

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА SH-ГРУПП И ГИСТИДИНОВЫХ ОСТАТКОВ В ДРОЖЖЕВОЙ АРГИНАЗЕ

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

Обнаружен восстанавливающий эффект восстановленного глутатиона и меркаптоэтанола на дрожжевую аргиназу при предынкубировании ферментного препарата с парахлормеркурибензоатом. Установлено наличие 24,5 быстрореагирующих SH-групп в молекуле выделенной нами дрожжевой аргиназы. Диэтилпирокарбонат в концентрации $4,2 \times 10^{-4}$ M подвергает модификации 6—7 остатков гистидина, что сопровождается падением ферментативной активности.

Հայտնաբերվել է վերականգնված գլուտաթիոնի և մերկապտոէթանոլի վերականգնիչ առեցուցիչը խմորասեղանի արգինազայի ակտիվության վրա՝ ֆերմենտային պրեպարատը պարաքլորմերկուրիբենզոատի հետ ինկուբացիայի ենթարկելու դեպքում: Հաստատվել է արգինազայի 24,5 SH-խմբերի ակտիվացման մարրված խմորասեղանի արգինազայի մոլեկուլում: Դիէթիլպիրոկարբոնատը $4,2 \times 10^{-4}$ M կոնցենտրացիայի դեպքում մոդիֆիկացիայի է ենթարկում 6—7 իստիդինային մնացորդ, որի հետևանքով տեղի է ունենում արգինազայի ակտիվության նվազում:

The recovering effect of the recovered glutathion and mercaptoethanol on the yeast arginase during preincubation of enzyme preparation with parachloromercuribenzoate has been found. The presence of 24.5 transitory reacting SH-groups in the molecule of the isolated yeast arginase has been established. 6—7 histidine residues are modulated by 4.2×10^{-4} M diethylpircarbonate, what is followed by the decrease of enzymatic activity.

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

Для получения информации о механизме действия фермента необходимы исследования по выявлению функциональных групп, участвующих в проявлении его активности. Аргиназа в этом отношении изучена недостаточно.

Ранее с помощью реагентов на тиоловые группы—иодацетата, иодацетамида, парабензохинона и парахлормеркурибензоата (ПХМБ)—и специфического модификатора гистидиновых остатков диэтилпирокарбоната (ДПК) нами было показано наличие SH-групп и гистидиновых остатков в аргиназе *Candida guilliermondii var. membranaefaciens* [3], необходимых для проявления активности фермента. Восстанавливающие агенты—глутатион восстановленный и меркаптоэтанол—в различной степени предохраняли активность фермента от действия ПХМБ.

В настоящем исследовании приводятся результаты изучения возможности восстановления аргиназной активности указанными реагентами после воздействия ПХМБ, а также определения числа SH-групп и гистидиновых остатков в молекуле фермента.

Материал и методика. Объектом исследования служили дрожжи *Candida guilliermondii var. membranaefaciens* ВКМ У-43. Выращивание и разрушение клеток, очистку фермента, определение аргиназной активности и белка проводили по ранее описанным методикам [2, 4]. ПХМБ и восстанавливающие реагенты, восстановленный глутатион и меркаптоэтанол, добавляли в концентрациях 10^{-4} — 10^{-8} M. Ци-

сло SH-групп определяли спектрофотометрическим методом Бойера [6]. При химической модификации гистидиновых остатков, проводимой по описанному ранее методу [3], использовали ферментный препарат в фосфатном буфере, рН 6,0. Число модифицированных гистидиновых остатков определяли измерением оптической плотности на спектрофотометре СФ-16, используя $E_{240} = 3,2 \times 10^3$ л/Мхсм.

Результаты и обсуждение. Результаты изучения восстанавливающего эффекта меркаптоэтанола и восстановленного глутатиона приводятся в табл. 1. Восстанавливающий эффект глутатиона при предше-

Таблица 1. Восстановление аргиназной активности меркаптоэтанолом и восстановленным глутатионом после предкубирования дрожжевой аргиназы с ПХМБ

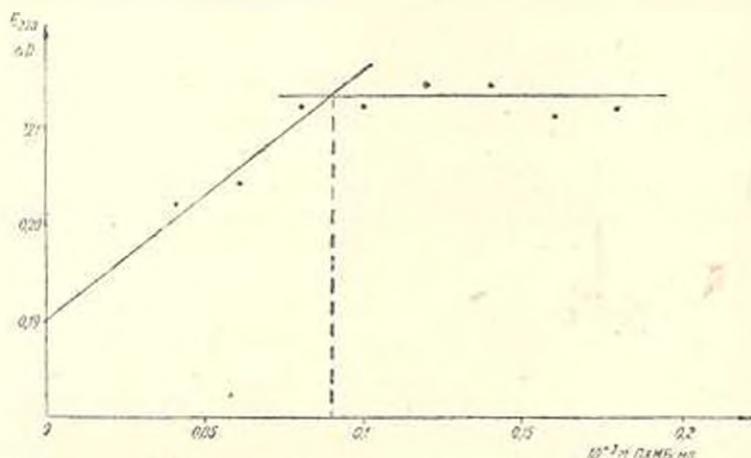
Концентрация, М	Активность, %					
	Предкубирование с аргинином			Предкубирование без аргинина		
	ПХМБ	ПХМБ+МЭ	ПХМБ+Глут- -SH	ПХМБ	ПХМБ+МЭ	ПХМБ+Глут- -SH
10^{-4}	0	0	0	0	0	0
10^{-5}	0	41.7	0	0	0	0
5×10^{-6}	0	67.9	1.2	0	43.0	0
10^{-6}	0	71.8	10.0	0	77.0	0
5×10^{-7}	24.7	67.3	32.7	31.5	69.0	28.6
10^{-7}	25.7	73.7	94.0	79.6	91.0	80.0
10^{-8}	92.7	103.5	100.0	91.2	94.0	94.8

кубировании ферментного препарата с ПХМБ без аргинина начинает проявляться лишь с концентрации 5×10^{-7} М, а в среде с аргинином он обнаруживается уже с концентрации 5×10^{-6} М, что согласуется с результатами изучения действия его при одновременном добавлении его с ПХМБ [3]. Восстанавливающий эффект меркаптоэтанола при предкубировании ферментного препарата с ПХМБ в присутствии аргинина также начинает проявляться с той же концентрации, что и его защитный эффект [3], а при предкубировании без него, как и в случае с глутатионом, он обнаруживается при более низких концентрациях: 10^{-5} М и 5×10^{-6} М. В присутствии аргинина активность равна 41,7 и 67,9%, а без него—0 и 43% соответственно. По всей вероятности, присутствие аргинина при предкубировании с ПХМБ способствует более быстрому восстановлению активности.

Поскольку результаты вышеприведенных и более ранних наших исследований [3] указывают на роль SH-групп в проявлении активности дрожжевой аргиназы, мы попытались определить число сульфгидрильных групп в молекуле нашего фермента.

Для спектрофотометрического определения числа быстрореагирующих сульфгидрильных групп к 3 мл раствора фермента (0,17 мг белка в 1 мл) в кварцевой кювете добавляли по 0,02 мл 10^{-3} М раствора ПХМБ, стандартизованного при длине волны 232 нм. После перемешивания измеряли изменение поглощения при длине волны 250 нм.

Из рис. видно, что дальнейшее добавление раствора ПХМБ после 0,09 мл не сопровождается изменением в поглощении. Подсчитанное на основе этого число свободных быстрореагирующих SH-групп в молекуле фермента (молекулярный вес 151 000 [5]) было равно 25,4.



Число быстрореагирующих SH-групп в молекуле дрожжевой аргиназы.

В следующей серии экспериментов нами исследовалось влияние разных концентраций ДПК на активность дрожжевой аргиназы. Поскольку, согласно данным Давтяна и Геворкян [1], L-аргинин, L-лизин и L-орнитин частично предохраняют аргиназу от инактивирования путем уменьшения числа модифицированных остатков гистидина, исследования проводились также в присутствии указанных аминокислот, которые брались в количестве 50 мкМ на пробу. Данные, представленные в табл. 2, показывают, что при наибольшей из использованных нами

Таблица 2. Зависимость инактивации аргиназы от концентрации ДПК и влияние аргинина, орнитина и лизина на процесс инактивации

Варианты	А к т и в н о с т ь, %					
	4.2×10^{-2}	$2.1 \cdot 10^{-2}$	4.1×10^{-3}	8.4×10^{-4}	2.1×10^{-4}	10^{-4}
ДПК	1.7	9.3	41.4	70.5	76.0	101.0
ДПК + Арг	2.2	2.8	56.3	90.0	98.6	101.0
ДПК + Орн	1.7	2.2	36.0	49.8	61.5	67.7
ДПК + Лиз	2.0	4.9	41.3	51.0	69.5	72.0

концентраций реагента— 4.2×10^{-2} М активность аргиназы фактически полностью подавляется, независимо от присутствия аминокислот. С уменьшением концентрации модификатора наблюдается постепенное восстановление активности фермента. Полное восстановление наступает при концентрации 10^{-4} М. Начиная с концентрации 4.2×10^{-3} М заметно некоторое предохраняющее от действия модификатора влияние аргинина. Трудно объяснить действие конкурентных ингибиторов выде-

Таблица 3. Влияние $4,2 \times 10^{-3}$ М ДПК на активность и модификацию гистидиновых остатков дрожжевой аргиназы. Активность в контрольном варианте (без ДПК)—100%

Время, мин	Без аргинина		С аргинином	
	активность, %	число модифицированных остатков	активность, %	число модифицированных остатков
0.5	74.2	7.5	92.5	6.5
10	27.6	8.5	54.0	10.0
20	20.5	11.0	50.4	13.0
30	13.4	13.5	49.0	15.0
40	12.0	14.0	44.3	15.5
50	10.2	16.5	41.2	17.0
60	9.4	17.0	41.5	17.0

ленной нами аргиназы—орнитина и лизина [5], которые не только не предохраняют фермент от отрицательного действия модификатора, но и несколько снижают его активность по сравнению с вариантом с одним ДПК.

Определение количества гистидиновых остатков в молекуле выделенного нами фермента проводилось спектрофотометрическим методом при длине волны 240 нм. Увеличение поглощения вследствие модификации гистидиновых остатков с образованием карбтоксигистидина прослеживалось с интервалом по 10 мин; параллельно брались пробы для определения аргиназной активности.

Из данных, представленных в табл. 3, видно, что при концентрации ДПК $4,2 \times 10^{-3}$ М сразу по его добавлении в среду без аргинина модификации подвергаются 7,5 остатков гистидина, что сопровождается падением активности аргиназы на 26%. Хотя и в присутствии аргинина число модифицированных остатков почти такое же (6,5), активность падает всего на 8%. Подобный фон сохраняется на протяжении всего периода опыта (60 мин), и к концу его в присутствии аргинина сохраняется 41% активности, а без него—9%. Предохраняющее от инактивирования модификатором действие аргинина, по всей вероятности, связано с благоприятным воздействием его на конформацию фермента.

ЛИТЕРАТУРА

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. Туманян Л. Р., Чубарян С. В., Торчян Р. О., Мовсесян А. С. Биолог. ж. Армении, 35, 6, 1983.
4. Чубарян С. В., Тер-Карпетян М. А., Туманян Л. Р. Биолог. ж. Армении, 24, 8, 1971.
5. Чубарян С. В., Туманян Л. Р., Торчян Р. О., Биолог. ж. Армении, 35, 3, 1983.
6. Boyer P. D. J. Am. Chem. Soc., 76, 4331, 1954.

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

Получено 27.IV 1984 г.