

Биолог. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 577.155.3:577.1124

ИНАКТИВАЦИЯ АРГИНАЗЫ ИОДАЦЕТАТОМ

М.Л. ГЕВОРКЯН, М.А. ДАВТЯН

*Ереванский государственный университет, кафедра биохимии и лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии, 375049*

The investigation of chemical modification of cattle liver arginase in the presence low concentrations of iodoacetate shows, that the inactivation takes place at pH values lower than 8,6. Arginase is resistant to this reagent in alkaline region of pH. The inactivation-concentration plot at pH 7,6 is exponential. The received data leads to conclusion, that loss of arginase activity in the presence of iodoacetate is related probably with modification of functional group with pK_a 8,6, which involved in the active site of arginase or disposed near of it.

Аргиназа - химическая модификация - иодацетат

Химическая модификация ферментов специфическими реагентами помогает выявить роль различных функциональных групп в составе белковой молекулы, определить их участие в осуществлении каталитической реакции или формировании активного центра. С целью изучения важных для активности аминокислотных остатков в аргиназе наряду с другими реагентами мы использовали и иодацетат. Этот реагент, как известно, в малых концентрациях модифицирует свободные SH-группы в белках [6]. Согласно литературным [8], а также нашим данным [1, 4], свободные сульфгидрильные группы не участвуют в формировании активного центра аргиназы печени крупного рогатого скота. Однако в наших опытах в присутствии сравнительно низких концентраций иодацетата (6 мМ в пробе) при pH 7 наблюдалась инактивация фермента. Представляло интерес более подробное исследование взаимодействия иодацетата с аргиназой. В настоящей работе представлены результаты этих экспериментов.

Материал и методика. В работе использовали коммерческий препарат аргиназы печени крупного рогатого скота фирмы Reanal (Венгрия). Растворы белка в концентрации $2,3 \cdot 10^{-6}$ М на 0,05 М Трис-НСl буфере при значениях pH от 6 до 11 выдерживали при комнатной температуре (20°) в присутствии добавок иодацетата в течение 60 мин. Затем пробу разбавляли 0,05 М глициновым буфером (pH 9,5) в 5 раз и определяли аргиназную активность по методу Ратнер, как описано ранее [3]. Молекулярную массу аргиназы принимали равной 120 кДа.

В работе использовали препараты L-аргинина, глицина фирмы Reanal (Венгрия). Остальные реактивы с маркой ХЧ или ЧДА отечественного производства.

Результаты и обсуждение. Добавление иодацетата (6мМ в пробе) к раствору аргиназы при pH 7,6 приводит к снижению активности фермента. Основная реакция протекает вначале. В течение первых десяти минут инкубации активность снижается на 35-40%. Далее процесс замедляется и через 60 мин остаточная активность составляет 55% от исходной. В присутствии более высоких концентраций реагента (25 мМ в пробе и выше) при инкубации в тех же условиях в течение часа наблюдается полная инактивация фермента. На рис. 1 показана полулогарифмическая зависимость остаточной активности аргиназы от концентрации иодацетата. Экспоненциальный характер этой зависимости указывает на то, что инактивация протекает по реакции псевдопервого порядка, в ходе которой модифицируется один или несколько однотипных аминокислотных остатков аргиназы, находящихся, по-видимому, вблизи от активного центра.

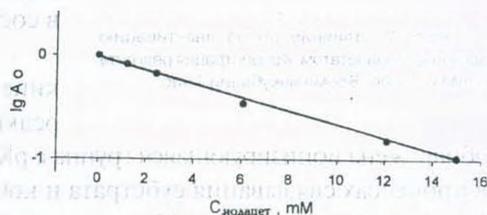


Рис. 1. Полулогарифмическая зависимость относительной активности аргиназы от концентрации иодацетата при pH 7,6. Время инкубации 1 час.

В присутствии высоких концентраций иодацетата, как известно, в белках, кроме сульфгидрильных групп, модификации подвергаются и другие аминокислотные остатки, в числе которых остатки гистидина, метионина, лизина и др. [6]. Аргиназа печени крупного рогатого скота, как уже отмечалось выше, не содержит существенных для активности сульфгидрильных групп. Модификация около 3,6 SH-групп на моль аргиназы с помощью парахлормеркурибензоата (ПХМБ) сопровождается снижением активности фермента всего на 5-7% [1]. Использование высоких концентраций ПХМБ снижает активность фермента на 80-90%. Однако и в этом случае реакция теряет специфичность, и, наряду с SH-группами, с реагентом взаимодействует целый ряд других аминокислотных остатков в белках [6]. N-этилмалеинимид не влияет на активность исследуемого нами фермента даже при использовании его в больших концентрациях [4]. Очевидно, инактивация аргиназы иодацетатом в данных условиях вызвана модификацией других чувствительных к реагенту функциональных групп.

Было изучено влияние изменения pH раствора на инактивацию аргиназы иодацетатом. При pH 6 и концентрации реагента 6 мМ в пробе в течение часа наблюдается почти полная потеря активности. С увеличением значений pH степень инактивации уменьшается, а при pH 8,6 и далее активность не снижается (рис.2). На кривой этой зависимости наблюдается перегиб. Таким образом, изменение величины pH раствора играет решающую роль во взаимодействии иодацетата с аргиназой в данных условиях. По-видимому, изменение ионизационного состояния белка в области активного центра влияет на реакционную способность взаимодействующих с реагентом функциональных групп - они становятся нечувствительными, либо просто недоступными для реагента. Можно предположить, что инактивация связана с модификацией функциональной группы с pK_a 8,6, которая находится в составе или вблизи

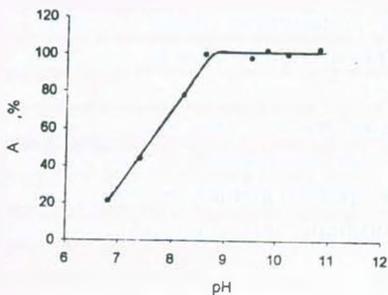


Рис. 2. Влияние pH на инaktivацию аргиназы иодацетатом. Концентрация реагента 6 мМ в пробе. Время инкубации 1 час.

активного центра аргиназы. Учитывая, что в растворе иодацетат находится в виде аниона, который может притягиваться разными заряженными группами, замедляя или ускоряя реакцию [6], можно предположить, что в исследуемых процессах определенную роль играют ионы двухвалентного марганца, которые входят в состав активного центра аргиназы [7].

При исследовании зависимости кинетических параметров каталитической реакции аргиназы от pH [2] нами была

обнаружена ионизирующая группа с pK_a 8,6, которая, по-видимому, участвует в процессах связывания субстрата и конкурентных ингибиторов L-лизина и L-орнитина с ферментом. Совпадение значений pK_a этой группы со значением pH, полученным из зависимости инaktivации фермента иодацетатом от pH (рис.2), указывает на то, что в процессах взаимодействия этого реагента с аргиназой, по-видимому, принимает участие та же функциональная группа. Этой группой, возможно, является остаток гистидина.

Изучение модификации остатков гистидина аргиназы печени крупного рогатого скота, проведенное нами ранее [5], показало, что один или два остатка гистидина, модифицирующиеся с помощью диэтилпирокарбоната, находятся в активном центре фермента, либо вблизи него и легко доступны для растворителя. В ряде работ показано, что остатки гистидина могут участвовать в процессах связывания субстрата, а также являются лигандами ионов марганца в активном центре аргиназы печени крыс [7, 9]. Новые успехи в изучении структуры и механизма действия аргиназы позволят полнее объяснить явления и закономерности, наблюдаемые при взаимодействии различных реагентов с функциональными группами этого фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян М.Л., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 32, 5, 435-441, 1979.
2. Геворкян М.Л., Давтян М.А., Григорян А.Г. Ученые записки ЕГУ, 2, 66-69, 1995.
3. Геворкян М.Л., Закарян А.Е., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 27, 9, 44-49, 1974.
4. Геворкян М.Л., Чубарян С.В., Туманян Л.Р., Торчян Р.О. Биолог. журн. Армении, 39, 4, 314-319, 1986.
5. Давтян М.А., Геворкян М.Л. Биолог. журн. Армении, 33, 9, 941-947, 1980.
6. Торчинский Ю.М. Сера в белках, М., Наука, 1977.
7. Khangulov S.V., Sossong T.M. Jr, Ash D.E., Dismukes G.Ch. Biochemistry, 37, 8539-8550, 1988.
8. Muszynska G., Severina L.O., Lobireva L.W. Acta biochim. polon., 19, 2, 109-116, 1972.
9. Scolnick L.R., Kanyo Z.F., Cavalli R.Ch., Ash D.E., Christianson D.W. Biochemistry, 38, 34, 10558-10565, 1997.

Поступила 19.V.2003