

УДК 577.155.34:615.5

Յ.Ք. ԲԱՐՏԵԳՅԱՆ, Մ.Ա. ԴԱՎՅԱՆ

РЕАКТИВАЦИЯ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ПРИ pH 3,6 АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ ЛЯГУШЕК R.RIDIBUNDA.

Показано, что в процессе реактивации (экспозиция-22 часа при 37°C в присутствии ионов Co и Mn) аргиназы печени лягушек *Rana ridibunda*, предварительно инактивированной при pH 3,6, происходит ассоциация субъединиц в октамерный олигомер взамен тетрамерной структуры нативной аргиназы, что приводит к изменению величины K_M по отношению к L-аргинуину для реактивированного фермента.

Предыдущими нашими исследованиями [1-3] показано, что процесс кислотной инактивации (pH 3,6) аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* обратим при pH 9,5 в присутствии ряда двухвалентных ионов. В частности в присутствии ионов Co фермент реактивировался на 74,7%, а Mn на 70,6% [1]. Цель настоящей работы - дальнейший поиск оптимальных условий реактивации фермента и изучение некоторых свойств инактивированного и реактивированного фермента.

Материал и методика. Объектом исследования служили лягушки *R. ridibunda* (лягушка озерная), весом по 100-120г. Активность аргиназы и величину K_M определяли по ранее описанным методам [2,3].

Активность фермента выражали в μM образовавшейся мочевины на 1г свежей ткани.

Молекулярная масса определялась методом гельфильтрации (Sephadex G-200, "Pharmacia", Швеция). Размеры колонки 1,5x40см, в элюции 3мл, скорость элюции 30мл в час. Для определения значения v_0 (свободный объем колонки) использовали свежеприготовленный 0,2% раствор голубого декстрана (Blue Dextran 2000 "Pharmacia", м.м. 2×10^6 ДА). В качестве белков-маркеров использовались уреаза из соевых бобов (м.м. 480000), дрожжевая алкогольдегидрогеназа (м.м. 157000), гемоглобин крови лошади (м.м. 67000) и пепсин (м.м. 35000).

Результаты и обсуждение. Известно, что в ряде случаев термоинкубация при 50°C (10мл) стимулирует активирование марганцем аргиназы. Например, образование комплекса аргиназа - марганец (печень крысы) при комнатной температуре идет 8-10 часов, а при 55° - 5млн [4]. Активность аргиназы молочной железы крысы при добавлении Mn^{2+} повышается в 6, а при термообработке с Mn^{2+} в 10 раз [5]. Инкубирование при 55°C (10мл) частично очищенной аргиназы печени, почек, эритроцитов и фибробластов человека увеличивает стимулирующий эффект марганца в 3-4 раза [6].

Исходя из вышесказанного, можно было предположить, что тер-

моинкубирование аргиназы с двухвалентными ионами должно было стимулировать реактивирование фермента.

Реактивацию предварительно инактивированной аргиназы печени (0,05M глицин-HCl буфер, pH 3,6) проводили после нейтрализации инкубационной среды (0,05M глицин-NaOH буфером, pH 9,5) в присутствии ионов Co и Mn при температуре 37°C в течение 22 часов, при температуре 50° (10 мин) и с предынкубацией фермента при 50° 10 мин и дальнейшей инкубацией его при вышеуказанных условиях. Результаты исследований представлены в таблице.

Степень реактивации аргиназы печени лягушек R. ridibunda при различных режимах (средние данные - 5 опытов)

Ф р а к ц и я	Активность на 1g свежей ткани, $\mu\text{KM/g}$	% инактивации и реактивации
экстракт	27300	-
инактивированный экстракт (pH 3,6)	2184	-92
реактивированный экстракт (+Co ²⁺) при 37°C (22ч)	20475	+75
при 50°C (10 мин)	2196	нет реактивации
при 50°C (10 мин) с последующей инкубацией при 37°C (22ч)	5460	+20
реактивированный экстракт (+Mn ²⁺) при 37°C (22ч)	16380	+60
при 50°C (10 мин)	2196	нет реактивации
при 50°C (10 мин) с последующей инкубацией при 37°C (22ч)	3003	+11

Как показали результаты исследований, предынкубирование инактивированной аргиназы печени при температуре 50°C (10 мин) тормозило реактивацию фермента. Если при температуре 37°C реактивация фермента была значительна (в случае Co²⁺ фермент активировался на 75%, а Mn²⁺ - на 60%), то при термоинкубации при 50° и дальнейшей инкубации при 37°C процесс тормозился в I случае в 3,7 раза, а во втором в 5,4 раза, реактивирование фермента соответственно шло на 20 и 11%.

Таким образом, стимулирующий эффект термоинкубации нами не обнаружен, оптимальной температурой реактивации аргиназы печени лягушек при наших условиях эксперимента является 37°C (22 часа) [1], при которой, очевидно, субъединицы ассоциируются в олигомерную структуру, что предотвращается предварительной термообработкой фермента.

Согласно литературным данным для максимального проявления каталитической активности аргиназы требуется объединение 4 субъединиц в олигомере фермента [7], тем не менее следует отметить, что имеются данные относительно тримера аргиназы из печени крысы [8], октамера аргиназы из грудной стенки речного рака (м.м.225000)

[9], гепатопанкреаса улитки (м.м.244000) [10]. Результаты наших исследований показали, что молекулярная масса аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* (экстракт), выловленных в различных районах республики, колеблется в пределах 123000-131800 (рис.1). Эта вели-

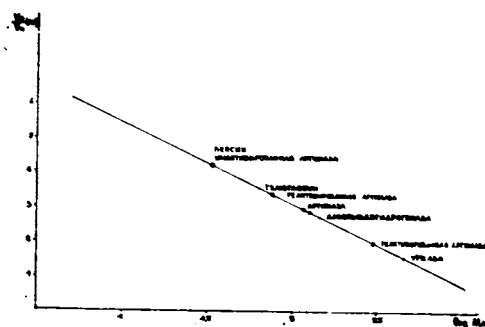


Рис.1. Калибровочная кривая определения молекулярных масс инактивированного и реактивированного фермента.

чина соответствует молекулярной массе (110000-136000), определенной для аргиназы млекопитающих [11], и является, как предполагается, оптимальной для проявления аргиназной активности [7].

После кислотной инактивации (рН 3,6) аргиназа печени лягушек *R. ridibunda* расщеплялась на субъединицы с м.м.34910. Сопоставляя значения молекулярных масс исходной и инактивированной аргиназы печени лягушек, мы можем говорить о тетрамерной структуре аргиназы печени лягушек *R. ridibunda*.

Реактивация аргиназы печени при вышеуказанных условиях приводила к восстановлению общей активности фермента до 75%. Молекулярная масса реактивированного фермента, определенная нами, была равна 316000. В некоторых вариантах был обнаружен одновременно и второй пик аргиназной активности с м.м.77620 (рис.1).

Таким образом, ассоциация субъединиц аргиназы в буфере при заданных условиях приводила к образованию октамера аргиназы (иногда и димера). По-видимому, разрыв дисульфидных связей под воздействием низких рН, приводящий к молекулярной деградации аргиназы, изменяет конформацию фермента и отражается на процессе формирова-

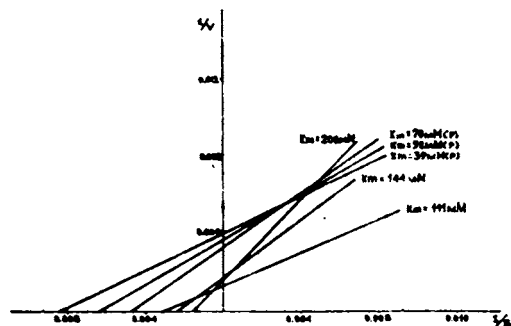


Рис. 2. Кривая Лайнуивера-Бэрка для инактивированной и реактивированной аргиназ. (Средние данные 3 опытов: для инактивированного фермента $K_M=151 \mu M$, для реактивированного — $K_M=53 \mu M$).

ния его олигомера.

Таким образом, при реактивации аргиназы, очевидно, образуется качественно новое олигомерное состояние фермента, которое должно обладать другими кинетическими и регуляторными характеристиками. Результаты исследований показали, что если значение K_M по отношению к L-аргинину для аргиназы экстракта печени было равно 30 мМ [2], то значение K_M , полученное для инактивированного фермента, — 151 мМ, т.е. сродство мономера аргиназы по отношению к субстрату в сравнении с таковым олигомера ниже в 5 раз. После реактивации аргиназы величина K_M стала равна 53 мМ (рис.2), сродство реактивированного фермента по отношению к субстрату возросло в 2,8 раза, однако значение величины K_M не достигло исходного значения.

Таким образом, анализ результатов исследований показал, что при реактивации инактивированной при pH 3,6 аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* происходит образование олигомерной структуры, неидентичной нативному ферменту.

*Кафедра биохимии и проблемная
лаборатория сравнительной и
эволюционной биохимии*

Поступила 6.05.1989

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Барсегян Э.Х. Изучение процесса обратимой инактивации аргиназы печени лягушек *R. ridibunda*. — Биолог.ж.Армении, 1980, т.42, №2.
2. Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Давтян М.А. Изучение изоферментного спектра аргиназы печени лягушки *R. ridibunda* в процессе онтогенеза. — Биолог.ж.Армении, 1977, т.30, №6.
3. Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Месропян М.Б. Изоферменты аргиназы печени лягушек *R. ridibunda*. — Биолог.ж.Армении, 1979, т.32, №12.
4. Hirsch-Kolb H., Kolb H.J., Greenberg D. Nuclear magnetic resonance studies of manganese binding of rat liver arginase. — J.Biol.Chem., 1971, v.246, p.395
5. Glass R.D., Knox W.E. Arginase isoenzymes of rat mammary gland, liver and other tissues. — J.Biol.Chem., 1973, v.248, p.5785.
6. Van-Elsen A.E., Leray J.G. Arginase isoenzyme in human diploid fibroblasts. Biochem.-Biophys.Res.Comm., 1975, v.62, p.191.
7. Myszyńska G., Reifer J. The arginase inhibitor from sun flower seeds: purification and inhibitory properties. — Acta.biochim. pol., 1970, v.17, p.247.
8. Penninx M., Stalon J.M., Wiame J.M. Interaction between arginase and L-ornithinecarbamoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. — Eur.J.Biochem., 1974, v.49, no.4, p.429.
9. Hartenstein R. Characteristics of arginase from the freshwater crayfish. — Comp.Biochem.a.Physiol., 1971, B40, no.3, p.781.
10. Reddy S.R., Campbell J.N. Arginase metabolism in insects. — Biochem.J., 1969, v.115, p.495.
11. Porembska Z. Different species of arginase in animal tissues. — Enzyme, 1973, v.15, p.198.

Ա մ փ ո փ ու մ

Ցույց է տրված, որ R.ridibunda գորտի լյարդի նախապես ինակտիվացված արգինազայի (pH=3,6) վերաակտիվացման ընթացքում (22ժ, 37°, Co^{2+} և Mn^{2+} իոնների առկայությամբ) տեղի է ունենում ենթամիավորների ասոցիացիայի նստիվ արգինազայի տետրամերային կառուցվածքի փոխարեն առաջանում է օկտամերային կառուցվածքով օլիգոմեր: Համապատասխանաբար փոխվում է վերակտիվացված ֆերմենտի K_M -ի արժեքը L-արգինինի նկատմամբ:

SUMMARY

It has been shown that when reactivating (exposition: 22 hours at 37° in the presence of Co^{2+} and Mn^{2+} ions) arginase of frog R.ridibunda liver, preliminary inactivated at pH=3.6, association of subunits into octamerous oligomer takes place instead of the tetramerous structure of native arginase, which brings to a corresponding change of the value K_M with respect to arginine for the reactivated ferment.