, с. 538.

Մ.Լ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Մ.Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ԵՐԿՎԱԼԵՆՏ ԿԱՏԻՈՆՆԵՐԻ ԱՉԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽՈՇՈՐ ԵՂՋԵՐԱՎՈՐ ԱՆԱՍՈՒՆՆԵՐԻ ԷՅԱՐԴԻ ԱՐԳԻՆԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո մ

Մի շարք երկվալենտ կատիոնների ազդեցության ուսումնասիրությունը խոշոր եղջերավոր անասունների լյարդի արգինազի ակտիվության վրա ցույց տվեց, որ Mn^{2+} իոններից բացի այդ ֆերմենտի ակտիվատորներ են հանդիսանում նաև Co^{2+} և Cd^{2+} իոնները: Վերջինները նաև կայունացնում են արգինազի կառուցվածքը, ապահովելով նրա ջերմակայունությունը: Սակայն Mn^{2+} իոնների ավելցուկի առկայությունը բերում է ֆերմենտի ակտիվության անկման ջերմաստիճանի անգամ ոչ զգալի բարձրացման դեպքում:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ գոյություն ունի որոշ առանձնահատկություն Mn^{2+} իոնների և արգինազի կապակցման պրոցեսներում: Այդ կատիոնները անմիջակամորեն չեն մասնակցում արգինազի կատալիտիկ ռեակցիային, բայց անհրաժեշտ են ֆերմենտի ակտիվ կոնֆորմացիոն վիճակը պահպանելու համար: