

KOYUN KARACİĞER DOKU ARGİNAZINDA -SH GRUPLARININ VARLIĞI VE ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE SÜLFÜR GRUBU İÇEREN, AROMATİK VE HİDROKSİLLİ AMİNO ASİTLERİN ETKİSİ

Fulya BENZER

Sema TEMİZER OZAN

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 31.07.2001

Presence of -SH Groups in Liver Tissue Arginase of Sheep and Effects of Amino Acids Containing Sulphur Group, Aromatic and Hydroxylic Amino Acids on the Enzyme Activity

Summary

The effects on sheep liver tissue arginase of tyrosine and tryptophan from aromatic amino acids; serine and threonine from hydroxylic amino acids; cysteine and methionine from amino acids containing sulphur group and homocysteine from amino acids that do not occur in proteins were investigated. To understand whether there was thiol groups in enzyme structure or not, effects of p-chloromercuri benzoate and n-ethylmaleimide was also investigated.

As a result of the investigation, while arginase was inhibited by cysteine, homocysteine and thyroptophan, was less activated by serine and threonine; methionine and tyrosine did not cause any changes on arginase activity. While p-chloromercuri benzoate, cysteine and homocysteine caused activation in low concentration, they caused inhibition in high concentration.

Cysteine, homocysteine and thyriptophan from amino acids caused mixed inhibition, p-chloromercuri benzoate caused uncompetitive inhibition and n-ethylmaleimide caused noncompetitive inhibition.

Key Words: Liver, arginase, sheep, amino acids, sulphydryl groups.

Özet

Koyun karaciğer doku arginazı üzerine aromatik amino asitlerden tirozin ve triptofan; hidroksilli amino asitlerden serin ve treonin; sülfür grubu içeren amino asitlerden sistein, metionin ile protein yapısında yer almayan amino asitlerden homosisteinin etkileri araştırılmıştır. Enzimin yapısında thiol gruplarının olup olmadığını anlamak için p-kloromerküri benzoik asit ve n-etyl maleimitin etkileri araştırılmıştır.

Yapılan araştırmalar sonucunda amino asitlerden sistein, homosistein ve triptofan inhibisyon, serin ve treonin hafif bir aktivasyon yaparken, metionin ve tirozin ise enzim aktivitesinde herhangi bir değişikliğe sebep olmamıştır. P-kloromerküri benzoik asit, sistein ve homosistein düşük konsantrasyonlarda aktivasyon, yüksek konsantrasyonlarda ise inhibisyon meydana getirmiştir.

Amino asitlerden sistein, homosistein ve triptofan karışık inhibisyon, p-kloromerküri benzoik asit unkompetitif inhibisyon, n-etyl maleimit ise nonkompetitif inhibisyon neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Koyun, karaciğer, arginaz, amino asitler, sülfhidril grupları.

Giriş

Arginaz (L-arginin amidinohidrolaz; EC 3.5.3.1) üre döngüsünün son basamağında L-argininin ornitin ve ureye hidrolizini katalizleyen bir enzimdir (21). Üre döngüsünün tüm enzimlerini içeren karaciğer hem ure sentezinin, hem de arginaz aktivitesinin en aktif olduğu organıdır (11). Üre üretimi, azotun son derece çözülebilir ve nontoksik formda atılmasını

sağlayan bir mekanizmadır, böylece yüksek seviyedeki amonyağın asıl tehlke yaratan toksik sonuçlarından kaçınılmış olur. Ana kaynağı üre sonuclarından kaçınılmış olur. Ana kaynağı üre döngüsünün bulunduğu karaciğer olan arginaz enzime böbrek, bağırsak, beyin, rumen, akciğer, eritrosit, fibroblast, kalp, dalak, iskelet kası, makrofaj, tükürük bezleri gibi nonüretik bezleri gibi nonüretik

dokularda da düşük düzeylerde rastlanılmaktadır (1,6,12,19). Bu dokulardaki arginaz, çeşitli kaynaklardan gelen argininin üre ve ornitine hidrolize etmektedir.

Koyun karaciğer doku arginazı üzerine farklı amino asitlerin etkilerini araştırmak ve enzimin katalitik aktivitesi için sülflhidril gruplarının gerekli olup olmadığını tespit edebilmek amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılan koyun karaciğer doku örnekleri (10 adet) Elazığ ELET tesislerine kesim için getirilen sağlıklı koyunlardan kesimden hemen sonra alınıp serum fizyolojik içine koyularak laboratuara getirilmiştir. Karaciğer doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan sonra 1 g olarak tartılıp, 4 mM MnCl₂ (1/10, w/v) ilavesinden sonra, kırlımsız buz içerisinde (Potter-Elvehjem, cam-cam) homojenizatörle homojenize edilmiştir. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 21 000 g'de +4 °C'de 15 dakika (20) santrifüje edilmiş ve işlemenden sonra peletler atılarak süpernatantlar alınıp, enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi, L-argininin arginaz ile hidrolizi sonucu oluşan ürenin Tiyosemikarbazid-Diasetilmonksim-Üre (TDMU) metodu (9) ile ölçülmesi sonucu saptanmıştır. Protein miktarının ölçümünde ise Lowry metodu (16) kullanılmıştır.

Enzim kaynakları, MnCl₂ çözeltisi ile 1000 misli sulandırılıp (MnCl₂'ün preinkübasyon ortamındaki son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde) 65 °C'de 15 dakika tutularak preinkübasyon işlemi uygulanmıştır. Amino asitlerin, p-kloromerkeuri benzoik asit (p-CMBA)'in ve n-etyl maleimitt (NEM)'in preinkübasyon ortamındaki son konsantrasyonları (serin, sistein, homosistein 0-80 mM, treonin 0-70 mM, triptofan 0-12 mM, p-CMBA 0-50 µM, NEM 0-14 mM) belirli aralıklarda hazırlanmıştır.

İnkübasyon ortamı 1 ml olup, 66.6 mM L-argininden (pH:10) çözeltisinden 0.3 ml, 75 mM NaHCO₃-Na₂CO₃ tamponundan (pH:10) 0.4 ml olacak şekilde düzenlenmiş ve karıştırma preinkübasyon işlemi uygulanmış enzim kaynağından 0.3 ml ilave edilerek 37 °C'de metabolik su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. 10 dakikalık inkübasyon işleminden sonra her bir tüpe 0.3 ml asit ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş, daha sonra 2 ml renk ayıracı ilave edilerek 10 dakika kaynatılmıştır. Sonuçların sağlıklı

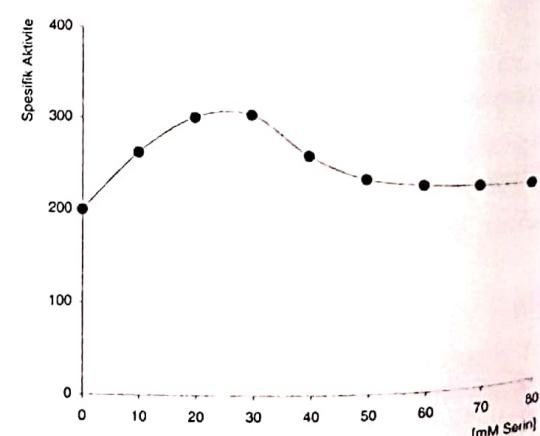
değerlendirilmesi için her örneğe sıfır zaman köprü hazırlanmıştır. Absorbanslar 520 nm dalga boyunda okunmuş ve örneklerin üre miktarları, sıfır zaman köplerinin absorbanslarının çıkarılmasından sonra değerlendirilmiştir.

Amino asitlerin, p-CMBA ve NEM'in sebep olduğu inhibisyon tipini belirleyebilmek için 12 mM triptofan, 55 mM sistein, 50 mM homosistein, 45 µM p-CMBA ve 12 mM NEM varlığında ve inkübasyon ortamındaki L-arginin konsantrasyonları değiştirilerek karaciğer doku arginaz aktivitesi ölçüлü, kontrol arginazına göre değerlendirilmiştir.

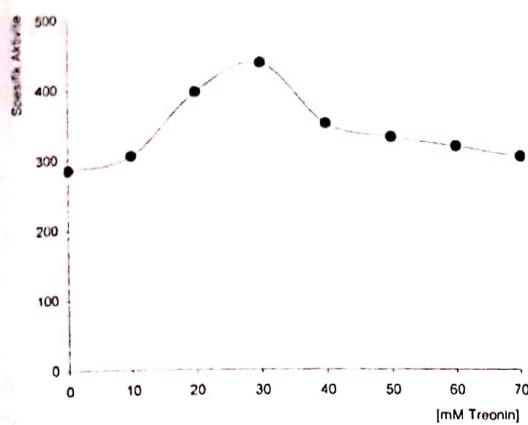
Çalışmada enzimin spesifik aktivitesi, 1 saatte, 37°C'de, L-argininden 1 µmol üre oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesi olup, µmol üre / mg protein / saat olarak tanımlanmıştır.

Bulgular

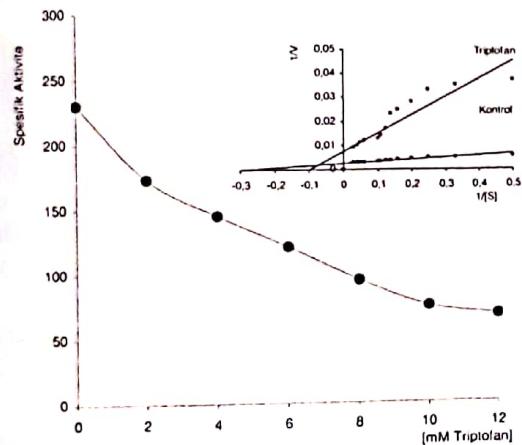
Yapılan çalışmalar sonucunda, amino asitlerden serin (Şekil 1) treonin (Şekil 2) hafif bir aktivasyona, triptofan (Şekil 3), sistein (Şekil 4) ve homosistein (Şekil 5) ise inhibisyon neden olmuştur. Sistein ve homosisteinin 10 mM'a kadar aktivasyona, 20 mM'dan itibaren ise inhibisyon neden oldukları görülmüştür. 12 mM triptofan varlığında % 67'lik, 55 mM sistein varlığında % 58'lik, 50 mM homosistein varlığında ise enzim aktivitesinde % 60'lık bir inhibisyon gözlenmiştir. 45 µM (0.045 mM) p-CMBA varlığında (Şekil 6) enzim aktivitesinde % 70'lik, 12 mM NEM varlığında (Şekil 7) ise % 85'lik bir inhibisyon gözlenmiştir. p-CMBA 10 µM'a kadar aktivasyona sebep olurken 20 µM'dan itibaren inhibisyon sebep olmuştur.



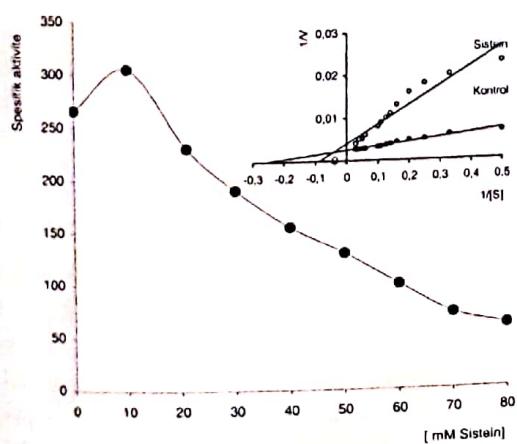
Şekil 1. Serinin koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi



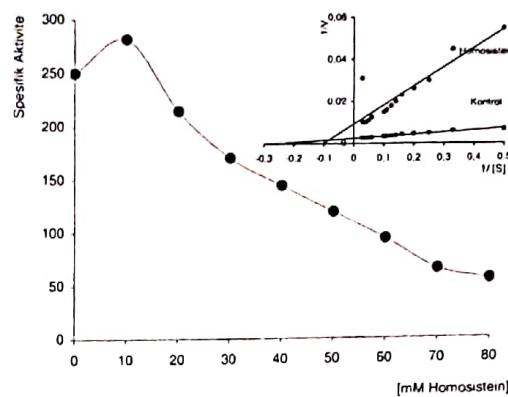
Şekil 2. Treoninin koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi



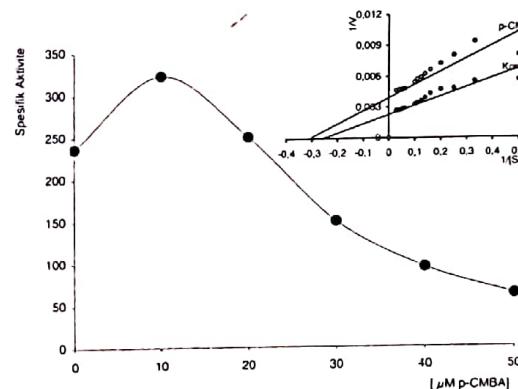
Şekil 3. L-Triptofanın koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi ve L-Triptofan varlığında, enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisiyle incelenmesi



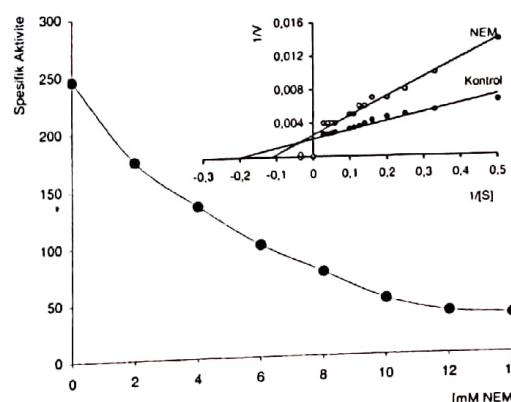
Şekil 4. L-Sisteinin koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi ve L-Sistein varlığında, enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisiyle incelenmesi



Şekil 5. L-Homosisteinin koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi ve L-Homosistein varlığında, enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisiyle incelenmesi



Şekil 6. p-CMBA'nın koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi ve p-CMBA varlığında, enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisiyle incelenmesi



Şekil 7. NEM'in koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi ve NEM varlığında, enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisiyle incelenmesi

Bulguların Lineweaver-Burk eğrisi ile değerlendirilmesi sonucunda triptofan, sistein ve homosisteinin arginazın V_{max} 'ını kontrole göre düşündüğü, K_m 'ını ise yükselttiği bulunmuştur. Enzimin substratı L-arginine karşı olan K_m 'ı 4 mM ve V_{max} 'ı 375 μ protein civarında iken triptofan varlığında enzimin V_{max} 'ı 100 μ protein'e düşmüş olup, K_m 'ise 7 mM'a çıkmıştır (Şekil 3). Sistein varlığında (Şekil 4) enzimin V_{max} 'ı 215 μ protein'e, homosistein varlığında (Şekil 5) ise 200 μ protein'e düşmüştür. K_m 'leri ise yaklaşık olarak 10 mM'a çıkmıştır. Böylece bu amino asitlerin enzimi kompetetif-nonkompetitif (karışık) inhibe ettiği saptanmıştır. p-CMBA'in (Şekil 6) enzimin V_{max} 'ını 210 μ protein'e, K_m 'ini ise 3 mM'a düşürmesi sonucu unkompetitif inhibisyon yaptığı bulunmuştur Buna karşılık NEM'in (Şekil 7) enzimin V_{max} 'ını 232 μ protein'e düşündüğü, ancak enzimin K_m 'ini değiştirmediği yani nonkompetitif inhibisyon neden olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalar sonucunda sistein, homosisteinin ve p-CMBA'in düşük konsantrasyonlarda aktivasyona, yüksek konsantrasyonlarda ise inhibisyon neden oldukları bulunmuştur.

Tartışma

p-CMBA ve NEM enzimlerin aktif merkezinde -SH grubu içeren amino asitlerin olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddelerden olup, enzimlerin aktif merkezlerindeki -SH gruplarını bloke ederek, enzimin inhibisyonuna neden olmaktadır.

Muszynska ve ark. (17) tarafından yapılan çalışmada, p-CMBA'in rat karaciğer ve sığır karaciğer arginazını etkilemediği, acı bakla ve tavuk karaciğer arginazı üzerine ise kuvvetli bir inhibisyon etki meydana getirdiği bildirilmiştir.

Ber ve ark. (3), p-CMBA ve NEM'in rat karaciğer arginazını etkilemediğini, acı bakla arginazını oldukça kuvvetli inhibe ettiğini bulmuşlardır.

İnsan karaciğer, eritrosit ve uterus doku arginazı üzerine p-CMBA'in etkisi araştırılmış ve herhangi bir inhibisyon etkisine rastlanılmamıştır (10).

L.Konarska ve L. Tomaszewski (15) rat ince bağırsak arginazının p-CMBA'le inhibe olmadığı, dokulara göre bu farklılıkların nedeninin, enzimlerin aktif merkezlerinin farklı yapıda olması ile beraber enzimlerin yapısındaki farklılıklarla da ilgili olabileceğini belirtmiştir.

Sığır rumen doku arginazı ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada (7), p-CMBA ve NEM'in etkisi araştırılmış ve nonkompetitif tipte inhibisyon yaptığı bulunmuştur.

Sığır karaciğer arginazı üzerine yapılan bir çalışmada (22) ise, NEM tarafından enzimin inhibe edilmediği, dolayısıyla enzimin aktif merkezinde -SH grubunun bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Koyun karaciğer doku arginazı üzerine yapmış olduğumuz bu çalışmada p-CMBA ve NEM'in inhibisyon etkisine rastlanılmış olması enzimin aktif merkezinde -SH gruplarının bulunduğu ve katalitik aktivitenin başarılması için -SH gruplarının gerekli olduğunu göstermektedir. Bulmuş olduğumuz sonuçlar sığır ve rat karaciğerindeki sonuçlar ile uyum göstermemektedir.

Ceşitli amino asitlerle arginaz aktivitesinin inhibisyonu birçok doku ve türde geniş olarak kaydedilmiştir (4,5,8,14).

Muszynska ve Wojczak (18), amino asitleri ligand olarak kabul etmekte, arginaza bu ligandların bağlanmasıının, arginazın konformasyonel değişimine sebep olduğunu ve bunun da enzim-substrat kompleksinin turnover'ını bozdugunu belirtmektedir. Aynı çalışmada, sıçan karaciğer arginazını sistein'in nonkompetitif inhibisyonu uğrattığı belirtilmiştir.

Kaysen ve ark. (13) tarafından yapılan bir çalışmada homosisteinin karaciğer ve böbrek arginazını inhibe ettiği, ancak bu inhibisyonun böbrekte daha etkili olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada, metioninin böbrek arginazını hiç etkilemediği, karaciğer arginazını ise yok denecik kadar zayıf bir şekilde etkilediği bildirilmiştir.

Koyun karaciğer doku arginazı üzerine bazı amino asitlerin etkilerinin incelendiği bu çalışmada metionin ve tirozin herhangi bir değişiklikle sebep olmamıştır. Metionin ile ilgili bulduğumuz sonuç Kaysen ve ark. tarafından yapılan çalışma ile uyum göstermektedir. Tirozin ile ilgili olarak herhangi bir bulguya rastlanılmadığı için bu konuda bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Amino asitlerden serin ve treonin hafif bir aktivasyon yaparken, homosistein ve sistein inhibisyonu sebep olmuşlardır. Bond (4) tarafından sığır karaciğer arginazı ile ilgili olarak yapılan çalışmada sistein'in nonkompetitif bir inhibisyon neden olduğu, serinin ise herhangi bir inhibisyon meydana getirmediği bulunmuştur.

Koyun karaciğer dokusu ile ilgili olarak yapılan bu çalışmada sistein, homosistein ve triptofanın karışık tipte bir inhibisyon meydana getirdiği görülmüştür. Saflaştırılmış insan karaciğer arginazından elde edilen AI'nın karışık tip inhibisyon göstermesi ES kompleksine inhibitörün bağlanması sonucu substrat yükünün engellenmesiyle açıklanmıştır (2).

Koyun karaciğer arginazı üzerine p-CMBA unkompetitif olarak inhibisyon yapmış, NEM ise nonkompetitif bir inhibisyon meydana getirmiştir. Bond non-kompetitif inhibisyonu neden olan inhibitörlerin substrattan farklı bir noktada enzimle reversibl olarak birleştiğini ve ligandların muhtemelen enzim-substrat kompleksinin turnover'ını bozan konformasyonel değişime sebep olduğunu ve enzimin proteolitik inaktivasyona duyarlılığının arttığını belirtmiştir.

Dokuya göre amino asitlerin inhibitör etkilerinin farklılıklarının aktif merkezin içinde veya

yakınındaki yapısal farklılıktan mı yoksa allosterik geçişlerden mi kaynaklandığına karar vermek mevcut verilerle mümkün değildir.

Yapılan çalışma sonucunda, koyun karaciğer arginazının p-CMBA ve NEM tarafından inhibe edildiği dolayısıyla, sülֆidril grubu içeriği kanaatine varılmıştır. Hidroksilli amino asitlerden serin ve treonin hafif bir aktivasyona sebep olduğu bulunurken; aromatik amino asitlerden trozinin herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı ancak, triptofanın inhibisyon meydana getirdiği görülmüştür. Sulfür grubu içeren amino asitlerden sistein inhibisyon etkisi göstermiş, ancak metionin herhangi bir etki göstermemiştir. Protein yapısında yer almayan amino asitlerden homosistein ise inhibisyonu neden olmuştur. Inhibisyon tipleri her üç amino asit için de aynı olup karışık tip inhibisyondur. p-CMBA unkompetitif tipte bir inhibisyonu neden olurken, NEM nonkompetitif tipte bir inhibisyon meydana getirmiştir.

Kaynaklar

1. Aminlari M and Vaseghi T. Arginase distribution in tissues of domestic animals. *Comp Biochem Physiol* 1992; 103(2): 385-389.
2. Bascur L, Cabello J, Veliz M and Gonzalez A. Molecular forms of human liver arginase. *Biochim et Biophys Acta* 1966; 128 : 149-154.
3. Ber E, Muszynska G and Cechova D. The lack of free -SH groups in rat liver arginase. *Bulletin de L'Academie Polonaise Des Sciences*. 1978; II. XXVI, 10: 665-667.
4. Bond JS. Effects of manganese and amino acids on proteolytic inactivation of beef liver arginase. *Biochim et Biophys Acta* 1973; 327: 157-165.
5. Carvajal N and Cederbaum SD. Kinetics of inhibition of rat liver and kidney arginases by proline and branched-chain amino acids. *Biochim et Biophys Acta* 1986; 870: 181-184.
6. Chen PC and Broome JD. Mouse macrophage arginase. *Analyt Biochem* 1980; 163: 354-359.
7. Erişir M, Temizer Ozan S. Sığır rumen doku arginazında -SH gruplarının varlığı ve enzimin aktivitesi üzerine bazı metal iyonları ile guanidino bileşiklerinin etkisi. *Biyokimya Dergisi* 1998; 3 (23): 24-31.
8. Erişir M, Ozan S. Sığır rumen doku arginazının bazı amino asitler tarafından inhibisyonu ve kinetiği. *Turk J Vet Anim Sci* 2000; 24: 65-70.
9. Geyer JW and Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analyt Biochem* 1971; 39 (2): 412-417.
10. Halifeoğlu I. İnsan karaciğer, eritrosit ve uterus doku arginazının kinetik özellikleri. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi. 1993.
11. Herzfeld A and Raper SM. The heterogeneity of arginases in rat tissues. *Biochem J* 1976; 153: 469-478.
12. Ikemoto M, Tabata M, Murachi T and Totani M. Purification and properties of human erythrocyte arginase. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 547-553.
13. Kaysen GA and Strecker HJ. Purification and properties of arginase of rat kidney. *Biochem J* 1973; 133: 779-788.
14. Kesava Rao KV, Reddy SRR and Swami KS. The inhibition of sheep liver arginase by some L-amino acids. *Int J Biochem* 1973; 4: 62.
15. Konarska L and Tomaszewski L. Studies on L-arginase of small intestine. I. Topographical distribution and some properties of small intestine L-arginase in the rat. *Biochem Med* 1975; 14: 250-262.
16. Lowry By OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

17. Muszynka G, Severina OL and Lobryeva LW. Characteristics of arginases from plant, ureotelic and uricotelic organism. *Acta Biochem Polon* 1972; 19 (2).
18. Muszynska G and Wojciezak M. Influence of immobilization on conformation of rat liver arginase. *Int J Biochem* 1979; 10: 665-668.
19. Nikumb SK, Santhanam K, Rama K and Rao MV. Hepatic and serum arginase and ornithine transcarbamylase activities of rats maintained on diets of different protein quality. *Ann Nut Metab* 1987; 31: 387-394.
20. Ozan S ve Gülen Ş. Farklı türlerin organlarında bulunan arginazların metilen mavisi ile fotoaktivasyonu. *Doğa Tr J Biol* 1991; 15: 222-229.
21. Powers SG, Meister T. Urea synthesis and ammonia metabolism. Edited by I Arias, H Popper, D Schachter and DA Shafrits. In: *The liver: biology and pathobiology*. Raven Press. Newyork, 1982; 251-263.
22. Türkoğlu S and Özer İ. Possible involvement of manganese in the catalytic mechanism of bovine liver arginase. *Int J Biochem* 1992; 24 (6): 937-939.