

М. Л. ГЕВОРКЯН, А. Е. ЗАКАРЯН, М. А. ДАВТЯН

О ФОТОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ АРГИНАЗЫ

Изучалась фотохемилюминесценция (ФХЛ) растворов аргиназы параллельно с определением ее фоточувствительности при действии УФ-облучения. Исследована зависимость интенсивности ФХЛ от времени облучения. Определены константа скорости спада начальной интенсивности ФХЛ и константа скорости снижения ферментативной активности в данных условиях. Установлена связь между процессами, приводящими к фотохемилюминесценции, и инактивацией фермента.

Хемилюминесценция, возникающая в растворах белков при действии УФ-облучения, была обнаружена сравнительно недавно [2, 14]. Как показали дальнейшие исследования, фотохемилюминесценция имеет свободнорадикальную природу и связана с наличием кислорода при облучении [8]. В настоящее время установлен механизм процессов, приводящих к послесвечению, состоящий из ряда стадий, в ходе которых происходят образование, превращение и гибель перекисных свободных радикалов [9]. Показано, что остатки триптофана в молекуле белка играют важную роль в процессах возникновения хемилюминесценции, а образование свободных радикалов связано с разрушением триптофанилов [10].

Остаткам триптофана принадлежит важная роль также в процессах фотоинактивации белков. Известно, что при действии УФ-облучения на растворы белков происходит фотолиз остатков триптофана, цистина и в значительно меньшей степени тирозина и фенилаланина. Фотохимическое разрушение этих аминокислотных остатков вызывает изменение нативной структуры белков, что и приводит к инактивации [1, 4]. Причем, инактивация вызывается фотолизом не любых, а только определенных остатков этих аминокислот. Показано, что для инактивации одних остатков существенно разрушение цистина [17], для других— триптофанила, для третьих— триптофанила и цистина [6, 7, 15, 16].

Таким образом, изучение процессов фотохемилюминесценции может дать ценные сведения не только о свободнорадикальных превращениях белков в растворе, но и, возможно, о механизмах их инактивации при УФ-облучении. В связи с этим представляет интерес изучение фотохемилюминесценции одновременно с определением фоточувствительности растворов ферментов. В данной работе проводилось параллельное изучение ФХЛ и изменения ферментативной активности растворов аргиназы при действии УФ-облучения.

Материал и методика. В работе использовались препараты аргиназы и сывороточного альбумина человека (САЧ) фирмы «Реанал», Венгрия. Растворы белка в концентрации 0,13% готовились на 0,01 М глициновом буфере при pH 9,5. Пробы (по 5 мл) облучались в стеклянной термостатированной кювете ($t=25^\circ$) при постоянном перемешивании. После облучения в течение 3—4 сек раствор перекачивался в измерительную кювету, расположенную перед фотокатодом фотоумножителя ФЭУ-42. Сигнал усиливался с помощью усилителя УШ-10, и кривые хемилюминесценции записывались на электронном самопишущем потенциометре ЭПП-09. Питание фотоумножителя осуществлялось через высоковольтный стабилизированный выпрямитель ВСВ-2. Облучение производилось полным светом ртутной лампы ПРК-4 с помощью облучателя ОКУФ-5 м.

Определение аргиназной активности проводилось по методу Ратнер с небольшими изменениями [18]. Аргиназу инкубировали с L-аргинином в течение часа. Образовавшаяся при этом мочевина определялась уреазным методом с последующим определением аммиака микродиффузионным методом. Зелингсона в модификации Силаковой и сотр. [13].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведена кинетическая кривая ФХЛ раствора аргиназы после двухминутного облучения и ее полулогарифмическая анаморфоза. Как видно из рисунка, интенсивность фотохемилюминесценции монотонно убывает, однако кривая имеет сложную форму. Она может быть представлена как сумма двух экспонент. Первая составляющая существенна на начальном участке кривой (до 100 сек), далее основной вклад в свечение вносит вторая составляющая. Экстраполяцией полулогарифмической анаморфозы к начальному моменту определялась начальная интенсивность ФХЛ — I^0 . По тангенсу угла наклона прямой за первые 100 сек определялась константа скорости спада свечения на начальном участке — k_1 , а из наклона прямой на поздних стадиях затухания свечения определялась константа скорости спада свечения для второй составляющей — k_2 . Для приведенной кривой значения k_1 и k_2 составляют соответственно $3,9 \cdot 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$ и $2,1 \cdot 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$. На рис. 1а для сравнения приведена также кинетическая кривая ФХЛ раствора САЧ.

Нами была изучена зависимость интенсивности ФХЛ растворов аргиназы от продолжительности облучения. На рис. 2 представлена кривая зависимости относительной начальной интенсивности ФХЛ ($I_{\text{отн}}^0$) и значений $\lg I_{\text{отн}}^0$ от времени облучения. Из рис. видно, что начальная интенсивность ФХЛ с увеличением времени облучения резко возрастает (до 3 мин), проходит через максимум, затем монотонно убывает. Константы скоростей спада свечения k_1 и k_2 , характеризующие форму кривой, с увеличением времени облучения почти не меняются. Такая неизменность кинетики процессов послесвечения свидетельствует об отсутствии существенных конформационных изменений белковой молекулы [5].

На возрастающем участке кривая может быть охарактеризована эффективной константой скорости, как это имеет место для соответствующих кривых, полученных в опытах с растворами сывороточного альбумина [12]. В координатах $2,3 \lg (1 - I^0/I_{\text{max}}^0) - t$ участок кривой до 2,5 мин удовлетворительно описывается линейной зависимостью с кон-

стантой скорости $K_{эфф} = 7,8 \cdot 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$ (рис. 3). Характер снижения относительной начальной интенсивности на спадающем участке кривой (рис. 2) экспоненциален с константой скорости $K_{хл} = 0,91 \cdot 10^{-1} \text{ сек}^{-1}$.

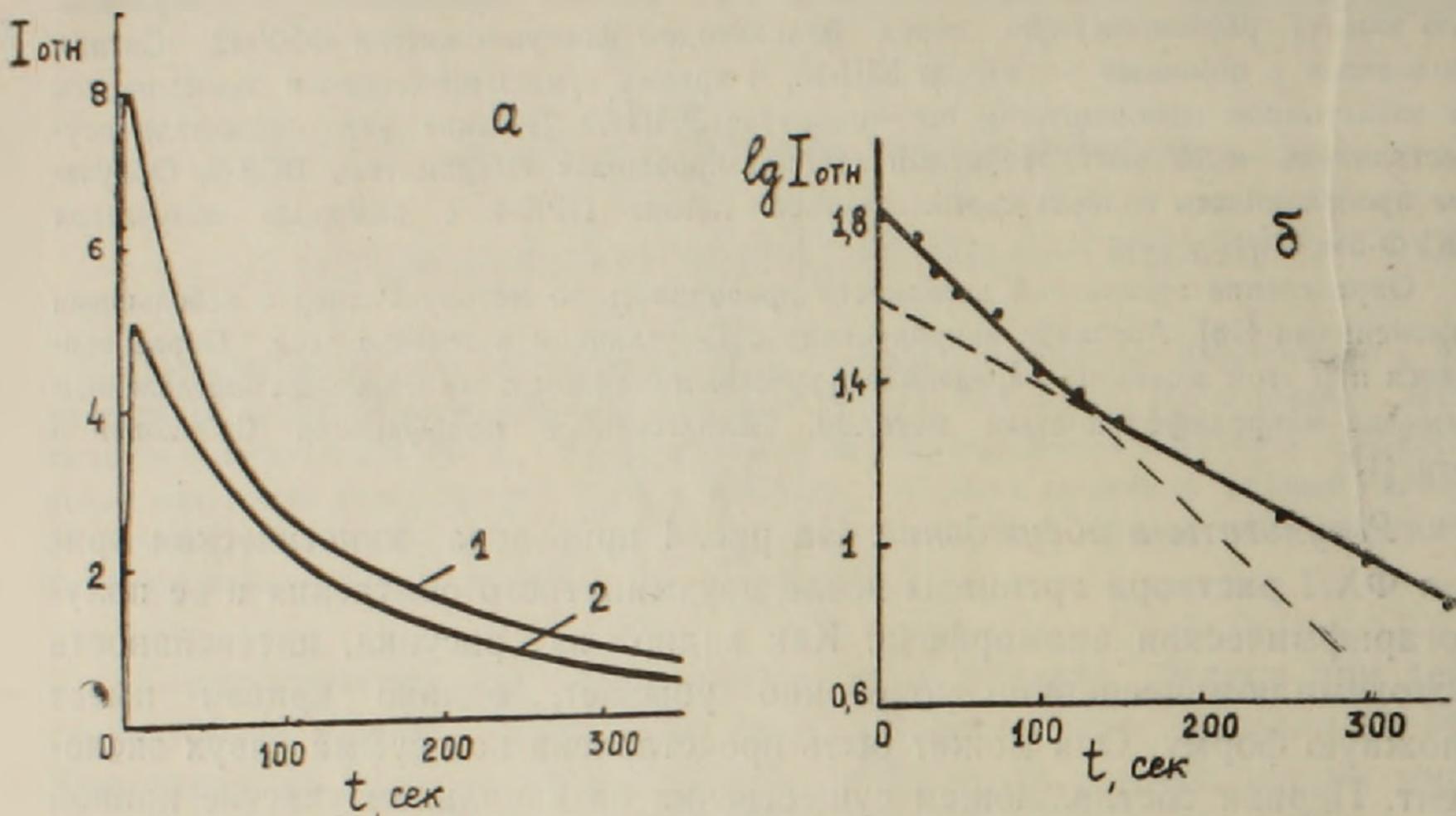


Рис. 1. Кинетическая кривая фотохемилюминесценции аргиназы (а, 1) и ее полулогарифмическая анаморфоза (б), а, 2—кинетическая кривая ФХЛ САЧ $C_a = 0,13\%$ ($\sim 1 \cdot 10^{-5} \text{ М}$), $C_{САЧ} = 0,068\%$ ($1 \cdot 10^{-5} \text{ М}$).

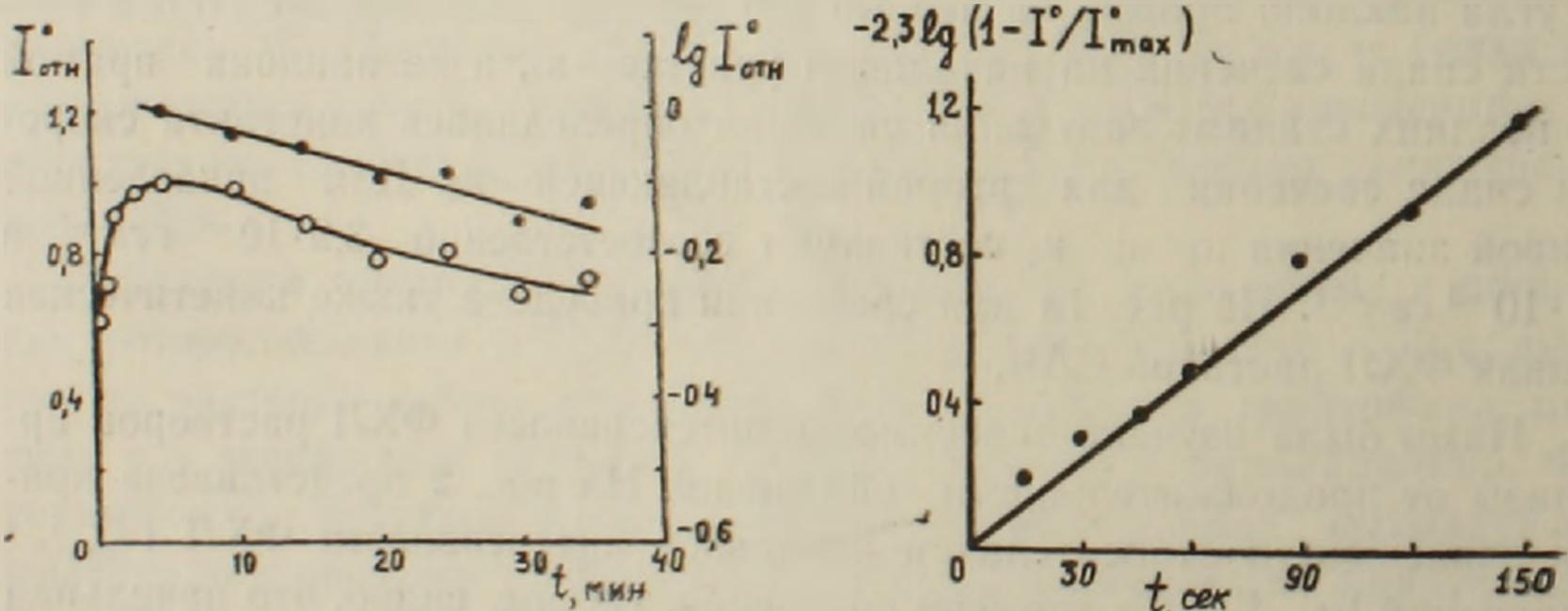


Рис. 2.

Рис. 2. Кривая зависимости относительной начальной интенсивности ФХЛ аргиназы от времени облучения и ее анаморфоза.

Рис. 3.

Рис. 3. Анаморфоза кривой нарастания начальной интенсивности ФХЛ.

Такой ход зависимости $I_{отн}^0$ от времени облучения хорошо согласуется с литературными данными, полученными в аналогичных экспериментах на растворах других белков [10—12]. Отличия в значениях определяемых величин связаны как со специфичностью молекулы аргиназы, так и, очевидно, с различиями в условиях экспериментов (состав буфера, рН среды, интенсивность облучения). В работе [10] проводилось исследование ФХЛ на примере бычьего сывороточного альбумина параллельно с измерением флуоресценции облученных растворов белка. Бы-

до показано, что снижение начальной интенсивности фотохемилюминесценции при увеличении времени облучения связано с расходом остатков триптофана в молекуле белка. Принимая во внимание общность механизма действия облучения на растворы белков, можно полагать, что и в наших экспериментах аналогичное снижение интенсивности ФХЛ вызвано убылью остатков триптофана в молекуле аргиназы.

Параллельно с измерением фотохемилюминесценции нами было проведено определение аргиназной активности в облученных растворах фермента. На рис. 4 приведена кривая зависимости относительной активности аргиназы (V) от времени облучения и ее полулогарифмическая анаморфоза. Из рис. явствует, что с увеличением времени облуче-

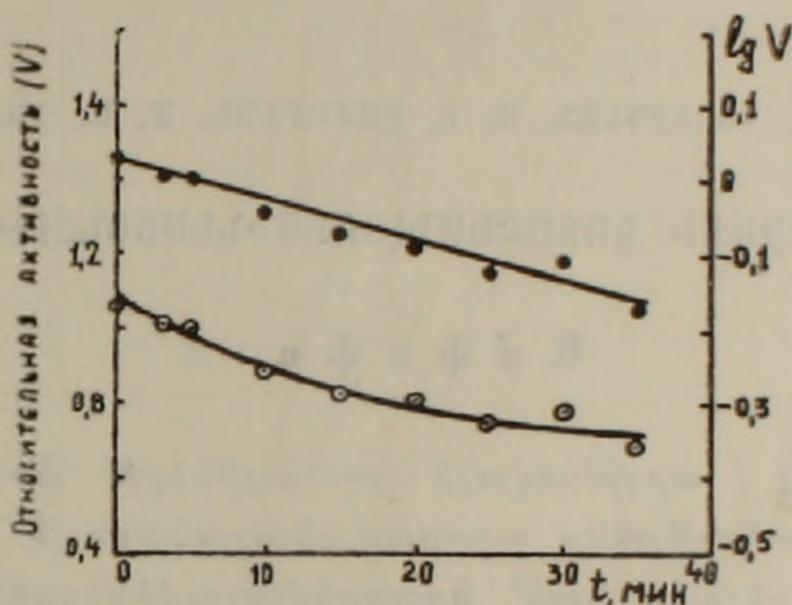


Рис. 4. Кривая зависимости относительной активности аргиназы от времени облучения и ее анаморфоза.

ния относительная активность фермента уменьшается и при 30 мин составляет 65% от начальной. Эта кривая также имеет экспоненциальный характер, а константа скорости снижения активности равна $K_d = 0,88 \cdot 10^{-4} \text{сек}^{-1}$, что практически совпадает со значением константы скорости спада начальной интенсивности ФХЛ. Совпадение значений этих величин может свидетельствовать о связи между процессами, приводящими к фотохемилюминесценции, и инактивацией фермента. Учитывая, что снижение начальной интенсивности ФХЛ связано с расходом триптофанилов, на основании совпадения значений этих констант можно отметить, что распад остатков триптофана с образованием свободных радикалов является, по-видимому, одной из основных причин, приводящих к потере активности аргиназы в данных условиях.

Нельзя исключить однако возможный вклад в процессы инактивации остатков цистина, разрушение которого при УФ-облучении аргиназы исследовалось в работе Конева с соавт. [3].

Представляет интерес вопрос, входят ли остатки триптофана в состав активного центра фермента, или они участвуют в поддержании нативной структуры молекулы аргиназы. В литературе имеются сведения пока лишь относительно гетерогенности триптофанилов в аргиназе (фоточувствительные и нефоточувствительные формы) [3]. Однако вопрос о том, распад каких именно остатков триптофана существенен для инак-

тивации аргиназы остается неясным. Для выяснения этих вопросов требуются дополнительные исследования.

На основании вышесказанного можно заключить, что дальнейшее изучение процессов фотохемилюминесценции позволит получить новые сведения о процессах, происходящих в молекулах ферментов при УФ-облучении, о механизмах их инактивации, а также о роли отдельных аминокислотных остатков в этих процессах.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии,
лаборатория сравнительной
и эволюционной биохимии

Поступило 26.VII 1973 г.

Մ. Լ. ԳԵՎՈՐԿՅԱՆ, Ա. Ե. ԶԱԿԱՐՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ՖՈՏՈՔԵՄԻԼՅՈՒՄԻՆԵՍԵՆՑԻԱՅԻ ՇՈՒՐՋ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է արգինազայի լուծույթների ֆոտոքեմիլյումինեսցենցիան և ֆոտոզգայունությունը ուլտրամանուշակագույն ճառագայթների ազդեցության ներքո, ինչպես նաև՝ ֆոտոքեմիլյումինեսցենցիայի ինտենսիվության կախվածությունը ճառագայթման տևողությունից: Պարզվել է, որ սկզբնական ինտենսիվության անկման արագության հաստատունը համընկնում է ֆերմենտատիվ ակտիվության անկման արագության հաստատունի հետ: Փորձերի տվյալներից հանգել ենք այն եզրակացություն, որ տրիպտոֆանի մնացորդների քայքայումը ազատ ռադիկալների առաջացման ճանապարհով կարող է տվյալ պայմաններում հանդիսանալ արգինազայի ինակտիվացման գլխավոր պատճառներից մեկը: Ենթադրվում է, որ ֆոտոքեմիլյումինեսցենցիայի պրոցեսների հետագա ուսումնասիրությունները հնարավորություն կտան նոր տեղեկություններ ստանալու ոչ միայն ազատ ռադիկալային փոխարկումների, այլև ֆերմենտների ինակտիվացման մեխանիզմների մասին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Владимирюв Ю. А., Роцупкин Д. И., Фесенко Е. Е. Биофизика, 15, 2, 254, 1970.
2. Конев С. В., Катибников М. А. Биофизика, 6, 6, 638, 1961.
3. Конев С. В., Воскресенская Л. Г., Волотовский И. Д., Шейко М. М. ДАН БССР, 15, 12, 1133, 1971.
4. Конев С. В., Волотовский И. Д. Введение в молекулярную фотобиологию, Минск, 1971.
5. Нисенбаум Г. Д. и др. Биофизика, 13, 138, 1968.
6. Перрасе Н. И. и др. Биофизика, 13, 1, 24, 1968.
7. Перрасе Н. И. Автореф. канд. дисс., М., 1967.
8. Сапезинский И. И. и др. Биофизика, 10, 3, 429, 1965.
9. Сапезинский И. И. ДАН СССР, 175, 5, 1167, 1967.
11. Сапезинский И. И. Химия высоких энергий, 3, 325, 1969.

12. Сапежинский И. И., Силаев Ю. В. Биопфизика, 12, 1, 38, 1967.
13. Силакова А. И., Труш Г. П., Явилякова А. Вопросы мед. химии, 8, 5, 538, 1962.
14. Herberg R. J. Science, 128, 3317, 199, 1958.
15. Grossweiner L. Y. Usui J., Photochem. and Photobiol. 13, 3, 195, 1971.
16. Ghiron C. A., Sellers D. R. Photochem. and Photobiol. 12, 5, 433, 1970.
17. Rathinasamy T. K., Augenstein L. G. Biophys. J., 8, 11, 1275, 1968.
18. Ratner S., Morell H. and Carvalho E. Arch. Biochem. Biophys., 91 280, 1960.