

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СПЕКТРА
АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС

Н. Х. АЛЧУДЖЯН

В предварительно очищенных двух изоферментах аргиназы печени исследовалось наличие марганца методами биамперометрии и ЭПР-спектроскопии. Показано наличие трехвалентного марганца у высокомолекулярного изофермента и двухвалентного— у низкомолекулярного. Показаны различия в прочности связывания марганца обоими изоферментами и влияние на них ЭДТА и глутатиона.

Широкое биологическое распространение L-аргиназы (L-аргинин-амидиноуреогидролазы 3.5.3.1), обнаружение ее изоферментов в печени уреотелических организмов подтверждают положение, выдвинутое Буянтяном и Давтяном, о существовании двух изоферментов аргиназы с различным метаболическим назначением [1]. Один из них—уреотелический—участвует в нейтрализации аминного азота через цикл мочевины, а другой—неуреотелический, роль которого до сих пор точно не выяснена. Предполагается, что последний влияет на биосинтез гистонов, а также является метаболическим поставщиком мочевины, однозамещенных гуанидиновых соединений и различных аминокислот [2, 7], а поэтому имеет общебиологическое значение. Изучение обоих изоферментов аргиназы представляет интерес для выяснения механизмов регуляции клеточного метаболизма сформировавшихся в процессе биохимической эволюции организмов. Целью данной работы являлось изучение некоторых физико-химических свойств изоферментов аргиназы печени крыс.

Материал и методика. Опыты проводились на белых крысах массой 150—200 г. Марганец определяли биамперометрическим методом посредством меркуроредуктометрического титрования [5], для чего предварительно готовились пробы. С этой целью электрофоретически гомогенные препараты изоферментов аргиназы печени крыс [3] гидролизovali в 25%-ном H_2SO_4 в течение 24 ч. при 115—120°C и окисляли дымящейся HNO_3 в присутствии Br_2 для перевода серы, имеющейся в гидролизатах, в H_2SO_4 . Избыток Br_2 удаляли кипячением полученных проб в водяной бане, а для окисления марганца до семивалентного состояния добавлялся висмутат натрия, избыток которого удалялся центрифугированием, после чего пробы титровались (рис. 1). Изучение ЭПР-спектров изоферментов проводилось на приборе Varian-4. Условия съемки спектра: микроволновая частота—9,13 ГГц, микроволновая мощность—10 мвт, амплитуда модуляции—6,3э, постоянная времени—0,3 сек, температура—77 К. Аргиназная активность определялась путем инкубации фермента в течение 20 мин, при 37°, pH 9,5. Инкубационная смесь: 1 мл 0,05 М NaOH-глицинового буфера (pH 9,5), 0,5 мл 0,1 М L-аргинаина (pH 9,5) и 0,5 мл ферментного экстракта. Реакцию остано-

ливали добавленным 1 мл 20%-ного ТХУ. Мочевина определялась по Моору и Кауфману [8]. За единицу активности фермента принималось такое количество фермента,

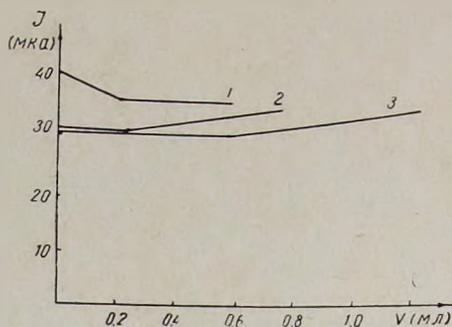


Рис. 1. Меркуроредуктометрическое титрование изоферментов аргиназы печени крыс. I — буфер; II—I изофермент; III—II изофермент.

которое в течение 1 мин при вышеуказанных условиях расщепляло 1 мкмоль субстрата. Белок определялся методом Лоури [6].

Результаты и обсуждение. При исследовании ЭПР-спектров изоферментов аргиназы печени крыс на разных этапах их очистки оказалось, что при приготовлении гомогената, содержащего марганец, после гельфильтрации на сефадексе G-200 в обоих белках был обнаружен марганец. Полученные ЭПР-спектры имели характерную для марганецсодержащих частиц 6 STS сверхтонкую структуру с расстоянием между максимумами—80 э (рис. 2). Но если у низкомолекулярного изофермента сразу выявляется спектр двухвалентного марганца, то у высокомолекулярного он обнаруживается лишь после воздействия восстановителей (глутатион, дитионит), что предполагает его иную валентность, очевидно, равную трем, так как в биосистемах из восьми состояний окисления марганца реализуются только два—2 и 3 [4]. При приготовлении гомогената, не содержащего марганец, в высокомолекуляр-

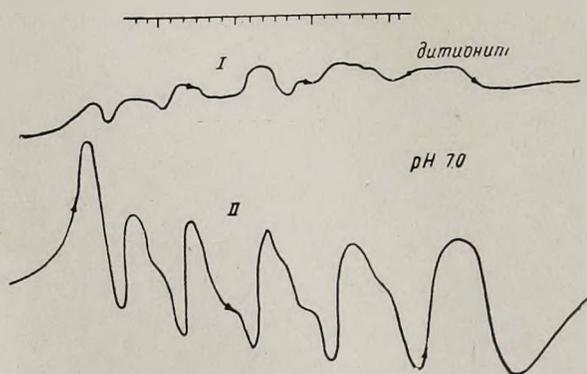


Рис. 2. ЭПР-спектры изоферментов аргиназы печени крыс.

ном изоферменте аргиназы марганец не был обнаружен, тогда как во втором изоферменте на молекулу белка приходилось 1—1,5 атома марганца. ЭПР-спектроскопия и биамперометрическое определение марганца в высокоочищенных препаратах изоферментов аргиназы печени

крыс выявили ту же картину. Таким образом, анализ, ионообменная хроматография и ряд других процедур, сопутствующих очистке, не полностью снимают марганец у низкомолекулярной аргиназы, что указывает на прочность связывания его с ферментом. Следовательно, хотя оба изофермента и адсорбируют марганец, степень адсорбции его, как и проявляемая преимущественная валентность, различны.

Исследуемые белки отличались и по влиянию на них ЭДТА и глутатиона, а также предынкубации на разных этапах очистки (табл.). Как

Таблица
Влияние различных условий на каталитическую активность изоферментов аргиназы печени крыс

Изоферменты	Удельная активность после гельфильтрации, ед./мг белка					
	Предынкубация с					
	Предынкубация		ЭДТА		глутатионом	
	-Mn ⁺⁺ +	Mn ⁺⁺	-Mn ⁺	+Mn ⁺⁺	-Mn ⁺⁺	+Mn ⁺
1	2090	5225	2090	2100	1780	5225
2	900	900	900	900	900	900
	Удельная активность гомогенных препаратов, ед./мг белка					
1	9540	10400	9540	9540	8210	19000
2	2840	3560	2830	2830	2830	3560

видно из таблицы, после гельфильтрации предынкубация высокомолекулярного изофермента аргиназы в течение 30 мин при 37°, без Mn⁺⁺ в пробе снижает его каталитическую активность примерно вдвое независимо от присутствия ЭДТА; при наличии Mn⁺⁺ в пробе предынкубация такого действия не оказывает. Очевидно, при внесении эффектора в пробу равновесие смещается в сторону комплекса фермент—марганец, что способствует стабилизации активной конформации аргиназы. ЭДТА, связываясь с марганцем, препятствует его положительному воздействию. У низкомолекулярной аргиназы активность на рассматриваемом этапе не зависит от указанных факторов. Подобная картина отмечалась в отношении гомогенных препаратов, с той лишь разницей, что при отсутствии ЭДТА в пробе Mn⁺⁺ активизирует низкомолекулярный изофермент. Глутатион не изменяет активности последнего ни в одном из вариантов, а на высокомолекулярный изофермент действует негативно, приводя к падению его активности более чем вдвое. Наличие Mn⁺ в инкубационной смеси снимает это действие, но добавление его после предынкубации с глутатионом не восстанавливает первоначальную активность фермента. Такие же данные получены относительно гомогенного препарата. Возможно, глутатион действует на S-S связи высокомолекулярного изофермента, а марганец, стабилизируя последний, препятствует его конформационным изменениям.

Рассмотренные различия в свойствах изоферментов аргиназы печени крыс свидетельствуют о различиях в контролируемых ими ферментативных реакциях, регуляторных механизмах, воздействующих на них, что, вероятно, обусловлено различной генетической детерминированностью данных белков, их различным функциональным назначением.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии

Поступило 2.VII 1979 г.

ԱՌՆԵՏԻ ԼՅԱՐԴԻ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ՍՊԵԿՏՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ

Ն. Խ. ԱԼՉՈՒՋՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է սպիտակ առնետների լյարդի արգինազայի իզոֆերմենտների էՊՌ-սպեկտրները: Հետազոտումը կատարվել է մաքրման տարբեր փուլերում: Բարձր մոլեկուլյար կշիռ ունեցող արգինազան չէր պարունակում իր մեջ Mn^{++} իսկ ցածրակշիռ իզոֆերմենտի մեկ մոլեկուլը կապված էր մեկ, մեկ ու կես Mn^{++} ատոմի հետ (նմուշները համոզեն են): Մանգանի քանակական որոշումը կատարվել էր բիամպերոմետրիկ և էՊՌ-ի մեթոդով: Հետազոտվել է նաև ջերմային մշակումի, էԴՏԱ-ի և գլուտատիոնի ազդեցությունը արգինազայի իզոֆերմենտների վրա, լսոանց մանգանի և մանգանի ներկայությունը:

STUDY OF ISOENZYMATIC SPECTRUM OF RAT LIVER ARGINASE

N. Kch. ALCHUDJIAN

EPR-spectrum of the isoenzymes of rat liver arginase has been studied. The low molecular weight isoenzyme contains tightly bound manganese. It has been made a quantitative and qualitative analysis of arginase by EPR and biamprometric methods. The influence on isoenzymes of the thermoincubation, EDTA, glutation in the absence and presence of Mn^{+2} has been studied.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Давтян М. А., Бунятыан Г. Х. *Вопр. биох. мозга*, 3, 273, Ереван, 1967.
2. Давтян М. А. *Вопр. биох. мозга*, 4, 237, Ереван, 1968.
3. Давтян М. А., Алчуджян Н. Х. *Междуз. сб. «Биология»*, Ереван, 1, 1979.
4. Уильямс Д. *Металлы жизни*. 28, М., 1975.
5. Шапошникова Г. Н., Тараян Р. М., Ачарян Г. С. *Арм. хим. журн.*, 30, 2, 1977
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
7. Metham T. B., Linzell J. L. *Biochem. J.*, 101, 76, 1966.
8. Moore R., Kauffman N. *Anal. bioch.*, 33 263, 1970.