

УДК 577.155.3., 577.152.353

М.Л.ГЕВОРКЯН, М.А.ДАВТЯН

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ pH И МОЧЕВИНЫ НА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ РАСТВОРОВ АРГИНАЗЫ

Изучение флуоресцентных свойств аргиназы печени крупного рогатого скота в растворах с различными значениями pH показало, что в области pH от 6,5 до 9,8, где аргиназа проявляет активность, конформационное состояние макромолекулы фермента изменяется незначительно. В экстремальных условиях – при pH 2,8 и 10,5, а также в присутствии высоких концентраций мочевины в среде при полной инактивации наблюдается снижение интенсивности флуоресценции и изменение положения максимума. На основании полученных данных сделано заключение о том, что наибольшее разворачивание полипептидной цепи фермента происходит в растворе 8M мочевины, что, однако, не сопровождается разрывом дисульфидных связей в молекулу аргиназы.

Для проявления функциональных свойств ферментов большое значение имеет конформационное состояние молекулы. Незначительные нарушения конформации под влиянием температуры, изменения концентрации водородных ионов или химических реагентов могут существенно влиять на скорость каталитической реакции, величину K_m , термостабильность и другие свойства. Выяснение условий, при которых фермент способен сохранять нативную конформацию, обеспечивающую наибольшую эффективность его действия, необходимо как для практического использования, так и для понимания механизма его действия.

Одним из чувствительных методов, позволяющих изучать конформационные изменения в молекулах белков в растворах, является измерение спектров флуоресценции (ФЛ) [1, 2]. Измерение параметров ФЛ позволило получить интересные сведения о конформации таких белков, как гистидин-декарбоксилаза [3], химоотрипсин [4], лизоцим [5], миоглобин [6] и др. Известно, что триптофановая ФЛ много более чувствительна к изменениям окружения хромофора по сравнению с тирозиновой и фенилаланиновой [7].

В настоящей работе изучалось влияние изменений значений pH среды и присутствия мочевины на конформацию аргиназы печени крупного рогатого скота с помощью измерения спектров триптофановой ФЛ. Молекула аргиназы, по данным [8], содержит 12 остатков триптофана, которые являются удобными репортерными группами, позволяющими получить сведения

о структурных особенностях тех участков макромолекулы, где они расположены.

Материал и методика. Исследования проводились на коммерческом лиофилизированном препарате аргиназы печени крупного рогатого скота фирмы *Reanal* (Венгрия). Растворы аргиназы (концентрация $9 \cdot 10^{-6} M$) готовились на глициновом ($0,05M$) и фосфатном ($0,05M$) буферах. Перед измерением спектров ФЛ растворы разбавлялись в 10 раз.

Измерения ФЛ проводили на спектрофлуориметре MPF-4A (*HITA-SHI*, Япония) при длине волны возбуждения $297nm$ в кварцевых кюветках шириной $10mm$.

Количество SH-групп в молекуле фермента определяли методом спектрофотометрического титрования по Бойеру [9]. Молекулярная масса аргиназы принималась равной $120kDa$.

В работе использовали препараты L-аргинина, L-лизина, L-орнитина, глицина фирмы *Reanal* (Венгрия), p-хлормеркурибензоат (ПХМБ) фирмы *Chemapol*. Остальные реактивы отечественного производства с маркой х.ч. или ч.д.а.

Результаты и обсуждение. Согласно литературным [10, 11], а также нашим [12] данным, аргиназа печени крупного рогатого скота при длине волны возбуждения $297nm$ в растворах с pH 8,6 имеет довольно интенсивную ФЛ с максимумом в области $334-338nm$ и полушириной спектра – $54nm$. Это указывает на то, что значительная часть остатков триптофана находится внутри белковой глобулы в низкополярном гидрофобном микроокружении. Присутствие в растворе L-аргинина или конкурентных ингибиторов – L-лизина, L-орнитина – не влияет на положение максимума и интенсивность ФЛ, т.е. связывание субстрата или ингибиторов в активном центре не сопровождается изменениями в микроокружении триптофановых остатков. Очевидно, они удалены от центров связывания этих аминокислот.

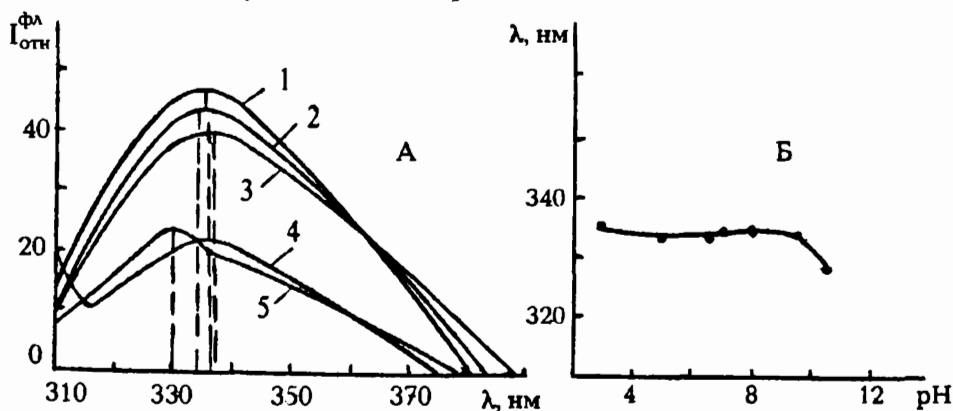


Рис. 1. А. Спектры флуоресценции растворов аргиназы при различных значениях pH: 1 – 6,5; 2 – 8; 3 – 9,5; 4 – 2,8; 5 – 10,5. Б. Изменение положения максимума спектра ФЛ аргиназы в зависимости от pH среды.

Измерение спектров триптофановой ФЛ растворов аргиназы при различных значениях pH показало (рис.1), что в области pH от 6,5 до 9,8 наблюдается небольшое изменение интенсивности ФЛ и максимум смещается

на 2–3нм в коротковолновую область. В сильноокислой и сильнощелочной средах обычно наблюдается тушение ФЛ [13]. В наших опытах также при значениях рН 2,8 и 10,5 происходит значительное снижение интенсивности флуоресценции, а при рН 10,5 наблюдается и изменение формы спектра (рис. 1). Максимум спектра ФЛ при этом смещается на 7–8нм в коротковолновую область. Это можно объяснить тем, что при изменении концентрации водородных ионов в растворе в результате нарушения конформации флуоресцирующие остатки триптофана оказываются в более гидрофобном окружении. Можно предположить также, что наблюдаемое смещение положения максимума связано с ФЛ расположенных на близком расстоянии остатков тирозина, на которые, как полагает ряд авторов [5], может мигрировать энергия возбуждения с триптофанилов.

При рН 2,8 наблюдается снижение интенсивности ФЛ, но положение максимума не меняется. Падение квантового выхода в кислой среде проще всего связать с контактным тушащим действием протонированных карбоксильных групп либо других тушащих групп, оказавшихся в непосредственной близости от остатков триптофана в результате конформационных изменений. По-видимому, разворачивания свернутых участков молекулы аргиназы в этих условиях не происходит и остатки триптофана локализованы во внутренних малоподвижных участках макромолекулы фермента, компактная упаковка которых поддерживается довольно прочными связями.

Как было показано нами ранее [14], при облучении растворов аргиназы ультрафиолетовым светом в растворах с рН 7 и 9,5 скорость деструкции остатков триптофана не меняется, что свидетельствует об отсутствии заметных изменений конформации аргиназы в этой области рН. Скорость инактивации в данных условиях также не зависела от концентрации водородных ионов. Таким образом, в участках макромолекулы аргиназы, где расположены флуоресцирующие остатки триптофана, а также в области активного центра существенных нарушений конформационного состояния аргиназы при изменении значений рН от 6 до 9,8 не происходит. Даже в сильноокислой среде (рН 2,8), хотя интенсивность ФЛ снижается, положение ее максимума меняется незначительно: λ_{\max} смещается на 2–4нм в длинноволновую область (рис. 1Б). Все это указывает на то, что аргиназа имеет довольно устойчивую вторичную и третичную структуры, обеспечивающие функциональную активность в сравнительно широкой области рН. Согласно литературным данным [15], активность и исходное конформационное состояние аргиназы восстанавливаются даже после длительной инкубации в кислой среде.

Было интересно проверить влияние сильных денатурирующих агентов на структуру аргиназы. Исследовалось влияние высоких концентраций мочевины на ФЛ аргиназы. Фермент выдерживали в растворах с 5,8 и 8М мочевиной при комнатной температуре (20°C) в течение 2-х часов, затем измеряли спектры триптофановой ФЛ. На рис. 2 приведены результаты этих экспериментов. В растворе с 5,8М мочевиной наблюдается снижение интенсивности ФЛ и небольшой сдвиг положения максимума в длинноволновую область (на 5–6нм). В этих условиях только часть внутренних остатков триптофана переходит на поверхность белка. Принимая во внимание, что мочевина является одним из продуктов реакции, катализируемой арги-

назой, можно предположить, что на поверхности фермента имеются определенные участки связывания ее молекул. Сравнительную устойчивость аргиназы в присутствии этого реагента можно объяснить тем, что, связываясь в определенных участках макромолекулы, мочевины может оказывать стабилизирующее воздействие на структуру фермента.

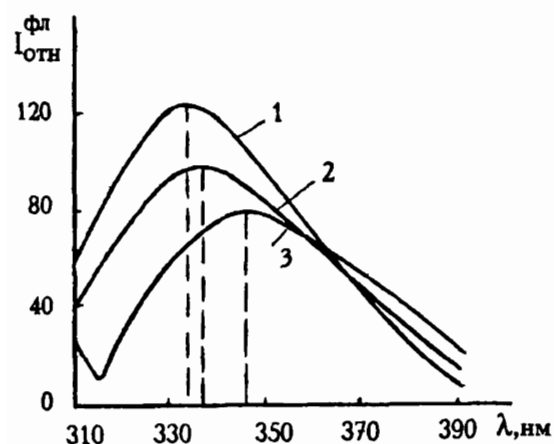


Рис. 2. Спектры флуоресценции растворов аргиназы в присутствии 2 – 5,8М, 3 – 8М мочевины (1 – контроль).

В растворе с более высокой концентрацией мочевины (8М) вместе со снижением интенсивности ФЛ происходит и значительный сдвиг положения максимума ($\lambda_{\text{max}} = 348\text{нм}$), что характерно для многих белков в этих условиях [16]. Таким образом, в 8М мочевины происходит разворачивание молекулы фермента и переход скрытых остатков триптофана в гидрофильное окружение.

Дополнительным критерием разворачивания молекулы белка является изменение доступности SH-групп в реакции с ПХМБ. В нативном белке

при рН 9,5 в 0,05М глициновом буфере этим методом определяется около 3,6 SH-групп на 1моль фермента. Однако в присутствии мочевины количество определяемых сульфгидрильных групп не изменилось. Таким образом, при превращении нативной аргиназы в денатурированную под действием высоких концентраций мочевины происходит переход триптофанилов в гидрофильное окружение, что, однако не сопровождается разрывом дисульфидных связей, а также разрушением полипептидной цепи молекулы аргиназы [17].

Как показано на примере некоторых белков [18], под влиянием повышенной температуры, кислых значений рН или умеренных концентраций денатурирующих агентов глобулярные белки переходят в стабильное состояние, промежуточное между нативным и полностью развернутым – в состояние так называемой “расплавленной глобулы”. При этом ослабляются водородные и другие связи, однако вторичная структура остается неизменной. Возможно, в условиях нашего эксперимента при значениях рН от 6,5 до 9,8, а также в присутствии сравнительно низкой концентрации мочевины аргиназа переходит в состояние, описанное выше, при котором полного разворачивания макромолекулы не происходит и сохраняются связи, обеспечивающие вторичную структуру.

Таким образом, результаты этих экспериментов показывают, что аргиназа печени крупного рогатого скота – довольно устойчивый фермент, способный сохранять активную конформацию при значительных изменениях условий среды. Такая конформация, по-видимому, обеспечивается наличием прочных боковых связей как в области активного центра, так и в участках, где расположены остатки триптофана. С другой стороны, стаби-

лизация структуры может быть связана с присутствием ионов двухвалентного марганца, важная роль которых в проявлении активности и поддержании нативной конформации аргиназы общеизвестна. В настоящее время рядом исследователей подробно и активно изучаются участки локализации этих ионов в молекуле фермента, а также природа лигандов, участвующих в образовании их связей [19–21]. Эти вопросы, представляющие значительный научный интерес, определяют основные направления дальнейших исследований структуры и механизма действия этого фермента.

*Кафедра биохимии и проблемная лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии*

Поступила 21. 12. 2000

ЛИТЕРАТУРА

1. Конев С.В., Мажуль В.И., Черницкий Е.А. – ДАН БССР, 1968, т. 12, с. 1122.
2. Бурштейн Э.А., Гуссаковский Е.Е., Бабаев Т.А. – Биофизика, 1981, т. 26, № 2, с. 204.
3. Мардашев С.Р., Семина Л.А., Гончар Н.А., Митрофанова И.Д., Александрова С.С. – Биохимия, 1975, т. 40, № 4, с. 783.
4. Левинский В.Ю., Мелик-Нубаров Н.С., Слепнев В.И., Шикснис В.А., Можаяев В.В. – Молек. биол., 1990, т. 24, № 5, с. 1246.
5. Веденкина Н.С., Троицкий А.В., Бурштейн Э.А. – Молек. биол., 1984, т. 18, № 2, с. 362.
6. Постникова Г.Б., Юмакова Е.М., Комаров Ю.Е. – Молек. биол., 1990, т. 24, № 3, с. 757.
7. Бурштейн Э.А. – Молек. биол., 1983, т. 17, № 3, с. 455.
8. Harrel D., Sokolovsky M. – Eur. J. Biochem., 1972, v. 25, № 1, p. 102.
9. Boyer P.D. – J. Am. Chem. Soc., 1954, v. 76, № 17, p. 4331.
10. Веденкина Н.С., Бурштейн Э.А. – Молек. биол., 1970, т. 4, № 5, с. 743.
11. Cavalli P.C., Burka C.J., Kawamoto S., Soprano D.P., Ash D.E. – Biochemistry, 1994, v. 33, p. 10652.
12. Геворкян М.Л., Давтян М.А. – Биолог. ж. Армении, 1979, т. 32, № 5, с. 435.
13. Коваль В. Г., Шевченко А.С., Щербачкая Н.В. – Биофизика, 1980, т. 25, № 4, с. 583.
14. Геворкян М.Л., Закарян А.Е., Демин Ю.М. – Ученые записки ЕГУ, 1976, № 1, с. 78.
15. Hosoyama Y. – Eur. J. Biochem., 1972, v. 27, № 1, p. 48.
16. Уварова Р.Н., Виноградова И.Д., Иванов К.К. – Молек. биол., 1983, т. 17, № 2, с. 286.
17. Геворкян М.Л., Закарян А.Е. – В сб.: Вопросы биологии, 1981, № 2, с. 90.
18. Болотина И.А. – Молек.биол., 1967, т. 21, № 6, с.1625.
19. Green S.M., Ginsburg A., Lewis M.S. – J. Biol. Chem., 1991, v. 266, № 32, p. 21474.
20. Khangulov S.V., Sossong T.M.Jr., Ash D.E., Dismukes G.S. – Biochemistry, 1998, v. 37, №23, p. 8539.
21. Scolnick L.R., Kanio Z.F., Cavalli R.C., Ash D.E. – Biochemistry, 1997, v. 36, № 34, p.10558.

Մ.Լ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Մ.Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

рН-ի ԵՎ ՄԻՋԱՆՅՈՒԹԻ ԱՁԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԱՐԳԻՆԱՁԻ ԼՈՒԾՈՒՅԹՆԵՐԻ ՖԼՈՒՈՐԵՍԵՆՑԻԱՅԻ ՎՐԱ

Ամփոփում

Խոշոր եղջյուրավոր անասունների լյարդի արգինազի ֆլուորեսցենցիայի ուսումնասիրությունը рН-ի տարբեր արժեքներ ունեցող լուծույթներում ցույց տվեց, որ рН 6,5-ից մինչև 9,8 տիրույթում, որտեղ արգինազը ակտիվություն է

ցուցաբերում, նրա կոնֆորմացիոն վիճակը քիչ է փոփոխվում: Միջավայրի էքստրեմալ պայմաններում (pH 2,8 և 10,5), ինչպես նաև միզանյութի բարձր կոնցենտրացիայի առկայության դեպքում ինակտիվացիայի հետ միասին դիտվում են ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության անկում և մաքսիմումի դիրքի շեղումներ: Ստացված տվյալների հիման վրա արվում է այն եզրակացությունը, որ ֆերմենտի պոլիպեպտիդային շղթայի առավել մեծ խախտումներ տեղի են ունենում լուծույթում 8M միզանյութի առկայության դեպքում, որոնք սակայն չեն ուղեկցվում արգինազի մոլեկուլի դիսուլֆիդային կապերի ճեղքմամբ:

M.L. GEVORKIAN, M.A.DAVTIAN

THE INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF pH AND UREA ON THE FLUORESCENCE OF ARGINASE SOLUTIONS

Summary

The investigation of the influence of pH on the fluorescence spectra of bovine liver arginase in solutions has shown that in the region of pH 6,5–9,8, where the enzyme keeps the activity, small conformational changes take place. At the extremal pH values (2,8 and 10,5) and in the presence of high concentrations of urea the intensity of fluorescence decreases and maximum spectra are shifted. The data suggested that polypeptide chain of arginase is damaged in 8M urea solutions without any cleavage of disulfide bonds.