

УДК 577.155.3

Մ.Ա. ԴԱՎԿՅԱՆ, Մ.Լ. ԳԵՎՈՐԿՅԱՆ

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ АРГИНАЗЫ

Исследована роль остатков триптофана, тирозина, гистидина, цистина и свободных SH-групп в проявлении активности аргиназы. Методами химической модификации N-бромсукцинимидом и тетраэтилометаном, а также с помощью изучения влияния ультрафиолетового облучения на растворы аргиназы показано, что остатки триптофана и тирозина не входят в состав активного центра фермента, но участвуют, по-видимому, в поддержании нативной конформации аргиназы. Свободные SH-группы и дисульфидные связи не существенны для проявления активности фермента. Результаты изучения сенсibilизированного метиленовым синим фотоокисления аргиназы, а также ее модификация диэтилпироксикарбонатом позволяют заключить, что один из остатков гистидина, по-видимому, участвует в формировании активного центра аргиназы, возможно, играя определенную роль в процессах связывания субстрата.

Аргиназа – широко распространенный в живых организмах фермент, играющий важную роль во многих процессах метаболизма. Основной функцией ее считается участие в орнитинном цикле мочевины. Однако в ряде работ была обнаружена важная роль аргиназы во многих других процессах, происходящих в организме [1-3]. Аргиназы, выделенные из многих органов и тканей различных организмов, широко исследуются [4-6]. Однако имеющиеся на сегодня данные не дают представления о механизме действия этого фермента и строении его активного центра. Антиопухолевая активность аргиназы, обнаруженная некоторыми авторами [7,8], делает ее исследование особенно актуальным.

В настоящей работе сделана попытка ближе подойти к пониманию особенностей функционирования и строения активного центра аргиназы на примере фермента, выделенного из печени крупного рогатого скота. С этой целью мы исследовали роль ряда аминокислотных остатков (триптофана, тирозина, цистина, цистеина, гистидина) в проявлении активности и поддержании нативной конформации аргиназы с помощью методов химической модификации, сенсibilизированного фотоокисления и изучения влияния ультрафиолетового (УФ) облучения.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились на препарате аргиназы печени крупного рогатого скота фирмы Reanal (Венгрия), подвергнутом дополнительной очистке методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G - 200, уравновешенной 0,05 М глициновым буфером (рН 9,5). Элюирование проводилось тем же буфером при 4°C. Аргиназную активность определяли методом Ратнер [9] с некоторыми изменениями. Аргиназу инкубировали с L-аргинином в течение часа в присутствии 5 мкмоль $MnCl_2$ при 37°C при постоянном перемешивании. Образовавшаяся в ходе реакции мочевины определялась далее уреазным методом с последующим определением аммиака микродиффузионным методом Зелигсона в модификации Силаковой и согр. [10].

Измерение спектров флуоресценции (ФЛ) растворов аргиназы проводили на спектрофлуориметре MPF -2A (HITACHI) при длине волны возбуждения 297 нм.

Свободные SH-группы определяли путем спектрофотометрического титрования по методу Бойера [11].

Облучение УФ светом проводили в открытой термостатированной кювете при постоянном перемешивании растворов с помощью магнитной мешалки. Растворы аргиназы (5 мл, $6 \cdot 10^{-6} M$) в 0,05M глициновом буфере (pH 9,5) облучали ртутной лампой ПРК-4 на расстоянии 4 см от основания кюветы с помощью облучателя ОКУФ -5. Модификацию растворов аргиназы N-бромсукцинимидом (БСИ) проводили при комнатной температуре (20°C) при постоянном перемешивании растворов. Измеряли оптическую плотность растворов аргиназы при 280 нм до и после реакции, интенсивность флуоресценции и остаточную активность модифицированного фермента. Число модифицированных остатков триптофана определяли по формуле, приведенной в работе [12]. Обработку аргиназы тетранитрометаном (ТНМ) проводили при pH 8 (0,05 M фосфатный буфер). К раствору белка (2,8 мл, $4,2 \cdot 10^{-6} M$) добавляли 0,05 мл ТНМ, приготовленного перед употреблением на 100% этаноле. Смесь инкубировали при 20°C в течение часа, затем определяли активность и изменение оптической плотности при 428 нм, т.к. образующийся в ходе реакции 3-нитротирозин поглощает в этой области [13].

Фотоинактивация аргиназы в присутствии метиленового синего проводилась с помощью лампы накаливания (150 Вт) в термостатированной кювете при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Присутствие красителя в растворе без облучения не влияло на активность аргиназы. Модификацию растворов аргиназы диэтилпиروкарбонатом проводили также при комнатной температуре в течение 30 минут. По изменению оптической плотности растворов при 240 нм определяли количество модифицированных остатков гистидина, принимая молярный коэффициент поглощения карбтоксигистидина равным $3,2 \cdot 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ [14].

В работе использовали препараты парахлормеркурибензоата (ПХМБ), (Chemapol), тетранитрометана (Serva), диэтилпирокарбоната (ДПК), (Fluka), дитиотрептола (β -меркаптоэтанола), (Calbiochem), сефадекса G - 200 (Pharmacia), L-аргинина, L-лизина (Reanal). Остальные использованные препараты - отечественного производства с марками ХЧ или ЧДА.

Результаты и обсуждение. При облучении растворов аргиназы УФ светом наблюдается инактивация (рис. 1). Активность аргиназы в условиях эксперимента снижается экспоненциально с увеличением времени облучения ($K = 9,5 \cdot 10^{-5} сек^{-1}$). Это указывает на то, что инактивация, по-видимому, вызывается разрушением одного или нескольких однотипных аминокислотных остатков в молекуле фермента, существенных для проявления активности.

Как известно, при облучении растворов белков УФ светом происходит фотолиз остатков триптофана, цистина и в значительно меньшей степени - других ароматических аминокислот [15]. За процессом фотохимического разрушения остатков триптофана следили по изменению спектров ФЛ растворов аргиназы в ходе облучения (рис. 2). Максимум ФЛ растворов аргиназы находится в области 336 - 338 нм, что согласуется с литературными данными [16]. Из рис. 2 видно, что интенсивность ФЛ в растворах аргиназы в результате облучения снижается, а положение максимума остается неизменным. Можно полагать, что в данных условиях фотолизу подвергнутся поверхностные расположенные остатки триптофана аргиназы. Полулогарифмическая зависимость относительной интенсивности ФЛ в максимуме от времени облучения (рис. 1) имеет излом на начальном участке кривой, что характерно для многих белков [17]. Вначале, по-видимому, разрушаются более чувствительные к УФ облучению остатки триптофана, а затем лимитирующим становится более медленный процесс разрушения остатков триптофана с константой скорости $K_{об} = 9,2 \cdot 10^{-5} сек^{-1}$, что совпадает со значением константы инактивации фермента. Это указывает на то, что потеря активности при УФ облучении связана с фотолизом сравнительно медленно разрушающихся остатков триптофана.

Присутствие субстрата или конкурентного ингибитора L-лизина в растворе не влияет на скорость снижения интенсивности ФЛ в ходе облучения как и не отра-

жается на инактивации аргиназы в данных условиях (рис. 1). Инактивация, по-видимому, является результатом косвенного влияния, связанного либо со взаимодействием образующихся в ходе облучения активных продуктов фотолиза триптофанов с чувствительными функциональными группами белка, ответственными за проявление активности, либо с нарушением конформации активного центра аргиназы.

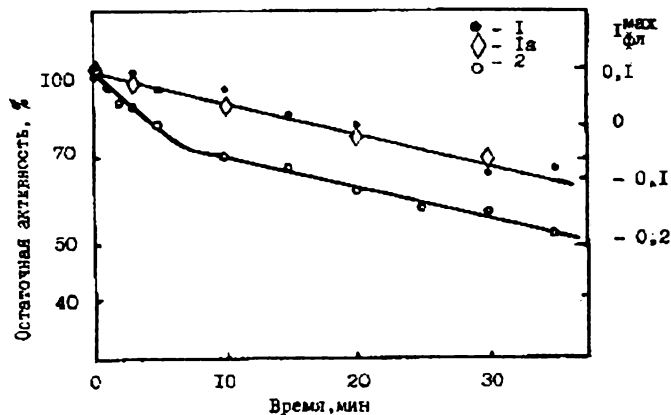


Рис. 1. Полулогарифмическая зависимость инактивации аргиназы (1) и флуоресценции остатков триптофана в максимуме (337 нм), (2) от времени облучения УФ светом (рН 9,5). Концентрация аргиназы в растворе - $6 \cdot 10^{-4} M$. (1а) - инактивация аргиназы в присутствии 12 мМ лизина в растворе.

Исследование остатков триптофана в аргиназе проводилось также методом химической модификации N-бромсукцинимидом [12]. Наиболее эффективно этот

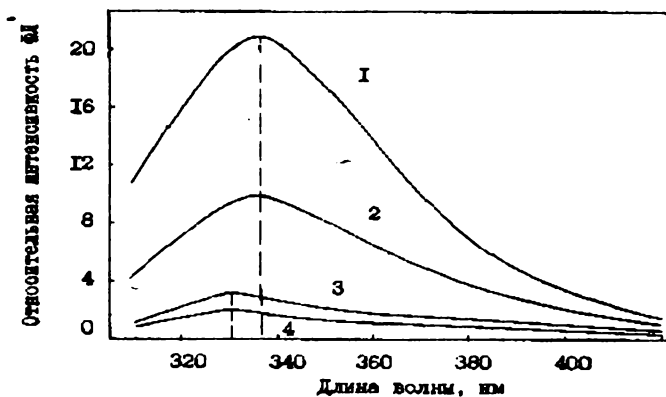


Рис. 2. Спектры флуоресценции растворов аргиназы до (1) и после (2) облучения УФ светом в течение 30 минут, а также после взаимодействия с БСИ. Концентрация БСИ в пробах: $3 \cdot 1,25 \cdot 10^{-4} M$, $4 \cdot 2,5 \cdot 10^{-4} M$. Длина волны возбуждения 297 нм.

реагент взаимодействует с белком в кислой среде. Однако аргиназа в этих условиях теряет нативную конформацию и активность. Наши эксперименты проводились при рН 9,5. Взаимодействие аргиназы с БСИ в этих условиях приводит к значительному снижению ферментативной активности. Определение числа модифицированных остатков триптофана, проведенное параллельно с определением остаточной актив-

ности аргиназы, показало, что модификация триптофанилов происходит в первые 15 минут, что и приводит к снижению активности. Учитывая, что БСИ в используемой концентрации может взаимодействовать и с некоторыми другими функциональными группами в белках [12], следует считать, что инактивация может быть связана с модификацией нескольких типов аминокислотных остатков в аргиназе. Исследование зависимости остаточной активности аргиназы и числа модифицированных остатков от концентрации БСИ показало, что (рис. 3) при модификации примерно 3-х остатков триптофана активность снижается на 50%, а дальнейшее увеличение концентрации БСИ отражается только на активности. В результате этого взаимодействия происходит значительное снижение интенсивности триптофановой ФЛ и смещение положения максимума в коротковолновую область (рис. 2) на 6-7нм. Это свидетельствует о том, что окисляющиеся остатки триптофана являются основными центрами ФЛ аргиназы и расположены в доступных для реагента участках макромолекулы.

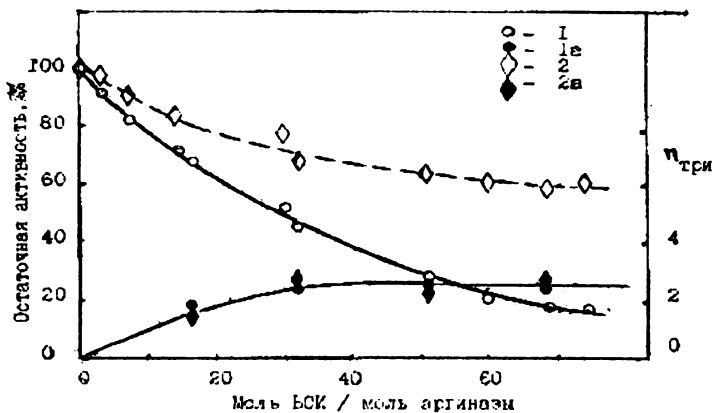


Рис. 3. Зависимость инактивации (1) и модификации остатков триптофана аргиназы (2) от концентрации N-бромсукцинимиды и влияние L-лизина на эти процессы (1а, 2а).

Учитывая, что исследуемый нами фермент содержит 10 остатков триптофана в молекуле [6], можно считать, что основная часть триптофанилов слабо флуоресцирует и расположена внутри молекулы аргиназы, оставаясь недоступной для реагента. В присутствии лизина в растворе ($2,6 \cdot 10^{-2} M$) число модифицированных остатков триптофана не меняется, однако наблюдается частичная защита фермента от инактивации (рис. 3). По-видимому, конкурентный ингибитор защищает от окисления другие важные для проявления активности функциональные группы, чувствительные к этому реагенту. Но даже в присутствии конкурентного ингибитора активность снижается на 30-35%. Можно предположить, что это происходит за счет модификации чувствительных к реагенту аминокислотных остатков, не входящих в состав активного центра, но участвующих в поддержании нативной конформации аргиназы.

Среди чувствительных к УФ облучению, а также к БСИ функциональных групп в белках находятся SH-группы и дисульфидные связи. С целью выявить их роль в активности фермента и возможного их вклада в процессы инактивации аргиназы при УФ облучении и взаимодействии с БСИ было проведено изучение влияния некоторых сульфгидрильных реагентов на аргиназу. Модификация SH-групп с помощью ПХМБ показала, что в исследуемом препарате аргиназы при pH 9,5 с этим реагентом взаимодействует около 3 SH-групп на моль фермента, а активность снижается только на 5-7%. Очевидно, доступные в данных условиях для реагента SH-группы не играют роли в проявлении активности этого фермента. Добавление дитиотрептола (ДТТ) или β -меркаптоэтанола (МЭ) при pH 9,5 не оказывает влияния

на активность. Отсутствие ингибирующего влияния этих соединений на активность аргиназы свидетельствует о том, что дисульфидные связи также не существенны для проявления активности этого фермента и поддержания его нативной конформации.

Модификация остатков тирозина в аргиназе с помощью тетранитрометана показала, что инактивация происходит только при использовании высоких концентраций реагента. В присутствии 70 мМ ТНМ в растворе при pH 8 в течение 30 мин активность аргиназы снижается на 50% и при этом модифицируется около 14 остатков тирозина. Учитывая, что молекула аргиназы содержит 35 остатков тирозина [6], можно заметить, что основная их часть остается во внутренних участках макромолекулы и недоступна для ТНМ. Снижение активности, по-видимому, является следствием нарушения конформации молекулы аргиназы, и остатки тирозина, очевидно, не участвуют в формировании активного центра этого фермента.

Роль остатков гистидина в проявлении активности аргиназы изучали с помощью метода сенситивизированного фотоокисления в присутствии метиленового синего. Фотоинактивация растворов аргиназы в условиях нашего эксперимента (pH 9,5) при концентрации метиленового синего $3 \cdot 10^{-5} M$ в растворе и в течение 30 минут облучения видимым светом составляет 90%. Конкурентные ингибиторы - лизин и орнитин в одинаковой мере частично предохраняют фермент от потери активности

*Влияние некоторых аминокислот на инактивацию аргиназы при облучении видимым светом в присутствии метиленового синего ($1,2 \cdot 10^{-5} M$).
Время облучения - 30 мин. концентрация аргиназы - $1,8 \cdot 10^{-6} M$.*

Аминокислота, 6,3 мМ	Остаточная активность, %
-	34
L-аргинин	71
L-лизин	72
L-орнитин	70
L-пролин	52
L-цистеин	50
L-аспарагиновая кислота	31

(табл.). Пролин, который по нашим данным [18] тоже является конкурентным ингибитором этого фермента, имеет более слабый защитный эффект. Отсутствие полной защиты от инактивации в присутствии этих соединений указывает на то, что кроме функциональных групп непосредственно активного центра фотоокислению подвергаются также и аминокислотные остатки, не защищенные ингибиторами, имеющие определенное значение для проявления активности. С ростом значений pH среды скорость инактивации возрастает. Однако характер кривой этой зависимости отличается от кривых аналогичных зависимостей, полученных для гистидина, а также некоторых ферментов, содержащих гистидин в активном центре [19,20]. В нашем случае при возрастании значений pH выше 8 инактивация также возрастает. Для более детального изучения роли остатков гистидина в аргиназе мы проводили исследование методом химической модификации ДПК. Как известно, этот реагент при pH 6 избирательно взаимодействует с остатками гистидина в белках [14]. Взаимодействие аргиназы с ДПК приводит к инактивации фермента. Однако в течение 30 мин инкубации с реагентом активность снижается только на 50%. Изучение кинетики инактивации аргиназы показало, что снижение активности происходит в основном в первые 5 минут (рис. 4), а дальнейшая инкубация слабо отражается на активности фермента. Остатки гистидина отличаются по скорости взаимодействия с ДПК. Часть из них быстро реагирует - в течение 1-2 минут. Согласно Кошланду [21], такая зависимость логарифма остаточной активности от времени инкубации с реагентом соответствует случаю, при котором молекула фермента не инактивируется полностью - происходит только снижение активности молекул аргиназы по сравне-

нию с нативными в результате модификации остатков гистидина. Зависимость инактивации от концентрации ДПК показала, что полной инактивации аргиназы в присутствии ДПК не происходит (рис. 5). Даже при использовании высоких концентраций реагента ($1,4 \cdot 10^{-3} M$) активность снижается на 50%.

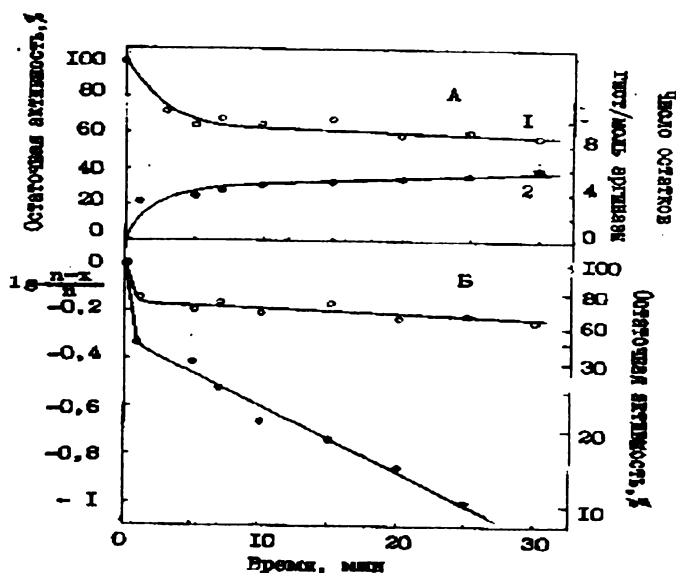


Рис.4. Кинетика инактивации (1) и модификации остатков гистидина (2) аргиназы ($4,2 \cdot 10^{-6} M$) при взаимодействии с ДПК ($1,45 \cdot 10^{-4} M$). Данные рис. А представлены на рис. Б в виде полулогарифмической зависимости остаточной активности и доли непрореагировавших к данному моменту времени остатков гистидина $\frac{n-x}{n}$, где n - максима-

льное число взаимодействующих с ДПК остатков гистидина, принятое равным 6; x - число остатков гистидина, модифицированных к моменту времени t .

Такие данные позволяют предположить, что непосредственно в каталитическом акте реакции эти аминокислотные остатки участия не принимают. С инактивацией, очевидно, связаны только наиболее чувствительные к реагенту остатки гистидина. На рис. 5 Б приведена зависимость между числом модифицированных остатков и остаточной активностью аргиназы. Экстраполяция начального наклона кривой к оси абсцисс показывает, что инактивация связана с образованием двух карбэтоксигистидилов. Остальные взаимодействующие с ДПК остатки гистидина, видимо, удалены от активного центра, так как их модификация не отражается на активности. Конкурентный ингибитор частично защищает фермент от инактивации, уменьшая так же число модифицирующихся остатков. При низких концентрациях ДПК, когда взаимодействуют наиболее реакционноспособные остатки, ингибитор защищает фермент от инактивации почти полностью, и при этом модифицируется около 1,3 остатка гистидина на моль фермента. В свободном ферменте в этих же условиях модифицируется около 2,2 остатка гистидина на моль аргиназы при снижении активности на 45%. По-видимому, ингибитор предохраняет один остаток гистидина от взаимодействия с реагентом. Этот остаток, очевидно, и играет роль в проявлении активности аргиназы, участвуя, возможно, в процессах связывания субстрата. Величина K_m модифицированного ДПК фермента увеличивается с 5,6 мМ до 12,5 мМ, а величина V_{max} при этом не меняется, что указывает на конкурентный характер ингибирования аргиназы диэтилпирокарбонатом.

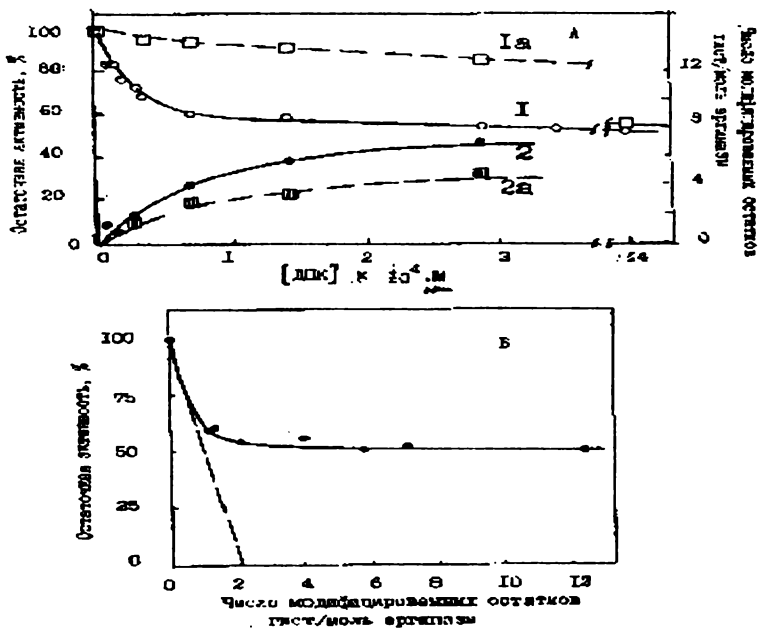


Рис. 5. А. Зависимость инактивации (1) и модификации остатков гистидина аргиназы (2) от концентрации ДПК и влияние лизина на эти процессы (1а, 2а). Б. Зависимость инактивации аргиназы от числа модифицированных остатков гистидина аргиназы.

Таким образом, остаток модифицируемый этим реагентом, принимает участие в формировании активного центра аргиназы или находится в непосредственной близости от него.

Полученные данные позволяют наметить дальнейшие пути в исследовании строения активного центра этого фермента.

Кафедра биохимии, лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии

Поступила 7.10.1996

ЛИТЕРАТУРА

1. Grazi E., Sangiorgi G., *Experientia*, 1971, v. 27, N03, p. 255.
2. Yip M.C., Knox W.E., *Biochem. J.*, 1972, v. 127, N05, 893.
3. Kaysen G.A., Strecker H.J., *Biochem. J.*, 1973, v. 133, N04, p. 779.
4. Greenberg D.M., Bagot A.E., Roholt O.A., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, v. 62, N02, p. 446.
5. Dahlig E., Porembska Z., *Acta biochim. polon.*, 1977, v. 24, N03, p. 187.
6. Harrel D., Sokolovsky M., *Eur. J. Biochem.*, 1972, v. 25, N01, p. 102.
7. Storr J.M., Burton A.F., *Brit. J. Cancer.*, 1974, v. 30, N01, p. 50.
8. Scallan C., Clines M., Jiyye P., *Biochem. Soc. Trans.*, 1981, v. 9, N04, p. 317.
9. Ratner S., *Methods in enzymol.*, 1955, v. 2, p. 356.
10. Силакова А.И., Труш Г.П., Являикова А., *Вопр. мед. химии*, 1962, т. 8, N05, с. 538.
11. Boyer P.D., *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, v. 76, N017, p. 4331.
12. Spande T.F., Witcop B.W., *Methods in enzymol.*, 1967, v. 11, p. 498.
13. Sokolovsky M., Riordan J.F., Walee B.L., *Biochemistry*, 1966, v. 5, N011, p. 3582.
14. Ovadi J., Libor S., Elödi P., *Acta Biochim. Acad. Sci. Hung.*, 1968, v. 2, N04, p. 455.
15. Владимиров Ю.А., Рошупкин Д.И., Фесенко Е.Е., *Биофизика*, 1970, т. 15, N02, 254.
16. Веденкина Н.С., Бурштейн Э.А., *Молек. биол.*, 1970, т. 4, N05, 743.
17. Калабухова Т.Н., Кондакова Н.В., Эйбус Л.Х., *Молек. биол.*, 1973, т. 7, N06, 829.
18. Давтян М.А., Геноркян М.Л., *Биол. ж. Армении*, 1989, т. 42, N01, 47.
19. Кочетов Г.А. Кобылянская К.Р., *Биохимия*, 1970, т. 35, N01, 3.

20. Danson M.J., Weltzman P., David J., Biochem. J., 1973, v.135, N03, p.513.
21. Ray W.J., Koshland D.E., J. Biol. Chem., 1961, v. 236, N07, p.1973.

Մ.Ա. ԳԱՎԹՅԱՆ, Մ.Լ. ԳՆՎՈՐԳՅԱՆ

**ԱՐԳԻՆԱՋԻ ՈՐՈՇ ԱՄԻՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ՄՆԱՑՈՐԳՆԵՐԻ
ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ԴԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ**

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Ուսումնասիրվել է տրիպտոֆանի, թիրոզինի, հիստիդինի, ցիստինի և ցլխտեինի դերը արգինազի ակտիվության մեջ: Քլոմիական մոլիֆիկացիայի և ուլտրամանուշակագույն ճառագայթման մեթոդների օգնությամբ ցույց է տրված, որ տրիպտոֆանի և թիրոզինի մնացորդները մասնակցում են, հավանաբար, արգինազի նատիվ կոնֆորմացիայի պահպանման գործին: Ցիստինը և ցլխտեինը դեր չեն խաղում ֆերմենտի ակտիվության մեջ:

Մենսլբիլիզացված ֆոտոօքսիդացման, ինչպես նաև դիէթիլպիրոկարբոնատով քիմիական մոդիֆիկացիայի եղանակներով ցույց է տրված, որ հիստիդինի մնացորդներից մեկը մասնակցում է արգինազի ակտիվ կենտրոնի կազմավորմանը, կարևոր դեր խաղալով, հավանաբար, սուբստրատի և ֆերմենտի կապակցման պլազեսների մեջ: