

KOYUN KARACİĞER DOKU ARGİNAZININ GUANİDİN VE BAZI AMİNO ASİTLER TARAFINDAN İNHİBİSYONU VE İNHİBİSYONUN KİNETİĞİ

Fulya BENZER¹

Sema TEMİZER OZAN²

Seval YILMAZ²

¹Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Elazığ – TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 29.11.2002

Inhibition and Its Kinetics of Arginase by Guanidin and Some Amino Acids in Sheep Liver Tissue

Summary

In this study, the inhibition effects of guanidin and some amino acids on arginase activity in sheep liver tissue were studied. Thiosemicarbazide-Diacetylmonoxime-Urea method was used to measure arginase activity.

Guanidin, a guanidino compound, inhibited the enzyme activity uncompetitively while L-amino acids, such as valine, leucine, isoleucine and lysine inhibited the enzyme activity competitively-noncompetitively (mixed). Low concentration of leucine caused activation while higher concentration caused inhibition.

Key Words: Arginase, sheep, liver, guanidin, amino acids

Özet

Çalışmada, koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine guanidin ve bazı amino asitlerin inhibisyon etkileri incelenmiştir. Arginaz aktivitesi ölçümü için Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim-Üre metodu kullanılmıştır.

Bir guanidino grubu bileşiği olan guanidin, enzimi unkompetitif olarak inhibe ederken, valin, löysin, izolöysin ve lizin amino asitleri ise karışık inhibisyon (kompetitif-nonkompetitif) neden olmuştur. Löysin'in düşük konsantrasyonları koyun karaciğer doku arginazının aktivasyonuna yol açarken, yüksek konsantrasyonları enzimi inhibe etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Arginaz, koyun, karaciğer, guanidin, amino asitler

Giriş

Arginaz (L-arginin amidinohidrolaz; EC 3.5.3.1) üreotelik hayvanların karaciğerinde L-arginini, üre ve L-ornitine hidrolize eden bir enzimdir (18,24). Karaciğer dokusu dışında üre döngüsünün bulunmadığı laktasyondaki meme bezi (16), böbrek (15,18,21,28), prostat (28) ve aktive olmuş makrofajlar (15) gibi dokularda da arginaz aktivitesi bulunmuştur. Biyolojik sistemlerde arginaz enziminin görev aldığı başlıca metabolik yollar, üre döngüsü, prolın ve poliaminlerin biyosentez yoludur (29). Nitrik oksit radikalini sentezleyen nitrik oksit sentaz enzimi ile arginaz enzimi substratları olan L-arginin için yarışmaktadır (15).

Amino asitlerin bir kısmının arginaz enzimini inhibe ettiği, bunlardan en etkili iki tanesinin kompetitif inhibitörler olarak etkiyen ornitin ve lizin olduğu bulunmuştur (9,25). Löysin, izolöysin ve valin gibi dallanmış karbon iskeletine sahip amino asitlerin sığır karaciğerinde (5), rat karaciğer ve böbreğinde (7), insan kalbinde (3) meydana getirdiği inhibisyon tipi türden türe değişmektedir.

Bu çalışmada, koyun karaciğer doku arginazı üzerine bazı amino asitlerin ve yapısal açıdan arginine benzeyen guanidin'in etkileri incelenmiştir.

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 labaratuvara getirilmiştir.

Karaciğer doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan sonra 1 g olarak tartılıp, 4 mM MnCl₂ (1/10, w/v) ilavesinden sonra kırılmış buz içerisinde (Potter-Elvehjem,cam-cam) homojenizatörle homojenize edilmiştir. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 21000 g'de +4°C'de 15 dakika (23) santrifüje tabi tutulmuş 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-Diasetilmonoksim-Üre (TDMU) metodu (14) ile ölçülmeli ile saptanmıştır. Protein miktarının ölçümünde ise Lowry (20) metodu kullanılmıştır.

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

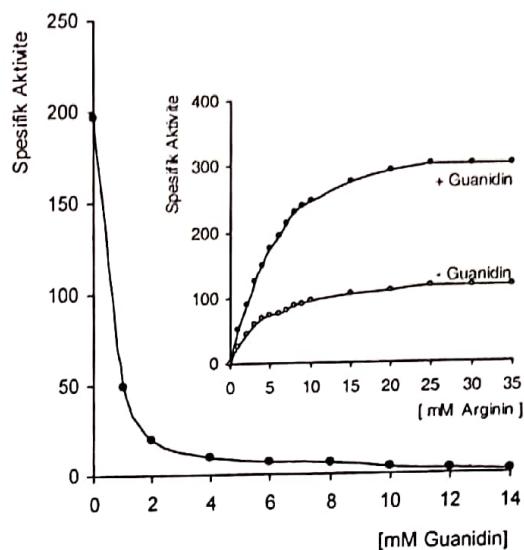
Bulgular

İnkübasyon ortamındaki L-arginin konsantrasyonu sabit tutulup, preinkübasyon ortamına guanidin ve L-amino asitlerden valin, löysin, izolöysin ve lizin farklı konsantrasyonlarda ilave edilerek karaciğer doku arginaz enzimi üzerine inhibitör etkileri ve inhibisyon oranları araştırılmıştır. Löysin 10 mM'a kadar aktivasyona, 15 mM'dan itibaren ise inhibisyon yol açarken, 2 mM'lık guanidin %90'luk (Şekil 1), 40 mM'lık valin %76'luk (Şekil 2), 40 mM'lık löysin %43'lük (Şekil 3), 30 mM'lık izolöysin varlığında %66'luk (Şekil 4), 55 mM'lık lizin varlığında ise enzim aktivitesinde %74'lük (Şekil 5) bir inhibisyon gözlenmiştir.

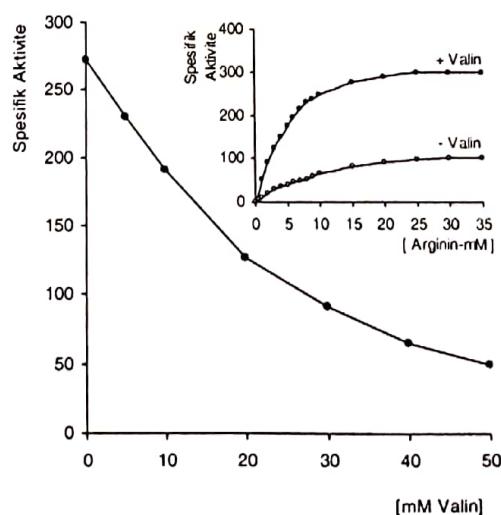
Bulguların Michealis-Menten eğrisi ile değerlendirilmesi sonucunda guanidinin arginazın V_{max} 'ını ve K_m 'ini kontrole göre düşürdüğü, enzimin L-arginine karşı K_m 'ı 4 mM ve V_{max} 'ı 300 Ü/protein civarında iken guanidinin varlığında K_m 2,6 mM'a ve V_{max} 112 Ü/proteine düşüğü ve guanidinin enzimi unkompetitif olarak inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil 1).

L-amino asitlerin tamamı enzimin V_{max} 'ını kontrole göre düşürerek, K_m 'ini ise artırarak karışık inhibisyon (kompetitif-nonkompetitif) şekillendirmiştir. Enzimin K_m 'ı L-arginine karşı 4 mM iken, amino asitlerden valin (Şekil 2) ve löysin için bu değer 6,6 mM (Şekil 3), izolöysin için 7 mM (Şekil 4) ve lizin için 8 mM (Şekil 5) bulunmuştur. Aynı şekilde enzimin V_{max} 'ı L-arginine karşı 300 Ü/protein iken amino asitlerden valin ve izolöysin için bu değer 100 Ü/protein, lizin için 112 Ü/protein ve löysin için 160 Ü/protein civarındadır. Bu verilerden de anlaşılacağı gibi amino asitlerin yol açtığı bu inhibisyon şekillerinde enzimin V_{max} 'ları küçülmekte, K_m 'leri ise büyümektedir, bir başka deyişle karışık inhibisyon söz konusudur.

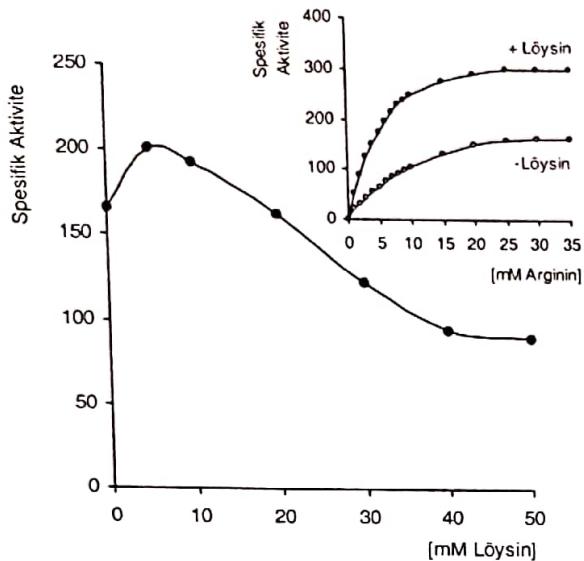
Yapılan çalışmalar sonucunda amino asitlerden löysinin düşük konsantrasyonlarda enzimi aktive ettiği, yüksek konsantrasyonlarda ise inhibe ettiği anlaşılmıştır.



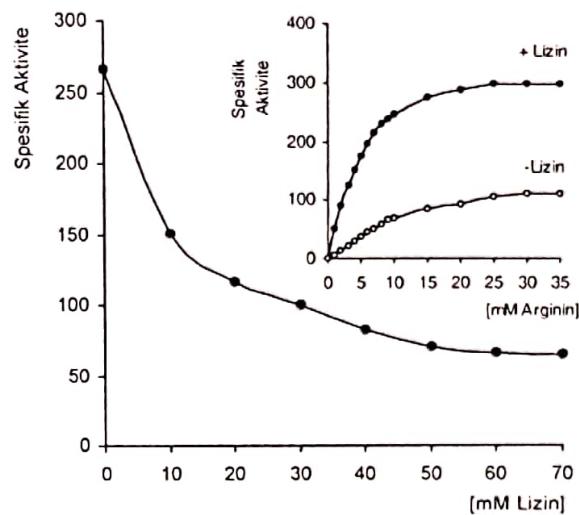
Şekil 1. Guanidinin koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi ve Guanidin varlığında, enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişiminin Michaelis-Menten Eğrisiyle incelenmesi



Şekil 2. L-Valinin koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi ve L-Valin varlığında, enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişiminin Michaelis-Menten Eğrisiyle incelenmesi



Şekil 3. L-Löysinin koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi ve L-Löysin varlığında, enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimini Michaelis-Menten Eğrisiyle incelenmesi



Şekil 5. L-Lizinin koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi ve L-Lizin varlığında, enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimini Michaelis-Menten Eğrisiyle incelenmesi

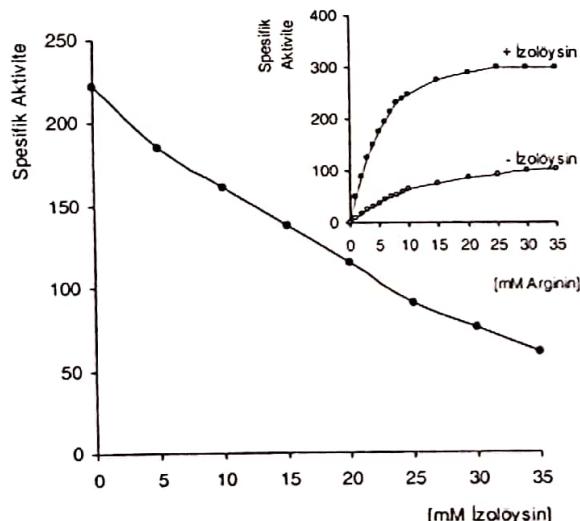
Tartışma

Guanidino grubu bileşikler ve amino asitlerin birçoğundan arginaz enzimini inhibe ettiği ve inhibisyonun tipinin doku ve türe göre değiştiğini bildiren pek çok çalışma vardır (5,7,11,13,19).

Fuentes ve ark. (13) laktasyondaki rat meme bezini arginazı üzerinde prolin, lizin, ornitin, izolöysin, löysin ve valinin etkisini araştırmışlar, amino asitlerden sadece valin güçlü bir inhibisyon yol açarken, diğer tüm amino asitlerin daha zayıf bir inhibisyon etkisine sahip oldukları bulmuşlardır.

Carvajal ve Cederbaum (7) rat karaciğer ve böbrek arginazının, Bond (5) sığır karaciğer arginazının izolöysin, löysin ve valin gibi dallanmış zincirli amino asitler tarafından nonkompetitif olarak inhibe edildiğini, Kesava Rao ve arkadaşları (19) Mn⁺⁺ katyonları ile preaktive edilmemiş koyun karaciğerinde bu amino asitlerin kompetitif, Mn⁺⁺ katyonları ile aktive edilmiş koyun karaciğerinde ise karışık veya nonkompetitif inhibisyon yol açtığını bildirmiştir.

pH 7.5'da löysin, izolöysin, valin rat karaciğer arginazını kompetitif, böbrek arginazını nonkompetitif olarak inhibe etmektedir. pH 9.5'de dallanmış zincirli amino asitlerle karaciğer arginazı, böbrek arginazından daha fazla inhibe olmuştur. Fakat dallanmış zincirli amino asitlerin her iki enzim üzerindeki etkileri pH 7.5'de gözlenenden daha düşük bulunmuştur. Böbrek arginazı karaciğer arginazına oranla prolinle inhibisyonu karşı daha



Şekil 4. L-İzolöysinin koyun karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi ve L-İzolöysin varlığında, enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimini Michaelis-Menten Eğrisiyle incelenmesi

fazla duyarlı iken, valin, löysin, izolöysin gibi dallanmış zincirli amino asitlerle inhibisyonu karşı karaciğer arginazı böbrek arginazına oranla daha duyarlı bulunmuştur (7).

Saflaştırılmış insan karaciğer arginazından elde edilen All'nin karışık tip inhibisyon göstermesi (K_m artmakta, V_{max} azalmakta) Enzim-Substrat [ES] kompleksine inhibitörün bağlanması sonucu substrat yıkımının engellenmesiyle açıklanmıştır (4).

Ayyıldız ve Gökhun (2), Sodyum siyanid ($NaCN$)'ın sığır karaciğer arginaz enzimini karışık tipte inhibisyonu uğrattığını bulmuşlar ve bu inhibisyon tipinin kompetitif ve nonkompetitif inhibisyonun bir bileşimi olarak kabul edilebileceğini, inhibitör varlığında substrat [S] ne kadar artarsa artsın, enzimin non-produktif Enzim-Substrat-İnhibitör [ESI] veya Substrat-İnhibitör [SI] formunu sentezleyeceğini öne sürmüştürler, inhibisyonun siyanid (CN)'in bir nükleofil olarak disülfid bağlarına saldırması ve enzimi denatüre etmesi üzerinden oluşturduğu kanısına varmışlardır.

Muszynska ve Wojtczak (22), amino asitleri bir ligand olarak kabul etmekte, arginaza bu ligandların bağlanmasıının, arginazın yapısının değişimine ve bu değişimin de [ES] kompleksinin turnover'ını bozduğunu, keza sıçan karaciğer arginazını L-amino asitlerden ornitin ve lizinin kompetitif, valin, löysin, izolöysin ve sisteinin ise nonkompetitif tipte inhibisyonu uğrattığını belirtmişlerdir.

Bu çalışmada amino asitlerin yüksek konsantrasyonları kullanılmış ve pH:9.2'de inhibisyonun kinetiği çalışılmıştır. Amino asitler konusunda yapılan bu çalışmanın diğerlerinden farkı, löysinin düşük konsantrasyonlarda aktivasyon, yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon etkisini göstermesi ve inhibitör etkisi olan bu amino asitlerin hepsinin koyun karaciğer arginazını kompetitif-nonkompetitif (karışık) olarak inhibe etmesidir (Şekil 2-5).

Arginin analogu olan guanidin koyun karaciğer arginazının V_{max} 'ını ve K_m 'ini kontrole göre düşürerek unkompetitif inhibisyonu sebep olmuştur. Arginin konsantrasyonundaki artışın inhibisyonu önleyememesi, unkompetitif inhibitörlerin serbest enzime değil de [ES] kompleksine bağlanması ile açıklanabilir.

Sığır rumen doku arginazı üzerinde yapılan bir çalışmada (10), guanido bileşiklerinden kanavanin, agmatin ve guanidin enzimin K_m 'ini değiştirmezken V_{max} 'ını azaltarak nonkompetitif inhibisyonu sebep olmuşlardır.

Bond (5), non-kompetitif inhibisyonu neden olan inhibitörlerin substrattan farklı bir noktada enzimle reverzibl olarak birleştiğini ve ligandların büyük bir olasılıkla [ES] kompleksinin turnover'ını bozan yapısal değişimine yol açtığını ve enzimin proteolitik inaktivasyona duyarlığını artırdığını öne sürmüştür.

Kaysen ve Strecker (18), böbrek dokusunda yüksek argininin konsantrasyonlarıyla enzimin aktivasyonunun, prolin ve lizin amino asitlerinin belirli konsantrasyonları ile engellenebildiğini ve bu verilerin enzim üzerinde belirli amino asitler ve arginin için ayrı iki bağlanma noktasının varlığına işaret ettiğini bildirmektedirler.

İnsan karaciğer (6) ve rat böbreğindeki (18) arginazlar üzerinde allosterik bölgelerin varlığı konusunda kanıtlar vardır. Dallanmış zincirli amino asitler tarafından oluşturulan kısmı inhibisyonlar arginaz üzerinde allosterik bir bölgenin varlığını, inhibitörün bu bölgeye bağlandığını (non-kompetitif inhibisyon) ve enzim amino asit kompleksinin enzimatik olarak aktif olduğunu göstermektedir (7).

Lizinin arginazın etkili bir inhibitörü olduğu bilinmektedir. Koyun karaciğer dokusunda 55 mM'lık lizinin arginaz aktivitesini %74 oranında inhibe ettiği ve inhibisyon tipinin karışık olduğu bulunmuştur. Ameen ve Palmer (1) lizinin karaciğer arginazının karışık inhibisyonuna sebep olduğunu, Subrahmanyam ve Reddy (27), ornitin ve lizinin sığır karaciğer doku arginazını kompetitif olarak inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Ratlarda aşırı miktardaki lizinin karaciğer arginaz aktivitesini inhibe etmesi sonucu (8), arginin miktarlarında görülen artışı (26), orotik asit ve amonyak düzeylerindeki artış ve üre sentezindeki gerilemenin izlediği bildirilmiştir (12). Yüksek lizin konsantrasyonları aynı zamanda mitokondrial ornitin alınımını engelleyerek üre döngüsünün zayıflamasına da neden olabilmektedir.

Intravenöz lizin infüzyonunun plazma amonyak, arginin ve ornitin, idrar homositrüllin, putressin ve orotik asit düzeylerinde artışa yol açarken, plazma üre ve sitrüllin düzeylerinde sınırlı değişimlere yol açmasının lizinin arginaz aktivitesini engellediğinin bir göstergesi olarak değerlendirilebileceği bildirilmektedir (17).

Koyun karaciğer enzim aktivitesinde dallanmış zincirli amino asitlerden valin %76'luk, löysin %43'lük, izolöysin %66'luk bir inhibisyonu neden olmuştur. Rao ve ark. (19), arginazın saturasyon altı konsantrasyonlarda dallanmış zincirli amino asitlerle daha fazla inhibisyonunu kaydetmişler, böylece

dallanmış zincirli amino asitlerin hücre içinde güçlü inhibitör etkiye sahip oldukları belirtmişlerdir.

Sonuç olarak, koyun karaciğer arginazı üzerine guanidinin ve amino asitlerin etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, guanidinin unkompetitif, amino asitlerin ise karışık tip inhibisyon sebep oldukları

Kaynaklar

1. Ameen M, Palmer T. Inhibition of urea cycle enzymes by lysine and saccharopine. *Biochem Int* 1987; 14(3): 395-400.
2. Ayyıldız A, Gökhun Hİ. Kısmen saflaştırılmış sığır karaciğer arginazının kinetik özellikleri ve bazı kimyasal bileşiklerin enzim aktivitesine etkilerinin araştırılması. *Ankara Univ Tip Fak Mec* 1999; 52(2): 71-76.
3. Baranczyk-Kuzma A, Skrzypek-Osiecka I, Zalejska M, Porembaska Z. Purification and some properties of human heart arginase. *Acta Biochim Pol* 1980; 27 (3-4): 181-199.
4. Bascur L, Cabello J, Veliz M, Gonzalez A. Molecular forms of human liver arginase. *Biochim Biophys Acta* 1966; 128 (1): 149-154.
5. Bond JS. Effects of manganese and amino acids on proteolytic inactivation of beef liver arginase. *Biochim Biophys Acta* 1973; 327 (1): 157-165.
6. Carvajal N, Acoria M, Rodriguez JP, Fernandez M and Martinez J. Evidence for cooperative effects in human liver arginase. *Biochim Biophys Acta* 1982; 701 (1): 146-148.
7. Carvajal N, Cederbaum SD. Kinetics of inhibition of rat liver and kidney arginases by proline and branched-chain amino acids. *Biochim Biophys Acta* 1986; 870 (2): 181-184.
8. Cittadini D, Pietropaolo C, de Cristofaro D, D'Ajello-Caracciolo M. In vivo effect of L-lysine on rat liver arginase. *Nature* 1964; 203:643-644.
9. Colombo J, Konarska L. Arginase. Ed. Bergmeyer ,H.U. In: Methods of Enzymatic Analysis. 3 rd. Verlag Chemic GmbH, Weinheim, 285-294. 1984.
10. Erişir M, Temizer Ozan S. Sığır rumen doku arginazında -SH gruplarının varlığı ve enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonları ile guanidino bileşiklerinin etkisi. *Biyokimya Dergisi* 1998; 3 (23): 24-30.
11. Erişir M, Ozan S. Sığır rumen doku arginazının bazı amino asitler tarafından inhibisyonu ve kinetiği. *Turk J Vet Anim Sci* 2000; 24: 65-70.
12. Fico ME, Hassan AS, Milner JA. The influence of excess lysine on urea cycle operation and pyrimidine biosynthesis. *J Nutr* 1982; 112 (10):1854-1861.
13. Fuentes JM, Campo ML, Soler G. Kinetics and inhibition by some aminoacids of lactating rat mammary gland arginase. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 1994; 102 (5): 255-258.
14. Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem* 1971; 39 (2): 412-417.
15. Gotoh T, Sonoki T, Nagasaki A, Terada K, Takiguchi M, Mori M. Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Lett* 1996; 395 (2-3): 119-122.
16. Jenkinson CP, Grigor MR. Rat mammary arginase: Isolation and characterization. *Biochem Med Metab Biol* 1994; 51 (2): 156-165.
17. Kato T, Sano M, Mizutani N. Inhibitory effect of intravenous lysine infusion on urea cycle metabolism. *Eur J Pediatr* 1987; 146 (1): 56-58.
18. Kaysen GA, Strecker HJ. Purification and properties of arginase of rat kidney. *Biochem J* 1973; 133 (4): 779-788.
19. 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.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
21. Morris SM, Bhamidipati D and Kepka-Lenhart D. Human type II arginase: Sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene* 1997; 193(2): 157-161.
22. Muszynska G and Wojtczak M. Influence of immobilization on conformation of rat liver arginase. *Int J Biochem* 1979; 10: 665-668.
23. Ozan S ve Gülen Ş. Farklı türlerin organlarında bulunan arginazların metilen mavisi ile fotoaktivasyonu. *Doğa-tr J of Biology* 1991; 15: 222-229.
24. 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, 251-263. 1982.
25. Soler G, Mataix FJ and Ruiz-Amil M. Physico-chemical properties of guinea pig liver arginase. *Rev Esp Fisiol* 1981; 37 (1): 37-44.

26. Stater M, Russel A. Competitive interrelationships between lysine and arginine in rat liver under normal conditions and in experimental hyperammonemia. *Life Sci* 1978; 22: 2097-2102.
27. Subrahmanyam TSR, Reddy RR. L-ornithine and L-lysine need their α -carboxyl groups for effective inhibition of bovine liver arginase. *Ind Biochemistry Biophysics*. 1986; 23: 359-361.
28. Vockley JG, Jenkinson CP, Shukla H, Kern RM, Grody WW, Cederbaum SD. Cloning and characterization of the human type II arginase gene. *Genomics* 1996; 38 (2): 118-123.
29. Williams Ashman HG, Canellakis ZN. Polyamines in mammalian biology and medicine. The University of Chicago Press. Perspective in biology and medicine. 421-451, 1979.