

A 03.00.04
A 9-88

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ և ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ ՌՈՒԶԱՆՆԱ ՀԱՅԿԻ

ԵՐԿԿԵՆՑԱՂՆԵՐԻ ՕՆՏՈԳԵՆԵԶԻ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ (*Rana ridibunda* ԳՐՐՏԻ
ՕՐԻՆԱԿԻ ՎՐԱ) ԼՅԱՐԴԻ ԱՐԳԻՆԱԶԻ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԹԹՎԱՅԻՆ
ԻՆԱԿՏԻՎԱՑՄԱՆ ԵՎ ՌԵԱԿՏԻՎԱՑՄԱՆ ԱՌԱՆՋՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Գ.00.04 – «Կենսաքիմիա» և Գ.00.09 – «Մարդու և կենդանիների ֆիզիոլոգիա»
մասնագիտություններով կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան – 2010

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ГРИГОРЯН РУЗАННА ГАЙКОВНА

ОСОБЕННОСТИ КИСЛОТНОЙ ИНАКТИВАЦИИ И РЕАКТИВАЦИИ
ИЗОФЕРМЕНТОВ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ ЗЕМНОВОДНЫХ В ТЕЧЕНИЕ
ОНТОГЕНЕЗА (НА ПРИМЕРЕ ЛЯГУШКИ *Rana ridibunda*)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальностям
03.00.04 – “Биохимия” и 03.00.09 – “Физиология человека и животных”

Ереван – 2010

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավարներ՝ ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կենս.գիտ.դոկտոր,
պրոֆեսոր Մ. Ա. Դավթյան
կենս.գիտ.թեկնածու, դոցենտ Է. Խ. Բարսեղյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս.գիտ.դոկտոր, պրոֆեսոր Գ. Վ. Ապրիկյան
կենս.գիտ.թեկնածու Ռ. Ս. Բաբլոյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2010թ. հոկտեմբերի 1-ին, ժամը
14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող 051 մասնագիտական խորհրդի
նիստում (0025, Երևան, Ա.Մանուկյան 1, ԵԴՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի
գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2010թ. օգոստոսի 30-ին

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. դոկտոր., պրոֆեսոր

 Լ. Հ. Նավասարդյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научные руководители: Академик НАН РА, доктор биол.наук,
профессор М. А. Давтян
канд.биол.наук, доцент Э. Х. Барсегян

Официальные оппоненты: доктор биол.наук, профессор Г. В. Априкян
канд.биол.наук Р. С. Баблоян

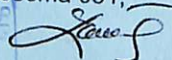
Ведущая организация: Государственный аграрный университет Армении

Защита диссертации состоится 1-го октября, 2010 года, в 14⁰⁰ часов на
заседании Специализированного совета 051 при Ереванском
государственном университете (0025, Ереван, А.Манукяна 1, ЕГУ,
биологический факультет)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского
государственного университета.

Автореферат разослан 30-го августа, 2010г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,
доктор биол. наук, профессор

 Ա. Ա. Նավասարդյան

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

Թեմայի արդիականությունը և հիմնավորումը: Ժամանակակից
կենսաբանության կարևոր խնդիրներից է նյութափոխանակության
կարգավորման մեխանիզմների պարզաբանումը: Այդ հարցում, անկասկած,
էական դեր են խաղում իզոֆերմենտները: Ներկայումս հետազոտողների
ուշադրության կենտրոնում է օրնիտինային ցիկլը, որը ուրեթեիկ
օրգանիզմներում ամոնիակի չեզոքացման հիմնական մեխանիզմն է: Այդ ցիկլի
առաջին չորս ֆերմենտները կատալիզում են արգինինի կենսասինթեզը, իսկ
վերջին ֆերմենտը՝ արգինազը՝ հիդրոլիզում է արգինինը միզանյութի և
օրնիտինի: Ուրեթեիկ օրգանիզմների մոտ միզանյութը հեռացվում է
օրգանիզմից մեզի կազմում: Արգինինի կենսասինթեզը ներկայացված է գրեթե
բոլոր օրգանիզմներում, իսկ արգինինի ճեղքումը միզանյութի և նրա
արտազատումը օրգանիզմից որպես ազոտային փոխանակության վերջնական
արգասիք տեղի է ունենում ուրեթեիկ օրգանիզմներում: Ուստի արգինազի
առկայությունը լայնորեն դիտարկվում էր որպես ուրեթեիզմի վկայություն:
Սակայն հետազոտվել արգինազը հայտնաբերվել է գրեթե բոլոր օրգանիզմներում
և հյուսվածքներում, այդ թվում՝ ուրիկոթեիկ և ամոնիոթեիկ [Бунятян, Давтян,
1965; 1967; Buniatian, Davtian, 1965; 1966; Давтян, 1967; Mora et al., 1965 և
այլն]:

Ակադեմիկոս Դավթյանը իր հետազոտությունների և գրականության
տվյալների վերլուծության հիման վրա հիմնավորեց բնության մեջ սկզբունքային
երկու տարբեր արգինազների գոյությունը. մեկը ուրեթեիկ արգինազն է, որը
ներկայացված է միայն ուրեթեիկ օրգանիզմների լյարդում և հանդիսանում է
միզանյութային (օրնիտինային) ցիկլի վերջին ֆերմենտը, երկրորդը՝ ոչ
ուրեթեիկ արգինազը, որը ունի շատ լայն տարածվածություն, ներկայացված է
բոլոր օրգանիզմներում (այդ թվում նաև ամոնիոթեիկ և ուրիկոթեիկ) և
հյուսվածքներում, չի մասնակցում ամոնիակի չեզոքացման մեխանիզմներում, այլ
ունի մետաբոլիկ հատուկ ֆունկցիաներ (մատակարարում է օրնիտինով
պրոլինի, պոլիամինների, գլուտամատի կենսասինթեզը, սահմանափակում է
արգինինի, գլուամինային միացությունների, այդ թվում՝ կրեատինի,

հիստոնների և ազոտի մոնոքսիդի սինթեզը) [Давтян, 1968; Давтян, 1968a; Давтян, 1968б; Давтян, Бунятян, 1970; Buniatian, Davtian, 1965; Davtian, 1979 և այլն]: Հետագայում ցույց տրվեց արգինազի այս երկու ձևերի որոշ ֆիզիկաքիմիական հատկությունների տարբերությունները (K_m , K_i , մոլեկուլային զանգված, ներքջային տեղակայում):

Ներկայումս վերջնականապես հաստատվել է երկու արգինազների գոյությունը, երբ հայտնաբերվել են մարդու լյարդի ՂՆԹ-ում այդ արգինազների առանձին գենետիկ լոկուսները, ընդ որում՝ նրանց միջև բացակայում են հոմոլոգիաները և անհնար են խաչաձև հիբրիդացումները և նրանք իմունոլոգիապես շատ հեռու են [Dizikes et al., 1986; Spector et al., 1985; 1994; Jencinson, Grigor, 1994; Grody et al, 1987; Grody et al., 1989]: Պարզված են նաև այդ գեների քրոմոսոմային տեղակայումները [Vockley et al., 1996]: Բայց դեռևս չի իրականացվել արգինազի երկու իզոֆերմենտների խորը բնութագրում նրանց սպիտակուցային կառուցվածքների, մասնավորապես՝ ենթամիավորների միավորման առանձնահատկությունների տեսակետից: Մեր առաջ խնդիր դրվեց՝ պարզել *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի տարբեր իզոֆերմենտների ենթամիավորային կազմը՝ օգտագործելով թթվային միջավայրում օլիգոմերային սպիտակուցների ենթամիավորների դիսոցվելու փաստը [Барсегян и др., 1996]: Որպես հետազոտության օբյեկտ ընտրվել է գորտը, քանի որ երկկենցաղները օնտոգենետիկ զարգացման ընթացքում ենթարկվում են կերպարանափոխության (մետամորֆոզի), և բազմաթիվ մորֆոլոգիական փոփոխություններին համապատասխան շատ ֆիզիոլոգիական ֆունկցիաներ և նրանց հիմքում ընկած մոլեկուլային մեխանիզմներ նույնպես ենթարկվում են խորը տեղաշարժերի: Հերեփուկները ամոնիոթելիկ օրգանիզմներ են, իսկ մետամորֆոզից հետո ջրային կենսակերպից ցամաքային պայմանների անցնելուն համապատասխան ամոնիոթելիզմը փոխարինվում է ուրեթելիզմի: Բայց ուշագրավը այն է, որ մինչև մետամորֆոզը շերեփուկների լյարդում հայտնաբերվում են օրնիտինային ցիկլի բոլոր հինգ ֆերմենտների ակտիվությունները: Տպավորությունն այն է, որ առաջին չորս ֆերմենտները կատալիզում են արգինինի կենսասինթեզը, բայց այն չի հիդրոլիզվում գոյություն

ունեցող արգինազով: Իսկ մետամորֆոզից հետո այդ արգինինը (էնդոգեն) գրոհվում է արգինազի կողմից, այլ կերպ ասած՝ արգինինը մատչելի է դառնում ֆերմենտի համար: Կարելի ասել, որ մետամորֆոզի հետևանքով արգինինի կենսասինթեզի չորս ֆերմենտները ինտեգրվում են արգինազի հետ, որը բերում է ֆիզիոլոգիական նոր ֆունկցիայի՝ ամոնիակի չեզոքացման ամոնիոթելիկ մեխանիզմին փոխարինող ուրեթելիկ մեխանիզմի ձևավորման: Ազոտային փոխանակության այս վերջնական արգասիքի առաջացման և նրա արտազատման տիպի փոփոխության մեխանիզմի վերաբերյալ բազմաթիվ տեսություններ են առաջադրված [Brown, Cohen, 1959; Mora et al., 1965; Palacios et al., 1969; Исаченко, Нечмауко, 1971 և այլն]: Բոլոր հեղինակները գտնում են, որ շերեփուկային շրջանում գոյություն ունեցող արգինազը մետամորֆոզի ընթացքում ենթարկվում է հետտրանսլյացիոն մոդիֆիկացման, որի արդյունքում հնարավորություն է ունենում ինտեգրվել արգինինի կենսասինթեզի ֆերմենտների հետ՝ գոյացնելով ամոնիակի չեզոքացման օրնիտինային (միզանյութային) ցիկլը: Սակայն տեսություններից և ոչ մեկը փորձնականորեն պատշաճ փաստարկված չէ:

Մ.Ա. Ղալթյանը առաջ քաշեց նոր տեսակետ, որի համաձայն ուրեթելիզմի ձևավորումը տեղի է ունենում ոչ թե գոյություն ունեցող արգինազի հետ արգինինի կենսասինթեզի ֆերմենտների ինտեգրումով, այլ ինդուկցման ենթարկված ուրեթելիկ արգինազով: Ցույց տրվեց, որ գորտերի շերեփուկային շրջանում հել-ֆիլտրացման եղանակով ֆրակցիոնացում իրականացնելիս հայտնաբերվում են մոլեկուլային զանգվածով իրարից տարբերվող արգինազի երեք իզոֆերմենտներ, որոնցից մեկը էլիմինացվում է շերեփուկային վաղ շրջանում, երկրորդը՝ մետամորֆոզի ընթացքում, իսկ երրորդը խիստ ինդուկցվում է մետամորֆոզի ընթացքում և մի շարք հատկություններով (շուրջ 120000 մոլեկուլային զանգված, ցիտոպլազմատիկ տեղակայում, K_m -ի ցածր արժեքներ, ոչ թիոլային բնույթ) նման է ուրեթելիկ օրգանիզմների լյարդի ուրեթելիկ արգինազին: Մինչդեռ շերեփուկային շրջանում գործող, բայց մետամորֆոզի ընթացքում էլիմինացվող իզոֆերմենտը թիոլային է, ունի K_m -ի բարձր արժեքներ, կապված է ենթաբջջային կառուցվածքների հետ, ունի ցածր

մուլեկուլային զանգված (45000) [Барсегян и др., 1975; 1977; 1977a; 1978; Барсегян, 1976; 1997; Арцрун и др., 1996; 2002]: Այս տվյալները խոսում են մետամորֆոզի ընթացքում ուրեթելիզմի ձևավորման մեխանիզմում ուրեթելիկ իզոֆերմենտի ինդուկցիայի կարևորության օգտին: Անկասկած, փաստերը կլինեն ավելի արժեքավոր, եթե դրանք արտահայտեն իզոէնզիմների կառուցվածքային փոփոխությունները:

Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները: Մեր առաջ խնդիր դրվեց ուսումնասիրել գորտի օնտոգենեզի ընթացքում լարդի արգինազի իզոֆերմենտների ենթամիավորային կառուցվածքի փոփոխությունները՝ օգտագործելով ֆերմենտների թթվային տրոհումը ենթամիավորների, այնուհետև՝ հիմնային միջավայրում նրանց վերամիավորումը օլիգոմերի: Այդ դեպքում հնարավոր կլինի պարզել, մետամորֆոզի ընթացքում մոլիֆիկացվում է գոյություն ունեցող արգինազը, թե՞ ինդուկցվում է նոր (ուրեթելիկ) ֆերմենտ: Դրված խնդիրների լուծման նպատակով հետազոտությունները իրականացվել են հետևյալ ուղղություններով:

1. Հետազոտվել են *Rana rudibunda* գորտի լարդի արգինազի թթվային ինակտիվացման օպտիմալ պայմանները (pH-ի, Mn իոնների, տևողության, բուֆերների մոլյարության ազդեցություն):
2. Հետազոտվել են նախապես թթվային ինակտիվացման ենթարկված արգինազի ռեակտիվացման օպտիմալ պայմանները
3. Հետազոտվել են թթվային ինակտիվացման օգնությամբ արգինազի իզոֆերմենտների ենթամիավորային կառուցվածքը և վերջինիս կրած փոփոխությունները մետամորֆոզի ընթացքում
4. Նույն հարցերը հետազոտվել են նաև իզոֆերմենտների ռեակտիվացման պրոցեսի համար

Աշխատանքի գիտական նորույթը և գործնական արժեքը:

Կատարելագործվել է թթվային ինակտիվացման և այնուհետև ռեակտիվացման մեթոդով օլիգոմերային սպիտակուցների, այդ թվում՝ նաև ֆերմենտների և իզոֆերմենտների ենթամիավորային կառուցվածքի ուսումնասիրությունը: Որոշվել են գորտերի լարդի իզոֆերմենտների ենթամիավորային կառուցվածքների

առանձնահատկությունները և նրանց կրած փոփոխությունները օրգանիզմների օնտոգենեզի, հատկապես՝ մետամորֆոզի ընթացքում: Ենթամիավորային կազմի պարզումը և ընդհանրապես դարձելի թթվային ինակտիվացման առանձնահատկությունների բացահայտումը հնարավորություն տվեց ավելի հստակ սահմանազատել ուրեթելիկ արգինազին ոչ ուրեթելիկ արգինազներից:

Կիրառված եղանակը, անկասկած, տեղ կգտնի էնզիմոլոգիայում՝ օլիգոմերային ֆերմենտների կառուցվածքային բնութագրման նպատակով:

Աշխատանքի փորձաքննությունը և հրապարակումները: Ատենախոսությունը փորձաքննության է ենթարկվել ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի կենսաքիմիայի ամբիոնի և գիտահետազոտական լաբորատորիայի ընդլայնված նիստում:

Ատենախոսության թեմայով հրատարակված են 5 հոդվածներ:

Ատենախոսության կառուցվածքը և ծավալը: Ատենախոսությունը կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից, հետազոտման օբյեկտի և մեթոդների նկարագրությունից, հետազոտությունների արդյունքներից, վերջաբանից, ընդհանուր եզրակացություններից, օգտագործված գրականության ցուցակից:

Աշխատանքը շարադրված է համակարգչային տեքստի 143 էջերում և պարունակում է 20 աղյուսակ:

ՀԵՏԱԶՈՏՄԱՆ ՕԲՅԵԿՏԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Հետազոտման օբյեկտ է հանդիսացել Հայաստանում տարածված *Rana ridibunda* (լճային) գորտը: Կենդանուց անջատված թարմ լարդը զգուշորեն չորացվել է ֆիլտրի թղթով, կշռվել և ենթարկվել է հոմոգենացման Պոտտեր-ելվեդժեմի տիպի ապակե հոմոգենիզատորով, +4°C-ում: Փորձերի ընթացքում օգտագործվել են լարդի 2,5-10%-ոց հոմոգենատներ՝ պատրաստված թորած ջրով:

Շերեփուկների զարգացման դասակարգումը իրականացվել է ըստ Տերենտևի [Терентьев, 1950]: Դասակարգումը հիմնված է շերեփուկների արտաքին մորֆոլոգիական բնութագրերի վրա: Զարգացման առաջին 19

փուլերը սաղմնային են: 30-րդ փուլի համարը համապատասխանում է իրական մետամորֆոզի սկզբին:

Արգինազային ակտիվություն որոշումը: Արգինազային ակտիվությունը որոշվել է Ուատների մեթոդով [Ratner, Pappas, 1960]՝ որոշակի փոփոխություններով: 1մլ ֆերմենտային պրեպարատը ինկուբացվել է 37°C-ում, 60 րոպեների ընթացքում, 0,05M գլի- NaOH բուֆերում ($\text{pH}=9,5$), L -արգինինի (50 մկմոլ) և MnCl_2 (5մկմոլ) առկայությամբ: Հետագայում որոշվել է սուբստրատի ձեղքման ընթացքում առաջացած միզանյութի քանակը Արչիբալդի մեթոդով [Archibald, 1956], որը մոդիֆիկացվել է Սուռի և Կաուֆմանի կողմից [Moore, Kaufman, 1970]: Ֆերմենտի ակտիվությունը արտահայտվել է առաջացած միզանյութի մկմոլերով՝ հաշված 1գ թարմ հյուսվածքում կամ 1մլ ֆերմենտի էքստրակտում:

Ապակե խցանով փորձանոթի մեջ լցվել է 1մլ ֆերմենտային պրեպարատ, 2,5մլ թթվային խառնուրդ (1մաս խիտ H_3PO_4 և 3 մաս խիտ H_2SO_4 , FeCl_3 և MnSO_4 աղերի առկայությամբ) և 0,25մլ 1,5-3%-ոց դիացետիլմոնոօքսիմի լուծույթ (ԴԱՄՕ): Փորձանոթները թափահարվել են, որից հետո նրանց պարունակությունը եռացվել է 45 րոպե: Սառեցված նմուշները գունաչափվել են $\text{C}\phi$ -26A-ով, 478 նմ ալիքի երկարության պայմաններում:

Ստացված արդյունքների վիճակագրական մշակումը իրականացվել է Ստյուդենտ-Ֆիշերի տարբերությունների և հավաստիության մեթոդի կիրառմամբ:

Էքստրակտի մասնակի մաքրումը հել-ֆիլտրացիայի եղանակով: Լյարդի էքստրակտները, ստացված 25000g 30 րոպե ցենտրիֆուգմամբ, անցկացվել են G-75, G-100, G-150, G-200 սեֆադեքսներով լցված աշտարակներով (Sephadex G-75, G-100, G-150, G-200, "Pharmacia", Sweden): Աշտարակի մեջ (1,5x100սմ) լցվել է 2,5-4մլ լյարդի հոմոգենատի էքստրակտ: Հավասարակշռումը և էլյուցիան կատարվել է թորած ջրով կամ 0,005M տրիս-HCl բուֆերով, pH 7.4: Էլյուցիայի արագությունը կազմել է 24 մլ/ժ:

Արգինազի և իզոլեզինների մոլեկուլային զանգվածների որոշումը: Մոլեկուլային զանգվածը որոշվել է հել-ֆիլտրացիայի մեթոդով (Sephadex G-200, "Pharmacia", Sweden): Աշտարակի չափսերը՝ 1,5x100սմ, էլյուցիայի ծավալը՝ 4մլ:

V_0 -ի (աշտարակի ազատ ծավալը) արժեքի որոշման համար օգտագործվել է 0,02M երկնագույն դեքստրանի լուծույթ (Blue dextran 2000, "Pharmacia", մոլեկուլային զանգվածը 2×10^6 Դ): Որպես մարկերային սպիտակուցներ օգտագործվել են սոյայի ունդերի ուրեազը (480000Դ), խմորասնկային ալկոհոլդեհիդրոգենազը (150000Դ), ձիու արյան հեմոգլոբինը (67000Դ) և պեպսինը (35000Դ):

Արգինազի ինակտիվացումը և ռեակտիվացումը: Արգինազի ինակտիվացումը իրականացվել է 0,05M, 0,1M, 0,3M գլիցին-HCl բուֆերում (pH 2 և pH 3.6): Նախապես ինակտիվացված արգինազի ռեակտիվացումը կատարվել է 0,05M, 0,2M, 0,5M-ոց գլիցին-NaOH բուֆերում (pH 9,5), 37°C պայմաններում, Mn իոնների (Mn^{2+}) առկայությամբ (25 մկմոլ՝ 1մլ նմուշում):

ՓՈՐՉՆԱԿԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ

Նախ և առաջ, մեր կողմից հետազոտվել են գորտի լյարդի արգինազի թթվային ինակտիվացման օպտիմալ պայմանները: Մասնավորապես, ցույց է տրվել, որ pH 3.6 պայմաններում ֆերմենտի ինակտիվացումը 1ժ և 2ժ ժամանակային միջակայքերում կազմում է 40% և 60% համապատասխանաբար: Թեև pH 2 պայմաններում ժամանակային նույն միջակայքերում ինակտիվացումը ավելի արդյունավետ է (84% և 89% համապատասխանաբար), բայց այդ պայմաններում երրորդային կառուցվածքների խախտման հնարավորությունը նույնպես մեծ է, ուստի հետագա փորձերում ինակտիվացումը իրականացվել է pH 3.6 պայմաններում: Գրականության տվյալների հետ համեմատելիս այս ցուցանիշով տարբեր օբյեկտների արգինազները զգալի տարբերվում են: Մեր փորձերի հիման վրա եզրակացվել է, որ օպտիմալ է ինակտիվացումը իրականացնել լյարդի 5%-ոց հոմոգենատում 0,05M գլի-HCl (pH 3.6) բուֆերում, 6 ժամվա ընթացքում:

Հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ նախապես ինակտիվացված լյարդի արգինազի ռեակտիվացման օպտիմալ պայմաններն են՝ ինկուբացիան 0,05M գլի-NaOH (pH 9.5) պայմաններում, Mn-ի իոնների առկայությամբ (25 մկմոլ 1մլ

ինկուբացման մնուշում), 22 ժամվա ընթացքում: 6 և 22 ժամվա ընթացքում ֆերմենտը ռեակտիվացվում է 33% և 48% համապատասխանաբար: Այստեղ էլ նշենք, որ մեր կողմից ռեակտիվացման արդյունավետության աստիճանի վերաբերյալ ստացված տվյալները, հատկապես՝ ռեակտիվացման տևողության տեսակետից, զգալի տարբերվում են այլ օրգանիզմների արգինազների համար ստացված տվյալներից [Hosoyama, 1972; Bascur, Cabello, 1966], որը խոսում է արգինազների միջտեսակային զգալի տարբերությունների մասին:

Հայտնի է, որ թթվային ինակտիվացման պատճառը ֆերմենտի տրոհումն է ենթամիավորների [Hosoyama, 1972, Исаченков, Нестанко, 1975], իսկ ռեակտիվացման պատճառը ենթամիավորների ասոցիացումն է՝ օլիգոմերային կառուցվածքի վերականգնմամբ: Ցույց է տրված *Rana terrestris* գորտի լյարդի արգինազի տրոհումը ենթամիավորների pH 4.0 և ռեակտիվացումը pH 9,5 պայմաններում [Исаченков, Нестанко, 1971]: Նման արդյունքներ են ստացվել նաև *Rana terrestris* գորտի վրա արված էքսպերիմենտներում: pH 2 պայմաններում ինակտիվացված առնետի լյարդի արգինազը pH 7 պայմաններում Mn^{++} իոնների ավելացումից հետո վերականգնում է ակտիվությունը [Hosoyama, 1972]: Ճագարի լյարդի արգինազի թթվային ինակտիվացումից հետո pH 7-8 պայմաններում Mn իոնների առկայությամբ վերականգնվում է ֆերմենտի ակտիվությունը [Vielle-Breitburd, Orth, 1972]: Խիստ թերմոֆիլ *Bacillus caldovelox*-ի արգինազը pH 2 պայմաններում ենթամիավորների դիսոցումից հետո pH 9 պայմաններում ռեասոցացվում է, և տարօրինակ է, որ այդ դեպքում Mn իոնների կարիք չի զգացվում [Patchett et al., 1991]:

Մեր կողմից մանրամասնությամբ ուսումնասիրվել է *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի մոլեկուլային զանգվածի կրած փոփոխությունները թթվային ինակտիվացման և ապա ռեակտիվացման ընթացքում՝ խնդիր ունենալով պարզել ֆերմենտի ինակտիվացման և ռեակտիվացման պրոցեսում համապատասխանաբար նրա հնարավոր տրոհումը ենթամիավորների և ապա վերամիավորումը՝ օլիգոմերային ֆերմենտի կառուցվածքի ձևով: Այդ նպատակով հել-ֆիլտրացման եղանակով (G-200 սեֆադեքսով)

ֆրակցիոնացվեց գորտի լյարդի էքստրակտը և որոշվեց յուրաքանչյուր ֆրակցիայի մոլեկուլային զանգվածը և արգինազային ակտիվությունը: Արդյունքները ցույց տվեցին, որ էքստրակտը ֆրակցիոնացման ենթարկելիս արգինազը ֆիլտրվում է 1 զագաթի ձևով, որի մոլեկուլային զանգվածը 124000 է: 6 ժ թթվային ինակտիվացման ենթարկելուց հետո ֆերմենտը հանդես է գալիս երեք զագաթներով. առաջինը՝ 124000, երկրորդը՝ 82230, իսկ փոքր զագաթը՝ 40100 մոլեկուլային զանգվածով: Անկասկած, առաջին զագաթը դեռևս դիսոցման չենթարկված մատիվ ֆերմենտն է, երկրորդը դիմերն է, իսկ երրորդը մոնոմերն է: Այս տվյալները հստակ խոսում են հետազոտվող արգինազի տրիմերային կառուցվածքի մասին:

Ինակտիվացման ժամկետը մինչև 22 ժ երկարացնելիս ֆերմենտատիվ ակտիվության անկմանը զուգահեռ պակասում է 124000 մոլեկուլային զանգվածով ֆրակցիայի ակտիվությունը, պակաս չափով ընկնում է 82230 և զգալի՝ 40100 մոլեկուլային զանգվածով ֆրակցիաների ակտիվությունը: Սա խոսում է այն մասին, որ թթվային ինակտիվացման ընթացքում աստիճանաբար ֆերմենտը տրոհվում է դիմերների, մոնոմերների, և ամենացածր ակտիվություն ունեն մոնոմերները: Ամենայն հավանականությամբ, տրիմերները նախ և առաջ տրոհվում են էկվիմոլյար քանակությամբ դիմերների և մոնոմերների, իսկ այնուհետև դիմերները տրոհվում են մոնոմերների:

Ինչ վերաբերվում է մեր փորձերի հիման վրա արված եզրակացությանը *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի տրիմերային կառուցվածքի վերաբերյալ, անհրաժեշտ է նշել, որ բնության մեջ տարածված են արգինազի տետրամերային (*Larus atricilla* որորի լյարդ [Reddy, Campbell, 1970], առնետի երիկամ [Baranczuk-Kuzma et al., 1976; Gasiorowska et al., 1970; Reddy et al., 1975]) և հատկապես տրիմերային կառուցվածքները (*Saccaromyces cerevisiae* [Chan, Cossins, 1973; Davis, 1986; Duong et al., 1986; Green et al., 1990; 1991; Sumrada, Cooper, 1984], հորթի լյարդ [Brusdeilins e.a., 1985; Harell, Sokolovsky, 1972; Hirsh-Kolb et al., 1970; Muszunska et al., 1970; Turkoglu, Ozer, 1991], խոզի լյարդ [Brusdeilins et al., 1985; Hirsh-Kolb et al., 1970; Porembaska, 1973], ճագարի լյարդ [Hirsh-Kolb et al., 1970; Vielle-Breitburd,

Orth, 1972], շան լյարդ [Brusdeilins et al., 1985; Hirsh-Kolb et al., 1970]), մարդու լյարդ [Bascur et al., 1966; Borcic, Straus, 1976; Cabello et al., 1961; Carvajal et al., 1977; 1978; Brusdeilins et al., 1983; Grol, Schumacher, 1983; Haraguchi et al., 1987; Ikemoto et al., 1990]): Գոյություն ունեն նաև հեքսամերային, ինչպես նաև՝ ավելի շատ ենթամիավորներով արգինազներ՝ բակտերիաներ [Schrell et al., 1989; Patchett et al., 1991; Moreno-Vivian et al., 1992], *Iris*-ի սոխուկ [Boutin, 1982], *Neurospora crassa* [Borkovich, Weiss, 1987], խիստ թերմոֆիլ *Bacillus caldovelox* [Patchett et al., 1991], խխունջի հեպատոպանկրեաս [Reddy, Campbell, 1969], պլանարիայի մարմին [Reddy, Campbell, 1970] և ցածր մոլեկուլային զանգվածով տեսակներ՝ խեցգետնի կրծքապատ [Hartenstein, 1971], *Concholepas concholepas* ծովային փորոտանու խռիկներ [Carvajal et al., 1984]: Պետք է հատուկ նշել, որ արգինազի ենթամիավորային կառուցվածքների բազմազանություն նկատվում է նաև երկկենցաղների մոտ: Այսպես, *Rana esculenta* գորտի լյարդում պարունակվում է արգինազ, որի մոլեկուլային զանգվածը 160000 է, իսկ շերեփուկների մոտ՝ 80000 [Porembaska, 1973], *Rana tigerina* գորտի մոտ հանդիպում են արգինազներ 26000-94000 մոլեկուլային զանգվածով [Venkatakrishnan, Reddy, 1993], *Xenopus laevis* գորտերի լյարդում ներկայացված է 37000 մոլեկուլային զանգվածով ունեցող ենթամիավորներով արգինազ [Xu et al., 1993], իսկ արտալյարդային հյուսվածքներում պարունակվում են 40000 մոլեկուլային զանգվածով ենթամիավորներից կազմված երեք արգինազներ, որոնք կլոնավորվել են, և ապացուցվել է նրանց α - β -ում չկոդավորվող ռեզիդուների տարբերությունները [Patterson et al., 1994]:

Մենք մանրամասնությամբ ուսումնասիրել ենք *Rana ridibunda* գորտի լյարդի նախապես թթվային ինակտիվացման ենթարկված արգինազի ռեակտիվացման ընթացքում արգինազային ակտիվությամբ օժտված ֆրակցիաների մոլեկուլային զանգվածների կրած փոփոխությունները:

Այդ նպատակով, նախապես թթվային ինակտիվացման ենթարկված լյարդի էքստրակտները ենթարկվել են ռեակտիվացման pH 9.5 պայմաններում, Mn-ի իոնների առկայությամբ, 0.05M զլի-NaOH բուֆերում և այնուհետև ենթարկվել

ֆրակցիոնացման G-200 սեֆադեքսի օգտագործմամբ: Ստացված տվյալները հստակ ցույց են տալիս, որ 6 ժ ռեակտիվացման ընթացքում հանդես են գալիս 117000, 165000, 240000, 317867 մոլեկուլային զանգվածով արգինազային ֆրակցիաներ: Եթե ֆերմենտի ենթամիավորի մոլեկուլային զանգվածը 42000 է, նշանակում է ֆերմենտի ռեակտիվացման ընթացքում ֆերմենտի նատիվ տրիմերից (120000) բացի ձևավորվում են օլիգոմերային կառուցվածքներ ավելի մեծ թվով ենթամիավորների միավորման հետևանքով (տետրամերներ, հեքսամերներ, օքտամերներ): Կարող ենք եզրակացնել, որ ռեակտիվացման պրոցեսը ընթանում է սխալներով, որի պատճառով, ռեակտիվացումը ընթանում է խիստ ցածր արդյունավետությամբ: Ռեակտիվացման օպտիմալ պայմաններում, անգամ ռեակտիվացման տևողությունը երկարացնելով մինչև 22ժ, ռեակտիվացումը հասնում է միայն մինչև 48.3%: Նման ցածր արդյունավետության պատճառը անկասկած ենթամիավորների փաթեթավորման սխալներն են, որոնք բերում են պակաս ակտիվ և, հնարավոր է, ինակտիվ օլիգոմերային կառուցվածքների առաջացման: Բնականաբար, կարևորը այդ սխալների պատճառների պարզաբանումն է: Կարելի է ենթադրել, որ ինչպես ցույց են տվել սպեկտրալ և շրջանային դիքրոիզմի անալիզի տվյալները, ֆերմենտի թթվային ինակտիվացումը ընթանում է ոչ միայն օլիգոմերային կառուցվածքի դիսոցումով ենթամիավորների, այլ նաև՝ երրորդային և անգամ երկրորդային կառուցվածքի փոփոխություններով [Hosoyama, 1972; 1982]: Ցավոք սրտի, պարզ չէ այդ փոփոխությունների բնույթը:

Մեր լաբորատորիայի նախկին տվյալների համաձայն, pH 3.6 պայմաններում ինակտիվացնելիս ֆերմենտը ձեռք է բերում ՊՔՄԲ-ով արգելակվելու հատկություն, որը բացակայում է նատիվ ֆերմենտում: Ամենայն հավանականությամբ, թթվային պայմաններում ենթամիավորներում տեղի ունեցող փոփոխությունները բերում են լրացուցիչ ազատ SH-խմբերի առաջացման, որոնք զգայուն են ՊՔՄԲ-ի նկատմամբ [Барсегян, 1997]: Պետք է ենթադրել, որ թթվային ինակտիվացման ենթարկված ֆերմենտը կրում է բավական խորը փոփոխություններ և այդ թվում՝ ազատ SH-խմբերի շատացում, որոնք կարող են մասնակցել pH 9.5-ում ռեակտիվացման ընթացքում նոր

դիսուլֆիդային կապերի առաջացմանը: Այլ կերպ ասած, մեր փորձերում ռեակտիվացման ընթացքում ֆոլդինգի սխեմների պատճառներում պետք է նկատի ունենալ նաև նշված հանգամանքը:

Ռեակտիվացման ցածր արդյունավետության հաջորդ եզրակացությունը այն է, որ թթվային ինակտիվացման և ռեակտիվացման փորձերում խիստ նոսրանում են սպիտակուցների ճիշտ փաթեթավորումը ուղղորդող հատուկ սպիտակուցային կառուցվածքները՝ շապերոնները և շապերոնինները: Գոյություն ունեն բազմաթիվ շապերոններ, որոնք շապերոնինների օգնությամբ ապահովում են պոլիպեպտիդային շղթաների ճիշտ փաթեթավորումը նրանց կենսասինթեզի ընթացքում: Շապերոնները և շապերոնինները պահպանում են պեպտիդներին էքստրենալ պայմաններում փաթեթավորման խախտումներից, ուղղորդում են նաև վնասված պեպտիդներին ճիշտ վերափաթեթավորվելու ուղղությամբ: Առավել ևս, ցույց է տրվել, որ *Rana catesbeiana* գորտերի մետամորֆոզի ժամանակ էքսպրեսիայի են ենթարկվում բազմաթիվ գեներ, այդ թվում՝ ջերմային շոկի (Hsp 30) գենը [Helbing et al., 1996]: Հեղինակների կարծիքով, ջերմային ստրեսի ժամանակ ինդուցվում են այնպիսի շապերոններ և շապերոնիններ, որոնք ապահովում են կենսագործունեության համար անհրաժեշտ սպիտակուցների m-ՌՆԹ-ների ընտրողական պրոտեկցիան [Helbing, Atkinson., 1994]: Ավելի մանրամասն շապերոնների և շապերոնինների մասին շարադրված է փորձնական մասի երրորդ պարագրաֆում:

Մեր փորձերում ոչ արդյունավետ ռեակտիվացման պատճառների մեջ շապերոնների հնարավոր նոսրացումը պարզելու համար ռեակտիվացման ընթացքում ավելացվել են արգինազային ակտիվություն չպարունակող սպիտակուցային ֆրակցիաներ: Այդպիսիք են եղել G-200 սեֆադեքսով ֆրակցիոնացումից հետո ստացված 24-32 ֆրակցիաները, որոնք պարունակել են 100000-61020 մոլեկուլային զանգված ունեցող սպիտակուցային ֆրակցիաներ: Անսպասելիորեն ռեակտիվացման ամենաբարձր արդյունավետություն է պայմանավորել արգինազ չպարունակող սպիտակուցային գումարային ֆրակցիան (72.4%) (առանց այդ ֆրակցիայի՝ 46.5%): Սպասածին հակառակ, արգինազ չպարունակող առանձին

ֆրակցիաների արդյունավետությունը եղել է շատ ցածր: Ամենաարդյունավետը եղել է 24-րդ ֆրակցիան, որի ժամանակ ռեակտիվացումը կազմել է ընդամենը 48% և ամենապակաս արդյունավետություն ունեցել է 28-րդ ֆրակցիան (17.3%):

Աղյուսակ 1.

Rana ridibunda գորտի լյարդի էքստրակտի 6 ժամ նախապես թթվային ինակտիվացման ենթարկված արգինազի ռեակտիվացման վրա 23-32 գումարային ֆրակցիաների խառնուրդի ազդեցությունը ($n=6$, $M \pm m$, $P < 0.005$)

Ռեակտիվացման տևողությունը	ռեակտիվացման պայմաններ	Արգինազի ակտիվությունը մկմոլ/գ	
		ակտիվությունը 1գ թ.հյուսվածքի	ռեակտ. % ելակետ. համեմատ
22 ժամ	Ելակետային ակտիվություն	13620 ± 509	—
	ինակտիվացում 6 ժ.	1792 ± 81	—
	-Mn ⁺⁺	4788 ± 255	35.1%
	+Mn ⁺⁺	5859 ± 579	43%
72 ժամ	-Mn ⁺⁺ +23-32-րդ սպիտակուցային ֆրակցիա	6635 ± 181	48.7%
	+Mn ⁺⁺ +23-32-րդ սպիտակուցային ֆրակցիա	8345 ± 702	61.3%
	-Mn ⁺⁺	5180 ± 323	38%
	+Mn ⁺⁺	6328 ± 436	46.5%
	-Mn ⁺⁺ +23-32 րդ սպիտակուցային ֆրակցիա	8961 ± 577	65.8%
	+Mn ⁺⁺ +23-32 րդ սպիտակուցային ֆրակցիա	9855 ± 352	72.4%

Ինչպե՞ս բացատրել սպիտակուցների գումարային ֆրակցիաների առավել արդյունավետությունը առանձին ֆրակցիաների նկատմամբ: Ամենայն հավանականությամբ, պատճառն այն է, որ ֆոլդինգի պրոցեսում, շապերոններից բացի, մասնակցում են նաև շապերոնինները, որոնք ունեն տարբեր մոլեկուլային զանգվածներ և, հետևաբար, մեր փորձերում նրանք պետք է գտնվեն տարբեր ֆրակցիաներում: Օրինակ, ցույց է տրված, որ տարբեր ֆերմենտների ֆոլդինգի պրոցեսում մասնակցող Hsp 70 շապերոնը և Hsp 60 շապերոնինը ունեն տարբեր մոլեկուլային զանգվածներ, և բնականաբար պետք է գտնվեն հեյ-ֆիլտրացմամբ բաժանված տարբեր ֆրակցիաներում [Hartman et al., 1993]:

Մեր փորձերում արգինազ չպարունակող ֆրակցիաների խառնուրդը նպաստում է ֆոլդինգի արդյունավետությանը, քանի որ այդ խառնուրդում գտնվում է արգինազի համար սպեցիֆիկ ինչպես շապերոնը, այնպես էլ՝ շապերոնինը: Բայց, այնուամենայնիվ, արդյունավետությունը բարձր չէ շապերոնների և շապերոնինների խիստ նոսրացված լինելու պատճառով, իսկ արգինազ չպարունակող առանձին ֆրակցիաներում սպիտակուցի խտությունը բարձր է, բայց և նրանցից ոչ մեկում միաժամանակ շապերոններ և շապերոնիններ չեն կարող պարունակվել՝ նրանց մոլեկուլային զանգվածների տարբերության պատճառով, և, հետևաբար, ռեակտիվացման վրա ազդեցության արդյունավետությունը մնում է շատ ցածր: Հետագայում նախատեսվում է ուսումնասիրել արգինազի ֆոլդինգին մասնակցող շապերոնների և շապերոնինների հատկությունները, այդ թվում՝ նրանց մոլեկուլային զանգվածները:

Հատուկ ուսումնասիրվել է *Rana ridibunda* շերեփուկների լյարդի արգինազի իզոֆերմենտների թթվային ինակտիվացման և այնուհետև ռեակտիվացման առանձնահատկությունները:

Մեր ամբիոնի նախկին տվյալների համաձայն, գորտերի լյարդի արգինազի թթվային ինակտիվացման ժամանակ առաջացող ենթամիավորները զգայուն են ՊԶՄԲ-ի նկատմամբ, այսինքն՝ թիոլային են: Մինչև մետամորֆոզը ֆերմենտը նույնպես թիոլային է, իսկ հետո կորցնում է զգայունությունը ռեագենտի նկատմամբ [Арцруни и др., 1996]: ՊԶՄԲ-ն կանխում է նախապես

ինակտիվացված լյարդի արգինազի ռեակտիվացումը [Барсегян, 1997; Исаченков и Нестанко, 1971]:

Աղյուսակ 2.

Rana ridibunda հասուն գորտերի և շերեփուկների (28-29) լյարդի արգինազի թթվային ինակտիվացման պրոցեսի համեմատական ուսումնասիրությունը ($n=6$, $M \pm m$, $P < 0.005$)

Արգինազի ակտիվությունը, մկմոլ/գ						
Գորտի լյարդի արգինազ			Շերեփուկների լյարդի արգինազ			
			Իզոֆերմենտ I		Իզոֆերմենտ III	
	Ֆերմենտի ակտիվություն	ինակտիվ. %	Ֆերմենտի ակտիվություն	ինակտիվ. %	Ֆերմենտի ակտիվություն	ինակտիվ. %
Ելակետային ակտիվություն	30883±409	-	4307±186	-	3152±165	-
30 ր	-	-	2510±135	42%	1514±120	52%
1 ժամ	17878±579	42.1%	2198±155	49%	1080±94	65.7%
2 ժամ	12248±141	60.3%	1593±101	63%	653±74	79.3%
3 ժամ	-	-	819±47	81%	346±37	89%
4 ժամ	8598±263	72.2%	498±51	88.4%	0	0%
5 ժամ	-	-	84±14	98%	0	0%
6 ժամ	5188±187	83.2%	0	0%	0	0%

Աղյուսակ 2-ի տվյալներից երևում է, որ շերեփուկների լյարդի երկու իզոֆերմենտները (I և III) ենթարկվում են թթվային ինակտիվացման 3-5 ժամում՝ հասնելով իրենց մաքսիմումին: Իզոֆերմենտ I-ը, ինչպես հասուն գորտերի լյարդում, այնպես էլ՝ շերեփուկների լյարդում զարգացման վերջին էտապներում

(28-29 փուլերում), ինակտիվացման պրոցեսի տևողության և արդյունավետության տեսակետից խիստ նման են:

Հասուն գորտերի I իզոֆերմենտի ելակետային ակտիվությունը շուրջ 12 անգամ ավելի բարձր է նույն իզոֆերմենտի շերտավային շրջանի ակտիվությունից, որը արդյունք է մետամորֆոզի շրջանում կտրուկ ինդուկցիայի:

Աղյուսակ 3.

Rana ridibunda շերտավային (28-29) լարդի էքստրակտի 3 ժամ նախապես թթվային ինակտիվացման ենթարկված արգինազ I-ի ռեակտիվացումը ($n=6$, $M \pm m$, $P < 0.005$)

Ռեակտիվացման պայմաններ		Արգինազի ակտիվությունը մկմոլ/գ	
		ակտիվությունը 1գ թ.հյուսվածքում	ռեակտ. % ելակետ. համեմատ
Ռեակտիվացման տևողությունը	Ելակետային ակտիվություն	4307±186	—
	ինակտիվացում 3 ժամ	819±135	—
	-Mn ⁺⁺	1338±116	31%
	+Mn ⁺⁺	1769±83	41%
	-Mn ⁺⁺	1941±72	45%
	+սպիտակուցային ֆրակցիա +Mn ⁺⁺	2715±92	63%
22 ժամ			
	-Mn ⁺⁺		
	+Mn ⁺⁺		
	-Mn ⁺⁺		
	+Mn ⁺⁺		
	-Mn ⁺⁺		
	+Mn ⁺⁺		

Աղյուսակ 3-ի տվյալներից երևում է, որ 28-29 փուլերի շերտավային ռեակտիվացման ենթարկված լարդի արգինազը ռեակտիվացման ենթարկելիս Mn-ի իոնների և արգինազային ակտիվություն չպարունակող սպիտակուցային ֆրակցիաների խառնուրդի առկայությամբ, 72 ժամվա ընթացքում ռեակտիվացվում է 63%-ով, մինչդեռ նույն պայմաններում հասուն գորտի լարդի արգինազը ռեակտիվացվում է 72.4%-ով:

Շերտավային լարդի III իզոֆերմենտը 3 ժամվա ընթացքում նախապես ինակտիվացման ենթարկելուց հետո (89%), այնուհետև ռեակտիվացման բացարձակապես չի ենթարկվում (աղյուսակ 4):

Անհրաժեշտ է պարզել, արդյո՞ք III իզոֆերմենտի թթվային ինակտիվացումը պայմանավորված է ֆերմենտի տրոհմամբ ենթամիավորների, թե ոչ:

Ինչպես տեսանք աղյուսակ 2-ի տվյալներից, այս փուլում, որը շերտավային զարգացման վերջին շրջանն է, արգինազի առաջին իզոֆերմենտը ինչպես շերտավային մոտ (28-29 փուլ), այնպես էլ հասուն գորտերի մոտ թթվային ինակտիվացման և այնուհետև ռեակտիվացման տեսակետից մոտ են:

Աղյուսակ 4.

Rana ridibunda շերտավային (28-29) լարդի էքստրակտի 3 ժամ նախապես թթվային ինակտիվացման ենթարկված արգինազ III-ի ռեակտիվացումը ($n=6$, $M \pm m$, $P < 0.005$)

Ռեակտիվացման պայմաններ		Արգինազի ակտիվությունը մկմոլ/գ	
		ակտիվությունը 1գ թ.հյուսվածքում	ռեակտիվացման %
Ռեակտիվացման տևողությունը	Ելակետային ակտիվություն	3152±165	—
	ինակտիվացում 3 ժամ	346±37	—
	-Mn ⁺⁺	346±37	0%
	+Mn ⁺⁺	346±37	0%
	-Mn ⁺⁺	346±37	0%
	+Mn ⁺⁺	346±37	0%
22 ժամ			
	-Mn ⁺⁺		
	+Mn ⁺⁺		
	-Mn ⁺⁺		
	+Mn ⁺⁺		
	-Mn ⁺⁺		
	+Mn ⁺⁺		

Աղյուսակ 5.

Rana ridibunda գորտի շերտփուկների ինակտիվացված և ռեակտիվացված արգինազների մոլեկուլային զանգվածները (7)

Ռեակտիվացման պայմաններ	իզոֆերմենտ AI	իզոֆերմենտ AIII
Ելակետային ֆերմենտ	124000	45000
3ժ ինակտիվացված	124000, 81385, 42300	45000
22ժ ռեակտիվացված, +Mn ⁺⁺	317867, 252396, 119133	45000
22ժ ռեակտիվացված, +Mn ⁺⁺ , + սպիտ. ֆրակցիա	124000, 162900	45000

Աղյուսակ 5-ի տվյալներից երևում է, որ շերտփուկների լյարդի արգինազի առաջին իզոֆերմենտը, հասուն գորտերի լյարդի արգինազի նման, թթվային ինակտիվացման ենթարկելիս տրոհվում է 42300, 81385 մոլեկուլային զանգված ունեցող սպիտակուցների, պահպանվում է նաև 124000 մոլեկուլային զանգված ունեցող ելակետային ֆերմենտի որոշ մաս:

Այլ կերպ ասած՝ մեր տվյալների համաձայն արգինազի առաջին իզոնդիմը ինչպես շերտփուկների մոտ, այնպես էլ հասուն գորտերի լյարդում իրենից ներկայացնում է տրիմերային սպիտակուց, որի մոնոմերը ունի շուրջ 42000, դիմերը՝ 81000 և օլիգոմերը (տրիմերը)՝ 124000 մոլեկուլային զանգված: Իսկ ռեակտիվացման (22ժ) արդյունքում տրիմերից բացի հանդես են գալիս 129000, 252396, 317867 մոլեկուլային զանգվածներով սպիտակուցային ֆրակցիաներ, որոնք, ամենայն հավանականությամբ, հանդիսանում են ֆերմենտի մոնոմերների ասոցացման հետևանքում առաջացած տրիմերը, հեքսամերը և օքտամերը համապատասխանաբար: Իսկ ռեակտիվացումը Mn-ի իոնների և սպիտակուցային գունարային ֆրակցիաների (39-52) առկայությամբ իրականացնելիս հայտնաբերվում են երկու սպիտակուցային ֆրակցիաներ 124000 և 162900 մոլեկուլային զանգվածներով, որոնք համապատասխանում են ֆերմենտի տրիմերային և տետրամերային կառուցվածքներին: Այս տվյալները խոսում են այն մասին, որ սպիտակուցային գունարային ֆրակցիաների

ազդեցության տակ արգինազի ֆոլդինգը զգալիորեն շտկվում է, այլևս չեն գոյանում հեքսամերային և օքտամերային տարբերակներ, և հայտնաբերվում են միայն տետրամերային և հիմնականում՝ տրիմերային կառուցվածքներ: Տրիմերայինից բացի, տետրամերային կառուցվածքների գոյացումը հավանաբար պայմանավորված է մեր փորձերում շապերոնների և շապերոնինների դեռևս նոսրացած վիճակով: Հետագայում նախատեսվում է բացահայտել ո՞ր սպիտակուցային ֆրակցիաներում են պարունակվում շապերոնները և շապերոնինները, այնուհետև՝ միավորել այդ ֆրակցիաները և ապա գնահատել նրանց արդյունավետությունը ֆերմենտի ռեակտիվացման պրոցեսում:

Ինչ վերաբերվում է շերտփուկային շրջանում գործող և մետամորֆոզի ընթացքում էլիմինացիայի ենթարկվող արգինազ III իզոֆերմենտին, ապա աղյուսակ 5-ում բերված տվյալներից պարզ երևում է, որ ֆերմենտի թթվային ինակտիվացման ժամանակ այն չի տրոհվում ենթամիավորների, քանի որ ինքը մոնոմերային սպիտակուց է 45000 մոլեկուլային զանգվածով: Միանգամայն հասկանալի է, որ ռեակտիվացման ժամանակ մոնոմերների միավորում տեղի չի ունենում: Ապա հարց է առաջանում ինչպե՞ս է իրականանում իզոֆերմենտ III-ի ինակտիվացումը:

Ամենայն հավանականությամբ, շերտփուկների III իզոֆերմենտի թթվային ինակտիվացման ժամանակ առաջ են գալիս իզոֆերմենտի ոչ միայն չորրորդային, այլ նաև՝ երրորդային և անգամ՝ երկրորդային կառուցվածքի փոփոխություններ, ինչպես այդ ցույց էր տրվել թթվային մշակման ենթարկված առնետների լյարդի արգինազի համար շրջանային դիքրոիզմի մեթոդով [Hosoyama, 1981]: Հիմնական եզրակացությունը այն է, որ կիրառելով թթվային ինակտիվացման և, այնուհետև, հիմնային պայմաններում Mn-ի իոններով ռեակտիվացման եղանակը հնարավոր եղավ ապացուցել երկկենցաղների լյարդում գոյություն ունեցող արգինազային իզոֆերմենտների ենթամիավորային կառուցվածքների էական տարբերությունները: Շերտփուկների լյարդում գործող իզոֆերմենտներից մեկը, որը էլիմինացվում է մետամորֆոզի ընթացքում, տարբերվում է արգինազի I իզոֆերմենտից (AI), որը ինդուկցվում է

մետամորֆոզի ժամանակ և պահպանվում է հասուն գորտի ողջ կյանքի ընթացքում: Անկասկած վերջինս ուրեթելիկ է, ունի այլ ծագման ուրեթելիկ արգինազների հատկությունները (K_m , K_i , մոլեկուլային զանգված, ներքջային լոկալիզացիա, հորմոնալ ինդուկցիա և այլն): Այս տվյալները լրիվ համապատասխանում են ուրեթելիզմի ձևավորման մեխանիզմում ուրեթելիկ արգինազի ինդուկցիայի վճռորոշ լինելու մասին կոնցեպցիային: Ստացված տվյալները հնարավորություն են տալիս ավելի հստակ սահմանազատել արգինազի ուրեթելիկ և ոչ ուրեթելիկ իզոէնզիմները, քանի որ խոսքը վերաբերում է ֆերմենտների կառուցվածքային առանձնահատկություններին:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Որոշվել են օլիգոմերային ֆերմենտների (*Rana ridibunda* գորտերի լյարդի արգինազի իզոֆերմենտների) թթվային ինակտիվացման և ապա pH 9.5 պայմաններում ռեակտիվացման օպտիմալ պայմանները:
2. Որոշվել է իզոֆերմենտների ենթամիավորային կազմը: Գորտի մետամորֆոզի ընթացքում կտրուկ ինդուկցման ենթարկվող ուրեթելիկ արգինազը ունի տրիմերային կառուցվածք՝ կազմված շուրջ 40000 մոլեկուլային զանգված ունեցող երեք ենթամիավորներից:
3. Շերեփուկների լյարդում գոյություն ունեցող և մետամորֆոզի ընթացքում էլիմինացվող իզոէնզիմը մոնոմեր է, որի ենթամիավորի մոլեկուլային զանգվածը 45000 է:
4. Վերոհիշյալ երկու իզոֆերմենտները ենթարկվում են թթվային ինակտիվացման և ուրեթելիկ իզոֆերմենտը միաժամանակ տրոհվում է ենթամիավորների:
5. Նախապես թթվային ինակտիվացման ենթարկված ուրեթելիկ իզոէնզիմը pH 9.5 պայմաններում Mn իոնների ներկայությամբ ինկուբացնելիս որոշակիորեն (41%) ռեակտիվանում է, իսկ ուրիկոթելիկ մոնոմերային իզոֆերմենտը չի ռեակտիվանում:
6. Ուրեթելիկ իզոֆերմենտի ռեակտիվացման ժամանակ ենթամիավորները միավորվում են ոչ միայն տրիմերի ձևով, այլ նաև գոյանում են

տետրամերներ, հեքսամերներ և նույնիսկ օկտամերներ, այսինքն՝ սխալ են միավորվում:

7. Նման սխալները արդյունք են փորձերի ընթացքում սպիտակուցների փաթեթավորումը ուղղորդող հատուկ սպիտակուցների՝ շապերոնների և շապերոնինների խիստ նոսրացման:

Ատենախոսության թեմայով հրատարակված աշխատանքների ցուցակ

1. Ռ.Հ. Գրիգորյան, Է.Խ. Բարսեղյան, Ս.Ա. Ղալբյան - *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի դարձելի ինակտիվացիայի պրոցեսի ուսումնասիրումը ցածր pH-ի պայմաններում // Գիտություն և Տեխնիկա, 2005, 4 (500), 22-25 էջ:
2. Է.Խ. Բարսեղյան, Ռ.Հ. Գրիգորյան, Ս.Ա. Ղալբյան - *Rana ridibunda* գորտի լյարդի արգինազի ցածր pH-ի պայմաններում ինակտիվացման և pH 9.5 պայմաններում ռեակտիվացման պրոցեսի ուսումնասիրությունը // Информационные Технологии и Управление, 2005, N 3, стр.118-125.
3. М.А. Давтян, С.А. Карапетян, М.А. Хачатрян, Э.Х. Барсегян, Н.А. Арцруни, Р.Г. Григорян - Механизмы становления уреотелизма в эволюции и онтогенезе организмов // Информационные Технологии и Управление, 2007, N 10, стр. 147-161.
4. М.А. Давтян, А.А. Навасардян, Э.Х. Барсегян, С.В. Марутян, Р.Г. Григорян - Белковые фракции организмов при экстремальных состояниях // Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии, III международный симпозиум под эгидой ЮНЕСКО, Труды, 2007 Дубна, стр. 289-296.
5. Р.Г. Григорян - Влияние определенных белковых фракции гомогенатов на процесс обратимой инактивации аргиназы печени лягушек *Rana ridibunda* // ВЕСТНИК МАНЭБ, 2009, т. 14, N 4, вып.1, стр. 107-109.

ОСОБЕННОСТИ КИСЛОТНОЙ ИНАКТИВАЦИИ И РЕАКТИВАЦИИ
ИЗОФЕРМЕНТОВ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ ЗЕМНОВОДНЫХ В ТЕЧЕНИЕ
ОНТОГЕНЕЗА (НА ПРИМЕРЕ ЛЯГУШКИ *Rana ridibunda*)

РЕЗЮМЕ

Одним из актуальных и интересных вопросов биохимии является выяснение механизмов регуляции обмена веществ, в котором существенную роль играют изоферменты, участвующие в различных биохимических процессах. В настоящее время в центре внимания исследователей находится орнитинный цикл, который является основным механизмом нейтрализации аммиака у уреотелических организмов. Первые 4 фермента этого цикла обеспечивают биосинтез аргинина, а аргиназа катализирует последний этап цикла - гидролиз аргинина на мочевины и орнитин.

В диссертации выявлены оптимальные условия кислотной инактивации и последующей реактивации (pH 9.5) аргиназы печени лягушек *Rana ridibunda*. Усовершенствование метода обратимой инактивации, как одного из методов изучения олигомерных белков позволило исследовать субъединичное строение изоферментов аргиназы и его изменения в течение метаморфоза.

В результате исследований показано, что уреотелическая аргиназа лягушки, которая резко индуцируется в течение метаморфоза является тримером. Неуреотелический изоэнзим, который обнаруживается в печени головастиков лягушки *Rana ridibunda* и элиминируется во время метаморфоза является мономером.

Показано, что уреотелический изоэнзим, предварительно подвергнутый кислотной инактивации реактивируется (pH 9.5) в присутствии ионов двухвалентного Mn, а неуреотелический мономерный изоэнзим не реактивируется. В процессе реактивации уреотелического изофермента субъединицы объединяются не только в виде тримера, но образуются также тетрамеры, гексамеры, даже октамеры. Такие „ошибки" в процессе реактивации, возможно, являются результатом разбавления в процессе

экспериментов специфических некаталитических белков - шаперонов и шаперонинов, которые направляют „фолдинг".

Выявление субъединичного состава фермента и раскрытие особенностей обратимой кислотной инактивации позволяют четче разграничить уреотелическую аргиназу от неуреотелической.

Усовершенствованный нами метод обратимой кислотной инактивации может быть применен при исследовании структурных особенностей олигомерных белков, в том числе и других ферментов.

05.02.2013

ՀՀ Ազգային գրադարան



NL1857020

