ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXIV, 1, 77—82, 1981

УДК 591.1.05

НЕКОТОРЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОФЕРМЕНТОВ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ КУР

Т. Г. АРУТЮНЯН, С. А. КАРАПЕТЯН, Н. Дж. ДЖАКУДЖЯН

Исследовались некоторые кинетические свойства (Km, Ki) изоферментов аргиназы печени в эмбриогенезе кур. Показано, что они сильно отличаются сродством к L-аргинину. L-лизин и L-орнитин конкурентно ингибируют аргиназную активность второго изофермента. Ингибирование ГАМК активности первого изофермента также носит конкурентный характер. Пролин же неконкурентно ингибирует первую аргиназную активность.

Ключевые слова: печень, изоферменты аргиназы, кинетические свойства, аминокислоты.

Анализ многочисленных литературных данных и результатов исследований, проведенных в сравнительно-эволюционном аспекте, выявил широкое биологическое распространение аргиназы и существование в природе по крайней мере двух молекулярных форм ее, уреотелической и неуреотелической [2]. Согласно выдвинутому М. А. Давтяном объяснению, уреотелическая аргиназа присутствует в печени только уреотелических животных и участвует в механизме нейтрализации аммиака, функционируя в орнитиновом цикле мочевинообразования, неуреотелическая же не связана с этим процессом и широко представлена в биологическом мире. Вопрос о роли последней полностью не выяснен. Имеются лишь отдельные, требующие дополнительных экспериментов доказательства об участии этой формы в лимитировании концентрации однозамещенных гуанидиновых соединений, в биосинтезе аргининбогатых белков, а также пролина [11, 17].

В нашей лаборатории на метаморфозирующих организмах [1] установлено, что при метаморфозе лягушки в процессе становления уреотелизма происходит значительная индукция одного из изоэнзимов аргиназы, очевидно, уреотелической природы. При метаморфозе тутового шелкопряда [4] также отмечаются количественные и качественные сдвиги в изоэнзимном спектре фермента. На стадии гусеницы, когда проявляется активность всех ферментов орнитинового цикла, индуцируется активность одного из изоэнзимов аргиназы, вероятно, уреотелического.

Определенные количественные и качественные сдвиги в изоэнзимном спектре аргиназы происходят и у куриного эмбриона, в эмбриогенезе которого отмечаются все три типа азотистого катаболизма [5, 7, 14].

М. А. Давтяном и сотр. установлено, что по мере развития эмбрио-

на происходит резкий спад активности одного из пиков изоэнзимного спектра аргиназы. Предполагается, что этот изофермент имеет прямое отношение к орнитиновому циклу и не исключается его уреотелическая природа.

С целью выяснения вопроса о множественности молекулярных форм аргиназы и их роли в возможных превращениях аргинина исследовались некоторые кинетические свойства (Km, Ki) выявленных нами изоферментов аргиназы печени и целого эмбриона кур в течение развития.

Материал и методика. Объектом служил куриный эмбрион породы Леггорн. Исследовались печень и эмбрион в разные дни (4, 6, 9, 11, 15, 18, 21) эмбриогенеза. Гомогенизацию проводили в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер-Эльведжема со стеклянным пестиком. Гомогенат (30%) готовили на калий-фосфатном буфере (pH 7,4). Разделение белков проводили на колонке с сефадексом G-100, уравновешенным 0,02 М калий-фосфатным буфером. Объем нанесенного на колонку супернатанта составлял 4 мл. Концентрацию белка определяли по интенсивности поглощения света при 280 нм. Далее в отобранных пробах определяли аргиназную активность методом Ратнер [16] с последующим определением мочевины по Арчибальду [9]

Из кинетических свойств выявленных молекулярных форм аргиназы определяли константы Михаэлиса (Km) на L-аргинин и константы ингибирования (Ki).

Величину Km (инкубационная среда: глициновый буфер—0,05 М, pH 9,5; $MnCl_2$—5 мкмоль; объект—1 мл; L-аргинин—10—600 мкмоль; общий объем—3 мл) определяли методом Лайнуивера-Бэрка [6]. Ki определяли графическим методом Диксона [6]. Инкубационная среда та же. L-аргинин применяли в следующих концентрациях: 150, 300 мкмоль—для первого пика и 300, 500 мкмоль—для второго. В качестве ингибиторов аргиназы использовали L-лизин, L-орнитин, L-пролин, ГАМК (в количестве 1—20 мкмоль на пробу).

Результаты и обсуждение. Как видно из приведенной таблицы, изоферменты аргиназы сильно отличаются сродством к L-аргинину. В то время как первый изоэнзим обладает низким сродством (Km—220—280 mM) и этот уровень сохраняется и на последующих этапах развития, второй, наоборот, проявляет высокое сродство (5,0—55 mM), сильно изменяющееся в течение развития.

Сравнивая полученные нами данные с литературными [15], можно сказать, что первая аргиназная активность (Km 220—280 mM) соответствует уреотелической аргиназе, а Km второго фермента изменяется в течение развития эмбриона: оно варьирует от 5,0 (2—6-дневный эмбрион) до 55 mM, т. е. начиная с 9-го дня развития сродство к L-аргинину падает в 10 раз. Интересно, что с 18-го дня развития эмбриона и затем у цыплят этот изоэнзим не проявляется. Приведенные данные дают возможность предположить, что в течение развития эмбриона действуют более двух изоэнзимов аргиназы.

В литерагуре имеются данные об ингибировании аргиназы различных организмов орнитином, лизином, ГАМК. Кроме того, есть сведения, что в печени и почках крысы, печени овцы, в опухоли молочной железы мышей [12, 13] пролин также ингибирует аргиназную активность

Из данных таблицы видно, что молекулярные формы аргиназы печени при воздействии различных аминокислот ингибируется по-разному. В то время как L-пролин и ГАМК ингибируют первый изофермент и не

Таблица

Значения Km, Ki изоферментов аргиназы печени в эмбриогенезе кур

Дни развития	I пик					II пик				
	Km 10^{-2} М	Ki 10^{-3} М				Km 10^{-2} М	Ki 10^{-3} М			
		L-орн	L-лиз	L-про	ГАМК		L-орн	L-лиз	L-про	ГАМК
4	28	—	—	7,5	8,9	0,48	2,9	5,0	—	—
6	22	—	—	7,5	8,7	0,50	2,8	4,8	—	—
9	25	—	—	7,2	8,8	5,4	3,0	5,1	—	—
11	22	—	—	7,8	9,2	5,5	3,2	5,0	—	—
15	25	—	—	7,5	9,1	5,4	2,9	5,2	—	—
18	28	—	—	7,3	9,3	—	—	—	—	—
Цыплята 1 дня	22	—	—	7,2	9,0	—	—	—	—	—

вляют на второй, L-лизин и L-орн, наоборот, ингибируют второй и не оказывают действия на первый. Это свидетельствует о функциональном различии молекулярных форм аргиназы в обмене аргинина.

Кривые, приведенные на рис. 1—3, показывают характер ингибирования изоферментов аргиназы L-лизином, L-орнитином, L-пролином и ГАМК. L-лизин и L-орн, которые ингибируют вторую аргиназную

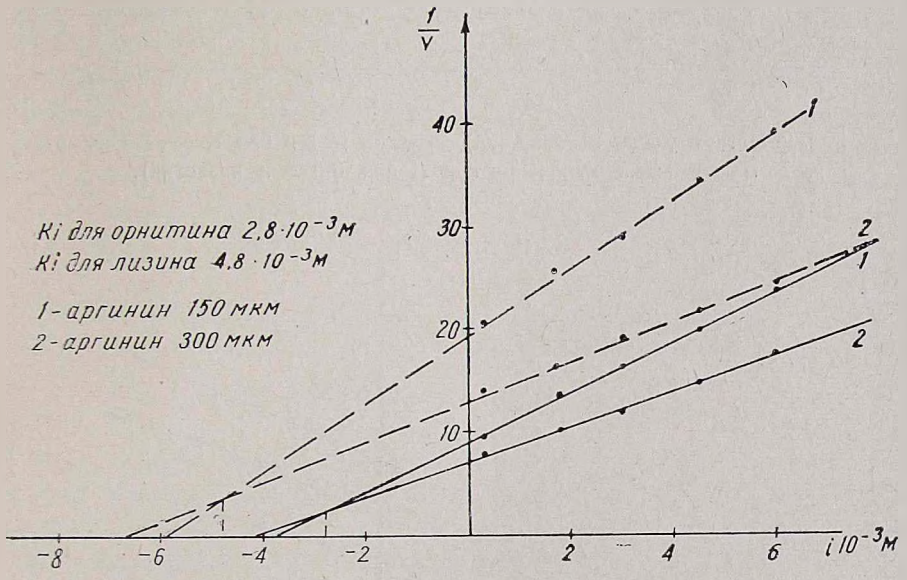

Рис. 1. Ингибирующее влияние (Ki) орнитина (—) и лизина (— —) на аргиназу печени эмбрионов кур (II пик, 6-й день развития).

активность, проявляют конкурентный характер ингибирования. Ингибирование ГАМК активности первого фермента также носит конкурентный характер. Пролин же неконкурентно ингибирует первую аргиназ-

ную активность. Такой характер ингибирования можно объяснить структурной специфичностью пролина, вследствие чего он не взаимодействует с активным центром фермента. Можно считать также, что первый изофермент аргиназы печени эмбриона обладает иным стереоспецифическим центром, чем и объясняется неконкурентный характер ингибирования. Нужно отметить, что в литературе есть достаточно данных о конкурентном ингибировании аргиназы различных организмов орнитином, лизином, ГАМК, в то время как относительно неконкурентного ингибирования пролином сведения весьма ограниченные [3].

Нами были определены также Ki изоферментов аргиназы при воздействии указанных аминокислот графическим методом Диксона [6], (рис. 1—3, табл.).

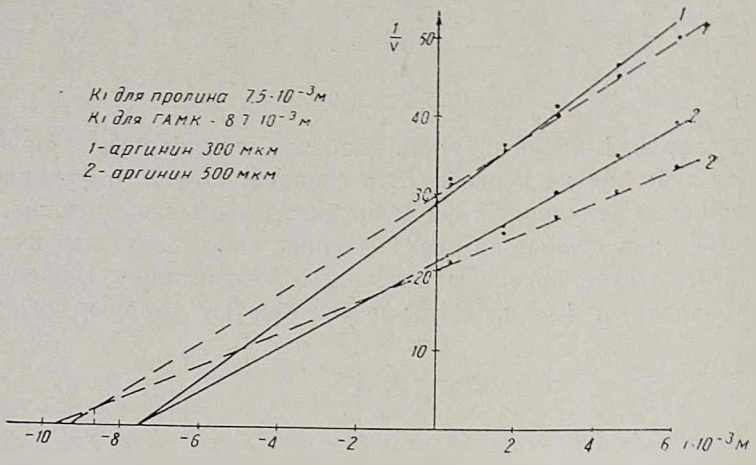

Рис. 2. Ингибирующее влияние (Ki) пролина (—) и ГАМК (— —) на аргиназу печени эмбрионов кур (I пик, 6-й день развития).

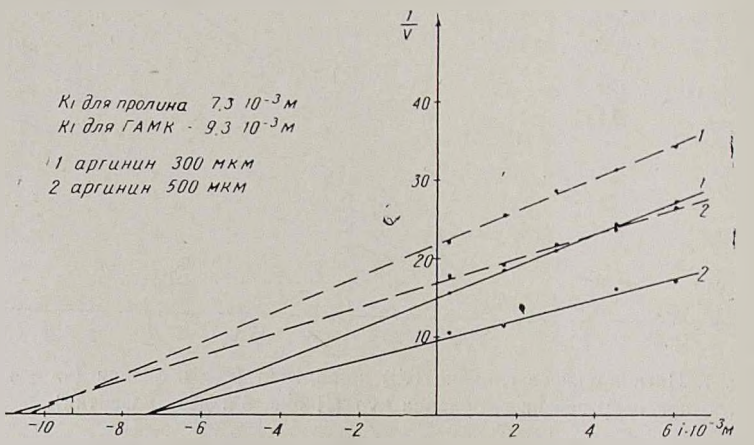

Рис. 3. Ингибирующее влияние (Ki) пролина (—) и ГАМК (— —) на аргиназу печени эмбрионов кур (I пик, 18-й день развития).

Согласно литературным данным, аргиназы различных организмов имеют Ki для орнитина $1,5—1,0 \cdot 10^{-3}$ [10], для лизина—$2,5—6,3 \cdot 10^{-3}$ [17], для ГАМК—$10 \cdot 10^{-3}$ [8], а для пролина—$8,6 \cdot 10^{-3}$ [3].

Итак, в печени развивающегося эмбриона кур методом гельфильтрации выявлены два изофермента аргиназы, отличающиеся друг от друга молекулярным весом, сродством к аргинину и регуляторными механизмами.

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

Поступило 22.III 1980 г.

ԼՅԱՐԴԻ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՈՐՈՇ ԿԻՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՀԱՎԻ ՍԱՂՄԻ ԶԱՐԳԱՑՄԱՆ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ

Տ. Գ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Ս. Ա. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Ն. Ջ. ՋԱԿՈՒՋՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են հավի սաղմի զարգացման ընթացքում լյարդի արգինազայի իզոֆերմենտների որոշ կինետիկական հատկությունները (Km, Ki)։ Բացահայտվել է, որ արգինազայի իզոֆերմենտները խիստ տարբերվում են իրենց խնամակցությամբ դեպի L-արգինինը, առաջին իզոֆերմենտն օժտված է ցածր խնամակցությամբ, իսկ երկրորդը՝ ընդհակառակը, ցուցաբերում է բարձր խնամակցություն, որը խիստ տատանվում է զարգացման ընթացքում։ Որոշված են լյարդի արգինազայի իզոֆերմենտների Ki՝ L-լիզինի, L-օրնիտինի, L-պրոլինի, ԳԱԿԹ-ի ազդեցության պայմաններում։ L-պրոլինը և ԳԱԿԹ-ն արգելակում են առաջին իզոֆերմենտի ակտիվությունը և չեն ազդում երկրորդի վրա, իսկ L-լիզինը և L-օրնիտինը՝ ընդհակառակը, արգելակում են երկրորդը և չեն ազդում առաջինի վրա։ L-լիզինը և L-օրնիտինը մրցութային արգելակման են ենթարկում երկրորդ իզոֆերմենտի արգինազային ակտիվությունը։ Առաջին արգինազային ակտիվության արգելակումը ԳԱԿԹ-ով նույնպես կրում է մրցութային բնույթ։ Իսկ պրոլինը, որը արգելակման է ենթարկում առաջին արգինազային ակտիվությունը, ցուցաբերում է ոչ մրցութային արգելակում։

SOME KINETIC PROPERTIES OF ISOENZYMES OF LIVER ARGINASE IN HEN EMBRYOGENESIS

T. G. HARUTUNIAN, S. A. KARAPETIAN, N. J. JAKUGIAN

Some kinetic properties (Km, Ki) of liver arginase isoenzymes in hen embryogenesis have been studied. It has been shown that arginase isoenzymes are distinguished by affinity to L-arginine: the first isoenzyme possesses low affinity (Km—220—280 mM), while the second on the contrary shows high affinity (50—55 mM), which is strongly changeable during development. L-lysin and L-ornithine inhibit competitively the second arginase isoenzyme activity. Inhibition of GABA activity of first enzyme has also a competitive character. Proline which inhibits the first arginase isoenzyme activity shows noncompetitive inhibition.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Барсегян Э. Х., Никогосян Ф. Ц., Давтян М. А.* Биолог. ж. Армении, *30*, 6, 12, 1977.
2. *Давтян М. А.* Докт. дисс., Ереван, 1970.
3. *Давтян М. А., Агаджанян А. Х., Заробян Т. Я.* Биолог. ж. Армении, *29*, 6, 1976.
4. *Давтян М. А., Арутюнян Т. Г., Хачатрян М. А.* Биолог. ж. Армении, *29*, 7, 28, 1976.
5. *Джакуджян Н. Дж., Арутюнян Т. Г., Хачатрян М. А., Давтян М. А.* Межвузовск. сб. науч. тр., 1, 100, 1979.
6. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты, М., 1966.
7. *Ковальский В. В., Дубинская Н. И., Исаченков В. И.* ДАН СССР, *182*, 5, 1435, 1968.
8. *Саруханян Ж. Г., Давтян М. А.* Биолог. ж. Армении, *26*, 5, 1973.
9. *Archibald R. M.* J. Biol. Chem., 156, 121, 1944.
10. *Baret R., Mourgue M., Broc A.* Compt. Rend. Soc. Biol., *158*, 1914, 1964.
11. *Yip M. C. M., Knox W. E.* Biochem. J., *127*, 893, 1972.
12. *Kaysen G. A., Strecker H. J.* Biochem. J., *133*, 779, 1973.
13. *Kesava Rao R., Pai S., Joung F.* Cancer., *30*, 12, 1974.
14. *Needham J.* Chemical embryology, *2*, Cambridg Univ. Press, London, 1931.
15. *Porembska Z,* Enzym Cont., 15, 1—6, 198, 1973.
16. *Ratner S., Pappas A.* Biochem. J., *179*, 1183, 1949.
17. *Reddy S. R., Campbell J. W.* Biochem, J., *115*, 3, 495, 1969.