



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1-2 (72), 2020

**RANA RIDIBUNDA ԳՈՐՏԻ ԼՅԱՐԴԻՑ ԱՆՁԱՏՎԱԾ ՈՐՈՇ
ՍՊԻՏԱԿՈՒՅԱՅԻՆ ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ԴԵՐԸ ԱՊԱԱԿՏԻՎԱՏՎԱԾ
ԱՐԳԻՆԱԶ Ի-Ի «ԻՆՔՆԱԿՎԱԶՄԱՆ» ԳՈՐԾԸՆԹԱՑՈՒՄ**

Է.Խ. ԲԱՐՍԵՂՅԱՆ, Յ.Մ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Ա.Յ. ԹՈՉՈՒՆՅԱՆ

ԵՊՀ, կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոն
hkarapetyan@ysu.am

Հետազոտվել են *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազ Ի-ի թթվային ապաակտիվացման և հետագա վերաակտիվացման գործընթացները: Բացահայտվել է ֆերմենտի մասնակի մաքրման արդյունքում ստացված որոշ սպիտակուցային ֆրակցիաների դերը արգինազի վերաակտիվացման գործընթացի արդյունավետության վրա: Ցույց է տրվել, որ այդ սպիտակուցների ազդեցությամբ փոխվում է հետազոտվող ֆերմենտի մոնոմեր/օլիգոմեր հարաբերությունը: Ենթադրվում է, որ այս սպիտակուցներն օժտված են ինչպես շապերոնանման սպիտակուցների, այնպես էլ դիսուլֆիդային կապերի առաջացմանը մասնակցող ֆերմենտների հատկություններով:

Արգինազ – դարձելի ապաակտիվացում – in vitro սպիտակուցի ինքնահավաքում

Исследовались процессы кислотной инактивации и дальнейшей реактивации аргиназы I печени лягушек *Rana ridibunda*: Выявлена роль некоторых белковых фракций, удаляемых при частичной очистке фермента на эффективность процесса реактивации, возможно, под влиянием этих белков изменяется соотношение мономер/олигомер исследуемого фермента. Предполагается, что эти белки обладают свойствами как шапероноподобных белков, так и свойствами ферментов, участвующих в образовании дисульфидных связей.

Аргиназа – обратимое инактивирование – самосборка белков in vitro

Acidic deactivation and further reactivation processes of arginase from *Rana ridibunda* frog liver have been studied. The role of some protein fractions, removed due to the enzyme partial purification, in the efficacy of arginase reactivation process was revealed. Monomer/oligomer relation of the studying enzyme was assumed to change under the effect of these proteins. It is possible that these proteins do not possess properties, characteristic both for chaperone-like proteins and for enzymes participating in formation of disulfide bonds.

Arginase – reversible inactivation – self-assembly of proteins in vitro

Գլոբուլային սպիտակուցների տարածական կառուցվածքի ձևավորումը կամ «ինքնահավաքումը» բարդ և փուլային գործընթաց է: Առաջնային ամինաթթվային հաջորդականությունը պահպանած ոչ բոլոր սպիտակուցներն են ունակ վերաբնափոխման (ռենատուրացման) in vitro պայմաններում: Պետք է նշել, որ ռենատուրացման համար արգելք է բնափոխված սպիտակուցի հնարավոր ագրեգացումը:

Ապացուցված է, որ վերաբնափոխման սովորաբար չեն ենթարկվում ֆերիլային սպիտակուցների խոշոր համալիրները և որոշ օլիգոմերային բարդ կառուցվածք ունեցող սպիտակուցները: Դժվարությամբ են ենթարկվում վերաբնափոխման թաղանթային սպիտակուցները, որոնք իրենց գործառնության վիճակին կարող են հասնել միայն լիպիդների մասնակցությամբ [1]:

Մի շարք հեղինակների կողմից [2, 5] դիտարկվել են հիմնական փորձարարական փաստերը և այն պարզ ֆիզիկական մոդելները, որոնք բացատրում են սպիտակուցի ինքնահավաքման ժամանակ տեղի ունեցող գործընթացները, թույլ տալով գնահատել սպիտակուցների «ինքնահավաքման» արագությունները և առանձնացնել այդ գործընթացի ամենակարևոր հատվածը՝ «կորիզի փաթեթավորումը»: Պոլիպեպտիդային շղթայից եռաչափ կառուցվածքի առաջացման գործընթացի ուսումնասիրման ձևերից է սպիտակուցային մոլեկուլի բնափոխումը և դրան հաջորդող վերաբնափոխումը:

Սպիտակուցների «ինքնահավաքման» գործընթացների վերաբերյալ կուտակված տեղեկատվությունը հիմնականում հիմնված է լուծույթներում առանձին մաքրված սպիտակուցների հետազոտությունների արդյունքների վրա: Պարզվել է, որ ինքնահավաքման գործընթացը *in vitro* պայմաններում ինքնաբուխ է, որը չի պահանջում ոչ մի լրացուցիչ տեղեկատվություն և էներգիայի աղբյուր [2, 6]: Այդ ուղղությամբ կատարված աշխատանքներից հետաքրքրություն է առաջացնում Պոլիցինի կողմից առաջարկված «հաված գլոբուլի» հիպոթեզը սպիտակուցների աստիճանական ինքնահավաքման գործընթացների վերաբերյալ [1]: Գլոբուլային սպիտակուցների մասին, այդ թվում ֆերմենտային սպիտակուցների մասին եղած տվյալները հաստատում են, որ տեղեկատվությունը սպիտակուցի տարածական կառուցվածքի մասին ներդրված է նրա առաջնային կառուցվածքում, ինչը համաձայն ժամանակակից տեսակետների համարվում է «գենետիկական կոդի» 2-րդ մաս: Սպիտակուցի պոլիպեպտիդային շղթան ունակ չէ ընդունել բոլոր հավանական կոնֆորմացիաները, որպեսզի որոշակի ժամանակահատվածում ընդունի իր յուրահատուկ տարածական կառուցվածքը (Լեվենտալի պարադոքս), որի համաձայն պոլիպեպտիդային շղթայի ինքնահավաքումը ուղղորդված գործընթաց է և տեղի է ունենում փուլերով [5,7]:

Օրգանիզմների նյութափոխանակության կարգավորման գործընթացում ամենախոցելի օղակներից է ազոտային փոխանակությունը, և այն կարգավորող մեխանիզմների հետազոտությունը ժամանակակից կենսաքիմիայի կարևոր խնդիրներից է: Այս խնդրի ուսումնասիրությունը թույլ կտա մշակել նպատակուղղված միջոցներ, որոնք կկարգավորեն օրգանիզմների կենսագործունեության գործընթացները:

Ներկայացված աշխատանքի խնդիրն է եղել հիմնվելով սպիտակուցային կառուցվածքի ինքնահավաքման ժամանակակից մոտեցումների վրա՝ ուսումնասիրել գլոբուլային ջրալուծ օլիգոմերային սպիտակուց՝ երկկենցաղների լյարդի I տիպի արգինազի դարձելի ապակոտիվացման գործընթացը: Ուսումնասիրվել է ֆերմենտի դարձելի ապակոտիվացման գործընթացում լյարդի արգինազի մասնակի մաքրման ընթացքում առանձնացված սպիտակուցային ֆրակցիաների դերը:

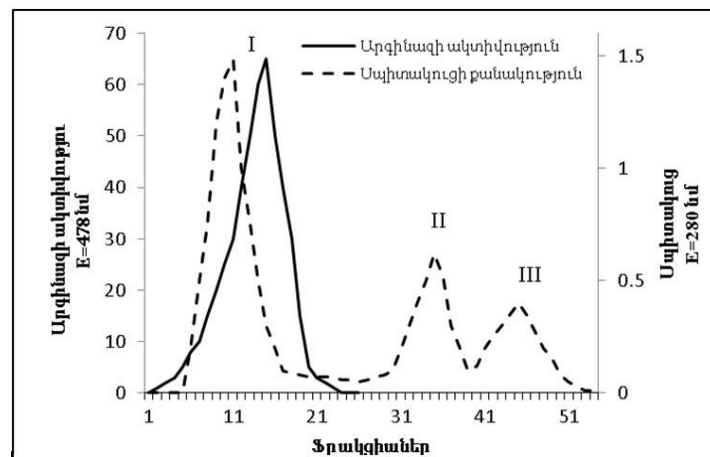
Նյութ և մեթոդ: Հետազոտման օբյեկտ է հանդիսացել ՀՀ-ում տարածված *Rana ridibunda* լճային գորտը (150-200 գ քաշով): Գորտերը պահվել են վիվարիումի պայմաններում սենյակային ջերմաստիճանում և սնվել ստանդարտ սննդակարգով: Փորձարարական աշխատանքների համար օգտագործվել է կենդանու լյարդը: Արգինազի ապակոտիվացումը կատարվել է 0.05 Մ գլիցին-HCl բուֆերում (pH 4) պայմաններում: Նախապես ապակոտիվացված արգինազի վերաակտիվացումն իրականացվել է ինկուբացման միջավայրի 0.05 Մ գլիցին-NaOH բուֆերով (pH 9.5) չեզոքացումից հետո, 15°C ջերմաստիճանում Mn^{2+} իոնների առկայությամբ (25 մկմոլ 1 մլ նմուշում) 22-70 Ժ տևողությամբ:

Արգինազի ակտիվությունը որոշվել է Ռատների մեթոդով որոշակի փոփոխություններով [12]: Ֆերմենտի ակտիվությունը արտահայտվել է 1 գ սպիտակուցում անջատված միզանյութի քանակով՝ մկմոլ/երով:

Ֆերմենտի մասնակի մաքրումն իրականացվել է ժել-ֆիլտրացման եղանակով (Sephadex G-200, Pharmacia, Uppsala, Sweden): Հավասարակշռումը և էյուցիան կատարվել է 0.05 Մ տրիս HCl բուֆերով (pH 7.4) էյուցիոն ծավալը կազմել է 4 մլ (արագությունը 24 մլ/ժ): Ֆրակցիաները հավաքելուց հետո սպիտակուցի կլանումը չափվել է 280 նմ ալիքի երկարության պայմաններում և յուրաքանչյուր նմուշում որոշվել է արգինազի ակտիվությունը սպեկտրաֆաիական եղանակով 478 նմ ալիքի երկարությամբ (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, USA): Ոչ արգինազային «ուղեկից» սպիտակուցների դերի ուսումնասիրման աշխատանքների ընթացքում վերջիններս վերաակտիվացման միջավայր ավելացվել են 1:5 հարաբերությամբ:

Արդյունքների վիճակագրական մշակումն իրականացվել է Student-Fisher-ի տարբերությունների և հավաստիության մեթոդի կիրառմամբ:

Արդյունքներ և քննարկում: Հետազոտություններում pH=4 պայմաններում նախապես ապաակտիվացման է ենթարկվել *R. ridibunda* գորտի լյարդի արգինազ I-ը (EC 3.5.3.1), որը երկմիջուկային Mn^{2+} պարունակող ֆերմենտ է, ճեղքում է L-արգինինը միզանյութի և L-օրնիտինի: Արգինազն օլիգոմերային ֆերմենտ է՝ կազմված 3 նմանատիպ 35-37 կԴա մոլեկուլային զանգվածով ենթամիավորներից, որոնցից յուրաքանչյուրի ակտիվ կենտրոնում $15\text{\AA}^\circ$ խորությամբ ճեղքի հատակում գտնվում են մանգանային երկմիջուկային կլաստերներ՝ Mn_A^{2+} և Mn_B^{2+} [10]:

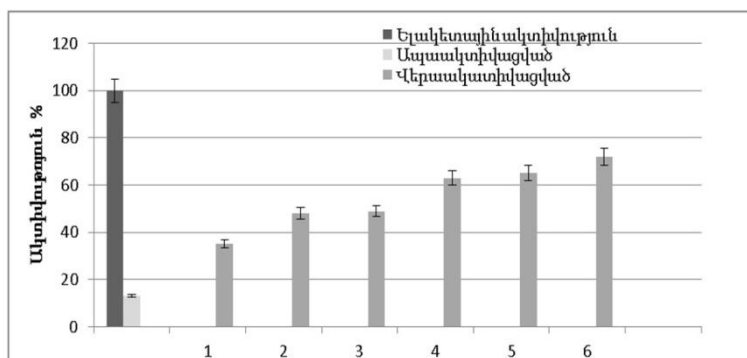


Նկ. 1. *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի մասնակի մաքրված պատրաստուկների ժել-ֆիլտրացման արդյունքները (սեֆադեքս G-200, n=6, M±m, p<0,05):

Իրականացվել է լյարդի արգինազի մասնակի մաքրում ժել-ֆիլտրացման եղանակով, որի ընթացքում ստացվել են երեք սպիտակուցային զազաթներ (I, II, III) (Նկ. 1), որոնցից I-ում հայտնաբերվել է արգինազային ակտիվություն, որի մոլեկուլային զանգվածը կազմել է 120 կԴա, II (30-40-րդ ֆրակցիաներ) և III (40-45-րդ ֆրակցիաներ) զազաթներում արգինազային ակտիվություն չի հայտնաբերվել, դրանց մոլեկուլային զանգվածները կազմել են համապատասխանաբար 68 և 48,6 կԴա:

Հետազոտությունների հաջորդ փուլում նախապես ապաակտիվացման ենթարկված ֆերմենտի վերաակտիվացման միջավայր ավելացվել են լյարդի լուծամզվածքներից անջատված այն սպիտակուցային ֆրակցիաները, որոնք չեն ունեցել արգինազային ակտիվություն՝ նպատակ ունենալով ուսումնասիրել նրանց ազդեցությունը վերաբնափոխման գործընթացի արդյունավետության և արագության վրա: Փորձարարական աշխատանքներն իրականացվել են ինչպես հետազոտվող ֆերմենտի իրական խթանիչ Mn^{2+} -ի առկայության, այնպես էլ բացակայության պայմաններում:

Արդյունքները ներկայացված են Նկ. 2-ում:



Նկ. 2. *Rana ridibunda* գորտի լյարդի I տիպի արգինազի pH 4 պայմաններում նախապես ապաստիվացված արգինազի վերաակտիվացումը (n=6, M±m, p<0,05):

1. Մասնակի մաքրված ֆերմենտի վերաակտիվացում (22 ժ, $-Mn^{2+}$)
2. Մասնակի մաքրված ֆերմենտի վերաակտիվացում (22 ժ, $+Mn^{2+}$)
3. Մասնակի մաքրված ֆերմենտի վերաակտիվացում (22 ժ, + II սպիտակուցային ֆրակցիա $-Mn^{2+}$)
4. Մասնակի մաքրված ֆերմենտի վերաակտիվացում (22 ժ, + II սպիտակուցային ֆրակցիա $+Mn^{2+}$)
5. Մասնակի մաքրված ֆերմենտի վերաակտիվացում (70 ժ, + II սպիտակուցային ֆրակցիա $-Mn^{2+}$)
6. Մասնակի մաքրված ֆերմենտի վերաակտիվացում (70 ժ, + II սպիտակուցային ֆրակցիա $+Mn^{2+}$)

Ինչպես ցույց են տվել արդյունքները, լյարդի լուծամզվածքից անջատված սպիտակուցային ֆրակցիաները (II զազաթ) զգալիորեն բարձրացրել են վերաակտիվացման գործընթացի արդյունավետությունը Mn^{2+} -ի առկայության պայմաններում: Վերաակտիվացման միջավայրի 22 ժ ինկուբացումից հետո 68 կԴա մոլեկուլային զանգվածով սպիտակուցները ապահովել են ֆերմենտի բավականին բարձր ելքը՝ 63.1% համեմատած մասնակի մաքրված և այդ սպիտակուցների բացակայությամբ վերաակտիվացված ֆերմենտի հետ (48.3 %):

Ելնելով այն փաստից, որ *in vitro* պայմաններում կատարված մոդելային փորձերում ցույց է տրվել, որ անցումը հալված գլոբուլի փուլից մինչև ինքնահալաթված կառուցվածք գործընթացի ամենադանդաղ փուլն է, երբ ֆերմենտային սպիտակուցի մոլեկուլը ձեռք է բերում այնպիսի տարածական կառուցվածք, որը մոտ է բնականոն սպիտակուցի կառուցվածքին [3, 7, 9], հետագա փուլերում վերաակտիվացման տևողությունը հասցվել է մինչև 70 ժամ (նկ. 2):

Համաձայն հետազոտությունների արդյունքների, 70 ժ վերաակտիվացումից հետո գործընթացի արդյունավետությունը եղել է ավելի բարձր՝ ֆերմենտի ակտիվությունը վերականգնվել է մինչև 72 %: Ընդ որում պետք է նշել, որ այդ ժամանակահատվածում նույնիսկ սպիտակուցների հնարավոր պրոտեոլիզի առկայության դեպքում (7 %) ակտիվության այդպիսի բարձրացումը բավականին հավաստի է:

Ստացված տվյալների ամփոփումից կարելի է եզրակացնել, որ լյարդի լուծամզվածքի որոշակի սպիտակուցային ֆրակցիաների առկայությամբ ֆերմենտի վերաակտիվացման ընթացքում հնարավոր է կատարվում են կոնֆորմացիոն փոփոխություններ, որոնց պատճառով փոխվում են հետազոտվող ֆերմենտի մոնոմեր/օլիգոմեր հարաբերությունը և կատարվում է օլիգոմերային կառուցվածքի յուրահատուկ ինքնահալաթում: Նշված սպիտակուցները կարող են ունենալ ինչպես կատալիտիկ, այնպես էլ ոչ կատալիտիկ բնույթ, այսինքն օժտված լինեն ինչպես շապերոնանման, այնպես էլ այն ֆերմենտների հատկություններով, որոնք մասնակցում են դիսուլֆիդային

կապերի առաջացման գործընթացում, բաժնի որ թթվային պայմաններում բայթայվում են սպիտակուցի դիսուլֆիդային կապերը [4, 8]: Այդ ֆերմենտների շարքում կարող է լինել նաև պրոտեին դիսուլֆիդիզոմերազը, որն *in vitro* պայմաններում մեծ դեր ունի պոլիպեպտիդների փաթեթավորման գործընթացում, այն կատալիզում է սպիտակուցների դիսուլֆիդային կապերի օքսիդացումը, վերականգնումը և վերախմբավորումը [8, 11], թույլ է տալիս սպիտակուցին արագ գտնել դիսուլֆիդային կապերի ճիշտ տեղակայում և գործում է որպես սպիտակուցների պարուրման կատալիզատոր: Նշված սպիտակուցների մաքրման և ուսումնասիրման հետազոտությունները թույլ կտան բացահայտելու հետազոտվող ֆերմենտի ինքնահավաքման հետաքրքիր կողմերը:

Հետազոտությունների արդյունքների ընդհանրացումը բերում է նաև մեկ այլ եզրակացության, որ որոշ դեպքերում անհրաժեշտ է հետազոտել ֆերմենտների գործունեությունը ոչ միայն վերջիններիս մաքուր վիճակում, այլ նաև *in situ*: Բնականոն ֆերմենտների հետազոտությունները կարող են բացահայտել նրանց որոշ կարևոր հատկությունները, որոնք վրիպում են մաքրված ֆերմենտների հետ աշխատող հետազոտողների ուշադրությունից:

Կենդանի բջիջն այնպիսի համակարգ է, որտեղ առանձին բաղադրամասեր միավորված են որպես մեկ ամբողջություն և դրանց միավորման գործընթացներն ու փոխազդեցությունները կարող են նպաստել նրանցից յուրաքանչյուրի «վարքի» փոփոխությանը:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Бычков В.Е., Семистонов Г.В., Балобанов В.А., Финкельштейн А.В. Расплавленная глобула: 45 лет спустя. Успехи биол. химии. 34, с., 2018.
2. Финкельштейн А.В., Иванова Д.Н., Галзиская О.В. Предсказание скоростей и ядер сворачивания глобулярных белков на основе теории их самоорганизации. Успехи биол. химии. 45, 3-36, 2005.
3. Acharya N., Mishra P., Jha S.K. Evidence for dry molten globule-like domains in the pH-induced equilibrium folding intermediate of a multidomain protein. J. Phys. Chem. Lett., 7, 173-179, 2016.
4. Conway M.E., Harris M. S-nitrosylation of the thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase and its role in neurodegenerative conditions Frontiers in Chemistry, 3, 27, 2015.
5. Finkelstein A.V., Garbuzynski S.O. Reduction of the search space for the folding of proteins at the level of formation and assembly of secondary structures. A new view on the solution of Levintal's paradox. Chem. Phys. Chem., 16, 3375-3378, 2015.
6. Finkelstein A.V., Ptitsin O.B. Protein Physics. A Course of lectures. 2-ed edition. Ch-s 7, 10, 13, 18, 19-21. Academic Press, 315 p., 2016.
7. Jha S.K., Udgaonkar J.B. Direct evidence for a dry molten globule intermediate during the unfolding of a small protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 12289-12294, 2009.
8. Khan RH, Siddiqui MK, Salahuddin P. Protein disulfide isomerase: structure, mechanism of oxidative protein folding and multiple functional roles. J. Biochem. Mol. Biology Res., 3, 2, 173-179, 2016.
9. Kmagata K., Kuwajima K. Surprisingly high correlation between early and late stages in non-two-state protein folding. J. Mol. Biol., 339, 1647-1654, 2006.
10. Mortier J., Prevost, J.R.C., Sydow D., Teuchert S., Omieczynski C., Bermudez M., Frederick R., Wolber G. Arginase structure and inhibition: catalytic site plasticity reveals new modulation possibilities. Sci. Rep. 2017, 7, 13616-13625.
11. Parakh S., Atkin J.D. Novel roles for protein disulphide isomerase in disease states: a double edged sword? Front. Cell Dev. Biol. 3, 30, 2015.
12. Shamirian A.S., Barseghyan E.Kh. Structure characterization of *Rana ridibunda* frog liver arginase. FEBS J., 279, 455, 2012.

Ստացվել է 13.01.2020