



L- Lizin ve L- Ornitin Sığır Böbrek Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi

F. Mehmet KANDEMİR
Necmi ÖZDEMİR

Fırat Üniversitesi
Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı
Elazığ-TÜRKİYE

Bu çalışmanın amacı L- lizin ve L- ornitin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisini saptamaktır.

Çalışmada kullanılan böbrek dokuları Elazığ'daki Elkas kesimevinden temin edilmiştir. Arginaz aktivitesini ölçmede tiyosemikarbazid-diasetilmonoksim üre (TDMU) metodu kullanılmıştır. Protein Lowry ve arkadaşlarının metoduna göre ölçülmüştür. Arginazın Km ve V max değerleri Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleriyle değerlendirilmiştir.

L- lizin ve L- ornitin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi ilk kez çalışılmış ve bu amino asitler enzim aktivitesini kompetitif-nonkompetitif (karışık) inhibisyona uğratmıştır.

Anahtar Kelimeler: Arginaz, İnhibisyon, L- Lizin, L- Ornitin.

Inhibition Effect of L-Lysine and L-Ornithine on Arginase Activity in Cattle Kidney Tissue

The aim of this study was to determine the inhibition effect of L-lysine and L- ornithine on arginase activity in cattle kidney tissue.

The kidney tissue used in the present study were obtained from the Elkas slaughterhouse in Elazığ. The thiosemicarbazide- diacetylmonoxime urea (TDMU) method was used to measure arginase activity. Protein was measured by the method of Lowry et al. The Km and Vmax values of arginase were assessed according to Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk graphics.

The inhibition effect of L-lysine and L- ornithine on arginase activity in cattle kidney tissue were studied at first time and these amino acids inhibited the enzyme activity competitively-noncompetitively (mixed).

Key Words: Arginase, Inhibition, L- Lysine, L- Ornithine.

Giriş

Arginaz (L-arginin aminohidrolaz E.C. 3.5.3.1) arjininin üre ve ornitine hidrolizinden sorumlu olan üre döngüsünün son enzimidir (1). Üre döngüsü sadece karaciğer hücrelerinde olmasına karşın arginaz enzimi birçok hücrede görülmektedir. Arginaz bakımından en zengin organ karaciğer olup üre döngüsüne katılarak amonyağı toksik olmayan bileşiklere dönüştürür. Karaciğer dokusu dışında böbrek, beyin, bağırsak, tiroid bez, eritrosit, lökosit, trombosit, iskelet ve kalp kası, plasenta, testis, meme gibi birçok dokuda düşük düzeyde bulunduğu ve üre döngüsü dışında özellikle poliamin sentezine katılmak ve protein biyosentezi için gerekli olan prolinin sentezlenmesi olmak üzere özel fonksiyonlara sahip olduğu saptanmıştır (2).

Bununla beraber böbrek ve meme bezini içeren diğer dokularda argininin arginazla hidrolizinden oluşan ornitin; kollagen ve kazein gibi bazı önemli proteinlerin yapısına katılan prolin ve hidroksiprolinin sentezinde ve amonyum iyonu transportu, enerji metabolizması, amino asitlerin birbirine çevrilmesinde anahtar bir ara metabolit olan glutamatın biyosentezinde kullanılmaktadır. Amino asitlerin bir çoğu arginazı inhibe etmekte ve inhibisyon tipi bir çok doku ve türe göre değişmektedir (3). Klinik açıdan önemli olan ve en çok incelenen konulardan biri ise arginazın lizin tarafından engellenmesidir. L- lizin deamine edilememesi sonucu kanda lizin miktarı artmakta ve argininemia oluşmaktadır. Argininemia kan ve idrarda normalin çok üstünde arginin, lizin, sitrülün ve amonyağın bulunması gibi biyokimyasal bulgularla karakterizedir (4). Lysine Intolerance olarak adlandırılan bu durumun nedeni lizin arginazı engellemesine bağlıdır (5).

Bu çalışmada L- lizin ve L- ornitin amino asitlerinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin ve kinetik özelliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Geliş Tarihi : 27.09.2007
Kabul Tarihi : 03.01.2008

Yazışma Adresi Correspondence

F.Mehmet KANDEMİR
Fırat Üniversitesi
Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı
23119
Elazığ-TÜRKİYE

fmk_03@mynet.com

Gereç ve Yöntem

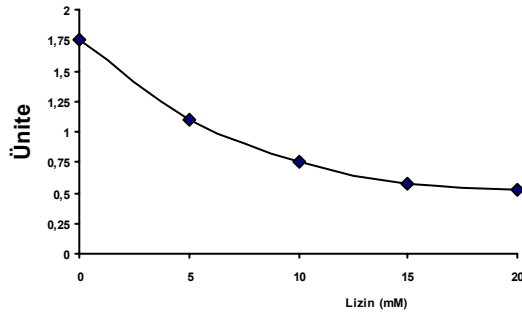
Araştırma materyali olan sığır böbreği Elazığ Elkas tesislerine kesim için getirilen 3-4 yaşlarındaki, aynı şartlarda yetiştirilmiş ve aynı fiziksel özelliğe sahip olan 20 adet Holştayn dişi sığırdan temin edilmiştir. Kesimden hemen sonra alınan böbrek dokusu üzerindeki kan, pıhtı ve yağlardan arındırıldıktan 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 sonra $MnCl_2$ ile (1/6 w/v) sulandırılarak Potter Elvehjem (cam-cam) homojenizatörde homojenize edilmiştir. Homojenat +4 °C 14000 rpm' de 13 dakika santrifügasyona tabi tutulmuş ve örneklerin süpernatantları enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Arginaz aktivitesi Tiyosemicarbazid-diasetilmonoksim üre (TDMU) yöntemi (6), protein miktarı da Lowry ve arkadaşlarının metodu (7) kullanılarak ölçülmüştür. Sığır böbrek doku örneklerinin her ml süpernatantına 3 ünite Jack-Bean üreaz enzimi ilave edildikten sonra 37 °C' de 15 dakika inkübe edilerek endojen ürenin parçalanması sağlanmıştır (8). Dış kaynaklı üreden arındırılan ve üzerine 2 mM $MnCl_2$ (1/20) ilave edilen süpernatantlar daha sonra 60 °C' de 15 dakika metabolik su banyosunda preinkübasyon işleminden sonra enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

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

Bulgular

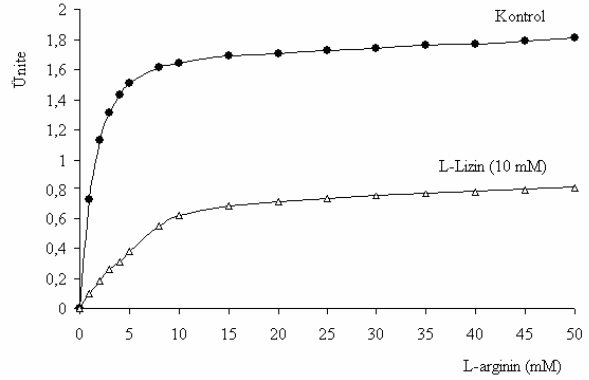
Farklı konsantrasyonlardaki L- Lizinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibitör etkisi incelendiğinde 5 mM' da aktivitenin % 37'sinin 10 mM' da aktivitenin % 57'sinin kaybolduğu tespit edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. L-lizinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibitör etkisi.

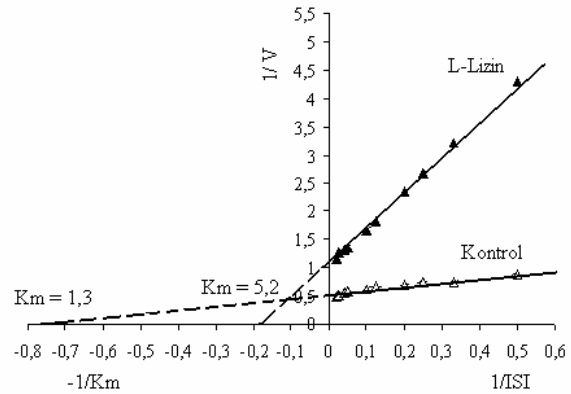
10 mM L-Lizinin farklı L- arginin konsantrasyonlarında sığır böbrek doku arginaz

enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon tipi belirlenmiştir. Veriler Michaelis-Menten grafiği ile değerlendirilmiştir. Buna göre enzimin V_{max} 'ının ve K_m 'inin değiştiği görülmüştür. (Şekil 2).



Şekil 2. L-lizinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine etkisinin michaelis-menten grafiği ile değerlendirilmesi.

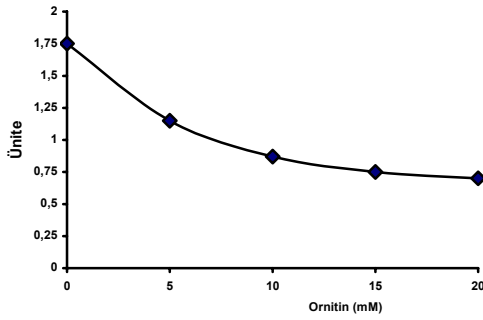
Sonuçlar Linewearver- Burk eğrisi ile değerlendirildiğinde inhibisyon tipinin karışık inhibisyon, K_m 'inin ise inhibitörlü enzim kaynağında 5.2, inhibitörsüz enzim kaynağında (kontrol) ise 1.3 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3).



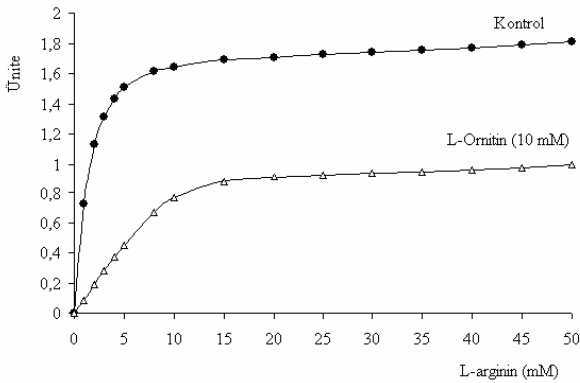
Şekil 3. L-lizinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine etkisinin linewearver- burk grafiği ile değerlendirilmesi.

Farklı konsantrasyonlarda L- Ornitinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibitör etkisi incelendiğinde 5 mM' da aktivitenin % 34'ünün, 10 mM' da aktivitenin % 50'sinin kaybolduğu tespit edilmiştir (Şekil 4).

10 mM L-Ornitin varlığında ve farklı L- arginin konsantrasyonlarında sığır böbrek doku arginaz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon tipi belirlenmiştir. Veriler Michaelis-Menten grafiği ile değerlendirilmiştir. L- Ornitinin varlığında da L-Lizine benzer şekilde enzimin V_{max} 'ının ve K_m 'inin değiştiği saptanmıştır (Şekil 5).

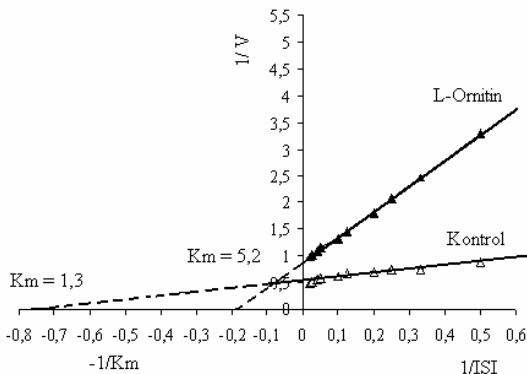


Şekil 4. L-ornitinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibitör etkisi.



Şekil 5. L-ornitinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine etkisinin Michaelis-Menten grafiği ile değerlendirilmesi.

Sonuçlar Lineweaver-Burk eğrisi ile değerlendirildiğinde inhibisyon tipinin karışık inhibisyon, K_m 'inin ise inhibitörlü enzim kaynağında 5.2, inhibitörsüz enzim kaynağında (kontrol) ise 1.3 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. L-ornitinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine etkisinin Lineweaver-Burk grafiği ile değerlendirilmesi.

Tartışma

Bu çalışmada L-lizin ve L- ornitinin sığır böbrek doku arginazını karışık olarak inhibe ettiği, K_m 'lerinin inhibitörlü enzim kaynağında 5.2, inhibitörsüz enzim kaynağında (kontrol) ise 1.3 olduğu saptanmıştır. Bu amino asitlerin her ikisi de enzimin V_{max} 'ını kontrole göre düşürerek, K_m 'ini ise artırarak karışık inhibisyona (kompetitif-nonkompetitif) neden olmuştur. İnhibitör serbest enzime yada enzim-substrat kompleksine bağlandığı zaman inhibisyon karışık inhibisyon olarak adlandırılır. Bu inhibisyon tipinde inhibitör substratın bağlandığı aktif merkezden farklı bir yere bağlanır. (9).

Bu güne kadar farklı dokularda bu amino asitlerin inhibisyon etkisi çalışılmıştır. Amino asitler konusunda yapılan bu çalışmanın diğerlerinden farkı inhibitör etkisi olan bu amino asitlerin her ikisinin de sığır böbrek doku arginazını karışık olarak inhibe etmesidir.

Bond (10), nonkompetatif inhibisyona sebep olan inhibitörlerin substrattan farklı bir noktada enzime reversible olarak birleştiği ve ligantların muhtemelen enzim substrat kompleksinin turnover'ını bozan konformasyonel değişime sebep olduğunu ve enzimin proteolitik inaktivasyona duyarlılığının arttığını belirtmiştir.

Rat beyin mitokondrisinde yaptıkları çalışmada 25 mM L-arginin kullanarak L- lizin ve L-ornitinin enzimi 20 kat inhibe ettiğini saptamışlardır (11).

Koyun meme doku arginaz aktivitesi (4) ve sığır sumen doku arginaz aktivitesi (3) üzerine L- lizin ve L- ornitin amino asitlerinin etkileri araştırılmış , her iki amino asidinde enzimi nonkompetitif inhibe ettiği tespit edilmiştir.

M. Expansa arginaz aktivitesi (12) , sıçan karaciğer arginaz aktivitesi (13), laktasyondaki rat meme bezi arginazı (14), Sığır karaciğer arginazı (15,16), İnsan tiroid doku arginaz aktivitesi (17), Xenopus laevis karaciğer arginazı (18), Mus booduga (Gray) karaciğer arginazı (19), üzerine L- Lizin ve L- ornitin amino asitlerinin inhibisyon etkisi incelenmiş ve bu amino asitlerin enzimi kompetitif inhibe ettikleri ortaya konmuştur..

İnsan karaciğer arginazını ornitinin nonkompetatif, lizin ise kompetitif inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır (20).L- ornitinin buzağı karaciğer arginazını (21), ve vitreus arginazı (22) üzerindeki etkisini incelenmiş ve bu amino asidin enzim üzerinde kompetitif inhibisyona neden olduğunu saptanmıştır.

Kaysen ve strecker böbrek dokusunda yüksek arginin konsantrasyonlarıyla enzimin aktivasyonunun, prolin ve lizin amino asitlerinin belirli konsantrasyonları ile engellenebildiğine işaret etmişlerdir (23). Koyun karaciğer dokusunda 55 mM'lık lizin arginaz aktivitesini % 74 oranında inhibe ettiği ve inhibisyon tipinin karışık olduğu bulunmuştur (24). Ameen ve Palmer' de lizin

karaciğer arginazının karışık inhibisyonuna sebep olduğunu belirtmişlerdir (25).

Koyun beyin doku arginazı üzerine bazı L- amino asitlerin inhibisyon etkisi incelendiğinde lizin, ornitin, lösin ve valinin kompetitif inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir (26). Ornitin, lizin ve prolin koyun karaciğer arginazı üzerinde kompetitif inhibisyona neden olurken valinin Mn^{+2} ile aktive edilmemiş enzimde karışık tip inhibisyona sebep olduğu saptanmıştır (27).

Sığır rumen doku arginazı üzerinde valin, lösin, izölösin, prolin, sistein gibi bazı L- amino asitlerin

nonkompetitif inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (28).

Sonuç olarak sığır böbrek doku arginazı üzerine L- Lizin ve L- Ornitin amino asitlerinin inhibisyon etkisi ilk defa laboratuvarımızda çalışılmış olup her iki amino asidin de enzimi karışık tip inhibisyona uğrattığı tesbit edilmiştir. Amino asitlerden L-Ornitin ile ilgili bulduğumuz sonuçlar literatürlerden farklı, L-lizin ile ilgili bulduğumuz sonuçların ise Benzer (24) ile Ameen ve Palmer (25) tarafından yapılmış çalışmalarla uyum içerisinde olduğu gözlenmektedir.

Kaynaklar

1. Cederbaum SD, Yu H, Grody WW, Kern RM, Yoo P, Iyer RK. Arginases I and II: do their functions overlap? . *Mol Genet Metab*. 2004 ;81: 38-44.
2. Özçelik M., Özdemir N.: Koyun Meme Doku Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 2003; 27: 719-725.
3. Erişir M., Ozan S.: Sığır Rumen Doku Arginazının Bazı Amino Asitler Tarafından İnhibisyonu ve Kinetiği. *Turk j. Vet. Anim. Sci.* 2000; 24:65-70.
4. Özçelik M.: Koyun Meme Dokusu Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2002.
5. Colombo J.P., Richterich R., Donath A., Rossi E.: Congenital lysine intolerance with periodic ammonia intoxication. *Lancet I.* 1964; 1014-1023
6. Geyer J.W., Dabich D.: Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. *Anal. Biochem.* 1971; 39: 412-417.
7. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J.: Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
8. Mohammed S. M., Greenberg D.M.: Liver Arginase I. Preperation of Extracts of High Potency, Chemical Properties, Activation, İnhibition and pH Activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 1945; 8: 349-357.
9. "Functional Metabolism: Regulation and Adaptation". http://en.wikipedia.org/wiki/mixed_inhibition. 17.12.2007
10. Bond J. S.:Effect of Manganese and Amino acids on Proteolytic İnactivation of Beef Liver Arginase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1973; 327: 157-165.
11. Dolinska M. Albrecht J.: L- Arginine Uptake in Rat Cerebral Mitokondria. *Neurochem Int.* 1998; 33(3): 233-236.
12. Özdemir N., Yaraloğlu S.,Ozan S.: İnhibition Effect of L- Lysine and L- Ornithine on Arginase of M. Expensa. International Congress on Free Radikals in Healty and Diseases. İstanbul, Eylül, 1995.
13. Musynska G., Wojtczak M.: Influence of Immobilization on Conformation of Rat Liver Arginase. *Int. J. Biochem.* 1979; 10(8): 665-668.
14. Fuentes J.M., Campo M.L. Soler G.: Kinetics and İnhibition by Some Amino acids of Lactating Rat Mammary Gland Arginase. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* 1994; 102(5): 255-258.
15. Subrahmanyam TS, Reddy SR.: L-ornithine and L-lysine need their alpha-carboxyl groups for Effective İnhibition of Bovine Liver Arginase. *Indian J Biochem Biophys.* 1986; 23(6): 359-361.
16. Pace C., N., Landers R., A.: Arginase İnhibition. *Biochimica et Biophysica Acta.*1981; 658: 410-412.
17. İlhan N.: İnsan Tiroid Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1992.
18. Peiser L, Balinsky JB.: Kinetic properties of arginase from *Xenopus laevis*. *Comp Biochem Physiol B.* 1982; 73(2): 215-220.
19. Prasad GV, Lokanatha V, Sreekanth K, Rajendra W. : Purification and kinetic properties of Mus booduga (Gray) hepatic arginase. *J Enzyme İnhib.* 1997 ; 12(4): 255-72.
20. Carvajal N., Martinez J., Oca F.M., Rodriguez J., Fernandez M.: Subunit interactions and Immobilised Dimers of Human Liver Arginase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1978; 527: 1-7.
21. Bommarius AS, Drauz K.: An enzymatic route to L- ornithine from arginine--activation, selectivity and stabilization of L-arginase. *Bioorg Med Chem.* 1994; 2(7): 617-26.
22. Gürsu F., M.: Çeşitli Humor Vitreuslarında Üre ve Kaynaklarının Araştırılması. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1993.
23. Kaysen GA, Strecker HJ.: Purification and properties of arginase of rat kidney. *Biochem J* 1973; 133 (4): 779-788
24. Benzer F., Ozan S.T., Yılmaz S.: Koyun karaciğer doku arginazının guanidin ve bazı amino asitler tarafından inhibisyonu ve inhibisyonun kinetiği. *F.Ü. Sağlık Bilimleri dergisi* 2003; 17(3): 173-178.
25. Ameen M., Palmer T. İnhibition of urea cycle enzymes by lysine and saccharopine. *Biochem Int.* 1987; 14(3): 395-400
26. Reddy P.N.M., Romano rao J.V: İnhibition of arginase in sheep brain homogenates by some L- amino acids. *Experientia.* 1981; 37:814
27. Kesava Rao K.V.:The inhibition of sheep liver arginase by some L- amino acids. *International Journal of Biochemistry.* 1973; 4(19): 62-70
28. Erişir M: Sığır Rumen doku arginazının bazı biyokimyasal özellikleri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1997