

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՇԱՄԻՐՅԱՆ ԱՆԱՄԱՐՅԱՄ ՍԱՐՔԻՄԻ

ԵՐԿԿԵՆՑԱՂՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ՈՒՐԵՈՒԹԵԼԻԿ ԱՐԳԻՆԱԶԻ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԱՅԻՆ
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ՝ *Rana ridibunda* ԳՈՐՏԻ ՕՐԻՆԱԿՈՎ

Գ.00.04 – Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ
Կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
Գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2014

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ШАМИРЯН АНАМАРЯМ САРКИСОВНА

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ УРЕОТЕЛИЧЕСКОЙ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ
АМФИБИЙ (НА ПРИМЕРЕ ЛЯГУШКИ RANA RIDIBUNDA)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.04- Биохимия

Е Р Е В А Ն 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝ ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կենս.գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր Մ.Ա. Դավթյան


Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս.գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Ռ.Գ. Քամայան
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Մ.Ա. Միմոնյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայ-Ռուսական (Մլավոնական)
համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2014թ. ապրիլի 25-ին, ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, ք. Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2014թ. մարտի 24-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ  Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель: Академик НАН РА, доктор биол. наук,
профессор М.А. Давтян


Официальные оппоненты: доктор биол. наук, профессор
Р.Г. Камалян
доктор биол. наук, профессор
М.А. Симонян

Ведущая организация: Российско-Армянский (Славянский)
университет

Защита диссертации состоится 25-ого апреля 2014 г., в 14⁰⁰ часов, на заседании Специализированного совета ВАК РА Биофизики 051 при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукиана 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 24-ого марта 2014 г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,
кандидат биол. наук, доцент  М.А. Парсаданян

ՆԵՐԱՏՈՒԹՅՈՒՆ

Թեմայի արդիականությունը և հիմնավորումը: Կենսաքիմիայի արդի և հետաքրքիր հարցերից է հանդիսանում հյուսվածքային և բջջային տարբերակման մոլեկուլային հիմքերի պարզաբանումը: Ներկայումս օրգանիզմների անհատական սպիտակուցային մոլեկուլների հետազոտությունները ավելի և ավելի են գրավում հետազոտողների ուշադրությունը: Նյութափոխանակության կարգավորման ընթացքում շատ կարևոր դեր են խաղում իզոֆունկցիոնալ սպիտակուցները (իզոֆերմենտներ), որոնք մասնակցում են տարբեր կենսաքիմիական պրոցեսներին: ԵՊՀ-ի կենսաքիմիայի ամբիոնի հետազոտությունները ակադեմիկոս Դավթյանի ղեկավարությամբ հաստատել են, որ երկկենցաղների անհատական զարգացման ընթացքում հատկապես մետամորֆոզի ժամանակ կատարվում են լյարդի արգինազի իզոֆերմենտային սպեկտրի խորը փոփոխություններ և զարգացման որոշակի փուլում ինդուկցվում է ուրեոթելիկ արգինազը, որը ընդգրկվելով արգինինի կենսասինթեզը իրականացնող ֆերմենտների խմբում պայմանավորում է միզանյութի առաջացման օրնիտինային ցիկլի ձևավորումը: Մասնավորապես ցույց է տրված, որ *Rana ridibunda* գորտերի մոտ մինչ մետամորֆոզ լյարդում հայտնաբերվում են արգինազի երեք իզոֆերմենտներ (I, II, III), որոնք միմյանցից տարբերվում են իրենց մոլեկուլային զանգվածներով: II իզոֆերմենտը զարգացման վաղ փուլերում ենթարկվում է ռեպրեսիայի, որից հետո մետամորֆոզի ընթացքում ռեպրեսիայի է ենթարկվում նաև III իզոֆերմենտը և կտրուկ ինդուկցվում է I իզոֆերմենտը: Ապացուցված է, որ շերտիուկների մետամորֆոզի ընթացքում կատարվում է անցում ամոնոթելիզմից ուրեոթելիզմ, որտեղ կարևորվում է I իզոֆերմենտի ինդուկցիան, որն իր բազմաթիվ բնութագրերով (մոլեկուլային զանգված, K_m , ցիտոպլազմատիկ լոկալիզացիա, թթվային ինակտիվացման և ռեակտիվացման առանձնահատկություններ և այլն) իդենտիկ է ուրեոթելիկ կենդանիների լյարդի արգինազին [Барсегян Э.Х. и др., 1977 а; Барсегян Э.Х. и др., 1977; Барсегян Э.Х. и др., 1979; Арцруни Н.А. и др., 2002]:

Ուրեոթելիզմի ձևավորումը որպես ամոնիակի չեզոքացման հարմարողական ուղի իրականանում է բարդ մեխանիզմով, որտեղ էական է ուրեոթելիկ արգինազի ինդուկցիան: Ցույց է տրված, որ լյարդի արգինազի իզոֆերմենտային սպեկտրի փոփոխությունները գորտերի տարբեր տեսակների համար կարող են լինել յուրահատուկ և արտացոլել կենդանու հարմարողական հնարավորությունները:

Ներկայումս գիտնականների կողմից կատարվում են խորը ուսումնասիրություններ տարբեր ծագում ունեցող արգինազների մի շարք հատկությունների վերաբերյալ, սակայն այդ աշխատանքների փոքր մասն է ուղղված ֆերմենտի կառուցվածքային առանձնահատկությունների հետազոտման ուղղությամբ: Հիմնականում գրականության մեջ ներկայացված են ժամանակակից պատկերացումներ ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի կառուցվածքի և գործողության մեխանիզմների վերաբերյալ: Հաշվի առնելով վերը նշվածը մեր կարծիքով, գորտերի լյարդի արգինազի խելատային միացությունով (ԷԴՏԱ) դարձելի ինակտիվացման պրոցեսի խորը ուսումնասիրությունը, և այդ պրոցեսի համեմատական

հետազոտությունը նախկինում կատարված թթվային ինկատիվացման հետազոտությունների արդյունքների հետ, կարող է բացահայտել երկկենցաղների լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի կառուցվածքային առանձնահատկությունների նոր կողմերը: Արգինազի ինկատիվացման և ռեակտիվացման վերոհիշյալ պրոցեսների մեխանիզմների ուսումնասիրումը ներառում է օլիգոմերային կառուցվածքի ձևավորման և ֆերմենտի ակտիվության ապահովման համար երկվալենտ իոնների և ֆունկցիոնալ խմբերի մասնակցության հարցերը:

Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները: Ներկայացվող աշխատանքին պատկանել էլեկտրոնային ուսումնասիրել իզոֆունկցիոնալ սպիտակուցների կառուցվածքային ձևավորման սկզբունքները *Rana ridibunda* (լճային գորտ) գորտի լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի օրինակով: Մեր առջև խնդիր էր դրված պարզաբանել գորտի լյարդի *ԷԴՏԱ*-ով դարձելի ինկատիվացման պրոցեսի առանձնահատկությունները, ինկատիվացման և ռեակտիվացման ընթացքում ենթամիավորային կառուցվածքների փոփոխությունները և ենթամիավորների որոշ հատկությունները: Խնդիր էր դրվել նաև ուսումնասիրել լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի կառուցվածքը տրիպսինով սահմանափակ պրոտեոլիզի եղանակով, որը հնարավորություն կտա որոշելու ֆերմենտի մոլեկուլի մակերեսին պրոտեազների նկատմամբ առանձին զգայուն կապերի դիրքը: Առաջացած ֆրագմենտների քանակի և տեսակի ուսումնասիրությունը թույլ կտա կարևոր ինֆորմացի աստանալ հետազոտվող ֆերմենտի պոլիպեպտիդային շղթայի պարուրման աստիճանի և մակրոմոլեկուլի կոնֆորմացիայի մասին: Նշված խնդիրների բացահայտման նպատակով հետազոտությունները կատարվել են հետևյալ ուղղություններով՝

- հետազոտել *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի *ԷԴՏԱ*-ով դարձելի ինկատիվացման պրոցեսի օպտիմալ պայմանները (pH-ի, ջերմաստիճանի, ժամանակի, ֆերմենտի մաքրության աստիճանի և երկվալենտ իոնների ազդեցությունը):
- ուսումնասիրել *ԷԴՏԱ*-ով նախապես ինկատիվացման ենթարկված արգինազի ռեակտիվացման պրոցեսի օպտիմալ պայմանները (Mn^{2+} և մի շարք երկվալենտ կատիոնների ազդեցությունը) և լյարդի էքստրակտների որոշակի ցածրամոլեկուլային ոչ արգինազային սպիտակուցային ֆրակցիաների դերը այս պրոցեսի ընթացքում:
- ուսումնասիրել *ԷԴՏԱ*-ի ազդեցությամբ *Rana ridibunda* գորտի լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի օլիգոմերային կառուցվածքի հնարավոր ճեղքավորումը:
- հետազոտել *ԷԴՏԱ*-ով ինկատիվացված արգինազի տրոհման ընթացքում առաջացած ենթամիավորների (դիմերների և մոնոմերների) մի շարք հատկությունները, երկվալենտ իոնների և թիոլային ռեագենտի (p-քլորմերկուրիթիոնգոատի) ազդեցությունը:
- հել-ֆիլտրացման եղանակով բացահայտել լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի տրիպսինով հիդրոլիզի արգասիքները և հետազոտել մի շարք գործոնների (տրիպսինոլիզի տևողություն, ջերմաստիճան, մի շարք երկվալենտ իոններ և

Լ-ամինաթթուներ) ազդեցությունը տրիպսինի նկատմամբ ֆերմենտի գոյնության վրա:

Աշխատանքի գիտական նորույթը և գործնական արժեքը: Առաջին անգամ երկկենցաղների լյարդի ուրեոթելիկ արգինազը ենթարկվել է կառուցվածքային մանրամասն ուսումնասիրության, մասնավորապես հայտնաբերվել են ֆերմենտի խելատային նյութով (ԷԴՏԱ) ինկատիվացման առանձնահատկությունները, ինչպես նաև տարբեր պայմաններում ֆերմենտի ռեակտիվացման օրինաչափությունները:

Առաջին անգամ ցույց է տրված, որ ռեակտիվացման պրոցեսում մասնկացում են ց պաշտպանողական սպիտակուցներ, որոնք ամենայն հավանականությամբ մտնում են “բազմաշապերոնային ցանցի” կազմի մեջ: Կատարելագործվել են երկկենցաղների օլիգոմերային արգինազի ենթամիավորային կառուցվածքի ուսումնասիրության մեթոդները և պարզաբանվել են դարձելի ինակտիվացման պրոցեսում նրանց կրած փոփոխությունները: Ենթամիավորային կազմի խորը ուսումնասիրությունը հնարավորություն է տվել ավելի հստակ բացահայտել և նկարագրել ֆերմենտի պրոտոմերները և խոսել ֆերմենտի տետրամերային կառուցվածքի մասին: Կիրառված կենսաքիմիական եղանակների և պրոտոմերների և օլիգոմերի մոլեկուլային զանգվածների դերի ուսումնասիրությունը թույլ է տալիս ստանալ ավելի խորը ինֆորմացիա ֆերմենտի կառուցվածքի մասին: Երկկենցաղների ուրեոթելիկ արգինազի ուսումնասիրության համար մեր կողմից կիրառված մոտեցումները, անկասկած, տեղ կգտնեն գործնական էնզիմոլոգիայում՝ տարբեր իզոֆերմենտների կառուցվածքային առանձնահատկությունների ուսումնասիրման նպատակով: Մետաբոլիզմի կարգավորման մեխանիզմների խնդիրների լուծումը թույլ կտա մշակել կենսագործունեության պրոցեսների նպատակաուղղված կարգավորման եղանակներ, ինչը ունի տեսական և կիրառական կարևոր նշանակություն:

Աշխատանքի փորձաքննությունը և հրապարակումները: Ատենախոսությունը փորձաքննության է ենթարկվել ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի կենսաքիմիայի ամբիոնի և գիտահետազոտական լաբորատորիայի ընդլայնված նիստում: Ստացված արդյունքները ներկայացվել են հետևյալ գիտաժողովներում՝ 22nd IUBMB and 37th FEBS congress, Seville, Spain, September 4-9, 2012; “*Perspectives for Development of Molecular and Cellular Biology 3*”, Yerevan, Armenia, 26-29 September 2012: Ատենախոսության թեմայով հրատարակված են 7 հոդվածներ և գիտաժողովների 1 թեզիս:

Ատենախոսության կառուցվածքը և ծավալը: Ատենախոսությունը կազմված է ներածությունից, գրականակնարկից, հետազոտման մեթոդների նկարագրությունից, հետազոտությունների արդյունքներից, ամփոփումից, եզրակացություններից, օգտագործված գրականության ցանկից: Աշխատանքը շարադրված է համակարգչային տեքստի 131 էջերում, պարունակում է 3 նկար, 17 աղյուսակ և 10 գծապատկեր:

ՀԵՏԱԶՈՏՄԱՆ ՕԲՅԵԿՏԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Հետազոտման օբյեկտ: Հետազոտման օբյեկտ է հանդիսացել Հայաստանի Հանրապետությունում տարածված *Rana ridibunda* (լճային) գորտը (150-200 գրաշով), որը բերված է Արարատյան դաշտավայրից: Գորտերը պահվել են վիվարիումի պայմաններում, սենյակային ջերմաստիճանում և սնվել են ստանդարտ սննդակարգով: Փորձարարական աշխատանքների համար օգտագործվել է կենդանու լյարդը: Կենդանուց անջատված թարմ լյարդը զգուշորեն չորացվել է ֆիլտրիթթով, կշռվել և ենթարկվել է հոմոգենիզացման Պոտեր-Էլվեյեմի տիպի սպակե հոմոգենիզատորով +4 °C-ում (հոմոգենիզատոր *Potter - Elvehjem Glass, Germany*):

Արգինազի ակտիվության որոշում: Պատրաստվել են հետազոտվող հյուսվածքի 5%-ոց հոմոգենատներ պատրաստված թորած ջրով: Արգինազի ակտիվությունը որոշվել է Ռատների մեթոդով [Rathner S., Pappas A., 1960] որոշակի փոփոխություններով: Հոմոգենատները ցենտրիֆուգվել են 20000 g, 30րոպե 0-4°C-ում սառը պայմաններում (LJIP-1, ՌԴ): 4 մլ ծավալով փորձնական (2.4 մլ 0.05 Մ գլիցին-NaOH բուֆեր (pH-9.5), 0.2 մլ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (5 մկՄ) և 0.4 մլ L-արգինին (50 մկՄ)) տարբերակները ինկուբացվել են 37 °C-ում 60 րոպեների ընթացքում: Ֆերմենտային ռեակցիան դադարեցվել է 1 մլ 10% ԵԶԲ-ի ավելացմամբ: Միզանյութի քանակը որոշվել է Արչիբալդի մեթոդով, որը մոդիֆիկացվել է Մուռի և Կաուֆմանի կողմից [Moore R., Kaufmann N. 1970]: Ֆերմենտի ակտիվությունը արտահայտվել է անջատված միզանյութի միկրոմոլերով հաշված 1 գրամ թաց հյուսվածքի կամ 1 կամ 100 մլ ֆերմենտի նմուշում:

Միզանյութի որոշումն համար սպակե խցանով փորձանոթի մեջ լցվել է 1 մլ ֆերմենտային պրեպարատ, 2.5 մլ թթվային խառնուրդ (1 մասիում H_3PO_4 և 3 մասիում H_2SO_4 , $FeCl_3$ և $MnSO_4$ աղերի առկայությամբ) և 0.25 մլ 1.5%-ոց դիացետիլոնոքսիմի լուծույթ (ԴԱՍՕ): Փորձանոթները թափահարվել են և պարունակությունը եռացվել է մթության մեջ, ջրային բաղնիքում 45 րոպե տևողությամբ: Սառեցված դեղնավուն գույնի նմուշները գունաչափվել են սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, USA) 478 նմ երկարության ալիքի տակ:

Արգինազի էքստրակտների մասնակի մաքրում: Ֆերմենտի մասնակի մաքրումը իրականացվել է հել-ֆիլտրացման եղանակով: Սեֆադեքս G-150 և G-200-ով (Sephadex G-150, G-200, Pharmacia, Uppsala, Sweden) լցված աշտարակի (1.5×70սմ) վրասվելացվել է 3 մլ լյարդի հոմոգենատի վերնսովածքը: Հավասարակշռումը և էլյուցիան կատարվել է թորած ջրով կամ 0.005 Մ տրիս-HCl բուֆերով (pH-7.4): Էլյուցիոն ծավալը կազմել է 4 մլ, արագությունը 20 մլ/ժ: Սպիտակուցների քանակական անալիզ կատարվել է 280 նմ ալիքի երկարության տակ (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, USA):

Արգինազի և իզոֆերմենտների մոլեկուլային զանգվածների որոշումը: Մոլեկուլային զանգվածները որոշվել են հել-ֆիլտրացման մեթոդով (Sephadex G-200, Pharmacia, Uppsala, Sweden): V_0 -ի (աշտարակի ազատ ծավալը) արժեքի որոշման համար օգտագործվել է 0.2 Մ երկնագույն դեքստրանի լուծույթ (Blue dextran 2000, "Pharmacia", 2×10^6 Դա մոլեկուլային զանգվածով): Որպես մարկերային սպիտակուցներ

օգտագործվել են սոյայի ունդերի ուրեազը (480000 Դա), խմորասնկային ակտիոլդեհիդրոգենազը (150000 Դա), մարդու շիճուկային ալբումինը (75000 Դա), պեպսինը (35000 Դա), տրիպսինը (23000 Դա) և ռիբոնուկլեազը (12000 Դա): **Սահմանափակ տրիպսինոլիզի** փորձերի ընթացքում օգտագործվել է մաքուր, քիմոտրիպսինի խառնուրդից զերծ տրիպսինի պրեպարատ (Самсон-Мед, Санкт-Петербург): Այնավելացվել է 1 մգ/մլ կոնցենտրացիայով 5%-ոց ֆերմենտային պրեպարատին: 20 ժամ անց ռեակցիան կանգնեցվել է սոյայի հակատրիպսինով (Sigma-Aldrich, Germany), որի կոնցենտրացիան լուծույթում կազմել է 0.2%: Սահմանափակ պրոտեոլիզի ընթացքում օգտագործվեն են 8 L-ամինաթթուներ՝ օրնիտին, լիզին-HCl, ալանին, վալին, պրովին, իզոլեյցին և լեյցին (1 մլ նմուշում 0.38 միլիմոլ):

Արգինազի ինակտիվացումը և ռեակտիվացումը: Ֆերմենտի ինակտիվացումը իրականացվել է 0.05 Մ գլիցին-NaOH բուֆերով (pH-7.4) ԷԴՏՍ-ի ազդեցությամբ (էթիլենդիամինտետրաացետատ, վերջնական կոնցենտրացիան 5×10^{-2} մոլ) սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում: Փորձերում օգտագործվել է ԷԴՏՍ-ի դինատրիումական աղը (-Na₂H₂-թթվայինմնացորդ), (Trilon B, մոլ. զանգված՝ 372 Դա, ABI chemicals, Germany): Նախապես ինակտիվացված արգինազի ռեակտիվացումը իրականացվել է 0.05 Մ գլիցին-NaOH բուֆերով (pH-9.5) 37 °C-ի պայմաններում, համապատասխան երկվալենտ կատիոնների՝ Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ անկայությամբ (25 մկմ 1 մլ հետազոտվող նմուշում):

Ստացված արդյունքների վիճակագրական մշակում Student-Fisher մեթոդով: Հետազոտությունների արդյունքում տացված տվյալները ներկայացված են միջին±ստանդարտ շեղում (M±SD) արժեքներով: ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացված և հետագա ռեակտիվացված արգինազի ակտիվության արդյունքների վիճակագրական մշակումը իրականացվել է *Student-Fisher*-ի տարբերությունների և հավաստիության մեթոդի կիրառմամբ: P<0,05 արժեքը համարվում է վիճակագրորեն նշանակալի:

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԱՐԳԻՆԱԶԻ ՔՆՆԱԿՎԱԿՆԵՐԸ ԵՎ ԴԴՆՆՑ ՔՆՆԱԿՎՈՒՄԸ

Rana ridibunda հասուն գորտի լյարդի արգինազի ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացման պրոցեսի վրա ազդող պայմանների ուսումնասիրությունը

Հաշվի առնելով այն փաստը, որ *Rana ridibunda* գորտի լյարդի ուրեոթելիկ արգինազը իրենից ներկայացնում է մետաղ պարունակող սպիտակուց, նպատակ է դրվել ուսումնասիրել խելատային նյութով՝ ԷԴՏՍ-ով նրա հնարավոր տրոհումը ենթամիավորների, որոնց բնութագրումը լրացուցիչ ինֆորմացիա կտա ուսումնասիրվող արգինազի կոնֆորմացիայի և ենթամիավորների որոշակի հատկությունների մասին: Նախ և առաջ մեր կողմից պարզաբանվել է *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացման պրոցեսի վրա մի շարք գործոնների ազդեցությունը (միջավայրի pH, ջերմաստիճան և ֆերմենտային պրեպարատի մաքրության աստիճան): Մասնավորապես ցույց է տրվել, որ *Rana ridibunda* գորտի լյարդի էքստրակտների արգինազը ինակտիվանում է 92%-ով 2

ժամվա ընթացքում միջավայրի pH=7.4-9.5 սահմաններում, 20-22°C-ի պայմաններում: Հետագա փորձերը լյարդի արգինազի էՆՏՍՍ-ով ինակտիվացման պրոցեսի վերաբերյալ կատարվել են pH-7.4-ի պայմաններում:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ էՆՏՍՍ-ով ֆերմենտի ինակտիվացման պրոցեսը ունի արտահայտված ջերմաստիճանային կախվածություն: 20°C-ի պայմաններում հետազոտվող ֆերմենտը 1 ժամ հետո կտրուկ ինակտիվանում է 80%-ով, իսկ 4°C-ի պայմաններում, նույն ժամանակահատվածում էՆՏՍՍ-ով ինակտիվացում չի կատարվում: Նույնիսկ 22 ժամ հետո, 4°C-ի դեպքում ֆերմենտի ակտիվությունը ընկնում է միայն 10%-ով: Ելնելով ստացված տվյալներից մեր հետագա փորձերը կատարվել են 20-22°C-ի պայմաններում:

Հետաքրքրական է այն փաստը, որ ֆերմենտի մաքրության աստիճանը որևէ ազդեցություն չունի էՆՏՍՍ-ով ինակտիվացման պրոցեսի վրա: Մեր հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տվել, որ ինչպես մասնակի մաքրված, այնպես էլ էքստրակտների արգինազը հավասարաչափ ինակտիվանում է 2 ժամ հետո 92-94%-ով: Հատկանշական է այն, որ *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազում էՊՌ սպեկտրոսկոպիայի եղանակով նախկինում հայտնաբերվել են 2 տիպի երկվալենտ Mn իոններ, որոնք ասոցացված են ֆերմենտի մակերեսին, բայց միննույն ժամանակ տարբերվում են իրենց սպիտակուցային շրջապատով [Барсегян и др. 1979]: Մեր հետազոտությունների ընթացքում գորտի լյարդի արգինազի արագ ինակտիվացումը էՆՏՍՍ-ի ազդեցությամբ (2 ժամվա ընթացքում) հավանաբար վկայում է մանգան իոնների և արգինազի ենթամիավորների հարաբերական անկայուն կապի և այդ իոնների հեշտ դիսոցիացման մասին:

Mn²⁺-ի և մի շարք երկվալենտ իոնների դերը *Rana ridibunda* հասուն գորտի լյարդի արգինազի էՆՏՍՍ-ով դարձելի ինակտիվացման պրոցեսի վրա

Հաշվի առնելով այն հանգամանքը, որ երկվալենտ կատիոնների հեռացումը դիալիզի կամ խելատային ռեագենտների միջոցով հանգեցնում է ֆերմենտի ակտիվության կորստին [Rossi V. et al., 1983; Dabir S. et al., 2005], հետազոտական աշխատանքների հաջորդ փուլում, մեր նպատակն է եղել՝ պարզաբանել Mn²⁺ իոնների դերը *Rana ridibunda* գորտի լյարդի ուրեոթելիկ արգինազի ինակտիվացման պրոցեսում: Խնդրի պարզաբանման նպատակով կատարվել է 10 րոպեների ընթացքում էքստրակտների նախաինկուբացում Mn²⁺ իոնների առկայությամբ, որից հետո 2 ժամվա ընթացքում ֆերմենտը ենթարկվել է ինակտիվացման էՆՏՍՍ-ի ազդեցությամբ (0.05 Մ գլիցին-NaOH բուֆեր, pH 7.4):

Ինչպես նկատելի է հետազոտման արդյունքներից (աղյուսակ 1), Mn²⁺ իոնների առկայությամբ նախաինկուբացումը 52%-ով «պաշտպանում» է հետազոտվող ֆերմենտը ինակտիվացումից: Մեր կողմից ստացված տվյալների համաձայն, ակնհայտ է, որ Mn²⁺ իոններով նախաինկուբացման ժամանակ, այդ իոնների մի մասը

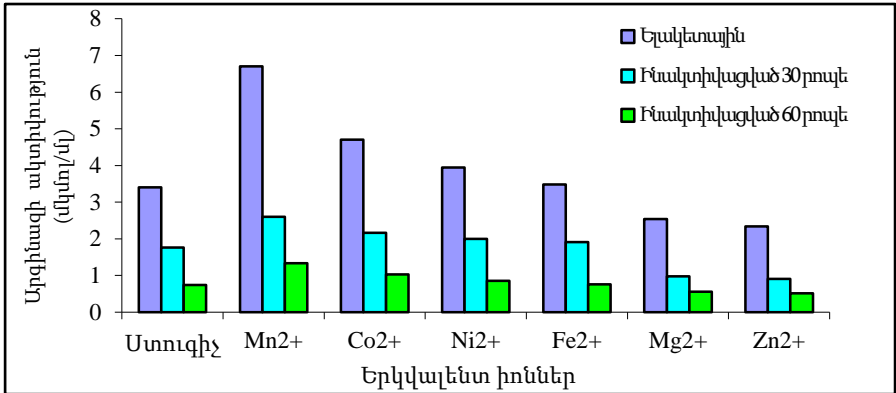
ամուր կապվում է ապոֆերմենտի որոշակի հատվածի հետ և չի անջատվում ԷԴՏՍ-ի ազդեցությամբ՝ պահպանելով ֆերմենտի ակտիվ կոնֆորմացիան:

Աղյուսակ 1. Mn^{2+} իոնների դերը *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացման պրոցեսի ընթացքի վրա (pH 7.4) (n=6, $M \pm m$, $p < 0,05$)

Նմուշ	Ելակետային ակտիվություն (մկմոլ/գ)	Ակտիվություն 2 ժամ անց (մկմոլ/գ)	Ինակտիվ. %-ը
ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացում	30200±309.2	2114±107	93
Mn^{2+} -ով նախահնկուրացում (10 րոպե), ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացում	31000±337.4	16120±263	48

Հետագա փորձարարական հետազոտությունները ուղղված են եղել մի շարք երկվալենտ իոնների (Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} և Zn^{2+}) ազդեցության ուսումնասիրմանը ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացման պրոցեսի ընթացքի վրա, ինչպես նաև՝ այդ իոններով արգինազի ակտիվության խթանման հնարավորությունների բացահայտմանը: Փորձերի տվյալ փուլում լյարդի արգինազը 2 ժամ տևողությամբ համապատասխան երկվալենտ իոնների ներկայությամբ նախահնկուրացվել է, որից հետո իրականացվել է ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացում (pH=7.4) 30 և 60 րոպեների ընթացքում: Ֆերմենտի ակտիվության որոշման նպատակով կատարվել է համապատասխան երկվալենտ իոնով հնկուրացում (pH=9.5): Փորձերի արդյունքները (գծապատկեր1) վկայում են, որ բացի Mn^{2+} իոններից, պաշտպանողական ազդեցություն ունեն նաև Co^{2+} (23-40%) և Ni^{2+} (14-16%) կատիոնները, Fe^{2+} կատիոնները գրեթե չեն ազդում ինակտիվացման վրա (2.5-4.5%), իսկ Mg^{2+} և Zn^{2+} -ի ազդեցությամբ ինակտիվացումը խորացվում է: Վերլուծելով ստացված արդյունքները, կարելի է եզրակացնել, որ երկվալենտ իոնների ազդեցության օրինաչափությունը (խթանիչներ՝ $Mn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+}$, չեզոք Fe^{2+} , արգելակիչ՝ Mg^{2+} և Zn^{2+}) նատիվ և ինակտիվացված ֆերմենտի մոտ պահպանվում է, սակայն նկատվում է որոշ կատիոնների խթանման աստիճանի ունակության փոփոխություն:

Մեր տվյալները համապատասխանում են կաթնասունների վրա մի շարք հեղինակների կողմից ստացված արդյունքներին [Reczkowski R. S., Ash D. E. 1994; Carvajal N. et al., 1995], որոնց համաձայն, կախված կաթնասունի տեսակից, արգինազի համար խթանիչ մետաղը փոփոխվում է և չնայած այն հանգամանքին, որ Co^{2+} , Ni^{2+} և Cd^{2+} իոնները ակտիվացնում են լյարդի ֆերմենտը տարբեր կաթնասունների մոտ, սակայն միևնույն է ամենաբարձր խթանումը ապահովում են Mn^{2+} կատիոնները, որոնք և հանդիսանում են ֆերմենտի ֆիզիոլոգիական խթանիչ: Այլ երկվալենտ կատիոնները՝ Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} և Sn^{2+} կամ որևէ ազդեցություն չունեն արգինազի ակտիվության վրա կամ էլ արգելակում են ակտիվությունը: Արդյունավետ արգելակիչներ են հանդիսանում Zn^{2+} և Hg^{2+} -ը [Kuhn N. J. et al., 1991; Reczkowski R. S., Ash D. E. 1994; Kuhn N. J. et al., 1995]:



Գծապատկեր 1. Երկվալենտ կատիոնների (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} և Zn^{2+}) դերը *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի ԷՂՏՍ-ով ինակտիվացման պրոցեսում ($n=6$, $p<0,05$): Յուրաքանչյուր նմուշի (ելակետային, 30 և 60 րոպե ինակտիվացում) ակտիվությունը (մկմոլ/մլ) համեմատվել է համապատասխան ստուգիչ տարբերակի նկատմամբ: Ստուգիչ տարբերակներում բացակայում են մետաղական իոնները: Ֆերմենտի ակտիվության որոշման նպատակով կատարվել է $pH=9.5$ -ում համապատասխան երկվալենտ իոնով ինկուբացում:

***Rana ridibunda* գորտի լյարդի ԷՂՏՍ-ով դարձելի ինակտիվացման պրոցեսի հետագա ռեակտիվացման առանձնահատկությունները**

Ուսումնասիրության այս փուլում մեր նպատակն է եղեղ պարզել ԷՂՏՍ-ով նախապես ինակտիվացած *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի ռեակտիվացման հնարավորությունները: ԷՂՏՍ- ով 2 ժամ ինակտիվացումից հետո ինկուբացման միջավայրի pH -ը հասցվել է 9.5-ի, որից հետո ֆերմենտային պրեպարատը ինկուբացվել է 22 ժամ Mn^{2+} իոնների առկայությամբ: Փորձերը կատարվել են ինչպես էքստրակտների (20000g, 30 րոպե), այնպես էլ մասնակի մաքրված պրեպարատների վրա (20000g, 30 րոպե, սեֆադեքս G-200):

Ստացված արդյունքները ցույց են տվել, որ ԷՂՏՍ-ի ազդեցությամբ ինակտիվացումը դարձելի է ինչպես էքստրակտների տարբերակներում, այնպես էլ մասնակի մաքրված պրեպարատների դեպքում: Նկատելի են որոշակի տարբերություններ ֆերմենտի ակտիվության վերականգնման գործընթացում, որոնք պայմանավորված են ինչպես Mn^{2+} իոնների առկայությամբ, այնպես էլ ֆերմենտի մաքրման աստիճանով: Ֆերմենտը ենթարկվել է ռեակտիվացման, ինչպես մանգան իոնների բացակայությամբ (ռեակտիվացումը կազմել է 37% մասնակի մաքրված պրեպարատների դեպքում և 40% էքստրակտների տարբերակներում), այնպես էլ առկայության պայմաններում (69% և 75% համապատասխանաբար): Ուշադրություն

է գրավում այն փաստը, որ էքստրակտների տարբերակներում ռեակտիվացման տոկոսը ավելի բարձր է (75%), քան մասնակի մաքրված պրեպարատների դեպքում (69%): Ամենայն հավանականությամբ այն սպիտակուցային ֆրակցիաները, որոնք չեն պարունակում արգինազ և անջատվել են հել- ֆիլտրացման ընթացքում, ունեն որոշակի դեր ռեակտիվացման պրոցեսում:

Հետաքրքիր է այն, որ ռեակտիվացման պրոցեսի ընթացքում ակտիվության վերականգնումը իրականանում է ոչ միայն “ֆիզիոլոգիական ակտիվատոր” Mn^{2+} -ի (75%), այլ մի շարք երկվալենտ կատիոնների առկայության պայմաններում, ընդ որում Ni^{2+} իոնների դեպքում ռեակտիվացումը կազմել է 140%, իսկ Fe^{2+} իոնների դեպքում՝ 91%:

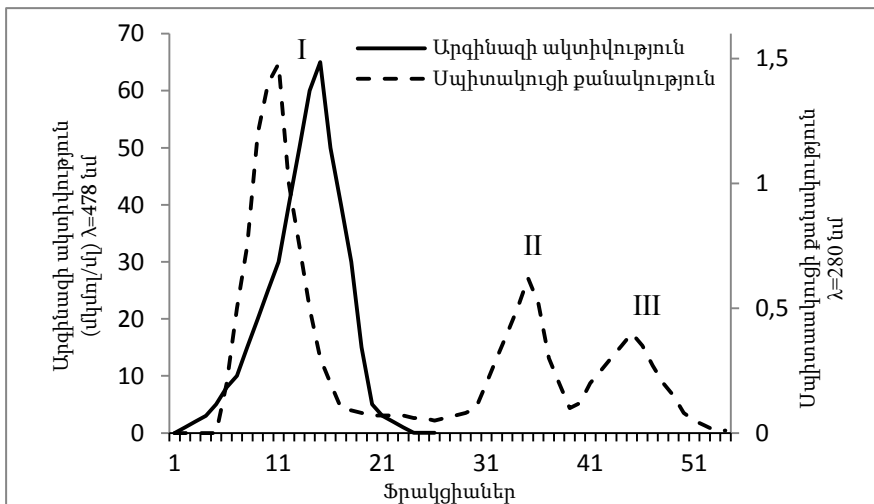
Այս տարբերակներում ֆերմենտի ակտիվությունը լրիվ վերականգնվում է 100%-ով, որից հետո ռեակտիվացված Ni^{2+} -արգինազի ընդհանուր ակտիվությունը խթանվում է նաև 40%-ով: Հնարավոր է, որ Mn^{2+} իոնների հեռացումը մեր փորձերի ընթացքում բերելով գորտի յարդի արգինազի դեգրադացմանը, փոխել է ֆերմենտի կոնֆորմացիան և հավանաբար նրա լիցքը, որն էլ արտահայտվել է այս կամ այն իոնի ակտիվացման աստիճանի, ինչպես նաև ֆերմենտի օլիգոմերային կառուցվածքի ձևավորման պրոցեսի վրա:

Ոչ արգինազային սպիտակուցային ֆրակցիաների ազդեցությունը *Rana ridibunda* գորտի յարդի արգինազի ռեակտիվացման պրոցեսի վրա

Ելնելով այն հանգամանքից, որ ֆերմենտի մաքրման ընթացքում անջատված սպիտակուցային ֆրակցիաները կարևոր դեր են խաղում հետագա ռենատուրացման պրոցեսում, այդ նպատակով մեր կողմից կատարվել է յարդի արգինազի ֆրակցիոնացում սեֆադեքս G-200-ով հել-ֆիլտրացման միջոցով: Համաձայն ստացված տվյալների ֆրակցիոնացման ընթացքում յարդի սպիտակուցային և արգինազային ակտիվության սպեկտրը ներկայացված է երեք զագաթներով (I, II, III), 10, 35 և 50 ֆրակցիաներում (գծապատկեր2), որոնցից I-ը իրենից ներկայացնում է հետազոտվող ֆերմենտ՝ արգինազը, II (30-40 ֆրակցիաներ) և III (40-45 ֆրակցիաներ) զագաթներում արգինազային ակտիվություն չի հայտնաբերվել: Այնուհետև հել-ֆիլտրացման եղանակով որոշվել են ստացված ոչ արգինազային սպիտակուցային ֆրակցիաների մոլեկուլային զանգվածները: Առաջին ֆրակցիայի (արգինազ) մոլեկուլային զանգվածը կազմել է 120000 Դա, երկրորդ ֆրակցիայի մոլեկուլային զանգվածը 68000 Դա, իսկ երրորդ ֆրակցիայի մոլեկուլային զանգվածը կազմել է 48600 Դա:

Ամփոփելով այս փուլի տվյալները՝ պետք է նշել, որ հայտնաբերված սպիտակուցային ֆրակցիաների արդյունավետությունը ռեակտիվացման ընթացքում եղել է տարբեր II-րդ ֆրակցիայի (68000 Դա) դերը արտահայտվել է ռեակտիվացումից 22 ժամանց, իսկ III-րդ ֆրակցիայի (48600 Դա) դեպքում ռեակտիվացումից 2 ժամ հետո: Հատկանշական է այն փաստը, որ երկու դեպքերում էլ առավելագույն ռեակտիվացումը գրանցվել է Mn^{2+} իոնների առկայության

պայմաններում: Ռեակտիվացման արդյունավետությունը սպիտակուցային II-րդ և III-րդ ֆրակցիաների միաժամանակ ավելացման դեպքում բարձրացել է մոտ 10 անգամ ինակտիվացված նմուշի համեմատությամբ:



Գծապատկեր 2. *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի մասնակի մաքրված պրեպարատների հել-ֆիլտրացման արդյունքները (սեֆադեքս G-200, n=5, p<0,05): *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազը ներկայանում է մեկ գագաթով՝ 1-20-րդ ֆրակցիաներում, որը ֆիլտրվում է բարձրամոլեկուլային սպիտակուցների (գագաթ I) հետ: Սպիտակուցային II-րդ գագաթը (68000 Դա մոլեկուլային զանգված) ներկայացված է 30-40-րդ ֆրակցիաներում, իսկ սպիտակուցային III-րդ գագաթը (48600 Դա մոլեկուլային զանգված) ներկայացված է 40-45-րդ ֆրակցիաներում: Սպիտակուցի քանակության գնահատումը կատարվել է կլանման արժեքի միջոցով իսկ արգինազի ակտիվությունը ներկայացված է մկմոլ/մլ-ով:

Հավանաբար մեր կողմից օգտագործված ֆրակցիաները իրենցից ներկայացնում են պաշտպանողական սպիտակուցներ, որոնք օժտված են շապերոնանման հատկություններով և հնարավոր է, որ նրանք մտնում են վերջին տարիներին հայտնաբերված այսպես կոչված “մուլտիշապերոնային ցանցի” կազմի մեջ [Ben-Zvi A. et al., 1998; Huang G. et al., 2002; Macrae T. 2000]: Իհարկե, մեր կողմից օգտագործված սպիտակուցային ֆրակցիաները որպես շապերոն բնութագրելու համար անհրաժեշտ են այդ սպիտակուցների հետագա լրացուցիչ կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ առանձնահատկությունների ուսումնասիրություններ:

***Rana ridibunda* գորտի լյարդի ԷՂՏՄ-ով դարձելի ինակտիվացման պրոցեսի ընթացքում ենթամիավորային կազմի կրած փոփոխությունները**

Ուսումնասիրելով ԷՂՏՄ-ով դարձելի ինակտիվացման պրոցեսի առանձնահատկությունները՝ անշուշտ կարևոր նշանակություն կունենար նաև ենթամիավորային կազմի կրած փոփոխությունների հետազոտությունը: Մեր նպատակն է եղել՝ պարզել ֆերմենտի ինակտիվացման պրոցեսում նրա հնարավոր տրոհումը ենթամիավորների և ապա ռեակտիվացման ժամանակ վերամիավորումը՝ օլիգոմերային ֆերմենտի կառուցվածքի ձևով: pH 7.4-ի պայմաններում ԷՂՏՄ-ով 1 և 2 ժամ ինակտիվացված և հետագայում 22 ժամվա ընթացքում Mn^{2+} իոնների առկայությամբ և բացակայությամբ ռեակտիվացված ֆերմենտի ենթամիավորային կազմի մոլեկուլային զանգվածները որոշվել է հել-ֆիլտրացման եղանակով (սեֆադեքս G-200): Ֆերմենտի ռեակտիվացումը հանգեցրել է տետրամերային կառուցվածքի առաջացմանը ի տարբերություն նախկինում ամբիոնում իրականացված ֆերմենտի թթվային դարձելի ինակտիվացման հետազոտությունների, որտեղ դիսուլֆիդային կամրջակների ճեղքավորումը և հետագա վերականգնումը բերել է ենթամիավորների ասոցացմանը՝ առաջացնելով օկտամերային կառուցվածք [Григорян Р. 2009]: 22 ժամ ռեակտիվացումից հետո որոշ դեպքերում բացի հիմնական տետրամերային արգինազից հայտնաբերվել են դիմերային և տրիմերային տարբերակներ, ինչը մեր կարծիքով հավանաբար կապված է ռեակտիվացման համար անհրաժեշտ ոչ բավարար ժամանակահատվածով կամ էլ այս երևույթը կարող է կապված լինել ֆերմենտային սպիտակուցի և մետաղական իոնի միջև գոյություն ունեցող ասոցացման տարբեր աստիճանով: Ըստ որոշ հեղինակների [Dahlig E., Poremska Z. 1977] առնետի և հորթի լյարդի արգինազի ԷՂՏՄ-ով դարձելի ինակտիվացման պրոցեսի ընթացքում յուրաքանչյուր արգինազային ենթամիավորի կողմից կա միևնույնիսկ կոմպոնենտի հաջորդական կորստի կամ ձեռք բերման հնարավորություն, որը կարող է հանգեցնել “մոտիկ” օլիգոմերների առաջացմանը:

ԷՂՏՄ-ով ինակտիվացման ընթացքում մեկ ժամ անց առաջանում են 71400 և 33000 Դա մոլեկուլային զանգվածներով դիմեր և մոնոմերներ, իսկ 2 ժամ անց հայտնաբերվում են միայն մոնոմերներ 32200 Դա մոլեկուլային զանգվածով, որոնք մեր կարծիքով, հավանաբար իրենցից ներկայացնում են “իրական” պրոտոմերներ, քանի որ հետազոտվող պրոցեսի ընթացքում չեն հայտնաբերվել այդ պրոտոմերների էրրորդային կառուցվածքի խորը խանգարումներ, մասնավորապես դիսուլֆիդային կապերի ճեղքում: Այդ մասին են վկայում ենթամիավորների մակարդակով թիուլային ռեագենտ p-բլորմերկուրիբենզոատի ազդեցության արդյունքները:

p-բլորմերկուրիբենզոատի ազդեցությունը *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի ԷՂՏՄ-ով դարձելի ինակտիվացման պրոցեսի վրա

Հետազոտությունների տվյալ փուլում մեր նպատակն է եղել՝ պարզաբանել ֆունկցիոնալ SH խմբերի դերը ֆերմենտի կոնֆորմացիայի պահպանման հարցում

խելատային նյութով դարձելի ապակտիվացման պրոցեսի տարբեր ժամանակահատվածներում: Գորտի լյարդի ենթամիավորների մակարդակով ՊՔՄԲ-ի առկայությամբ նկատվում է ակտիվության որոշակի խթանում՝ 5 և 8% համապատասխանաբար (աղյուսակ2), այն դեպքում երբ, ՊՔՄԲ-ն չի ազդում նատիվ ֆերմենտի ակտիվության վրա, հետազոտվող ֆերմենտը ունի ոչ թիրախյին բնույթ:

Վերլուծելով տվյալ փուլի հետազոտությունների արդյունքները կարելի է ենթադրել, որ մեր կողմից օգտագործվող մեթոդի արդյունքում, երբ հեռացվում են Mn^{2+} իոնները, առաջացած ենթամիավորներում (դիմեր, մոնոմեր) հավանաբար չեն ճեղքվում երրորդային կառուցվածքի ձևավորմանը մասնակցող դիսուլֆիդային կապերը և չեն հայտնաբերվում ակտիվ SH խմբեր: Ռեակտիվացման ընթացքում ՊՔՄԲ-ի ազդեցությամբ նկատվում է ֆերմենտի ակտիվության անկում չնայած նրան, որ էլակետային էքստրակտում ֆերմենտը չէր արգելակվում ՊՔՄԲ-ով, այդ իսկ պատճառով հետագա փորձարարական հետազոտությունները ուղղված են եղել ռեակտիվացման պրոցեսի վրա ՊՔՄԲ-ի ազդեցության պարզաբանմանը:

Աղյուսակ 2. ՊՔՄԲ-ի ազդեցությունը *Rana ridibunda* հասուն գորտի լյարդի E γ SU-ով ինակտիվացված (pH 7.4) և ռեակտիվացված (pH 9.5, Mn^{2+}) ֆերմենտի վրա (n=6, $M\pm m$, $p<0,05$)

Նմուշ	-ՊՔՄԲ (մկմոլ/գ)	Ինակտիվ. և ռեակտիվ. %	+ՊՔՄԲ (մկմոլ/գ)	Ինակտիվ. և ռեակտիվ. %
Ելակետային	29300± 293	-	29383± 265	-
Ինակտիվացված 1 ժամ	7325± 153	75	9669± 184	67
Ինակտիվացված 2 ժամ	5049± 231	82.7	6525± 225	77.7
Ռեակտիվացված 22 ժամ pH 9.5, + Mn^{2+}	21096± 304	72	11048± 286	37.7

Ռեակտիվացման ընթացքում ՊՔՄԲ-ի ազդեցությամբ նկատվել է ռեակտիվացված ֆերմենտի 37-40%-ով ակտիվության կորուստ: Մեր կարծիքով, այս ազդեցությունը հավանաբար կարելի է կապել այն փաստի հետ, որ համաձայն գրականության տվյալների, սպիտակուցների վրա ՊՔՄԲ-ի ազդեցության ընթացքում ավելի էական է հանդիսանում նրա կողմնակի ազդեցությունը ոչ թե SH խմբերի, այլ ուրիշ ֆունկցիոնալ խմբերի և մասնավորապես հիստիդինային մնացորդների իմիդազոլների վրա, ինչի մասին մանրամասնորեն քննարկվել է մի շարք աշխատանքներում: Ցույց է տրված, որ ՊՔՄԲ-ն որոշ դեպքերում կարող է ընկճել նույնիսկ այն ֆերմենտների ակտիվությունը, որոնք առհասարակ սուլֆիդիդիլ խմբեր

չունեն, որը նույնպես բացատրվում է սպիտակուցի հետ այդ ռեագենտի ոչ սպեցիֆիկ փոխազդեցությամբ [Greenblatt G., Sarkissian I. 1974; Garland R. et al., 1976]:

Մեր փորձերի ընթացքում ՊՔՄԲ-ի ազդեցությամբ ենթամիավորների ակտիվության որոշակի խթանումը հնարավոր է խոսում է այն մասին, որ ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացման ընթացքում ենթամիավորները հավանաբար պահպանում են իրենց երրորդային կառուցվածքը:

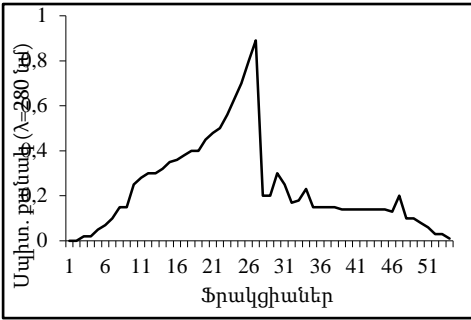
Rana ridibunda հասուն գորտի յարդի ուրեթելիկ արգինազի տրիպսինով սահմանափակ պրոտեոլիզի նկատմամբ զգայնության առանձնահատկությունները

Մեր կողմից մանրամասնորեն ուսումնասիրվել են հետազոտվող ֆերմենտի զգայնությունը պրոտեոլիզի նկատմամբ մասնավորապես, մի շարք գործոնների դերը տրիպսինով սահմանափակ պրոտեոլիզի ընթացքում:

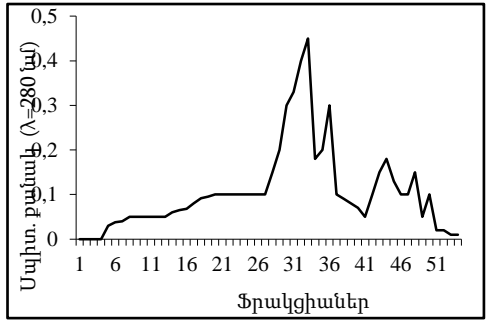
Ուսումնասիրման այս փուլում իրականացված հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տվել, որ մեր ընտրած պայմաններում առանց նախնական ջերմամշակման տրիպսինով հիդրոլիզի 22 ժամվա ընթացքում հնարավոր է *Rana ridibunda* գորտի յարդի արգինազի մոլեկուլը բաժանել համեմատաբար խոշոր բեկորների: Կախված պրոտեոլիզի տևողությունից և ֆերմենտի մաքրության աստիճանից հայտնաբերվել են 2-5 բեկորներ: Ըստ երևույթին, այդ պայմաններում արգինազի մակրոմոլեկուլում տրիպսինի նկատմամբ ավելի զգայուն, ձեռքվող կապերը դասավորված են ֆերմենտի մոլեկուլի մակերևույթին և պոլիպեպտիդային շղթայում միմյանցից հեռու են գտնվում:

Պարզաբանվել է նաև, որ ֆերմենտի նախնական ջերմամշակումը տրիպսինոլիզի ընթացքի վրա ունի որոշակի ազդեցություն՝ կատարվում է ֆերմենտի հետագա դեգրադացիա, բեկորների թիվը մեծանում է ի հաշիվ լրացուցիչ ցածրամոլեկուլային տարբերակների: Պարզվել է, որ Mn^{2+} , Co^{2+} և Ni^{2+} իոնները հանդիսանալով ֆերմենտի խթանիչներ՝ բարձրացրել են հետազոտվող ֆերմենտի զգայնությունը տրիպսինի գործունեության նկատմամբ: Այդ մասին են վկայում առաջացած բեկորների քանակի ավելացումը և նրանց մոլեկուլային զանգվածի փոքրացումը: Mg^{2+} իոնը հանդիսանալով նատիվ ֆերմենտի արգելակիչ՝ պաշտպանել է յարդի արգինազը տրիպսինի պրոտեոլիտիկ ազդեցությունից (զճապատկեր 3):

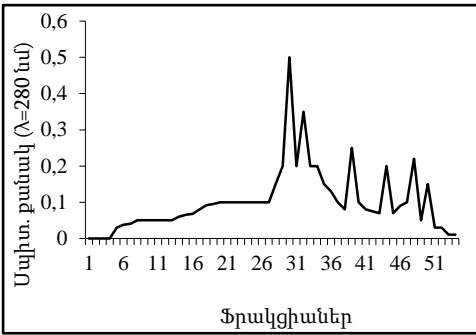
Ուսումնասիրվել են նաև 8 L-ամինաթթուների ազդեցությունը հասուն գորտի յարդի ուրեթելիկ արգինազի պրոտեոլիտիկ ինակտիվացման նկատմամբ զգայնության վրա: Պարզվել է, որ 8 L-ամինաթթուներից 6-ը (L-վալին, L-լեյցին, L-իզոլեյցին, γ -ամինոկարագաթթու, L-պրոլին և L-ալանին) ցուցաբերում են պաշտպանիչ ազդեցություն պրոտեոլիտիկ ինակտիվացման նկատմամբ, ընդ որում L-ալանինի դեպքում հայտնաբերվել են ամենաբարձր ցուցանիշները: Հավանաբար ալանինի առկայությունը կամ պաշտպանում է, կամ էլ շրջափակում արգինազի մակերեսի վրա գտնվող կապերը տրիպսինի ձեռքող ազդեցությունից: L-լիզինը և L-օրնիտինը, որոնք հանդիսանում են յարդի արգինազի մրցակցային արգելակիչներ, բարձրացրել են ֆերմենտի զգայնությունը տրիպսինի նկատմամբ:



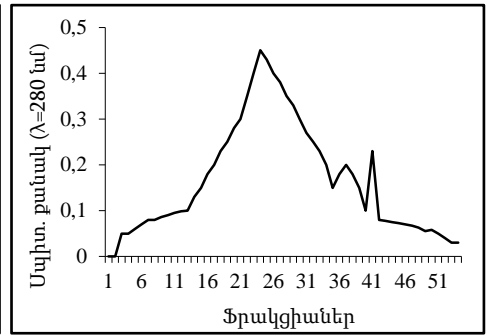
ա.



բ.



գ.



դ.

Գծապատկեր 3. Երկվալենտ իոններով նախաինկուբացման ազդեցությունը *Rana ridibunda* հատուն գորտի լյարդի արգինազի պրոտեոլիտիկ ինակտիվացման նկատմամբ զգայնության վրա (սեֆադեքս G-200, n=4, p<0,05): Ա. ստուգիչ տարբերակում բացակայում են երկվալենտ իոնները: Mn^{2+} (բ) Co^{2+} (գ) և Mg^{2+} (դ) իոններով նախաինկուբացում և տրիպսինով սահմանափակ պրոտեոլիզի 18 ժամվա ընթացքում: Հավաքված ֆրակցիաների քանակությունը՝ 54՝ 5-ական մլ (արագությունը 20 մլ/ժ):

Այսպիսով, արդյունքների վերլուծությունը թույլ է տալիս եզրակացնել, որ *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազը օժտված է կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ առանձնահատկություններով, որոնք տարբերում են նրան էվոլյուցիոն զարգացման տարբեր աստիճաններում գտնվող օրգանիզմների լյարդի ուրեոթելիկ արգինազներից: Ենթամիավորային կազմի և հատկությունների վերլուծությունը թույլ է տալիս խոսել ֆերմենտի տետրամերային կառուցվածքի մասին, որով երկկենցաղների արգինազը տարբերվում է կաթնասունների լյարդի տրիմերային արգինազից:

ԵԶՐԱԿԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. ԷՂՏԱ-ի ազդեցությամբ *Rana ridibunda* գորտի լյարդի էքստրակտների արգինազը ինակտիվանում է 2 ժամվա ընթացքում միջավայրի pH=7.4-9.5 սահմաններում, 22°C-ում 92%-ով: Ինակտիվացումը դրսևորում է արտահայտված ջերմաստիճանային կախվածություն՝ 4°C-ի պայմաններում ինակտիվացումը արգելակվում է 90%-ով:
2. Ֆերմենտի մաքրության աստիճանը չի ազդում ԷՂՏԱ-ով ինակտիվացման պրոցեսի վրա՝ ինչպես մասնակի մաքրված, այնպես էլ էքստրակտների արգինազը հավասարաչափ ինակտիվանում է 2 ժամ հետո 92%-ով:
3. Լյարդի էքստրակտի և մասնակի մաքրված նախապես ԷՂՏԱ-ով ինակտիվացված արգինազը ենթարկվում է ռեակտիվացման 0.05 Մ գլիցին-NaOH բուֆերում pH 9.5-ի պայմաններում ինչպես Mn²⁺ իոնների բացակայության (37% մասնակի մաքրված պրեպարատների դեպքում և 40% էքստրակտների տարբերակներում), այնպես էլ՝ առկայության դեպքում (69% և 75% համապատասխանաբար): Արգինազի ռեակտիվացման ամենաբարձր ցուցանիշները հայտնաբերված են Ni²⁺ (140%) և Fe²⁺ (91%) կատիոնների տարբերակներում:
4. Ռեակտիվացման արդյունավետությունը մոտ 10 անգամ բարձրանում է ոչ արգինազային (68000 Դա և 48600 Դա) սպիտակուցների առկայությամբ, որոնք հավանաբար իրենցից ներկայացնում են պաշտպանողական սպիտակուցներ և հնարավոր է, որ մտնում են այսպես կոչված “մուլտիշապերոնային ցանցի” կազմի մեջ:
5. ԷՂՏԱ-ի ազդեցությամբ *Rana ridibunda* գորտի լյարդի ուրեոթելիկ արգինազը դիսոցվում է ենթամիավորների 32200 Դա մոլեկուլային զանգվածով, որոնք հավանաբար իրենցից ներկայացնում են “իրական” պրոտոմերներ, որի մասին են վկայում ենթամիավորների մակարդակով ՊՔՄԲ-ով սպեցիֆիկ ազդեցության արդյունքները: Ռեակտիվացման ընթացքում առաջացած արգինազի օլիգոմերային կառուցվածքը իրենից ներկայացնում է տետրամեր:
6. Mn²⁺, Co²⁺ և Ni²⁺ իոնները բարձրացնում են լյարդի արգինազի զգայնությունը տրիպսինի ազդեցության նկատմամբ, իսկ Mg²⁺ իոնը պաշտպանում է լյարդի արգինազը տրիպսինի պրոտեոլիտիկ ազդեցությունից: Նմանատիպ պաշտպանողական ազդեցություն ունեն նաև L-վալին, L-լեյցին, L-իզոլեյցին, γ-ամինոկարագաթթու, L-պրովին և L-ալանին ամինոթթուները: L-լիզինը և L-օրնիտինը բարձրացնում են ֆերմենտի զգայնությունը տրիպսինի նկատմամբ:

1. Shamirian A.S., Barseghyan E. Kh., Davtyan M. A. // Limited proteolysis of *Rana ridibunda* frog liver arginase by trypsin. International young scientists conference, perspectives for development of molecular and cellular biology-3, Yerevan, Armenia, September 26-29, 2012, № 3, p. 181-184
2. Shamirian A.S., Barseghyan E. Kh. // Structure characterization of *Rana ridibunda* frog liver arginase. FEBS Journal, 22nd IUBMB and 37th FEBS congress, Seville, Spain, 2012, v.279, № 1, p. 455
3. Shamirian A.S., Grigoryan R.H., Barseghyan E.Kh., Davtyan M.A. // The effect of several bivalent cations on the sensitivity of *Rana ridibunda* frog liver arginase towards proteolysis. Biol.J. Armenia, 2012, v.64, № 4, p. 38-43
4. Շամիրյան Ա. Ս. Սիմոնյան Թ. Ն. Բարսեղյան Է. Խ. // Սպիտակ առնետի և *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի ԷԴՏՍՍ-ով ապասկտիվացման առանձնահատկությունները. Գիտական տեղեկագիր, 2012, № 3, 33-37
5. Shamirian A. S., Barseghyan E. Kh., Davtyan M.A. // The effect of several L-amino acids on the inactivation process of *Rana ridibunda* adult frog liver arginase. Biol. J. Armenia 2013, v.2, № 65, p. 43-46
6. Shamirian A. S. // Characteristics of *Rana ridibunda* frog liver arginase inactivation by EDTA and further reactivation processes. Electronic Journal of natural sciences, 2013, v. 21, Issue 2, p. 26-29
7. Shamirian A.S., Zakaryan T. A., Barseghyan E. Kh., Davtyan M. A. // Role of functional SH groups on the activity expression and conformation maintenance of *Rana ridibunda* frog liver arginase. Proceedings of YSU, 2013, № 3, p. 32-35
8. Shamirian A. S., Barseghyan E. Kh., Grigoryan R. H., Davtyan M.A. // Investigation of the *Rana ridibunda* tadpole's liver arginase tryptic hydrolysis products by gel-filtration method// Proceedings of YSU, 2013, № 1, p. 28-31

STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF AMPHIBIANS LIVER UREOTELIC ARGINASE
USING RANA RIDIBUNDA FROG AS TEST OBJECT

SUMMARY

Keywords: isoenzyme, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), p-chloromercuribenzoate (pCMB), limited trypsinolysis

The isofunctional proteins (isoenzymes) which are involved in various biochemical processes, have a significant role in the regulation of metabolism. In this point of view, recently, the investigation of ureotelic and non-ureotelic isoenzymes of arginase with various metabolic functions, are of special interest. The amphibians are considered uniquely suitable object for the study of nitrogen metabolism's final products formation and their excretion evolution and ontogenesis, because of the variation in nitrogen excretion forms during their life cycle. It is well known, that during metamorphosis the induction of liver ureotelic arginase occur, which cooperates with four enzymes of arginine biosynthesis and participate in urea cycle. It has been shown, that the physiochemical and kinetic characteristics of amphibians liver ureotelic arginase corresponds to the ureotelic enzyme in mammalians liver. In the following study we aim to discover the correspondence between the structure and catalytic function of ureotelic arginase and investigate the subunit's activity changes by the influence of various factors.

The characteristics of ureotelic arginase inhibition by EDTA have been studied. This reagent inhibits the enzyme activity in noncompetitive mechanism by linking the certain bivalent cations which are participating in the expression of catalytic activity. During the reversible inactivation process have been detected and identified the intermediate's (monomer, dimer, tetramer) structures, the pathway reproduced that leads to the formation of renatured arginase's active structure. The studied enzyme inactivated during 2 hours (pH 7.4 and 20-22^o C) by EDTA which dissociate the enzyme into subunits with 32200 Da molecular weights. The inactivation process has significant temperature dependence. Inactivation inhibited by 90% at +4^o C. The purification degree of enzyme has no effect on inactivation by EDTA. It is notable, that enzyme pre-incubation by Mn²⁺ ions protects the enzyme by 52% during inactivation. This kind of protection effects were also detected in the presence of Co²⁺ (23-40%) and Ni²⁺ (14-16%) cations, Fe²⁺ ions have no effect on the inactivation, while the inactivation deepened in the presence of Mg²⁺ and Zn²⁺ cations.

The reactivation of enzyme at pH 9.5 in the presence and absence of several bivalent cations leads to the formation of oligomer with 125000 Da molecular weight. Interestingly, Ni²⁺ ions increased the reactivation effectiveness (140%) in a higher degree than physiological activator Mn²⁺ (75%). Our data demonstrates that the reactivation of partially purified preparations is lower than the extracts. Therefore, the role of these protein fractions which are separated by gel-filtration has been discussed. The molecular weights of these fractions are 68000 (II-nd fraction) and 48600 Da (III-rd fraction). The effect of protein fractions with 68000 Da molecular weight reveal after 22 hours reactivation, in the case when the effect on protein fractions with 48600 Da molecular weight reveal after 2 hours reactivation. Moreover, by adding these fractions (II-nd and III-rd) simultaneously, the reactivation efficiency was increased 10 fold compared to the inactivated samples. In all probability it is possible that these low molecular fractions are considered the defensive proteins which have chaperon-like properties and supposedly are integrated into "multichaperone network".

Further studies of subunit's changes during inactivation by EDTA showed that after 60 minutes inactivation enzyme dissociates into dimers and monomers with 71400 and 33000 Da molecular weights, but only after 2 hours inactivation enzyme was finally degraded into the monomers with 32280 Da molecular weights. Obtained results point out that these monomers may constitute a "real" protomers and the effect of p-chloromercuribenzoate in subunit levels is the evidence for this fact.

Investigation of the sensitivity of studied enzyme towards proteolysis by limited trypsinolysis method revealed that Mn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} ions increase the sensitivity of enzyme towards trypsinolysis in the case when Mg^{2+} ions considered as inhibitors for native enzyme protect the liver arginase towards proteolytic effect of trypsin. During the limited proteolysis a number of amino acids, including L-valine, L-leucine, L-isoleucine, γ -aminobutyric acid L-alanine and L-proline are considered the beneficial inhibitors of liver arginase towards proteolytic inactivation.

The results allow us to conclude, that amphibians liver arginase has structural characteristics, which distinguishes it from various ureotelic arginases in different levels of evolution development. The results are significant and allow clearly identifying and describing the enzyme's protomers and point out the tetrameric structure of the studied enzyme, in which the amphibian's arginase differs from mammalian's trimeric ureotelic enzyme.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ УРЕОТЕЛИЧЕСКОЙ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ
АМФИБИЙ (НА ПРИМЕРЕ ЛЯГУШКИ RANA RIDIBUNDA)

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: изофермент, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), парахлормеркурийбензоат (ПХМБ), ограниченный трипсинолиз

В регуляции механизмов обмена веществ существенную роль играют изофункциональные белки (изоферменты), участвующие в различных биохимических процессах. В настоящее время большой интерес представляет изучение широко представленных в природе уреотелических и неуреотелических изоферментов аргиназы различного происхождения.

Развивающиеся амфибии являются исключительно удобным объектом для изучения образования конечных продуктов азотистого обмена, изучения эволюции выделения этих продуктов, так как в их жизненном цикле происходит смена типов азотистой экскреции. Доказано, что в процессе онтогенеза амфибий, в стадии метаморфоза, индуцируется уреотелическая аргиназа печени, которая функционируя совместно с известными ферментами биосинтеза аргинина обуславливает формирование орнитинового цикла мочевинообразования. Показано, что аргиназа печени амфибий по ряду физикохимических и кинетических свойств соответствует уреотелической аргиназе ряда млекопитающих.

Цель представленной работы выявление соответствия между строением аргиназы печени лягушки и каталитической функцией, а также изучение активности фермента при изменении под влиянием определенных факторов субъединичной структуры. Изучены особенности ингибирования аргиназы печени под действием ЭДТА, этот реагент ингибирует активность фермента неконкурентным механизмом, связывая определенные двухвалентные катионы, участвующие в проявлении каталитических свойств.

Выявлены и идентифицированы образующиеся при инактивации и последующей реактивации промежуточные структуры (димеры, мономеры), воссоздан путь, который приводит к формированию активной ренатурированной структуры аргиназы. Показано, что исследуемый фермент подвергается инактивации в течение двух часов при pH 7,4 и +22⁰ С и расщепляется на субъединицы с молекулярной массой 32200 Да. Инактивация имеет выраженную температурную зависимость, при +4⁰ С ингибируется на 90 %. Степень очистки фермента не влияет на процесс инактивации, прединкубация фермента в присутствии Mn²⁺ предохраняет фермент от инактивации на 52%. Такое же протекторное влияние имели Co³⁺ (23-40%) и Ni²⁺ (14-16%). Ионы Mg²⁺ и Zn²⁺ углубляли процесс инактивации.

Реактивация фермента происходила при pH 9,5 как в отсутствие, так и в присутствии ряда двухвалентных катионов и приводила к образованию олигомера с молекулярной массой 125000 Да. Примечательно, что ионы Ni²⁺ более эффективны для процесса реактивации (140%), чем физиологический активатор аргиназы Mn²⁺ (75%). Показано, что в частично очищенных препаратах аргиназы процент реактивации сравнительно ниже, чем в экстрактах. Обсуждается роль некоторых низкомолекулярных белковых фракций, удаляемых при очистке фермента. Молекулярная масса низкомолекулярных белков составляла 68000 Да (фракция II) и 48600 Да (фракция III). При добавлении этих белков в

реактивационную среду обнаружено, что эффект добавления белков с молекулярной массой 68000 Да проявляется через 22 часа, а фракции с молекулярной массой 48600 Да через 2 часа реактивации. Делается предположение о том, что возможно, эти белки имеют шапероноподобные свойства и входят в состав «мультишаперонной сети».

Изучены изменения субъединичного состава аргиназы при действии ЭДТА. При инактивации фермента через 60 минут обнаружены димеры (м.м. 71400 Да) и мономеры (3300 Да), а через 2 часа – только мономеры (32280 Да). Последние, возможно, представляют собой «истинные» протомеры, о чем свидетельствуют результаты исследований по влиянию ПХМБ на активность субъединиц.

Изучена чувствительность аргиназы печени к протеолизу. Показано, что ионы Mn , Co , Ni^{2+} повышали чувствительность фермента к трипсинолизу. Обнаружено «защитное» действие ряда L-аминокислот (валин, лейцин, изолейцин, аминокислотная кислота, аланин и пролин) по отношению к триптическому гидролизу.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что аргиназа печени лягушки *Rana ridibunda* наделена определенными структурными особенностями, которые отличают ее от уреотелических аргиназ ряда организмов, находящихся на разных ступенях эволюционного развития. Исследования субъединичного состава позволяют выявить и описать протомеры фермента и говорить о тетрамерной структуре последнего, что отличает изучаемый фермент от тримерной уреотелической аргиназы печени млекопитающих.