

УДК 577.155.3.

М.Л. ГЕВОРКЯН, М.А. ДАВТЯН

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА АРГИНАЗЫ МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ

Методом гель-фильтрации на колонках с сефадексами G-100 и G-150 исследовали продукты триптического гидролиза аргиназы печени крупного рогатого скота. Показано, что под действием трипсина в течение 16 часов при  $pH$  9,5 и  $37^{\circ}C$  происходит образование сравнительно небольших фрагментов с молекулярной массой 11000-13000 *дальтон*. Добавление ионов двухвалентного марганца к раствору аргиназы или обработка его янтарным ангидридом лишь в небольшой степени влияет на ход триптического гидролиза – молекулярная масса образующихся фрагментов несколько увеличивается. Это, очевидно, связано с блокированием некоторых чувствительных к трипсину пептидных связей на поверхности молекулы аргиназы.

Метод протеолитического расщепления нативных белков широко используется в настоящее время для исследования структуры различных ферментов. Он позволяет определить положение отдельных чувствительных к различным протеазам связей на поверхности белковой молекулы. Изучение числа и типов фрагментов протеолиза может дать ценную информацию о степени свернутости полипептидной цепи и о конформации макромолекулы. Различные белки проявляют разную чувствительность к действию протеаз. Так, сывороточный альбумин под действием трипсина в определенных условиях расщепляется на 4 сравнительно крупных фрагмента [1], а одна из молекулярных форм гликогенсинтетазы в результате триптического гидролиза в течение 30 минут полностью деградирует до низкомолекулярных фрагментов [2]. Метод успешно использовался для исследования структурных и функциональных особенностей таких ферментов, как креатинкиназа [3], АТФ-фаза [4], миозин [5] и т.д.

В данной работе проводилось исследование триптического гидролиза аргиназы печени крупного рогатого скота. Фрагменты протеолиза изучали методом гель-фильтрации на колонках с сефадексом G-100 и G-150.

**Материал и методика.** В работе использовали препараты аргиназы печени крупного рогатого скота (Reanal, Венгрия), сефадексы G-100 и G-150 (Farmacia, Швеция), трипсин (Спофа, Чехословакия), аргинин, глицин (Reanal, Венгрия), янтарный ангидрид и остальные реактивы отечественного производства.

Триптический гидролиз проводили в растворе глицинового буфера ( $pH$  9,5; 0,05M) при температуре  $37^{\circ}C$  в течение 14–16 часов. Соотношение фермент – субстрат составляло 1:20. Смесь после гидролиза анализировалась гель-фильтрацией на колонках с сефадексами G-100 (1,8x42) и G-150 (1,8x48). К 4,5 мл раствора аргиназы (50 мг) добавляли 0,5 мл раствора трипсина. Для определения молекулярного веса образующихся фрагментов была проведена калибровка колонки с сефадексом G-100. В качестве стандартов использовали трипсин (24000) (Спофа, ЧССР), пероксидазу (40000) и РНК-азу (14000) (Reanal, Венгрия).

Янтарный ангидрид (концентрация  $5 \cdot 10^{-2}M$ ) готовили на ацетоне непосредственно

перед употреблением. К 4,3 мл раствора аргиназы добавляли 0,2 мл янтарного ангидрида и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 минут, затем проводили триптический гидролиз, добавляя раствор трипсина (0,5 мл).

Раствор  $MnCl_2$  в концентрации  $2,5 \cdot 10^{-2} M$  добавляли по 0,4 мл к раствору аргиназы (4,1 мл) и через 25 минут инкубации при комнатной температуре проводили триптический гидролиз, как обычно, добавляя 0,5 мл раствора трипсина.

Аргиназную активность определяли по методу, описанному нами ранее [6].

**Результаты и обсуждение.** Препарат аргиназы печени крупного рогатого скота подвергли действию трипсина в течение 16 часов при  $37^{\circ} C$ . Полученную в результате гидролиза смесь пропускали через колонку с сефадексом G-100. Результаты этих экспериментов показаны на рис. 1. Как видно из рисунка, аргиназа под действием трипсина расщепляется на сравнительно небольшие фрагменты, выходящие широкой полосой. Молекулярный вес фрагментов, определенный с помощью калибровочной кривой (см. методику), оказался равным 11000–13000 дальтон. Пробы, содержащие нерасщепленный фермент и фрагменты гидролиза, были проверены на активность. Эти опыты показали, что аргиназная активность в ходе протеолиза полностью теряется.

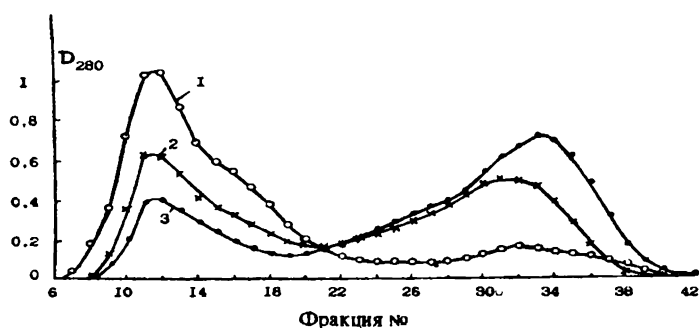


Рис. 1. Гель-фильтрация аргиназы на колонке с сефадексом G-100 после инкубации в течение 3 (2) и 16 часов (3) с трипсином при температуре  $37^{\circ} C$  и соотношении фермент – субстрат (1:20) ( $pH$  9,5), 1 – контроль.

Ионы  $Mn^{2+}$ , как известно, кроме активации, оказывают и стабилизирующее влияние на молекулу аргиназы. В работах Бонд [7] показано, что добавление ионов марганца в отличие от ионов магния вызывает повышение чувствительности аргиназы печени быка к протеолизу трипсином. В связи с этим было интересно проверить, как влияет присутствие ионов марганца на чувствительность аргиназы к триптическому гидролизу в наших условиях. Для этого к раствору аргиназы добавляли водный раствор  $MnCl_2$  и через 20–25 минут выдерживания при комнатной температуре проводили триптический гидролиз в течение 16 часов. Данные, приведенные на рис. 2, показывают, что присутствие этих ионов в некоторой степени влияет на ход триптического гидролиза. Фрагменты, содержащие ионы  $Mn^{2+}$ , элюируются несколько раньше, чем в контроле. Это указывает на некоторое увеличение величины образующихся фрагментов. Таким образом в наших опытах проявляется стабилизирующее влияние ионов марганца, хотя и в незначительной степени. Резкое увеличение поглощения при 280 нм во фракциях, содержащих фрагменты гидролиза, объясняется тем, что ионы марганца оказались связанными с образующимися фрагментами (раствор  $MnCl_2$  интенсивно поглощает при этой длине волны).

Как известно, трипсин избирательно расщепляет пептидные связи, образованные остатками аргинина и лизина в белках [8]. Блокирование некоторых из них, в частности  $\xi$ -аминогруппы лизина, может повлиять на ход гидролиза, приводя к образованию более крупных фрагментов [9]. В связи с этим представляло интерес про-

вести модификацию остатков лизина в аргиназе и проверить влияние этой модификации на ход триптического гидролиза. Для модификации использовали янтарный ангидрид. Этот реагент при определенных условиях взаимодействует с  $\xi$ -аминогруппами лизина, а при более высоких концентрациях – и с другими аминогруппами в белках [10]. Использование этого реагента позволило выявить важную роль остатков лизина в активности целого ряда ферментов [10,11]. В наших опытах инкубация раствора аргиназы при  $pH$  9,5 с янтарным ангидридом не влияла на активность аргиназы. По-видимому,  $\xi$ -аминогруппы лизина, а также другие легкодоступные и находящиеся на поверхности молекулы аргиназы аминогруппы не играют роли в проявлении активности этого фермента и находятся, очевидно, на участках, удаленных от его активного центра.

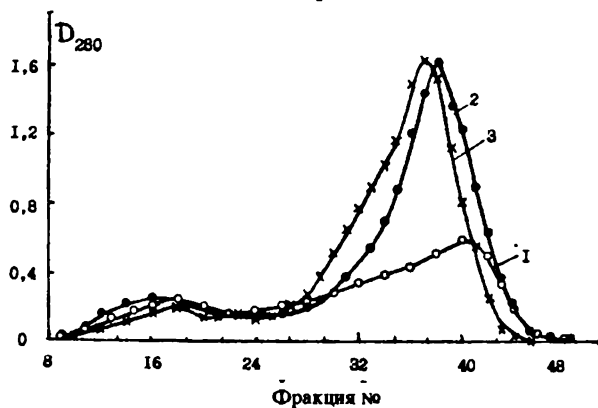


Рис. 2. Гель-фильтрация аргиназы после обработки трипсином в течение 14 часов на колонке с сефадексом G-150. Условия те же. 1- контроль, 2- аргиназа, предварительно обработанная  $MnCl_2$ , 3- аргиназа, обработанная янтарным ангидридом

(см. методику).

Данные, приведенные на рис. 2, показывают, что обработка янтарным ангидридом оказывает определенное влияние на ход триптического гидролиза. Молекулярная масса образующихся фрагментов несколько выше, чем в контроле. Увеличение поглощения связано с тем, что и в этом случае, как и в случае с раствором  $Mn^{2+}$ , реагент оказался связанным с продуктами гидролиза (раствор янтарного ангидрида также интенсивно поглощает при длине волны 280 нм). По-видимому, взаимодействие янтарного ангидрида с аминогруппами лизина предохраняет некоторые связи на поверхности аргиназы от переваривания трипсином, что отразилось на величине молекулярной массы образовавшихся фрагментов. Очевидно, что в результате триптического гидролиза могут образоваться и более мелкие фрагменты, которые не фиксируются на используемых нами колонках. Для их идентификации требуются дополнительные исследования.

Полученные результаты позволяют полагать, что дальнейшее исследование особенностей триптического гидролиза аргиназы, а также выделение и изучение структуры полученных фрагментов несомненно позволят получить ценную информацию как об аминокислотном составе и последовательности аминокислот отдельных участков полипептидной цепи, так и о расположении чувствительных к трипсину связей на поверхности этого фермента. Дальнейшие исследования в этом направлении представляют особый интерес, так как позволят выявить различия в структуре и пространственной организации различных молекулярных форм одного и того же фермента, а также изучать видовую специфичность.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Peters T.Jr., Feldhoff K.C. – Biochemistry, 1975, v.14, № 15. p. 3384.
2. Takeda Y., Larner J. – J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 23, p. 8951.
3. Price N.C., Murray S., Milner-White E.J. Biochem. J., 1981, v. 199, № 1, p. 239.
4. Thorley-Lowson D.A., Grenn N.M. – Eur. J. Biochem., 1975, v. 59, № 1, p. 193.
5. Zobel C.R. – В.В. Аста., 1978, v. 536, № 1, p. 142.
6. Геворкян М.Л., Закарян А.Е., Давтян М.А. – Биолог. ж. Армении, 1974, т. 27, № 9, с. 44.
7. Bond J.S. – В.В. Аста., 1973, v. 327, № 1, 157.
8. Ленинджер А. Основы биохимии, М.: Мир, 1985.
9. Девени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976.
10. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков, М.: Мир, 1974.
11. Угарова Н.Н., Рожкова Г.Д., Березин И.В. – Биохимия, 1978, т. 43, № 7, с. 1242.

Մ.Լ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Մ.Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ԱՐԳԻՆԱԶԻ ՏՐԻՊՏԻԿ ՀԻԴՐՈԼԻԶԻ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԻ  
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԺԵԼ-ՖԻԼՏՐՄԱՆ ՍԵԹՈՂՈՎ

### Ամփոփում

Խոշոր եղջյուրավոր անասունների լյարդի արգինազի տրիպտիկ հիդրոլիզի հետևանքով առաջացած հատվածները ուսումնասիրվել են ժել-ֆիլտրման մեթոդով G-100 և G-150 սեֆադեքսներով լցված սյունակների օգնությամբ: Ցույց է տրված, որ տրիպտիկ ազդեցության տակ 16 ժամվա ընթացքում, 37<sup>0</sup> C և pH 9,5 պայմաններում արգինազը ճեղքվում է 11000-13000 դայտոն մոլեկուլային զանգված ունեցող հատվածների: Mn<sup>2+</sup> իոնների ներկայությունը, ինչպես նաև սաթաթթվի անհիդրիդով արգինազի լուծույթի նախօրոք մշակումը որոշ չափով պաշտպանում են արգինազի մոլեկուլը տրիպտիկ ճեղքումից. առաջացած հատվածների մոլեկուլային զանգվածը համեմատաբար մեծանում է: Հավանաբար, արգինազի մոլեկուլի մակերևույթի տրիպտիկի նկատմամբ զգայուն որոշ պեպտիդային կապերը մեկուսացվում են այդ նյութերի ազդեցության հետևանքով: