

ФОТООКИСЛЕНИЕ И ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОСТАТКОВ ГИСТИДИНА В АРГИНАЗЕ

М. А. ЦАВТЯН, М. Л. ГЕВОРКЯН

Исследовалась фотоинактивация растворов аргиназы из печени крупного рогатого скота при облучении видимым светом в присутствии сенсibilизатора метиленового синего. Зависимость снижения активности от времени облучения носит экспоненциальный характер. Степень инактивации увеличивается при щелочных значениях рН. Субстрат и конкурентные ингибиторы частично защищают фермент от инактивации.

Модификация аргиназы диэтилпирокарбонатом также приводит к снижению активности фермента. Сделано предположение, что два остатка гистидина в молекуле аргиназы связаны с проявлением активности фермента.

Ключевые слова: аргиназа, фотоокисление, химическая модификация.

В настоящее время большое внимание уделяется исследованию функциональных групп, играющих важную роль в проявлении активности и поддержании нативной конформации ферментов. Методы, используемые для этой цели (химическая модификация, фотоокисление, ингибирование аналогами субстратов и др.), позволяют получать ценные сведения о механизме действия ферментов, строении и свойствах участка макромолекулы, связанного с ферментативной активностью.

Механизм действия и строение активного центра аргиназы пока не изучены. Имеющиеся литературные данные [12], а также результаты наших экспериментов [4] свидетельствуют о том, что сульфгидрильные группы не связаны с активностью фермента из печени крупного рогатого скота. Опыты, проведенные с N-бромсукцинимидом [4], показали, что значительное снижение активности аргиназы при действии этого реагента происходит за счет взаимодействия его с несколькими типами функциональных групп фермента, вносящих вклад в проявление активности. Причем разрушение триптофанилов, по-видимому, не является основной причиной его инактивации в данных условиях. Одними из наиболее чувствительных к N-бромсукцинимиду функциональных групп в белках являются также остатки гистидина. С целью выяснения роли этих аминокислотных остатков в активности аргиназы из печени крупного рогатого скота было проведено исследование сенсibilизированного метиленовым синим фотоокисления растворов аргиназы и химической модификации диэтилпирокарбонатом.

Материал и методика. В работе использовали препарат аргиназы из печени крупного рогатого скота (Reanal, Венгрия), метиленовый синий, глицин, L-аргинин, L-лизин, L-орнитин, L-пролин, L-цистеин, DL-аспарагиновая кислота—отечественного производства, диэтилпиروкарбонат (ДПК) (Fluka, Швейцария).

Растворы белка (0,2 мг/мл) готовили на 0,05 М глициновом буфере (рН 9,5). К 3 мл раствора аргиназы добавляли 1 мл водного раствора красителя и облучали видимым светом (лампа накаливания 150 Вт) при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Облучение проводили в круглой кювете диаметром 3,8 см на расстоянии 15 см от основания кюветы. После облучения из раствора брали пробу для определения ферментативной активности. Добавление красителя к раствору аргиназы без облучения не влияло на ферментативную активность, так же как облучение раствора фермента без красителя. Для исследования влияния субстрата и ингибиторов на процесс инактивации к раствору фермента перед облучением добавляли эти соединения в концентрации $6,2 \cdot 10^{-3}$ М в растворе. Опыты проводились при комнатной температуре (20°).

Аргиназную активность определяли по методу, описанному ранее [1].

В опытах по химической модификации растворы белка готовили на 0,1 М или 0,05 М фосфатном буфере (рН 6). ДПК разбавляли холодным этиловым спиртом (100%) непосредственно перед употреблением. К 2,8 мл раствора фермента (0,5 мг/мл) добавляли 0,1 мл раствора ДПК и после 30 мин инкубации определяли аргиназную активность и изменение поглощения при 240 нм. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре СФ-4А. Используя $E_{240} = 3,2 \cdot 10^3$ л/м см [13], рассчитывали число модифицированных остатков гистидина. Молекулярный вес аргиназы принимался равным 120000 дальтон.

Результаты и обсуждение. Облучение растворов аргиназы печени крупного рогатого скота видимым светом в присутствии метиленового синего приводит к значительному снижению активности фермента. На рис. 1 показана зависимость относительной аргиназной активности от продолжительности облучения раствора фермента при концентрации красителя $2,5 \cdot 10^{-5}$ М. Экспоненциальный характер кривой этой зависимости может указывать на разрушение одного или нескольких однотипных аминокислотных остатков в молекуле аргиназы, связанных с проявлением активности. Степень инактивации зависит также от концентрации красителя, при увеличении которого до $1,25 \cdot 10^{-4}$ М в растворе активность фермента в течение 30 мин облучения снижается на 90%.

Исследовалась зависимость инактивации растворов аргиназы от рН в области рН 6—11. Кривая зависимости скорости фотоинактивации от рН при фотоокислении остатков гистидина в молекулах некоторых ферментов в присутствии метиленового синего имеет характерную форму в области рН 6—8, что связано с изменениями в структуре имидазольного кольца гистидина в этих условиях [5, 9, 18]. В наших опытах с увеличением значений рН степень инактивации постепенно возрастала и при рН 11 была почти в 2 раза больше, чем при рН 6. Наблюдаемое увеличение скорости инактивации можно объяснить как изменением ионизационной формы чувствительных к фотоокислению аминокислотных остатков (в том числе и остатков гистидина), так и изменением конформации определенных участков молекулы фермента, приводящим к экспонированию ранее недоступных фотоокислению функциональных

групп в аргиназе. Как известно, при сенсibilизированном фотоокислении растворов ферментов разрушению подвергаются главным образом триптофан, тирозин, гистидин, метионин и цистеин [10, 14]. Принимая во внимание литературные данные [12, 14], а также результаты проведенных нами ранее экспериментов [2, 4], можно предположить, что наиболее чувствительными функциональными группами, связанными с активностью аргиназы, в данных условиях являются остатки гистидина.

Было проведено исследование фотоокисления растворов аргиназы в присутствии субстрата L-аргинина и двух конкурентных ингибиторов L-лизина и L-орнитина. Эти соединения в одинаковой степени значительно предохраняют фермент от инактивации. Пролин и цистеин имеют слабый защитный эффект, а аспарагиновая кислота совсем не влияет на процесс инактивации аргиназы. По-видимому, субстрат и оба конкурентных ингибитора защищают от разрушения одни и те же участки активного центра фермента, не предохраняя, однако, полностью фермент от инактивации. Наличие 30%-ной инактивации даже в присутствии L-аргинина свидетельствует о том, что в ходе облучения разрушаются функциональные группы, не связывающиеся с субстратом и имеющие существенное значение для проявления активности аргиназы.

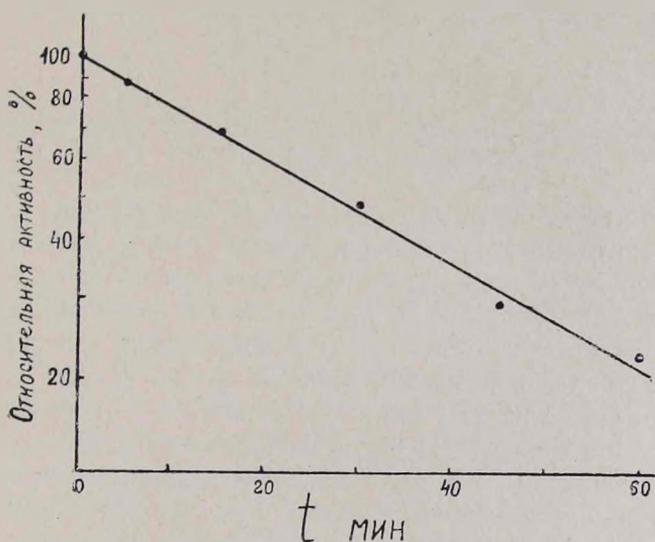


Рис. 1. Зависимость аргиназной активности от времени облучения.

Представляло интерес исследовать влияние на аргиназу специфического химического реагента диэтилпиروкарбоната, который, как известно, при определенных условиях избирательно взаимодействует с остатками гистидина в белках [11, 13].

Эксперименты показали, что при взаимодействии ДПК с аргиназой происходит снижение ферментативной активности. На рис. 2 показана зависимость относительной аргиназной активности от концентрации ДПК. Фермент инактивируется на 50% уже при малых концентрациях

реагента ($4,2 \cdot 10^{-5}$ М), а дальнейшее увеличение концентрации ДПК существенно не влияет на этот процесс. При высоких концентрациях ($4,2 \cdot 10^{-2}$ М) активность снижается на 60%.

Количество взаимодействующих с ДПК остатков гистидина было определено по изменению оптической плотности при 240 нм, где поглощает образующийся в ходе реакции карбэтоксигистидин [13]. Основная

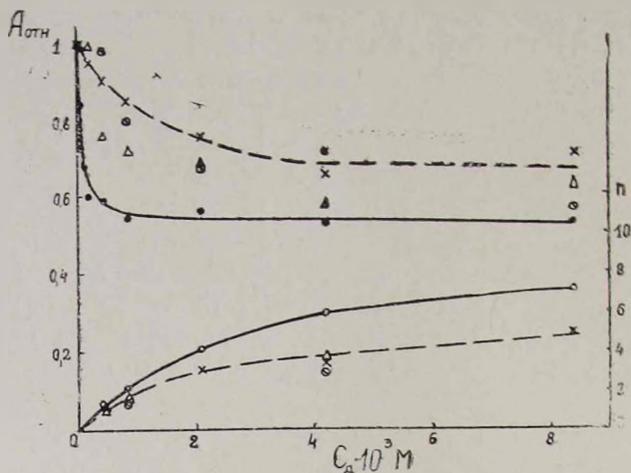


Рис. 2. Зависимость инактивации аргиназы (●) и модификации остатков гистидина (○) от концентрации ДПК и влияние L-аргинина (x), L-лизина (Δ), L-орнитина (⊕) на эти процессы.

реакция протекает в течение первых 10—15 мин. Из рис. 2 видно, что остатки гистидина модифицируются уже при низких концентрациях реагента, что сопровождается снижением активности аргиназы на 50%. Дальнейшее взаимодействие ДПК с остатками гистидина аргиназы не отражается на ферментативной активности. Очевидно, взаимодействующие с ДПК при высоких концентрациях реагента остатки гистидина не связаны с активностью и находятся на отдаленных от активного центра участках макромолекулы. На рис. 3 приведена зависимость между числом модифицированных остатков гистидина и аргиназной активностью. Экстраполяция начальной части кривой к нулевой точке показывает, что только два остатка гистидина могут быть связаны с активностью аргиназы.

Инактивированные ДПК ферменты часто восстанавливают активность при воздействии на них гидроксиламином, который отщепляет связанный ДПК от гистидина белка [6, 15, 17]. Однако аргиназа сама теряет активность в присутствии этого реагента. Гидроксиламин является ингибитором некоторых ферментов [3, 7, 8], в том числе и аргиназы, выделенной из стафилококковых бактерий [16]. В наших опытах добавление 0,2 М раствора этого реагента приводило к снижению активности фермента на 50% при инкубировании в течение 20 мин (рН 7). По-видимому, карбонильные группы, с которыми он взаимодействует, играют оп-

ределенную роль и в проявлении активности аргиназы из печени крупного рогатого скота.

L-Аргинин, L-лизин и L-орнитин частично предохраняют фермент от инактивации диэтилпиокарбонатом и уменьшают число модифицированных остатков (рис. 2). Необходимо отметить, что при малых концентрациях реагента ($2 \cdot 10^{-4}$ М) субстрат и ингибиторы полностью защищают фермент от инактивации, с увеличением концентрации ДПК защитный эффект их уменьшается. При концентрации реагента, когда ак-

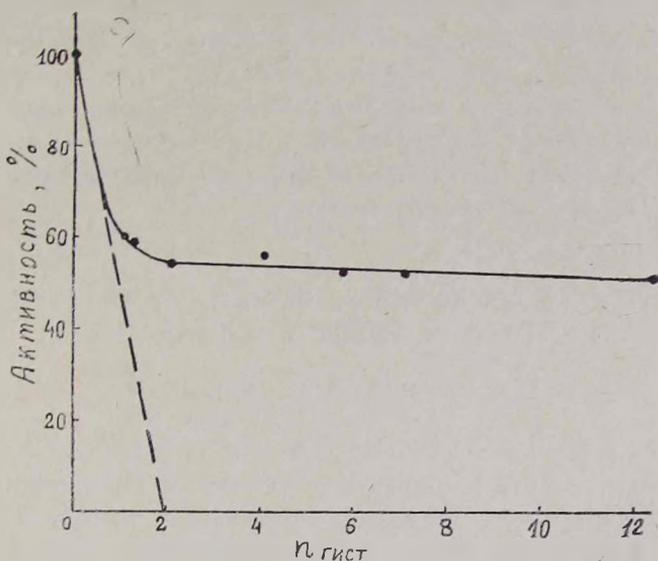


Рис. 3. Зависимость аргиназной активности от числа модифицированных остатков гистидина.

тивность снижается на 50%, разница между модифицированными остатками гистидина в присутствии и в отсутствие субстрата составляет 1, т. е. аргинин и ингибиторы предохраняют один остаток гистидина от взаимодействия с ДПК. По-видимому, этот остаток входит в состав активного центра фермента. Снижение активности даже в присутствии субстрата и ингибиторов показывает, что имеется по крайней мере еще один остаток гистидина, связанный с активностью фермента, но не предохраняемый от взаимодействия с ДПК. Таким образом, исходя из вышеизложенного, можно заключить, что два остатка гистидина в аргиназе, по-видимому, связаны с проявлением активности фермента.

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

Поступило 2.VII 1979 г.

ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ՀԻՍՏԻԴԻՆԻ ՄՆԱՑՈՐԴՆԵՐԻ
ՖՈՏՈՓՐՍԻԿԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ՔԻՄԻԱԿԱՆ ՄՈԴԻՖԻԿԱՑԻԱՆ

Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Մ. Լ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է խոշոր եղջերավոր անասունների լյարդի արգինազայի ֆոտոինակտիվացումը մեթիլենային կապույտի ներկայությամբ տեսանելի լույսով ճառագայթելիս: Ակտիվության անկման կախվածությունը ճառագայթման ժամանակից ունի էքսպոնենցիալ բնույթ: Սուբստրատը և ինհիբիտորները մասամբ պաշտպանում են ֆերմենտը ինակտիվացումից:

Ուսումնասիրվել է նաև արգինազայի մոդիֆիկացիան դիէթիլպիրոկարբոնատով, որը փոխազդելով ֆերմենտի հիստիդինի մնացորդների հետ, առաջացնում է արգինազայի ակտիվության անկում: Փորձերի արդյունքներից ելնելով ենթադրվում է, որ հիստիդինի երկու մնացորդները կարևոր դեր են խաղում արգինազայի ակտիվության մեջ:

PHOTOOXIDATION AND CHEMICAL MODIFICATION
OF HISTIDYL RESIDUES OF ARGINASE

M. A. DAVTIAN, M. L. GEVORKIAN

The photoinactivation of cattle liver arginase solution by irradiation with visible light in the presence of sensiblilzator (metnylene blue) has been investigated. The dependence of decrease of activity on irradiation time has an exponential character. The inactivation rate increases at alkaline medium of pH. The substrate and inhibitors partly protect enzyme from inactivation. Modification of arginase by diethylpyrocarbonate also decreases the enzyme activity. On the base of experimental data it has been supposed that only 2 histidyl residues in the molecule of arginase are connected with enzyme activity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян М. Л., Закарян А. Е., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 27, 9, 44, 1971.
2. Геворкян М. Л., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 29, 3, 32, 1976.
3. Гончар Н. А., Мардашев С. Р. Биохимия, 35, 2, 224, 1970.
4. Давтян М. А., Геворкян М. Л. Биолог. ж. Армении, 32, 5, 435, 1979.
5. Chatterjee G. C., Noltman E. A. Eur. J. Biochem., 2, 9, 1, 1967.
6. Fan Ch. C., Stegeman W. J., Plaut G. W. E. Arch. Biochem. and biophys., 184, 1, 125, 1977.
7. Juwali N., Sainis J. K., Sane P. V. Phytochemistry, 17, 9, 1527, 1978.
8. Little G. Biochem. J., 167, 2, 399, 1977.
9. Makino H., Inada J. Biochem. et biophys. acta, 295, 2, 543, 1973.
10. Menezes L., Grousselle M., Fudles J. Eur. J. Biochem., 30, 1, 81, 1972.
11. Muhtrad A., Hegyl G., Toth G. Acta biochim. et biophys. Acad. Sci. Hung., 2, 1, 19, 1967.
12. Muszynska G., Severina L. O., Lobyreva L. W. Acta biochim. pol., 19, 2, 109, 1972.

13. *Ovadi J., Lliber S., Elodi P.* Acta biochim. et biophys. Acad. Sci. Hung.. 2, 4, 455, 1967.
14. *Scoffone E., Jori G., Galiazzo G.* Chem. Reactiv. and Biol. Role of Func. Groups in Enzymes, Biochem. Soc. Symp., Oxford, London, New York, 31, 163, 1970.
15. *Soon G. Y., Shepherd M. G., Sullivan P. A.* Biochem. J., 165, 2, 385, 1977.
16. *Soru E., Zaharia O.* Rev. roum. biochim., 13, 1, 49, 1976.
17. *Thome Beau F., Le Thi Lan, Olomucki A., Thoai N. V.* Eur. J. Biochem., 19, 270, 1971.
18. *Tsukamoto J., Joshinaga T., Sano S.* Biochem. and biophys. Res. Communs., 67, 1, 294, 1975.