

М.Л. ГЕВОРКЯН, М.А. ДАВТЯН

ИНАКТИВАЦИЯ АРГИНАЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВОДОРАСТВОРИМОГО КАРБОДИИМИДА

Взаимодействие аргиназы печени крупного рогатого скота с водорастворимым карбодимидом (КДИ) приводит к частичной потере активности. В присутствии этилового эфира глицина (ЭГ) скорость инактивации возрастает почти в 3 раза. Изучение кинетики и характера ингибирования аргиназы указывает на неконкурентный характер ингибирования фермента КДИ. В результате модификации этим реагентом температура полуинактивации аргиназы снижается на 4°C. Полученные данные позволяют заключить, что модифицирующиеся этим реагентом карбоксильные группы не участвуют в формировании активного центра аргиназы и наблюдаемая инактивация связана, по-видимому, с нарушением активной конформации фермента в данных условиях.

Карбоксильные группы играют важную роль в функционировании многих ферментов. Они могут участвовать непосредственно в каталитической реакции, в формировании активной конформации ферментов, оказывать влияние на полярность групп активного центра и фермент-субстратного комплекса. Каталитически активные карбоксильные группы обнаружены в активных центрах пепсина, лизоцима, в сериновых протеазах и т. д. [1, 2]. Кроме того, они могут участвовать в образовании связей с катионами двухвалентных металлов, необходимых для проявления активности многих ферментов [2, 3].

С целью выяснения роли карбоксильных групп в проявлении активности аргиназы в данной работе изучалась химическая модификация аргиназы печени крупного рогатого скота водорастворимым карбодимидом (КДИ).

Материалы и методы. Исследования проводились на коммерческом лиофилизированном препарате аргиназы печени крупного рогатого скота (Reanal, Венгрия). К растворам аргиназы в концентрации $10^{-5}M$ на $0,05M$ трис- HCl или $0,01M$ фосфатном буфере добавляли КДИ, приготовленный непосредственно перед употреблением и инкубировали при комнатной температуре ($20^{\circ}C$) в течение 6–8 часов. Общий объем реакционной смеси – $1ml$. Карбодимид наиболее эффективно взаимодействует с протонированной формой карбоксильной группы [4], поэтому обычно эта реакция проводится при кислых pH . Однако при значениях pH ниже 6 вследствие нарушения конформации полностью теряется активность аргиназы [5, 6]. В связи с этим наши исследования проводились при pH 6 и выше. После инкубации с реагентом пробу из смеси разбавляли в 50 раз глициновым буфером ($0,05M$, pH 9,5) и определяли активность по методу Ратнер, как описывалось ранее [7].

В опытах по термодинамической инактивации пробы растворов модифицированного карбодимидом фермента, разбавленные в 50 раз $0,05M$ глициновым буфером (pH 9,5), инкубировали на водяной бане при соответствующих температурах в течение 10 минут, затем охлаждали до $37^{\circ}C$ и определяли остаточную аргиназную активность.

В работе использовались препараты L -аргинина и других L -аминокислот (Reanal, Венгрия), 1-циклогексил-3-2-(морфолиноэтил)-карбодимид мето- p -толуено-сульфонат (Пирс, США), этиловый эфир глицина (ЭГ), синтезированный в ла-

боратории Института биохимии АН Армении. Остальные реактивы – с маркой х.ч. и ч.д.а. отечественного производства.

Результаты и обсуждение. При взаимодействии аргиназы с КДИ активность фермента снижается. Кинетика инактивации при pH 6 и концентрации КДИ 10 мМ показана на рис.1. Процесс инактивации протекает довольно медленно и через 8 часов инкубации при комнатной температуре активность снижается на 50%. Однако в присутствии этилового эфира глицина в растворе в тех же условиях остаточная активность составляет всего 30%. Как видно из рисунка, инактивация аргиназы под действием КДИ представляет собой двустадийный процесс, причем скорости снижения активности на начальных участках кинетических кривых в присутствии ЭГ и без него существенно отличаются ($K_1=1,1 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$, $K_1'=2,9 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$). По-видимому, на начальном этапе реакции происходит модификация одной или нескольких однотипных карбоксильных групп, связанных с активностью. Вторая медленная составляющая, возможно, связана со взаимодействием менее доступных и удаленных от активного центра карбоксильных групп, а также других, чувствительных к реагенту аминокислотных остатков в аргиназе, среди которых могут быть остатки тирозина, гистидина, SH-группы и др. [4,8]. В присутствии ЭГ модификация карбоксильных групп в аргиназе происходит значительно эффективнее, и скорость инактивации на начальном этапе реакции возрастает почти в 3 раза.

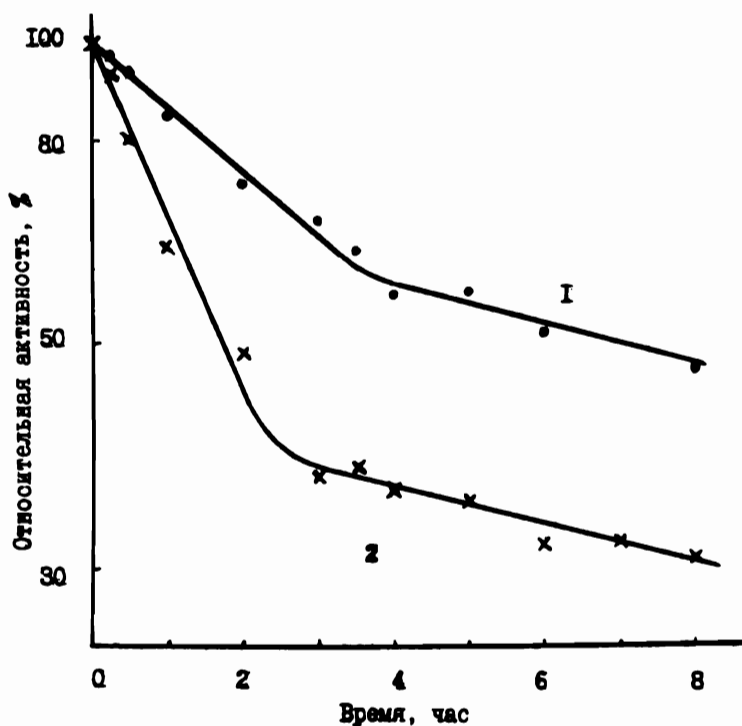


Рис. 1. Кинетика инактивации аргиназы при взаимодействии с КДИ (10 мМ) в присутствии 100 мМ ЭГ (2) и без него (1).

Степень инактивации аргиназы карбодимидом зависит от pH . Небольшое изменение значений pH от 6 до 6,5 существенно уменьшает скорость инактивации в присутствии ЭГ. При pH 6 под действием КДИ активность в течение 3 часов в присутствии ЭГ снижается на 60%, а при pH 6,5 – на 35–40%. Без ЭГ в растворе изменение значений pH не отражается на степени инактивации фермента под действием КДИ.

Как показано в ряде работ [9,10], в слабо щелочной среде происходит расщепление амидной связи в образовавшейся в результате реакции с КДИ *N*-ацилмочевине, что восстанавливает карбоксильные группы и должно приводить к восстановлению функциональных свойств ферментов. В наших экспериментах длительное (2–3 часа) выдерживание модифицированного фермента в растворе с *pH* 9,5 не восстанавливало активности аргиназы.

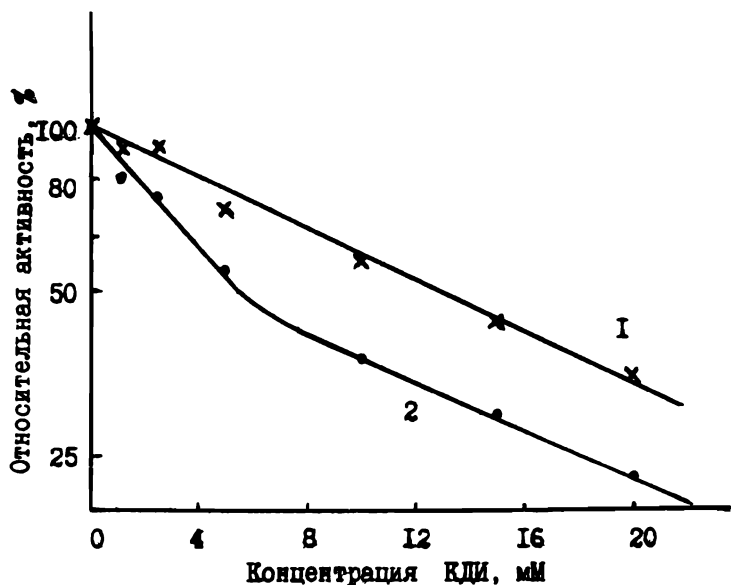


Рис. 2. Полулогарифмическая зависимость остаточной активности аргиназы от концентрации КДИ в присутствии 100 мМ ЭГ (2) и без него (1). Время инкубации – 3 часа.

Скорость инактивации аргиназы зависит от концентрации КДИ. Из рис. 2 видно, что активность фермента при увеличении концентрации КДИ снижается экспоненциально. В присутствии ЭГ кривая снижения активности имеет перегиб, т.е. наиболее чувствительные к реагенту карбоксильные группы модифицируются уже при низких концентрациях реагента. Легко заметить, что скорость инактивации аргиназы при возрастании концентрации реагента без ЭГ в растворе и скорость снижения активности на второй, медленной стадии реакции в присутствии ЭГ, близки ($K=2,4 \cdot 10^{-2} \text{ мМ}^{-1}$, $K'=2,2 \cdot 10^{-2} \text{ мМ}^{-1}$). Видимо, в присутствии ЭГ за счет присоединения нуклеофила происходит быстрая модификация критических для активности карбоксильных групп. Медленная стадия реакции связана, по-видимому, с модификацией менее доступных карбоксильных групп или чувствительных к КДИ других аминокислотных остатков в аргиназе. Снижение активности происходит, по-видимому, в результате нарушения конформации, в определенной степени затрагивающей область активного центра аргиназы. При высоких концентрациях реагента (20 мМ) в растворе активность снижается почти на 80%, однако полной инактивации даже при более высоких концентрациях реагента не наблюдается.

Величина K_i аргиназы после взаимодействия с этим реагентом как в присутствии ЭГ, так и без него не изменяется, хотя существенно снижается скорость каталитической реакции. Это указывает на неконкурентный характер ингибирования аргиназы карбодинимидом. Конкурентный ингибитор аргиназы – лизин не защищает фермент от инактивации в данных условиях.

Была исследована также термостабильность аргиназы, модифицированной карбодинимидом. Эти эксперименты показали, что модификация этого фермента КДИ не влияет на его термостабильность. Температура полуинактивации в данных условиях оказалась равной 68°C. Однако в присутствии ЭГ в растворе реакция с КДИ приводит к снижению температуры полуинактивации аргиназы до 64°C. Таким образом модификация карбоксильных групп аргиназы в присутствии ЭГ сопровождается существенным нарушением нативной конформации фермента, что отражается и на его термостабильности.

Полученные данные позволяют заключить, что карбоксильные группы, по-видимому, не входят в состав активного центра аргиназы. Модификация их сопровождается нарушением конформационного состояния фермента, что вызывает инактивацию. В присутствии ЭГ в молекуле аргиназы под действием водорастворимого КДИ происходят значительно более глубокие изменения, не только приводящие к увеличению степени инактивации, но и влияющие на термочувствительность аргиназы. Принимая во внимание, что молекула КДИ заряжена положительно, можно предположить, что в снижении активности аргиназы определенную роль может играть изменение заряда молекулы аргиназы в результате присоединения КДИ.

Проблемная лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии

Поступила 28.04.1999

ЛИТЕРАТУРА

1. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980.
2. Страйвер Л. Биохимия. М.: Мир, 1984.
3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982.
4. Banks T.E., Blossey B.K., Shafer J.A. – J.Biol.Chem., 1969, v. 244, p. 6323.
5. Bach S.J., Killip J.D. – BBA., 1961, v.47, №2, p. 336.
6. Springell P.H. – Comp. Biochem. Physiol., 1975, v. A 50, №2, p. 267.
7. Геворкян М.Л., Закарян А.Е., Давтян М.А. – Биол. ж. Армении, 1974, т. 27, №9, с. 44.
8. Carraway K.L., Triplett R.B. – BBA, 1970, v. 200, №3, p. 564.
9. Волкова Р.И., Кочетова Л.Л. – Биохимия, 1981, т. 46, №10, с. 1823.
10. Горшкова И.И., Лаврик О.И., Фаллипов В.В. – Молек. биол., 1981, т. 15, №1, с. 62.

Մ.Լ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Մ.Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ԱՐԳԻՆԱԶԻ ԻՆԱԿՏԻՎԱՅՈՒՄԸ ՋՐԱԼՈՒԾԵԼԻ ԿԱՐԲՈՂԻԻՄԻԴԻ
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՏԱԿ

Ա մ փ ո փ ու մ

Խոշոր եղջուրավոր անասունների լյարդի արգինազի փոխազդեցությունը ջրալուծելի կարբոդիմիդի հետ գլիցինի էթիլային եթերի ներկայությամբ առաջացնում է ֆերմենտի ակտիվության անկում և ազդում է ֆիզիկա-քիմիական հատկությունների վրա: Արգելակման բնույթի և կինետիկայի ուսումնասիրությունները ցույց են տալիս, որ կարբոքսիլ խմբերը, որոնց հետ փոխազդեցության մեջ է մտնում կարբոդիմիդը, չեն մասնակցում արգինազի ակտիվ կենտրոնի կազմավորմանը, իսկ ինակտիվացումը տեղի է ունենում, հավանաբար, ֆերմենտի ակտիվ կոնֆորմացիայի խախտման հետևանքով: