

М. Л. ГЕВОРКЯН, М. А. ДАВТЯН

СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ФОТООКИСЛЕНИЕ ТРИПТОФАНИЛОВ В АРГИНАЗЕ

Исследовали сенсibilизированное эозином фотоокисление остатков триптофана в аргиназе методами измерения интенсивности флуоресценции облученных растворов и интенсивности сенсibilизированной фотохемилюминесценции. Показано, что разрушающиеся остатки триптофана не существенны для проявления активности фермента.

Фотонактивация растворов ферментов при облучении видимым светом в присутствии сенсibilизатора является одним из распространенных методов, используемых для идентификации важных для активности ферментов аминокислотных остатков. Наиболее чувствительными к фотоокислению остатками в молекулах белков являются остатки триптофана, гистидина, тирозина, цистеина и метионина [10—13]. Один из красителей, применяемых для сенсibilизации,—эозин—использовался для изучения механизма фотодинамического эффекта в растворах таких ферментов, как пепсин, трипсин, лизоцим и др. [2, 7, 8].

В отношении изучаемого нами фермента—аргиназы—вопрос об аминокислотных остатках, существенных для активности фермента, еще не исследован. Наши [1], а также некоторые литературные данные [3] позволяют предположить, что в активности аргиназы немало важную роль могут играть остатки триптофана. В связи с этим в настоящей работе проводилось исследование сенсibilизированного эозином фотоокисления триптофанилов в аргиназе.

Материал и методика. В работе использовались препараты аргиназы (Германия), эозина желтоватого, L-аргинина и L-лизина отечественного производства. Растворы белка готовились на 0,05 М глициновом буфере (рН 9,5) в концентрации 0,3 мг/мл. К 3 мл раствора фермента в открытой кювете диаметром 3,5 см добавляли 1 мл водного раствора красителя ($1,25 \cdot 10^{-5}$ М). Смесь облучалась видимым светом ртутной лампы ПРК-4 на расстоянии 6 см от основания кюветы при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Опыты проводились при комнатной температуре ($t=20^\circ\text{C}$).

Измерение интенсивности флуоресценции (ФЛ) растворов аргиназы проводилось на спектрофлуориметре MPS-2A (HITACHI) при длине волны возбуждения 297 нм. Перед измерением ФЛ пробы исследуемых растворов разбавлялись в 10 раз.

Интенсивность фотохемилюминесценции (ФХЛ) измерялась на установке для регистрации хемилюминесценции, описанной нами ранее [1].

Аргиназная активность определялась по методу Ратнер [9] с небольшими изменениями. Аргиназа с L-аргином инкубировалась в течение часа. Образовавшаяся мочевина определялась уреазным методом с последующим определением аммиака микродиффузионным методом Зелингсера в модификации Силаковой и соотр. [4]. В присутствии эозина раствор аргиназы имел такую же активность, как и без него.

Проводилось также измерение спектров поглощения растворов эозина с аргиназой (спектрофотометр СФ-4А). Изменений в спектре поглощения раствора красителя в присутствии аргиназы не наблюдалось.

Результаты и обсуждение. Как показали результаты опытов, в ходе облучения происходит сенсибилизированное фотоокисление остатков триптофана в аргиназе. Этот процесс исследовался нами как с помощью измерения интенсивности ФЛ в облученных растворах, так и методом измерения ФХЛ.

Интенсивность и положение максимума триптофановой флуоресценции растворов аргиназы в присутствии эозина не меняется. В облученных растворах интенсивность ФЛ снижается. На рисунке приведена зависимость интенсивности ФЛ в максимуме (336—338 нм) от времени облучения растворов аргиназы с эозином. Эта зависимость носит экспоненциальный характер ($K_T = 1,6 \cdot 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$), и при 40-минутном облучении интенсивность ФЛ снижается на 50%.

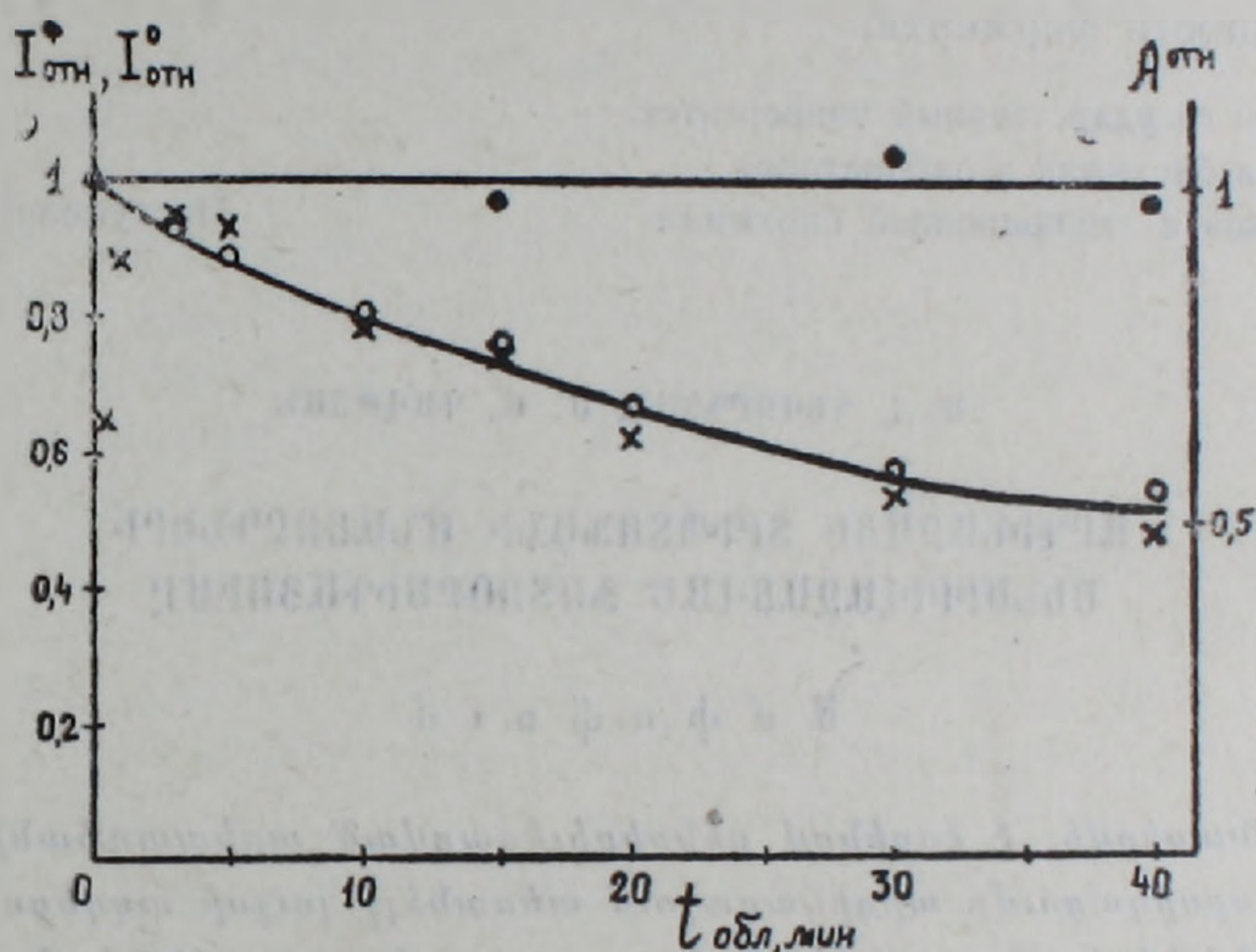


Рис. Зависимость относительной интенсивности ФЛ (о), относительной начальной интенсивности ФХЛ (х) и относительной активности растворов аргиназы (●) от времени облучения.

Сенсибилизированная эозином фотохемилюминесценция растворов белков изучалась некоторыми авторами [5, 6]. Нами были получены кинетические кривые сенсибилизированной ФХЛ растворов аргиназы. Они имеют двустадийный характер. На начальном участке наблюдается резкое падение интенсивности ФХЛ, затем скорость затухания свечения снижается. Форма кинетических кривых при увеличении продолжительности облучения почти не меняется. Экстраполяцией полулогарифмической анаморфозы начального участка кинетических кривых определялась начальная интенсивность ФХЛ — $I_{\text{отн}}^0$. Зависимость $I_{\text{отн}}^0$ от времени облучения (рис.) имеет обычный вид — вначале идет резкое нарастание интенсивности ФХЛ, затем она проходит через максимум и медленно снижается. Как видно из рис., скорость снижения стационарной интенсивности ФХЛ совпадает со скоростью падения интенсивности ФЛ в облученных растворах аргиназы, т. е. спад интенсивности сенсибилизированной ФХЛ связан с уменьшением скорости образования радикалов

за счет фотохимического разрушения триптофанилов в аргиназе, что уже было показано на примере трипсина [6].

Добавление субстрата L-аргинина или конкурентного ингибитора—L-лизина не влияет на скорость фотолиза триптофанилов и другие характеристики ФЛ и ФХЛ.

В облученных растворах проводилось определение аргиназной активности (рис.). В ходе облучения в данных условиях активность фермента не меняется. Таким образом, сенсibilизированное фотоокисление остатков триптофана в аргиназе, происходящее с образованием свободных радикалов, не отражается на активности фермента. Подвергающиеся фотоокислению в данных условиях, по-видимому, поверхностно расположенные остатки триптофана, не существенны для проявления активности фермента.

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

Поступило 23.XII 1975 г.

Մ. Լ. ԳԵՎՈՐԴՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ՏՐԻՊՏՈՖԱՆԻ ՄՆԱՑՈՐԴՆԵՐԻ ՍԵՆՍԻԲԻԼԱԶԱՑՎԱԾ ՖՈՏՈՔՍԻՏԻԱՑՈՒՄԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է էոզինով սենսիբիլիզացված տրիպտոֆանի մնացորդների ֆոտոքսիդացումը արգինազայում տեսանելի լույսի ազդեցության տակ: Տրիպտոֆանիլների ֆոտոքսիմիական քայքայումը որոշվել է ճառագայթված լուծույթներում ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության իջեցմամբ: Չափվել է նաև արգինազայի լուծույթների սենսիբիլիզացված ֆոտոքսիմիզմինեսցենցիան: Ցույց է տրված, որ տրիպտոֆանիլների քայքայումը տվյալ պայմաններում չի անդրադառնում ֆերմենտի ակտիվության վրա, հետևաբար, քայքայման ենթարկվող տրիպտոֆանի մնացորդները դեր չեն խաղում ֆերմենտի ակտիվության մեջ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Геворкян М. Л., Закарян А. Е., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, 27, 9, 1974.
2. Кондакова Н. В., Эйдус Л. Х. Сб. Молекулярная биофизика, М., 217, 1965.
3. Конев С. В., Воскресенская Л. Г., Вологовский И. Д., Шейко М. М. ДАН БССР, 15, 12, 1133, 1971.
4. Силакова А. И., Труш Г. П., Явилякова А. Вопросы мед. химии, 8, 5, 538, 1962.
5. Ширяев В. М. и др. Сб. Тез. симп. МОИП. Сверхслабые свечения в биологии, 68, М., 1969.
6. Ширяев В. М. Автореф. канд. дисс., М., 1972.
7. Hopkins T. R., Spikes J. D. Radiat. Rec., 53, 2, 315, 1973.
8. Kepka A. G., Grossweiner L. J. Photochem. and Photobiol. 18, 1, 49, 1973.

9. *Ratner S., Morell H., Carvalho E.* Arch. Biochem. Biophys., 91, 280, 1960.
10. *Scoffone E., Jori G., Galazzo G.* Chem. Reactiv. and Biol. Role Func. Groups Enzymes, Biochem. Soc. Simp., 31, 163, 1970.
11. *Weil L., Gordon W. G., Buchert A. R.* Arch. Biochem. Biophys., 33, 90, 1951.
12. *Weil L., Buchert A. R., Maher J.* Arch. Biochem. Biophys., 40, 245, 1952.
13. *Weil L., James S., Buchert A. R.* Arch. Biochem. Biophys., 46, 266, 1953.