

Օրիգինալ հոդվածներ • Оригинальные статьи • Original articles

Биолог. журн. Армении, 3-4 (58), 2006

УДК 577.155.3:577.112.4

**СТРОЕНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ПЕЧЕНОЧНОЙ АРГИНАЗЫ  
МЛЕКОПИТАЮЩИХ 1. РОЛЬ ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ**

**Մ.Լ. ԳԵՎՈՐԿՅԱՆ, Մ.Ա. ԴԱՎՅԱՆ**

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

В работе приведены современные представления о структуре активного центра и механизме действия печеночной аргиназы млекопитающих с использованием имеющихся в литературе данных, а также результаты собственных исследований. В активном центре каждой из трех субъединиц этого тримерного металлофермента содержится бинуклеарный марганцевый кластер, который непосредственно связан с процессом катализа. Лигандами катионов марганца в активном центре являются высоко консервативные остатки гистидина и аспарагиновой кислоты. Представлены данные о влиянии также и других двухвалентных катионов на активность и стабилизацию конформации этого фермента. Результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что, в аргиназе, кроме активного центра, по-видимому, имеются и иные участки связывания катионов  $Mn^{2+}$ , не чувствительные к другим двухвалентным катионам.

Օգտագործելով գրականության տվյալները և սեփական հետազոտությունների արդյունքները, աշխատանքում ներկայացրած են ժամանակակից պատկերացումները կաթնասունների լյարդի արգինազի ակտիվ կենտրոնի կառուցվածքի և կատալիտիկ ռեակցիայի մեխանիզմի մասին: Այդ եռամիավոր մետաղաֆերմենտի յուրաքանչյուր ենթամիավորը պարունակում է մանգանի կատիոններ, որոնք ներգրավված են ակտիվ կենտրոնում գտնվող երկմիջուկային կլաստերի կազմի մեջ և անմիջականորեն կապված են կատալիտիկ պրոցեսների հետ: Բացահայտված են մանգանի իոնների հիմնական լիգանդները ակտիվ կենտրոնում հիստիդինի և ասպարտատի մնացորդները, որոնք համարվում են կոնսերվատիվ: Ներկայացված են նաև տվյալներ այլ երկվալենտ կատիոնների ազդեցության մասին ֆերմենտի ակտիվության և կոնֆորմացիայի կայունացման վրա: Համաձայն մեր տվյալների, արգինազի մոլեկուլի կառուցվածքում թացի երկմիջուկային կլաստերից, կան նաև այլ կենտրոններ, որոնք փոխազդում են  $Mn^{2+}$  իոնների հետ և զգայուն չեն այլ մետաղների երկվալենտ կատիոնների նկատմամբ:

Based on the literature data and results of our investigations the modern conclusions about the structure of the active center and the mechanism of the catalytic reaction of mammalian liver arginase have been presented. This trimeric metalloenzyme contains binuclear manganese cluster in the active site of each subunit required for maximal catalytic activity. The ligands of manganese ions, histidine and aspartate residues, are strictly conserved. The data on the influence of other bivalent metal ions on the activity and conformational stability of arginase molecule have been shown. The results of our investigations show, that besides of binuclear manganese cluster, in the structure of arginase molecule there are other binding sites for manganese ions, which are inaccessible to other bivalent metal ions.

*Аргиназа - структура активного центра - механизм действия - катионы марганца*

Аргиназа [EC 3.5.3.1.] катализирует расщепление аргинина на мочевины и орнитин. Эта реакция является завершающим этапом цикла мочевины, который осуществляется уреотелической аргиназой (аргиназа I) в печени млекопитающих организмов. Неуреотелическая аргиназа (аргиназа II) в небольшом количестве также присутствует в печени, но в основном представлена в других тканях млекопитающих (почки, мозг, молочная железа и др.), а также в различных органах других организмов. Она играет важную роль в биосинтезе полиаминов, гистонов, креатина, глутамата, пролина [5, 6, 23]. Конкурируя с синтазой окиси азота за общий субстрат, аргиназа, очевидно, участвует и в регуляции биосинтеза NO в тканях [14]. Позиция аргиназы в метаболизме, где аргинин участвует в целом ряде важнейших процессов, происходящих в клетке, делает возможным ее участие в регуляции этих процессов [23]. Благодаря высокой концентрации в печени млекопитающих и цитоплазматической локализации, уреотелическая аргиназа легко выделяется в значительных количествах и используется как в научных целях, так и в медицине. Этот фермент применяется для лечения ряда аргинин-зависимых опухолей [4], а также наследственной аргининемии [29].

Уже на начальном этапе изучения различных свойств печеночной аргиназы было обнаружено, что двухвалентные ионы марганца активируют этот фермент [17]. Многочисленные исследования, проведенные на высокоочищенных препаратах аргиназы, выделенных из печени крысы, человека, быка и других млекопитающих, показали, что кроме активации, эти ионы стабилизируют конформацию фермента, регулируют оптимум pH, влияют на термостабильность, протеолиз трипсином и другие свойства [9, 16, 18, 27]. Структурные особенности аргиназы, выявленные с помощью рентгеноструктурного анализа, ЭПР-спектроскопии, а также на основании изучения свойств рекомбинантных форм фермента, полученных с помощью сайт-направленного мутагенеза [12, 13], позволили в основном охарактеризовать структуру активного центра аргиназы и представить предположительный механизм ее действия [13, 21]. В настоящее время установлено, что аргиназа печени крысы является примером с идентичными или почти идентичными субъединицами, который содержит двухкомпонентный марганцевый кластер  $[Mn_A^{3+} - Mn_B^{2+}]$  в активном центре каждой из трех субъединиц [21]. Молекулярная масса (Мм) субъединицы равна 35 кДа [21], 37 кДа [22]. Аминокислотная последовательность аргиназы печени крысы состоит из 323 аминокислотных остатков [22]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, бинуклеарный марганцевый кластер расположен в полости активного центра фермента, на дне расщелины глубиной 15Å [21]. Два катиона марганца, расстояние между которыми составляет 3,3Å, связаны друг с другом водным мостиком, и гидролиз аргинина, по-видимому, происходит с участием активированной молекулы воды, локализованной на расстоянии 2,36 и 2,41Å между ионами металла кластера (рис. 1).

Лигандами ионов марганца в активном центре аргиназы, согласно этой модели, являются остатки гистидина H101, H126 и карбоксильные группы остатков аспартата - D124, D128, D232, D234. Лигандами  $Mn_A^{2+}$  являются остаток гистидина H101 и остатки аспарагиновой кислоты D124, D128, D232. Второй ион марганца  $Mn_B^{2+}$  связан координационными связями с H126, D124, D234, D232. Все лиганды, кроме остатка аспартата D128, связаны водородными связями с другими

остатками белка, что обеспечивает дополнительную стабильность кластера [20]. Сравнение аминокислотных последовательностей печеночных аргиназ, выделенных из разных организмов, показало, что аминокислотные остатки, связанные координационными связями с катионами  $Mn^{2+}$ , являются консервативными, они сохраняются и в аргиназах из других организмов [25].

Кристаллографический анализ позволил определить расстояния между катионами марганца и лигандами, а также некоторыми окружающими лигандами атомами аминокислотных остатков, связанными с ними водородными связями - лигандами второй оболочки [13, 20]. Компьютерное изучение моделей активного центра аргиназы с использованием различных программ позволило выявить некоторые особенности строения, наиболее соответствующие экспериментальным данным [20]. Водородные связи остатков гистидина H101 и H126 помогают ориентации этих аминокислотных остатков в активном центре и в случае H126 модулируют длину  $Mn-N^{\delta}$  связи [23]. Согласно данным ряда авторов [25], остатки серина (Ser 230) и аспартата (Asp 274), которые находятся на близком расстоянии от активного центра аргиназы, могут быть непрямыми лигандами металла, связанными водородными связями с прямыми лигандами. Они способны влиять на электростатический потенциал металлсвязывающего участка и изменять величину  $pK_a$  координированной с металлом молекулы воды.

Исследование зависимости кинетических параметров каталитической реакции аргиназы от pH, проведенное на ферменте из печени быка [1, 28], показало, что в состав каталитического центра входит основная ионизирующаяся группа с  $pK_a$  8,6 - 8,7. По мнению авторов [28], эти цифры могут отражать ионизацию связанной с металлом молекулы воды. В активном центре аргиназы печени человека обнаружена ионотенная группа с  $pK_a$  8,5 [24], а у фермента из печени мыши - с  $pK_a$  7,9 [23]. Разница в значениях  $pK_a$  для аргиназ из печени разных млекопитающих может быть связана с видовыми особенностями структуры активного центра и различиями в расположении окружающих аминокислотных остатков. Следует отметить, что использование разных буферных растворов, по мнению ряда авторов [24], также может влиять на величину  $pK_a$  ионизирующейся группы

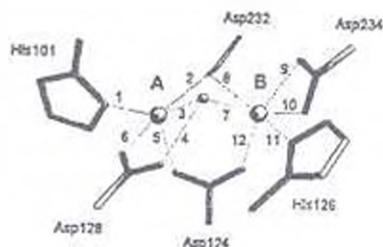


Рис. 1. Схема координационных связей ионов марганца в активном центре аргиназы печени крысы по данным [21].

каталитического центра аргиназы.

Изучение свойств рекомбинантных форм уреотелической аргиназы, полученных с помощью экспрессии в *E.coli*, показало, что важную роль в каталитическом процессе играют два полярных остатка, обнаруженные в активном центре аргиназы - остаток гистидина 141 [H141] и глутамата 277 [Glu277] [13]. Скрытый остаток гистидина H141 находится в углублении на половине расстояния до марганцевого кластера и, как считают авторы, играет роль "челнока" в процессе катализа. Этот остаток наиболее чувствителен к модификации N-бромсукцинимидом [15] и диэтилпирокарбонатом (ДПК) [10, 12] - аргиназы из печени крысы и человека теряют активность даже при использовании низких концентраций этих реагентов. Частичная инактивация аргиназы печени быка при модификации остатков гистидина ДПК, изучавшаяся нами ранее [7], также, очевидно, связана с модификацией этого остатка гистидина.

Предположительный механизм гидролиза аргинина аргиназой, предложенный группой авторов на основании результатов собственных исследований [13], показан на рис. 2. Депротонирование субстрата L-аргинина ( $H^+$ ) с помощью остатка гистидина H141 разрешает вход нейтральной гуанидиновой группы в полость активного центра, где находится двухмарганцевый кластер. Иминогруппа субстрата, наиболее вероятно, связывается с  $Mn_B^{2+}$ , что сопровождается разрывом связи этого иона марганца с волевым мостиком и образованием терминального водного лиганда на  $Mn_A^{2+}$ .

Далее, как полагают авторы, происходит переход протона от терминального водного лиганда к  $N^{\delta}$ -гуанидиновому атому субстрата с образованием нуклеофильного гидроксида на  $Mn_A^{2+}$  и катионной гуанидиновой группы. Это, по-видимому, способствует связыванию водорода  $-N^{\delta}H_2^+$  гуанидиновой группы с находящейся рядом карбоксильной группой Glu 277. Остаток Glu 277 расположен в полости активного центра на расстоянии 4,5 Å от катиона  $Mn_A^{2+}$ . Таким образом, расположенная уже в активном центре, заряженная гуанидиновая группа субстрата, связанная с карбоксильным анионом боковой цепочки Glu 277 (солевой мостик), ориентируется в позиции, наиболее удобной для протекания реакции. На следующем этапе в результате взаимодействия связанного с  $Mn_A^{2+}$  гидроксида с электрофильным углеродным атомом гуанидина формируются тетраэдрические промежуточные соединения, из которых при расщеплении связи  $-C-N^{\delta}H_2^+$  и образуются мочевина и L-орнитин ( $H^+$ ) (рис. 2). Отделение орнитина и мочевины происходит сразу в результате переноса протона от гистидина 141, что и восстанавливает состояние покоя. Такая последовательность процессов находится в соответствии с результатами исследований ряда авторов [26]. Предложенный механизм реакции, очевидно, может быть скорректирован в дальнейшем в соответствии с новыми экспериментальными данными.

Аминокислотная группа аргинина связывается в так называемом участке "узнавания", который, по-видимому, расположен на другой стороне полости активного центра. Опыты с использованием аналогов субстрата и

ингибиторов показывают, что в связывании аргинина в активном центре фермента важную роль играют электростатические взаимодействия, в которых участвуют  $\alpha$ -карбоксильная и  $\alpha$ -аминогруппа аргинина [13, 19]. Положительно заряженная боковая цепь Arg 21 может взаимодействовать с отрицательно заряженной  $\alpha$ -карбоксильной группой субстрата, а отрицательно заряженная боковая цепь Asp 181 - с положительно заряженной  $\alpha$ -аминогруппой. Важную роль играет также размер аполярной углеродной цепочки, которая обеспечивает более прочное связывание субстрата в активном центре фермента [19].

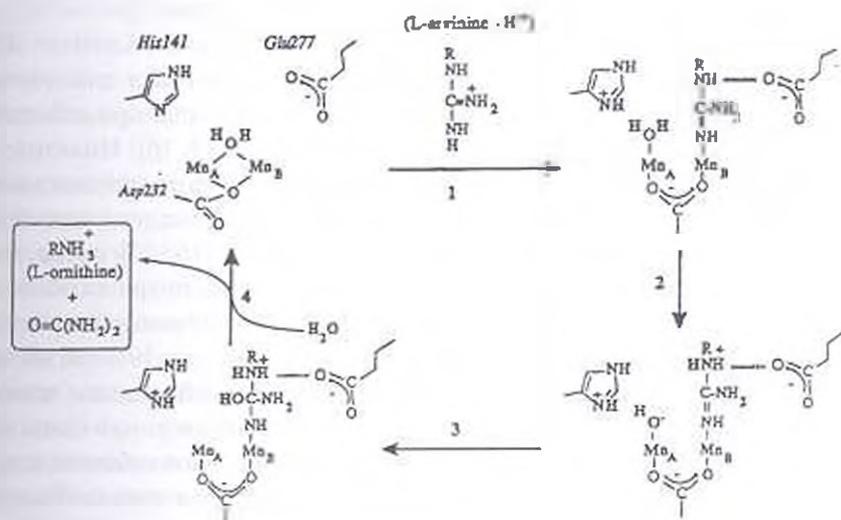


Рис. 2. Предположительная модель гидролиза L-аргинина аргиназой [13]

Для проявления максимальной активности аргиназы бинуклеарный марганцевый кластер должен быть заполнен. Активированная форма фермента из печени крыс содержит 2 Mn<sup>2+</sup> на субъединицу [26]. Как показано в работе [21], катионы марганца в кластере аргиназы координационно неэквивалентны - одни из них (Mn<sub>A</sub><sup>2+</sup>) сравнительно слабо связан и легко удаляется при диализе. Отсутствие слабо связанного катиона марганца вызывает небольшие изменения конформации и снижение аргиназной активности на 50 % [11]. Удаление же прочно связанного катиона марганца (Mn<sub>B</sub><sup>2+</sup>) приводит к полной потере активности и вызывает частичное "разворачивание" глобулы белка, хотя в основном третичная структура сохраняется. На основании экспериментальных данных было сделано предположение о том, что Asp 128 является депротонирующей группой для связанной с металлом молекулы воды [20]. Образующаяся сильная и короткая водородная связь сохраняется даже у форм, содержащих только один из катионов марганца (Mn<sub>B</sub><sup>2+</sup>), что может объяснить частичную активность такой формы фермента [11, 20].

Полностью активированная форма фермента при диализе теряет ионы Mn<sup>2+</sup> медленно. В течение почти 30 ч диализа при 4° удаляется 50% этих

ионов и пропорционально снижается ферментативная активность аргиназы печени крысы [18, 26]. Добавление  $Mn^{2+}$  вновь активизирует фермент, причем скорость этого процесса зависит от температуры - в присутствии 50 мМ  $MnCl_2$  (рН 7,5) при 55° полная активация происходит в течение 5 мин, тогда как при 30° для сравнимой активации необходимо 10 ч [18]. Аргиназа печени человека, содержащая один ион марганца на субъединицу, каталитически активна, однако также способна к полной активации при добавлении еще одного катиона марганца на субъединицу [11]. Диализованная аргиназа печени быка, сохраняющая около 30% исходной активности, активизируется при добавлении катионов марганца в 3 раза [2].

Удаление катионов марганца с помощью хелатирующего агента - ЭДТА при 37° и последующий диализ приводят к инактивации и диссоциации аргиназы печени крысы и человека на субъединицы, которые при добавлении ионов марганца реассоциируют в активный фермент [9, 16]. Инактивация аргиназы печени быка при диализе в присутствии ЭДТА не сопровождается изменением Мм фермента [16]. Не обнаружено заметных изменений и во вторичной и третичной структурах этого фермента [16, 27] после такой обработки. Эти данные свидетельствуют о том, что, несмотря на общность основных свойств, фермент из печени быка имеет существенные отличия в структуре субъединиц и/или в их связывании. Ряд авторов [9] считает, что, по крайней мере, один из катионов марганца в печеночной аргиназе человека не является незаменимым, так как реактивация инактивированного с помощью ЭДТА фермента, наблюдается также и при добавлении ионов кобальта, кадмия и никеля. Реактивация печеночной аргиназы человека при добавлении катионов марганца превышает исходную активность фермента в 6 - 7 раз, а катионы никеля, кадмия и кобальта восстанавливают активность ЭДТА обработанного фермента печени человека наполовину слабее [9]. Аргиназа печени быка активизируется, кроме катионов марганца, также катионами кобальта и кадмия, ионы никеля не оказывают влияния на этот фермент [2, 16]. Как считают некоторые исследователи [9, 26], металл-активатор аргиназы зависит от вида млекопитающего, и хотя  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  и  $Cd^{2+}$  активизируют ферменты из печени разных млекопитающих, наибольшую стимулирующую обеспечивают катионы марганца, который и является физиологическим активатором. Другие двухвалентные катионы ( $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sn^{2+}$ ) либо не оказывают влияния на активность печеночной аргиназы, либо ингибируют ее. Наиболее сильными ингибиторами являются катионы  $Zn^{2+}$  и  $Hg^{2+}$  [2, 23, 24, 26].

Увеличение концентрации ионов  $Mn^{2+}$  в растворе аргиназы вызывает инактивацию фермента [2, 30]. При использовании физиологических концентраций марганца в растворах белков при рН 7 лигандом ионов  $Mn^{2+}$  в белках часто является имидазольный азот гистидина [8, 21]. С увеличением значений рН раствора может происходить также связывание ионов металла с терминальными аминокислотами. При использовании высоких концентраций марганца наблюдается лиотропный эффект - частичное разворачивание белковой глобулы, при котором катионы металла могут

взаимодействовать и с пептидной связью, что наблюдалось при изучении взаимодействия  $Mn^{2+}$  с альбумином и лизоцимом в водных растворах [8].

Печеночная аргиназа демонстрирует заслуживающую внимания термостабильность [3, 27]. Температура полуинактивации аргиназы печени быка и крысы, определенная в разных условиях, равна  $T_{50} = 70^{\circ}-77^{\circ}$  [3, 27]. Длительный диализ или обработка ЭДТА, кроме инактивации, существенно снижают и термостабильность аргиназы, а добавление катионов марганца восстанавливает свойства нативного фермента [9, 27]. Однако для обеспечения функционирования фермента, по-видимому, необходимо весьма ограниченное количество ионов марганца. Согласно нашим данным [2], даже небольшой избыток этих ионов в растворе (2 мМ) значительно снижает термостабильность аргиназы печени быка. В присутствии же в растворе фермента катионов  $Co^{2+}$  или  $Cd^{2+}$  в той же концентрации такого явления не наблюдается [2]. Эти результаты указывают на особую специфичность взаимодействия катионов марганца с аргиназой. Такой вывод подтверждают также результаты экспериментов по изучению влияния двухвалентных катионов на конформацию ЭДТА обработанной и диализованной аргиназы печени быка с помощью измерения спектров ФЛ (неопубликованные данные). Добавление ионов  $Mn^{2+}$  к подвергнутому такой обработке ферменту вызывает необратимую денатурацию аргиназы. В присутствии же ионов кобальта, кадмия, никеля и даже цинка в той же концентрации (8 мМ) растворы остаются прозрачными, а максимум ФЛ несколько смещается в коротковолновую область, т. е. происходит некоторое упорядочение структуры белка. По-видимому, катионы  $Mn^{2+}$ , кроме активного центра, имеют также и другие участки связывания на поверхности молекулы аргиназы.

Инактивация аргиназы из печени человека и быка в присутствии ЭДТА зависит от pH раствора [24]. Влияние хелатора значительно сильнее проявляется в кислой среде (pH 6-7). Однако в работе [26] было показано, что хелаторы металлов (ЭДТА, цитрат) не ингибируют аргиназу печени крыс, несмотря на потребность фермента в двухвалентных катионах. Авторы объясняют это тем, что участок, где локализованы ионы марганца, в данных условиях недоступен растворителю. Эти результаты, так же как и целый ряд вопросов, связанных с участием двухвалентных катионов в каталитической реакции и стабилизации структуры фермента, остаются неясными и требуют дополнительных исследований. Катионы марганца в аргиназе играют важную и многофункциональную роль и, хотя в настоящее время получено много новой, интересной информации о локализации этих катионов в структуре фермента, об их участии в процессах функционирования и поддержания нативной конформации аргиназы, как видно из приведенного выше обзора, остается еще множество неясных вопросов. Дальнейшие исследования, очевидно, позволят лучше понять и объяснить участие этих катионов в сложной взаимосвязи между структурой и функцией печеночной аргиназы.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян М.Л., Давтян М.А. Уч. записки ЕГУ, 2, 66-69, 1995.
2. Геворкян М.Л., Давтян М.Л. Уч. записки ЕГУ, 2, 51-54, 1997.
3. Геворкян М.Л., Давтян М.А. Уч. записки ЕГУ, 1, 100-105, 2001.
4. Давтян М.А., Асламянц Ж.К., Алчуджян Н.Х., Добрынин Я.В. Биолог. журн. Армении, 35, 4, 256-259, 1982.
5. Давтян М.А. Вопр. биохимии мозга, 4, 237-266, 1968.
6. Давтян М.А., Буянтян Г.Х. Биохимия, 35, 412-417, 1970.
7. Давтян М.А., Геворкян М.Л. Биолог. журн. Армении, 33, 9, 941-947, 1980.
8. Хмара Л.А., Крюков А.И. Биофизика, 30, 3, 400-405, 1985.
9. Carvajal N., Torres C., Uribe E., Salas M. Comp. Biochem. Physiol., 112B, 1, 153-159, 1995.
10. Carvajal N., Uribe E., Salas M. Biochem. Arch., 12, 1, 19-26, 1996.
11. Carvajal N., Orellana M.S., Borquez J., Uribe E., Lopes V., Salas M. J. Inorg. Biochem., 98, 1465-69, 2004.
12. Cavalli R.Ch., Burke C.J., Kawamoto S., Soprano D.R., Ash D.E. Biochemistry, 33, 10652-10657, 1994.
13. Changulov S.V., Sossong T.M., Jr., Ash D.E., Dismukes G.Ch. Biochemistry, 37, 8539-8550, 1998.
14. Daghigh F., Fukuto J.M., Ash D.E. V.B.R.C., 292, 1, 174-180, 1994.
15. Daghigh F., Cavalli R.C., Soprano D.R., Ash D.E. Arch. Biochem. Biophys., 327, 1, 107-112, 1996.
16. Dahlig E., Poremska Z. Acta biochim. Polon., 24, 3, 187-196, 1977.
17. Hellerman L., Perkins M.E. J. Biol. Chem., 112, 1, 175-194, 1935.
18. Hirsh-Kolb H., Kolb H.J., Greenberg D.M. J. Biol. Chem., 246, 2, 395-401, 1971.
19. Hrabak A., Bajor T., Temesi A. Comp. Biochem. Physiol., 113B, 2, 375-381, 1996.
20. Ivanov I., Klein M.L. Proteins, 54, 1-7, 2004.
21. Kanyo Z.F., Scolnick I.R., Ash D.E., Christianson D.W. Nature, 383, 6600, 554-557, 1996.
22. Kawamoto S., Amaya Y., Murakami K., Tokunaga F., Iwanaga S., Kobayashi K., Sabeki T., Kimura S., Mori M. J. Biol. Chem., 262, 13, 6281-83, 1987.
23. Kuhn N. J., Talbot J., Ward S. Arch. Biochem. Biophys., 286, 1, 217-21, 1991.
24. Kuhn N. J., Ward S., Piponski M., Young T. W. Arch. Biochem. Biophys., 320, 1, 24-34, 1995.
25. Perozich J., Hempel J., Morris S.M. Jr. Biochim. Biophys. Acta, 1382, 23-37, 1998.
26. Reczkowski R.S., Ash D.E. Arch. Biochem. Biophys., 312, 1, 31-37, 1994.
27. Rossi V., Grandi C., Dalzoppo D., Fontana A. Int. J. Peptide Protein Res., 22, 239-250, 1983.
28. Turkoglu S., Ozer I. Int. J. Biochem., 24, 6, 937-939, 1992.
29. Vockley J.G., Goodman B.K., Tabor D.E., Kern R.M., Jenkinson C.P., Grody W.W., Cederbaum S.D. Biochem. Mol. Med., 59, 44-51, 1996.
30. Xie X-Y., Li X., Wang Z-Y., Wang C-X. Thermochim. Acta, 414, 19-23, 2004.

Поступила 28.IV.2006