ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ОБРАТИМОЙ ИНАКТИВАЦИИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ ЛЯГУШЕК *RANA RIDIBUNDA*

Э. Х. БАРСЕГЯН

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

Установлено, что инактивирование аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* при pH 3,6 происходит к 22 часу инкубации (на 85%), при действии ЭДТА—через 2 часа (на 92,8%). В случае кислотной инактивации присутствие ионов Mn^{2+} никакая температура не предотвращает инактивирование фермента, а в вариантах с ЭДТА фермент при 0° инактивируется лишь на 10%. Показано, что при изученных двух способах инактивации аргиназы процесс обратим в разной степени, в зависимости от pH среды и наличия определенных двухвалентных ионов. Делается предположение о различных механизмах восстановления активности фермента.

Ցույց է տրվել, որ *R. ridibunda* գորտի լյարդի արգինազան pH 3,6-ի զննարան ինակտիվանում է 85% -ով 22 ժամից նետո, իսկ էԲՏՆ-ով իշակված արգինազան ինակտիվանում է 92,8% -ով 2 ժամ նետո: Ինակտիվացման ժամանակ Mn^{2+} իոնների առկայությունը և ցածր շերտաստիմանը չեն կանխում պրոցեսը, իսկ էԲՏՆ-ի առկայությամբ 0°-ում ֆերմենտը ինակտիվանում է միայն 10% -ով: Ցույց է տրվել, որ երկու տարրեր նշանակվեցող ինակտիվացված ֆերմենտը pH-ի և երկվալենտ իոնների ազդեցության տակ վերականգնում է ակտիվությունը տարրեր առտիմանով: Հնարավորությունները թույլ են տալիս ենթադրելու ֆերմենտի ակտիվության վերականգնման տարրեր նաևս արտիվների մասին:

It has been established that inactivation of liver arginase of the frogs *R. ridibunda* takes place after 22 hours at pH 3,6 (by 8,5 per cent), and EDTA treatment—after 2 hours (by 92,8 per cent). In case of acid inactivation, the presence of Mn^{2+} ions, low temperature don't inhibit the enzyme inactivation, whereas in variants with EDTA the enzyme is inactivated by 10 per cent at 0°. It has been shown that at the studied two ways of arginase inactivation, the process is reversible for various degrees in dependence on the medium pH and the presence of definite two valency ions. An assumption is made on various mechanisms of recovery of the enzyme activity.

Аргиназа—инактивация—реактивация—денатурация—репатурация.

Известно, что высокоочищенные препараты аргиназы печени ряда животных при значении pH ниже 6 в течение нескольких часов полностью теряют ферментативную активность. По мнению Дэвиса и Гринберга [7, 8], инактивация аргиназы при значении pH 5—3 происходит медленно и снижение активности незначительно. При pH ниже 3 уровень инактивации резко возрастает. При изучении аналогичного процесса у крыс показано, что при pH 2 в глициновом буфере ионы Mn^{2+} в концентрации 10 мМ не защищают фермент от денатурации. При этом аргиназа печени распадается на субъединицы с молекулярной массой 32.000 [10]. По мнению Исаченкова и сотр., инактивирование фермента в этих условиях является следствием разрыва дисульфидных мостиков [3].

Поскольку двухвалентные катионы (Mn, Co, Ni и др.) участвуют в поддержании олигомерной структуры тетрамерной молекулы аргиназы и в проявлении каталитических свойств фермента, некоторые хелатные соединения (в частности, ЭДТА) неконкурентно ингибируют его, связывая эти ионы. Подавление активности аргиназ различного происхождения под влиянием ЭДТА выявлено рядом исследователей [4, 5, 6]. Этот процесс, очевидно, происходит вследствие распада фермента на субъединицы. В частности, показано, что аргиназа легких здоровых человека с молекулярной массой 120000 под влиянием ЭДТА распадается на субъединицы по 30000 [5].

Данное исследование предпринято с целью изучения процесса инактивации аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* при низком значении pH и действии ЭДТА в разных условиях.

Материал и методика. Объектом исследования служили лягушки *R. ridibunda* (лягушка озерная) массой 100–120 г.

Активность аргиназы определяли по описанному нами методу [1]. Активность фермента выражали в мкмоль образовавшейся мочевины на 1 г свежей ткани.

Результаты и обсуждение. Результаты I серии экспериментов, в которых определяли время инактивирования аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* при pH 3,6 и действии ЭДТА, представлены в табл. 1.

Таблица 1. Инактивирование аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* (средние данные 5 опытов)

Проба	Активность аргиназы, мкмоль/г			
	контроль, нулевой момент	через 2 ч	через 22 ч	% инактивации
pH 9.5	30000			
pH 3.6	30000	19200	4734	85
pH 3.6 (предынкубация с Mn 10 мин)	30000	19680	4760	85
ЭДТА (pH 7.4)	29600	2140	0	92.8

Почти полное инактивирование экстракта аргиназы печени в 0,05 M глицин—HCl буфере при pH 3,6 наблюдалось к 22 часу инкубации (на 85%), при действии же ЭДТА в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 7,4) — через 2 часа (на 92,8%).

Такая быстрая инактивация фермента в присутствии ЭДТА свидетельствует, вероятно, об относительно непрочной связи Mn^{2+} с субъединицами аргиназы и о легкой диссоциации этих ионов при их поверхностном расположении на аргиназе, поскольку, как показано нами при исследовании ЭПР-спектров аргиназы, в печени лягушек *R. ridibunda* присутствуют два типа двухвалентного Mn, которые ассоциируются на поверхности, но отличаются по белковому окружению в молекуле фермента [2]. С целью выяснения роли ионов Mn в процессе инактивации мы проводили предварительную предынкубацию проб с Mn^{2+}

в концентрации 25 мкмоль на 1 мл инактивируемой пробы в течение 10 минут.

Как показали результаты исследования (табл. 1), в случае кислотной денатурации присутствие ионов Mn не предотвращает инактивирование фермента. Таким образом, в этом отношении аргиназа печени лягушек, подвергнутая кислотной инактивации, не отличается от фермента печени крыс [10].

Далее эксперименты по изучению инактивирования аргиназы печени мы проводили при двух температурных режимах (0° и 20°). Полученные данные показывают, что в случае кислотной инактивации (рН 3,6) температура инкубации не играет никакой роли. При обоих температурных режимах инактивирование фермента к 22 часу составляло 87% (табл. 2).

Таблица 2. Влияние температуры на процесс инактивации аргиназы печени (средние данные 3 опытов)

Проба	Активность аргиназы, мкмоль/ч			
	рН 3.6		ЭДТА	
	0°	20°	0°	20°
0 ^о момент	49000	48000	49704	40704
Через 2 ч	24700	24700	46000	8140
Через 22 ч	6400	6400	0	0
% денатурации	87	87	10	80

В случае же инактивации аргиназы под действием ЭДТА (рН 7,4) при 20° через 2 ч фермент инактивировался на 80%, а при 0° всего на 10%. На тормозящий эффект низких температур в процессе инактивирования аргиназы под действием ЭДТА обратили внимание также Дейлинг и сотр. [5], изучавшие инактивацию аргиназы легких здорового человека.

Реактивация аргиназы. Влияние ионов двухвалентных металлов. С целью изучения вопроса, включает ли процесс инактивации диссоциацию фермента на субъединицы или при этом происходят необратимые изменения, нами проведены следующие эксперименты. После 22-часовой инкубации фермента в 0,05 М растворе глицин-НСI буфера (рН 3,6) мы повышали рН среды инкубации соответствующим щелочным буфером (0,05 М глицин-NaOH буфер) до рН 9,5 с последующей 22-часовой экспозицией фермента при 0° и 20° в присутствии ряда двухвалентных ионов (Mn , Co , Ni , Fe , Mg , Zn).

В вариантах же с ЭДТА после инактивации рН инкубационной среды доводили до рН 9,5 и далее также выдерживали ферментный препарат в течение 22 ч в присутствии указанных двухвалентных ионов (25 мкмоль на 1 мл инактивируемой пробы).

Как видно из таблицы 3, кислотная инактивация и инактивация под воздействием ЭДТА обратимы. И в том и в другом случае шло

Таблица 3. Восстановление активности аргиназы печени в присутствии двухвалентных ионов (средние данные 4 опытов)

Проба	Активность аргиназы, мкмоль/г			
	pH 3,6	% инактивации и реактивации	ЭДТА	% инактивации и реактивации
Экстракт	35127		29600	
Денатурированный экстракт	4800	- 87	2140	-93,6
Реконструкция:				
без иона (pH 9,5)	9184	+28	10952	+37
Mn	24800	+70,6	21600	+72
Co	26240	+74,7	14880	+50
Ni	24800	+70,6	41600	+140
Fe	25600	+72,8	27200	+91
Mg	25100	+71,5	2720	-81
Zn	19680	+56	6560	+22

восстановление активности фермента, однако по-разному в зависимости от наличия в инкубационной среде того или иного иона.

Активность фермента при pH 9,5 без добавления ионов повышалась незначительно (на 28% в случае кислотной денатурации и на 37% в случае с ЭДТА).

При добавлении двухвалентных ионов после кислотной денатурации при pH 9,5 фермент реактивировался не только в присутствии Mn^{2+} , но практически в присутствии всех испытанных ионов. Восстановление активности фермента, инактивированного ЭДТА под влиянием испытанных ионов, также имело место, но с некоторыми особенностями. В частности, реактивирование аргиназы в присутствии ионов Ni было в 2 раза выше, чем в присутствии Mn, а ионы Zn почти не влияли на этот процесс. Можно допустить, что хотя при обеих формах инактивации, возможно, фермент распадается на субъединицы, однако механизмы этого распада различны. Если при кислотной инактивации, очевидно, развиваются дисульфидные связи [3], то в случае с ЭДТА удаляется Mn^{2+} , что и влечет распад олигомерной структуры фермента [4—6]. Соответственно и процесс реактивации инактивированных различными способами ферментных препаратов под влиянием двухвалентных ионов происходит различными путями. Возможно, при реактивировании фермента в присутствии ЭДТА взамен удаленного Mn^{2+} в белок внедряется другой двухвалентный ион, от характера которого и зависит степень реактивации. Однако даже при таком допущении трудно объяснить преимущество Ni²⁺ по сравнению с Mn^{2+} в процессе реактивации фермента. Очевидно, необходимы дополнительные исследования для объяснения этого факта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барсесян Э. А., Никогосян Ф. Ц., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 20, 6, 1977
2. Барсесян Э. А., Никогосян Ф. Ц., Мегричян М. Б. Биолог. ж. Армении, 32, 12, 1979
3. Писарьков В. А., Пестелько Г. В. Эволюция некаталитических функций. М., 1971

4. *Carvajal N., Bustamante M., Hinrichsen D.* Comp. Biochem. and Physiol., 3B, 78, 591, 1984
5. *Dahlig E., Porembka Z., Mochnacka J.* Acta biochim polon., 22, 176, 1975.
6. *Dahlig E., Porembka Z.* Acta biochim polon., 24, 3, 187, 1977.
7. *Davis R., Defalco A., Kopelman A.* Nature, 191, 288, 1961.
8. *Greenberg D., Sahib H., Knox W.* Arch. Biochim. Biophys., 137, 477, 1970.
9. *Hirsch-Kolb H., Greenberg D.* J. B. C., 243, 6123, 1968.
10. *Hosejama J.* Eur. J. Biochem., 27, 248, 1972.

Поступила 15.IX 1988 г.