

ЗНАЧЕНИЕ SH-ГРУПП И ГИСТИДИНОВЫХ ОСТАТКОВ В ПРОЯВЛЕНИИ АКТИВНОСТИ ДРОЖЖЕВОЙ АРГИНАЗЫ

Л. Р. ТУМАНЯН, С. В. ЧУБАРЯН, Р. О. ТОРЧЯН, А. С. МОВСЕСЯН

Показано наличие SH-групп в активном центре аргиназы дрожжей *Candida guilliermondii* var. *membranaefaciens*. На важное значение гистидиновых остатков в проявлении активности аргиназы указывает ингибирование ее специфическим модификатором гистидиновых остатков диэтилпирокарбонатом.

Ключевые слова: дрожжи, аргиназа, SH-группы, гистидиновые остатки.

К настоящему времени наиболее очищена и полнее охарактеризована печеночная аргиназа крыс, кролика, быка [5, 11, 12]. Некоторые физико-химические свойства, молекулярный вес и олигомерная структура нативного фермента весьма схожи [5, 12]. Значительно менее изучен этот фермент у микроорганизмов, хотя в последнее десятилетие появились работы, сделанные на очищенной аргиназе из *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Corynebacterium* [9, 10, 13].

Цель наших исследований состояла в выяснении роли SH-групп и гистидиновых остатков в проявлении активности дрожжевой аргиназы.

Материал и методика. Объектом исследования служили дрожжи *Candida guilliermondii* var. *membranaefaciens* ВКМ У-43. Выращивание и разрушение клеток, очистка фермента, определение аргиназной активности и белка проводились по ранее описанным методикам [2, 3]. Электрофорез проводился в щелочной буферной системе, рекомендованной Орнштейном и Девисом [8]. Реагенты на тиоловые группы—пара-хлормеркурибензоат (ПХМБ), парабензохинон, иодацетат и иодацетамид—добавлялись в концентрациях, указанных в соответствующих таблицах, непосредственно в инкубационную среду, где определялась аргиназная активность, перед добавлением аргинина. В опытах по химической модификации гистидиновых остатков раствор аргиназы готовили в 0,05 М фосфатном буфере, рН 6,0. Диэтилпирокарбонат (ДПК) добавляли холодным абсолютным этиловым спиртом непосредственно перед употреблением. К 2,5 мл ферментного препарата (около 0,5 мг белка) добавляли 0,1 мл раствора ДПК, объем смеси буфером доводили до 2,9 мл. По истечении 30 мин брали пробы для определения аргиназной активности.

Результаты и обсуждение. Прежде чем приступить к опытам по влиянию реагентов на тиоловые группы и химической модификации гистидиновых остатков на аргиназную активность выделенного нами ферментного препарата, мы попытались определить степень его чистоты. С этой целью полученный нами в результате нескольких стадий очистки ферментный препарат [2] после лиофилизации подвергался электрофорезу на полиакриламидном геле. Результаты электрофореза (рис., а) обнаружили недостаточную чистоту препарата. Было получено 8 белковых полос, одна из которых была сильно выражена. Для достижения большей степени чистоты ферментного препарата разработанная нами схема очистки была несколько видоизменена: на послед-

нем этапе, при гельфильтрации, сефадекс G-50 был заменен сефадексом G-150. На электрофореграмме проявились всего три белковые полосы, с четко выраженной одной, по всей вероятности, аргиназой (рис., б). Об эффективности замены сефадекса, кроме данных электрофореза, свидетельствует также повышение степени очистки фермента—96 вместо 79.

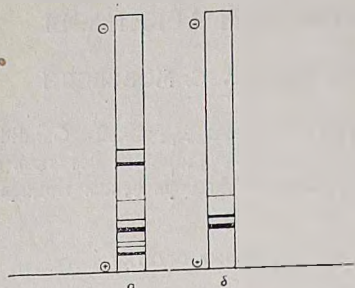


Рис. Электрофореграмма аргиназного препарата *S. guilliermondii* var *membranaefaciens* разной степени очистки.

Все исследованные нами реагенты на тиоловые группы оказались эффективными ингибиторами дрожжевой аргиназы, что указывает на наличие SH-групп в активном центре фермента. ПХМБ—специфический реагент на тиоловые группы—использовался в концентрациях 10^{-4} и 5×10^{-9} М (табл. 1). Он оказался очень эффективным ингиби-

Таблица 1
Влияние ПХМБ и ПХМБ в комбинации с меркаптоэтанолом и глутатионом на дрожжевую аргиназу

Концентрация реагентов, М	Активность					
	ПХМБ		ПХМБ+Глутатион		ПХМБ+МЭ	
	мкМ мочевины	%	мкМ мочевины	%	мкМ мочевины	%
Контроль	35,0	100	35,0	100	35,5	100
10^{-4}	0	0	0	0	0	0
5×10^{-5}	0	0	0	0	3,7	10,5
$2,5 \times 10^{-5}$	0	0	0	0	9,9	28,2
10^{-5}	0	0	0	0	14,5	41,4
5×10^{-6}	0	0	0,8	2,2	19,2	54,8
10^{-6}	0,6	0,7	0,9	2,5	28,4	81,1
5×10^{-7}	1,2	3,4	1,6	4,5	30,9	88,2
10^{-7}	3,4	9,7	6,7	19,1	43,1	123,1
5×10^{-8}	12,6	36,0	14,1	40,1	39,9	114,0
10^{-8}	27,5	78,5	18,4	52,5	28,7	82,0
5×10^{-9}	28,7	82,5	31,9	91,1	25,1	71,7

тором для выделенного нами препарата: при концентрациях 10^{-4} — 10^{-6} наступило полное ингибирование фермента. Используемые в эквимольных с ингибитором концентрациях восстанавливающие агенты глутатион (восстановленный) и меркаптоэтанол, обладающие защитным действием на тиоловые группы, в различной степени предохра-

няли фермент от ПХМБ. Интересно, что глутатион оказывал лишь незначительное защитное действие, тогда как в случае с меркаптоэтано-
лом сохранялось более 50% активности фермента при концентрации 5×10^{-6} М. С уменьшением концентрации ингибитора и меркаптоэтано-
ча этот эффект усиливался. При концентрациях 10^{-7} и 5×10^{-8} М об-
наруживалось даже некоторое стимулирование активности. Из данных
литературы, однако, известна устойчивость аргиназы печени крупного
рогатого скота к ПХМБ [7]. Для убеждения в достоверности получен-
ных нами данных были проведены соответствующие эксперименты и на
аргиназе печени крупного рогатого скота. Оказалось, что даже в кон-
центрации 10^{-4} М ПХМБ не оказывал никакого влияния на активность
фермента.

Влияние парабензохинона, иодацетата и иодацетамида на активность
дрожжевой аргиназы оказалось сходным с действием ПХМБ (табл. 2).

Таблица 2

Влияние разных концентраций иодацетата, иодацетамида и парабензохинона
на аргиназную активность

Концентра- ция реаген- тов, М	А к т и в н о с т ь				Концентра- ция реаген- тов, М	А к т и в н о с т ь	
	иодацетат,		иодацетамид,			парабензохинон,	
	мкМ мо- чевины	%	мкМ мо- чевины	%		мкМ мо- чевины	%
Контроль	35,6	100	35,6	100	Контроль	25,6	100
7×10^{-2}	2,3	6,4	2,3	6,4	5×10^{-3}	8,3	20,5
$3,5 \times 10^{-2}$	3,5	9,8	2,7	7,5	10^{-4}	18,8	50,5
10^{-2}	2,7	7,5	6,4	17,9	$7,5 \times 10^{-5}$	21,3	59,8
5×10^{-3}	4,1	11,5	5,6	15,7	5×10^{-5}	22,0	61,7
10^{-3}	10,5	29,4	11,3	31,7	$2,5 \times 10^{-5}$	30,6	85,0
5×10^{-4}	18,1	50,8	13,5	37,9	10^{-5}	33,6	94,3
10^{-4}	31,2	87,6	21,6	60,5	5×10^{-6}	38,4	107,8

Парабензохинон при концентрации 5×10^{-3} М ингибировал фермента-
тивную активность на 80%. Подавляющий эффект ингибитора с умень-
шением концентрации ослаблялся: при концентрации 5×10^{-6} М
обнаруживалось незначительное стимулирование активности. Действие
иодацетата и иодацетамида проявлялось при более высоких concentra-
циях: концентрация 7×10^{-2} М оказывала значительное ингибирующее
влияние—на 95%, с уменьшением концентрации оно ослаблялось. Хотя
иодацетат и иодацетамид легко вступают в реакцию с SH-группами
белков, образуя карбоксиметильные производные, ее нельзя считать
специфической для тиоловых групп. Эти соединения могут комбини-
роваться и с реакционноспособными группами гистидина, лизина и ме-
тионина при pH в пределах 7–10 [6]. Следовательно, можно допу-
стить, что одна из этих аминокислот играет роль в проявлении актив-
ности дрожжевой аргиназы.

Исходя из сказанного, мы попытались установить наличие гистиди-
новых остатков в выделенном нами ферменте, используя метод специ-

фической модификации гистидиновых остатков. Самым эффективным и применяемым в последние годы химическим модификатором гистидиновых остатков является ДПК. При pH 6,0 он избирательно модифицирует имидазольное кольцо гистидина [4]. Согласно данным нашей лаборатории [1], ДПК в концентрации $4,2 \times 10^{-5}$ М на 50% ингибирует активность аргиназы печени крупного рогатого скота. Методом химической модификации показано, что в проявлении активности фермента участвуют два из 30-ти модифицированных остатков гистидина. В наших экспериментах также оказалось, что высокая концентрация ДПК ($2,1 \times 10^{-2}$ М) полностью подавляет активность дрожжевого фермента. С уменьшением концентрации ингибитора наблюдается постепенное восстановление активности. При концентрации $4,2 \times 10^{-3}$ М активность фермента составляет около 25% от контроля. Полное восстановление ее наступает при концентрации $4,2 \times 10^{-4}$ М. Результаты данной серии экспериментов четко указывают на значительную роль гистидиновых остатков в активном центре аргиназы дрожжей.

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

Поступило 30.IX 1982 г.

SH—ԽՄԲԵՐԻ ԵՎ ՀԻՍՏԻԴԻՆԱՅԻՆ ՄՆԱՅՈՐԴՆԵՐԻ ՆՇԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽՄՈՐԱՍՆԿԱՅԻՆ ԱՐԳԻՆԱԶՍԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԱՐՏԱՀԱՅՏՄԱՆ ՀԱՄԱՐ

Լ. Ռ. ԹՈՒՄԱՆՅԱՆ, Ս. Վ. ՉՈՒԲԱՐՅԱՆ, Ռ. Օ. ԹՈՐՉԻԱՆ, Հ. Ս. ՄՈՎՍԵՍՅԱՆ

Թիոլային խմբերի վրա ազդող ռեագենտների միջոցով ցույց է տրվել SH-խմբերի առկայությունը խմորասնկային արգինազայի ակտիվ կենտրոնում: Հիստիդինային խմբերի առանձնահատուկ մոդիֆիկատոր դիէթիլպիրոկարբոնատի ընկճող ազդեցությունը վկայում է խմորասնկային արգինազայի պրեպարատի ակտիվության համար հիստիդինային մնացորդների կարևոր նշանակության մասին:

THE IMPORTANCE OF SH-GROUPS AND HISTIDINE RESIDUA FOR THE EXPRESSION OF YEAST ARGINASE ACTIVITY

L. R. TUMANIAN, S. V. CHUBARIAN, R. O. TORCHIAN, H. S. MOVSESIAN

The presence of SH-groups in the active centre of the yeast arginase has been shown by means of reagents, which influence on the thiol groups. The inhibitory action of histidine groups specific modifier diethylpyrocarbonate shows the great importance of histidine residua for the yeast arginase preparations.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Давтян М. А., Геворкян М. Л. Биолог. ж. Армении, 33, 9, 1980.
2. Давтян М. А., Чубарян С. В., Туманян Л. Р. Биолог. ж. Армении, 32, 9, 1979.

3. Чубарян С. В., Тер-Карпетян М. А., Туманян Л. Р. Биолог. ж. Армении, 24, 8, 1971.
4. Gurd F. R. N. Methods in Enzymology, 2, 532, 1967.
5. Hirsch—Kolb H., Greenberg D. M. J. Biol. Chem., 243, 6123, 1968.
6. Mühlrad A., Heggl J., Toth J. Acta Biochim. Biophys., 2, 19, 1967.
7. Muszynska G., Severina L. O., Lobireva L. W. Acta Biochim. Polon., 192, 169, 1972.
8. Ornstein L. Davis B. J. Deliv. at the Soc for the Study of Blood at the New York Acad. Med., 1959.
9. Penninckx M., Simon J. P., Wiame J. M. Eur. J. Biochem., 49, 429, 1974.
10. Simon J. P., Stalon V. Biochimie, 58, 1419, 1976.
11. Tarrab R., Rodrigues J., Huitron C., Palacios R., Soberon G. Eur. J. Biochem. 49, 457, 1974.
12. Vielle—Bretburd F., Orth G. J. Biol. Chem., 247, 1227, 1972.
13. Yamanaka K., Hara T., Gino M. Ferment Technol., 54, 12, 838, 1976.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 6, 1983

УДК 631.46:634.956

ВЛИЯНИЕ ЛЕСОМЕЛИОРАЦИИ НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ОБНАЖЕННЫХ ПОЧВОГРУНТОВ ОЗЕРА СЕВАН

Э. А. ШАРОВЕВ, Л. А. ХАЧИКЯН

Установлено, что под лесонасаждениями почвогрунты обогащаются тонкодисперсными частицами и органическими веществами, создающими благоприятные условия для формирования микробных ассоциаций. Численность и состав целлюлозоразрушающих аэробных микроорганизмов могут служить диагностическим показателем биологического процесса почвообразования.

Ключевые слова: обнаженные почвогрунты, оз. Севан, микроорганизмы, лесомелиорация.

Использование вековых запасов вод озера Севан для ирригационных и энергетических целей привело к обнажению почти 20 тысяч га непригодных для сельского хозяйства донных отложений, освоение которых имеет огромное научное и практическое значение. Эти отложения неодинаковы по механическому и химическому составу, а также водно-физическим свойствам [10, 13].

Лимитирующим фактором протекания почвообразовательных процессов в почвогрунтах является степень влажности, зависящая в основном от уровня залегания грунтовых вод [9]. Исследованию биологических процессов в обнаженных донных отложениях озера Севан посвящены работы ряда авторов [1, 3—7, 11—13]. Нами изучалось влияние лесонасаждений на микробиологическую активность почв с учетом степени увлажнения, механического и химического состава с целью определения направленности почвообразовательного процесса.

Материал и методика. Микробиологические исследования проводились на новообнаженных, еще неосвоенных, а также старообнаженных с различной степенью