



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2010: 24 (1): 23 - 27
<http://www.fusabil.org>

Koyun Böbrek Doku Arginazının *Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)*, *Para Kloromerküri Benzoik Asit (P-CMBA)*, *N- Etil Maleimid (NEM)* Tarafından İnhibisyonu ve İnhibisyon Kinetiği

Mehtap ÖZÇELİK¹
Fatih Mehmet KANDEMİR²
Necmi ÖZDEMİR²

¹Veteriner Kontrol ve
Araştırma Enstitüsü,
Elazığ, TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

Bu çalışmada koyun böbrek doku arginazı üzerine EDTA, NEM, p-CMBA' in inhibisyon etkileri incelenmiştir. Arginaz aktivitesi Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim-Üre metodu kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Protein Lowry metoduna göre saptanmıştır. Koyun böbrek dokuları Elazığ Elkas Kesimevi'nden temin edilmiştir. Araştırmada 20 tane koyun böbrek dokusu kullanılmıştır. Sonuç olarak, koyun böbrek doku arginazını EDTA' nın kompetitif tipte; NEM, p-CMBA' in ise nonkompetitif tipte inhibisyona uğrattığı saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Arginaz, EDTA, NEM, p-CMBA.

Inhibitory Effect of Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA), p-Chloromercuri Benzoic Acid (p-CMBA), N-Ethyl Maleimide (NEM) on Arginase Activity of the Sheep Kidney Tissue and Kinetic of Inhibition

In this study, the inhibition effects of EDTA, p-CMBA, NEM on arginase activity in sheep kidney tissue were studied. Arginase activity was spectrophotometrically measured using the Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim-Urea Method. Protein was determined by the method of Lowry. The kidney tissues of sheep in the present study were obtained from the Elkas slaughterhouse in Elazığ. This study was carried out using 20 sample of kidney tissue. In conclusion, arginase activity in sheep kidney tissue was determined to be inhibited competitive inhibition by EDTA but to be inhibited noncompetitive inhibition by NEM, p-CMBA.

Keywords: Arginase, EDTA, NEM, p-CMBA.

Giriş

Arginaz (L- arginin amidinohidrolaz; EC 3.5.3.1) üreotelik hayvanların karaciğerlerindeki yüksek toksisiteye sahip amonyum iyonlarının uzaklaştırılması için L- arginini, üre ve L- ornitine hidrolize eden bir enzimdir (1).

Karaciğer dokusu dışında arginaz enzimi böbrek, beyin, bağırsak, troid bezi, tükrük bezi, eritrosit, laktasyondaki meme bezi, dalak, testis gibi dokularda da bulunmaktadır (2-12).

Arginazın esas fonksiyonu üre döngüsüne katılmaktır (1, 5, 7). Bunun yanında üre döngüsü bulunmayan ekstrahepatik dokularda ise proteinlerin yapısına katılan prolin ve hidroksiprolinin sentezinde (13), poliaminlerin biyosentezinde gerekli ornitin üretiminde, ayrıca immun cevap oluşumunda ve tümör biyolojisinde de rol oynadığı saptanmıştır (14, 15).

Arginazın tam aktivite gösterebilmesi için Mn^{+2} iyonları gereklidir (11). Mn^{++} iyonları arginazın tetramer yapı kazanarak inhibitörlere karşı daha stabil hale gelmesini sağlamaktadır (16-17). Bazı amino asitlerin arginazı inhibe ettiği bilinmektedir. Prolin, ornitin, sistein, lizin, valin gibi amino asitlerin birçoğu arginazı inhibe etmekte ve inhibisyonun tipi birçok doku ve türe göre değişmektedir (18,19). Bunun yanında Borat, EDTA (20), kanavanin, NEM, p-CMBA (18), metilen mavisi (21) gibi maddelerin de arginazı inhibe ettiği ortaya konulmuştur. p-CMBA, EDTA ve NEM enzimlerin aktif merkezinde -SH grubu içeren amino asitler olup olmadığını belirlemek için kullanılan kimyasal maddeler olup bu maddeler -SH gruplarını bloke ederek enzimin inhibisyonuna neden olmaktadır (22).

Bu çalışmada p- CMBA, NEM, EDTA'nın koyun böbrek doku arginazı üzerine inhibisyon etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırmada kullanılan materyal Elazığ Elkas Kesimevi'nde kesilen aynı fiziksel özelliklere ve beslenme şartlarına sahip 20 tane koyun böbrek dokusu olup, bu dokular % 0,9'luk NaCl içinde en kısa zamanda laboratuara getirilmiştir.

Geliş Tarihi : 22.01.2010
Kabul Tarihi : 15.03.2010

Yazışma Adresi Correspondence

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

fmk_03@mynet.com

Alınan dokular iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan sonra $MnCl_2$ (1/ 10, w/ v) ile sulandırılarak Potter Elvehjem (cam-cam) homojenizatörde homojenize edilip homojenatlar soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 16000xg'de 15 dakika santrifüj işlemine tabii tutulduktan sonra üste kalan süpernatant alınarak enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

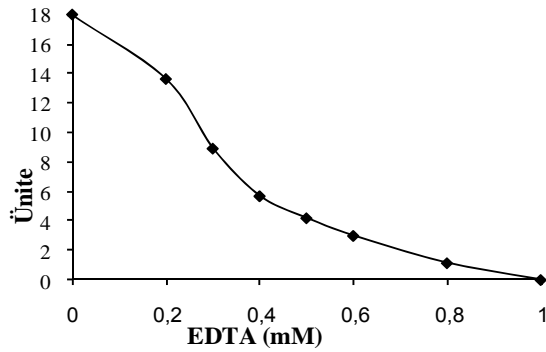
Enzim aktivitesi Tiyosemikarbazid Diasetilmonoksim Üre (TDMU) Metodu ile ölçülmüştür (23). Enzim kaynakları 2,5 mM'lık $MnCl_2$ ile reaksiyona sokularak, 55°C'de 10 dakika preinkübasyona tabii tutulmuştur. L-argininden 0,3 ml (pH 9,7), karbonat tamponundan (pH 9,7) 0,4 ml ve üzerine 0,3 ml enzim kaynağı konularak 37°C'de 10 dakika sallantılı su banyosunda inkübasyona tabii tutulmuştur. Daha sonra 3 ml asit ayırıcı ilave edilip reaksiyon durdurulmuş ve 2 ml renk ayırıcı ilave edilerek 10 dakika kaynar su hamamında bekletilmiştir. 520 nm dalga boyunda örneklerin absorbanlarından sıfır zaman körlerinin absorbanları (zero time blank) çıkarıldıktan sonra üre miktarları değerlendirilmiştir.

Protein miktarı ise Lowry Metodu ile saptanmıştır (24).

Çalışmada 1 ünite enzim; 1 saatte, 37 °C' de L-argininden 1 µmol üre oluşturan enzim miktarı olup, spesifik aktivite µmol üre/ saat/ mg protein olarak ifade edilmiştir.

Bulgular

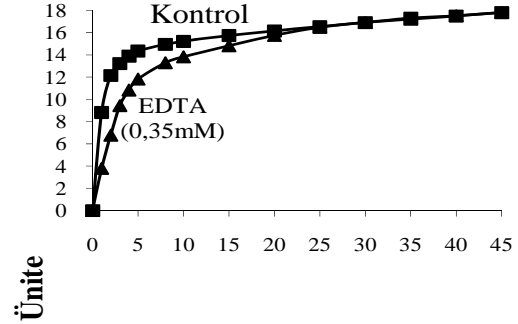
Koyun böbrek doku arginazı üzerine EDTA'nın inhibisyon etkisi araştırılmıştır (Şekil 1). İnkübasyon ortamındaki L- arginin konsantrasyonu sabit tutulup, preinkübasyon ortamına 0-1 mM arasında değişen farklı konsantrasyonlarda EDTA ilave edilerek aktivite kaybı kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir. Enzim aktivitesinin 0,2 mM'da % 25; 0,4 mM'da % 68 ve 1 mM da ise % 100 kayb olduğu görülmüştür.



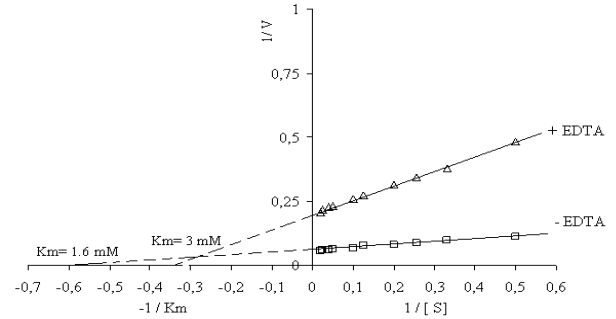
Şekil 1. EDTA' nın koyun böbrek doku arginazı üzerine inhibisyon etkisi.

EDTA'nın yaptığı inhibisyon tipini tespit etmek amacıyla 0,35 mM EDTA kullanılmış ve sonuçlar Michaelis-Menten grafiğinde değerlendirilmiştir (Şekil 2). Şekil 3'de görüldüğü gibi koyun böbrek doku arginazın

Vmax değerinin değişmediği, Km değerinin ise değişerek enzimde kompetitif inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir.

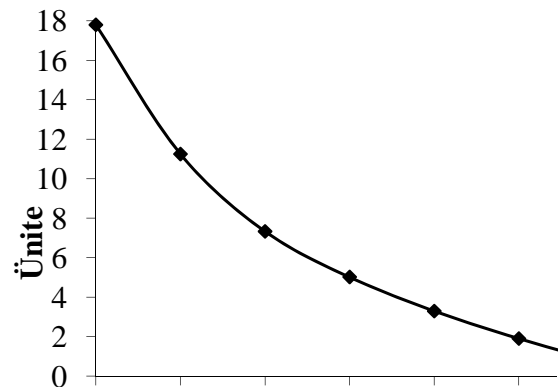


Şekil 2. Farklı L-arginin konsantrasyonlarında EDTA varlığında arginaz aktivitesindeki değişiklikler.



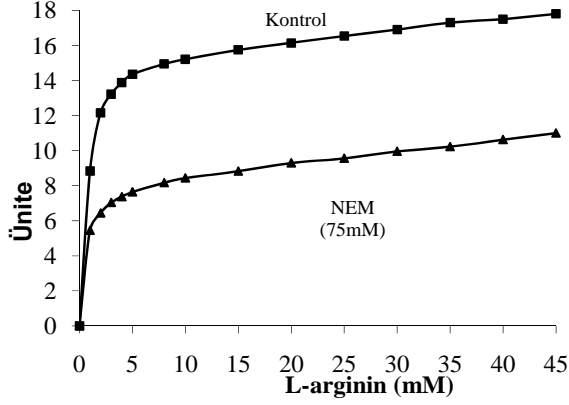
Şekil 3. EDTA tarafından arginaz aktivitesinin L-arginin konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiminin Lineweaver- Burk eğrisi ile gösterilmesi.

Farklı NEM konsantrasyonlarında arginaz aktivitesi incelenmiş, 20-120 mM arasında değişen NEM konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Aktivitede 20 mM'da % 37, 60 mM'da % 72, 100 mM'da % 90, 120 mM'da % 96 azalma olmuştur (Şekil 4).

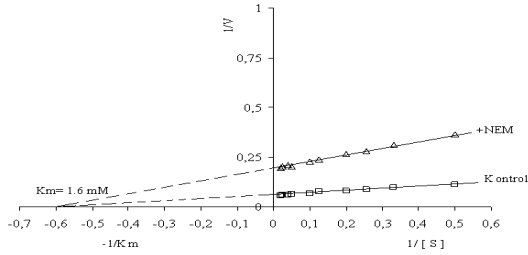


Şekil 4: NEM' in koyun böbrek doku arginazı üzerine inhibisyon etkisi.

Farklı arginin konsantrasyonlarında ve 75 mM NEM varlığında koyun böbrek doku arginaz aktivitesi bulunarak kontrole göre değerlendirilmiştir. Vmax değerinin değiştiği Km'lerinin ise değişmediği görülmüş ve NEM' in koyun böbrek doku arginaz enzimini nonkompetitif olarak inhibe ettiği ortaya konmuştur (Şekil 5, 6).

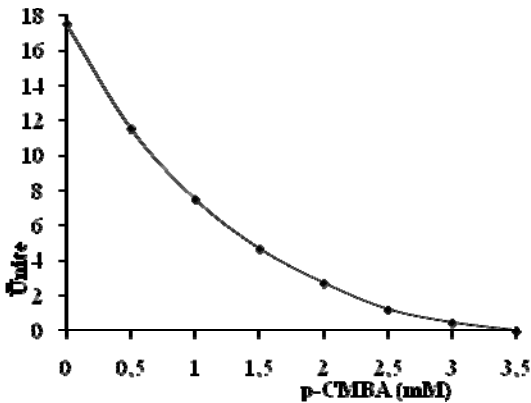


Şekil 5: Farklı L-arginin konsantrasyonlarında ve NEM varlığında arginaz aktivitesindeki değişiklikler.



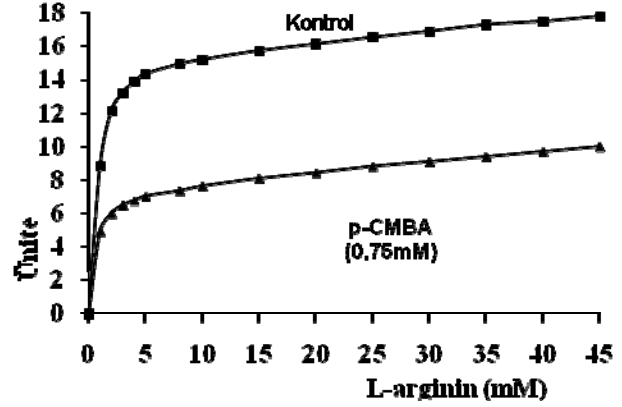
Şekil 6: NEM tarafından arginaz aktivitesinin L-arginin konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiminin Lineweaver- Burk eğrisi ile gösterilmesi.

p-CMBA, 0,5- 3,5 mM arasında değişen konsantrasyonlarda preinkübasyon ortamına ilave edilerek enzim üzerine inhibitör etkisi incelenip kontrole göre değerlendirilmiştir. Enzim aktivitesinde 0,5 mM'da % 34, 1 mM'da % 57, 2,5 mM'da % 93, 3,5 mM'da ise %100 azalma olmuştur (Şekil 7).

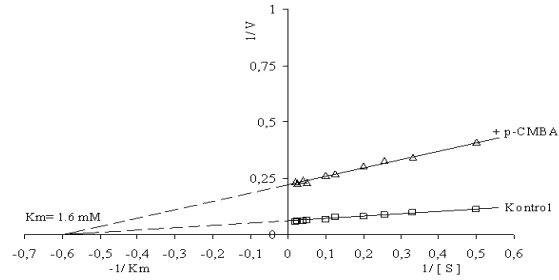


Şekil 7. p-CMBA'nın koyun böbrek doku arginazı üzerine inhibisyon etkisi.

0,75 mM p-CMBA varlığında ve inkübasyon ortamındaki arginin konsantrasyonlarını değiştirerek, koyun böbrek doku arginaz aktivitesi ölçülüp inhibisyon etkisinin varlığı kontrole göre değerlendirilmiştir. Hem Michaelis-Menten eşitliği (Şekil 8) ile hem de Lineweaver- Burk eğrisi (Şekil 9) ile değerlendirilmesi sonucu p- CMBA'in Vmax'ı değiştirip Km değerini değiştirmedeği görülmüş ve arginaz enzimini nonkompetitif olarak inhibe ettiği saptanmıştır.



Şekil 8: Farklı L-arginin konsantrasyonlarında p-CMBA varlığında arginaz aktivitesindeki değişiklikler.



Şekil 9: p-CMBA tarafından arginaz aktivitesinin L-arginin konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiminin Lineweaver- Burk eğrisi ile gösterilmesi.

Tartışma

Koyun böbrek doku arginazı üzerine EDTA, p-CMBA, NEM'in etkisi araştırılmış, farklı konsantrasyonlarda inhibitörler enzim kaynağı ile reaksiyona sokularak inhibisyon etkisi incelenmiştir (Şekil 1,4,7). Bu şekilde 0,2 mM EDTA konsantrasyonunda enzimin %25 aktivite kaybettiği tespit edilmiş, konsantrasyon 1mM üstüne çıkıldığında ise aktivite kaybının %100 olduğu görülmüştür (Şekil 1). EDTA 0,35 mM kullanılarak farklı substrat yoğunluklarında enzim aktivitesi araştırılmış ve sonuçlar Lineweaver- Burk eğrisine dökülerek inhibisyon türü tespit edilmiştir (Şekil 2,3). Bu konsantrasyonda V₀-S grafiği kontrol grafiğine göre karşılaştırılmış ve inhibisyonun kompetitif tipte olduğu saptanmıştır. Burada enzimin Vmax değerlerinin değişmediği, Km değerlerinin değiştiği görülmüş, kontrolün Km değeri 1,6 mM iken EDTA varlığında Km değeri 3 mM olarak tespit edilmiştir.

Reczkowski ve ark. (20), EDTA ve sitrat gibi şelatörlerin rat karaciğer arginazını inhibe ettiklerini bildirmişlerdir. Fakat enzim saflaştırıldıktan sonra Mn⁺⁺ ile reaksiyona sokulması sonucu inhibitörlere maruz bırakıldığında enzimi fazla inhibe etmediklerini görmüşlerdir. Yapılan başka bir çalışmada, EDTA'nın fare karaciğer arginazına etki etmediği ortaya konmuştur (25).

Genç koyunların yemlerine Ca⁺²- EDTA- Cu⁺² kompleksi katılarak yapılan bir çalışmada, ilk 24 saatte arginaz aktivitesinin arttığı, daha sonra ise düştüğü ortaya konulmuştur (26). *Helicobacter pylori* arginazının, 30 mM'lık L-arginin ve 0,25 mM'lık EDTA ile reaksiyona sokulmasıyla enzimin tamamen inhibe olduğu bildirilmiştir (27).

Kuhn ve ark. (28), insan karaciğer arginazının farklı pH'larda EDTA ile reaksiyona sokulduğunda enzim aktivitesinde sürekli azalma olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmada NEM ve p-CMBA koyun böbrek doku arginazı üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Değişen NEM konsantrasyonlarda enzimin preinkübe edilmesi sonucunda aktivite kaybının 20 mM'da %37, 60 mM'da %72, 100 mM'da %90, 120 mM'da ise %96 ulaştığı saptanmıştır (Şekil 4). Enzim kaynağı, 0,5-3,5 mM değişen konsantrasyonlarda p-CMBA ile preinkübasyona tabii tutulmuştur. p-CMBA 0,5 mM konsantrasyonda koyun böbrek doku arginazını %34, 1 mM'da %57, 2,5 mM'da ise %93 düzeyinde inhibisyona uğratmıştır (Şekil 7). Konsantrasyon 3,5 mM'a ulaştığında ise enzim aktivitesinin %100' ünü kaybetmiştir.

Enzim aktivitesi 75 mM NEM, 0,75 mM p-CMBA kullanılarak incelenmiş ve veriler Michaelis-Menten

grafığı ile değerlendirilmiştir (Şekil 5,8). Grafik verileri Linewear-Burk eğrisine dökülmüş ve Km'leri belirlenmiştir (Şekil 6,9). Her ikisinin de Km'lerinin değişmediği Vmax değerlerinin değiştiği tespit edilmiş ve bu sonuca göre p-CMBA ve NEM'in koyun böbrek doku arginazını nonkompetitif inhibisyona uğrattığı saptanmıştır.

Ber ve ark. (29), arginazın aktivite göstermesi için aktif merkezinde, -SH grubu içeren amino asitlerin olması gerektiğini, saflaştırılmış sıçan karaciğer arginazı üzerine p-CMBA ve NEM kullanarak incelemişler ve bu iki maddenin sıçan karaciğer arginazı üzerine inhibisyon etkisi göstermediklerini açıklamışlardır. Buna karşın siğir rumen doku arginazı (30) ve insan tiroid doku arginazı üzerinde p-CMBA ve NEM'in inhibisyon etkisinin olduğu bildirilmiştir (3).

Helicobacter pylori'nin ligantlarında p-CMBA'nin mikromolar düzeyde enzimi inhibe etmesine rağmen (27), başka bir çalışmada rat karaciğer arginazının p-CMBA ve NEM'den etkilenmediği tespit edilmiştir (29). *M.benedeni* arginazı üzerine p-CMBA ve NEM'in inhibisyon etkisinin olduğu ortaya konmuştur (31). Bu çalışmada insan tiroid dokusu (3) ve rumen dokusunda (30) elde edilen bulgulara paralel olarak koyun böbrek doku arginazını p-CMBA ve NEM'in non kompetitif inhibe ettikleri saptanmıştır.

Sonuç olarak; koyun böbrek doku arginazının aktif merkezinde fonksiyonel -SH gruplarının var olduğu ve katalitik faaliyetin başlaması için -SH gruplarının gerekli olduğu, EDTA, NEM ve p-CMBA'ın enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri, bu etkiyi de enziminin aktif merkezindeki -SH gruplarını bloke ederek sağladıkları sonucuna ulaşılmıştır.

Kaynaklar

1. Powers GS, Meister T. Urea synthesis and ammonia metabolism. In: Arias I, Popper H, Schachter D, Shafrits DA (Editors), The Liver: Biology and Pathobiology. New York: Raven Press 1982: 251-263.
2. Braissant O, Gotoh T, Loup M, et al. L- Arginine uptake, the citrulline- NO cycle and arginase II in the rat brain : An in situ hybridization study. Mol Brain Res 1999; 70: 231-241.
3. İlhan N. İnsan Tiroid Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 1992.
4. Fuentes JM, Campo ML, Soler G. Kinetics and inhibition by some aminoacids of lactating rat Mammary gland arginase. Arch Int Phys Bioch Bioph 1994; 102: 255-258.
5. Konarska L, Tomaszewski L, Rolczyk U. Studies on L- Arginase in developing rat small intestine, Brain and Kidney. Biochem Med Met Biol 1986; 35: 170-178.
6. Nadolska - Lutyk J, Grabon W, Poremska Z. Arginase in bull testis. Acta Biochim Pol 1990; 37(3): 377-384.
7. Nakamura H, Saheki T, Nakagawa S. Differential cellular localization of enzymes of L- Arginine metabolism in the rat brain. Brain Res 1990; 530: 108-112.
8. Ozan ST, Yarıoğlu S, İleri T, Halifeoğlu İ. Akkaraman ve ivesi koyunlarında, gebelikte ve doğumdan sonra eritrosit, tükürük ve serum arginaz aktiviteleri ile serum üre ve östrojen düzeyleri. Tr J Vet Anim Sci 1999; 23: 345-350.
9. Özçelik M, Özdemir N. Koyun meme doku arjinazının bazı biyokimyasal özellikleri. Tr J Vet Anim Sci 2003; 27: 719-725.
10. Jenkinson CP, Grigor MR. Rat mammary arginase: Isolation and characterization. Biochem Med Met Biol 1994; 51: 156-165.
11. Ikemeto M, Tabata M, Murachi T, et al. Purification and properties of human erythrocyte arginase. Ann Clin Biochem 1989; 26: 547-553.
12. Kandemir FM, Özdemir N. Koyun dalak doku arginazının bazı kinetik özellikleri. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2009;15(4):553-559.

13. Kandemir FM, Özdemir N. L- Lizin ve L- Ornitinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi. F Ü Sağ Bil Derg 2008; 22(1): 01-04.
14. Efron DT, Barbul A. Arginine and nutrition in renal disease. J Nutr 1999; 9(3): 142-144.
15. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond. Biochem J 1998; 336: 1-17.
16. Muszynska G, Wojtczak M. Influence of immobilization on conformation of rat liver arginase. Int J Bioch 1979; 10: 665-668.
17. Poremska Z, Grabon W, Zelazowska E, et al. Nonidentity of subunits of human kidney arginase A₁ and human liver arginase A₅. Acta Biochim Pol 1993; 40(4): 465-470.
18. Erişir M, Ozan ST. Sığır rumen doku arginazının bazı amino asitler tarafından inhibisyonu ve kinetiği. Tr J Vet Anim Sci 2000; 24: 65-70.
19. Özçelik M, Özdemir N. L- Lizin ve L- Ornitinin manda karaciğer ve böbrek doku arginazı üzerine etkisi. F Ü Sağ Bil Vet Derg 2009; 23(2): 73-79.
20. Reczkowski RS, Ash DE. Rat liver arginase: Kinetic mechanism, alternate substrates and inhibitors. Arch Biochem Biophys 1994; 312(1): 31-37.
21. Özdemir N, Özçelik M. Manda karaciğer ve böbrek doku arginazının fotoinaktivasyonu ve kinetik özellikleri. Tr J Vet Anim Sci 2001; 25(6): 995-1000.
22. Erişir M. Sığır Rumen Doku Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1997.
23. Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. Anal Biochem 1971; 39(2): 412-417.
24. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurements with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1971; 193(1): 265-275.
25. Moss S. Sodium nucleata inhibition of arginase activity. Science 1952; 115: 69-70.
26. Ishmael J, Gopinath C, Howell J. Studies with copper calcium EDTA. J Comp Path 1971; 81, 279-290.
27. Menz GL, Holmes EM, Ferrero RL. In situ charecterization of helicobacter pylori arginase. BBA 1998; 1388(2): 465-477.
28. Kuhn NJ, Ward S, Piponski M, et al. Purification of human hepatic arginase and its manganese (II)- dependent interconversion between active and inactive forms: A possible Ph- sensing function of the enzyme on the ornithine cycle. Arch Biochem Biophys 1991; 320(1): 24-34.
29. Ber E, Muszynska G, Cechova D. The lack of free -SH groups in rat liver arginase. Bull Acad Pol Sci Biol 1978; 26(10): 665-667.
30. Erişir M, Ozan ST. Sığır doku rumen arginazının saflaştırılmasından önce ve saflaştırılmasından sonra bazı özellikler. Tr J Vet Anim Sci 1999; 23(3): 597-608.
31. Özdemir N, Ozan ST. NEM, EDTA ve p-CMBA'nın *M. Benedeni* arginazı üzerindeki inhibisyon etkileri ve kinetik özellikleri. Tr J Vet Anim Sci 1994; 19: 157-160.