

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՄԻՄՈՆՑԱՆ ԹԱՄԱՐԱՆՎԵՐԻ

ԱՌՆԵՏԻ ԼՅԱՐԴԻ ԱՐԳԻՆԱԶԻ ԴԱՐՁԵԼԻ ԻՆԱԿՏԻՎԱՑՄԱՆ
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՑԱԾԸ pH-Ի ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ ԵՎ ԷՂՏԱ-Ի
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՄԲ

Գ.00.04 – Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
զիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2014

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

СИМОНЯН ТАМАРА НВЕРОВНА

ОСОБЕННОСТИ ОБРАТИМОЙ ИНАКТИВАЦИИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ
НИЗКИХ pH И ДЕЙСТВИИ ЭДТА

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. Քամալյան
կենս. գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր Մ.Ա. Սիմոնյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Հայ-Ռուսական (Սլավոնական)
համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2014թ. սեպտեմբերի 12-ին,
ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՂ-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. հուլիսի 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 12-го сентября 2014 г., в 14⁰⁰ часов, на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 24-го июля 2014 г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,

кандидат биол. наук, доцент

М.А. Парсаданян

ՆԵՐԱՄՈՒԹՅՈՒՆ

Թեմայի արդիականությունը և հիմնավորումը: Վերջին տարիներին անհատական սպիտակուցների ուսումնասիրությունները բազմաթիվ հետազոտողների ուշադրության կենտրոնում են: Հայտնի է, որ նյութափոխանակության կարգավորման ընթացքում կարևոր դեր են խաղում իզոֆունկցիոնալ սպիտակուցները, հատկապես իզոֆերմենտները: ԵՊՀ կենսաքիմիայի ամբիոնում երկար տարիների ընթացքում ուսումնասիրվում են էվոլյուցիոն զարգացման տարբեր մակարդակներում գտնվող օրգանիզմների ազոտային փոխանակության ֆերմենտները, մասնավորապես, օրնիտինային ցիկլի ֆերմենտները: Այդ աշխատանքների շարքում ներկայումս մեծ հետաքրքրություն են ներկայացնում բնության մեջ լայնորեն տարածված տարբեր ծագում ունեցող ուրեոթելիկ և ոչ ուրեոթելիկ արգինազների ուսումնասիրությունները:

Վաղ շրջանի հետազոտությունների մեծ մասի արդյունքները, որոնք հիմնված էին ուրեոթելիկ արգինազների մի շարք ֆիզիկաքիմիական և կինետիկ հատկությունների ուսումնասիրության վրա, վկայում էին այն մասին, որ այս արգինազները նույնական են: Մակայն այդ աշխատանքների տվյալների խորը վերլուծությունը և մեր կողմից որոշակի գործոնների ազդեցությամբ ֆերմենտի ակտիվության փոփոխությունները և ենթամիավորային կազմի ուսումնասիրությունները հանգեցրին այն մտքին, որ յուրաքանչյուր առանձին դեպքում լյարդի ուրեոթելիկ արգինազն օժտված է որոշակի առանձնահատկություններով, որոնք տարբերում են վերջինիս էվոլյուցիոն զարգացման տարբեր մակարդակներում գտնվող մի շարք օրգանիզմների արգինազներից: Այս հարցերը կենսաքիմիայի ամբիոնում բավականին մանրամասն ուսումնասիրվել են, մասնավորապես, երկկենցաղների մոտ *Rana ridibunda* գորտի օրինակով: Լյարդի ուրեոթելիկ արգինազի տեսակային տարբերությունները կարող են հսկայական լինել տարբեր դասերի մոտ, կարող են տարբերվել նաև ակտիվ կենտրոններն իրենց կառուցվածքով: Ակնհայտ է, որ արտաքին գործոնների փոփոխության ազդեցության արդյունքում, հնարավոր է կենսաքիմիական ադապտացիա, այսինքն վերամոլեկուլային մակարդակով ֆերմենտատիվ համակարգերի փոփոխություններ: Նշենք, որ այդ գործընթացների մեխանիզմների ուսումնասիրությունը կենսաքիմիայի կարևորագույն հարցերից է:

Ազոտային փոխանակությունն ամենախոցելին է շրջապատող միջավայրի փոփոխությունների հանդեպ: Նյութափոխանակությունը կարգավորող մեխանիզմների հետազոտությունը ևս ժամանակակից կենսաքիմիայի կարևոր խնդիրներից է: Այս խնդրի ուսումնասիրությունը թույլ կտա մշակել նպատակաուղղված միջոցներ, որոնք կկարգավորեն օրգանիզմների կենսագործունեության գործընթացները:

Ուրեոթելիկ արգինազի ուսումնասիրման հարցին նվիրված են մեծ թվով հետազոտություններ, բայց դրանց հակասական լինելու պատճառով, ինչը պայմանավորված է հիմնականում ֆերմենտի իդենտիֆիկացման մեթոդների տարբերությամբ, դժվար է անել եզրակացություններ, հատկապես, օլիգոմերային կառուցվածքին վերաբերվող որոշ հարցերի շուրջ:

Այսպիսով, առնետի լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի երկու եղանակով (ցածր pH-ի պայմաններում և ԷԴՏՍ-ի ազդեցությամբ) դարձելի ինակտիվացման ուսումնասիրությունը և այդ գործընթացների համեմատական հետազոտությունը թույլ կտա բացահայտել էվոյուցիոն զարգացման տարբեր աստիճաններում գտնվող կենդանիների լյարդի ուրեթեյիկ արգինազների կառուցվածքային առանձնահատկությունների նոր կողմերը:

Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները: Ներկայացվող աշխատանքի նպատակն է հանդիսացել երկու եղանակով (ցածր pH-ի պայմաններ և ԷԴՏՍ-ի ազդեցություն) դարձելի ինակտիվացման մեթոդի կիրառմամբ պարզաբանել կաթնասունների (սպիտակ առնետ) լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի առանձնահատկությունները, մասնավորապես, ենթամիավորային կազմի կրած փոփոխությունները և ռեակտիվացման ընթացքում վերաբաղադրել այն ճանապարհը, որը բերում է ֆերմենտի օլիգոմերիզացմանը: Նպատակ է դրվել նաև ուսումնասիրել կենդանու օրգանիզմի ադապտացիոն հնարավորությունները, մասնավորապես, հիպոբարիկ սթրեսի ենթարկված կենդանիների լյարդում ինդուկցվող «պաշտպանողական» սպիտակուցների դերը: Խնդիր էր դրվել նաև ֆլուորեսցենտային անալիզի միջոցով հայտնաբերել լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի կոնֆորմացիոն փոփոխությունները երկու եղանակով ֆերմենտի դարձելի ինակտիվացման գործընթացում: Մեր առջև նստակ էր դրված նաև բացահայտել էվոյուցիոն զարգացման տարբեր մակարդակների վրա գտնվող օրգանիզմների մոտ լյարդի ուրեթեյիկ արգինազների միջև տարբերությունները: Նշված խնդիրների բացահայտման նպատակով հետազոտությունները կատարվել են հետևյալ ուղղություններով՝

- հետազոտել առնետի լյարդի արգինազի pH3,6 պայմաններում և ԷԴՏՍ-ի ազդեցությամբ դարձելի ինակտիվացման գործընթացի օպտիմալ պայմանները (pH, ժամանակ, ֆերմենտի մաքրության աստիճան և երկվալենտ իոնների ազդեցություն):
- ուսումնասիրել երկու եղանակով նախապես ինակտիվացման ենթարկված լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի ռեակտիվացման օպտիմալ պայմանները և լյարդի էքստրակտներից անջատված որոշակի, ոչ արգինազային «ուղղորդող» սպիտակուցային ֆրակցիաների մասնակցությունն այս գործընթացում:
- ուսումնասիրել հիպոբարիկ սթրեսի ենթարկված առնետի լյարդում հիպօբսիայի արդյունքում ինդուկցված պաշտպանողական սպիտակուցների դերը ֆերմենտի նստիվ կոնֆորմացիայի վերականգնման գործընթացում:
- Համեմատել երկու եղանակով (pH3,6 և ԷԴՏՍ) նախապես ինակտիվացված արգինազի տրոհման արդյունքում առաջացած ենթամիավորների և վերականգնված օլիգոմերային կառուցվածքների տարբերությունները:
- Ֆլուորեսցենտային անալիզի մեթոդի կիրառմամբ բացահայտել ինակտիվացման և ռեակտիվացման գործընթացների ազդեցությունն առնետի լյարդի արգինազի մոլեկուլի կոնֆորմացիոն վիճակի վրա:

Աշխատանքի գիտական նորույթը և գործնական արժեքը: Առաջին անգամ առնետի լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի դարձելի ինակտիվացման գործընթացն ուսումնասիրվել է երկու եղանակով (թթվային pH և E-RSU), ինչպես նաև պարզաբանվել են տարբեր պայմաններում ֆերմենտի ռեակտիվացման հնարավորությունները:

Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ առնետի լյարդի արգինազի ռեակտիվացման գործընթացում մասնակացում են «ուղղորդող» պաշտպանողական սպիտակուցներ, որոնք ամենայն հավանականությամբ մտնում են «բազմաշապերոնային ցանցի» կազմի մեջ: Այս սպիտակուցների մոլեկուլային զանգվածները կազմել են 55 ԿԴա և 71 ԿԴա: Ենթադրվում է, որ այդ սպիտակուցներն ունեն ինչպես ֆոլդագային, այնպես էլ շապերոնային հատկություններ: Ուսումնասիրվել են օլիգոմերային արգինազի ենթամիավորային կազմի առանձնահատկությունները և պարզաբանվել են դարձելի ինակտիվացման գործընթացում ենթամիավորային կազմի կրած փոփոխությունները: Լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի ենթամիավորային կազմի մանրակրկիտ ուսումնասիրությունը հնարավորություն է ընձեռել ավելի հստակ բացահայտել և նկարագրել ֆերմենտի պրոտոմերները և դրանց ռեստացման հնարավորությունները:

Առաջին անգամ ստացվել են առնետի լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի նատիվ, ինակտիվացված և տարբեր եղանակներով ռեակտիվացված ձևերի ֆլուորեսցենտային սպեկտրները, որոնք մանրամասն վերլուծվել են:

Կիրառված կենսաքիմիական մեթոդները թույլ են տվել ստանալ ավելի հիմնավոր ինֆորմացիա ֆերմենտի ենթամիավորային կառուցվածքի մասին: Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ երկու եղանակով առնետի լյարդի արգինազի ինակտիվացումը դարձել է և ռեակտիվացման գործընթացում կարևոր դեր են խաղում ինչպես կոնստիտուտիվ, այնպես էլ հիպոբարիկ սթրեսային պայմաններում ինդուկցվող «պաշտպանողական» սպիտակուցները, որոնց շնորհիվ ռենատուրացված օլիգոմերը իրենց կառուցվածքով ավելի մոտ են նատիվ ֆերմենտին, ինչի մասին վկայում են նաև ֆլուորեսցենտային անալիզի արդյունքները:

Առնետի լյարդի ուրեթեյիկ արգինազի ուսումնասիրության համար մեր կողմից կիրառված մոտեցումներն, անկասկած, տեղ կգտնեն գործնական էնզիմոլոգիայում՝ տարբեր իզոսպիտակուցների (իզոֆերմենտների) ենթամիավորների առանձնահատկությունների ուսումնասիրման ժամանակ: Այս մեխանիզմների պարզաբանումը թույլ կտա մշակել կենսագործունեության գործընթացների նպատակաուղղված կարգավորման եղանակներ, ինչն ունի տեսական և կիրառական կարևոր նշանակություն:

Աշխատանքի փորձաքննությունը և հրապարակումները: Ատենախոսությունը փորձաքննություն է ենթարկվել ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի կենսաքիմիայի ամբիոնի և «Ազոտ պարունակող միացությունների կենսաքիմիայի» գիտահետազոտական լաբորատորիայի ընդլայնված նիստում: Ստացված արդյունքները ներկայացվել են FEBS Advanced Lecture Course, School of protein science: Structure and dynamics of biological macromolecules, Sofia, Bulgaria, 2012: Ատենախոսության թեմայով հրատարակված են հինգ հոդվածներ և մեկ թեզիս:

Ատենախոսության կառուցվածքը և ծավալը: Ատենախոսությունը կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից, հետազոտման մեթոդների նկարագրությունից, հետազոտությունների արդյունքներից, ամփոփումից, եզրակացություններից, օգտագործված գրականության ցանկից: Աշխատանքը շարադրված է համակարգչային տեքստի 105 էջերում, պարունակում է 2 նկար և 23 գծապատկեր:

ՀԵՏԱԶՈՏՄԱՆ ՕԲՅԵԿՏԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Հետազոտման օբյեկտ: Հետազոտման օբյեկտ է ծառայել լաբորատոր սպիտակ արու առնետը՝ 180-200 գ. զանգվածով: Առնետները պահվել են 18-23°C, 12/12ժ գիշեր/ցերեկ հարաբերությամբ, ստանդարտ սննդակարգով: Փորձարարական աշխատանքների համար օգտագործվել է կենդանու յարդը: Կենդանուց անջատված թարմ յարդը զգուշորեն չորացվել է ֆիլտրի թղթով, կշռվել և ենթարկվել է հոմոգենիզացման՝ Պոտտեր-էլվեդեմի տիպի ապակե հոմոգենիզատորով +4 °C-ում (հոմոգենիզատոր՝ *Potter - Elvehjem Glass, Germany*):

Արգինազի ակտիվության որոշում: Պատրաստվել են հետազոտվող հյուսվածքի 5%-ոց հոմոգենատներ՝ 0,005 Մ տրիս-HCl բուֆերով (pH-7.4): Արգինազի ակտիվությունը որոշվել է Ռատների մեթոդով [*Rathner S., Pappas A., 1960*], որոշակի փոփոխություններով: Հոմոգենատները ցենտրիֆուգվել են 20000 g, 30 րոպե 0°C-ում սառը պայմաններում (LJIP-1, ՌԴ): Անջատված էքստրակտը ծառայել է ֆերմենտի աղբյուր: Փորձնական տարբերակի փորձանոթում ավելացվել է 2,4 մլ 0,01 Մ գլիցին-NaOH բուֆեր (pH-9.5), 0.2մլ MnCl₂×4H₂O (5 մկմոլ) և 0.4մլ L-արգինին (50 մկմոլ): Ստուգիչ տարբերակները պարունակել են նույն բաղադրամասերը բացառությամբ L-արգինինի, որի փոխարեն ավելացվել է 0,005 M տրիս-HCl բուֆեր: 4 մլ ծավալով ստուգիչ և փորձնական տարբերակները ինկուբացվել են 37 °C-ում 60 րոպեների ընթացքում: Ֆերմենտային ռեակցիան դադարեցվել է 1 մլ 10% ԵՔՔ-ի ավելացմամբ: Սուբստրատի ձեռքման ընթացքում առաջացած միզանյութի քանակը որոշվել է Արչիբալդի մեթոդով, որը մոդիֆիկացվել է Մուռի և Կաուֆմանի կողմից [*Moore R.B., Kaufmann N. J., 1970*]: Միզանյութի որոշման համար ապակե խցանով փորձանոթի մեջ լցվել է 1 մլ ֆերմենտային պրեպարատ, 2.5 մլ թթվային խառնուրդ (1 մաս խիտ H₃PO₄ և 3 մաս խիտ H₂SO₄, FeCl₃ և MnSO₄ աղերի առկայությամբ) և 0.25 մլ 1.5%-ոց դիացետիլմոնօքսիմի լուծույթ (ԴԱՄՕ): Փորձանոթները թափահարվել են և պարունակությունը եռացվել է մթության մեջ, ջրային բաղնիքում 45 րոպե տևողությամբ: Սառեցված դեղնավուն 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 ժել-ֆիլտրացման եղանակով: Սեֆադեքս G-200-ով (*Sephadex G-200, Pharmacia, Uppsala, Sweden*) լցված սյունակի (1.5×70սմ) վրա ավելացվել է 2 մլ յարդի հոմոգենատի վերնստվածքը: Հավասարակշռումը և էլյուցիան կատարվել է 0.005 Մ տրիս-HCl բուֆերով (pH-7.4): Էլյուցիոն ծավալը կազմել է 4 մլ, արագությունը՝ 24 մլ/ժ: Ֆրակցիաները հավաքելուց հետո սպիտակուցի կլանումը չափվել է 280 նմ ալիքի

երկարության պայմաններում և յուրաքանչյուրի մեջ որոշվել է արգինազի ակտիվությունը Ռատների մեթոդով՝ 478 նմ ալիքի երկարությամբ, (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, USA):

Արգինազի մոլեկուլային զանգվածի որոշումը: Մոլեկուլային զանգվածները որոշվել են ժել-ֆիլտրացման մեթոդով (Sephadex G-200, Pharmacia, Uppsala, Sweden): V_0 -ի սյունակի ազատ ծավալի արժեքի որոշման համար օգտագործվել է 0.2 Մ երկնագույն դեքստրանի լուծույթ (Blue dextran 2000, “Pharmacia”, 2×10^6 Դա մոլեկուլային զանգվածով): Մարկերային սպիտակուցներ են ծառայել սոյայի ունդերի ուրեազը (480000 Դա), խմորասնկային ակոհոլդեհիդրոգենազը (150000 Դա), մարդու շիճուկային ալբումինը (75000 Դա), պեպսինը (35000 Դա), տրիպսինը (23000 Դա) և ռիբոնուկլեազը (12000 Դա): Ժել-ֆիլտրացման եղանակով ստացվել են տրամաչափական կորեր, որտեղ էլյուցիոն ծավալի միջոցով որոշվել են մարկերային սպիտակուցների մոլեկուլային զանգվածները [Andrews P. 1964]:

Արգինազի ինակտիվացումը և ռեակտիվացումը: Ֆերմենտի ինակտիվացումը իրականացվել է pH-3.6 պայմաններում՝ 0.01 M գլիցին-HCl բուֆերում, ինչպես նաև էթիլենդիամինտետրաացետատի (ԷԴՏԱ) ազդեցությամբ, որի վերջնական կոնցենտրացիան կազմել է 10 մՄ սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում: Օգտագործվել է ԷԴՏԱ-ի դինատրիումական աղը (Trilon B, մոլ. զանգվածը՝ 372 Դա, ABI Chemicals, Germany): Նախապես ինակտիվացված արգինազի ռեակտիվացումն իրականացվել է 0.01 Մ գլիցին-NaOH (pH-9.5) և 0,01 Մ տրիս-HCl (pH-7,4) բուֆերներով 20°C-ի պայմաններում, մի շարք երկվալենտ կատիոնների՝ Mn^{2+} , Co , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} առկայությամբ (50 մկմոլ 1 մլ հետազոտվող նմուշում):

Հիպոքարիկ հիպօքսիայի ազդեցությունը: Հիպոքարիկ հիպօքսիայի ազդեցության ենթարկման նպատակով կենդանիները նախօրոք պահվել են 15 րոպե հատուկ բարդկամերայում, որտեղ մթնոլորտային ճնշումը համապատասխանել է ծովի մակարդակից 6000 մ բարձրությանը:

Ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրերի չափումը: Ֆլուորեսցենտային չափումները կատարվել են Varian Cary Eclipse ֆլուորեսցենտային սպեկտրոֆոտոմետրի օգնությամբ՝ 1 սմ լայնությամբ քվարցե կյուվետներում: Գրգռման ալիքի երկարությունն ընտրվել է 280 նմ և 295 նմ, իսկ առաքումը գրանցվել է 300-500 նմ ալիքի երկարության տակ: Գրգռման և առաքման ճեղքերի լայնությունները եղել են համապատասխանաբար 5 և 10 նմ: Չափումները կատարվել են 22 °C ջերմաստիճանում: Ջերմաստիճանը կարգավորվել է LAUDA A100 թերմոստատի օգնությամբ: Լուծույթի ջերմաստիճանն անմիջականորեն ֆիքսվել է կյուվետի բաժանմունքում տեղադրված ջերմաստիճանային ինդիկատորի միջոցով:

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

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆԱՄԱՐԿՈՒՄԸ

Մի շարք գործոնների ազդեցությունն առնետի լյարդի արգինազի թթվային պայմաններում և ԷՂՏԱ-ի ազդեցությամբ դարձելի ինակտիվացման գործընթացի վրա

Հետազոտությունների առաջին փուլում մեր կողմից ուսումնասիրվել են pH3,6 պայմաններում և ԷՂՏԱ-ի ազդեցությամբ առնետի լյարդի էքստրակտի արգինազի *ինակտիվացման* վրա ազդող գործոնների դերը, մասնավորապես, ժամանակի գործոնի, ինակտիվացման բուֆերի մոլյարության և միջավայրի pH-ի: Համեմատելով թթվային պայմաններում ինակտիվացման դինամիկան ԷՂՏԱ-ով ինակտիվացման գործընթացի հետ՝ կարելի է նկատել, որ առնետի լյարդի արգինազը pH3,6 պայմաններում 12 ժամ ինակտիվացումից հետո պահպանում է 25%, իսկ ԷՂՏԱ-ի ազդեցությամբ 4 ժամ հետո 10% մնացորդային ակտիվություն, որը հավանաբար իրենից ներկայացնում է տվյալ պայմաններում առաջացած առանձին ենթամիավորների ակտիվություն:

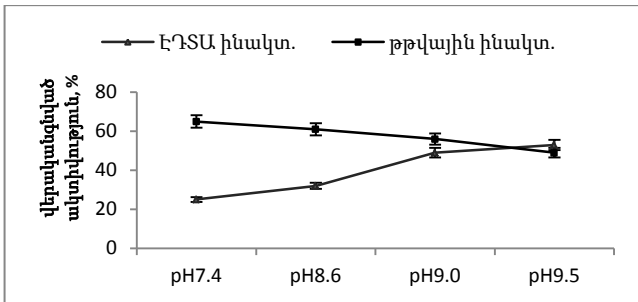
Ցույց է տրվել, որ մասնակի մաքրված ֆերմենտն ավելի խոցելի է թթվային միջավայրում, մինչդեռ էքստրակտի դեպքում ֆերմենտն ինակտիվանում է միայն 75%-ի չափով: Ամենայն հավանականությամբ լյարդի էքստրակտներում առկա է թթվային ինակտիվացումից պաշտպանող կայունացնող գործոն: Ակնհայտ է, որ մասնակի մաքրման ժամանակ այդ գործոնը հեռացվում է և ֆերմենտը դառնում է խոցելի ցածր pH-ի ազդեցության հանդեպ: Կարելի է ենթադրել, որ այդ գործոնը ծածկում է դիսուլֆիդային կապերը ցածր pH-ի պայմաններում: ԷՂՏԱ-ով ինակտիվացման հետազոտման արդյունքները ցույց են տվել, որ առնետի լյարդի արգինազի ինակտիվացման մակարդակն էքստրակտի և մասնակի մաքրված նմուշներում միևնույն է: Երկու դեպքերում էլ դա հավանաբար պայմանավորված է Mn²⁺ իոնների միևնույն էկրանավորվածությամբ: Առնետի լյարդի արգինազի համեմատաբար արագ ինակտիվացման փաստը ԷՂՏԱ-ի ներկայությամբ մեր փորձերում վկայում է ֆերմենտի ենթամիավորների հետ Mn²⁺ հարաբերական ոչ ամուր կապի և դրանց հնարավոր մակերեսային տեղակայվածության մասին:

Ցույց է տրվել նաև, որ բուֆերի մոլյարության բարձրացմանը զուգընթաց (pH3.6 պայմաններում) ինակտիվացման ինտենսիվությունը մեծանում է, իսկ ԷՂՏԱ-ով ինակտիվացումն առավել արդյունավետ է ընթանում միջավայրի չեզոք pH-ի պայմաններում, և ակտիվությունը արգելակվում է վերջինիս բարձրացմանը զուգընթաց (զծապատկեր 1):

Աշխատանքների հաջորդ փուլում կատարվել է երկու եղանակով ինակտիվացված լյարդի ուրեոթելիկ արգինազի տարբեր պայմաններում *ռեակտիվացման* հնարավորությունների ուսումնասիրությունը: Պարզվել է որ, թթվային ինակտիվացմանը հաջորդող ռեակտիվացման առավելագույն ցուցանիշներ դիտվում են 12 ժամ 0,5 մՄ Mn²⁺ իոնների կոնցենտրացիայի դեպքում, ռեակտիվացման ժամանակի հետագա երկարացումը հանգեցնում է ռեակտիվացման ելքի որոշակի

անկման: Իսկ ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացմանը հաջորդող ռեակտիվացման ժամանակ ակտիվության վերականգնման առավելագույն արժեքներ դիտվում են արդեն 6 ժամ հետո և Mn^{2+} իոնների 1մՄ կոնցենտրացիայի դեպքում, որը գերազանցում է թթվային ինակտիվացմանը հաջորդող ռեակտիվացման գործընթացում իոնների անհրաժեշտ քանակը երկու անգամ:

Հետազոտությունների հաջորդ փուլում ուսումնասիրել ենք **միջավայրի pH-ի ազդեցությունը** էկստրակտի երկու եղանակով ինակտիվացված արգինազի ռեակտիվացման գործընթացում (գծապատկեր 1):



Գծապատկեր 1. Միջավայրի pH-ի ազդեցությունը (pH=7.4; 8.6; 9.0; 9.5) 4 ժամ 10 մՄ ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացված և 12 ժամ pH-3,6 միջավայրում նախապես ինակտիվացված ֆերմենտի ռեակտիվացման գործընթացում՝ համապատասխանաբար 6 ժամ 0,01 Մ տրիս-HCl և 12 ժամ 0,01 Մ գլիցին-NaOH բուֆերներում, 20°C շերմաստիճանի պայմաններում (n=6, $M \pm m$, $p < 0,05$):

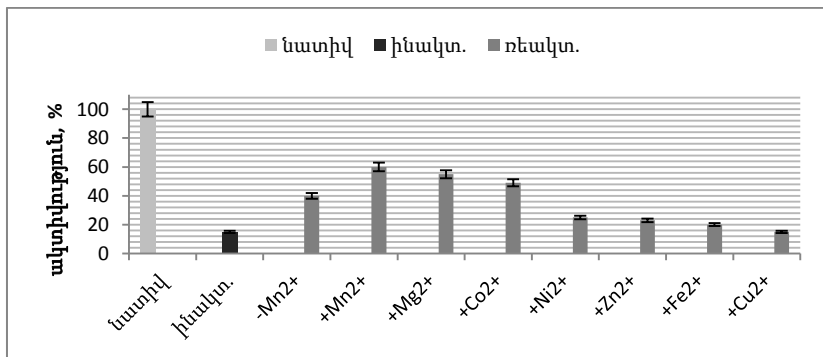
Ինչպես երևում է գծապատկեր 1-ից ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացված տարբերակում ռեակտիվացման արդյունավետությունը բարձրանում է միջավայրի pH-ի բարձրացմանը զուգընթաց՝ առավելագույնին հասնելով pH9,5 տիրույթում: Թթվային ինակտիվացմանը հաջորդող ռեակտիվացման ժամանակ, հակառակը, միջավայրի pH-ի բարձրացումը չի նպաստում վերականգնմանն. այս դեպքում առավելագույն վերականգնում դիտվում է չեզոք pH-ի սահմաններում:

Հայտնաբերվել են որոշակի տարբերություններ ֆերմենտի ակտիվության վերականգնման գործընթացում, որոնք պայմանավորված են ինչպես ֆերմենտի մաքրման աստիճանով, այնպես էլ մի շարք երկվալենտ կատիոններով: Ֆերմենտի ռեակտիվացումն, ինչպես էքստրակտների տարբերակում, այնպես էլ մասնակի մաքրված պրեպարատներում, առանց Mn^{2+} իոնների ավելացման կատարվում է ոչ արդյունավետ: Ուշադրություն է գրավում այն փաստը, որ էքստրակտների տարբերակում ռեակտիվացման տոկոսը որոշ չափով ավելի բարձր է, քան մասնակի մաքրված պրեպարատների դեպքում: Ամենայն հավանականությամբ էքստրակտի ֆրակցիոնացման ընթացում, սպիտակուցային ֆրակցիաները, որոնք հեռացվել են մաքրման ընթացքում որոշակի դեր ունեն ռեակտիվացման գործընթացում:

ԷԴՏՍ-ի ազդեցությամբ ինակտիվացումը ևս դարձելի է, ինչպես էքստրակտների, այնպես էլ մասնակի մաքրված պրեպարատների դեպքում: Սակայն այստեղ մասնակի մաքրած ֆերմենտի ինակտիվացման և ռեակտիվացման հնարավորությունները էքստրակտների համեմատությամբ գրեթե չեն տարբերվում: Համեմատելով այս արդյունքները երկկենցաղների ուրեոթելիկ արգինազի էքստրակտի և մասնակի մաքրված արգինազների հետ՝ նկատելի է, որ երկու դեպքում էլ թե՛ թթվային պայմաններում և թե՛ ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացման դեպքում, ինտենսիվությունը կախված է մաքրման աստիճանից [Շամիրյան Ա., 2013]:

Երկվալենտ իոնների ազդեցությունը առնետի լյարդի արգինազի ռեակտիվացման գործընթացի ժամանակ

Հաշվի առնելով գրականության մեջ հայտնի օրինակները, որոնց համաձայն սպիտակ առնետի լյարդի արգինազի ակտիվության դրսևորման գործընթացում բացի Mn^{2+} իոններից կարող են մասնակցել այլ երկվալենտ իոններ ևս, մեր կողմից ուսումնասիրվել է նախապես ինակտիվացված ֆերմենտի ռեակտիվացման գործընթացում Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} և Zn^{2+} իոնների դերը: Նախապես pH-3,6 բուֆերում 12 ժամ և ԷԴՏՍ-ով 4 ժամ ինակտիվացված ֆերմենտը ռեակտիվացվել է համապատասխանաբար 12 ժամ pH 7.4-ի և 6 ժամ pH 9.5-ի պայմաններում նշված երկվալենտ կատիոնների առկայությամբ: Ֆերմենտի վերջնական ակտիվությունը չափվել է՝ համեմատելով ելակետային ակտիվության հետ: Արդյունքները ներկայացված են գծապատկերներ 2 և 3-ում:

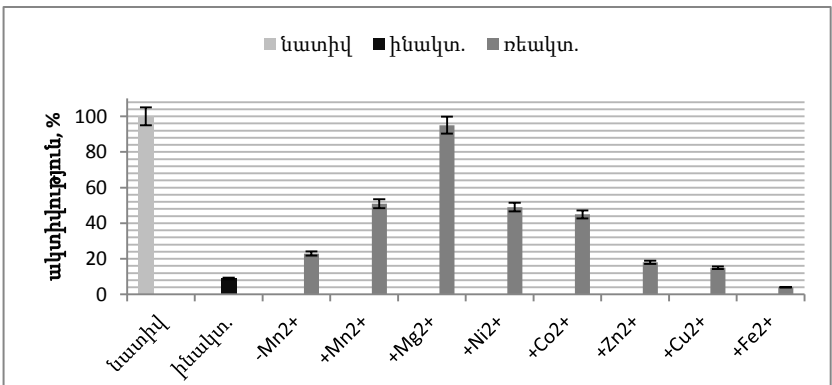


Գծապատկեր 2. Երկվալենտ իոնների ազդեցությունը սպիտակ առնետի լյարդի 12 ժամ pH 3,6 պայմաններում ինակտիվացված արգինազի 12 ժամ pH-7,4 0,01 M տրիս-HCl բուֆերում ռեակտիվացման գործընթացի վրա (n=6, M±m, p<0,05):

Ստացված տվյալների համաձայն, **թթվային պայմաններում** ինակտիվացված ֆերմենտի ակտիվությունը առանց որևէ իոնի 12 ժամ pH 9,5 բուֆերում ռեակտիվացումից հետո վերականգնվում է մինչև 40%, իսկ Mn^{2+} իոնների

առկայությամբ ֆերմենտը ռեակտիվանում է մինչև 60%: Մնացած իոնները ավելի քիչ ազդեցություն ունեն ռեակտիվացման գործընթացի վրա: Հետաքրքիր տվյալներ են ստացվել Mg^{2+} տարբերակում, որի առկայությամբ ակտիվությունը վերականգնվել է գրեթե ֆիզիոլոգիական ակտիվատորի տարբերակների չափով (55%):

Նմանատիպ տվյալներ են ստացվել ցուլի յարդի արգինազի դեպքում, երբ Mg^{2+} իոնները ակտիվության դրսևորման ժամանակ գերազանցում են Mn^{2+} իոնների ազդեցությանը [Dabir S. et al., 2005]: Հնարավոր է, որ Mn^{2+} իոնների հեռացումը, մեր փորձերի ընթացքում հանգեցնելով առնետի յարդի արգինազի դեգրադացմանը, փոխում է ֆերմենտի լիցքը և կոնֆորմացիան, ինչն էլ արտահայտվում է մեկ այլ իոնի հանդեպ խնամակցության բարձրացմամբ և օլիգոմերային կառուցվածքի ձևավորմամբ:



Գծապատկեր 3. Երկվալենտ իոնների ազդեցությունը սպիտակ առնետի յարդի էԴՏՍ-ով 4 ժամ ինակտիվացված արգինազի 6 ժամ pH 9,5 0,01M գլիցին-NaOH բուֆերում ռեակտիվացման գործընթացի վրա (n=6, M±m, p<0,05):

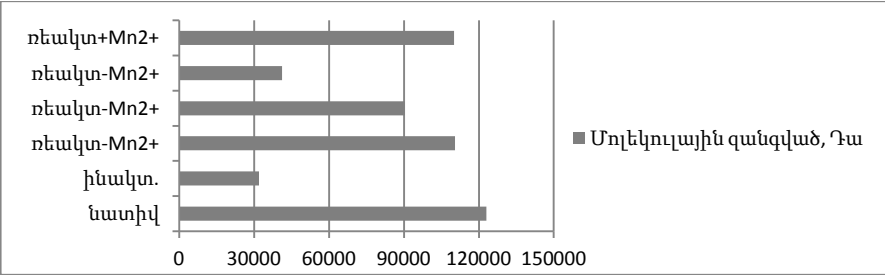
ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացված արգինազի ռեակտիվացման գործընթացքում ևս ակտիվության վերականգնմանը մասնակցում են ոչ միայն ֆիզիոլոգիական խթանիչ հանդիսացող Mn^{2+} իոնները, այլ նաև այլ երկվալենտ կատիոններ: Համաձայն արդյունքների՝ 6 ժամ մասնակի մաքրված ֆերմենտը Mn^{2+} իոնների դեպքում վերականգնվում է էլակետային ակտիվության 51 %-ի չափով: Ռեակտիվացիոն միջավայր Co^{2+} և Ni^{2+} իոնների ավելացումը հանգեցրել է գրեթե Mn^{2+} իոնների չափով ակտիվության վերականգնման (45% և 49%), Mg^{2+} իոնների ավելացումն անսպասելի կերպով ապահովել է ակտիվության մինչև 95% վերականգնում: Այս արդյունքները թույլ տվեցին եզրակացնել, որ թե՛ թթվային պայմաններում, թե՛ էԴՏՍ-ի ազդեցության դեպքում հետագա ռեակտիվացման ժամանակ Mn^{2+} իոնների փոխարեն հնարավոր է նաև այլ երկվալենտ կատիոններով ակտիվության վերականգնում, որը վկայում է տարբեր ծագում ունեցող արգինազների առանձնահատկությունների մասին: Ինչպես հայտնի է գրականությունից

երկկենցաղների լյարդի ուրեոթելիկ արգինազի ռեակտիվացման էֆեկտիվությունն ամենաբարձրն է Ni (140%) և Fe (91%) իոնների դեպքում [Shamiryan A., 2012]:

Բացի կոֆակտոր Mn^{2+} -ից, որոշ երկվալենտ իոնների մասնակցությունը վերականգնման գործընթացում պայմանավորված է արգինազի որոշակի կոնֆորմացիոն փոփոխություններով, որի դեպքում մոլեկուլը, հնարավոր է, դուրս է գալիս որոշակի կայուն կոնֆորմացիայից և պատահական կերպով ընդունում է այլ կոնֆորմացիա: Ամենայն հավանականությամբ, կոնֆորմացիոն փոփոխությունները կարող են զգալիորեն ազդել այն խմբերի փոխափոխության վրա, որոնք նախատեսված են յուրօրինակ լիզանդին ճանաչելու համար՝ թուլացնելով կամ ուժեղացնելով լիզանդի հետ փոխազդեցությունն: Այս դեպքում կարող է տեղի ունենալ ելակետայինից բավականին տարբերվող անցում այլ կառուցվածքի:

Առնետի լյարդի արգինազի pH 3,6 պայմաններում և E-ՆSU-ով դարձելի ինակտիվացման ընթացքում ֆերմենտի ֆրակցիոնացման արդյունքները

Հետազոտությունների այս փուլում նպատակ ենք ունեցել ուսումնասիրել pH 3,6 պայմաններում և E-ՆSU-ով դարձելի ինակտիվացման գործընթացում ֆերմենտի տրոհման և ռեասոցացման հնարավորությունները (գծապատկերներ 4,5): Հետազոտվել են դարձելի ինակտիվացված ֆերմենտի ենթամիավորային կազմի կրած փոփոխությունները: Ենթամիավորային կազմի մոլեկուլային զանգվածները որոշվել են ժել-ֆիլտրացման եղանակով (սեֆադեքս G-200):



Գծապատկեր 4. Առնետի լյարդի արգինազի pH3,6 պայմաններում դարձելի ինակտիվացման գործընթացքում ենթամիավորային կազմի մոլեկուլային զանգվածների փոփոխությունները (n= 6, M±m, P<0,01):

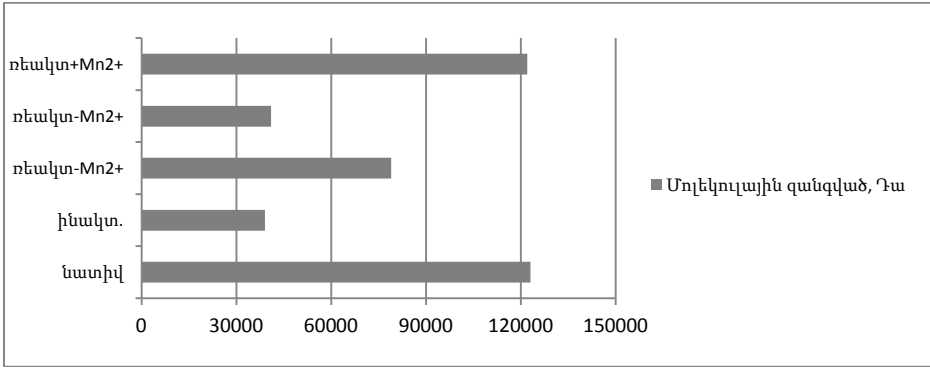
Ինչպես երևում է գծապատկեր 4-ից, առնետի լյարդի արգինազն իրենից ներկայացնում է տրիմեր՝ 125000 մոլեկուլային զանգվածով: Թրվային պայմաններում 12 ժամ ֆերմենտի ինակտիվացման դեպքում առաջացել են 32000 Դա մոլեկուլային զանգվածով ենթամիավորներ:

Ֆերմենտի հետագա ռենատուրացման արդյունքում Mn^{2+} իոնների բացակայությամբ առաջացել են տարբեր մոլեկուլային զանգվածներով 3 տիպի

ֆրագմենտներ, որոնք, համաձայն ստացված արդյունքների, իրենցից ներկայացնում են մոնոմեր, դիմեր և գրեթե ամբողջությամբ վերականգնված տրիմեր: Mn^{2+} իոններով վերականգնման դեպքում առաջացել է ոչ լիարժեք տրիմեր (110000Դա), ինչը հավանաբար պայմանավորված է այն փաստով, որ թթվային ինակտիվացման ժամանակ պոլիպեպտիդային շղթայից հնարավոր է անջատվել են փոքր հատվածներ, որոնք վերամիավորման ժամանակ այլևս չեն միացել պոլիպեպտիդին, ինչն անդրադարձել է վերջնական արդյունքի վրա:

Պետք է նշել, որ այս հարցում առնետի լյարդի ուրեոթելիկ արգինազը զգալի տարբերվում է *Rana ridibunda* հատուն գորտի լյարդի արգինազից, երբ միևնույն փորձարարական պայմաններում նատիվ տետրամերի փոխարեն առաջանում էր օկտամեր: Այս փաստը վկայում է տարբեր ծագում ունեցող ուրեոթելիկ արգինազների ոչ միանշանակ հատկությունների մասին: Հեղինակների համաձայն՝ օկտամերի առաջացումը, հնարավոր է բացատրել լրացուցիչ դիսուլֆիդային կապերի առաջացմամբ, ինչի պատճառով խաթարվում է սպիտակուցի ճիշտ փաթեթավորումը [Գրիգորյան Ռ., 2005]:

Ինչ վերաբերվում է ԷԴՏՍ-ի ազդեցությամբ կատարված փորձերի արդյունքներին, (զծապատկեր 5) ապա այստեղ ֆերմենտը ևս դիսոցվում է ենթամիավորների: 4 ժամ ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացումից հետո առաջանում է 39000 Դա մոլեկուլային զանգվածով ֆրակցիա, որը ամենայն հավանականությամբ իրենից ներկայացնում է լիարժեք իրական մոնոմեր, ինչի մասին վկայում են ՊՔՄԲ-ի ազդեցությամբ հետազոտությունները: Սեր փորձերում պրոտոմերների միավորման գործընթացը որոշ չափով իրականանում է նաև առանց երկվալենտ կատիոնի մասնակցության:



Գծապատկեր 5. Առնետի լյարդի արգինազի ԷԴՏՍ-ով դարձելի ինակտիվացման գործընթացում ենթամիավորային կազմի փոփոխությունները, արտահայտված մոլեկուլային զանգվածներով (n= 6, M±m, P<0,01):

Առանց Mn^{2+} իոնների ֆերմենտի ռեակտիվացման ընթացքում առաջանում են սպիտակուցային ֆրագմենտներ՝ 79000 և 41000 մոլեկուլային զանգվածներով: Ի տարբերություն թթվային ինակտիվացման արդյունքների, դիմերների մոլեկուլային

զանգվածներն ավելի մոտ են իրական դիմերների մոլեկուլային զանգվածներին, ինչի մասին վկայում են նաև Mn^{2+} իոնների առկայությամբ հետազոտությունների արդյունքները, որտեղ ռեակտիվացված տարբերակի մոլեկուլային զանգվածը հավասար է 123000 Դա (զծապատկեր 5), չնայած որ ֆերմենտի ակտիվությունը վերականգնվել է միայն ելակետային ակտիվության 49% չափով: Հնարավոր է, որ ռեակտիվացման ընթացքում ֆերմենտի դիսոցման և ռեասոցացման գործընթացների ժամանակ տուբստրատը նախապատվությունը տալիս է մոնոմերի փոխարեն դիմերի հետ միացմանը, որն էլ կարող է անդրադառնալ ակտիվության վերականգնման վերջնական արդյունքի վրա:

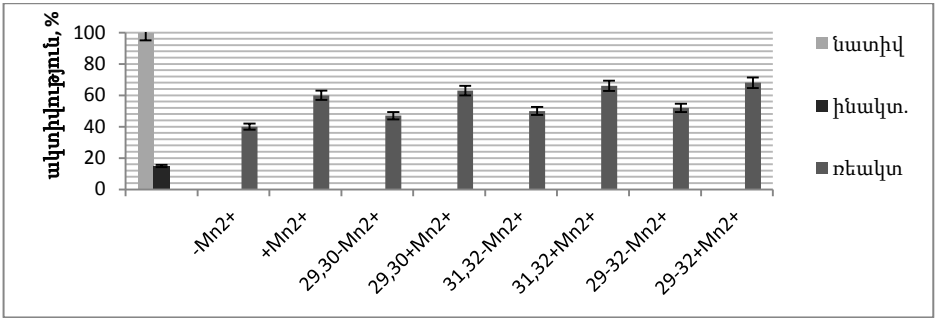
Առնետի յարդի ուրեթելի արգինազի ռեակտիվացման ընթացքում որոշակի սպիտակուցային ֆրակցիաների դերը

Ինչպես ցույց տրվեց հետազոտությունների նախորդ փուլում էքստրակտներում առկա արգինազն ավելի կայուն է ցածր pH-ի արգդեցության հանդեպ քան մասնակի մաքրված ֆերմենտը, որի դեպքում մաքրման ընթացքում Ժել-ֆիլտրացման արդյունքում հեռացվում են մի շարք «ոչ արգինազային» սպիտակուցներ: Ներկայացվող փուլում փորձել ենք պարզաբանել ինակտիվացված արգինազի ակտիվության վերականգնման գործընթացում այդ սպիտակուցային ֆրակցիաների հնարավոր դերը: Ժել-ֆիլտրացման եղանակով որոշվել են ստացված ոչ արգինազային սպիտակուցային ֆրակցիաների մոլեկուլային զանգվածները: 29-30 ֆրակցիայի մոլեկուլային զանգվածը կազմել է 71000 Դա է, իսկ 31-32 ֆրակցիայի մոլեկուլային զանգվածը՝ 55000 Դա:

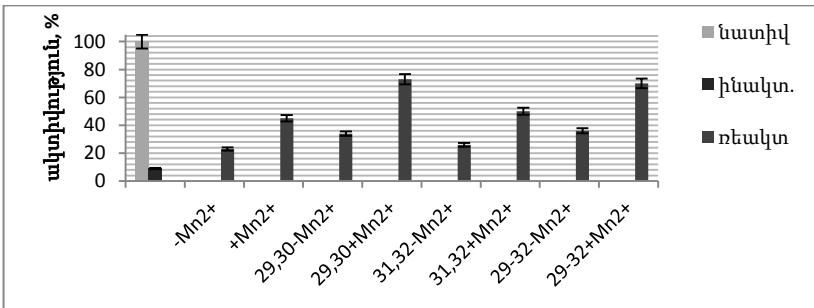
Ռեակտիվացիոն միջավայր ավելացվել են ինչպես առանձին 29,30 ֆրակցիաների սպիտակուցներ, այնպես էլ գումարային 29-32 ֆրակցիաների խառնուրդ՝ նպատակ ունենալով պարզաբանել ռեակտիվացման գործընթացում առանձին սպիտակուցային ֆրակցիաների դերը: Նշված տարբերակներում ռեակտիվացումն իրականացվել է Mn^{2+} իոնների առկայության և բացակայության պայմաններում: Հետազոտությունների արդյունքները ներկայացված են զծապատկերներ 6,7-ում:

Ինչպես երևում է զծապատկեր 6-ի տվյալներից առանց իոնների ռեակտիվացման տոկոսը կազմել է 40%, Mn^{2+} իոնների առկայությամբ՝ 60%: Ուշադրություն է գրավում այն փաստը, որ թթվային ինակտիվացումից հետո առավել արդյունավետ է 29-32 գումարային ֆրակցիաների ավելացումը: Այստեղ ռենատուրացված ֆերմենտի ակտիվությունը կազմել է 68%: Այսինքն, ռենատուրացման գործընթացում այս սպիտակուցները ունեն զգալի դրական դեր:

Միջավայրի pH-7,4-ի պայմաններում 4 ժամ նախապես ԷԴՏU-ով ինակտիվացած արգինազի ակտիվության վերականգնման գործընթացում (6 ժամ, pH=9,5) նշված «ողորդող» սպիտակուցային ֆրակցիաների դերը գրեթե չի արտահայտված (զծապատկեր 7):



Գծապատկեր 6. Առնետի լյարդի pH 3,6 պայմաններում 12 ժամ նախապես ինակտիվացած արգինազի ռեակտիվացման գործընթացում (12 ժամ, pH=7,4) ոչ արգինազային «ուղղորդող» սպիտակուցային ֆրակցիաների դերը (n=6, M±m, p<0,05):



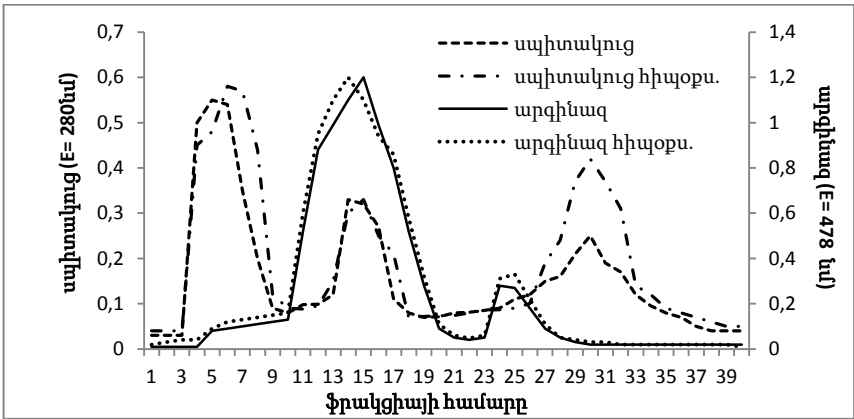
Գծապատկեր 7. Առնետի լյարդի pH 7.4-ի պայմաններում 4 ժամ նախապես ԷԴՏՍՍ-ով ինակտիվացած արգինազի ակտիվության վերականգնման գործընթացում (12 ժամ, pH 7.4) ոչ արգինազային սպիտակուցների դերը (n=6, M±m, p<0,05):

Այսպիսով, 71000 և 55000 Դա մոլեկուլային զանգվածով «ուղղորդող» սպիտակուցների ավելացումը ռեակտիվացման միջավայր թթվային ինակտիվացման դեպքում զգալիորեն բարձրացնում է ռեակտիվացման արդյունավետությունը, մինչդեռ ԷԴՏՍՍ-ով ինակտիվացման տարբերակում ակտիվության տատանումներ գրեթե չեն հայտնաբերվում:

Հիպոքսիայի ենթարկված առնետի լյարդից անջատված ուղղորդող ոչ արգինազային սպիտակուցային ֆրակցիաների ազդեցությունը մասնակի մաքրված արգինազի ռեակտիվացման գործընթացում

Ներկայացվող բաժնում փորձել ենք պարզաբանել հիպոքսիայի ենթարկված կենդանու լյարդում ինդուկցված սպիտակուցների դերը ֆերմենտի

ռեակտիվացման գործընթացում (գծապատկերներ 8,9,10): Ինչպես երևում է գծապատկեր 8-ի տվյալներից, հիպոբարիկ սթրեսի արդյունքում, որը բերում է հիպօքսիայի առաջացման, նկատվում է 29-32 ֆրակցիաների սպիտակուցների ինդուկցիա, որոնց քանակը մոտավորապես երկու անգամ ավելանում է:

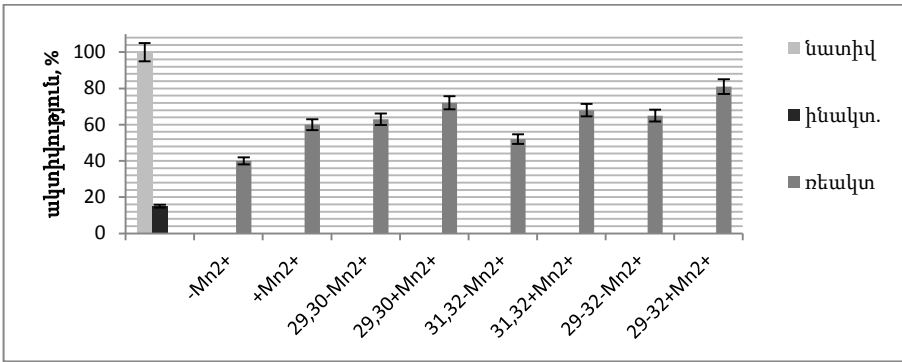


Գծապատկեր 8. Առնետի լյարդի հոմոգենատի ֆրակցիոնացումը սեֆադեքս G200-ով: Պատկերված են նորմալ և հիպօքսիայի ենթարկված կենդանիների լյարդի էքստրակտների ֆրակցիոնացման արդյունքները: Էլյուցիան կատարվել է 0,01 Մ տրիս-HCl բուֆերով, 25մլ/ժ արագությամբ:

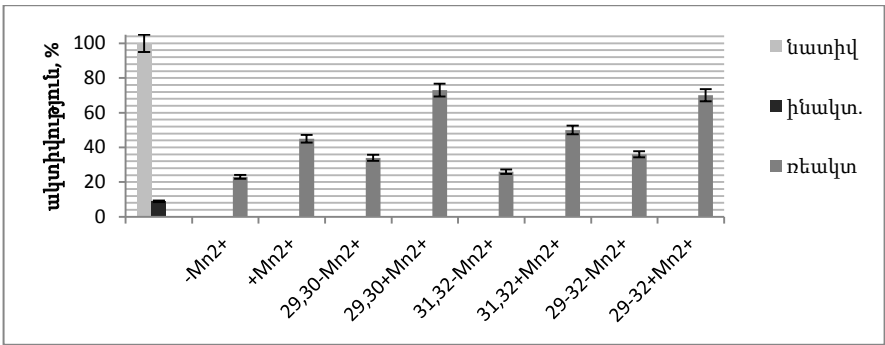
Սթրեսի ժամանակ գենոմի վերածրագրավորումը բերում է սպեցիֆիկ սթրեսային սպիտակուցների սինթեզին, որոնք օգնում են բջջին գոյատևել էքստրեմալ պայմաններում: Հիպօքսիայի հանդեպ բջջային պատասխանը ուղեկցվում է հատուկ սպիտակուցային ֆրակցիայի՝ HIF-1 (hipoxia-inducible factor) ակտիվացմամբ, որը հանդիսանում է տրանսկրիպցիոն գործոն բազմաթիվ սպիտակուցների սինթեզի համար, որոնց շարքում է նաև Hsp 70 [Deri et al, 2005; Тихонова Н.С. и др., 2008]:

Ինչպես երևում է գծապատկեր 9-ի տվյալներից, թթվային ինակտիվացմանը հաջորդող վերաակտիվացման գործընթացում համեմատաբար ավելի արտահայտված է 71000 մոլեկուլային զանգվածով սպիտակուցային ֆրակցիաների դերը (29-30 ֆրակցիաներ), իսկ 31-32 ֆրակցիաների ավելացումը պակաս արդյունավետ է: Ուշադրություն է արժանի այն փաստը, որ հիպօքսիայի ենթարկված կենդանիների տարբերակում ֆերմենտի ակտիվության վերականգնման տոկոսը զգալիորեն բարձրանում է, մասնավորապես, սպիտակուցային ֆրակցիաների խառնուրդի (29-32 ֆրակցիաներ) ավելացման դեպքում՝ կազմելով 81% Mn²⁺ իոնների առկայությամբ և 65% առանց իոնների, ինչը, հնարավոր է, պայմանավորված է կարգավորող շապերոնանման ազդեցության գումարային էֆեկտով: Ամենայն հավանականությամբ այդ սպիտակուցները մտնում են այսպես կոչված «բազմաշապերոնային ցանց» կազմի մեջ:

ԷՂՏԱ-ով ինակտիվացմանը հաջորդող ռեակտիվացման ժամանակ ևս առավել բարենպաստ ազդեցություն ունեն 71000 Դա զանգվածով սպիտակուցները՝ 29-30 ֆրակցիաներ (գծապատկեր 10):



Գծապատկեր 9. Առնետի լյարդի pH 3,6 պայմաններում 12 ժամ նախապես ինակտիվացած արգինազի ռեակտիվացման գործընթացում (12 ժամ, pH=7,4) հիպօքսիայի արդյունքում ինդուկցված ուղղորդող սպիտակուցային ֆրակցիաների դերը (n=6, M±m, p<0,05):



Գծապատկեր 10. Առնետի լյարդի pH 7.4-ի պայմաններում 4 ժամ նախապես ԷՂՏԱ-ով ինակտիվացված արգինազի ակտիվության վերականգնման գործընթացում (12 ժամ, pH=9,5) ոչ արգինազային սպիտակուցների դերը (n=6, M±m, p<0,05):

Այսպիսով, ինչպես ցույց տվեցին փորձերի արդյունքները հիպօքսիայի արդյունքում ինդուկցված սպիտակուցային ֆրակցիաները զգալիորեն բարձրացնում են ռենատուրացման էֆեկտիվությունը՝ ֆերմենտի ակտիվությունը թթվային

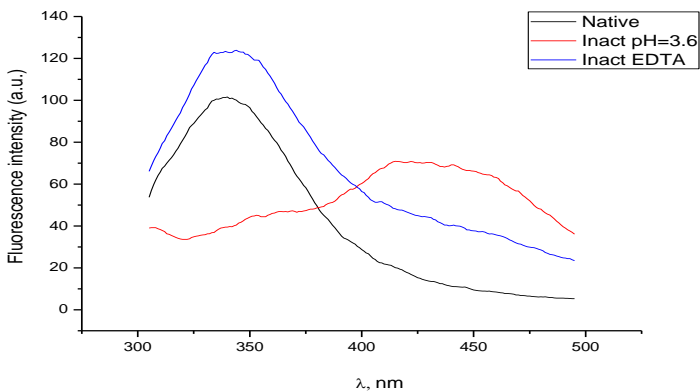
ինակտիվացումից հետո բարձրանում է մինչև 80%, իսկ ԷԴՏԱ-ի դեպքում մինչև՝ 70%: Ակնհայտ է, որ նշված ֆրակցիաներում պարունակվում են ջերմային շոկի սպիտակուցներ (շապերոններ, շապերոնիններ և այլ սպիտակուցներ), որոնք ուղղորդում են ֆոլդինգի գործընթացը ճիշտ ուղղությամբ: Գրականության տվյալների համաձայն առնետի ուղեղի կեղևում ընթացող հիպօքսիա հետ կապված օքսիդացման և վերականգնման գործընթացները սերտորեն առնչվում են էներգետիկ փոխանակության, բջջակմախքի և շապերոնների հետ: Այս տվյալները կարող են նոր հեռանկարներ ստղծել հիպօքսիայի հետ կապված վնասվածքների համար թերապևտիկ միջոցների ստեղծման համար [Hernandez R. et al., 2013]: Ներկայումս կատարվում են հետազոտություններ այդ սպիտակուցների իդենտիֆիկացման ուղղությամբ:

Առնետի լյարդի արգինազի երկու եղանակով դարձելի ինակտիվացման ընթացքում ֆերմենտի կոնֆորմացիայի փոփոխություններին ազդեցությունը ֆլուորեսցենտային սպեկտրերի վրա

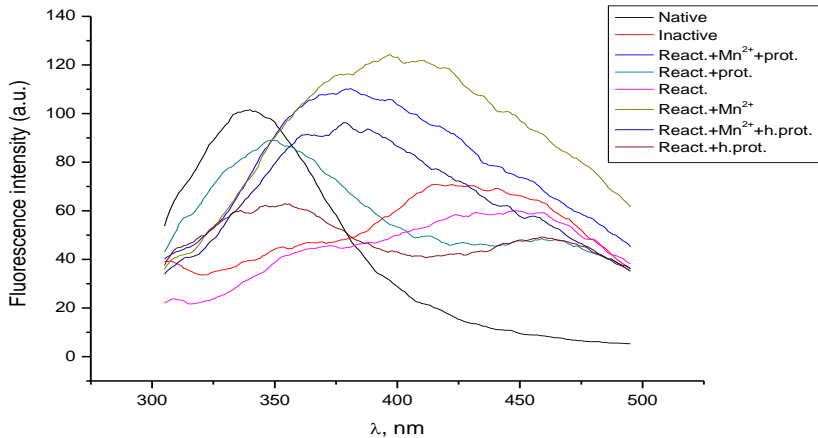
Նպատակ ունենալով բացահայտել, թե ինչպես են ազդում ինակտիվացման և ռեակտիվացման գործընթացներն առնետի լյարդի ուրեթեյլիկ արգինազի մոլեկուլի կոնֆորմացիոն վիճակի վրա և ինչքանով են նման տարբեր եղանակներով ռեակտիվացված արգինազների օլիգոմերների ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրերը նատիվ արգինազի սպեկտրերին՝ իրականացվել են ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրերի չափումներ 280 նմ և 295 նմ գրգռման ալիքի պայմաններում: Համաձայն մեր տվյալների (գծապատկեր 11), առնետի լյարդի նատիվ արգինազի ֆլուորեսցենցիայի գրգռման 280 նմ ալիքի երկարության դեպքում մաքսիմումը դիտվում է 335-340 նմ, իսկ սպեկտրի կիսալայնքը կազմում է 46 նմ է, ինչը համընկնում է ցուլի լյարդի գերմաքուր արգինազի ֆլուորեսցենցիայի տվյալների հե՝ 338 նմ [Геворкян М.Л. и др., 1995]: Դա վկայում է այն մասին, որ սպեկտրի այդ շրջանում ֆլուորեսցենցիան ապահովվող տիպտոֆանի և թիրոզինի մնացորդները գտնվում են հիդրոֆոբ շրջապատում: 295 նմ գրգռման ալիքի պայմանների հետ համեմատած՝ առաքման ինտենսիվությունը 280 նմ ալիքի երկարության պայմաններում ավելի բարձր է, և մաքսիմումի դիրքը աննշան չափով շեղված է ավելի կարճալիք տիրույթ, ինչը վկայում է այն մասին, որ թիրոզինային կոմպոնենտը որոշակի ներդրում ունի ֆլուորեսցենցիայի ժամանակ, սակայն 280 նմ գրգռման ալիքի դեպքում ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրը հիմնականում որոշվում է տրիպտոֆանային բաղադրիչով:

Մասնակի մաքրված ֆերմենտի 12 ժամ pH 3,6 պայմաններում ինակտիվացումից հետո դիտվում է ֆերմենտի ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրի զգալի փոփոխություն՝ իջնում է ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը և ֆլուորեսցենցիայի մաքսիմումը շեղվում է դեպի երկարալիք տիրույթ՝ մինչև 450-480 նմ (գծապատկեր 11): Ակնհայտ է, որ այս պայմաններում տեղի է ունենում ֆերմենտի կոնֆորմացիայի խախտում, հատկապես այն հատվածներում, որտեղ տեղակայված են տրիպտոֆանի և թիրոզինի մնացորդները, կատարվում է պոլիպեպտիդային շղթայի ապապարուրում

և ֆլուորեսցենցիան իրականացնող մնացորդներն անցնում են ավելի հիդրոֆիլ միջավայր: Հնարավոր է, որ այս դեպքում տեղի է ունենում նաև էներգիայի միգրացիա թիրոզինի մնացորդներից տրիպտոֆանի վրա:



Գծապատկեր 11. Առնետի լյարդի ուռետթելիկ արգինազի նատիվ, pH 3,6 պայմաններում 12 ժամ և EԴՏԱ-ի միջավայրում 4 ժամ ինակտիվացված նմուշների ֆլուորեսցենցիան՝ 280 նմ կլանման ալիքի պայմաններում (n=3):



Գծապատկեր 12. pH 3,6 պայմաններում 12 ժամ ինակտիվացված մասնակի մաքրված արգինազի pH7,4 Tris-HCl բուֆերում տարբեր եղանակներով 12 ժամ որոշակի սպիտակուցային ֆրակցիաների ազդեցությամբ վերականգնված նմուշների ֆլուորեսցենտային սպեկտրները 280 նմ կլանման ալիքի պայմաններում (n=3):

Ինչպես ցույց է տրված աշխատանքի նախորդ բաժիններում 4 ժամ 0,01Մ ԷԴՏՍ-ի միջավայրում ֆերմենտն ինկուբացնելիս այն դարձյալ գրեթե ամբողջովին ինակտիվանում է, ինչպես նաև տրոհվում է մոնոմերների, մինչդեռ ֆլուորեսցենցիայի առաքման մաքսիմումը պահպանվում է միննույն ավիքի երկարության տիրույթում, ինչպես նաև տեղի է ունենում առաքման ինտենսիվության աննշան աճ (գծապատկեր 11): Այսպիսով, արգինազի տրիպտոֆանի և թիրոզինի մնացորդների միկրոշրջապատի փոփոխություններ տրվյալ դեպքում չեն կատարվել:

Գծապատկեր 12-ից երևում է, որ թթվային պայմաններում նախապես ինակտիվացված ֆերմենտը 0,01 Մ Tris-HCl բուֆերում pH 7,4 բուֆերում 12 ժամ վերականգնելուց հետո, ֆերմենտը դարձյալ մնում է դեստրուկտիվ, թեև այդ դեպքում ֆերմենտի ակտիվությունը նատիվ նմուշի համեմատությամբ վերականգնվում է 40% չափով: Դա, հնարավոր է, վկայում է այն մասին, որ չնայած տեղի են ունենում կոնֆորմացիայի փոփոխություն այն հատվածներում, ուր տեղակայված են քրոմոֆորներն, այնուամենայնիվ, կատարվում է ֆերմենտի մասնակի վերականգնում ակտիվ կենտրոնի շրջանում:

Հետաքրքիր տվյալներ են ստացվել, երբ ինակտիվացման միջավայր են ավելացվել սպիտակուցային ոչ արգինազային ֆրակցիաներ՝ անջատված ինչպես նորմալ, այնպես հիպօքսիայի ենթարկված առնետի լյարդի էքստրակտներից: Այդ դեպքում նկատվել է ֆլուորեսցենցիայի մաքսիմումի տեղափոխում դեպի կարճալիք տիրույթ (գծապատկեր 12): Ըստ արդյունքների՝ այդ սպիտակուցները մասամբ վերականգնել են ակտիվ կենտրոնի կոնֆորմացիան՝ ֆլուորեսցենցիայի մաքսիմումը տեղափոխելով նատիվին բնորոշ կարճալիք տիրույթ:

Ինչ վերաբերվում է ԷԴՏՍ-ով ինակտիվացման գործընթացին, ապա այստեղ թեև տեղի է ունենում ֆերմենտատիվ ակտիվության կորուստ, սակայն ֆլուորեսցենցիայի տեսակետից ֆերմենտի կոնֆորմացիան աննշան է փոխվում, մինչդեռ թթվային պայմաններում ինակտիվացիայից հետո կոնֆորմացիան ամբողջովին փոխվում է, որը հետագա ռեակտիվացման ժամանակ միայն մասամբ է վերականգնվում:

Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրել, որ առնետի լյարդի արգինազի մոլեկուլում առկա են տարբեր կառուցվածքային դոմեններ, որոնք ունեն առանձնահատուկ կայունություն տարբեր դենատուրացնող գործոնների հանդեպ և վերականգնման տարբեր հնարավորություններ: Թթվային պայմաններում և ԷԴՏՍ-ի ազդեցությամբ առնետի լյարդի ինակտիվացման և ռեակտիվացման գործընթացների ուսումնասիրությունները բացահայտեցին նատիվ և վերականգնված ֆերմենտի ենթամիավորային կառուցվածքի հետաքրքիր կողմերը, ցույց տվեցին, որ այս երկու եղանակների մեխանիզմները սկզբունքորեն տարբեր են:

Այսպիսով, կարելի է եզրակացնել, որ առնետի լյարդի ուրեոթելիկ արգինազն օժտված է յուրահատուկ կառուցվածքային առանձնահատկություններով, որոնք տարբերում են նրան էվոլյուցիոն զարգացման տարբեր աստիճաններում գտնվող օրգանիզմների լյարդի ուրեոթելիկ արգինազներից:

ԵԶՐԱԿԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Առնետի լյարդի արգինազի թթվային պայմաններում և ԷԴՏՍ-ի ազդեցությամբ դարձելի ինակտիվացումն ուղեկցվում է ֆերմենտի ենթամիավորների տրոհմամբ՝ համապատասխանաբար 32000 Դա և 39000 Դա մոլեկուլային զանգվածներով:
2. Նախապես երկու եղանակով ինակտիվացված արգինազը, բացի ֆիզիոլոգիական ակտիվատոր Mn^{2+} -ից, ռեակտիվանում է նաև մի շարք երկվալենտ իոններով (Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} և Zn^{2+}), ինչպես նաև որոշ «ուղղորդող», պաշտպանողական սպիտակուցների առկայությամբ:
3. Երկու եղանակով ինակտիվացված արգինազի ռեակտիվացման արդյունքում առաջանում են օլիգոմերներ, որոնց մոլեկուլային զանգվածը կազմում է 110000-124000 Դա, որը համապատասխանում է նատիվ տրիմերի մոլեկուլային զանգվածին:
4. Ռեակտիվացման էֆեկտիվությունն ամենաբարձրն է (80%) հիպոբարիկ հիպօքսիայի արդյունքում ինդուկցված «ուղղորդող», պաշտպանողական սպիտակուցների ավելացման դեպքում, որոնք, անկասկած, օժտված են ինչպես ֆոլրագային, այնպես էլ շապերոնանման հատկություններով և աջակցում են ֆոլդինգի գործընթացին:
5. Ֆլուորեսցենտային սպեկտրների վերլուծության միջոցով նկարագրվել են առնետի լյարդի արգինազի նատիվ, ինակտիվացված և ռենատուրացված տարբերակների կոնֆորմացիոն վիճակները, և ցույց է տրվել, որ միայն «պաշտպանողական» սպիտակուցները զգալիորեն բարձրացնում են ռեակտիվացման էֆեկտիվությունը, նատիվ տրիմերի բարձր ելքով և մասնակցում են նոր առաջացած օլիգոմերի տարածական կոնֆորմացիայի վերականգնմանը:
6. Առնետի լյարդի ուրեոթելիկ արգինազն օժտված է որոշակի կառուցվածքային դոմեններով, որոնք ունեն առանձնահատուկ կայունություն տարբեր դենատուրացնող գործոնների հանդեպ և վերականգնման տարբեր հնարավորություններ, որոնք էլ տարբերում են դրան Էվոլյուցիոն զարգացման տարբեր աստիճաններում գտնվող օրգանիզմների արգինազներից:

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՀՐԱՏԱՐԱԿՎԱԾ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ ՑՈՒՑԱԿ

1. Դավթյան Մ.Ա., Բարսեղյան Է.Խ., Սիմոնյան Թ.Ն.// Առնետի լյարդի արգինազի ինակտիվացման և ռեակտիվացման պրոցեսների ուսումնասիրությունը. Տեղեկատվական տեխնոլոգիաներ և կառավարում, 2008, Yerevan, Armenia, № 8, էջ 120-125:
2. Սիմոնյան Թ.Ն., Բարսեղյան Է.Խ.// Առնետի լյարդի արգինազի դարձելի ինակտիվացման պրոցեսի վրա տարբեր բուժերային համակարգերի ազդեցության ուսումնասիրությունը. ԵՊՀ գիտական տեղեկագիր, քիմիա և կենսաբանություն, 2010, № 1, էջ 63-65:
3. Simonyan T.N., Barseghyan E.Kh., Davtyan M.A.// Study of reversible inactivation of rat's liver type arginase by adding to the reactivation medium protein fractions derived from hypoxia treated rats. FEBS Advanced Lecture Course, Matherials, Sofia school of protein science: Structure and dynamics of biological macromolecules, Sofia, Bulgaria, 9-14 Sept. 2012, P29, p. 85.
4. Շամիրյան Ա.Ս. Սիմոնյան Թ. Ն. Բարսեղյան Է. Խ.// Սպիտակ առնետի և Rana ridibunda գորտի լյարդի արգինազի ԷԴՏՍ-ով ապակտիվացման առանձնահատկությունները. ԵՊՀ գիտական տեղեկագիր, 2012, № 3, էջ 33-37:
5. Simonyan T.N.// Role of low weight protein fractions in the process of reversible inactivation of white rat liver arginase. Proceedings of YSU 2014, №1, p. 32-36.
6. Սիմոնյան Թ.Ն., Բարսեղյան Է.Խ., Գևորգյան Մ.Լ., Դավթյան Մ.Ա.// Սպիտակ առնետի լյարդի արգինազի թթվային ինակտիվացման և հետագա ռեակտիվացման ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության և ֆլուորեսցենցիայի վրա, Հայաստանի Կենսաբանակ Հանդես, 2014, հ. 66, №2, էջ 75-77:

ОСОБЕННОСТИ ОБРАТИМОЙ ИНАКТИВАЦИИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ НИЗКИХ pH И ДЕЙСТВИИ ЭДТА

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: изофермент, гипобарическая гипоксия, денатурация, ренатурация, флуоресценция, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)

Одним из важных и интересных вопросов современной биохимии является проблема регуляции метаболизма в живых системах, что в конечном счете сводится к управлению действием биологических катализаторов – ферментов. В настоящее время большой интерес представляет изучение индивидуальных изофункциональных белков (изоферментов), участвующих в различных биохимических процессах.

В представленной работе проведено исследование субъединичного строения уреотелической аргиназы печени крыс и выявление изменений активности фермента в ходе обратимой инактивации под влиянием низких pH и ЭДТА. Этот метод довольно широко распространен при изучении свойств олигомерных белков. В ходе экспериментов несколько усовершенствован метод обратимой инактивации, выявлены оптимальные условия инактивации фермента 2-мя способами и последующей реактивации (pH, молярность использованных буферов, наличие и концентрация ионов ряда двухвалентных катионов, влияние степени очистки фермента). Выявлены и идентифицированы образующиеся при обратимой инактивации промежуточные структуры. Инактивация при низких pH приводила к образованию субъединиц с молекулярной массой 32000 Да, под действием ЭДТА-39000 Да. Реактивация фермента приводила к образованию олигомера с м.м. 110000-125000 Да, что практически соответствовало м.м. тримерного нативного фермента. Примечательно, что ионы Mg^{2+} были более эффективны для процесса реактивации фермента, чем физиологический активатор Mn^{2+} .

Обсуждается роль определенных белковых фракций, удаляемых при очистке фермента, с м.м. 55000-71000 Да в процессе ренатурации. Показано, что при гипобарической гипоксии эти белки резко индуцируются и их добавление в ренатурационную среду приводит к восстановлению активности фермента до 80%, а также, к возможному восстановлению олигомерной структуры. Делается предположение, как о фолдазной, так и о «шапероноподобной» функции этих белков.

Анализ флуоресцентных спектров аргиназы печени крыс позволил описать конформационное состояние нативного, инактивированного и реактивированного разными способами фермента. При наличии у аргиназы печени крыс определенной пространственной структуры в ходе обратимой инактивации, могли происходить глубокие изменения конформации, приводящие к новой структуре, резко отличающейся от исходной.

Такие изменения могли существенно влиять на взаимное расположение групп, участвующих в узнавании специфического лиганда, либо усиливая, либо ослабляя

взаимодействие. При ренатурации возможен переход в новую определенную структуру, достаточно отличающуюся от исходной и имеющей свой структурный облик. Анализ флуоресцентных спектров показал, что большинство двухвалентных катионов в ходе реактивации участвуют в формировании пространственной конфигурации вновь воссозданного олигомера. Показано, что уреотелическая аргиназа печени крыс наделена определенными структурными доменами, которые имеют специфическую устойчивость к различным денатурирующим факторам и различную способность к «ренатурации» и «реактивации», которые отличают ее от уреотелических аргиназ ряда организмов, стоящих на разных ступенях эволюционного развития.

PECULIARITIES OF REVERSIBLE INACTIVATION OF RAT LIVER ARGINASE BY INFLUENCE OF EDTA AND AT LOW pH CONDITIONS

SUMMARY

Keywords: denaturation, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), fluorescence, hypobaric hypoxia, isoenzyme, renaturation

One of the important and interesting issues of modern biochemistry is the problem of regulation of metabolism in living systems that ultimately occurs by biological catalisators-enzymes. Nowadays, the study of individual isofunctional proteins (isoenzymes) which are involved in various biochemical processes is in great importance.

In the presented work is studied the subunit structure of rat liver ureotelic arginase and are detected changes in enzyme activity during the reversible inactivation by EDTA and at low pH. These methods are quite common in the process of studying the properties of oligomeric proteins. Mentioned methods revealed the optimal conditions for inactivation of the enzyme by different pathways and subsequent reactivation (pH, buffer molarity, the presence and concentration of some divalent cations and influence of the enzyme's purification degree).

We revealed and identified the intermediate structures which are formed during the reversible inactivation. Inactivation at low pH leads to the formation of subunits by 32000 Da molecular weight and under the influence of EDTA-39000 Da m.w. After reactivation oligomers of 110000-125000 Da m.w. are formed, which practically corresponds to m.w. of trimeric native enzyme. It is noteworthy that the Mg^{2+} ions were more effective during the process of reactivation of the enzyme than a physiological activator (Mn^{2+} ions).

The role of specific protein fractions, derived during purification of the enzyme (molecular weight 55000-71000 Da), in the process of reactivation is discussed. It is showed, that due to hypobaric hypoxia, these proteins are induced dramatically and by adding them to renaturation medium leads to the recovery of enzyme activity up to 80%, as well as to the possible restoration of the oligomeric structure. We suppose that these proteins have not only foldase activity, but also chaperon-like properties.

Analysis of the fluorescence spectra of rat liver arginase allow us to describe the conformational state of native, inactivated and in different ways reactivated enzymes. In the presence of specific spatial structure of rat liver arginase during reversible inactivation the conformational changes could be profound, which leads to formation of a totally different new structure, than the native one.

Such changes could significantly affect the positioning of the groups involved in the recognition of a specific ligand, strengthening or weakening the interaction. Possibly, during renaturation occurs the transition to a new defined structure, quite different from the original one which has its own structural characteristics. Analysis of fluorescent spectra showed, that during the reactivation most of divalent cations involved in the formation of the spatial configuration of the newly reconstituted oligomer.

It is shown, that rat liver arginase has certain structural domains that have specific resistance to various denaturing factors and different renaturtaion and reactivation abilities, which distinguish it from other ureotelic arginases positioned at the different stages of evolution.