

Manda Karaciğer ve Böbrek Doku Arginazının Fotoinaktivasyonu ve Kinetik Özellikleri

Necmi ÖZDEMİR, Mehtap ÖZÇELİK
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 21.11.2000

Özet: Manda karaciğer ve böbrek doku arginazı 150 w ışık varlığında 0.05mM metilen mavisıyla önemli bir şekilde inhibe olmuştur. Bu inhibisyonun karaciğer ve böbrek dokularında farklı olduğu bulunmuştur. Thiosemicarbazide diacetyl-monoxime urea (TDMU) metodu kullanılarak arginaz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Manda karaciğer ve böbrek doku arginazı metilen mavisini varlığında 150 w ışığa maruz bırakıldıktan sonra $MnCl_2$ ilavesi ile aktivitedeki düşüş az olmuştur. Ama $MnCl_2$ ile preinkübasyona tabii tutulduktan sonra metilen mavisini uygulandığında aktivitedeki düşüş daha fazladır. Oda ışığı ve karanlıkta enzim aktivitesi karaciğer dokusunda %45-48; böbrek dokusunda %30-40 oranında bir düşüş olduğu ortaya konulmuştur. 150 w ışık kaynağı altında ise, karaciğer dokusunda %63; böbrek dokusunda %33'lük bir inhibisyon görülmüştür. Enzimatik reaksiyon gün ışığında veya karanlıkta olduğu zaman metilen mavisinin manda karaciğer ve böbrek arginazına ilavesi arginaz aktivitesini azaltmaktadır. Manda karaciğer ve böbreğinde bulunan arginazın metilen mavisini tarafından fotoinaktivasyona neden olduğu gösterilmiştir. Metilen mavisinin manda karaciğer ve böbrek doku arginazı üzerindeki inhibitör etkisi incelenmiş ve kinetik özellikleri araştırılarak inhibisyonun nonkompetatif olduğu ortaya konulmuştur. Fotoinaktivasyon muhtemelen etkisini arginaz molekülünde bulunan histidil artıklarının imidazol gruplarını değişikliğe uğratarak göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Fotoinaktivasyon, Arginaz, Üre döngüsü

Photoinactivation of Buffalo Liver and Kidney Tissue Arginases and its Kinetic Properties

Abstract: Exposure of buffalo liver and kidney tissue arginases to a 150 w light source from a distance of 8-10 cm, in the presence of 0.05mM methylene blue, caused significant inhibition of arginase activity. It was determined that this inhibition occurred differently in liver and kidney tissues. Arginase activity was spectrophotometrically measured using the Thiosemicarbazide diacetyl-monoxime urea (TDMU) method.

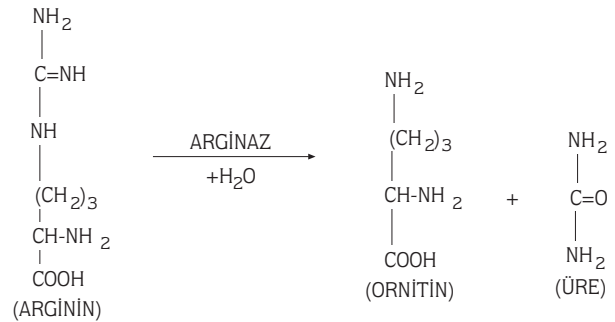
Following preincubation with $MnCl_2$, exposure to a 150 w light source and the addition of methylene blue, the activity of arginase was found to be lower than that after preincubation with a 150 w light source and methylene blue and the addition of $MnCl_2$. Addition of methylene blue to buffalo liver and kidney tissue did not reduce the activity of arginase when the enzymatic reaction was carried out in darkness or in daylight, indicating that arginase is subject to photoinactivation by methylene blue. Enzyme inhibition was reduced 45-48% to 63% in the liver tissue and 30-40% in the kidney tissue. The inhibitory effect of methylene blue on buffalo liver and kidney tissue of arginase and its kinetic properties were studied. The inhibition was found to be noncompetitive. Photoinactivation might show its effect by modifying imidazole groups of histidyl residues in arginase molecules.

Key Words: Photoinactivation, Arginase, Urea Cycle

Giriş

Arginaz ((EC.3.5.3.1.) L-arginin ürehidrolaz), Üre Döngüsü'nün son basamağı olan, arginini üre ve ornitine parçalayan enzimdir. Varlığı ilk defa 1904 yılında Kossel ve Dakin tarafından keşfedilen arginaz sitoplazmik bir enzimdir (1,2,3).

Enzimin esas yeri karaciğer dokusudur. Karaciğer dokusu dışındaki dokularda da rastlanmıştır. Bu dokuların başlıcaları kan hücrelerinden eritrosit, lökosit, trombosit;



iskelet ve kalp kası; böbrek; meme; plasenta; testisler vb. birçok dokuda varlığı ispatlanmıştır (4,5,6).

Arginaz enzimi tam bir aktivite göstermesi için kofaktör olarak Mn^{++} iyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Bu da enzimin tetramerik yapıya sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Mn^{++} katyonları, arginaz enzimine bağlanarak enzimi dayanıklı hale getirmektedir(6).

Fotoinaktivasyon, enzimdeki histidil artıklarının (histidyl residues) imidazol gruplarının parçalanması sonucu oluştuğu ve bu suretle enzime liganın bağlanmaması sonucu katyonların etkili olmadığı daha önce öne sürülmüştür. Metilen mavisinin ışıkta artırılmış siçan karaciğer arginazını da fotoinaktivasyona uğrattığı ve enzimin aktivitesini önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir (7).

Bu araştırma, manda karaciğer ve böbrek doku arginazının kinetik özelliklerini tespit etmek için yapılmıştır. Bu kinetik özelliklerden K_m , V_{max} ve metilen mavisinin ışığa karşı enzim üzerindeki etkilerinin ortaya koyulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada kullanılan manda karaciğer ve böbrek dokuları Elazığ Elet Tic. A.Ş. Kesimevi'nde kesilen 5 mandadan karaciğer ve böbrek doku örnekleri alınıp bu dokuların hepsi ayrı ayrı %0.9 luk NaCl içinde en kısa zamanda laboratuara getirilmiştir. Bu dokuların hepsinde deneyler 3 kez tekrarlandıktan sonra kinetik sonuçlar bulunmuştur.

Alınan dokular iki süzgeç kağıdı arasına konup, kurutulduktan sonra $MnCl_2$ ile sulandırılarak Potter-Elvenjam cam-cam homojenizatörde homojenize edilmiştir. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde 16000g'de 15 dakika santrifüj edilerek, süpernatantlar deney için kullanılmıştır.

Arginaz enzim aktivitesi, L-argininin arginaz ile hidrolizi sonucu oluşan ürenin TDMU yöntemiyle ölçülmesi sonucu saptanmıştır (8). Örnekler önce 4 mM $MnCl_2$ ile 0.05 mM 'lık metilen mavisi varlığında 52 °C de 9 dakika metabolik su banyosunda preinkübasyona tabii tutulmuştur.

1-Örneklerin metilen mavisile muamelesi: Deney koşullarına göre preinkübasyon işlemi metilen mavisinin etkisini araştırmak üzere 10 dakikalık iki dönem halinde toplam 20 dakika olarak uygulanmıştır. Metilen mavisi şartlara göre I. ve II. preinkübasyon aşamasında ilave edilmiştir.

2-Örneklerin ışık kaynağı ile muamelesi: Metilen mavisinin ilave edildiği koşullara göre aynı şekilde preinkübasyonun değişik aşamalarında numunelere 8-10 cm mesafeden 150 w ışık kaynağına maruz bırakılmıştır.

Enzimatik karışım 1ml olup, bu karışım 50 mM L-argininden (pH=9.5) 0.4 ml; 75 mM karbonat tamponundan (pH=9.5) 0.4ml; 0.2ml de enzim kaynağı olacak şekilde hazırlanmıştır. Tüplere önce L-arginin, sonra karbonat tamponu konularak preinkübasyondan çıkan enzim kaynağı ilave edilip inkübasyon için 37°C de 4 dakika sallantılı metabolik su banyosunda tutularak enzimatik tepkime başlatılmıştır. Daha sonra 3 ml asit karışımı ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Üzerine 2 ml renk ayırıcı konulup karıştırılarak tüpler 10 dakika kaynar su içinde bekletilmiştir. Daha sonra renk oluşumu sağlanmıştır. Oluşan renge göre, 520 nm dalga boyunda elde edilen örneklerin absorpsiyonundan sıfır zaman körlerinin absorpsiyonlarının çıkarılmasıyla kalan değer Ünite üzerinden değerlendirilmiştir.

Doku homojenatlarındaki protein miktarı Biüret Metodu ile ölçülmüştür (9).

Ünite : 1 mg proteinin 1 saatte oluşturduğu üre miktarının mikromol cinsinden ifadesidir. μ mol üre/mg protein X saat olarak alınmıştır.

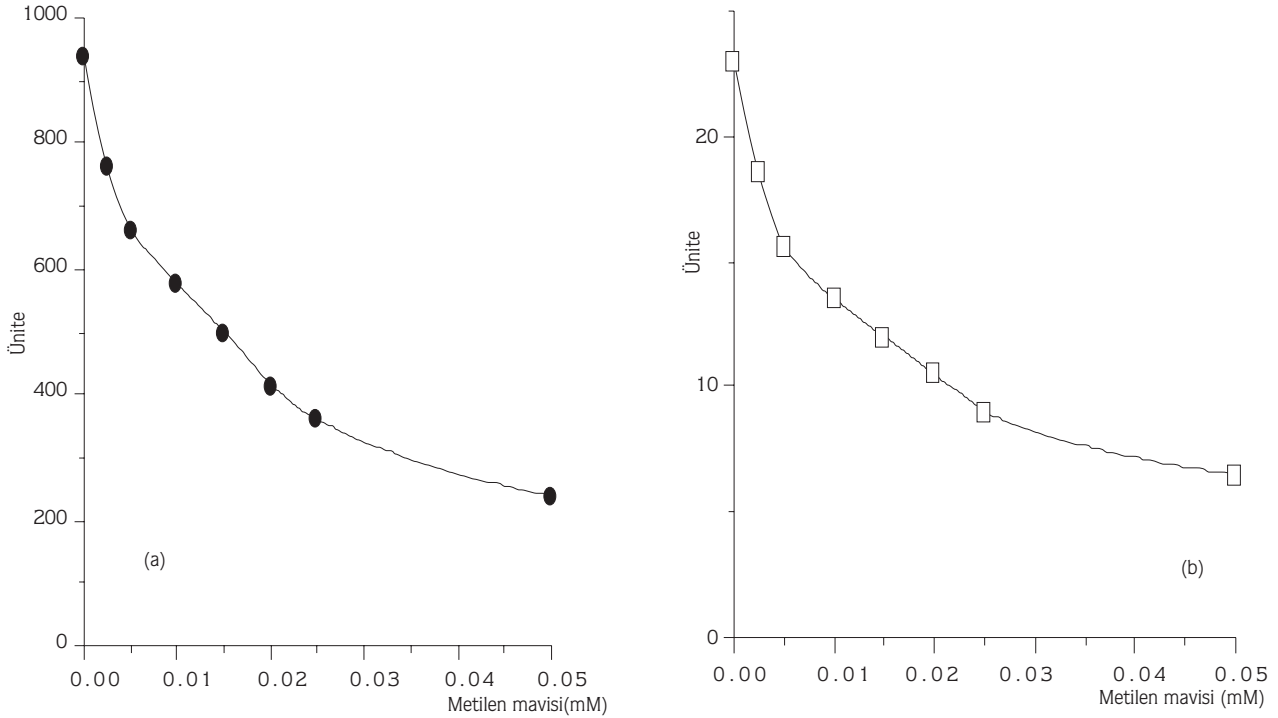
Bulgular

Manda karaciğer ve böbrek dokuları 8 mM $MnCl_2$ ile sulandırılıp 53°C de 9 dakika I. preinkübasyona bırakıldıktan sonra 0.0025-0.05mM arasında değişen konsantrasyonlarında metilen mavisine ilave edilmiş ve 53°C de 9 dakika II. preinkübasyona bırakılmıştır.

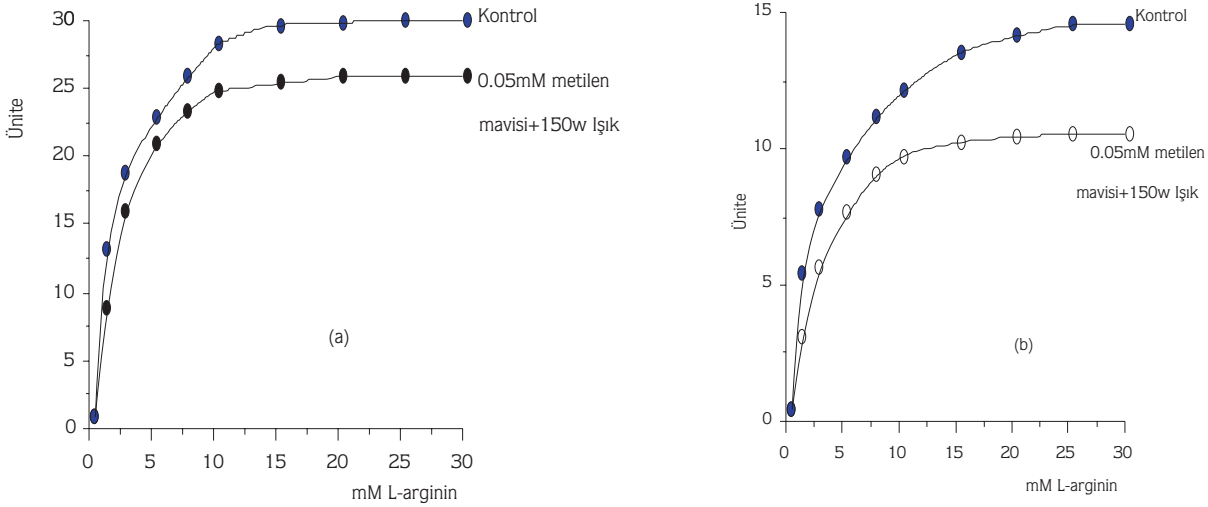
Metilen mavisinin 0.0025 mM konsantrasyonunda kontrole göre; karaciğer dokusunda %20, böbrek dokusunda %22'lik bir düşüş olmuştur. Metilen mavisinin konsantrasyonu 0.05mM olduğunda karaciğer dokusundaki aktivitede %74'lük, böbrek dokusundaki aktivitede ise yaklaşık %70'lik düşüş olduğu görülmüştür (Şekil 1).

Süpernatantlar 8 mM'lık $MnCl_2$ ile I. preinkübasyon sonrası II. preinkübasyonda farklı substrat konsantrasyonunda 0.03 mM'lık metilen mavisine ilave edilerek II. preinkübasyona tabii tutulmuştur. Metilen mavisine ve 150 w ışık varlığında manda karaciğer dokusunda yaklaşık %15 (Şekil 2a), manda böbrek dokusunda da %39 'luk (Şekil 2b) aktivite kaybetmiştir.

Manda karaciğer ve böbrek dokusunun farklı arginin konsantrasyonlarında arginaz aktiviteleri saptanarak



Şekil 1(a-b): Manda karaciğer dokusu(a) ve böbrek dokusu(b) arginazının değişik konsantrasyonlarındaki metilen mavisi ile fotoinaktivasyon eğrisi.



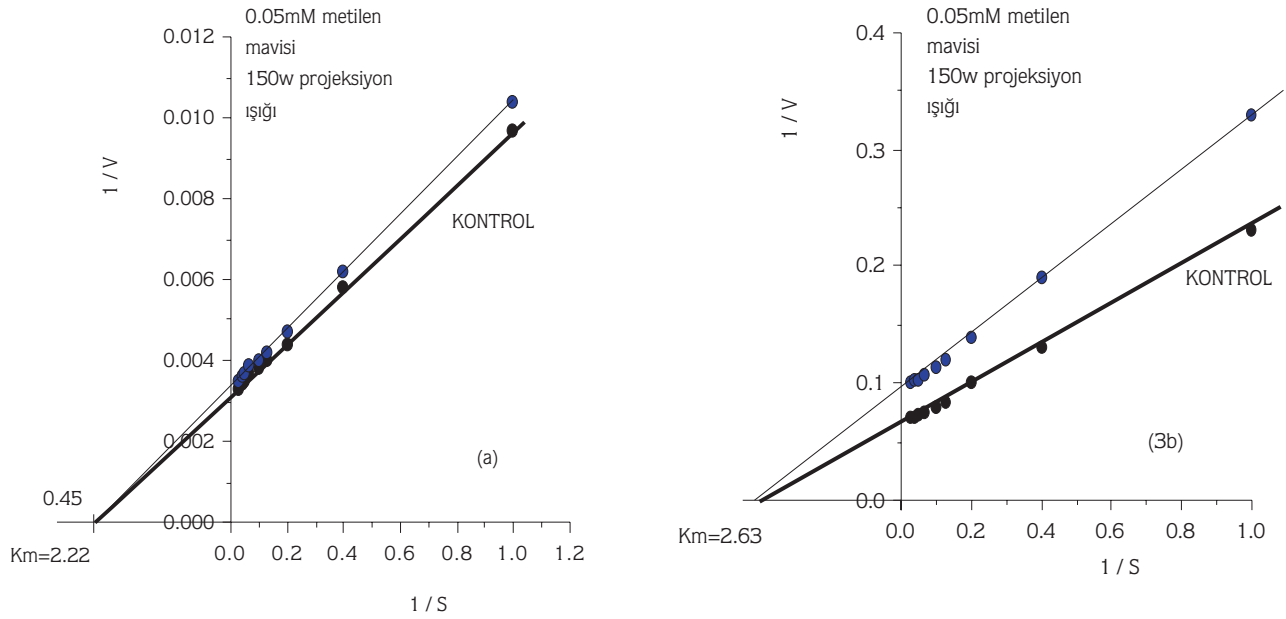
Şekil 2(a-b): Metilen mavisinin manda karaciğer dokusu(a) ve manda böbrek dokusu (b) arginaz aktivitesi üzerine farklı substrat yoğunluklarındaki etkisi.

Michaelis-Menten grafiğine göre değerlendirilmiştir (Şekil 2a-2b). Bu değerlendirmeye Lineweaver-Burk grafiğine göre her iki dokudaki inhibisyonunda nonkompetatif olduğu görülmüştür (Şekil 3a-3b).

Manda karaciğer ve böbrek dokusunun 4mM $MnCl_2$, %0.01 mM metilen mavisi kontrol grubuna göre farklı ortamlardaki durumu çalışılmıştır. Oda ışığı, karanlık ve

150 w ışık ortamı kullanılmıştır. Her ortamda farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 1-2 de görüldüğü gibi manda karaciğer ve böbrek dokusunun 4mM $MnCl_2$, 0.01mM metilen mavisi varlığında farklı ortamlardaki durumu çalışılmıştır. Kontrol grubuna göre oda ışığında karaciğer dokusu %55, böbrek dokusu %70; 150 w ışıkta karaciğer



Şekil 3(a-b): Metilen mavisinin manda karaciğer(a) ve böbrek dokusu(b) arginaz aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisinin Lineweaver-Burk yöntemi ile değerlendirilmesi.

Tablo 1. Değişik ışık koşullarında metilen mavisinin manda karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine olan etkisi.

Koşullar	Aktivite %	
	Kontrol	Kalan aktivite (+Metilen mavisi)
Oda Işığı	100	55
150W Işık	100	47
Karanlık	100	52

dokusu %55, böbrek dokusu %67; karanlık ortamda ise karaciğer dokusu %47, böbrek dokusu %60 enzimi inhibe olduğu görülmüştür.

Tablo 3-4 de görüldüğü gibi manda karaciğer ve böbrek doku süpernatantlarına $MnCl_2$ ve metilen mavisinin I. ve II. preinkübasyonda farklı preinkübasyon aşamasında ilave edildiğinde şu sonuçlar bulunmuştur: 8mM $MnCl_2$ ve %0.1 mM metilen mavisinin I. preinkübasyonda koyup 150 w ışık uygulanarak 18 dakikalık preinkübasyon uygulanan deney sonucunda manda kontrol grubuna göre; karaciğer dokusunda %59, böbrek dokusunda ise %39 aktivitenin düştüğü görülmüştür (B).

I. preinkübasyonda metilen mavisi, II. preinkübasyonda ise $MnCl_2$ eklenerek 150 w ışık

Tablo 2. Değişik ışık koşullarında metilen mavisinin manda böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine olan etkisi.

Koşullar	Aktivite %	
	Kontrol	Kalan aktivite (+Metilen mavisi)
Oda Işığı	100	70
150W Işık	100	67
Karanlık	100	60

uygulanmasında ise karaciğer dokusunda %63'lük, böbrek dokusunda %45'lik bir inhibisyon tesbit edilmiştir (C).

150 w ışık varlığında I. preinkübasyonda $MnCl_2$, II. preinkübasyonda metilen mavisi ilave edildiğinde ise, karaciğer dokusunda %45'lik, böbrek dokusunda %58'lik bir düşüş olduğu görülmüştür (D).

Tartışma

Metilen mavisi ve 150 w ışığın, manda karaciğer ve böbrek dokusu arginazını inhibe ettiği görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda (10,11,12), metilen mavisinin ve 150 w ışığın arginaz aktivitesi üzerinde inhibitör etki yaptığı kanıtlanmıştır .

	MnCl ₂	% 0.1'lik Metilen	% 0.1'lik Metilen	MnCl ₂	Işıklandırma		Kalan % Aktivite
					150W Işık	Oda Işığı	
A	+	-	-	-	-	+	100
B	+	+	-	-	+	-	41
C	-	+	-	+	+	-	55
D	+	-	+	-	+	-	37
I. Preinkübasyon		II. Preinkübasyon		I. ve II. Preinkübasyon			

Not: (+) veya (-) işareti A, B, C, D tüplerinde o maddenin varlığını veya yokluğunu göstermektedir.

Tablo 3. MnCl₂, metilen mavisi ve ışığın manda karaciğer arginazının fotoinaktivasyonuna olan etkileri.

	MnCl ₂	% 0.1'lik Metilen	% 0.1'lik Metilen	MnCl ₂	Işıklandırma		Kalan % Aktivite
					150W Işık	Oda Işığı	
A	+	-	-	-	-	+	100
B	+	+	-	-	+	-	38
C	-	+	-	+	+	-	42
D	+	-	+	-	+	-	39
I. Preinkübasyon		II. Preinkübasyon		I. ve II. Preinkübasyon			

Not: (+) veya (-) işareti A, B, C, D tüplerinde o maddenin varlığını veya yokluğunu göstermektedir.

Tablo 4. MnCl₂, metilen mavisi ve ışığın manda böbrek arginazının fotoinaktivasyonuna olan etkileri

Samuel (13), arginaz enziminin substrat ilave edilmeden önce inhibitör ile karşılaşması halinde inhibisyon olayının fazla olduğunu; substrat ile inhibitör karşılaştıktan sonra enzim ilave edildiğinde de inhibisyonun az olduğunu açıklamıştır. Enzimimiz inhibitörle karşılaştıktan sonra aktivatör olan MnCl₂ uygulandığında inhibisyonun karaciğer dokusu için %45, böbrek dokusu için de %58 olduğu, oysa aktivatör uygulandıktan sonra inhibitörün uygulanmasıyla da inhibisyonun karaciğer dokusu için %37, böbrek dokusu için %39 olduğu görülmüştür. Böylece enzim önce inhibitörle karşılaşmış daha sonra aktivatörle muamele edilmesinde inhibisyon daha az olmaktadır. Çünkü, substrat inhibitöre bağlandıktan sonra E-M⁺⁺ kompleksinden Mn⁺⁺'nin ayrılması daha zor olur.

Enzim, metilen mavisi ve MnCl₂'ün farklı ortamlarda ilavesiyle inhibisyon gerçekleştiği görülmüştür. Arginaz enzimi dimerik yapıdadır (E-Mn₂). Mn⁺⁺ iyonları bu dimerik yapıya bağlanarak enzimi tetramerik (E-Mn₄) yapıya dönüştürmektedir. Böylece tam aktivite gösterdiği ispatlanmıştır (14). Metilen mavisi ve 150 w ışık enzimin

aktivatörü olan MnCl₂ ile tetramer yapı kazanmasını engellemektedir. Elde edilen sonuçlara göre fotoinaktivasyon enzimin yapısında önemli değişiklik sonucu olmaktadır.

150w ışıkla 5-10 cm uzaklıkta enzim fotoinaktivasyona uğramaktadır. Enzimin histidil gruplarının imidazol grubunun parçalanması sonucu oluşturduğu ve bu suretle enzime ligantın bağlanmadığını, neticede Mn⁺⁺ katyonlarının etkili olmadığı daha önce yapılan çalışmada gösterilmiştir (14).

Manda böbrek ve karaciğer homojenatının Mn⁺⁺ katyonları ile preinkübasyondan sonra metilen mavisiyle ışığa maruz bırakılmaları sonucunda inaktivasyon düzeyi düşmektedir. Enzimin oligomerik yapıya kavuştuktan sonra histidil artıklarının yıkımı oligomerik yapının değişimini ancak belli miktarda etkilemektedir. Daha önce yapılan çalışmada (15), metilen mavisinin oda ışığında fotokimyasal bir oksidant olarak hareket ettiği bilinmektedir. Bu fotokimyasal oksidasyon esnasında proteinlerde bulunan amino asitler modifikasyona uğramaktadır. Özellikle histidin, metionin, sistein,

triptofan, tirozin ve sistin amino asitlerinin yan grupları bu değişime maruz kalmaktadır.

Fotodinamik yıkım olarak bu olayda histidil artıkları önemli ölçüde yıkıma uğramakta buna bağlı olarak da arginaz enzimi aktivitesini kaybetmektedir (15).

Ortam ne olursa olsun metilen mavisi manda karaciğer ve böbrek dokusu için inhibitör etki etmektedir. 150 w

ışık eklenmesi ise inhibisyonu daha önemli hale getirerek, manda karaciğer ve böbrek doku arginaz enzimini fotoinaktivasyona uğratmaktadır. Fotoinaktivasyon, arginazın yapısındaki histidil gruplarının imidazol halkasını bozarak inhibitör etki yaptığı ispatlanmıştır. Manda karaciğer ve böbrek doku arginazının da bu şekilde inhibe olduğu ihtimali fazladır.

Kaynaklar

1. Fuentes J.M., Campo M.L. and Soler G.: Kinetics and Inhibition by Some Amino Acids of Lactating Rat Mammary Gland Arginase. Arch. Inter. Physiol. Bioch. Biophys. 1994, 102: 255-258.
2. Gargnata C.L. and Bond J.S.: Assay and Kinetic of Arginase. Anal. Biochem. 1986, 154: 388-394.
3. Ber E. and Muszynska G.: Chemical Modification of Rat Liver Arginase. Acta Biochemica Polonica. 1979, Vol 19: No: 1/2.
4. Nadolska-Lutyk J., Grabon W. and Porembaska Z.: Arginase in Bull Testis. Acta Bioch. Polonica. 1990, 37: 377-384.
5. King J.: Practical Clinical Enzymology. D. Von Nostrand Company London. 220-225, 1965.
6. Bellin J.S. and Yankus A.: Influence of Dye Binding on the Sensitized Photooxidation of Amino Acids. Arch. Biochem. Biophys. 1968, 123: 18-28.
7. Konarska L., Tomaszewski and Rolczyk U.: Studies on L-Arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. Biochem. Medic. Metab. Biol. 1986, 35: 170-178.
8. Geyer J.W. and Dabich D.: Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenate. Department of Biochemistry. 1971, 412-417.
9. Gornall A.G., Bardawill C.J. and David M.M.: Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. J. Biol. Chem:1975; 177: 751
10. Özdemir N. and Ozan S.: M. benedeni Arginazının Fotoinaktivasyonu ve Kinetik Özellikleri. Erciyes Üniv. Sađ. Bil. Derg: 1993; 2(2): 152-157
11. Ozan S., Gürsu F. ve Gülen Ş.: İnsan Tükürük Arginazının Fotoinaktivasyonu. Biyokimya Derg:1991; F.Ü. 16(3): 57-65
12. Ozan S. ve Gülen Ş.: Farklı Türlerin Organlarında Bulunan Arginazların Metilen Mavisi ile Fotoinaktivasyonları. Dođa-Tr. J. of Biology: 1991; 15 : 222-229.
13. Samuel M.: Sodium Nucleate Inhibition of Arginase Activity. Science: 1952, 115: 69-70
14. Ber E. and Muszynska G.: Chemical Modification of Rat Liver Arginase. Acta Biochem. Polonica: 1979; 26: 103-114.
15. Ray W.J. Jr: Photochemical Oxidation. In S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Eds): Methods in Enzymology Academic Press New York. Vol. 11, pp. 490-497, 1967.