

## ВЛИЯНИЕ ЭДТА И ДИАЛИЗА НА АКТИВНОСТЬ И ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ БЫКА

М.Л. ГЕВОРКЯН, М.А. ДАВТЯН

*Ереванский государственный университет,  
научно-исследовательская лаборатория биохимии, 375025*

Инактивация аргиназы печени быка под действием ЭДТА наиболее эффективно происходит при pH 6-7. Изучение спектров ФЛ аргиназы в растворах с разными pH при  $\lambda_{exc}$  280 и 297 нм показало, что в результате удаления катиона  $Mn^{2+}$  в щелочной среде происходят значительные изменения конформации гидрофобных участков молекулы аргиназы, в которых локализованы остатки триптофана и тирозина. Инкубация с ЭДТА и последующий диализ растворов фермента приводит к красному смещению положений максимумов спектров ФЛ аргиназы (на 10-14 нм) при pH 9,4. Полученные данные свидетельствуют о том, что в поддержании нативной конформации аргиназы важную роль играют электростатические взаимодействия.

Ցուլի լարդի արգինազի ինակտիվացումը ԷԴՏՍ-ի հետ փոխազդեցության արդյունքում առավել էֆեկտիվ տեղի է ունենում рН-ի 6-7 պայմաններում: Ֆերմենտի լուծույթների ֆլուորեսցենցիայի (ՖԼ) սպեկտրների ուսումնասիրությունը 280 և 297 նմ գրգռման ալիքների երկարությունների դեպքում ցույց տվեց, որ  $Mn^{2+}$  իոնների բացակայությունը հիմնային միջավայրում առաջացնում է կոնֆորմացիայի զգալի խախտումներ արգինազի մոլեկուլի այն հատվածներում, որտեղ գտնվում են տրիպտոֆանի և տիրոզինի մնացորդները: Ֆերմենտի ԷԴՏՍ-ի հետ փոխազդեցության և դրան հաջորդող դիալիզի արդյունքում (рН 9,4) տեղի է ունենում ՖԼ սպեկտրների մաքսիմալ ինտենսիվությունների դիրքերի կարմիր շեղում (10-14 նմ): Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ արգինազի մոլեկուլի նատիվ կոնֆորմացիայի պահպանման գործում կարևոր դեր են կատարում էլեկտրոստատիկ փոխազդեցությունները:

The inactivation of bovine liver arginase in the presence of EDTA is more effective at pH 6-7. The fluorescence emission spectra of arginase solutions at different pH values upon excitation 280 and 297 nm were studied. The removing of  $Mn^{2+}$  from the enzyme molecule by EDTA led to significant conformational changes in hydrophobic regions of arginase molecule, where tryptophanyl and tyrosyl residues are buried. The red shift (by 10-14 nm) in the fluorescence emission peak of EDTA-treated and then dialysed enzyme solutions (pH 9.4) is observed. The received data suggest that electrostatic interactions play an important role in conformational stability of arginase.

*Аргиназа - ЭДТА - флуоресценция - конформация*

Аргиназа (ЕС 3.5.3.1.) катализирует реакцию расщепления аргинина на мочевины и орнитин. Уреотелическая форма фермента участвует в цикле

мочевины, а неуротелическая аргиназа играет важную роль во многих других процессах, происходящих в живых организмах (биосинтез полиаминов и пролина, димитирование биосинтеза гистонов и однозамещенных гуанидиновых соединений и т. п.) [5, 6]. В последнее десятилетие обнаружено, что аргиназа регулирует образование в тканях окиси азота, конкурируя с синтазой окиси азота за общий субстрат [10, 18]. Она используется в медицине для лечения аргинин-зависимых болезней [16], а также для снижения темпов роста опухолевых тканей [11, 20].

Как известно, аргиназа - металлозависимый фермент. Роль катионов двухвалентного марганца ( $Mn^{2+}$ ) в нативной аргиназе, выделенной из тканей различных организмов, изучается уже давно [14, 17]. Эти катионы участвуют в поддержании активной конформации и четвертичной структуры фермента, регулируют оптимум pH, влияют на термостабильность, чувствительность к протеолизу и т.д. [12-14]. Изучение влияния хелатирующего агента ЭДТА на аргиназу печени быка показало, что в отличие от аргиназ из печени других млекопитающих, инактивация в присутствии этого соединения не сопровождается распадом на субъединицы [9, 12, 13], т.е. катионы  $Mn^{2+}$  не участвуют в формировании четвертичной структуры этого фермента. Как показано в ряде работ [15, 21], расположенные в области активного центра аргиназы печени крыс катионы  $Mn^{2+}$  координационно неэквивалентны. Один из них сравнительно слабо связан с окружающими его функциональными группами и легко удаляется при диализе. Согласно нашим [3], а также литературным данным [12], в результате диализа аргиназа печени быка частично теряет активность, которая восстанавливается при добавлении ионов марганца или замене их на ионы кобальта или кадмия. Инактивация этого фермента при диализе, возможно, также связана с удалением из молекулы одного из катионов  $Mn^{2+}$ . Для более подробного изучения роли ионов  $Mn^{2+}$  в стабилизации конформации и проявлении активности аргиназы печени быка в данной работе было проведено исследование влияния ЭДТА и диализа на активность и флуоресценцию растворов этого фермента.

**Материал и методика.** В работе использовали лиофилизированный препарат аргиназы печени быка фирмы "Reanal" (Венгрия). Растворы аргиназы на 0,05 М глициновом, трис-НСI и фосфатом буферах при разных значениях pH в концентрациях  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  М инкубировали при комнатной температуре (20°) в присутствии ЭДТА, затем определяли аргиназную активность и измеряли спектры флуоресценции (ФЛ). Активность аргиназы определяли по методу Патнер, как описано ранее [7]. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре марки Cary Eclipse фирмы "Varian" при комнатной температуре (20°) в 1-сантиметровой кювете в диапазоне 300-500 нм при длинах волн возбуждения 280 и 297 нм. Ширина щелей монохроматоров 5 и 10 нм при возбуждении и испускании соответственно. Диализ ЭДТА-обработанных растворов фермента проводили при 4° в течение 20 ч при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Растворы аргиназы  $4,7 \times 10^{-5}$  М на 0,01 М глициновом буфере (pH 7,6) после взаимодействия с ЭДТА (12,5 mM) в течение 60 мин диализовали против 280-300 объемов того же буфера. Затем пробу разбавляли соответствующим буфером в 4 раза и измеряли спектры ФЛ.

В работе использовали L-аргинин, глицин фирмы "Reanal" (Венгрия), ЭДТА динатриевую соль фирмы "Merck" (Германия), остальные реактивы с маркой х.ч. или ч.д.а.

**Результаты и обсуждение.** Инкубация растворов аргиназы с ЭДТА приводит к инаktivации фермента. На рис. 1А показано снижение активности аргиназы при концентрациях реагента 7 и 3,6 мМ, рН 6,2 и 8. Из рисунка видно, что кинетика инаktivации двустадийна. Основное снижение активности происходит в начальные 10-15 мин, а дальнейшая инкубация в тех же условиях приводит к дополнительной инаktivации лишь на 5-8%. Изменение значений рН раствора существенно влияет на степень инаktivации аргиназы. Если в растворах с рН 6,2 в течение 30 мин в присутствии ЭДТА происходит полная инаktivация фермента, то при рН 8 активность снижается только на 50% (рис. 1А). Инаktivация аргиназы печени быка в присутствии ЭДТА в кислой и нейтральной средах изучалась в ряде работ [12, 13, 19]. В наших экспериментах с ростом значений рН степень инаktivации уменьшается, и при рН 9,2 и выше при используемой концентрации ЭДТА активность снижается на 10-15% (рис. 1Б).

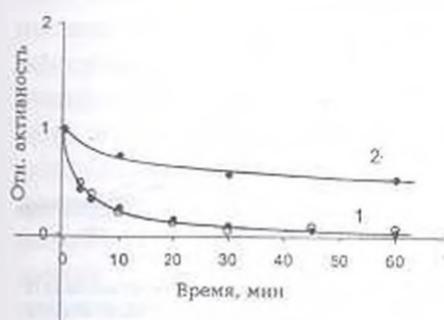


Рис. 1. А. Кинетика инаktivации аргиназы в присутствии 7 мМ ЭДТА, (рН 6,2) /1/, 3,6 мМ ЭДТА, (рН 6,2) /о/ и 7 мМ ЭДТА (рН 8) /2/. Концентрация аргиназы  $4,7 \times 10^{-6}$  М.

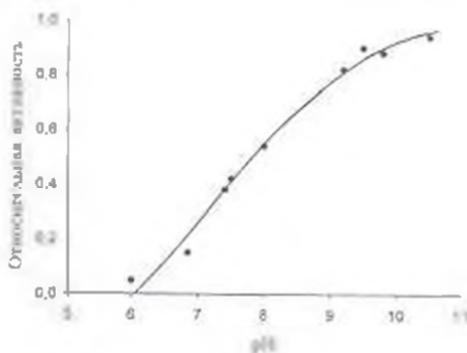


Рис. 1. Б. Влияние pH раствора на инаktivацию аргиназы ( $4,7 \times 10^{-6}$  М) при взаимодействии с 7 мМ ЭДТА в пробире. Время инкубации 1 час.

Таким образом, в щелочной среде даже при сравнительно высоких концентрациях ЭДТА активность фермента в значительной степени сохраняется. Можно предположить, что происходящее в кислой среде протонирование карбоксилатных лигандов функциональных катионов  $Mn^{2+}$  приводит к ослаблению координационных связей, что облегчает их удаление из молекулы белка. Принимая во внимание, что при значениях рН ниже 6,5 активность нативной аргиназы существенно снижается, изучение влияния концентрации ЭДТА на активность фермента проводилось при рН 7,5. Степень инаktivации аргиназы растет с увеличением концентрации реагента (рис. 2). Полная инаktivация фермента при инкубации в течение 60 мин достигается при концентрации ЭДТА 25 мМ в пробе.

С целью выяснить как влияет взаимодействие с ЭДТА на конформационное состояние молекулы аргиназы были измерены спектры ФЛ растворов фермента до и после инкубации с этим реагентом (рис. 3). Максимум спектра ФЛ растворов исследуемого нами препарата фермента (рН 6-7) при  $\lambda_{max}$  297 нм находится при 338 нм, что было показано ранее [4,

8]. Такое положение максимума ФЛ аргиназы согласно теории, предложенной Веденкиной и Бурштейном [2], означает, что остатки триптофана этого белка расположены в гидрофобных участках молекулы и только небольшая часть из них частично экспонирована к растворителю. При  $\lambda_{\text{возб}}$  280 нм максимум смещен на 1-2 нм в коротковолновую область, что свидетельствует об участии остатков тирозина в процессах ФЛ этого белка. Интенсивность ФЛ при  $\lambda_{\text{возб}}$  280 нм выше, чем при  $\lambda_{\text{возб}}$  297 нм. Это связано, очевидно, с разницей в коэффициентах поглощения остатков триптофана при этих длинах волн, а также с ФЛ остатков тирозина. Таким образом, хотя тирозиновые остатки вносят определенный вклад в процессы ФЛ аргиназы печени быка, основными центрами ФЛ этого фермента, как для большинства белков, являются остатки триптофана.

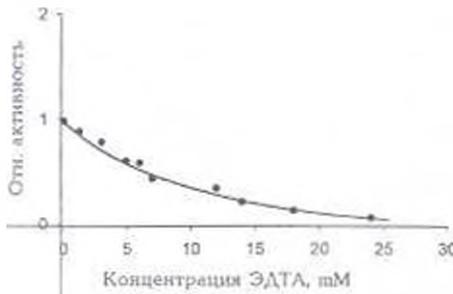


Рис. 2. Зависимость от инактивации аргиназы от концентрации ЭДТА (рН 7,5). Концентрация аргиназы —  $5 \times 10^{-5}$  М. Время инкубации 1 час.

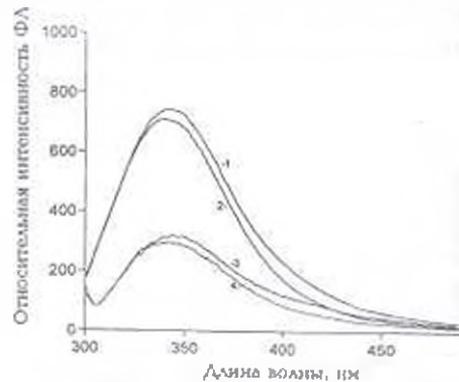


Рис. 3. Спектры ФЛ растворов аргиназы (рН 9,4) при  $\lambda_{\text{возб}}$  280 нм /1, 2/ и 297 нм /3, 4/ до /2,4/ и после /1,3/ взаимодействия с ЭДТА.

При различных значениях рН раствора параметры ФЛ аргиназы несколько изменяются. В табл. 1 приведены положения максимумов спектров ФЛ при указанных длинах волн возбуждения, величины отношений относительной интенсивности ФЛ в максимуме [ $I_{\text{max}}280/I_{\text{max}}297$ ] и величины отношений относительных квантовых выходов ФЛ [ $q280/q297$ ] растворов аргиназы в различных условиях. При рН 9,4, где фермент проявляет наибольшую активность, максимум ФЛ растворов аргиназы смещается на 2-3 нм в длинноволновую область (табл. 1). В щелочной среде, по-видимому, происходит некоторое изменение конформационного состояния молекулы фермента, что влияет на микроокружение флуоресцирующих аминокислотных остатков этого белка. Величины  $I_{\text{max}}280/I_{\text{max}}297$  и  $q280/q297$  несколько уменьшаются с ростом значений рН. Это можно объяснить уменьшением вклада остатков тирозина в процессы ФЛ при конформационных изменениях фермента в щелочной среде. Необходимо учитывать, что в растворах белков имеет место тушение ФЛ хромофоров находящимися вблизи группами, обладающими тушашими свойствами, в числе которых карбоксильные и аминогруппы, имидазол, пептидная и амидная группы и др. [1]. Небольшие изменения конформации аргиназы, по-видимому, влияют на взаимное расположение функциональных групп, что и отражается на параметрах ФЛ фермента.

Таблица 1. Влияние pH, ЭДТА и диализа ЭДТА-обработанного фермента (Э+Д) на некоторые параметры ФЛ растворов аргиназы

Условия	$\lambda_{\text{max}}$ 280 нм ФЛ [нм] $\pm 1$ нм	$\lambda_{\text{exc}}$ 297 нм ФЛ [нм] $\pm 1$ нм	$I_{\text{max}280}/I_{\text{max}297}$	$q_{280}/q_{297}$
pH 6	337	338	2,46	2,31
pH 8,6	339	341	2,33	2,38
pH 9,4	340	343	2,39	2,24
ЭДТА pH 6	337	338	2,4	2,4
ЭДТА pH 8,6	339	342	2,39	2,26
ЭДТА pH 9,4	343	348	2,34	2,1
Э+Д pH 6	337	338	2,41	2,02
Э+Д pH 8,6	345	348	2,46	2,23
Э+Д pH 9,4	347	351	2,4	2,62

Были измерены спектры ФЛ растворов фермента при тех же длинах волн возбуждения после взаимодействия с 12,5 мМ ЭДТА. Изменений в положении максимумов спектров ФЛ аргиназы после взаимодействия с этим реагентом в растворе с pH 6 не наблюдается (табл. 1), хотя активность, как показано выше, снижается. Это свидетельствует о том, что удаление катионов  $Mn^{2+}$  из активного центра аргиназы в растворе с pH 6 не влияет на конформацию гидрофобных участков молекулы фермента, в которых локализованы остатки триптофана и тирозина. Согласно литературным данным [19], при взаимодействии аргиназы печени быка с ЭДТА (pH 7.5) вместе с некоторым увеличением относительной интенсивности ФЛ происходит красное смещение на 2 нм, однако изменений во вторичной и третичной структурах фермента в этих условиях авторами обнаружено не было. В наших экспериментах в слабкокислой и нейтральной средах существенных изменений параметров ФЛ после взаимодействия с ЭДТА не обнаружено. На существование кислотоустойчивых гидрофобных участков, в которые погружены остатки триптофана аргиназы печени быка, указывалось также в работах [7, 19]. В растворах же аргиназы с pH 8,6 и 9,4 после взаимодействия с этим хелатором наблюдается красный сдвиг положения максимумов спектров ФЛ (рис. 3, табл. 1). При  $\lambda_{\text{exc}}$  280 и 297 нм максимумы спектров ФЛ аргиназы (pH 9,4) смещаются до 343 и 348 нм соответственно, что указывает на значительные изменения в конформации тех участков молекулы аргиназы, в которых расположены остатки триптофана и тирозина. Интенсивность ФЛ после взаимодействия с ЭДТА при pH 9,4, как видно из рис. 3, несколько возрастает, что можно объяснить перестройкой боковых цепочек аминокислот, расположенных вблизи от флуоресцирующих центров белка. Величина  $I_{\text{max}280}/I_{\text{max}297}$  почти не меняется, несколько снижается величина  $q_{280}/q_{297}$  после взаимодействия аргиназы с ЭДТА в щелочной среде (табл. 1). Следует отметить, что участие остатков тирозина в процессах ФЛ аргиназы в этих условиях становится более заметным. По-видимому, разворачивание свернутых участков макромолекулы аргиназы приводит к контакту части флуоресцирующих остатков тирозина с тушащими группами.

а также, возможно, затрудняет перенос энергии возбуждения внутри молекулы фермента. Однако, как показано выше, после взаимодействия аргиназы с ЭДТА в щелочной среде активность фермента частично сохраняется. В условиях данного эксперимента ферментативная активность аргиназы после взаимодействия с 12,5 мМ ЭДТА при рН 9,4 снижается на 75-80%. Таким образом, в щелочной среде при удалении, по-видимому, одного из катионов  $Mn^{2+}$  из активного центра под действием ЭДТА активность фермента частично сохраняется, а в гидрофобных участках белковой молекулы происходит значительные конформационные изменения. Тот факт, что при рН 6 параметры ФЛ аргиназы после взаимодействия с ЭДТА не меняются, свидетельствует о том, что в стабилизации гидрофобных участков фермента важную роль играют электростатические взаимодействия. В щелочной среде в результате депротонирования функциональных групп, участвующих в образовании ионных связей, в отсутствие катионов марганца, по-видимому, изменяется электростатическое равновесие, нарушается компактная структура белковой глобулы и флуоресцирующие аминокислотные остатки переходят в более гидрофильное микроокружение.

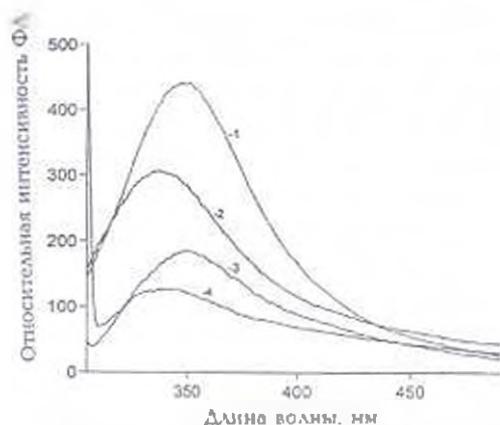


Рис. 4. Спектры ФЛ ЭДТА-обработанной и затем диализованной аргиназы при  $\lambda_{\text{возб}} 280$  нм /1,2/ и 297 нм /3,4/ в растворах с рН 6 /2,4/ и 9,4 /1,3/.

Далее были измерены спектры флуоресценции предварительно обработанной ЭДТА (12,5 мМ) при рН 7,6, а затем диализованной в течение 20 ч аргиназы. Ферментативной активности в растворах аргиназы после такой обработки обнаружено не было. После диализа растворы фермента разбавляли в 4 раза буферными растворами с разными значениями рН и измеряли спектры ФЛ. Как видно из рис. 4 и табл. 1, положения максимумов ФЛ и величины  $I_{\text{max}} 280 / I_{\text{max}} 297$  при рН 6 и в этом случае не меняются. Несколько снижается величина  $q_{280} / q_{297}$ , что, очевидно, связано с изменением формы спектров ФЛ аргиназы в данных условиях. Однако при рН 8,6 и 9,4 в растворах ЭДТА-обработанного и затем диализованного фермента величины смещений положений максимумов ФЛ в длинноволновую область увеличиваются (рис. 4, табл. 1). При  $\lambda_{\text{возб}} 280$  и 297 нм максимумы спектров ФЛ в растворе фермента с рН 9,4 находятся при 347 и 351 нм соответственно. Это свидетельствует о том, что флуоресцирующие аминокислотные остатки фермента полностью экспонированы к растворителю. Величина  $I_{\text{max}} 280 / I_{\text{max}} 297$  почти не меняется. Заметно увеличивается только величина  $q_{280} / q_{297}$  в щелочной среде (табл. 1), что связано с изменением формы спектров ФЛ. Таким образом, взаимодействие с ЭДТА и последующий диализ приводят к инактивации

фермента и значительному нарушению вторичной и третичной структур аргиназы, происходящими в щелочной среде, и катионы марганца, кроме участия в функционировании активного центра или обеспечения его активной конформации, играют важную роль в поддержании электростатического равновесия в структуре этого фермента. Полученные данные позволяют предположить возможность существования в молекуле аргиназы структурных доменов, обладающих разной конформационной стабильностью при различных значениях pH.

Дальнейшее изучение структурных и функциональных особенностей аргиназы печени быка с использованием современных физико-химических методов исследования позволят прояснить вопросы, связанные с локализацией  $Mn^{2+}$  в структуре фермента, и их ролью как в стабилизации активной конформации, так и в обеспечении оптимальных условий для протекания каталитического процесса.

Авторы выражают благодарность Ш. А. Маркарян и А. Г. Хосцяну (кафедра физической химии ЕГУ) за содействие и помощь при измерении спектров ФЛ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бурштейн Э.А. Молек. биол., 17, 3, 455-467, 1983.
2. Веденкина Н.С., Бурштейн Э.А. Молек. биол., 4, 5, 743, 1970.
3. Геворкян М.Л., Давтян М.А. Ученые записки ЕГУ, 2, 51-54, 1997.
4. Геворкян М.Л., Давтян М.А. Ученые записки ЕГУ, 3, 85-90, 2002.
5. Давтян М.А. Вопросы биохимии мозга, Ереван, 3, 273-278, 1967.
6. Давтян М.А. Вопросы биохимии мозга, Ереван, 4, 237-266, 1968.
7. Давтян М.А., Геворкян М.Л. Ученые записки ЕГУ, 1, 40-47, 1997.
8. Burshstein E.R., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. Photochem. Photobiol., 18, 263-279, 1973.
9. Carvajal N., Martinez J., De Oca F.M., Rodriguez J., Fernandez M. Biochim. Biophys. Acta, 527, 1, 1-7, 1978.
10. Chang Ch.I., Liao J.C., Kuo I. Amer. J. Physiol., 274, 1, Pt 2, 342-348, 1998.
11. Chen P.C., Broome J.D. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 163, 3, 354-359, 1980.
12. Dahlig E., Porembska Z. Acta biochim. Polon., 24, 3, 187-196, 1977.
13. Harell D., Sokolovsky M. Eur. J. Biochem., 25, 1, 102-108, 1972.
14. Hirsh-Kolb H., Kolb H. J., Greenberg D.M. J. Biol. Chem., 246, 2, 395-341, 1971.
15. Kanyo Z.F., Scolnick L.R., Ash D.E., Christianson D.W. Nature, 383, 6600, 554-557, 1996.
16. Kern B.M., Klela D., Dochos A.E., Wissmann P.B., Banky S. Amer. J. Hum. Genet. 47, 3, Suppl.-C.A 157, 1990.
17. Muszynska G., Ber E. Int. J. Biochem., 9, 10, 757-759, 1978.
18. Perozich J., Hempel J., Morris S.M.Jr. BBA, 1382, 1, 23-37, 1998.
19. Rossi V., Grandi C., Dalzoppo D., Fontana A. Int. J. Peptide Protein Res., 22, 239-250, 1983.
20. Scallan C., Clynes M., Joyce P. Biochem. Soc. Trans., 9, 4, 317, 1981.
21. Scolnick L.R., Kanyo Z.F., Cavalli R.Ch., Ash D.E., Christianson D.W. Biochemistry, 36, 34, 10558-10565, 1997.