

Օրիգինալ հոդվածներ • Оригинальные статьи • Original articles

Биолог. журн. Армении, 1-2 (54), 2002

УДК 577.155.34:615.5

**ИЗУЧЕНИЕ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ ЛЯГУШКИ *RANA RIDIBUNDA*
ПОСЛЕ ИНАКТИВАЦИИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭДТА
И ПОСЛЕДУЮЩЕЙ РЕАКТИВАЦИИ**

Ջ.Ք. ԲԱՐՏԵԳՅԱՆ, Ն.Ա. ԱՐՇՐՈՒՆԻ, Մ.Ա. ԴԱՎՅԱՆ

Երևանский государственный университет, кафедра биохимии и проблемная лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии, 375025

Показано, что аргиназа печени лягушек *Rana ridibunda*, которая является тетрамером с молекулярными массами 110000-136000D, распадается под действием ЭДТА на субъединицы с молекулярными массами 63035 и 34956. После реактивации фермента в определенных условиях происходит реассоциация субъединиц в тетрамер.

Ցույց է տրված, որ *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազը, որն իրենից ներկայացնում է տետրամեր, որի մոլեկուլյար կշիռը 110000-136000D, էԴՏԱ-ի ազդեցության տակ տրոհվում է 63035 և 34956 մոլեկուլյար կշռով ենթամիավորների: Ֆերմենտի ռեակտիվացումից հետո տեղի է ունենում ենթամիավորների ռեասոցում տետրամերի մեջ:

It has been shown, that *Rana ridibunda* frog's liver arginase has tetrameric structure with molecular mass 110000-136000D, which is desintegrated by EDTA into subunits with 63035 and 34956. The reallocation of these subunits into tetrameric enzyme takes place after enzyme reactivation under the certain conditions.

Аргиназа - инактивация - реактивация

Известно, что в поддержании олигомерной структуры молекул аргиназ, а также в проявлении каталитических свойств фермента участвуют определенные двухвалентные катионы. Связывая эти ионы, некоторые хелатные соединения (в частности ЭДТА) неконкурентно ингибируют его. Ингибирование аргиназы под действием ЭДТА выявлено многими исследователями. Так, например, аргиназа молочной железы крысы полностью ингибируется ЭДТА в концентрации 5 мМ при рН 6, но затем восстанавливается ионами Mn^{2+} [7]. В некоторых случаях этот процесс сопровождается молекулярной деградацией фермента. Например, аргиназы из печени и почек человека (м.м. 120000) в присутствии ЭДТА распадаются на 4 мономера [9]. По мнению авторов, эти данные свидетельствуют о поверхностном расположении ионов Mn^{2+} и об их необходимости для

поддержания четвертичной структуры вышеуказанных аргиназ. Существуют примеры неполной диссоциации под воздействием ЭДТА. Тримерная форма аргиназы из *Saccharomyces cerevisiae* при диализе против ЭДТА частично диссоциирует (константа седиментации понижается от 5,95 до 4,65). Авторы пришли к заключению, что в этих условиях аргиназа находится в мономер-тример равновесии. Такое состояние объясняется наличием в молекуле фермента двух ионов - Mn^{2+} и Zn^{2+} , по-разному связанных с апоферментом и выполняющих различные функции. Связь иона Mn^{2+} , ответственного за проявление каталитической активности, слабая. А более прочно связанный ион Zn^{2+} дает молекуле фермента стабильность третичной и четвертичной структур [8].

Показано, что удаление марганца под действием хелатирующих агентов у некоторых аргиназ не приводит к молекулярной деградации аргиназы. Так, при действии ЭДТА на аргиназу печени телянка (катионная форма), крыс (анионная форма) [6], быка [10], м.м. ферментов не меняется, хотя во всех случаях идет инактивация. Согласно Дейлиг [6], подобное действие ЭДТА можно объяснить особым расположением Mn^{2+} в молекуле фермента. Например, в аргиназе печени телянка Mn^{2+} связывается с ферментом в двух участках: каталитическом и в центре, ответственном за ассоциацию субъединиц. По мнению автора, участки связывания ионов Mn^{2+} , ответственные за олигомерную структуру, не чувствительны к хелатирующему реагенту, тогда как участки, находящиеся вблизи активного центра и ответственные за активацию, видимо, легко доступны для него [6].

Предыдущие исследования по инактивации аргиназы показали, что ферментные препараты различной степени очистки инактивируются под действием ЭДТА через 20 мин приблизительно на 90% [1]. Было также показано, что процесс обратим при определенных рН среды и наличии некоторых двухвалентных ионов [2].

Наши исследования проведены с целью выявления возможного расщепления олигомерной структуры аргиназы печени лягушки *Rana ridibunda* после инактивации под действием ЭДТА, а также возможного реассоциирования субъединиц в олигомерную структуру при реактивации фермента.

Материал и методика. Объектом исследования служили лягушки *R. ridibunda* (лягушка озерная) массой 100-120 г. Активность аргиназы определяли по методу [4]. Активность фермента выражали в мкмоль образовавшейся мочевины на 1г свежей ткани. Инактивацию аргиназы проводили в присутствии ЭДТА в конечной концентрации 5×10^{-2} М. Реактивацию предварительно инактивированной аргиназы проводили в глицин - NaOH буфере, рН 9,5, при температуре 37° с добавлением ионов Mn^{2+} (25 мкмоль на 1 мл пробы).

Молекулярные фракции во всех вариантах определяли методом гельфильтрации (*Sephadex G-200*, "Pharmacia", Швеция). Размеры колонки 1,5х40 см, объем элюции 4 мл. Колонка уравнивалась 0,05 М трис-HCl буфером, рН 7,4.

Для определения значения V_0 (свободный объем колонки) использовали 0,2%-ный раствор голубого декстрана (*Blue Dextran 2000*, "Pharmacia", м.м. 2^{10} дальтон). В качестве белков-маркеров - уреазу из соевых бобов (м.м. 480000), дрожжевую алкогольдегидрогеназу (м.м. 150000), гемоглобин крови лошади (м.м. 67000) и пепсин (м.м. 35000).

Ионообменную хроматографию экстрактов печени проводили на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (колонка 1,5x20 см). Уравновешивание 0,005 М трис-НСl буфером, рН 7,4. Элюция градиентная растворами КСl в этом же буфере при постоянном повышении молярности от 0 до 0,35 М. Скорость элюции 24 мл/час.

Результаты и обсуждение. Нами в ранних работах показано, что молекулярная масса аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* (экстракт), выловленных в различных районах республики, колеблется в пределах 113000-138000. Эта величина соответствует молекулярной массе (110000-136000), определенной для аргиназы млекопитающих, и является, как предполагается, оптимальной для проявления аргиназной активности [3].

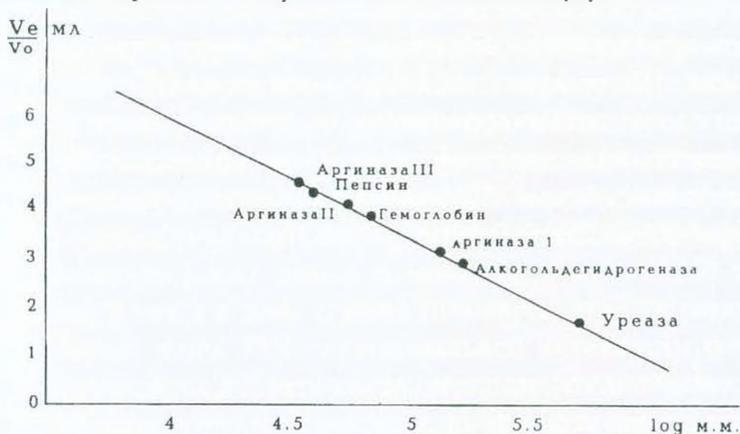


Рис. 1. Фракционирование аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* после инактивации под действием ЭДТА.

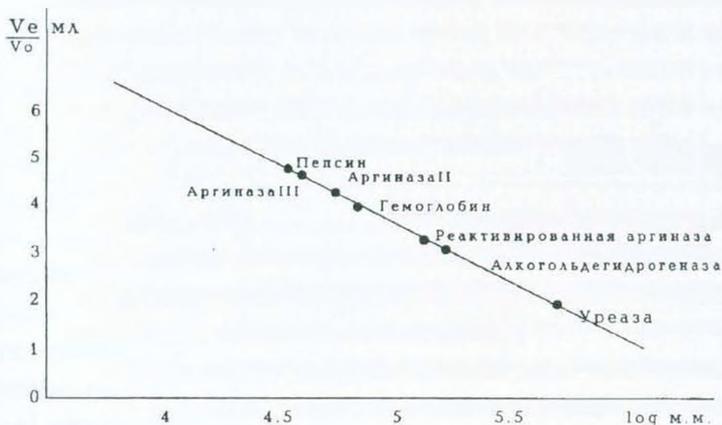


Рис. 2. Фракционирование реактивированной аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* после инактивации под действием ЭДТА.

Как видно из рис. 1, 2, при действии ЭДТА на аргиназу печени лягушки *R. ridibunda* методом гельфильтрации выявляются 3 фракции аргиназы (AI, AII, AIII) с соответствующими молекулярными массами 127900, 63035 и 34956. Известен случай, при котором обработка ЭДТА наиболее активных изоферментов аргиназы печени и почек крысы приводила к образованию фракций фермента с м.м. 120000, 60000 и 30000 [5].

Анализ полученных нами данных (рис. 1) показывает, что при обработке аргиназы печени лягушек ЭДТА происходит диссоциация фермента на субъединицы с м.м. 63035 и 34956.

То обстоятельство, что в наших экспериментах обнаруживается определенное количество недиссоциированного фермента (1 фракция, м.м. 127900), очевидно, является следствием неполного воздействия ЭДТА (в силу его низкой концентрации) или реассоциации фермента в колонке при гельфильтрации (вследствие разбавления концентрации ЭДТА). Нельзя было исключить также и наличие изоэнзима, не инактивируемого ЭДТА, поскольку получаемый при гельфильтрации аргиназный пик печени лягушки не гомогенен и дополнительно фракционируется ионообменной хроматографией (ДЭАЭ-целлюлоза) на три подфракции. С целью выяснения этого вопроса было исследовано действие ЭДТА на 3 субфракции, полученные ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе (рис.3).

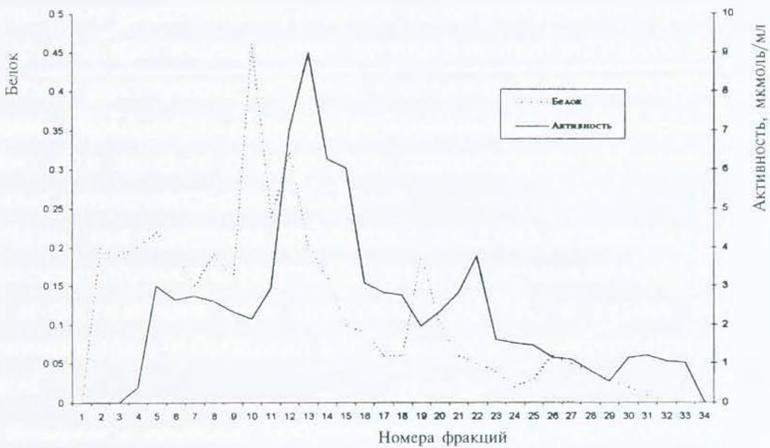


Рис.3. Фракционирование аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой.

Оказалось, что ЭДТА ингибировал аргиназную активность во всех трех субфракциях, что обнаружилось уже в первые минуты эксперимента и в процентном отношении почти не изменялось в течение 2 ч (табл. 1).

Таблица 1. Действие ЭДТА на аргиназную активность в 3 субфракциях, полученных ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе.

Активность аргиназы, мкмоль/г белка			
Время, мин	1	2	3
исходная активность	133±14.3	423±24.4	269±18.6
1'	16.7±3.6	18.3±5.4	29.7±4.6
30	16.6±3.2	17.7±3.2	27.2±3.6
60	15.6±2.2	17.6±2.7	26.7±4.2
120	14.2±2.1	16.3±2.2	26.5±4.2
инактивация, %	88	96	90.1

Таким образом, наличие изоэнзима, не инактивируемого ЭДТА, было исключено.

В последующей серии экспериментов мы проводили реактивацию инактивированной ЭДТА аргиназы при pH 9,5 и температуре 37° с добавлением ионов Mn^{2+} (25 мкмоль на 1 мл пробы), экспозиция 22 ч.

Реактивированный фермент пропусклся через колонку с сефадексом G-200. Исследования показали, что реактивированный фермент в большинстве случаев имел м.м.126000 (рис.2). Однако, наряду с фракцией 126000, выявлялись также димер и мономер с м.м. 60260 и 35480 соответственно. В связи с этим следует упомянуть, что при реактивации восстанавливается лишь 72% первоначальной активности фермента. Очевидно, что оставшиеся 28% активности - результат неполной реассоциации.

Таким образом, в процессе реактивации аргиназы печени лягушек *R. ridibunda*, предварительно инактивированной ЭДТА при pH 7,4, в большинстве случаев происходила ассоциация субъединиц в тетрамерный олигомер. Эти данные вызывают определенный интерес в сравнении с результатами изучения процесса обратимой инактивации при низких pH (3,6), где предполагается иной механизм распада фермента на субъединицы за счет разрыва дисульфидных связей нативного фермента. Реактивация фермента в случае кислотной инактивации приводила к ассоциации субъединиц в октамерный олигомер взамен нативного тетрамера [3].

Реактивация фермента при двух способах инактивирования - дополнительный аргумент, свидетельствующий о различных механизмах процесса обратимой инактивации.

Кроме того, учитывая данные, полученные при исследовании влияния парахлормеркурийбензоата на инактивированную при pH 3,6 и ЭДТА, а также реактивированную аргиназы [1] можно заключить, что различны не только механизмы инактивации и реактивации, но и субъединицы, образующиеся при двух способах инактивирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арцруни Н.А., Барсегян Э.Х., Давтян М.А. Биолог.журн.Армении, 49, 3-4, 156-157, 1996.
2. Барсегян Э.Х. Биолог.журн.Армении, 42, 2, 1989.
3. Барсегян Э.Х., Давтян М.А. Уч.записки ЕГУ, 2, 102-105, 1990.
4. Барсегян Э.Х., Никогосян Ф.Ц., Давтян М.А. Биолог.журн.Армении, 30, 6, 12-20, 1977.
5. Baramczyk-Kuzma A., Porembcka Z., Mochnacka I. Acta Biochim.Polon., 23,2-3, 151-163, 1976.
6. Dahlig E., Porembcka Z. Acta Biochim.Polon., 24,3, 187-196, 1977.
7. Fuentes J.M., Campo M.L., Soler G. Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys., 102, 5, 255-258, 1994.
8. Green S.M., Ginsburg A., Lewis M.S., Hensley P. J. Biol. Chim., 266, 32, 21474-21481, 1991.
9. Porembcka Z., Grabon W., Zelazowska E., Czeczot H., Zamecka E. Acta Biochim.Polon., 40, 4, 465-470, 1993.
10. Rossi V., Grandi C., Dalzoppo D., Fontuna A. Int. J. Pept. Protein Res., 2, 2, 239-250, 1983.

Поступила 10.XI.1997