



Fatih Mehmet KANDEMİR¹
Mehtap ÖZÇELİK²
Necmi ÖZDEMİR¹

¹Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

²Veteriner Kontrol ve
Araştırma Enstitüsü,
Elazığ, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 03.08.2009
Kabul Tarihi : 26.10.2009

Yazışma Adresi
Correspondence

Fatih Mehmet KANDEMİR
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı
Elazığ - TÜRKİYE

fmk_03@mynet.com

ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2010: 24 (1): 01 - 04
http://www.fusabil.org

Koyun Dalak Doku Arjinazının Fotoinaktivasyonu ve Bazı Kinetik Özellikleri*

Bu çalışmanın amacı koyun dalak doku arjinazının bazı kinetik özelliklerinin tesbit edilerek metilen mavisinin inhibisyon etkisinin araştırılmasıdır.

Çalışmada kullanılan dalak dokuları Elazığ'daki Elkas kesimeviden temin edilmiştir. Arjinaz aktivitesi spektrofotometrik olarak tiyosemikarbazid-diasetilmonoksime üre (TDMU) metodu kullanılarak ölçüldü. Protein Lowry ve arkadaşlarının metoduna göre ölçülmüştür.

Çalışmada dört grup kullanıldı. Birinci grupta, birinci preinkübasyonda MnCl₂ eklendi ve örnekler oda ışığında tutuldu. Bu grup kontrol grubu olarak kabul edildi. İkinci grupta metilen mavisi ve MnCl₂ birinci preinkübasyonda eklendi ve örnekler 150 watt ışığa maruz bırakıldı. Üçüncü grupta örnekler birinci preinkübasyonda MnCl₂, ikinci preinkübasyonda metilen mavisi eklenerek 150 w ışık uygulandı. Dördüncü grupta ise birinci preinkübasyonda metilen mavisi ikinci preinkübasyonda ise MnCl₂ eklenerek örnekler 150 w ışığa tabi tutuldu.

Koyun dalak doku arjinaz aktivitesinde en fazla kayıp dördüncü grupta olurken bunu ikinci grup takip etti. En az aktivite kaybı ise üçüncü grupta görüldü. Enzim aktivitesinde oda ışığında % 66, karanlıkta % 60 ve 150 w ışıkta % 72' lik bir inhibisyon olduğu saptandı. Metilen mavisinin koyun dalak doku arjinazı üzerinde non-kompetitif inhibisyona neden olduğu tesbit edildi.

Fotoinaktivasyonun, muhtemelen arjinaz molekülünde bulunan histidil artıklarının imidazol gruplarının değişikliğe uğraması sonucu meydana geldiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Arjinaz, fotoinaktivasyon, koyun dalak dokusu.

Photoinactivation and Some Kinetic Properties of Tissues Arginase in Sheep Spleen

The aim of study was to investigate the inhibitory effect of methylene blue by determining some kinetic properties of tissues arginase in sheep spleen.

The spleen tissues samples used in this study were obtained from Elkas slaughterhouse in Elazığ. Arginase activity was spectrophotometrically measured, using the Thiocemicarbazide diacetylmonoxime urea (TDMU) method. Protein activity was measured with the method of Lowry et al.

The study was performed on four groups. In the first group, the samples were supplemented with MnCl₂ at the first preincubation and kept at room light. In the second group, the samples were supplemented with methylene blue and MnCl₂ at the first preincubation and exposed to a 150 W (watt) light source. In the third group, MnCl₂ at first preincubation and methylene blue at the second preincubation were included in the samples that were then exposed to a 150 W (watt) light source. In the fourth group, after supplementing methylene blue at the first preincubation and MnCl₂ at the second preincubation, the samples were exposed to a 150 W light source. The highest decrease in the sheep spleen arginase activity were determined in the fourth group, which were followed by the second group. The least decrease in the enzyme activity was determined in the third group. It was analyzed to have 66, 60 and 72 % of inhibitory decrease in enzyme activity successfully in the room light, dark and 150 w light source. Methylene blue was found to result in a non-competitive inhibitory effect on sheep spleen tissues arginase.

We concluded that photoinactivation may be due to a modification in imidazole group of hystidyl residues present in arginase molecules.

Key Words: Arginase, photoinactivation, sheep spleen tissues.

Giriş

Arjinaz, L- arjininin ortinitin ve üreye dönüşümünden sorumlu olan üre döngüsünün son enzimidir (1). Arjinaz enziminin esas kaynağı memeli karaciğeri olmasına rağmen böbrek, kalp kası, akciğer, dalak, beyin, iskelet kası gibi ekstrahepatik dokularda da düşük miktarda arjinaz aktivitesi saptanmıştır (2).

* Bu çalışma, doktora tezinin bir bölümünden özet olup, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu (FÜBAP-Proje No: 1398) tarafından desteklenmiştir.

Arjinazın dokulara yayılmış iki formu bulunmaktadır. Bunlar sitozolik form A1 ve mitokondrial form A2' dir. Sitozolik form (A1) daha çok karaciğerde bulunur ve üre döngüsünde görev alır (1). Mitokondrial form (A2) ise üre siklusunun olmadığı ekstrahepatik dokularda, poliaminlerin (putressin, spermin, spermidin), protein biyosentezi için gerekli olan prolinin sentezlenmesi gibi özel fonksiyonlara sahiptir ve yangısal mekanizmaların biyosentezinde görev almaktadır (2).

Muszynska ve ark. (3), arjinaz enziminin histidil artıklarının imidazol gruplarına Mn^{+2} kationlarının bağlanması ile enzimin tetramerik yapıya ulaşarak tam aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Mn^{+2} iyonlarının enzime bağlanması ısıya dayanıklılığı artırmakta ve enzimin inaktivasyonlara karşı daha dayanıklı hale gelmesini sağlamaktadır (4).

150 watt ışık ve metilen mavisi varlığında enzim histidil artığının imidazol gruplarının parçalanması ile Mn^{+2} kationlarının tetramerik yapıyı oluşturamadığı ve bu nedenle fotoinaktivasyonun meydana geldiği bildirilmiştir (5,6).

Bu araştırmada koyun dalak doku arjinazının bazı kinetik özelliklerinin saptanması, arjinazın fotoinaktivasyonu ile enzimin histidil artığının imidazol gruplarının parçalanmasıyla ortamda inhibisyonun nasıl olacağı ve preinkübasyon aşamalarında inhibitörün farklı zamanlarda ilavesiyle nasıl bir sonuç alınacağını tespiti amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırma materyali olan koyun dalağı Elazığ Elkas tesislerine kesim için getirilen 2-3 yaşlarındaki, barınak, bakım ve beslenme şartları aynı olan bir sürüdeki 20 adet Akkaraman ırkı koyunlardan temin edilmiştir. Kesimden sonra alınan dalak dokusu, üzerindeki kan ve pıhtıdan temizlendikten sonra %0.9'luk soğuk NaCl çözeltisi içerisinde behere aktarılmış ve buz içerisinde hızlı bir şekilde laboratuara ulaştırılmıştır.

Doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan ve $MnCl_2$ ile sulandırıldıktan (sulandırma oranı 1/6) sonra cam-cam homojenizatörde homojenize edilmiştir. Homojenat $+4^{\circ}C$ 14000 rpm'de 13 dakika santrifüj edilerek örneklerin süpernatantları enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Arjinaz aktivitesi Tiyosemikarbazid-Diasetil Monoksim Üre (TDMU) Metodu (7) ile; protein miktarı ise Lowry (8) yöntemine göre ölçülmüştür. Çalışmamızda kullandığımız homojenatta koyun dalak doku örneklerinin her ml süpernatantına 3 ünite Jack-Bean üreaz enzimi ilave edildikten sonra $37^{\circ}C$ ' de 15 dakika inkübe edilerek endojen ürenin parçalanması sağlanmıştır (9).

Örneklerin metilen mavisiyle muamelesi: Deney şartlarına göre preinkübasyon işlemi, metilen mavisinin etkisini araştırmak üzere $58^{\circ}C$ ' de 13 dakikalık iki dönem halinde toplam 26 dakika olarak uygulanmıştır. Metilen mavisi şartlara göre I. ve II. preinkübasyon aşamasında ilave edilmiştir.

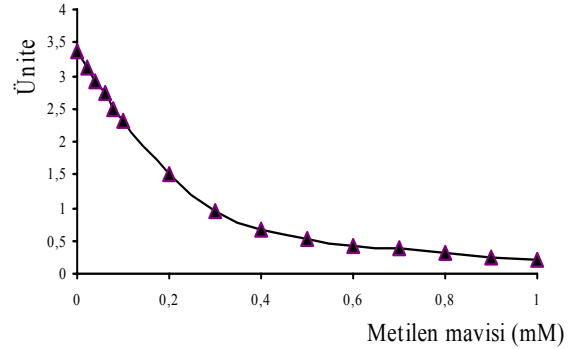
Örneklerin ışık kaynağı (150 w) ile muamelesi:

Metilen mavisinin ilave edildiği koşullara göre numuneler preinkübasyonun değişik aşamalarında 10 cm mesafeden 150 w ışık kaynağına maruz bırakılmıştır. Enzimatik karışım toplam 1 ml olup bu karışım 0.3 ml 120 mM arjinin (pH 9.5), 0.4 ml 200 mM karbonat tamponu (pH 9.5) ve 0.3 ml enzim kaynağı olacak şekilde hazırlanmıştır. Tüplere önce L-arjinin, sonra karbonat tamponu konulmuş ve daha sonra preinkübasyondan çıkan enzim kaynağı eklenerek inkübasyon için $37^{\circ}C$ ' de 10 dakika sallantılı metabolik su banyosunda tutularak tepkime başlatılmıştır. Tepkime sonunda tüplere 3 ml asit karışımı ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve son olarak 2 ml renk ayırıcı eklenerek tüpler 10 dakika kaynar su banyosunda tutularak renk oluşumu sağlanmıştır. 520 nm dalga boyunda elde edilen örneklerin absorbansından sıfır zaman körlerinin absorbanslarının çıkarılmasıyla kalan değer ünite üzerinden değerlendirilmiştir.

Çalışmada, 1 ünite enzim 1 saatte, $37^{\circ}C$ 'de L-arjininden 1 μ mol üre oluşturan enzim miktarı olup, spesifik aktivite μ mol üre / saat / mg protein olarak ifade edilmiştir.

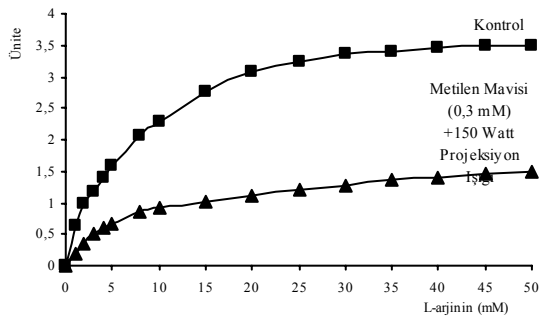
Bulgular

Koyun dalak doku arjinaz aktivitesi üzerine metilen mavisinin fotoinaktivasyon etkisini incelemek amacıyla enzim değişik metilen mavisi konsantrasyonlarına ve 150 w ışığa maruz bırakılmıştır. Enzim, 0,3 mM metilen mavisi konsantrasyonunda %72, 0,6 mM' da % 85, 0,9 mM' da % 92 aktivite kaybına uğramıştır (Şekil 1).

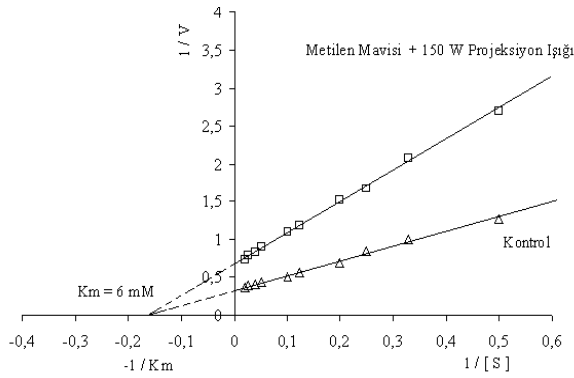


Şekil 1. Değişik konsantrasyonlarda metilen mavisinin koyun dalak doku arjinaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi

Metilen mavisinin koyun dalak doku arjinaz aktivitesi üzerine yaptığı inhibisyon tipini belirlemek için farklı arjinin konsantrasyonlarında ve 0,3 mM metilen mavisi varlığında enzim aktiviteleri incelenerek veriler Michaelis-Menten (Şekil 2) ve Lineweaver-Burk eğrisi (Şekil 3) ile değerlendirilmiştir, sonuç olarak metilen mavisinin enzimi non-kompetitif inhibisyona uğrattığı saptanmıştır.



Şekil 2. Farklı substrat konsantrasyonlarında metilen mavisinin koyun dalak doku arjinaz aktivitesi üzerine etkisinin Michaelis-Menten grafiği ile değerlendirilmesi.



Şekil 3: Metilen mavisinin koyun dalak doku arjinaz aktivitesi üzerine etkisinin Lineweaver-Burk eğrisi ile değerlendirilmesi.

Koyun dalak doku arjinaz aktivitesi üzerine metilen mavisinin etkisi farklı ortamlar (oda ışığı, karanlık, 150 watt ışık) altında incelenmiştir. Buna göre enzim oda ışığında % 66, karanlıkta % 60, 150 watt ışık altında ise % 72 aktivite kaybına uğramıştır (Tablo 1).

Tablo 2. Metilen mavisi, MnCl₂ ve ışığın koyun dalak doku arjinazının fotoinaktivasyonuna olan etkileri.

	I.Preinkübasyon		II. Preinkübasyon		IŞIKLANDIRMA		
	MnCl ₂	%0,3'lük Metilen Mavisi	%0,3'lük Metilen Mavisi	MnCl ₂	150 w Işık	Oda ışığı	Kalan % Aktivite
A	+	-	-	-	-	+	100
B	+	+	-	-	+	-	37
C	+	-	+	-	+	-	49
D	-	+	-	+	+	-	19

Tartışma

Koyun dalak doku arjinaz aktivitesi üzerine metilen mavisinin fotoinaktivasyon etkisini incelemek için enzim

Metilen mavisini ilave edilmemiş örnekler kontrol olarak kabul edilmiş ve aktivite %100 olarak tanımlanmıştır. Metilen mavisini ilave edilmiş örneklerdeki aktivite kaybedilen aktiviteyi göstermektedir. Bu aşamaya metilen mavisinin hangi ortamda daha etkili olduğu saptanmıştır.

Değişik ışıklandırmalar, MnCl₂ (2 mM) ve % 0,3' lük metilen mavisinin I. ve II. preinkübasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen veriler değerlendirilmiştir (Tablo 2).

I. preinkübasyona sadece MnCl₂ (2 mM) eklenmiş ve bu kontrol olarak kabul edilmiştir (A). MnCl₂ (2 mM) ve % 0,3' lük metilen mavisini 150 watt ışık altında I. preinkübasyonda uygulanmış ve enzimin % 63 aktivite kaybına uğradığı görülmüştür (B). I. preinkübasyonda MnCl₂ (2 mM), II preinkübasyonda ise % 0,3' lük metilen mavisini eklenmiş ve enzim 150 watt ışığa maruz bırakıldığında % 51 aktivite kaybının olduğu saptanmıştır (C). % 0,3' lük metilen mavisini I. preinkübasyonda, MnCl₂ (2 mM) ise II. preinkübasyonda ortama eklenmiş ve enzimin 150 watt ışık altında aktivitesi incelendiğinde % 81' lik aktivite kaybına uğradığı tespit edilmiştir.

Tablo 1. Değişik ışık koşullarında metilen mavisinin arjinaz aktivitesi üzerine olan etkisi.

KOŞULLAR	AKTİVİTE % (Kaybedilen)	
	Kontrol	+ Metilen Mavisi
Oda Işığı	100	66
Karanlık	100	60
150 Watt Işık	100	72

kaynağı 150 watt ışık altında, değişik metilen mavisini konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. 0.3 mM metilen mavisini varlığında enzim aktivitesinde %72, 0.6mM konsantrasyonda ise % 85' lik bir azalma tesbit edilmiştir.

İnhibisyon tipini belirlemek için 0.3 mM metilen mavisi varlığında enzim aktivitesi incelenmiş ve metilen mavisinin enzimi non-kompetitif inhibisyona uğrattığı saptanmıştır. Çalışmamızla paralel olarak koyun meme doku arjinazı (10), M. Benedeni arjinazı (6), manda karaciğer ve böbrek doku arjinazı (5) ve insan tükürük arjinazının da (11) metilen mavisi tarafından non-kompetitif inhibisyona uğratıldığı belirtilmiştir.

Metilen mavisinin inhibisyon etkisi farklı ortamlarda incelenmiş, oda ışığında aktivitenin % 66' sının, karanlıkta % 60' inin ve 150 watt ışık altında ise % 72' sinin kaybolduğu görülmüştür. Koyun dalak doku arjinaz enzimini, metilen mavisinin 150 wat ışık altında daha güçlü inhibisyona uğrattığı saptanmıştır. Enzimin 150 w ışık altında reaksiyona sokulmasının bir fotoinaktivasyon olayı olduğu kanıtlanmıştır.

Rat karaciğer arjinazı üzerine metilen mavisi ile 150 w ışık uygulanmış ve aktivitedeki düşüşe 21 histidil artığının fotoinaktivasyona uğramasıyla enzimin subünitelere ayrılmasının neden olduğu belirtilmiştir. Fotoinaktivasyon, enzimdeki histidil artıklarının imidazol gruplarının parçalanmasıyla oluşmaktadır. Çeşitli dokularda arjinaz enzimi dimerik yapıdadır. Mn^{+2} iyonları dimerik yapıya bağlanarak enzimi tetramerik (E- Mn_4) yapıya dönüştürmekte ve bu şekilde arjinaz enzimi tam aktivite göstermektedir (12). 150 w ışık ve metilen mavisi varlığında enzimin histidil artığının imidazol gruplarının parçalanması ile Mn^{+2} katyonlarının tetramerik yapıyı oluşturamadığı ve bu nedenle fotoinaktivasyonun meydana geldiği bildirilmiştir (5, 6, 11, 13).

Koyun dalak doku arjinaz enzimine farklı ortamlarda iki preinkübasyon uygulanmış, oda ışığında I. preinkübasyona sadece $MnCl_2$ konularak yapılan

çalışma kontrol kabul edilmiş ve diğer çalışmalar bununla kıyaslanmıştır. Bu çalışma sonucunda en az aktivite kaybının Mn^{+2} ile preinkübasyona sokulduktan sonra metilen mavisi uygulanan grupta (C) olduğu gözlemlenmiştir. Mn^{+2} katyonları enzimi tetramerik yapıya kavuşturduktan sonra histidil artıklarının yıkımı ve tetramerik yapının değişimi ancak belli miktarda etkilenmektedir. Bu yüzden en az aktivite kaybı bu grupta olmuştur. Ray (14), metilen mavisinin oda ışığında fotokimyasal bir oksidant olarak hareket ettiğini ve bu fotokimyasal oksidasyon esnasında proteinlerde bulunan histidin, methionin, sistein, triptofan, tirozin ve sistin amino asitlerinin yan gruplarının değişime maruz kaldığını bildirmiştir. Moss (15), arjinaz enziminin substrat ilave edilmeden inhibitörle karşılaştığında inhibisyonun daha fazla olduğunu, substrat ile inhibitör karşılaştıktan sonra enzim ilave edildiğinde ise inhibisyonun daha az olduğunu bildirmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürlerle uyum içerisindedir.

Sonuç olarak metilen mavisinin her türlü ortamda koyun dalak doku arjinazı üzerine inhibisyon etkisinin olduğu, ışığın (150 W) eklenmesi ile inhibisyonun daha da arttığı ve enzimin fotoinaktivasyona uğradığı tespit edilmiştir. Bu fotoinaktivasyona da enzimin histidil artıklarının imidazol gruplarının parçalanması ve enzimin aktivasyon gösterdiği tetramerik yapısını oluşturamamasının neden olduğu düşünülmektedir. Metilen mavisinin ve ışığın bu inhibisyon etkisinin engellenmesinin mümkün olmadığı ancak enzimin önce aktivatörle muamele edilerek tetramerik yapıya kavuştuktan sonra inhibitörle muamele etmenin inhibisyonu azaltacağı sonucuna ulaşılmıştır.

Kaynaklar

1. Cederbaum SD, Yu H, Grody WW, et al. Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Genet Metab* 2004; 81: 38-44.
2. Kandemir FM, Özdemir N. Sığır dalak doku arjinazının bazı kinetik özellikleri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2008; 22: 153-158.
3. Muszynska G, Wojtczak M. Influence of immobilization on conformation of rat liver arginase. *Int J Biochem* 1979; 10: 665-668.
4. İlhan N, Gülen Ş. Tiroid arjinaz enzim aktivitesinin farklı metal iyonları varlığında ısıya karşı stabilitesi. *Turk J Bioch* 1993; 18: 59-67.
5. Özdemir N, Özçelik M. Manda karaciğer ve böbrek doku arjinazının fotoinaktivasyonu ve kinetik özellikleri. *Turk J Vet Anim Sci* 2001; 25: 995-1000.
6. Özdemir N, Ozan S. Moniezia Benedeni arjinazının fotoinaktivasyonu ve kinetik özellikleri. *Eciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 1993; 2: 152-157.
7. Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem* 1971; 39: 412-417.
8. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
9. Mohammed SM, Greenberg DM. Liver arginase I. preparation of extracts of high potency, chemical properties, activation, inhibition and pH activity. *Arch Biochem Biophys* 1945; 8: 349-357.
10. Özçelik M, Özdemir N. Koyun meme doku arjinaz aktivitesi üzerine metilen mavisinin inhibisyon etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2002; 16: 107-112.
11. Ozan S, Gürsu MF, Gülen Ş. İnsan tükürük arjinazının fotoinaktivasyonu. *Turk J Bioch* 1991; 16: 57-65.
12. Ber E, Muszynska G. Chemical modification of rat liver arginase. *Acta Biochim Pol* 1979; 26: 103-114.
13. Ozan S, Gülen Ş. Farklı türlerin organlarında bulunan arjinazların metilen mavisi ile fotoinaktivasyonu. *Turk J Biol* 1991; 15: 222-229.
14. Ray WJ. Photochemical oxidation. In: SP Colowick, NO Kaplan (Editors). *Methods in Enzymology*. Newyork: Academic Pres 1967; 490-497.
15. Moss S. Sodium nucleata inhibition of arginase activity. *Science* 1952; 115: 69-70.