

## KOYUN MEME DOKU ARGİNAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE METİLEN MAVİSİNİN İNHİBİSYON ETKİSİ\*

Mehtap ÖZÇELİK

Necmi ÖZDEMİR

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 10.04.2002

### Inhibitory Effect of Methylene Blue on Arginase Activity of the Sheep Mammary Tissue

#### Summary

It was found that methylene blue caused inhibition of enzyme and that its kinetic properties of sheep mammary tissue arginase in lactation. Arginase activity was spectrophotometrically measured using the Tiosemicarbazide diacetylmonoxime urea (TDMU) method.

Following preincubation with  $MnCl_2$ , exposure to a 150 W (watt) light source and the addition of methylene blue, the activity of arginase was found to be lower than that after preincubation with a 150 W light source, methylene blue and the addition of  $MnCl_2$ .

Enzyme inhibition was reduced by 76% in daylight, 63% in darkness and 66% in 150 W light source. The inhibitory effect of methylene blue on sheep mammary tissue arginase was studied and inhibition was found to be noncompetitive.

We concluded that photoinactivation might probably show its effect by modifying imidazole groups of histidyl residues in arginase molecules.

**Key Words:** Arginase, photoinactivation, sheep, mammary tissue, methylene blue.

#### Özet

Laktasyondaki koyun meme doku arginazının kinetik özellikleri araştırılarak metilen mavisiinin enzimi inhibe ettiği tespit edilmiştir. Tiyosemikarbazid- Diasetilmonoksim (TDMU) Yöntemi kullanılarak arginaz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Koyun meme doku arginazı, metilen mavisi varlığında 150 W ışığa maruz bırakıldıktan sonra  $MnCl_2$  ilavesi ile daha az aktivite göstermiş,  $MnCl_2$  ile preinkübasyona tabi tutulduktan sonra, metilen mavisi uygulandığında aktivitedeki düşüş daha fazla bulunmuştur. Enzim aktivitesinde; oda ışığında %76, karanlıkta %63, 150 W ışıkta ise %66'lık bir inhibisyon görülmüştür. Metilen mavisiinin koyun meme doku arginazı üzerindeki inhibitör etkisinin nonkompetitif olduğu ortaya konulmuştur.

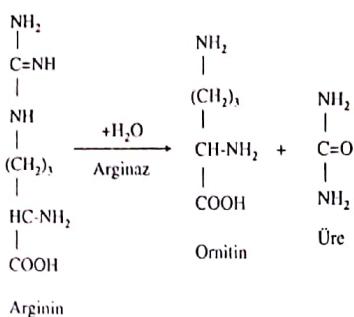
Fotoaktivasyon muhtemelen arginaz molekülünde bulunan histidil artıklarının imidazol gruplarındaki değişiklikle ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Arginaz, fotoaktivasyon, koyun, meme dokusu, metilen mavisi.

\* Bu çalışma, doktora tezinin bir bölümünden özet olup, FÜNAF (Proje No: 359) tarafından desteklenmiştir.

## Giriş

Arginaz (E.C. 3.5.3.1) üre döngüsünün son basamağında L-argininini, üre ve ornitine hidroliz eden sitoplazmik bir enzimdir (12, 19).



Arginaz bakımından en zengin organ karaciğer olup (25,34), bunun dışında böbrek, beyin, bağırsak, troid bezi, tükürük bezi, meme bezi, eritrosit, lökosit, trombosit, iskelet ve kalp kası, plasenta, testis gibi dokularda (5,11,20,21,28,29) ve bronş lavaj sıvısında (1) da bulunmuştur. Arginaz enzimi sadece üretotelik canlılarda bulunmayıp, bazı ürikotelik canlılarda ve bitkilerde de bulunmuştur (6,16,18).

Arginaz bir metaloenzim olup, tam katalitik aktivite göstermesi ve dördüncü yapı şekillenmesi için her subünenin bir mol  $\text{Mn}^{+2}$  içermesi gerekir (4,10,15,17,22,23,27,34).  $\text{Mn}^{+2}$  iyonlarının bağlanması enzimin işiye dayanıklılığını artırmaktır ve inhibitörlerle karşı daha dayanıklı hale gelmesini sağlamaktadır (34).

Metilen mavisinin ışıkta arıtılmış sıçan karaciğer arginazını da fotoaktivasyona uğrattığı ve enzimin aktivitesini önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir (2).

Bu araştırma, laktasyondaki koyun meme doku arginazının kinetik özelliklerini tespit etmek ve metilen mavisinin enzim üzerine olan fotoaktivasyon etkisini araştırmak amacıyla planlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Araştırma materyalini, Elazığ ELET Tesisleri'ne getirilen laktasyondaki Akkaraman koyunların meme dokuları oluşturmuştur. Dokular, 20 baş koyundan, kesimden hemen sonra alınarak %0.9 NaCl çözeltisi içerisinde buz kabında en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılmıştır.

Alınan doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında

kurutulup  $\text{MnCl}_2$  ile sulandırılarak Potter-Elvehjem (cam-cam) homojenizatörle homojen hale getirilmiştir. Homojenat  $+4^\circ\text{C}$ 'de 16000xg'de 15 dakika (Sorvall RC-5B'de) santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra örneklerin süpernatantları ve peletleri birbirinden ayrılmıştır.

Koyun meme doku örneklerinin her mililitre süpernatant için 3 ünite Jack-Bean üreaz ilave edilmiştir. Daha sonra  $37^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika inkübe edilerek endojen ürenin parçalanması sağlanmıştır (24). Arginaz enzim aktivitesi, L-argininin arginaz ile hidrolizi sonucu oluşan ürenin TDMU Metodu ile ölçülmüş sonucu saptanmıştır (13). Örnekler 2 mM  $\text{MnCl}_2$  çözeltisi ile sulandırılarak  $52^\circ\text{C}$ 'de 12 dakika metabolik su banyosunda tutulmasıyla preinkübasyon işlemi sağlanmıştır. Preinkübasyon işleminden sonra örnekler enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

*Örneklerin metilen mavisiyle muamelesi:* Deney şartlarına göre preinkübasyon işlemi metilen mavisinin etkisini araştırmak üzere 12 dakikalık iki periyot halinde toplam 24 dakika olarak uygulanmıştır. Metilen mavisi şartlara göre I. ve II. preinkübasyon aşamasında ilave edilmiştir.

*Örneklerin ışık kaynağı ile muamelesi:* Metilen mavisinin ilave edildiği koşullara göre aynı şekilde preinkübasyonun değişik aşamalarında numuneler 8-10 cm mesafeden 150 W ışık kaynağına maruz bırakılmıştır. 75 mM'lik L-arginin'den (pH 9.5) 0.3 ml ve 100 mM'lik karbonat tamponundan (pH 9.5) 0.4 ml içerecek şekilde düzenlenmiştir. Tüplere önce L-arginin, sonra karbonat tamponu daha sonra üzerine preinkübasyona tabii tutulan enzim kaynağından 0.3 ml eklenerek örnekler  $37^\circ\text{C}$ 'de sallantılı metabolik su banyosunda 15 dakika tutularak enzimatik tepkime başlatılmıştır. 15 dakikalık inkübasyon süresi 3 ml asit karışım ilavesiyle sona erdirilmiştir. Asit ilavesinden sonra tüplere 2 ml renk ayıracı ilave edilmiş, tüpler karıştırılarak 10 dakika kaynar su içersinde tutulmuş ve renk oluşumu sağlanmıştır. Dalga boyu 520 nm'de örneklerin üre miktarları sıfır zaman körlerinin (zero time blank) absorbanslarının çıkarılmasından sonra değerlendirilmiştir.

Protein miktarı Biüret Yöntemi ile saptanmıştır (14).

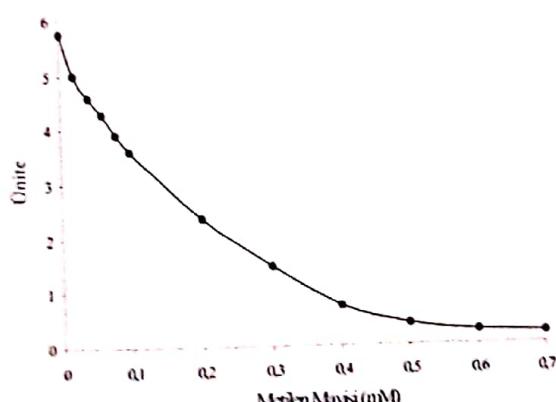
*Ünite:* 1 mg proteinin 1 saatte oluşturduğu üre miktarının  $\mu\text{mol}$  cinsinden ifadesidir. ( $\mu\text{mol}$  üre/mg protein x saat)

## Bulgular

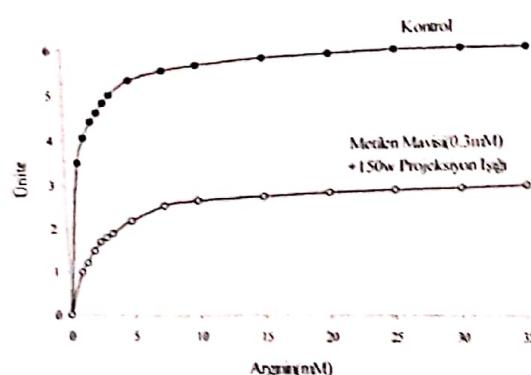
Koyun meme dokusunda arginaz varlığının saptanmasından sonra enzimin kinetik özellikleri tespit edilmiştir. Analizler en az üç kez tekrarlandıktan sonra bulgular açıklanmıştır.

Değişik metilen mavisi konsantrasyonlarında, 150 W projeksiyon ışığı altında, koyun meme doku arginazının fotoaktivasyonu incelenmiş ve metilen mavisinin 0.3 mM konsantrasyonunda %74; 0.7 mM konsantrasyonunda ise %96 aktivite kaybettiği gözlenmiştir (Şekil 1).

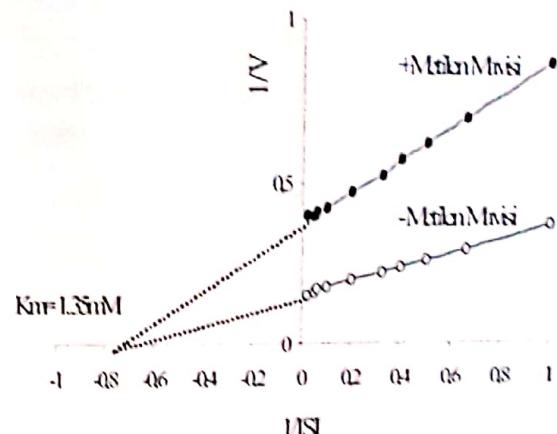
Meten mavisinin arginaz aktivitesi üzerine yaptığı inhibisyonun tipini belirlemek için farklı arginin konsantrasyonlarında, 0.3 mM metilen mavisi kullanılmıştır. Veriler kontrolle karşılaştırılarak  $V_{max}$  değerinin değiştiği  $K_m$  değerinin ise değişmediği bulunmuştur. Metilen mavisinin enzimi nonkompetitif inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 2, 3).



Şekil 1. Metilen mavisinin koyun meme doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi.



Şekil 2. Metilen mavisinin ve ışığın koyun meme doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi.



Şekil 3. Metilen mavisinin koyun meme doku arginaz aktivitesi üzerine etkisinin Lineweaver-Burk yöntemi ile değerlendirilmesi.

Meten mavisinin, koyun meme doku arginaz aktivitesine etkisi oda ışığında, karanlıkta ve 150 W ışık altında araştırılarak kontrole göre değerlendirilmiş ve inhibisyon oda ışığında %76; karanlıkta %63; 150 W ışıkta ise %66 olarak hesaplanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Metilen mavisinin farklı ortamlarda koyun meme doku arginaz aktivitesi üzerine inhibitör etkisi.

Koşullar	Aktivite %	
	Kontrol	Aktivite (+Meten mavisi)
Oda ışığı	100	76
Karanlık	100	63
150 W ışık	100	66

Meten mavisi %0.1 mM ve  $MnCl_2$ 'ün (2 mM), I. ve II. preinkübasyon şartlarının uygulanmasıyla (Tablo 2) sonuçlar değerlendirilmiş; I. Preinkübasyonda sadece  $MnCl_2$  (2 mM) konulmasıyla yapılan çalışmayı kontrol kabul edip diğer çalışmalar bu kontrole göre karşılaştırılmıştır (A). Hem  $MnCl_2$  (2 mM) hem de %0.1 metilen mavisinin I. preinkübasyon 150 w ışık altında yapılan çalışmaya koyun meme doku arginaz aktivitesini %59 inhibe ettiği bulunmuştur (B). Işık altında (150 W) I. preinkübasyonda ise %0.1 metilen mavisi, II. preinkübasyonda ise  $MnCl_2$  (2 mM) eklenliğinde koyun meme doku arginaz aktivitesini %66 inhibe ettiği saptanmıştır (C). Yine 150 W ışık varlığında, I. preinkübasyonda  $MnCl_2$  (2 mM), II. preinkübasyonda ise %0.1 metilen mavisi eklenliğinde koyun meme doku arginaz aktivitesini %86 inhibe ettiği görülmüştür (D).

Tablo 2.  $MnCl_2$ , metilen mavisi ve ışığın koyun meme doku arginazının fotoaktivasyonuna olan etkisi.

$MnCl_2$	%0.1 metilen mavisi	%0.1 metilen mavisi	$MnCl_2$	Işıklandırma			Kalan % aktivite
				150 W ışık	Oda ışığı		
A	+	-	-	-	+	-	100
B	+	+	-	+	-	-	41
C	-	+	+	+	-	-	34
D	+	-	+	-	+	-	14
I. Preinkübasyon			II. Preinkübasyon				

### Tartışma

Bu çalışmada metilen mavisinin koyun meme doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve  $0.3\text{ mM}$  konsantrasyonun  $\%74$ ,  $0.7\text{ mM}$  konsantrasyonun ise  $\%96$  düzeyinde enzimi inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 1). Koyun meme doku arginaz aktivitesi üzerine metilen mavisinin yaptığı inhibisyonun tipini belirlemek için farklı arginin konsantrasyonlarında,  $0.3\text{ mM}$  metilen mavisi kullanılarak aktivite tespit edilmiş,  $V_{max}$  değerinin değiştiği,  $K_m$  değerinin değişmediğini ve nonkompetitif inhibisyonu neden olduğu saptanmıştır (Şekil 2, 3).

Meten mavisinin *M. benedeni* arginazını (32), insan tükürük arginazını (31), manda karaciğer ve böbrek doku arginazını (33) nonkompetitif tipte inhibe ettiği daha önce yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Meten mavisi ile oda ışığında, karanlık ve  $150\text{ W'lik}$  ışık altında enzim preinkübe edilerek bulunan sonuçlar kontrollerle kıyaslanmış ve inhibisyonun derecesi bulunmuştur. İhibisyon sonucu aktivitenin oda ışığında  $\%76$ ; karanlıkta  $\%63$ ;  $150\text{ W}$  ışıkta  $\%66$  olarak bulunmuştur (Tablo 1). Laktasyondaki koyunun meme doku arginazını metilen mavisinin karanlıkta ve  $150\text{ W'lik}$  ışıkta daha kuvvetli inhibe ettiği tespit edilmiştir. Enzimin  $150\text{ W}$  ışık altında reaksiyona sokulması bir fotoaktivasyon olayıdır. Fotoaktivasyon, enzimdeki histidil artıklarının imidazol gruplarının parçalanmasıyla oluşur. Metilen mavisi ve  $150\text{ W}$  ışık varlığında enzimin histidil artığının imidazol gruplarının parçalanmasıyla  $Mn^{+2}$  katyonlarının tetramerik yapıya dönüştüğü ve fotoaktivasyonun meydana geldiği bildirilmiştir (30,31,32,33).

Rat karaciğer arginazı üzerine metilen mavisiyle  $150\text{ W}$  ışık uygulandığında aktivitedeki düşüşün 21 histidil artığının fotoaktivasyona uğramasıyla enzimin ya subunitelere ayrılması veya subunitelerin bir araya gelmesi sonucu olabileceğini açıklamışlardır (3).

Koyun meme doku arginaz enzimin farklı ortamlarda iki farklı preinkübasyon uygulanmış (Tablo 2) ve oda ışığında, sadece  $MnCl_2$ 'nın konulmasıyla yapılan I. preinkübasyon kontrol kabul edilmiş ve diğer uygulamalar bununla kıyaslanmıştır (A).

İşik altında ( $150\text{ W}$ )  $MnCl_2$  ve  $\%0.1$  metilen mavisi I. preinkübasyonda ortama ilave edilmesiyle arginaz aktivitesini  $\%59$  inhibe ettiği (B); I. preinkübasyonda  $\%0.1$  metilen mavisi, II. preinkübasyonda ise  $MnCl_2$  eklendiğinde enzim aktivitesinin  $\%66$ 'ını inhibe ettiği (C); I. preinkübasyonda  $MnCl_2$ , II. preinkübasyonda ise  $\%0.1$  metilen mavisi eklendiğinde koyun meme doku arginaz aktivitesini  $\%86$ 'sını inhibe ettiği ortaya konulmuştur (D).

Carvajal ve ark.(7), insan karaciğerinde yaptıkları çalışmada, tetramer yapıdaki arginazı p-MHBA (p-hidroxi merküri benzoik asit) ile reaksiyona sokmalarıyla aktif dimerlerin olduğunu, ortama 2-merkapto etanol eklenmesiyle bu dimerlerin rejenerasyon yeteneği kazandıklarını bulmuşlardır. Çalışmada bu subunitelerin  $Mn^{+2}$  ile reaksiyona sokulmasıyla enzimin tekrar aktif tetramer yapı kazadığı saptanmıştır.

Başka bir çalışmada (9), insan karaciğer arginazının dördüncü yapısına üzerine  $Mn^{+2}$  iyonlarının etkisi incelenmiş, enzim önce EDTA ile inkübe edilerek, 30 000 Dalton molekül ağırlığında inaktif şeke dönüşmüş, daha sonra  $Mn^{+2}$  iyonlarının ilave edilmesiyle doğal enzimin molekül ağırlığıyla aynı olan yeni rejenere enzim elde edilmiştir. Benzer çalışma (27), rat karaciğeri üzerinde de denenmiş ve aynı sonuç elde edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada (26), arginaz enziminin substrat ilave edilmeden inhibitör ile karşılaşlığında inhibisyonun daha fazla olduğunu, substrat ile inhibitör karşılaşmaktan sonra enzim ilave edildiğinde ise inhibisyonun daha az olduğunu bildirilmiştir.

İnsan karaciğer arginazının mutagenezisi sonucu oluşan histidin-141'e fotoaktivasyonun etkili olmadığı bulunmuştur (8).

Sonuç olarak, ortam ne olursa olsun metilen mavisi koyun meme doku arginazı üzerine inhibitör etki etmektedir; ışığın (150 W) eklenmesi ise, inhibisyonu daha önemli hale getirerek, enzimi fotoaktivasyona uğratmaktadır. Fotoaktivasyon, histidil artıklarının imidazol gruplarına  $Mn^{+2}$  katyonları bağlanınca enzim tetramerik forma geçebilmektedir. Histidil artıklarının imidazol

grupları yıkıma uğrayınca  $Mn^{+2}$  katyonları tetramerik yapının oluşumunu sağlayamamaktadır. Koyun meme doku arginazı, önce  $Mn^{+2}$  katyonları ile preinkübasyona sokulup daha sonra metilen mavisi ile ışığa maruz bırakılmaları sonucunda inaktivasyon düzeyi düşmektedir. Enzimin oligomerik yapıya kavuştuktan sonra histidil artıklarının yıkımı, oligomerik yapının değişimini ancak belli miktarda etkilemektedir. Koyun meme doku arginazının bu şekilde inhibe olduğu açıklanabilir.

## Kaynaklar

1. Altundağ Y. Bronj Lavaj Sivisinda Arginaz Enziminin Özellikleri ve Klinik Diagnostik Önemi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2001.
2. Basch JJ, Wickham ED and Farrell HM. Arginase in lactating bovine mammary glands: Implications in proline synthesis. *J Dairy Sci* 1997; 80: 3241-3248.
3. Ber E and Muszynska G. Chemical modification of rat liver arginase. *Acta Biochimica Polonica* 1979; 26(1-2): 103-114.
4. Bond JS. Effect of manganese and amino acids on proteolytic inactivation of beef liver arginase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1973; 32: 157-165.
5. Braissant O, Gotoh T, Loup M, Mori M, Bachmann C. L-Arginine uptake, the citrulline-NO cycle and arginase II in the rat brain: An in situ hybridization study. *Molecular Brain Research* 1999; 70: 231-241.
6. Campbell JW and Lee TW. Ornithine transcarbamylase and arginase activity in flatworms. *Comp Biochem Physiol* 1963; 8: 29-38.
7. Carvajal N, Martinez J, Oca FM, Rodriguez J and Fernandez M. Subunit interactions and immobilised dimers of human liver arginase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1978; 527: 1-7.
8. Carvajal N, Olate J, Salas M. et. al. Chemical modification and site-directed mutagenesis of human liver arginase: Evidence that the imidazole group of histidine-141 is not involved in substrate binding. *Archives of Biochem Bioph* 1999; 371(2): 202-206.
9. Carvajal N, Venegas A, Oestreicher G and Plaza M. Effect of manganese on the quaternary structure of human liver arginase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1971; 250: 437-442.
10. Christianson DW. Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes. *Prog Biophys Molec Biol* 1997; 67(2-3): 217-252.
11. Fuentes JM, Campo ML and Soler G. kinetics and inhibition by some aminoacids of lactating rat mammary gland arginase. *Arch Int Physiol Biochim Biophysique* 1994; 102: 255-258.
12. Garganta CL and Bond JS. Assay and kinetics of arginase. *analitical biochemistry* 1986; 154: 388-394.
13. Geyer JW and Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analytical Biochemistry* 1971; 39: 412-417.
14. Gornall AG, Bardawill CJ and David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1975; 177: 751.
15. Hirsch-Kolb H, Heine JP, Kolb HJ and Greenberg D. M. Comparative physical-chemical studies of mammalian arginases. *Comp Biochem Physiol* 1970; 37: 345-359.
16. Hosoyama Y. The reversible inactivation of rat- liver arginase at low pH. *Eur J Biochem* 1972; 27: 48-52.
17. Ikemeto M, Tabata M, Murachi T, Totani M. Purification and properties of human erythrocyte arginase. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 547-553.
18. Kang JH and Cho YD. Purification and properties of arginase from soybean, glycine max, axes. *Plant Physiol* 1990; 93: 1230-1234.
19. King J. Arginase. In: *Practical Clinical Enzymology*. D. Van Nostrand Company, London 1965, 220-225.
20. Konarska L and Tomaszewski L. Studies on L-Arginase of small intestine. *Biochemical Medicine* 1975; 14: 250-262.
21. Konarska L, Tomaszewski L and Rolczyk U. Studies on L-Arginase in developing rat small intestine, brain and kidney. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 1986; 35: 170-178.
22. Kuhn NJ, Talbot J and Ward S. pH-sensitive control of arginase by Mn (II) ions at submicromolar concentrations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1991; 286(1): 217-221.
23. Maggini S, Stoecklin-Tschann FB, Mörikofer-Zwez S and Walter P. New kinetic parameters for rat liver arginase measured at near- physiological steady-state concentrations of arginine and  $Mn^{+2}$ . *Biochem J* 1992; 283: 653-660.

24. Mohamed SM and 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.
25. Moreno-Vivian C, Soler G and Castillo F. Arginine catabolism in the phototrophic bacterium *rhodobacter capsulatus* E1 F1. *Eur J Biochem* 1992; 204: 531-537. Moss S. Sodium nucleata inhibition of arginase activity. *Science* 1952, Vol 115: 69- 70.
26. Moss S. Sodium nucleata inhibition of arginase activity. *Science* 1952; 115: 69-70.
27. Muszynska G and Wojtczak M. Influence of immobilization on conformation of rat liver arginase. *Int J Biochem* 1979; 10: 665-668.
28. Nadolska-Lutyk J, Grabon W and Poremska Z. Arginase in bull testis. *Acta Biochimica Polonica* 1990; 37(3): 377-384.
29. Nakamura H, Saheki T and Nakagawa S. Differential cellular localization of enzymes of L-Arginine metabolism in the rat brain. *Brain Research* 1990; 530: 108-112.
30. Ozan S ve Gülen \$. Farklı türlerin organlarında bulunan arginazların metilen mavisi ile fotoaktivasyonu. *Doğa Tr J Biology* 1991; 15: 222-
31. Ozan S, Gürsu MF ve Gülen \$. İnsan tükürük arginazının fotoaktivasyonu. *Biyokimya Dergisi* 1991; 16(3): 57-65.
32. Özdemir N, Ozan S. M. benedeni arginazının fotoaktivasyonu ve kinetik özellikleri. *Erciyes Univ Sağlık Bil Derg* 1993; 2 (2): 152-157.
33. Özdemir N ve Özçelik M. Manda karaciğer ve böbrek doku arginazının fotoaktivasyonu ve kinetik özellikleri. *Tr J Vet Anim Sci* 2001; 25(6): 995-1000.
34. Spector EB, Rice SCH, Moedjono S, Bernard B and Cederbaum SD. Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Biochemical Medicine* 1982; 28: 165-175