

Биология

УДК 577.112.4; 577.343

М. Л. ГЕВОРКЯН, А. Е. ЗАКАРЯН

**ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ
N-БРОМСУКЦИНИМИДОМ НА СЕНСИБИЛИЗИРОВАННУЮ
ФОТОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ РАСТВОРОВ АРГИНАЗЫ**

Исследовалась сенсibilизированная эозином фотохемилюминесценция (ФХЛ) растворов аргиназы печени крупного рогатого скота, подвергнутых химической модификации N-бромсукцинимидом (БСИ). Наряду с инактивацией фермента и снижением интенсивности триптофановой флуоресценции (ФЛ), в ходе модификации наблюдалось значительное снижение интенсивности сенсibilизированной фотохемилюминесценции растворов аргиназы. На основании полученных данных делается заключение, что измерение интенсивности сенсibilизированной ФХЛ можно использовать как чувствительный метод для контролирования процессов разрушения остатков триптофана в белках при различных воздействиях.

При облучении растворов белков видимым светом в присутствии некоторых красителей наблюдается сенсibilизированная фотохемилюминесценция, интенсивность которой в ходе облучения постепенно снижается [1, 2]. Наиболее чувствительными к фотохимическому окислению аминокислотными остатками в белках, как известно, являются остатки триптофана, тирозина, гистидина, метионина и др. [3, 4]. Как показано в ряде работ [1, 2], сенсibilизированная фотохемилюминесценция связана с фотолизом остатков триптофана в белках, причем снижение интенсивности ФХЛ с увеличением времени облучения объясняется расходом остатков триптофана. Сенсibilизированная ФХЛ исследовалась нами на растворах аргиназы печени крупного рогатого скота при облучении видимым светом в присутствии эозина [5]. Так как снижение интенсивности ФХЛ в ходе облучения отражает процесс разрушения триптофанолов в белке, представляло интерес выяснить, можно ли с помощью измерения интенсивности ФХЛ проследить за распадом остатков триптофана в белках при других способах их модификации, в частности, при химической модификации.

Влияние N-бромсукцинимида на аргиназу печени крупного рогатого скота исследовалось нами ранее [6]. Наряду с инактивацией при взаимодействии с БСИ, были обнаружены снижение интенсивности триптофановой флуоресценции и уменьшение оптической плотности при 280 нм, что свидетельствует о модификации остатков триптофана в аргиназе [7]. В данной работе проводилось исследование влияния химической модификации БСИ на интенсивность сенсibilизированной эозином фотохемилюминесценции растворов аргиназы параллельно с определением активности и интенсивности триптофановой ФЛ.

Материал и методика. В работе использовали препараты аргиназы печени крупного рогатого скота, L-аргинин, L-лизин, L-орнитин (Reanal, Венгрия); эозин (натриевая соль), N-бромсукцинимид—отечественного производства. Растворы белка готовили на 0,05 М глицино-

вом буфере (рН 9,5). К 3 мл раствора аргиназы добавляли 1 мл свеже-приготовленного водного раствора БСИ и в смеси определяли остаточную активность аргиназы через 2 часа инкубации при комнатной температуре (20°C), предварительно разбавив пробу 10 раз. Аргиназную активность определяли по методу Ратнер с небольшими изменениями, как описано ранее [8].

В исследуемом растворе аргиназы после инкубации с БСИ измеряли интенсивность триптофановой ФЛ с помощью спектрофлуориметра MPF-2A (HITACHI, Япония) при длине волны возбуждения 297 нм. Измерение интенсивности сенсibilизированной ФХЛ проводили на установке для регистрации хемилюминесценции, описанной ранее [8]. К смеси растворов аргиназы с БСИ после инкубации при комнатной температуре добавляли 1 мл водного раствора эозина ($1,25 \cdot 10^{-5}$ М), облучали в открытой термостатированной (20°C) кювете в течение 5 мин (диаметр кюветы 3,5 см). Затем в течение 2—3 сек исследуемую смесь перекачивали в измерительную кювету, расположенную перед фотокастом фотоумножителя и регистрировали интенсивность ФХЛ на самопишущем потенциометре, как описано ранее [8]. Облучение раствора проводили видимым светом ртутной лампы ПРК-4 (фильтр БС-8) на расстоянии 6 см от основания кюветы при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки.

В опытах по изучению влияния L-аргинина, L-лизина и L-орнитина на интенсивность сенсibilизированной ФХЛ и на инактивацию растворов аргиназы эти соединения в концентрации 5—10 мМ добавляли к раствору аргиназы перед проведением химической модификации и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин (в опытах с L-аргинином инкубации не проводились). Присутствие этих соединений в растворе не влияло на уровень и кинетику сенсibilизированной ФХЛ растворов аргиназы.

Результаты и обсуждение. Сенсibilизованная эозином фотохемилюминесценция, возникающая в растворах аргиназы при облучении видимым светом, имеет те же закономерности, что и в растворах других белков [5]. Типичная кинетическая кривая спада свечения приведена на рис. 1. Как видно из рисунка, эта кривая состоит из 2-х составляющих, одна из которых существенна на начальном участке, а вторая—характеризует поздние стадии затухания свечения. По тангенсу угла наклона полулогарифмической анаморфозы были определены значения констант скоростей спада свечения k_1 и k_2 для первой и второй составляющих. Экстраполяцией полулогарифмической анаморфозы начального участка кривой к нулевому моменту определялась относительная начальная интенсивность ФХЛ-1°.

Интенсивность сенсibilизированной ФХЛ в растворах аргиназы, обработанных БСИ, резко снижается (рис. 2). После инкубации раствора аргиназы с БСИ смесь облучали видимым светом в присутствии эозина в течение 5 мин и измеряли интенсивность возникающей при этом сенсibilизированной ФХЛ. Уже в первые 5—10 мин после начала взаимодействия с БСИ 1° составляет 30% от начальной величины, однако дальнейшее увеличение времени инкубации до 2-х часов почти не отражается на интенсивности ФХЛ (рис. 2). Значения констант скоростей снижения интенсивности ФХЛ— k_1 и k_2 , характеризующие форму кинетической кривой, после инкубации растворов аргиназы с БСИ не меняются, что свидетельствует о неизменности кинетики ФХЛ в исследуемых растворах.

Инактивация аргиназы при взаимодействии с БСИ происходит в основном также в начальной стадии—активность снижается на 50% (рис. 2), затем инактивация медленно продолжается и через 2 часа достигает 80%.

Увеличение концентрации БСИ приводит к снижению интенсивности сенсibilизированной ФХЛ растворов аргиназы. Зависимость отню-

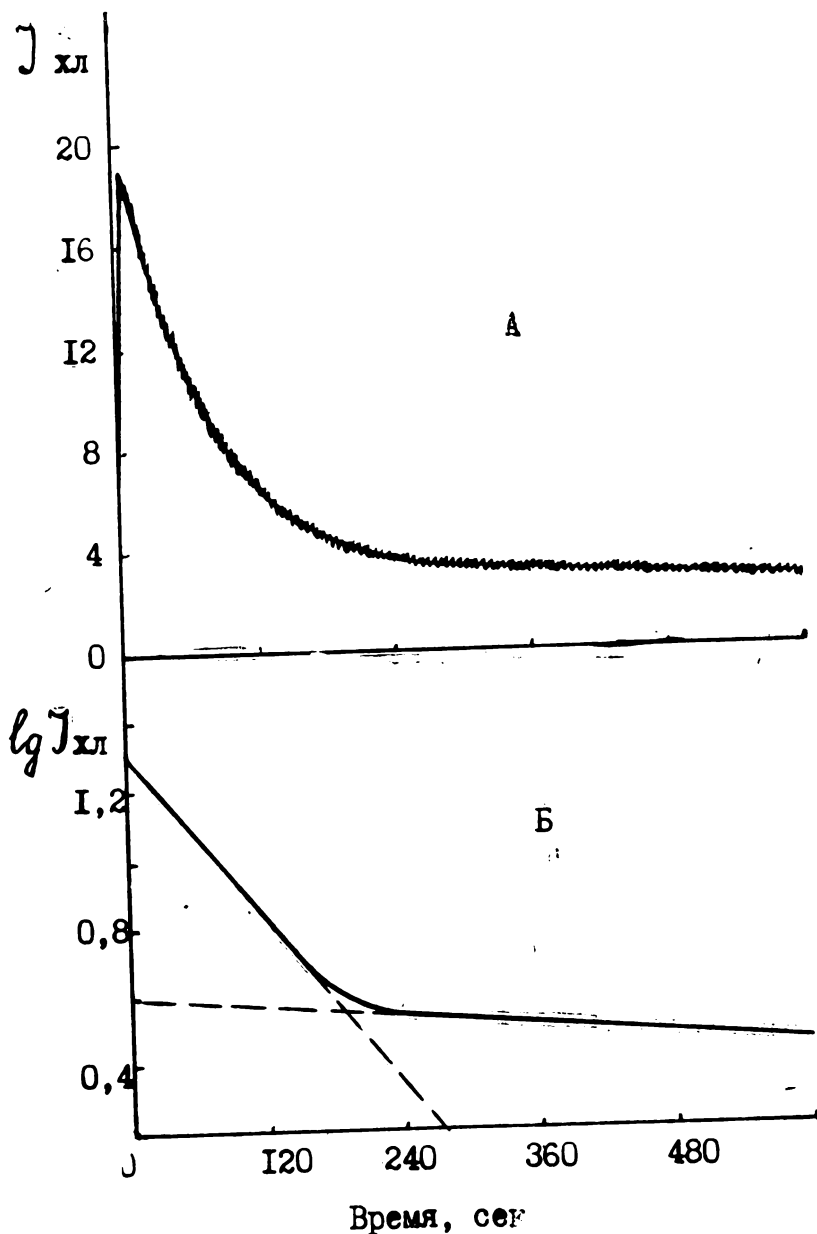


Рис. 1. Кинетическая кривая сенсibilизированной эозином фотохемилюминесценции растворов аргиназы при облучении в течение 5 мин (А) и ее полулогарифмическая анаморфоза (Б). $C_a = 4,2 \cdot 10^{-7} M$, $C_g = 3 \cdot 10^{-6} M$

сительной начальной интенсивности ФХЛ от концентрации БСИ приведена на рис. 3. При концентрации БСИ $1,2 \cdot 10^{-4} M$ I^0 снижается на 90%. Исследование спектров триптофановой ФЛ растворов аргиназы, обработанных БСИ, проведенное нами ранее [6], показало, что интенсивность ФЛ аргиназы в присутствии этого реагента значительно снижается и максимум смещается в коротковолновую область. Для сравнения с данными по ФХЛ зависимость относительной интенсивности триптофановой ФЛ растворов аргиназы в максимуме от концентрации БСИ приведена на рис. 3. Как видно из рисунка, скорости снижения интенсивности сенсibilизированной ФХЛ и триптофановой ФЛ в исследуемых растворах совпадают, что свидетельствует об идентичности получаемой этими

методами информации о скорости разрушения остатков триптофана в белке. Характер уменьшения активности аргиназы в зависимости от концентрации реагента несколько отличается от характера снижения интенсивности ФЛ и сенсibilизированной ФХЛ (рис. 3). Согласно на-

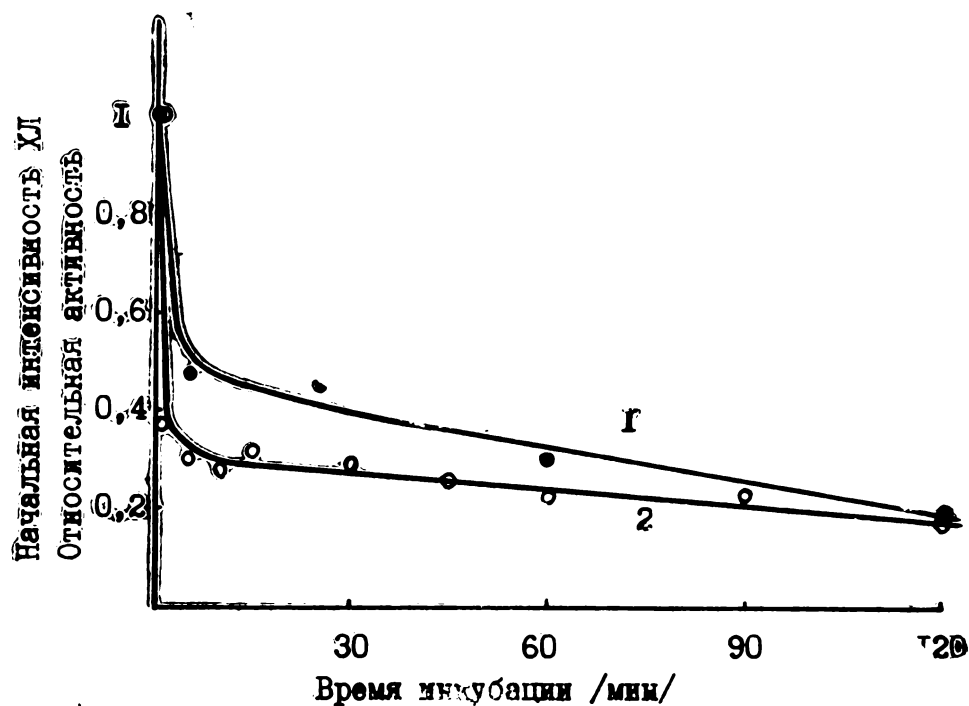


Рис. 2. Кинетика инaktivации (1) и снижения начальной интенсивности сенсibilизированной ФХЛ (2) растворов аргиназы при взаимодействии с БСИ. $C_a = 1,3 \cdot 10^{-6} M$, $C_{БСИ} = 1,25 \cdot 10^{-4} M$, $C_s 2,5 \cdot 10^{-6} M$

шему предположению, модифицирующиеся БСИ остатки триптофана не входят в состав активного центра фермента, и инaktivация при взаимодействии с БСИ является либо результатом косвенного влияния (путем нарушения нативной конформации при окислении триптофанилов), либо происходит благодаря химической модификации других, чувствительных к БСИ функциональных групп в аргиназе. Так как снижение интенсивности ФХЛ связано с разрушением триптофанилов, можно считать, что основная реакция модификации этих остатков в аргиназе происходит сразу после добавления реагентов — в первые 5–10 мин. Различие в кинетике инaktivации аргиназы и снижении интенсивности сенсibilизированной ФХЛ в зависимости от времен инкубации растворов аргиназы с БСИ указывает на важную роль модификации других чувствительных к реагенту функциональных групп в инaktivации фермента в данных условиях.

Были проведены опыты также в присутствии субстрата L-аргинина и двух ингибиторов аргиназы L-лизина и L-орнитина. Из рис. 3 видно, что аргинин и орнитин в одинаковой степени частично предохраняют остатки триптофана от разрушения при взаимодействии с БСИ, в то время как присутствие лизина не влияет на процесс модификации. Активность фермента в присутствии аргинина также частично сохраняется, что можно объяснить стабилизирующим влиянием субстрата на аргиназу.

Таким образом, совпадение кривых зависимостей интенсивности сенсibilизированной ФХЛ и ФЛ растворов аргиназы от концентрации реагента позволяет заключить, что уровень интенсивности сенсibilизированной ФХЛ связан с наличием остатков триптофана в белке, а сни-

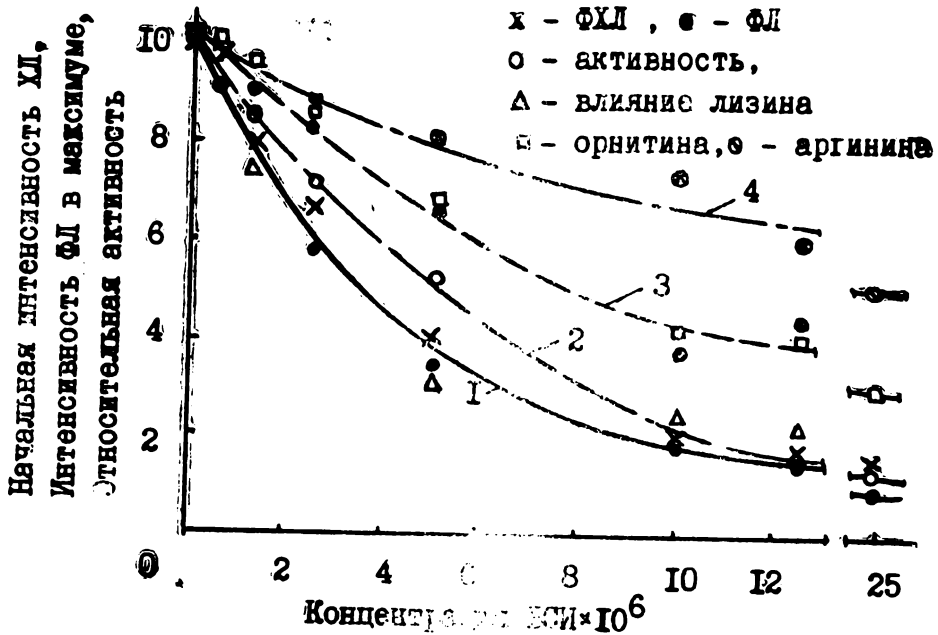


Рис. 3. Зависимость начальной интенсивности ФХЛ (1), интенсивности триптофановой ФЛ и относительной активности (2) растворов аргиназы от концентрации БСИ. Влияние аргинина на инактивацию (4), а также аргинина и лизина (3) на начальную интенсивность ФХЛ исследуемых растворов аргиназы.

жение начальной интенсивности ФХЛ отражает процесс убыли триптофанилов в аргиназе независимо от способа их разрушения. Исходя из вышесказанного, можно считать, что метод измерения интенсивности сенсibilизированной ФХЛ может быть использован для изучения кинетики разрушения триптофанилов в белках при различных воздействиях.

Кафедра биофизики ЕГУ

Поступила 28.02.1984

ЛИТЕРАТУРА

1. Сапежинский И. И. Исследования радиационных превращений в растворах белков методом хемилюминесценции.—В сб.: Молекулярная радиобиология, М.: Атомиздат, 1972, т. 3, с. 95—129.
2. Ширяев В. М. Изучение фотохемилюминесценции растворов белка: Автореферат канд. диссертации. М., 1972.
3. Ray W. J. Photochemical oxidation.—Methods in Enzymology, N-Y, London, Acad. press., 1967, v. 11, p. 490—497.
4. Ray W. J., Koshland D. E. A method for characterizing the Type and Number of Groups Involved in Enzyme action.—J. Biol. Chem., 1961, v. 236, № 7, p. 1973—1979.
5. Геворкян М. Л., Давтян М. А. Сенсibilизированное фотоокисление триптофанилов в аргиназе.— Биолог. ж. Армении, 1976, т. 29, № 3, с. 32—35.
6. Геворкян М. Л., Давтян М. А. Модификация аргиназы N-бромсукцинимидом.—Биолог. ж. Армении, 1979, т. 32, № 5, с. 435—441.
7. Spande T. F., Witcop B. W. Determination of the tryptophan content of proteins with N-bromosuccinimide.—Methods in Enzymology, N-Y, London: Acad. press., 1967, v. 11, p. 498—506.

