

11. Göring H., Polevov V. V., Stahlberg R., Stumpe G. Plant and Cell Physiol., 20(3) 649, 1970.
12. Goldsmith M. H. M. Planta, 155, 1, 63, 1982.
13. Goldsmith M. H. M., Goldsmith T. H. Planta, 153, 1, 25, 1981.
14. Murphy G. J. P. Plant Sci. Lett., 2, 183, 1979.
15. Pesci P., Corucci S. M., Randazzo G. Plant, Cell and Environ., 2, 205, 1979.
16. Rayle D. L., Evans M. L., Hertel R. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 65, 184, 1972.
17. Vredenberg W. Ion transport in plants. (W. Anderson), London, Acad Press, 15, 1973.
18. Zientara M. Acta Soc. Bot. Pol., 52, 3-4, 279, 1983.

Поступило 2.VII 1985

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 6, стр. 502—507, 1986

УДК 591.1.0

ФОТООКИСЛЕНИЕ И ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОСТАТКОВ ГИСТИДИНА И ТРИПТОФАНА В АРГИНАЗЕ ПЕЧЕНИ ЭМБРИОНОВ КУР

Т. Г. АРУТЮНЯН, С. А. КАРАПЕТЯН, А. Ж. АБРАМЯН, А. М. ДАВТЯН

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

Аннотация — Фотоннактивация и ингибирование очищенной аргиназы печени 18-дневного куриного эмбриона специфическими модификаторами диэтилпирокрбонатом и N-бромсукцинимидом указывают на значение остатков гистидина и триптофана в проявлении активности фермента. Субстрат защищает модифицированный фермент от инактивации. Сделано предположение об участии этих аминокислот в формировании активного центра и поддержании названной конформации фермента.

Անոտացիա — Հավի 18 օրական ազդի լյարդի մաքրված արգինազայի ֆունկցիոնալիտեի և րեկտումը յուրաքանչյուր մոդիֆիկատորներով՝ դիէթիլպիրոկարբոնատով և N-բրոմսուկցինիմիդով, ցույց են տալիս չիստիդինի և տրիպտոֆանի մնացորդների դերը ֆերմենտի ակտիվության արտահայտման գործում: Սուբստրատը պաշտպանում է մոդիֆիկացված ֆերմենտը ֆունկցիոնալիտեից: Ենթադրվում է, որ վերոհիշյալ ամինաթթուները մասնակցում են ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի մեա-գործանք և նրա րնական կոնֆորմացիայի պահպանմանը:

Abstract — Photoinactivation and inhibition of 18-days hen embryo liver purified arginase by specific modifiers (diethylpyrocarbonate and N-bromosuccinimide) point out the importance of histidine and tryptophane residues for the expression of enzyme activity. The substratum protects the modified enzyme from inactivation. It is supposed that these amino acids participate in the formation of active centre and supporting of the enzyme native conformation.

Ключевые слова: эмбриогенет. кур. аргиназа, изоферменты, модификаторы.

Метаболическая роль аргиназы из тканей различных организмов определяется их физико-химическими, кинетическими свойствами [2, 8, 12], а также строением и свойствами активного центра [5, 6, 8, 9, 15]. К

настоящему времени методами химической модификации исследованы структурные особенности, функциональная роль отдельных аминокислотных остатков очищенной печеночной аргиназы крысы, кролика, быка [3, 6, 9]. Известно большое число реагентов, избирательно взаимодействующих при определенных условиях с отдельными аминокислотными остатками в белках. Они широко используются для определения SH-групп тирозина, OH-групп серина, гидроксила триптофана, фенольной группы тирозина, имидазола гистидина, ϵ -аминогруппы лизина, гуанидиновой группы аргинина, карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот [4, 9].

Целью настоящего исследования являлось выявление роли гистидиновых, триптофановых остатков в проявлении активности очищенной аргиназы печени 18-дневного куриного эмбриона.

Материал и методика. Объектом исследований служил эмбрион кур породы леггорн. Исследовалась печень эмбрионов кур 18-го дня развития.

Аргиназную активность и белок определяли ранее описанными методами [1]. Электрофорез проводили в щелочной буферной системе, рекомендованной Орштейном и Дэвисом [11]. Сенсибилизированное красителем фотоокисление аргиназы проводили в открытой термостатированной кювете диаметром 3,5 см при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки (20°). Растворы фермента с метиленовым синим (4 мл) облучали видимым светом (лампа накаливания 150 Вт) на расстоянии 15 см от основания кюветы. Модификацию диэтилпиразолатом (ДЭП) проводили при pH 6,0, химическую модификацию N-бромсукцинимидом (БСИ) осуществляли при pH 9,5 [13]. Модификаторы вносились перед добавлением аргинина.

Результаты и обсуждение. Ранее нами было установлено, что в печени развивающегося куриного эмбриона изоэнзимный спектр аргиназы претерпевает определенные изменения: из двух пиков активности к концу эмбриогенеза остается пик, который по молекулярному весу, физико-химическим и клиническим свойствам соответствует неуретерической аргиназе [1]. Аргиназа печени 18-дневного эмбриона была выделена нами по схеме, приведенной в таблице.

Очистка аргиназы печени 18-дневных эмбрионов кур

Этапы	Объем, мл	Количество белка, мг	Аргиназная активность, мкмоль мочевины	Удельная активность, мкм/мг мочевины	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	140	9660,0	496,7	0,051	—	100
Ацетонный порошок	90	4092,0	278,3	0,068	1,3	55,6
Хроматография на ДЕАЕ-целлюлозе	30	698,0	243,7	0,35	7,0	48,5
Термообработка	25	163,4	216,5	1,3	25,5	43,3
Высаливание сульфатом аммония и гель-фильтрация на сепарексе G-100	31	19,8	138,8	7,8	153,0	27,9

По указанной схеме нам удалось очистить аргиназу печени 18-дневного куриного эмбриона в 153 раза. Из 100 эмбрионов было выделено 45,5 г печени. Очищенный препарат фермента содержал 19,8 мг бел-

ка с удельной активностью 7,8 мкмоль/мг. Степень очистки определяли электрофорезом на полиакриламидном геле (рис. 1).

Изучение роли гистидиновых остатков в проявлении активности аргиназы печени эмбрионов проводили фотоокислением и химической модификацией в присутствии ДЭП.

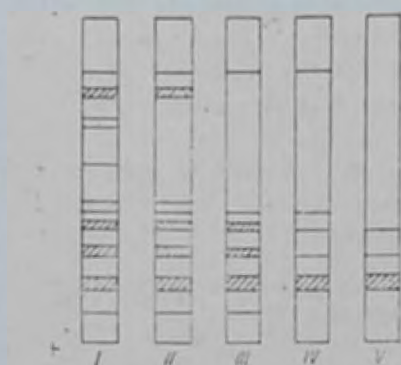


Рис. 1. Электрофореграммы аргиназы печени куриного эмбриона на разных этапах очистки.

Согласно Минсу [7], фотоокислением можно модифицировать несколько типов функциональных групп (имидазольные, триптофановые, SH и S—CH₃). Однако фотохимическое окисление в присутствии сенсibilизирующих красителей, проходящее в мягких условиях, может приводить к избирательной модификации имидазольных групп [14]. Кроме того, на чистом препарате аргиназы быка показано, что наиболее чувствительными функциональными группами, связанными с активностью фермента, в данных условиях являются остатки гистидина [3].

Облучение раствора очищенного из печени кур фермента (при pH 9,5) видимым светом в присутствии метиленового синего ($2,5 \cdot 10^{-5}$ М) приводит к значительному снижению активности аргиназы. Необлученный раствор аргиназы с метиленовым синим полностью сохраняет активность фермента при любых концентрациях красителя [3]. На рис. 2 показано, что падение активности фермента находится в прямой зависимости от продолжительности облучения.

Фотоокисление аргиназы, сенсibilизированное метиленовым синим, было проведено в присутствии субстрата, лизина и орнитина (50 мкмоль на пробу). Лизин и орнитин (рис. 2) в одинаковой степени незначительно предохраняют фермент от инактивации. Аргинин в тех же условиях в первые 30 мин защищает фермент на 80—90%, а к часу остаточная его активность составляет 50%. Выявление защитного эффекта субстрата позволяет предположить, что фотоокисляющиеся группы находятся в составе активного центра фермента.

Инкубация аргиназы с ДЭП (10^{-4} — 10^{-5} М), который при pH 6,0 избирательно взаимодействует с имидазольным кольцом гистидина в белках [10], незначительно снижает активность фермента. По мере возрастания концентрации реагентов (10^{-3} — 10^{-4} , 1,4 М) происходит полное инактивирование его (рис. 3).

Изучение кинетических свойств изоэнзимов аргиназы [1] показало, что изоэнзим аргиназы печени 18-дневного куриного эмбриона, в отличие от урсотелической аргиназы, для которой лизин и орнитин являются

взаимодействие фермента с лизином и орнитинном. Аргинин, наоборот, в этих условиях значительно предохраняет фермент и даже при высоких концентрациях реагента, полностью ингибирующей активность фермента, сохраняет его активность на 50%.

Роль остатков триптофана в проявлении активности аргиназы исследовалась с помощью химической модификации (БСН) при pH 9,5. Как показано на рис. 4, взаимодействие БСН с аргининой приводит к значительному снижению ферментативной активности. Здесь, как и в случае с ДЭП, орнитин и лизин при низких концентрациях модификатора ослабляют ингибирующее влияние на фермент, а аргинин предо-

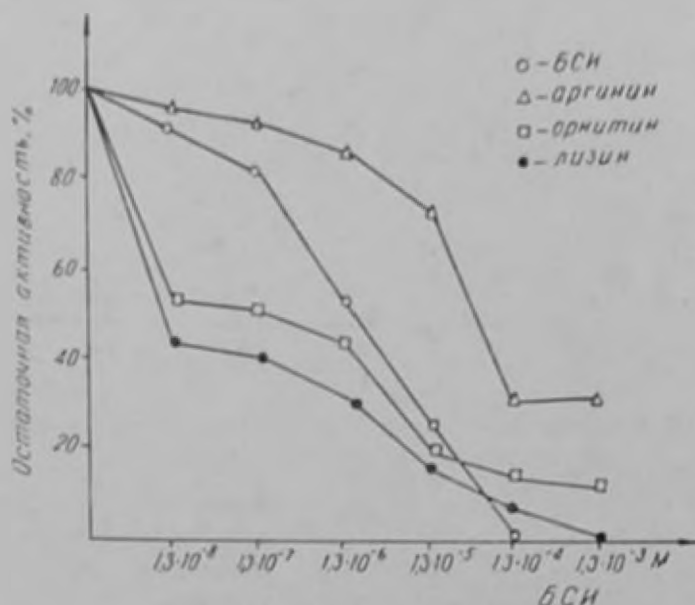


Рис. 4. Влияние БСН на очищенную аргиназу печени 16-дневного куриного эмбриона.

храняет его от инактивации на 30%, в то время как, согласно данным Дактына и Геворкян [3], аргиназу крупного рогатого скота наряду с аргинином частично защищают орнитин и лизин. Не отрицая возможного взаимодействия БСН также с SH-группами, можно полагать, что при низких концентрациях БСН происходит модификация легко взаимодействующих с реагентом остатков триптофана, цистеина, которая значительно повышает чувствительность к лизину и орнитину.

Таким образом, результаты экспериментов указывают на значительную роль гистидиновых и триптофановых остатков в проявлении активности аргиназы. Защитное влияние аргинина при химической модификации и фотоокислении аргиназы, а также ингибирование ее лизином и орнитинном свидетельствуют об участии гистидина и триптофана в формировании активного центра и поддержании нативной конформации фермента.

1. Арутюнян Т. Г., Карапетян С. А., Джакуджян Н. Дж. Биолог. ж. Армении, 34, 1, 1981.
2. Давтян М. А., Буниатян Г. Х., Геворкян Д. Н., Петросян Л. А. Вопросы биохимии мозга, 6, 1970, Ереван.
3. Давтян М. А., Геворкян М. Л., Биолог. ж. Армении, 33, 9, 1980.
4. Северин Е. С., Курочкин С. Н., Кочеткова С. Н. Успехи биол. химии, 15, 1974.
5. Ber E., Muszynska G., Chechova D. Bull. Acad. Polon. sci. ser. sci. biol., 26, 10, 1978.
6. Hirsch-Kolb H., Greenberg D. M. J. Biol. Chem., 243, 6123, 1968.
7. Meins G. E., Feeney R. E. In: Chemical modification of proteins, Holden-Day, Inc., 1971.
8. Mora J., Tarrab R., Martuselli J., Soberon G. Biochem. J., 96, 598, 1965.
9. Muszynska G., Severina L., Lobereva L. Acta Biochem. polon., 192, 109, 1972.
10. Mählrad A., Heggt J., Tolh J. Acta Biochim. Biophys., 2, 19, 1967.
11. Ornstein L., Davis B. J. Deliv at the soc. for the Study of Blood at the New-Jork Acad. Med., 1959.
12. Porembska Z. Tissues, Enzymes, 15, 199, 1973.
13. Spande T. F., Willson B. W. In: Methods in enzymology, ed thirs C. H. W., N.-J., London: Acad. Press, 7, 498, 1967.
14. Weil L. Arch. Biochem. Biophys., 110, 57, 1965.
15. Wright L. C., Bady C. J., Hida R. W. phytochemistry, 20, 2641, 1981.

Поступило 3.X 1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 6, стр. 507—511, 1986

УДК 576.851.151

ВЛИЯНИЕ АГАРА НА АЗОТФИКСИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ АЗОТОБАКТЕРА

В. Г. НИКОГОСЯН

Институт микробиологии АН Армянской ССР, г. Абовян

Аннотация — Показано, что наличие агара в питательной среде способствует заметному повышению азотфиксирующей активности азотобактера, максимум которой проявляется при концентрации агара 0.5—1.0%. Азотобактер, выращенный на агаризованных средах, обладает в два раза большей азотфиксирующей активностью, чем на жидкой среде. Существенные изменения происходят также в динамике нитрогеназной активности в зависимости от характера питательной среды.

Անոտացիա — Ցույց է տրվել, որ անհամախառնում ագարի ներկայությունը նպաստում է ազոտաֆիքսիտների ուղղորդ ֆիրման ափսիքության նկատելի բարձրացմանը, որի մաքսիմումն է հայտ է էկել ագարի 0.5—1.0% խտության դեպքում: Ագարային միջավայրում ունեցված ազոտաֆիքսիտների ազոտի ֆիրման ափսիքությունը չեղով միջավայրի համեմատ էրկո անգամ ավել է: Հավան փոփոխություններ էն տեղի ունեցել նաե նիտրոգեննազային ափսիքության գինամիկայում կտրված անհամախառնում բնույթից:

Abstract — It has been shown that the presence of agar in nutritious medium notably promotes the increase of nitrogenization activity of azotobacter, the maximum of which is revealed in case of 0.5—1.0 per cent agar concentration.