

МОДИФИКАЦИЯ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА N-БРОМСУКЦИНИМИДОМ

М. Л. ГЕВОРКЯН, М. А. ДАВТЯН

Исследовали инактивацию и разрушение триптофанилов аргиназы печени крупного рогатого скота при взаимодействии с N-бромсукцинимидом. Показано, что субстрат и конкурентные ингибиторы частично предохраняют фермент от инактивации. Изучалась также роль свободных сульфгидрильных групп в проявлении активности аргиназы. Сделано заключение, что инактивация ее является результатом взаимодействия N-бромсукцинимида с несколькими типами функциональных групп фермента, часть которых входит, по-видимому, в состав активного центра аргиназы.

Изучению роли отдельных функциональных групп в проявлении активности ферментов в настоящее время уделяется большое внимание. Результаты подобных исследований позволяют ближе подойти к выяснению механизма действия ферментов, понять сложную взаимосвязь между их структурой и функцией. Аргиназа относится к сравнительно мало изученным с этой точки зрения ферментам.

Проведенные нами ранее исследования по воздействию УФ облучения на аргиназу печени крупного рогатого скота [1] позволили предположить, что в проявлении активности этого фермента определенную роль могут играть остатки триптофана. В опытах по сенсibilизированному фотоокислению аргиназы в присутствии эозина [2] было показано, однако, что разрушение триптофанилов в этих условиях не отражается на активности фермента. Представляло интерес изучение влияния на аргиназу специфического реагента N-бромсукцинимида (НБС). Хотя наряду с остатками триптофана этот реагент может взаимодействовать и с некоторыми другими функциональными группами в белках (остатками тирозина, гистидина, цистеина и др.) [3, 4], его применение позволило получить ценные сведения о роли отдельных аминокислотных остатков в активности целого ряда ферментов [5—11], в том числе и аргиназы, полученной из стафилококковых бактерий [12]. В опытах этих авторов наблюдалось значительное торможение ферментативной активности и частичная защита субстратом от инактивации; по их мнению, ингибирование активности фермента не связано с остатками триптофана и является результатом действия более сложного механизма.

Нами исследовалось влияние НБС на аргиназу печени крупного рогатого скота.

Материал и методика. В работе использовались препараты из печени крупного рогатого скота фирмы Reapa¹ (Венгрия), N-бромсукцинимид, L-аргинин, L-лизин, L-орнитин, мочеви́на, додецилсульфат натрия (ДС)—отечественного производства, параллортмеркурибензоат (ПХМБ)-натриевая соль—фирмы Chemapol (Чехословакия).

Аргиназная активность определялась по методу Ратнер, как описано ранее [1]. Растворы белка готовились на 0,05 М глициновом буфере (рН 9,5). Опыты проводились при комнатной температуре (22°). Реакцию аргиназы с НБС проводили следующим образом: к раствору белка добавляли свежеприготовленный водный раствор НБС и эту смесь инкубировали до двух часов. Затем брались пробы для определения активности и измерения флуоресценции (ФЛ). Интенсивность триптофановой ФЛ измерялась на спектрофлуориметре MPS-2A (Hitachi, Япония) при длине волны возбуждения 297 нм.

Число модифицирующихся триптофанилов определялось по методу Виткопа [13, 14]. К раствору аргиназы ($8,3 \cdot 10^{-6}$ М) в кварцевой кювете добавляли раствор НБС ($4 \cdot 10^{-4}$ М) по 0,1 мл, перемешивали переворачиванием и через 10—15 мин измеряли поглощение при 280 нм. Затем брали пробу для определения аргиназной активности.

Растворы аргиназы денатурировали в 5,8 и 8 М мочеви́не, а также в растворе с рН 2,75 в течение 2—3 час. при комнатной температуре.

Число сульфгидрильных групп определялось по методу Бойера [15]. К раствору белка в кварцевой кювете добавляли раствор ПХМБ, стандартизированный при 232 нм, по 0,02 мл, и после перемешивания измеряли изменение поглощения при 250 нм. Молекулярный вес аргиназы принимался равным 120000 дальтон.

Результаты и обсуждение. Как показали наши эксперименты, N-бромсукцинимид значительно тормозит аргиназную активность (рис. 1) Из рисунка видно, что в первые 5 мин активность аргиназы резко

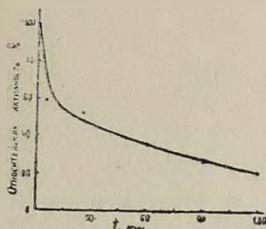


Рис. 1.

Рис. 1. Зависимость относительной аргиназной активности от времени в ходе реакции аргиназы ($1,8 \cdot 10^{-6}$ М) с НБС ($1,25 \cdot 10^{-4}$ М).

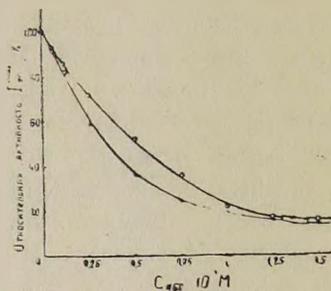


Рис. 2.

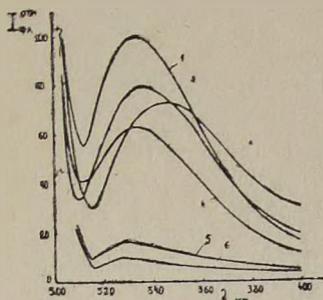
Рис. 2. Влияние различных концентраций НБС на активность (○) и интенсивность ФЛ (●) растворов аргиназы ($1,8 \cdot 10^{-6}$ М).

уменьшается, затем продолжает медленно снижаться и через два часа инактивация достигает 80%. Вначале, по-видимому, происходит быстрая модификация легко взаимодействующих с реагентом аминокислотных остатков, связанных с активностью фермента. Дальнейшее снижение ее, вероятно, является результатом дополнительной модификации менее реакционноспособных групп, или функциональных групп, которые стали доступны реагенту после структурных изменений, вызванных первичными реакциями модификации.

Исследовалась также зависимость аргиназной активности от концентрации реагента. Как видно из рис. 2, с увеличением концентрации НБС активность фермента снижается и при $1,25 \cdot 10^{-4}$ М в растворе уменьшается на 85%. Однако и при использовании большей концентрации, $2,5 \cdot 10^{-4}$ М, после двухчасовой инкубации полной инактивации не происходит, активность снижается на 85%.

Параллельно с определением активности фермента были измерены спектры триптофановой флуоресценции в исследуемых растворах. Максимум ФЛ остатков триптофана аргиназы находится, как известно, в области 335—337 нм. При добавлении НБС интенсивность ФЛ значительно уменьшается и максимум несколько смещается в коротковолновую область (рис. 3). На рис. 2 приведены значения относительной интенсив-

Рис. 3. Кривые интенсивности флуоресценции остатков триптофана в аргиназе. 1— аргиназа в 0,05 М глициновом буфере (рН 9,5). 2— в 5,8 М мочеvine, 3— в 8 М мочеvine, 4— в глицин-НСI буфере (рН 2,75), 5, 6— после двухчасовой инкубации с НБС при концентрациях реагента $1,25 \cdot 10^{-4}$ М и $2,5 \cdot 10^{-4}$ М соответственно.



ности ФЛ триптофанов в максимуме в зависимости от концентрации НБС. Существует различие в характере уменьшения интенсивности ФЛ и снижения активности аргиназы. Кроме разрушения остатков триптофана на ход снижения интенсивности ФЛ, очевидно, влияет и изменение микроокружения этих остатков, происходящее в результате конформационных изменений молекулы аргиназы в процессе реакции. Почти полное тушение интенсивности ФЛ может свидетельствовать о том, что модифицирующиеся остатки триптофана являются основными центрами ФЛ белка и, по-видимому, расположены в доступных для реагента участках макромолекулы.

Определение числа модифицированных триптофанилов в аргиназе при взаимодействии с НБС (рис. 4) показало, что в данных условиях разрушается около 2,5—3 остатков триптофана на молекулу фермента. На рис. 4 б приведена зависимость между числом модифицированных триптофанилов и аргиназной активностью. Экстраполяция кривой снижения активности к нулевой точке показывает, что остатки триптофана, модифицирующиеся в ходе реакции с НБС, могут быть в одинаковой степени связаны с активностью аргиназы. Из рис. 4 а видно, что при добавлении около 30 моль НБС на моль белка, когда активность подавляется на 50%, триптофанилы уже модифицированы. Дальнейшее добавление реагента не влияет на число модифицирующихся остатков, хотя активность продолжает снижаться. Это свидетельствует о том, что в процесс инактивации вносят вклад функциональные группы аргиназы, взаимодействующие с НБС, параллельно с модификацией триптофанилов.

Было определено также число модифицирующихся остатков триптофана в растворах денатурированного белка. В растворе 5,8 и 8 М мочевины выявлялось около 6 остатков триптофана на молекулу фермента. Измерение спектров триптофановой ФЛ аргиназы в этих растворах показало, что в растворе 5,8 М мочевины происходит только некоторое снижение интенсивности ФЛ аргиназы, тогда как в 8 М мочевины оно сопровождается характерным для большинства белков смещением максимума ФЛ в длинноволновую область (рис. 3). Таким образом, увеличение числа доступных для НБС остатков триптофана происходит уже в растворе 5,8 М мочевины, а дальнейшее разворачивание молекулы белка в 8 М мочевины изменяет, по-видимому, только характер микроокружения триптофанилов, приводя к смещению положения максимума ФЛ. В растворе с pH 2,75, в котором, как показано некоторыми авторами [16, 17], аргиназа распадается на субъединицы и теряет активность, модифицируется около 7—8 остатков триптофана на молекулу белка. В этом случае, как и в растворе 5,8 М мочевины, не наблюдается смещения положения максимума ФЛ, происходит только снижение интенсивности (рис. 3). Таким образом, наибольшее число триптофанилов взаимодействует с НБС в растворе с кислым pH.

Далее были проведены опыты в присутствии природного субстрата L-аргинина и двух конкурентных ингибиторов— L-лизина и L-орнитина (рис. 4 а). Присутствие этих соединений в концентрации $2,5 \cdot 10^{-2}$ М в

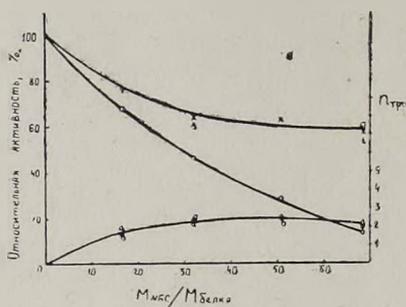


Рис. 4а.

Рис. 4. Зависимость инактивации аргиназы (о), деструкции триптофанилов (●) от концентрации НБС и влияние L-аргинина (×), L-лизина (Δ) и L-орнитина (■) на эти процессы.

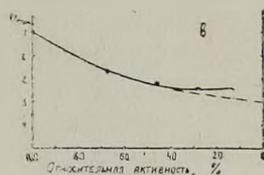


Рис. 4б.

реакционной смеси не отражается на числе модифицирующихся остатков, в то же время аргиназная активность заметно сохраняется. После добавления 30 моль НБС, когда исчерпано разрушение триптофанилов и активность снизилась на 35%, дальнейшее увеличение концентрации реагента не вызывает снижения активности фермента, т. е. субстрат и ингибиторы частично защищают фермент от инактивации. Функциональные группы аргиназы, предохраняемые от взаимодействия с НБС, очевидно, входят в состав ее активного центра. Тот факт, что в присутствии аргинина реагент все же вызывает снижение активности фермента на 35%, свидетельствует о модификации аминокислотных остатков,

либо входящих в состав активного центра, но не прикрываемых субстратом, либо локализованных вне его и косвенно влияющих на активность аргиназы (нарушение конформации). Таким образом, кривая активность—концентрация реагента отражает взаимодействие НБС с несколькими типами функциональных групп, влияющих на активность аргиназы. Что касается остатков триптофана, то исходя из полученных данных можно предположить, что триптофаны, по-видимому, не входят в состав активного центра, но, возможно, их разрушение оказывает косвенное влияние на процессы инактивации.

Как уже указывалось выше, НБС взаимодействует, кроме остатков триптофана, также и с некоторыми другими функциональными группами в белках. Принимая во внимание полученные данные, представляло интерес выяснить участие также других, чувствительных к реагенту аминокислотных остатков. С этой целью было проведено определение свободных быстрореагирующих SH-групп с помощью ПХМБ. В наших опытах в аргиназе определялось около 3 SH-групп на молекулу, а ферментативная активность снижалась на 5—7%. L-аргинин, добавленный перед титрованием, не влиял на число титруемых групп и на степень инактивации фермента. Судя по всему, легкомодифицируемые ПХМБ SH-группы в аргиназе не играют существенной роли в проявлении активности фермента. В аргиназе, обработанной НБС, свободных SH-групп не было обнаружено, т. е. реагент взаимодействовал и с тиоловыми группами. В растворе 8 М мочевины с помощью ПХМБ было определено 4 SH-группы, а в 1%-ном растворе ДС—5 SH-групп. Наибольшее число их в аргиназе было обнаружено при pH 3,65—6 SH-групп на молекулу фермента. Эти, определяемые после денатурации, SH-группы находятся внутри молекулы и, возможно, участвуют в поддержании нативной конформации молекулы аргиназы. Мы наблюдали значительное ингибирование аргиназной активности в присутствии высоких концентраций ПХМБ. При добавлении 180 моль ПХМБ на моль аргиназы активность последней снижалась на 80%, а добавление 400 моль ПХМБ приводило к 100%-ной инактивации. В литературе имеются данные об инактивации аргиназы высокими концентрациями ПХМБ [12]. Однако в последнее время в ряде работ указывается, что ПХМБ может вызывать инактивацию ферментов не в результате взаимодействия с тиоловыми группами, а вследствие нарушения нативной конформации при взаимодействии с другими аминокислотными остатками белка [19]. Показано даже, что ПХМБ подавляет активность ферментов, вообще не содержащих сульфгидрильных групп, что также объясняется конформационными изменениями, вызванными его молекулой [20]. На основании этих данных, а также наших результатов можно предположить, что наблюдаемый эффект при использовании высоких концентраций ПХМБ также является результатом неспецифических структурных изменений молекулы фермента, и аргиназа печени крупного рогатого скота, так же как и аргиназа печени лошади [18] и печени крысы [21], не является тиоловым ферментом. Таким образом, хотя НБС и модифицирует SH-

группы в аргиназе, это взаимодействие не является основной причиной потери активности в данных условиях. Здесь, очевидно, имеет место модификация других, чувствительных к реагенту функциональных групп, играющих существенную роль в процессах инактивации.

Принимая во внимание все вышеизложенное, можно заключить, что инактивация аргиназы из печени крупного рогатого скота происходит в результате модификации НБС как аминокислотных остатков, входящих в состав активного центра фермента, так и, по-видимому, функциональных групп, косвенно влияющих на проявление активности фермента.

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

Поступило 31.VII 1978 г.

ԽՈՇՈՐ ԵՂՋԵՐԱՎՈՐ ԱՆԱՍՈՒՆՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ՄՈՒԻՑԻԿԱՅԻԱՆ N-ԲՐՈՄՍՍՈՒԿՅԻՆԻՄԻԴՈՎ

Մ. Լ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԻՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է խոշոր եղջերավոր անասունների լյարդի արգինազայի ինակտիվացումը և տրիպտոֆանի մնացորդների քայքայումը N-բրոմսուկցինիմիդի ազդեցության հետևանքով: Ցույց է տրվում, որ սուբստրատը և մրրդակցային ինհիբիտորները մասամբ պաշտպանում են ֆերմենտը ինակտիվացումից:

Հետազոտվել է նաև ազատ SH-խմբերի դերը ֆերմենտի ակտիվության մեջ: Ստացված տվյալներից կարելի է եզրակացնել, որ արգինազայի ինակտիվացումը տեղի է ունենում N-բրոմսուկցինիմիդի և արգինազայի մի քանի տիպի ֆունկցիոնալ խմբերի փոխազդեցության հետևանքով, որոնց մի մասը, հավանաբար, մտնում է ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի կազմության մեջ:

CATTLE LIVER ARGINASE MODIFICATION BY N-BROMOSUCCINIMIDE

M. L. GEVORGIAN, M. A. DAVTIAN

The inactivation and destruction of tryptophan residues of cattle liver arginase have been investigated. The arginase activity is partly protected by substratum and competitive inhibitors. The data lead to the conclusion that inactivation of arginase is the result of interaction of NBS with several functional groups of enzyme, some of which are probably involved in the active site of arginase,

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Геворкян М. Л., Закарян А. Е., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 27, 9, 44, 1974.
2. Геворкян М. Л., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 29, 3, 32, 1976.
3. Shaltiel S., Patchornik A. J. Am. Chem. Soc., 85, 2799, 1963.
4. Brand L., Shaltiel S. Biochim. et biophys. acta, 88, 2, 338, 1964.

5. Блума Р. К., Вина И. А., Жагат Р. А. Химия природн. соед., 2, 228, 1975.
6. Yielding K. L., Summers M. R., Gregg R. S. Ala. J. Med. Sci., 10, 4, 393, 1973.
7. Irie M., Harada M., Sawada F. J. Biochem., 72, 6, 1351, 1972.
8. Nagami K. Biochem. and biophys. Res. Communs., 51, 2, 364, 1973.
9. Bell J. E., Castellino F. Y., Trayer J. P., Hill R. L. J. Biol. Chem., 250, 19, 7579, 1975.
10. Hirose M., Sugimoto E., Chiba H. Biochim. et biophys. acta, 250, 3, 514, 1971.
11. Fujimori H., Ohnishi M., Himori K. J. Biochem., 75, 4, 767, 1974.
12. Soru E., Zaharia O. Rev. roum. biochim., 13, 1, 49, 1976.
13. Patchornik A., Louson W. B., Gross E., Witcop B. J. Am. Chem. Soc., 82, 5923, 1960.
14. Spande T. F., Witcop W. B. Methods In Enzymology, 11, 500, 1967.
15. Boyer P. D. J. Am. Chem. Soc. 76, 4331, 1954.
16. Hosoyama J. Eur. J. Biochem., 27, 1, 48, 1972.
17. Vielle-Breitburg F., Orth G. J. Biol. Chem., 247, 4, 1227, 1972.
18. Greenberg D. M., Bagot A. E., Roholt O. A. Arch. Biochem. and biophys., 62, 446, 1956.
19. Garland R. C., Cori C. F., Chang H. W. Mol. and Cell. Biochem., 12, 23, 1979.
20. Greenblatt G. A., Sarkisian I. V. Sub-Cellul. Biochem., 3, 249, 1974.
21. Mora J., Tarrab R., Bojallil L. F. Biochim. et biophys. acta, 118, 206, 1966.