

Sığır Rumen Doku Arginazının Bazı Amino Asitler Tarafından İnhibisyonu ve Kinetiği

Mine ERIŞİR, Sema TEMİZER OZAN
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 08.10.1998

Özet: Sığır rumen doku arginaz aktivitesi üzerine bazı amino asitlerin etkileri çalışıldı.

Valin, lösin, izölösin, ornitin, prolin, sistein, lizin gibi L-amino asitler enzimi nonkompetitif olarak inhibe ederken, histidin ve hidroksiprolinin enzim aktivitesi üzerine herhangi bir inhibitör etkisi bulunamamıştır.

İzolösin, valin, lösin, sistein, ornitin prolin ve lizine göre daha kuvvetli inhibitördür.

Anahtar Sözcükler: Arginaz, Sığır Rumen Dokusu, Amino Asitler

Kinetics and Inhibition by Some Amino Acids of Arginase in Cattle Rumen Tissue

Abstract: The effects of some amino acids on arginase activity in cattle rumen tissue were studied.

L-amino acids, such as valine, leucine, isoleucine, ornithine, cysteine, proline, lysine inhibited the enzyme activity noncompetitively. On the other hand, histidine and hydroxyproline were not determined to have any inhibitory effect on the enzyme activity.

Isoleucine, valine, leucine, cysteine, ornithine were more strongly inhibitory than proline and lysine.

Key Words: Arginase, Cattle Rumen Tissue, Amino Acids

Giriş

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

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 (2-4) ve amonyum iyonu transportu, enerji metabolizması, amino asitlerin birbirine çevrilmesinde anahtar bir ara metabolit olan glutamatin biyosentezinde kullanılmaktadır (2). Amino asitlerin birçoğu arginazı inhibe etmekte ve inhibisyonun tipi birçok doku ve türe göre değişmektedir (4-13).

Rumen dokusundaki arginaz üre siklusunun bir bölümü olarak fonksiyon görememektedir, çünkü bu dokuda siklusun diğer enzimlerine (arginaz ve ornitin transkarbamilaz hariç) rastlanmamaktadır (14-17).

Arginazın farklı fonksiyonları (2-4), doku nitrojeninin kullanılmasıyla dallanmış amino asitlerin ilişkisi (18) göz önünde tutularak ayrıca arginin ile prolin arasındaki prekürsör-ürün ilişkisinden dolayı prolin ve diğer bazı amino asitlerin sığır rumen doku arginazı üzerine etkileri

ve bu amino asitler varlığında enzimin kinetik davranışı çalışmanın ilgi alanını oluşturmuştur.

Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılan sığır rumen doku örnekleri kesimden hemen sonra alınmış, musluk suyu ile iyice yıkanarak rumen muhteviyatı uzaklaştırılmış ve doku en kısa zamanda laboratuara getirilip, tekrar %0.9'luk NaCl ile temizlenmiştir.

Sığır rumen doku arginaz aktivitesi, L-argininin arginaz ile hidrolizi sonucu oluşan ürenin Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim-Üre (TDMU) metodu (19) ile ölçülmesi sonucu saptanmıştır.

Rumen doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan sonra tam 1 g olarak tartılıp bir makas yardımıyla küçük parçalara ayrılmış ve pH'sı 7.4 olan 0.01M Tris-HCl tamponunun (1/10, w/v) ilavesinden sonra kırılmış buz içerisinde (Potter-Elvehjem, cam-cam) homojenizatörle homojenize edilmiştir (20, 21). Homojenatlar soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 15000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüje tabi tutulmuş ve işlemden sonra peletler atılarak süpernatantlar alınıp, enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

* Doktora tezinin bir kısmında alınmıştır.

Protein miktarının ölçümünde ise Lowry (22) metodu kullanılmıştır.

Çalışmada bir ünite enzim 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.

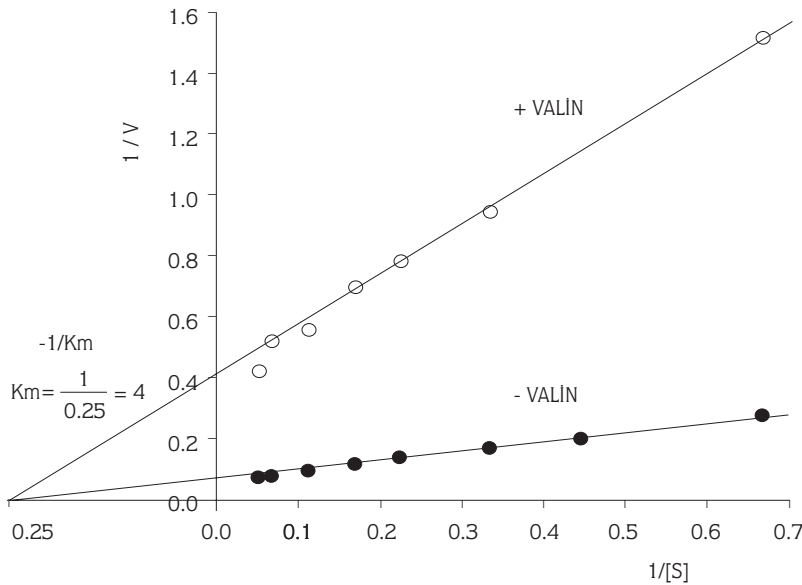
Bulgular

L-amino asitlerden valin, lösin, izolösin, ornitin, prolin, sistein, lizin, histidin, hidroksiprolinin rumen doku arginaz aktivitesi üzerine etkileri ve bu amino asitlerin varlığında enzimin kinetik özellikleri incelenmiştir.

İnkübasyon ortamındaki L-arginin konsantrasyonu sabit tutulup, preinkübasyon ortamına L-amino asitler farklı konsantrasyonlarda ilave edilerek rumen doku arginaz enzimi üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, amino asitler 10-50 mM arasında değişen konsantrasyonlarda kullanılmış ve tablo 1'de görüldüğü

gibi valin, lösin, izolösin, ornitin, prolin, sistein, lizin enzim aktivitesini düşürmekte ve enzim üzerine inhibitör etki göstermektedir. Tablo 1'de bu amino asitlerin konsantrasyonları ve inhibisyon yüzdeleri verilmiştir. Görüldüğü gibi rumen doku arginazının; izolösin, valin, lösin, sistein ve ornitin prolin ve lizine göre daha kuvvetli inhibitörleridir. Histidin ve hidroksiprolinin rumen doku arginaz aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi bulunamamıştır.

Bu amino asitlerin sebep olduğu inhibisyonun tipini belirleyebilmek için; 30 mM valin (Şekil 1) 40 mM lösin (Şekil 2), 25 mM izolösin (Şekil 3), 30 mM ornitin (Şekil 4), 40 mM prolin (Şekil 5), 50 mM sistein (Şekil 6), 40 mM lizin (Şekil 7) varlığında ve inkübasyon ortamındaki L-arginin konsantrasyonları değiştirilerek rumen doku arginaz aktivitesi ölçülüp, kontrol arginazına göre değerlendirilmiştir. Sonuçların Lineweaver-Burk eğrisi ile değerlendirilmesi sonucunda bu amino asitlerin enzimin V max'ını kontrole göre düşürdüğü, Km'ini ise



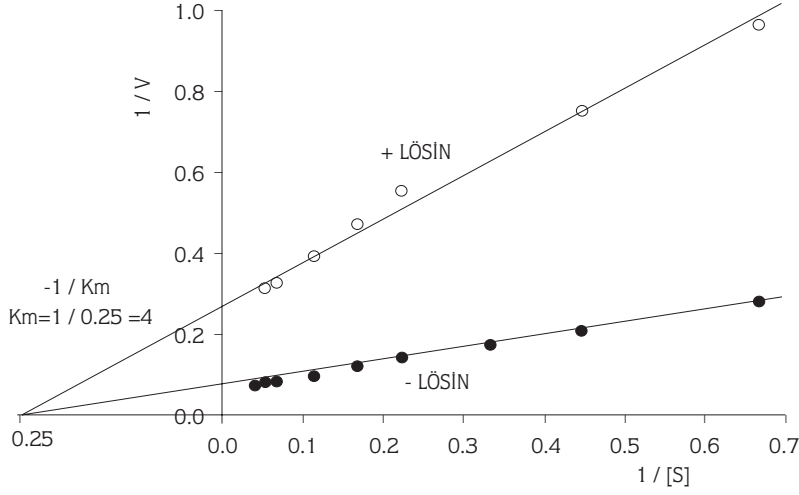
Şekil 1. L-valin Varlığında, Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisiyle İncelenmesi

	% İnhibisyon						
	Lizin	Sistein	Ornitin	Izolösin	Lösin	Prolin	Valin
10 mM	24	10	43	68	33	21	59
20 mM	41	24	60	83	57	35	77
30 mM	51	43	70	88	71	44	84
40 mM	58	61	77	90	77	49	88
50 mM	62	71	81	90	79	51	90

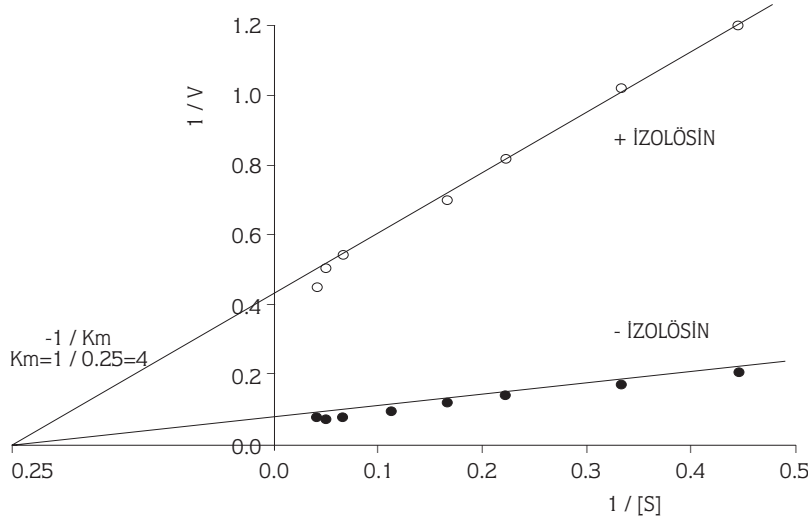
Tablo 1. Farklı Konsantrasyonlardaki Amino Asitlerin Sığır Rumen Doku Arginazı Üzerine Oluşturduğu İnhibisyonun Yüzdeleri.

değiştirmedeği bulunmuştur. Enzimin substratı L-arginine karşı olan K_m 'inin 4 mM civarında olduğu ve bu amino

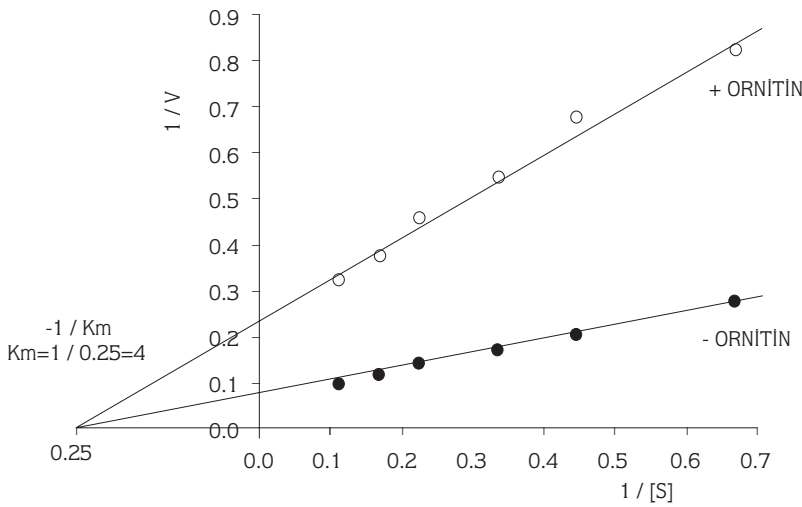
asitlerin enzimi nonkompetitif olarak inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 1-7).



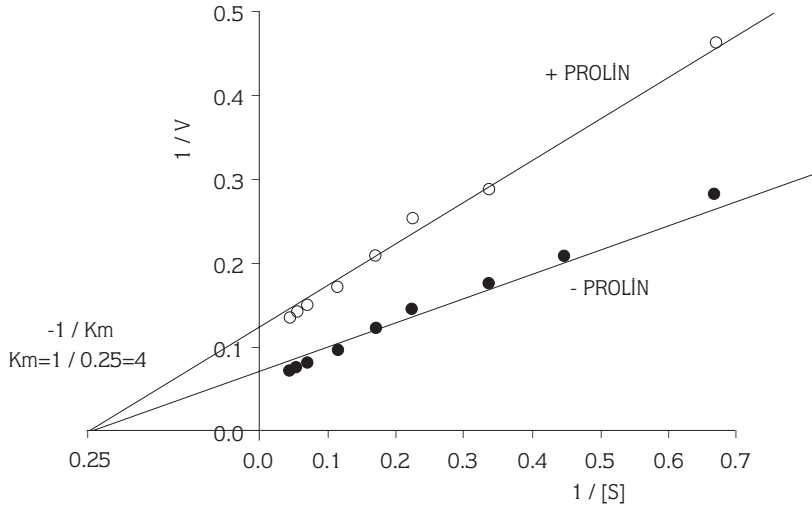
Şekil 2. L-lösün Varlığında, Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğirisiyle İncelenmesi



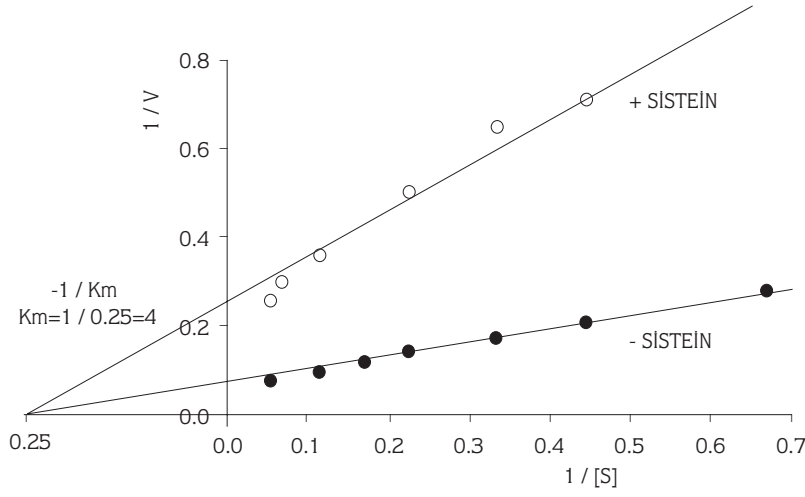
Şekil 3. L-izolösün Varlığında, Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğirisiyle İncelenmesi



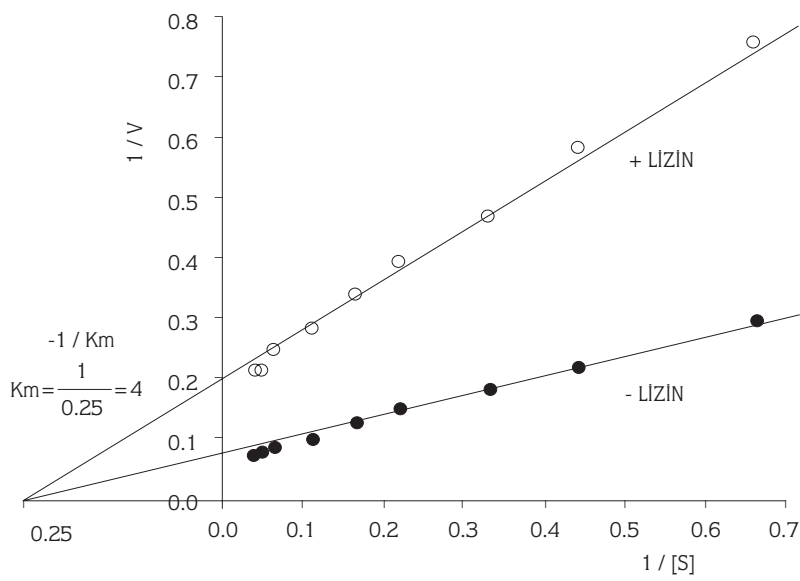
Şekil 4. L-ornitin Varlığında, Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğirisiyle İncelenmesi



Şekil 5. L-prolin Varlığında, Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisiyle İncelenmesi



Şekil 6. L-sistein Varlığında, Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisiyle İncelenmesi



Şekil 1. L-lizin Varlığında, Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisiyle İncelenmesi

Tartışma

Lizin, Ornitin ve dallanmış zincirli amino asitlerle arginaz aktivitesinin inhibisyonu birçok doku ve türde geniş olarak kaydedilmiştir (4-13).

Valin, lösin, izolösin, ornitin, prolin, lizinin laktasyondaki rat meme bezi arginazını kompetitif olarak inhibe ettiği ve bu amino asitlerden ornitin, lizin, valinin meme bezi arginazını prolin, lösin, izolösinden daha kuvvetlice inhibisyona uğrattığı bulunmuştur (12).

Prolin pH 9.5'ta rat böbrek arginazı A4'ü kompetitif, karaciğer arginazı A1'i nonkompetitif inhibe etmiştir. pH 7.5'da lösin, izolösin, valin rat karaciğer arginazını kompetitif, böbrek arginazını nonkompetitif olarak inhibe etmektedir. pH 9.5'da dallanmış zincirli amino asitlerle arginaz A1 böbrek arginazından daha fazla inhibe olmuştur. Fakat dallanmış amino asitlerin her iki enzim üzerindeki etkileri pH 7.5'da gözlenenden daha düşük bulunmuştur. Böbrek arginazı prolinle inhibisyona karaciğer enzimine göre çok daha fazla duyarlıdır. Karaciğer arginazı da lösin, izolösin ve valin gibi dallanmış zincirli amino asitlere böbrek arginazından daha duyarlıdır. Hidroksiprolin böbrek arginazı A4'ü inhibe ederken karaciğer arginazı A1 üzerinde önemsiz bir etkiye sahiptir (5).

Fare meme tümör arginazının 40 mmol prolin varlığında %28, hidroksiprolin varlığında %10 inhibisyonu (kompetitif) gözlenmiştir (10).

Bu çalışmada amino asitlerin yüksek konsantrasyonları kullanılmış ve pH:9.7'de inhibisyonun kinetiği çalışılmıştır. Amino asitler kosununda yapılan bu çalışmanın diğerlerinden farkı, inhibitör etkisi olan bu amino asitlerin hepsinin, rumen doku arginazını nonkompetitif olarak inhibe etmesi (Şekil 1-7), hidroksiprolin ve histidin inhibitör etkisine rastlanamamasıdır.

Rat karaciğer arginazının aktif merkezinde histidin amino asidi bulunmakta ve histidindeki imidazol grubunun, Mn-imidazol etkileşmesi ile enzimi aktif forma dönüştürdüğü bildirilmektedir (13). L-histidin rumen doku arginazı üzerine herhangi bir etkisinin tespit edilememesi enzimin aktif merkezinde aktiviteden sorumlu histidil artışının bulunabileceğini düşündürmektedir.

Saflaştırılmış insan karaciğer arginazından elde edilen All'nin karışık tip inhibisyon göstermesi (Km artmakta, Vmax azalmakta) ES kompleksine inhibitörün bağlanması sonucu substrat yıkımının engellenmesiyle açıklanmıştır (6).

Muszynska ve Wojtczak (11), amino asitleri ligand olarak kabul etmekte, arginaza bu ligandların

bağlanmasının, arginazın konformasyonel değişimine sebep olduğunu ve bununda enzim-substrat kompleksinin turnover'ını bozduğunu belirtmektedir. Aynı çalışmada, sıçan karaciğer arginazını L-amino asitlerden ornitin ve lizinin kompetitif, valin, lösin, izolösin ve sisteinin ise nonkompetitif tipte inhibisyona uğrattığı belirtilmiştir. Yine Bond (9)'da non-kompetitif inhibisyona 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.

Kaysen ve Strecker (4) argininin yüksek konsantrasyonlarıyla enzimin aktivasyonunun, belirli amino asitlerin spesifik konsantrasyonları ile engellendiğini ve bu verilerin belirli amino asitler ve arginin için 2. bağlanma bölgelerini işaret ettiğini bildirmektedirler. pH'a bağlı olarak arginin ve diğer belirli amino asitlerle işgal edilen katalitik bölgenin modifiye olduğunu, bununda arginin ve diğer belirli amino asitler için 2. bağlanma bölgesinin varlığına işaret ettiğini ve 2. bağlanma bölgesindeki etkileri göstermek için yüksek konsantrasyonlarda arginin gerekmesinde, bazı diğer bileşiklerin (amino asitler) modifikatör olabileceği ihtimalini doğurduğunu önermektedirler.

İnsan karaciğer (7) ve rat böbreğindeki (4) arginazlar üzerinde allosterik bölgelerin varlığı konusunda kanıtlar vardır. Dallanmış zincirli amino asitler tarafından oluşturulan kısmi inhibisyonlar arginaz üzerinde allosterik bir bölgenin varlığını, inhibitörün bu bölgeye bağlandığını (non-kompetitif inhibisyon) ve enzim amino asit kompleksinin enzimatik olarak aktif olduğunu gösterir (5).

Rao ve ark. (10), arginazın saturasyon altı konsantrasyonlarda dallanmış zincirli amino asitlerle daha fazla inhibisyonunu kaydetmiş, böylece dallanmış zincirli amino asitlerin hücre içinde güçlü inhibitör etkiye sahip olduğunu belirtmiştir.

Prekanserli nodüllerde ve meme tümörlerinde, prolinin meme tümör arginazını inhibe ettiği prolinin korformasyonel değişim olmaksızın aktif bölge için direkt olarak yarışmayla arginaz aktivitesini inhibe ettiği saptanmış ve prolinin sebep olduğu inhibisyonun meme tümörlerinde feedback mekanizmasını içeren regülatör önemi olduğu (10) yine böbrek arginazı üzerine prolinin, karaciğer enzimi üzerine dallanmış zincirli amino asitlerin fizyolojik efektör olarak rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (5).

Dokuya göre bu amino asitlerin inhibitör etkilerinin farklılıklarının aktif merkezin içinde veya yakınındaki yapısal farklılıktan mı veya allosterik geçişlerden mi kaynaklandığına karar vermek mevcut verilerle mümkün değildir.

Metabolik yolların kontrolünün gelişme, beslenme, doku ve türe göre değişmesi muhtemeldir. Rumen dokusunda metabolik şartlarla ve dietle amino asit

havuzunda meydana gelen dalgalanmalar arginazın yapısını, stabilitesini ve yarı ömrünü etkileyebilir.

Rumen dokusundaki arginaz enzimini bu amino asitlerin regüle ettiği ve prolinle inhibisyonunun enzimin end-product inhibisyonunu ve regülasyonunu sağladığı sonucuna varılabilir. Bu regülatör etkilerin mümkün fizyolojik önemleri ve tam tabiatı daha ileri çalışmalarla analiz edilmek zorundadır.

Kaynaklar

1. Powers G.S. and Meister T. Urea Synthesis and Ammonia Metabolism. 251-263. Edited by I. Arias, H. Popper, D. Schachter and D.A. Shafrits. In: "The liver: Biology and Pathobiology". Raven Press. New York, 1982.
2. Jenkinson C.P. and Grigor M.R. Rat Mammary Arginase: Isolation and Characterization. *Biochem. Med. and Met. Biol.* 1994, 51, 156-165.
3. Yip M.C. and Knox W.E. Function of Arginase in Lactating Mammary Gland. *Biochem. J.* 1972, 127,893.
4. Kaysen G.A. and Strecker H.J. Purification and Properties of Arginase of Rat Kidney. *Biochem. J.* 1973, 133, 779-788.
5. Carvajal N. and Cederbaum S.D. Kinetics of Inhibition of Rat Liver and Kidney Arginases by Prolin and Branched-Chain Amino Acids. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1986, 870, 181-184.
6. Bascur L., Cabello J, Veliz M. and Gonzalez A. Molecular Forms of Human-Liver Arginase. *Biochem. et Biophys. Acta.* 1966, 128, 149-154. B
7. Carjaval N., Acoria M., Rodriguez J.P., Fernandez M. and Martinez J. Evidence for Cooperative Effects in Human Liver Arginase. *Biochem. et Biophys. Acta.* 1982, 701, 146-148.
8. Pace C.N. and Landrers R.A. Arginase Inhibition. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1981, 658, 410-412.
9. Bond J.S. Effect of Manganese and Amino Acids on Proteolytic Inactivation of Beef Liver Arginase. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1973, 327, 157-165.
10. Rao K.V.K, Pai S.R. and Bapat C.V. The Inhibition of Arginase by Prolin in Cell-free Extracts of Mouse Mammary Tumour. *Br. J. Cancer.* 1974, 30, 129-135.
11. Muszynska G. and Wojtczak M. Influence of Immobilization on Conformation of Rat Liver Arginase. *Int. J. Biochem.* 1979, Vol. 10, pp. 665-668.
12. Fuentes J.M., Campo M.L. and Soler G. Kinetics and Inhibition by Some Amino Acids of Lactating Rat Mammary Gland Arginase. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique.* 1994, 102, 255-258.
13. Ber E. and Muszynska G. Chemical Modification of Liver Arginase. *Acta Biochim. Polon.* 1979, Vol. 26, 103-114.
14. Aminlari M. and Vaseghi T. Arginase Distribution in Tissues of Domestic Animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 1992, Vol. 103 B, No. 2, pp. 385-389.
15. Harmeyer J., Kurelec B. und Hill H. Über Funktionen der Arginase, Urease und Ornithin-transcarbamylase. 2. Mitteilung: Ornithintrans-carbamylase funktion. *Zbl. Vet. Med.* 1968, Reihe A, Bd. 15, Heft 6, 510-516.
16. Kurelec B., Harmeyer J. und Hill H. Über Funktionen der Arginase, Urease und Ornithin-transcarbamylase. 1. Mitteilung: Arginase-und Urease funktion. *Zbl. Vet. Med.* 1968, Reihe A, Bd. 15, Heft 5, 460-469.
17. Martincic T. and Kravica S. Enzymatic Investigations in the Mucosa of the Rumen. II. On the Presence of Arginase in the Ruminal Mucosa of Cattle. *Vet. Arh.* 1964, Zagreb, svezak 3-4, pp. 90-93.
18. Adibi S.A. Roles of Branched-chain Amino Acids in Metabolic Regulation. *J. Lab. Clin. Med.* 1980, Vol. 95, 4, 475-484.
19. Geyer J.W. and Dabich D. Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. *Analy. Biochem.* 1971, 39, 412-417.
20. Colombo J. and Konarska L. Arginase. 285-294. Ed. Bergmeyer H.U. In: "Methods of Enzymatic Analysis". 3rd ed., Verlag Chemie GmbH, Weinheim. 1984.
21. Spector E.B., Rice S.C.H., Moedjono S., Bernard B. and Cederbaum S.D. Biochemical Properties of Arginase in Human Adult and Fetal Tissues. *Biochem. Med.* 1982, 28, 165-175.
22. 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.