

М. Л. ГЕВОРКЯН, М. А. ДАВТЯН

## ОСОБЕННОСТИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ АРГИНАЗЫ

Изучалось влияние повышенных температур на аргиназу печени крупного рогатого скота в растворе. В выбранных условиях эксперимента (концентрация аргиназы  $4,2 \cdot 10^{-7}$  М, рН 9,5) под воздействием температуры (60–80°C) инактивация аргиназы, происходящая по реакции псевдопервого порядка, сопровождалась снижением величины  $K_M$  и уменьшением интенсивности триптофановой флуоресценции (ФЛ). В присутствии орнитина чувствительность фермента к воздействию температуры существенно возрастала. Полученные данные позволили заключить, что термическая инактивация аргиназы в растворе происходит в результате нарушения нативного конформационного состояния, не затрагивающего непосредственно активный центр фермента. Измерение интенсивности триптофановой флуоресценции можно успешно использовать для регистрации небольших конформационных изменений в растворах аргиназы в данных условиях.

Практическое применение ферментов в разных областях биотехнологии и ферментотерапии вызывает повышенные требования к его стабильности. Задачу стабилизации фермента нельзя решить, не зная закономерностей его инактивации под воздействием температуры, изменения значений рН, различных денатурирующих агентов, органических растворителей и т.д. Механизмы инактивации ферментов могут быть связаны, как известно, с конформационными изменениями макромолекул в результате расщепления водородных и дисульфидных связей, с агрегацией или распадом белков на мономерные единицы и др.

Аргиназа, как известно [1, 2], обладает антиопухолевой активностью. Было показано, что добавление к среде с опухолевыми клетками аргиназы печени быка вызывает торможение синтеза ДНК. Причем существует определенная специфичность во влиянии на рост и развитие клеточных культур аргиназ из разных объектов [3]. По мнению ряда авторов [2, 3], этот эффект нельзя объяснить лишь расщеплением аргинина в среде. Задача получения и хранения препаратов аргиназы в активном состоянии требует сведений об условиях ее стабилизации в растворах. Небольшие изменения температуры, рН или присутствие химических реагентов в растворе могут привести к снижению активности или даже полностью инактивировать его.

В настоящей работе проводилось изучение закономерностей термической инактивации аргиназы печени крупного рогатого скота в растворе.

**Материал и методика.** Исследования проводились на препарате аргиназы печени крупного рогатого скота (Reanal, Венгрия) в растворах 0,05 М

глицинового буфера при рН 9,5. Термоинактивация фермента проводилась путем выдерживания исследуемых растворов на водяной бане при температуре от 37 до 80°C в течение 30 минут. Затем растворы охлаждали и проводили исследования при комнатной температуре (20°C). Аргиназную активность определяли по методу Ратнер в модификации Силаковой и сотр. [4], как описано ранее [5]. В опытах по определению температуры полуинактивации аргиназы растворы фермента в течение 10 минут выдерживали при соответствующей температуре, затем охлаждали до 37°C и определяли аргиназную активность.

Интенсивность триптофановой ФЛ измеряли на спектрофлуориметре MPF-4A (HITACHI, Япония) при длине волны возбуждения 297 нм.

Число свободных сульфгидрильных групп определяли по методу Бойера [6]. К раствору белка добавляли раствор парахлормеркурибензоата (ПХМБ), стандартизированный при 232 нм, и после перемешивания измеряли изменение поглощения раствора при 250 нм. Молекулярная масса аргиназы принималась равной 120 кДа.

В работе использовали препараты L-аминокислот: глицин, аргинин, лизин, пролин, валин фирмы Reanal (Венгрия), парахлормеркурибензоата натрия соль (ПХМБ) фирмы Chemarol (Чехословакия). Остальные реактивы с маркой х.ч. или ч. д. а. отечественного производства.

**Результаты и обсуждения.** Изучалось влияние повышения температуры раствора на некоторые свойства аргиназы. Степень инактивации зависит от концентрации фермента в растворе. Увеличение концентрации повышает обычно устойчивость фермента к воздействию температуры, очевидно, за счет агрегации белковых молекул. Интересно было исследовать свойства фермента в условиях, близких к физиологическим. В связи с этим в наших экспериментах была выбрана концентрация аргиназы –  $4,2 \cdot 10^{-7}$  М в растворе при значении рН 9,5, при котором, как известно, аргиназа наиболее активна.

Выдерживание аргиназы в течение 30 минут при температурах от 60 до 80°C приводит к снижению ферментативной активности. На рис. 1 видно, что инактивация происходит по реакции псевдопервого порядка в зависимости от времени инкубации при каждой указанной температуре. При температуре раствора 75°C активность фермента полностью подавляется в течение 25 минут, а при 80°C скорость инактивации возрастает в 3 раза и полная потеря активности наблюдается уже через 8–10 минут.

Были проведены эксперименты по определению температуры полуинактивации аргиназы. Выдерживание растворов фермента в данной концентрации в течение 10 минут при температуре до 58°C не влияет на активность. При 60°C наблюдается снижение активности на 5%. Дальнейшее повышение температуры увеличивает степень инактивации, а при 80°C наблюдается полная потеря активности (рис. 2). Температура полуинактивации в этих условиях равна 70°C. Присутствие конкурентных ингибиторов аргиназы – лизина, пролина или валина не влияет на степень инактивации фермента в данных условиях. Существенные отклонения от этой зависимости наблюдаются в присутствии орнитина (рис. 2). Уже при 50°C инактивация в присутствии орнитина составляет 10%, а температура полуинактивации снижается до 64°C. Это указывает на специфичность взаимодействия орнитина с аргиназой. По-видимому, кроме активного центра, орнитин связывается и с другими участками белковой молекулы, что, возможно, и повышает чувствительность фермента к воздействию температуры. Специфичность взаимо-

действия этой аминокислоты с аргиназой печени быка подтверждается также экспериментами, проведенными нами ранее [7]. При протеолизе аргиназы трипсином орнитин защищал фермент от протеолитической инактивации в большей степени, чем другие аминокислоты-ингибиторы. Взаимодействие

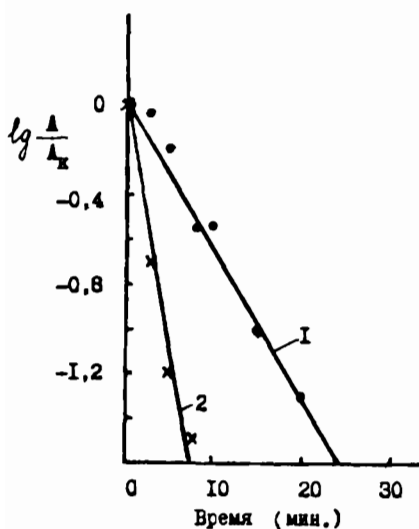


Рис. 1. Кинетика инактивации аргиназы при температурах 75°C - 1 и 80°C - 2.

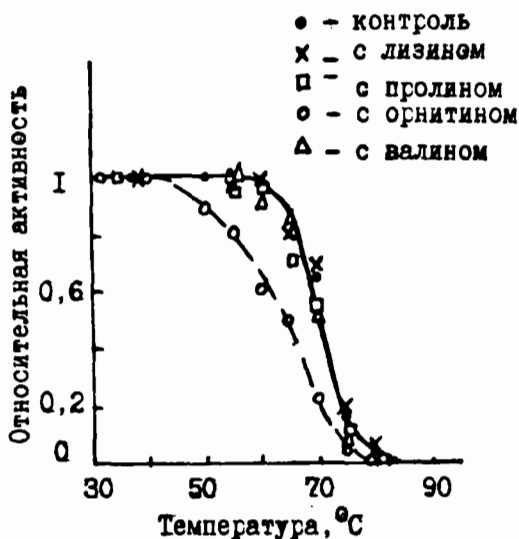


Рис. 2. Влияние лизина, пролина, валина и орнитина на термоинактивацию аргиназы. Концентрация аминокислот-ингибиторов - 20 мМ в растворе.

этой аминокислоты с аргиназой представляет особый интерес, так как орнитин является продуктом реакции. По нашим данным [8], константа ингибирования аргиназы печени крупного рогатого скота орнитином равна 3,8 мМ. Эта величина почти в 2 раза меньше, чем величина  $K_m$  этого фермента (см. таблицу), т.е. орнитин имеет высокую эффективность связывания с аргиназой. Подробное изучение механизма ингибирования аргиназы печени быка орнитином было проведено в работе [9]. Автором была предложена модель, согласно которой оба конформационных состояния аргиназы - "активное и неактивное", которые связывают орнитин, находятся в состоянии обратимого равновесия. В присутствии аргинина равновесие смещается в сторону активного состояния даже при высокой концентрации орнитина, так как "оба участка связывания независимы" [9]. Такой вывод хорошо согласуется с нашим предположением.

Была определена величина константы Михаэлиса для аргиназы, подвергнутой термоинактивации в течение 10 минут при температуре от 60 до 75°C. Как видно из таблицы, в результате воздействия температуры на растворы аргиназы при pH 9,5 величина  $K_m$  уменьшается. Это свидетельствует о том, что при нагревании растворов аргиназы происходит такое изменение конформации, при котором увеличивается сродство фермента к субстрату, хотя скорость реакции существенно снижается.

Величины  $K_M$  и относительной начальной скорости реакции аргиназы, подвергнутой термической денатурации в течение 10 минут

$^{\circ}C$	$K_M, \mu M$	$V_{отн}^0$
20	7,4	1,0
60	7,0	0,8
65	5,4	0,7
70	4,0	0,5
75	2,8	0,14

В растворах белка после выдерживания их при высоких температурах были изменены спектры триптофановой флуоресценции (рис. 3). Максимум ФЛ аргиназы находится в области 336–338 нм. Это указывает на то, что остатки триптофана аргиназы находятся в неполярном окружении во внутренних областях белковой молекулы. В результате тепловой денатурации происходит снижение интенсивности флуоресценции и несколько смещается

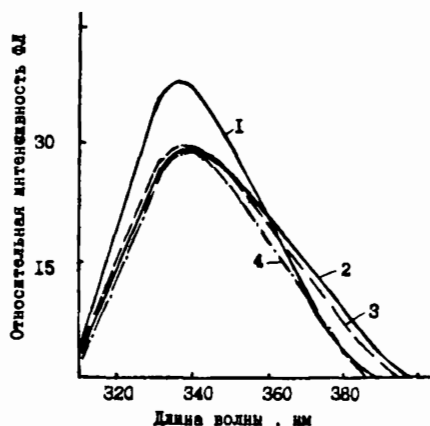


Рис. 3. Спектры ФЛ растворов аргиназы до инкубации (1) и после — при температурах 60°C — 2, 70°C — 3 и 80°C — 4.  $\lambda_{\text{возб.}} = 297 \text{ нм}$ .

положение максимума спектра ФЛ (на 2–3 нм) (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что термоденатурация не вызывает значительных изменений в полярности микроокружения остатков триптофана. Нарушения конформационного состояния, по-видимому, приводят к появлению новых контактов хромофоров с участками макромолекулы, содержащими аминокислотные остатки, оказывающие тушащее воздействие на флуоресценцию (среди них карбоксильные группы, аминогруппы, имидазол, дисульфидные связи и др.).

Определение числа свободных SH-групп с помощью ПХМБ в растворах денатурированного фермента показало, что число определяемых этим методом SH-групп после воздействия температу-

ры на аргиназу печени крупного рогатого скота не изменяется — 3,2 SH-групп на моль фермента. Ранее нами было показано, что после обработки додецилсульфатом натрия и меркаптоэтанолам аргиназа распадается на фрагменты с молекулярной массой около 71 кДа [10]. Тепловая денатурация этого фермента в течение 5 минут при 90°C не влияла на величину молекулярной массы получаемых фрагментов в тех же условиях. Таким образом, тепловая денатурация не сопровождается дополнительным распадом молекулы аргиназы на более мелкие фрагменты. Эти данные свидетельствуют о том, что существенного разворачивания спиральных участков в области, в которой расположены флуоресцирующие остатки триптофана, а также расщепления дисульфидных связей в молекуле аргиназы в этих условиях не происходит. Воздействие температуры проявляется в некотором повышении чувствительности к протеолитической инактивации [10]. Как было показано нами ранее, в растворах фермента после термообработки рас-

шепление аргиназы на мелкие фрагменты под действием трипсина происходит значительно легче [10]. В результате повышения температуры растворов, по-видимому, становится доступным большее число специфических, чувствительных к трипсину связей в аргиназе, возможно, в результате разворачивания определенных участков полипептидной цепи, разрыва водородных и других связей.

Таким образом, при повышении температуры происходит нарушение конформации макромолекулы аргиназы, приводящее к инактивации, снижению интенсивности триптофановой флуоресценции и некоторому повышению чувствительности к протеолизу трипсином. Полученные данные позволяют заключить, что инактивация аргиназы, происходящая в результате нагревания растворов фермента, не сопровождается существенным разворачиванием макромолекулы аргиназы, а происходящие изменения конформационного состояния косвенно затрагивают область активного центра этого фермента. Измерение интенсивности ФЛ может служить чувствительным методом для регистрации небольших конформационных изменений в молекуле аргиназы в данных условиях.

*Кафедра биохимии, проблемная лаборатория  
сравнительной и эволюционной биохимии*

*Поступила 25.10.1999*

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Storr J.M., Burton A.F. – Brit. J. Cancer, 1974, v. 30, N1, p. 50.
- 2 Savoca K.V., Abuchowski A., Van Es T., Davis F.F., Palczuk N.C. – Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 578, N1, p. 47.
- 3 Давтян М.А., Асланянц Ж.К., Алчуджян Н.Х., Добрынин Я.В. – Биолог. ж. Армении, 1982, т. 35, N 4, с. 256.
- 4 Силикова А.И., Труш Г.П., Являева А. – Вопр. мед. химии, 1962, т. 8, N5, 538.
- 5 Геворкян М.Т., Закарян А.Е., Давтян М.А. – Биолог. ж. Армении, 1974, т. 27, N9, 44.
- 6 Boyer P.D. – J. Am. Chem. Soc., 1954, v. 76, p. 4331.
- 7 Геворкян М.Т., Чубарян С.В., Туманян Л.Р., Торчян Р.О. – Биолог. ж. Армении, 1986, т. 39, N4, с. 314.
- 8 Давтян М.А., Геворкян М.Т. – Биолог. ж. Армении, 1989, т. 42, N1, с. 41.
- 9 Bedino St. – Ital. J. Bioshem., 1977, v. 26, N4, p. 264.
- 10 Геворкян М.Т., Закарян А.Е. – Сб.: Вопросы биологии, 1981, N2, с. 90.

Մ. Լ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ԱՐԳԻՆԱԶԻ ՋԵՐՄԱՅԻՆ ԻՆՎԵՏԻՎԱՑՄԱՆ  
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ո մ

Ուսումնասիրվել է լուծույթի ջերմաստիճանի բարձրացման ազդեցությունը խաղաղ նյութաբանության անասունների լյարդի արգինազի տարբեր հատկությունների վրա Էրսպերիսենտի բնորոշած պայմաններում (արգինազի կոնցենտրացիան՝  $4.2 \cdot 10^{-4}$  Մ, pH 9.5) ջերմաստիճանի բարձրացման հետևանքով տեղի են ունենում կոնֆորմացիայի փոփոխություններ, որոնք առաջացնում են ակտիվության անկում։ Մթ-

խաելիսի հաստատունի արժեքների փոքրացում և արգինազի տրիպտոֆանային ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության իջեցում: Մրգակցային արգելակիչ օրնիտինի ներկայությունը լուծույթում ավելի զգայուն է դարձնում ֆերմենտը ցերմաստիճանի նկատմամբ:

Ստացված տվյալները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ լուծույթի ցերմաստիճանի բարձրացման պայմաններում առաջացող ակտիվության անկումը տեղի է ունենում, հավանաբար, նատիվ կոնֆորմացիայի խախտման հետևանքով, որը տևելի է ունենում ակտիվ կենտրոնից դուրս: Արգինազի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության չափումը կարող է հանդիսանալ զգայուն և հարմար մեթոդ, որի օգնությամբ կարելի է գրանցել լուծույթում ֆերմենտի կոնֆորմացիայի փոքր փոփոխությունները:

M. L. GEVORKIAN, M. A. DAVTIAN

## THE PECULARITIES OF ARGINASE THERMIC INACTIVATION

### Summary

The effect of temperature on conformation and catalytic activity of bovine liver arginase in aqueous solutions was studied. During the experiment ( $Ca=4,2 \cdot 10^{-7}M$ , pH 9,5) under the influence of the temperature of 60-80°C the inactivation of the arginase was accompanied by a decrease of Michaelis constant values and reduction of triptophane fluorescence. In the presence of ornithine the sensitiveness of the enzyme towards the temperature effect is considerably increased. The results led to the conclusion that the thermic inactivation of arginase in a solution is a result of the violation of native conformational condition, not directly affecting the active centre of the enzyme. The measuring of intensity of triptophane fluorescence can be successfully used to registrate conformational changes in arginase solutions under existing conditions.