

13. Reddi P. K., Knox W. E., Herzfeld A. Enzyme, 29, 5, 305—314, 1975.
14. Schimke R. T. Biochem., 239, 4, 3808—3818, 1964.
15. Wu C., Roberts E. H., Bauer J. M. Cancer Res., 27, 956—961, 1967.

Поступило 3.V 1990 г.

Биол. журн. Армения, № 9.(43), 1990

УДК 577.352

ՏՐԻՊՏՈՖԱՆԻ ՄԱՆԱՅՈՐԻՆԻ ՆՇԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ NADPH-ԱԴՐԵՆՈԴՈՔՍԻՆ ԻՆԻՏԻՏԱՑԻՅԱՆ ԱԴՐԵՆՈԴՈՔՍԻՆԻՆ ԷԼԵԿՏՐՈՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱՆՑՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍՈՒՄ

Ե. ՍԱԿԻՈՒՈՎԱ, Ս. ԽԱՐԴԱՆՅԱՆ, Լ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

Հայաստանի ԳԱ Կենսաբանության ինստիտուտ, Երևան

N-բրոմսուկցինիմիդով NADPH-ադրենոդոքսինի ռեդուկտազի արիպտոֆանի մնացորդի բնական մոդիֆիկացումը բերում է նրա մասնակցությանը վերականգնման ռեակցիաների արագության անկմանը: Մոդիֆիկացումը նվազեցնում է NADPH-ադրենոդոքսինի ռեդուկտազի և ադրենոդոքսինի միջև կոմպլեքսառաջացումը: Նրկու սպիտակուցների փոխազդեցության, ինչպես նաև նրանց մասնակցությանը ռեակցիայի վերականգնման ռեակցիաների պարամետրերը, թույլ են տալիս եզրակացնել, որ NADPH-ադրենոդոքսինի ռեդուկտազի արիպտոֆանի մնացորդը մասնակցում է սպիտակուցի պրոպեռտիկ խումբի՝ ֆրիլին-ադենինիլոկլենտիդիկ ադրենոդոքսինին էլեկտրոնների փոխանցմանը:

Химическая модификация остатков триптофана НАДФН-аденодоксин редуктазы N-бромсукцинимидом приводит к снижению скорости восстановительных реакций с ее участием. Модификация снижает способность аденодоксин редуктазы к комплексообразованию с аденодоксином. Параметры взаимодействия двух белков, а также параметры восстановительных реакций с их участием позволяют сделать вывод об участии остатка триптофана аденодоксин редуктазы в переносе электронов от простетической группы белка—ФАД—на аденодоксин.

Chemical modification of tryptophanyl residues of NADPH-adrenodoxin reductase by N-bromosuccinimide resulted in inhibition of electron transferring activity of the protein. The modification suppresses complex formation ability of adrenodoxin reductase with adrenodoxin. The parameters of interaction of two proteins and of NADPH-cytochrome c reduction bring to conclusion, that tryptophanyl residues in adrenodoxin reductase participate in electron transfer from prosthetic group, FAD, to adrenodoxin.

ԷԼԵԿՏՐՈՆԻ ՓՈԽԱՆՑՈՒՄ—NADPH-ԱԴՐԵՆՈԴՈՔՍԻՆ ՌԵԴՈՎԿԱԶ—ԲԻՈԼԿԱՆԵ ՄՈԴԻԲԻԿԱՑՈՒՄ

Մակերիկամների կեղևի միտոքոնդրիաներում տեղակայված է ստերոլիդային հորմոնների հիդրոքսիլացման ֆերմենտային համակարգը, որի մեջ մտնում են ՖԼԴ պարունակող NADPH-ադրենոդոքսին ռեդուկտազը (ԱդՐ), 2 Fe—2 S—4 Cys պարունակող ադրենոդոքսինը (Ադ) և ցիտոքրոմ P-450-ների դասին պատկանող հեմ պարունակող ծայրային ֆերմենտը [12, 10]:

Ռատմասաթրոսթյունների ցույց են տվել, որ Ադ-ի և Ադ-ի փոխազդեցության մեջ ներգրավվում են Ադ-ի կարբոքսիլ խմբերը [7] և տիրոզին

[13] Ինչպես նաև NADPH-ի կոնցենտրացիայի խոտորակները [5] և նախորդ աշխատանքում N-բրոմսուկցինիմիդով (NBS) բիմիակալի մոդիֆիկացման մեթոդը մեղ թույլ տվեց բացահայտել Աղմ-ի ակտիվության համար Tcr-ի էակալի լինելը [4]: Այս աշխատանքում քննվում են երկու սպիտակուցների փոխադրելիության և նրանց մասնակցությունը վերականգնման ռեակցիաների պարամետրերի ուսումնասիրության արդյունքները: Իրանք թույլ են տալիս եզրակացնել, որ Աղմ-ի Tcr-ը հանդես է գալիս որպես սպիտակուցի պրոսթետիկ խումբ Ֆև-ի գիպի Աղ-ը էլեկտրոնների փոխանցումը իրականացնող օղակ:

Նյութ և մեթոդ: Աղ-ռեդուկտորը, Աղ-ը և ցիտոքրոմ c-ն մակերկամների կեղևի հոմոլոգներ: ստացվել են ըստ նախորդ աշխատանքներում նկարագրված մեթոդների, [1, 2 և 3] և աշխատելու համար օգտագործել ենք Էտոնյալ մաքրության օպտիկական ինդեքսներ ունեցող սպիտակուցներ. Աղմ՝ $A_{280}/A_{260} = 6.0$; Աղ՝ $A_{215}/A_{275} = 0.5$; ցիտոքրոմ c (վերականգնված վիճակում)՝ $A_{350}/A_{280} = 1.0$:

Սպիտակուցների և ռեակցիաների մյուս բաղադրամասերի կոնցենտրացիաները որոշելու համար օգտագործել ենք կլանման միլիմոլյար գործակիցների Էտոնյալ արժեքները (ԳՄՄ-ում): Աղմ՝ $\epsilon_{280} = 10,9$, Աղ՝ $\epsilon_{215} = 9.8$, ցիտոքրոմ c՝ $\epsilon_{350} = 2.1$ (վերականգնված օքսիդացված)՝ ϵ_{350} , NADPH՝ $\epsilon_{340} = 6.23$:

Ապեկտրալ և կինետիկ չափումները կատարվել են Specord M-40, (Specord, ԳԴՀ) սարքի վրա, օգտագործելով օպտիկական ճանապարհի 10 կմմ 7 մմ երկարության կյուվետներ, Դիֆրեկցիալ օպեկարների ստացման համար օգտագործվել են տանդեմային կյուվետներ: Ֆլուորիմետրիկ չափումները կատարվել են MPF-40A (Perkin-Elmer, ԱՄՆ) սարքի վրա, օպտիկական ճանապարհի 10 մմ երկարության կյուվետներում: KSV և K₂:

Սպիտակուցի մշակումը NBS-ով, մոդիֆիկացված մետաղների թվի որոշումը և էլեկտրոնի անդամադրող ակտիվության ուսումնասիրումը նկարագրել ենք նախորդ աշխատանքներում (4,5): Ֆլուորիմետրիկ տվյալների մշակման համար օգտագործել ենք Նոտեր-Ֆոլմերի մոդել [11]:

$$F_0 F = 1 + K_{SV} \cdot c$$

և բերված (8)՝

$$F_0 \Delta F = 1 + 1 + K_q \cdot c$$

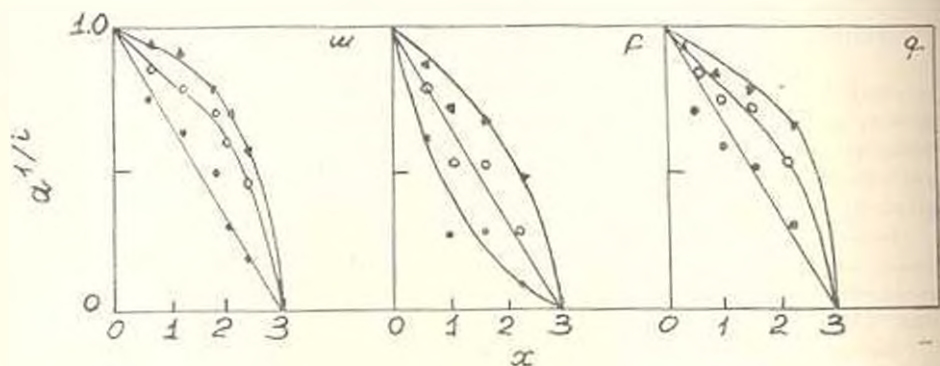
կախումները Այս հավասարումներում F_0 և ΔF , համապատասխանաբար երկայնացում են օքսիդացման ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը մարիչի բացակայության պայմաններում, c կոնցենտրացիայով մարիչի առկայությամբ և նրանց միջև եղած տարբերությունը: K_{SV} և K_q մարիչի և ֆլուորեսցենտային կենտրոնի բիմոլեկուլյար փոխադրելիության զործակցին ուղիղ համեմատական հաստատուններ են. 1-ը մարիչի խումբը հաստենելի ֆլուորոֆորի ֆրակցիան է, հավասար օրգանալների առանցքից հատվող համալսի հակադարձ մեծությունը:

Արդյունքներ և բնագրություն: Նախորդ մեր աշխատանքում ցույց է տրվել, որ NBS-ով Աղմ-ի տրիպտոֆանի մետաբոլիզմի մոդիֆիկացիան բերում է սպիտակուցի էլեկտրոն փոխանցող ակտիվության ճնշման: Այդ երևույթը դիտվել էր մոդելային ակցեպտորների՝ կալիումի ֆերրիքսինիդ և դիքրոֆիլնիլ-ինդոլ-3-ի (ԿԲԻԻ) և ֆիզիոլոգիական ակցեպտորի՝ Աղ-ի վերականգնման ռեակցիաներում: Այդ աշխատանքում նշված ռեակցիաներում կատալիտիկորեն էակալի Tcr-ների թիվը գնահատելու համար օգտվել էինք մոդիֆիկացված Tcr-ների թվից մետաբոլիզմի ակտիվության կախումից: Մոդելային ակցեպտորների համար աչդ թիվը համասար է 2-ի, իսկ Աղ-ի համար՝ 1-ի: Սակայն էական մնացորդների թիվը գնահատելու այս ձևը գիտականորեն բավարար չի համարվում:

Նկ. 1-ում պատկերված են ֆերմենտների մոդիֆիկացման մասնատվ տարբեր ռեակցիաներում էակալի մետաբոլիզմի թիվը գնահատելու համար Tsou-ի

(14) կողմից առաջարկված տեսական կորերը Բնահատման այս ձևը կայանում է հետևյալում: Կառուցվում են մնացորդային ակաիվության 1%-ից առաջանի կախումը մոդիֆիկացված մնացորդների թվից: Կորերը կառուցում են ի թիվն առկա տարրեր արժեքներ: Այն արժեքը, որի դեպքում փորձի կետերը դասավորվում են ուղիղ գծի վրա, համապատասխանում է տվյալ ռեակցիայի համար ուսումնասիրվող ամֆիտիթի էական բանաձևին:

Ահա տեսնում ենք, որ Աղ-ի մասնակցությունը ռեակցիաներում փորձերի կետերը դասավորվում են ուղիղ գծով $\lambda = 1$ արժեքի դեպքում (նկ. 1



Նկ. 1. Աղ-ակտիվացիոն տրիպտոֆանի մնացորդների (սկզբնական քանակը որոշվում է 100 TSPU (14) մեկուկուսի Գատկերված են էլեկտրոնի փոխանցման մնացորդային ակտիվության (3) 1%-ից առաջանի կախումները Աղ-ի մոդիֆիկացված տրիպտոֆանների քանակից $i = 1$ (●) $i = 2$ (○) և $i = 3$ (△) արժեքների նախա. (ա) NADPN → Աղ → Աղ-ցիտոքրոմ c համակարգում. (բ) NADPH → Աղ-ցիտոքրոմ c համակարգում. (գ) NADPN → Աղ-ցիտոքրոմ c համակարգում:

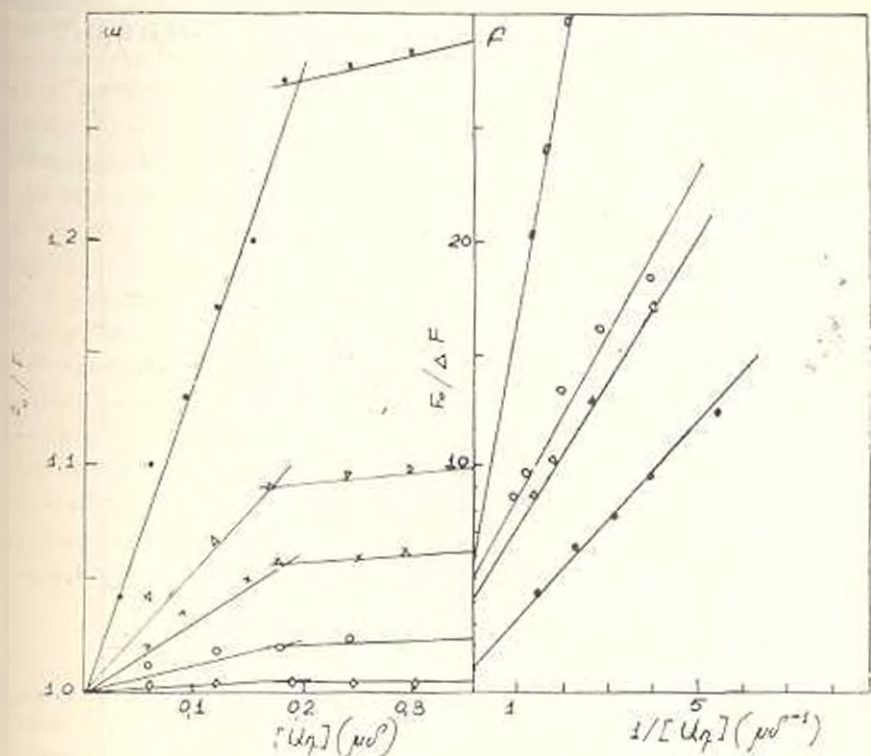
(ա) և (գ)), իսկ առանց Աղ-ի ռեակցիաներում $i = 2$ արժեքի դեպքում (նկ. 1 (բ)):

Շաշվարկման այս ձևը հաստատում է Աղ-ի մասնակցությունը ռեակցիաներում Աղ-ի առաջին մոդիֆիկացվող տրիպտոֆանային մնացորդի կարևորությունը: Այս արդյունքը հաստատում է նախորդ աշխատանքում ալված կերակացությունը:

Hiwatashi և մյուսները (6) նշել են, որ Աղ-ի ներկայությամբ Աղ-ի տրիպտոֆանների ֆլուորեսցենցիան մարում է: Այս երևույթը բնորոշվել է որպես ապիտակաց-ապիտակացային (Աղ և Աղ-ի) կոմպլեքսի առաջացման արդյունք: Սեր փորձերում Աղ-ի մշակումը NBS-ով բերում է տրիպտոֆանի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության փոքրացման: Սխառմանակ թուլանում է Աղ-ի ներկայությամբ մնացորդային ֆլուորեսցենցիայի մարումը: Նկ. 2-ում պատկերված են NBS-ի տարրեր բանակներով մշակված Աղ-ի Դր-ների ֆլուորեսցենցիային Աղ-ով մարելու համար Շախին-Ֆուլմերի ուղիղ (ա) և բերված (բ) կախումների զրաֆիկները: Ստացված ուղիղների տարրեր թերությունները արտացոլում են մարիչի (Աղ) և Աղ-ի Դր-ների բիմոլեկուլյար փոխազդեցության զործակցի փոքրացումը: Այդ զրաֆիկներով որդինատների առանցքից կտրված հատվածների մեծացումը NBS-ի կոնցենտրացիայի աճի հետ (նկ. 2) (բ)-ցույց է տալիս, որ մոդիֆիկացումը բերում է Աղ-ի հետ փոխազդող Դր-ների ֆրակցիայի կտրուկ նվազման: Այսինքն NBS-ով մշակումը մոդիֆիկացնում է Աղ-ի այն տրիպտոֆանները, որոնք պատասխանատու են Աղ-ի և Աղ-ի փոխազդեցության համար: Այս ամենը վկայում են,

ար Աղմ-ի ԴԴՐ-ների մոդիֆիկացման հետևանքով նվազում է Աղ-ի հետ կոմպլեքսառաջացման ունակությունը:

Աղմ-ի և Աղ-ի միջև կոմպլեքսառաջացմանը կարելի է հետևել, ուսումնասիրելով կոմպլեքսի դիֆերենցիալ սպեկտրը: Այդ սպեկտրի դրանցման հա-



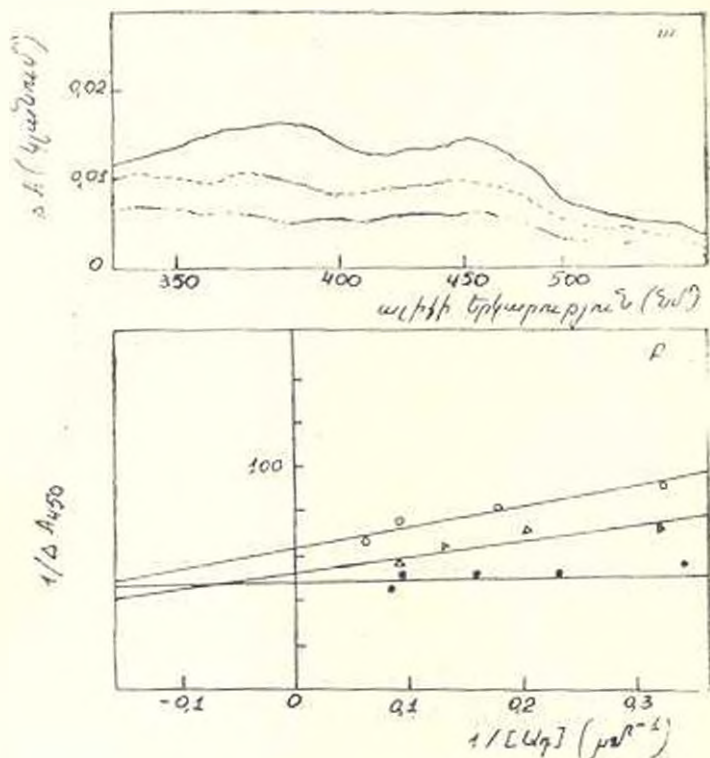
Նկ. 2. Աղմ-ի օրինակաբանային ֆլուորեսցենցիայի մարումը Աղ-ով սլատկերովում ըստ Շտերն-Ֆոլմերի ուղիղ (ա) և բերված (բ) կախումների: NBS-ի մոլային հարաբերությունը Աղմ-ին հավասար է 0 ● 3,5 (Δ); 8,5 (X); 15,7 (○); 23,5 (◐) Աղմ-ի էռնգենտրացիան բոլոր փորձերում հավասար է 2,5 լ/լ, ֆլուորեն-էռնցիայի դրզուման համար օգտագործել ենք $\lambda = 295$ նմ լույս, արձակումը գրանցել ենք $\lambda = 334$ նմ մասքիմոմոմ:

մար Եզսազործել ենք տանդենային կյուվետներ: Աղ-ի և Աղմ-ի լուծույթները լցնում էինք սառույի կյուվետի տարրի մասերը, իսկ աշխատանքային կյուվետի միևնույն մասի մեջ լցնում էինք այդ լուծույթների խառնուրդը: Հետո գրանցում էինք սպիտակուցների խառնուրդի սպեկտրը նրանց սպեկտրների գումարի դեմ, ալսիրեն՝ կոմպլեքսի առաջացման հետևանքով Երևան էկոդ հավելյալ կլանման սպեկտրը: Նկ. 3 (ա)-ում բերված է նատիվ և մոդիֆիկացված Աղմ-ի և նույն րանակով Աղ-ի խառնուրդների վերը նշված ձևով ստացված դիֆերենցիալ սպեկտրների րնտանիքը:

ԴԴՐ-ների մոդիֆիկացիայի խորացման հետևանքով Աղմ-ի և Աղ-ի փոխադրույթյան փոփոխությանը հետևել ենք ըստ դիֆերենցիալ սպեկտրի 450 նմ-ում ինտենսիտետի փոփոխության: Նկ. 3 (բ)-ում բերված են այդ ինտենսիտետյան կախվածությունը Աղ-ի կոնցենտրացիայից կրկնակի հակադարձ մեծությունների գրաֆիկների աեսքով (Հաննուվեր-Բենդի մեթոդ): Կախվածությունները կառուցված են նատիվ Աղմ-ի և այն պրեպարատների համար, որոնք ստացվել են NBS-Աղմ-ի 11 և 24 հարաբերությունների համար:

Այդ հարաբերություններին համապատասխանում են մեկ մոլ սպիտակուցում 2 և 3 մոդիֆիկացված մնացորդներ:

Պատկերված ուղիղները նկարի սահմաններից դուրս շարունակելու դեպքում արսցիսների սուսնցքից հատում են հատվածներ, որոնք համապատասխանում են ԱդՌ-ի և Ադ-ի փոխազդեցության համար $K_d = 10^{-8} M$ (նատիվ ուղուկում) և $10^{-6} M$ (մոդիֆիկացված ուղուկում) արժեքներին:



Նկ. 3. NBS-ով ԱդՌ-ի մոդիֆիկացման նշանակությունը Ադ-ի հետ փոխազդեցության համար: NBS-ի հարաբերությունը ԱդՌ-ին հավասար է. 0 (●), 11 (Δ), 24 (○):

(ա) ԱդՌ-ի և հավասար քանակով Ադ-ի կամպլեքսի դիֆերենցիալ սպեկտրները: Սպիտակուցների կոնցենտրացիաները հավասար են $5 \mu M$: (բ) Դիֆերենցիալ սպեկտրի ինտենսիվության կախվածությունը Ադ-ի կոնցենտրացիայից կրկնակի հետադարձ մեծությունների զրաֆիկների տեսքով: ԱդՌ-ի կոնցենտրացիան հաստատուն է և հավասար $5 \mu M$:

Ուղիղները օրդինատների սուսնցքից հատում են հատվածներ, որոնցից հետևում է, որ փոխազդող սպիտակուցների բրոմֆորմների զրգուման մաքսիմալ չափը ΔA_{max} -ը մոդիֆիկացման ընթացքում փոքրանում է: Ինչպես նշել էինք ԱդՌ-ի Դր-ները NBS-ով մոդիֆիկացման ժամանակ, նրա ակտիվությունը NADPH-ից էլիկտրոնների փոխանցման բոլոր ուղիղներում ընկնում է և, մասնավորապես, ընկնում է սպիտակուցի NADPH-ցիտոքրոմ c ուղուկազային ակտիվությունը:

Այդ ուղիղների արագությունը զնահատելու ժամանակ աշխատանքային կյուվետը 2 մլ վերջնական ծավալում պարունակում էր $50 mM$ կալիում-ֆոսֆատային բուֆեր, $pH 7.4$; $10^{-4} M$ EDTA; $35,8 \mu M$ օքսիդացրած ցիտո-

քան $32,2 \mu\text{M}$ NADPH; $0,2 \mu\text{M}$ ԱզՌ-ի կոնցենտրացիաներից բարձր ու ցածր արագություններ:

Ֆիտոքրոմ C-ի վերականգնմանը հետևել ենք ըստ 550նմ-ում նրա կլանման աճի: Հայտնի է, որ վերականգնված Ազ-ից էլեկտրոնների փոխադրումը ֆիտոքրոմ C-ի վրա կատարվում է քափականաչափ մեծ արագությամբ (5): Հետևաբար, շնայած ֆերմենտի (ԱզՌ) և սուբստրատի (Ազ) կոնցենտրացիաները համեմատելի են, Արթուրյան-Մենենտի ստացիանար վիճակների տեսությունը կիրառելի է այս փորձում, քանի որ քափարարվում է սուբստրատի կոնցենտրացիաների հաստատուն լինելու պահանջը: Այս փորձերում ստացված կախվածությունները իրենցից ներկայացնում են արացիաների առանցքին և միմյանց զուգահեռ ուղիղների ընտանիք: Այդ ուղիղները օրգինատների առանցքից հոսում են համալսման, որոնք վկայում են, որ ԱզՌ-ի մոդիֆիկացման խորացման հետ սեղանային V_{max} -ը փոքրանում է:

Ստացված տվյալների խումբը են ապահովում հետազոտել, որ ԱզՌ-ում ԴԻՐ-ների մնացորդների մոդիֆիկացումը թուլացնում է Ազ-ի հետ նրա փոխադրելիությունը, նվազեցնում է դիֆերենցիալ սպեկտրի առաջացման պատճառով առաջացող քրոմոֆորների շրջապատի զրոգնությունը:

Այս մոդիֆիկացումը պայմանավորված է մակերիկամների կեղևում միադրողիանների ստերոիդ-հիդրոսիլացիոզ ցիտոքրոմ 1՝ 450-կախյալ համակարգի էլեկտրոնների փոխանցման մարտիմալ արագությունը այդ փոխանցման արագությունը սահմանափակող Ազ-սեղանային Ազ օղակում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Арменян А. Г., Марданян С. С., Налбандян Р. М. Биохимия, 44, 6, 1074—1079, 1979.
2. Марданян С. С., Налбандян Р. М. Биохимия, 40, 1, 48—52, 1975.
3. Марданян С. С., Саркисова Е. Г., Осипова Э. Н., Григорян Н. А., Налбандян Р. М. Биохимия, 41, 2, 223—227, 1976.
4. Саркисова Е. Г., Марданян С. С. Биохимия, 52, 8, 1258—1262, 1987.
5. Hamamoto I., Ichikawa J. Biochem. Biophys. Acta, 786, 32—41, 1984.
6. Hiwatashi A., Ichikawa Y., Maruya N., Yumoto T., Aki K. Biochemistry, 15, 3082—3090, 1976.
7. Lambeth J. D., Geren L. M., Millett F. J. Biol. Chem., 259, 10025—10029, 1984.
8. Lehrer Sh. S., Leavis P. C. Methods in Enzymol., 49, 222—236, 1978.
9. Sarkisova Y. G., Mardanian S. S., and Haroutunian A. V. (in press)
10. Shikita M., Hall P. F. J. Biol. Chem., 248, 16, 5599—604, 1973.
11. Stern O. and Volmer M. Phys. Z., 20, 183—188, 1919.
12. Suzuki K., Kimura T. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 19, 3, 340—345, 1965.
13. Taniguchi A., Kimura T. Biochemistry, 15, 2849—2851, 1976.
14. Tsou C.—L. Sci. Sin., 11, 1535—1558, 1962.
15. Usanov S. A., Turk J. V., Chashchin V. L., Akhrem A. A. Biochem Biophys. Acta, 832, 286—296, 1985.

Ստացված է 22 VI 1990 թ.