

Sığır Rumen Doku Arginazı ve Subünitelerinin Molekül Ağırlığı*

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

Geliş Tarihi: 01.02.2001

Özet: Sığır rumen doku arginazı kısmi olarak saflaştırılmış, özellikleri araştırılmış ve diğer doku arginazlarınınki ile karşılaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzimin spesifik aktivitesi rumen homojenatından yaklaşık 150 kez fazla bulunmuştur.

Nativ enzimin molekül ağırlığı sefadeks G-150 jel filtrasyonla $122\,500 \pm 2500$, subünitelerinin molekül ağırlığı ise SDS-PAGE ve sefadeks G-100 jel filtrasyonla $44\,000 \pm 1000$ ve $34\,500 \pm 500$ olarak saptanmıştır. Nativ enzim, iki farklı molekül ağırlığına sahip subünitelerin birleşmesi ile meydana gelen bir trimerdir.

Saflaştırılmış enzim, aktivitesini buzdolabı, oda sıcaklığı ve derin dondurucuda giderek kaybettiğinden dayanıksızdır. Enzim $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 'de (derin dondurucuda) 9 günde aktivitesinin % 50'sini kaybetmektedir.

DEAE-sephacel kromatografisi ile sığır rumen doku arginazının tek bir anyonik formunun varlığı gösterilmiştir. Bir başka deyişle sığır rumen doku arginazı tek bir izoenzim içermektedir. Sığır rumen dokusundan izole edilen arginazın, diğer doku arginaz izoenzimleri ile karşılaştırıldığında A_2 veya A_4 formu olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Sığır rumen dokusu, arginaz, subünite, molekül ağırlığı

Cattle Rumen Tissue Arginase and Molecular Weights of Its Subunits

Abstract: The arginase was partially purified from cattle rumen tissue and its properties were investigated and thereafter compared with those of other tissue arginases. The specific activity of the purified enzyme was found about 150 times greater than that of the crude rumen homogenate.

The molecular weight of native arginase, estimated by gel filtration on a Sephadex G-150 column, was $122\,500 \pm 2500$ and those of subunits of the enzyme, estimated by SDS-PAGE and gel filtration on a Sephadex G-100 column, were $44\,000 \pm 1000$ and $34\,500 \pm 500$. This indicates that the native enzyme is a trimer composed of subunits with two different molecular weights.

The enzyme was unstable because it gradually lost its activity in a freezer, at $+4\text{ }^\circ\text{C}$ and room temperature. The enzyme lost 50% of total activity in 9 days at $-30\text{ }^\circ\text{C}$ (in the freezer).

The presence of a single anionic form of arginase in cattle rumen tissue was demonstrated by DEAE-sephacel chromatography. Cattle rumen tissue arginase contains only one isoenzyme. Arginase isolated from cattle rumen tissue may be arginase A_4 or A_2 form when it is compared with those of other tissue arginase isoenzymes.

Key Words: Cattle rumen tissue, arginase, subunit, molecular weight

Giriş

L-argininin, üre ve L-ornitine dönüşümünü katalize eden arginaz (L-arginin üreohidrolaz; EC 3.5.3.1) üre döngüsünün anahtar bir enzimi olup, birçok organizmada bulunur ve azot metabolizmasında temel bir rol oynar (1).

Gerek fare gerekse insan dokularında yapılan çalışmalarda arginaz enziminin beş izoenzimi olduğu saptanmıştır (2-9). İzoenzimlerin dokulara göre dağılımı şöyledir: Karaciğer (A_1 , A_2 , A_3 , A_5), böbrek, bağırsak,

beyin (A_1 , A_4), Gl. mandibularis (A_3), fibroblast (A_1 , A_3 , A_4), eritrosit (A_2 , A_4), tükürük ve Gl. parotis (A_1), meme bezi (A_1 , A_2).

Hirsch-Kolb ve ark. (10), çeşitli üreoteliklerin karaciğer arginazlarının molekül ağırlıklarını 120-160 kDa civarında bulmuşlardır. Brusdeilins ve ark. (11), insan, domuz, sığır, köpek, rat, fare karaciğer arginaz subünitelerinin molekül ağırlıklarını elektroforez ile 38500 ± 500 ile 39700 ± 400 arasında tespit etmişlerdir.

* Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1440) tarafından desteklenmiştir.

Üreotelik hayvanların karaciğerindeki arginazın ana fonksiyonu amonyağın detoksifikasyonu için ürenin üretimidir. Ancak, üre sentezi olmayan rumen gibi birçok ekstrahepatik doku, arginazı üre döngüsünden başka amaçlar için kullanmaktadır. Argininin hidrolizinde ikinci reaksiyon ürünü olan ornitin; poliamin, prolin ve glutamat sentezi için bir prekürsördür (2,3,7,12-17).

Siğir rumen dokusu üre döngüsü ile üre sentez edemez (18); ancak, aktif bir arginaz enzimine sahiptir (12,19,20) ve bu dokudaki arginazın, amonyağın detoksifikasyonundan çok azotlu bileşiklerin, rumen içeriği ile rumen veni arasında resirkülasyonundan sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (19,20). Ancak, rumen doku arginazının kesin fonksiyonu henüz bilinmemektedir.

1960'lı yıllarda varlığı ortaya konulan siğir rumen doku arginaz enziminin fonksiyonu üzerine araştırmalar yapılmıştır. Ancak siğir rumen doku arginazı ile ilgili çalışmalar son derece sınırlı olup, rumen doku arginazının ve subünitelerinin molekül ağırlığı, izoenzimlerinin var olup olmadığı hakkında bir bilgi bulunamamıştır. Buradan hareketle siğir rumen doku arginazının belirtilen özelliklerinin araştırılması gerekli görülmüştür.

Materyal ve Metot

Elazığ Elet Tic. A.Ş. Mezbahasında kesilen siğirlardan elde edilen rumenler çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

Tiyosemikarbazid- Diasetilmonoksim- Üre (TDMU) metodu (21) kullanılarak ve siğir rumen doku arginazı için optimize edilen şartlarda (22) aktivite ölçülmüştür. Protein miktarının ölçümünde Lowry (23) metodu kullanılmıştır.

Çalışmada, bir 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.

Siğir rumen doku arginazının saflaştırılması:

Saflaştırma işleminde önceden farklı dokular için uygulanmış işlemlerin bir kısmı siğir rumen doku arginazı için uyarlanmıştır.

1-Tamponda homojenizasyon: Rumen homojenatı, 50 g kıyılmış rumen dokusunun homojenizasyon çözeltisi [0,05 M $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,16 M KCl, 10 mM 2-

Merkaptoetanol içeren 0,01 M'lik Tris-HCl tamponu (pH:7,5)] ile 200 ml'ye tamamlanıp, homojenizatörde (Sorvall Omni Mixer) 30 dakika kadar homojenize edilmesiyle elde edilmiştir. Homojenat iki defa tülbentten süzölmüştür.

2-Homojenatın santrifüjü: Homojenat soğutmalı santrifüjde +2 °C'de 14 000 rpm'de 20 dakika (16 000g) santrifüj edilerek homojenat süpernatantı elde edilmiştir.

3-Isıtma işlemi: Süpernatantın pH'sı 7,5'a ayarlandıktan sonra 60 °C' deki su banyosunda 20 dakika bekletilmiş ve bu süre içerisinde birkaç defa bagetle karıştırılarak sıcaklığın eşit dağılımı sağlanmıştır. Isıtma işleminden sonra homojenat, kırılmış buz içerisinde 5 dakika soğutulmuştur. Isıtma sonucu denatüre olan proteinleri uzaklaştırmak amacı ile, homojenat 14 000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant, süzgeç kağıdı ile süzülerek sıcaklık fraksiyonu elde edilmiştir.

4-Aseton ile işlem: Bir önceki basamaktan elde edilen süpernatanta, buz banyosunda 30 dakika içerisinde, hacminin 1,5 katı oranında -25 °C'de bekletilmiş asetondan damla damla ilave edilmiştir. Karışım daha sonra 14 000 rpm'de ve -10 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant kısmı atılmış, peletler ise 35 ml homojenizasyon çözeltisi içinde cam-teflon homojenizatörde homojenize edilmiştir. Daha sonra, 0,01 M Tris-HCl tamponuna karşı 1 gece diyaliz edilen homojenat, 17 000 rpm'de 20 dakika (25 000g) santrifüje edilmiştir.

5-(NH₄)₂SO₄ ile doyurma: Katı amonyum sülfat % 45 (8,37 g/30,5 ml) doygunluğa erişinceye kadar, süpernatanta yavaş yavaş ve karıştırılarak ilave edilmiştir. Otuz dakikalık karıştırma işleminden sonra 10 000 rpm'de 30 dakika (8500 g) santrifüj edilerek pelet kısmı atılmış, süpernatanttaki doygunluğun % 60'a (12,07 g/33ml) ulaşması için gerekli amonyum sülfat bir kez daha ilave edilmiş ve aynı işlemler tekrarlanmıştır. % 60 amonyum sülfat doygunluğunun süpernatantı atılmış ve pelet, 5 mM 2-Merkaptoetanol içeren 0,01 M Tris-HCl tamponunun (pH:8) 2 ml'sinde çözölmüştür. Bu fraksiyon diyaliz torbalarına aktarılarak, aynı tampona karşı bir gece diyalize edilmiştir. Tampon bu süre içerisinde 4 kez değiştirilmiş, diyaliz içeriği 11 000 rpm'de 20 dakika (10 000g) santrifüj edilmiştir.

6-DEAE-sephacel kromatografi: % 45-60 amonyum sülfat ile doyurulmuş diyaliz içeriği, DEAE-

sephacelle paketlenmiş ve 5 mM 2-merkaptolanol içeren 0,01 M Tris-HCl tamponunun (pH:8) 150 ml'si ile dengelenmiş kolona (2,5x10 cm) uygulanmıştır; elüatlar 65 ml/saat akış hızında 3 ml'lik fraksiyonlar halinde toplanmıştır. Enzim pH 8'de kolona adsorbe olduğundan elüsyon için iyonik güç uygulanmış ve elüsyon aynı tamponda 0,01 M ile 0,5 M arasında NaCl'ün (9x30ml) 9 basamak konsantrasyon gradienti uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

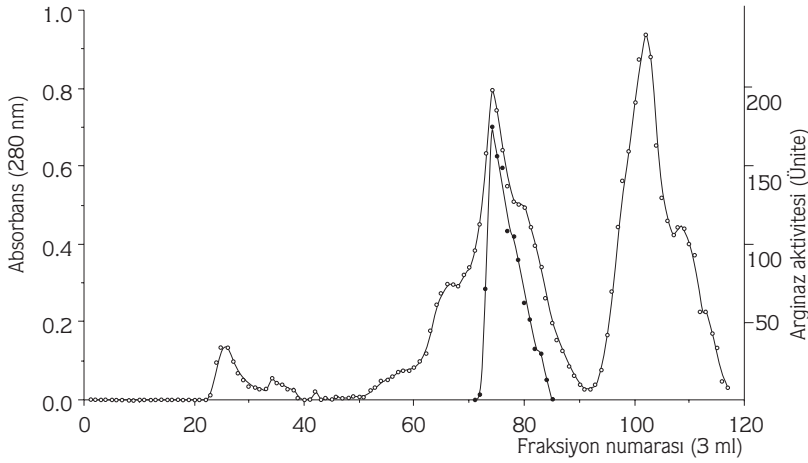
Aktif fraksiyonlar [73-84] birleştirilmiş (Şekil 1) ve % 90 doygunluktaki amonyum sülfatla çöktürülerek yoğunlaştırılmıştır. Pelet 0,01 M Tris-HCl pH: 7,5 (1 mM MnCl₂, 5 mM 2-merkaptolanol, % 0,9 NaCl içeren) tamponunun 2 ml'sinde çözülmüş ve aynı tampona karşı diyaliz yapıp 11000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir.

7-Jel Filtrasyon: Bir önceki basamaktan elde edilen diyalize edilmiş örnek, % 0,9 NaCl içeren 0,01M Tris-HCl

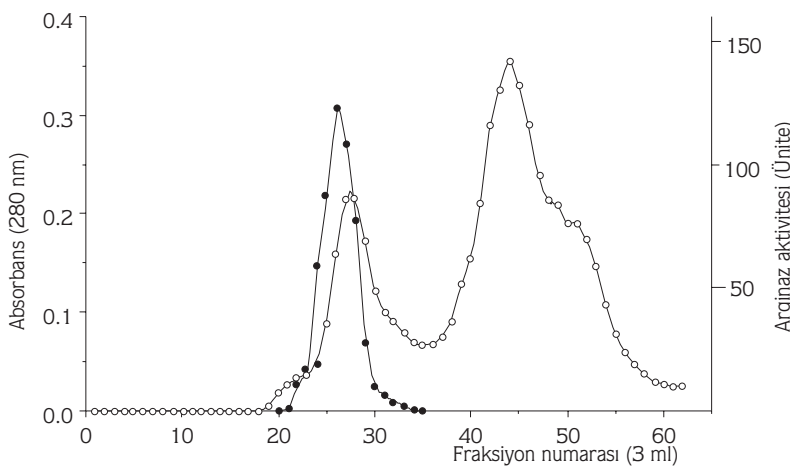
tamponu (pH:7,5) ile dengelenmiş sefadeks G-150 kolonunda (2,5 x 27,5 cm) iyice saflaştırılmış ve 280 nm'de absorbanans alınmayınca kadar kolon tamponla yıkanmıştır. Absorbanansları yüksek olan tüplerde enzim aktivitesine bakılarak, en yüksek aktiviteye sahip olan tüpler [23-29] birleştirilmiş (Şekil 2) ve sonraki deneylerde enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Molekül ağırlığı tayini:

a-Jel filtrasyonla nativ enzimin molekül ağırlığının tayini: Sığır rumen doku arginazının molekül ağırlığı Andrews'in (24) metoduna göre tayin edilmiştir. Kromatografi işlemi, 0,1 M KCl içeren 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,5) ile dengelenmiş sefadeks G-150 süperfine kolonunda (2,5 x 27,5 cm) yapılmış ve aynı mobil faz ile elüsyon gerçekleştirilmiştir. Molekül ağırlığı standartı olarak, Alkol dehidrogenaz (150 000), Albumin (66 000), Karbonik anhidraz (29 000), sitokrom c (12 400) kullanılmış ve % 5 gliserol içeren dengeleme



Şekil 1. Sığır rumen doku arginazının DEAE-sephacel kromatografisi, o- 28 nm'de absorbanans, •- Arginaz aktivitesi. 65 ml/saat akış hızında 3 ml'lik fraksiyonlar toplanmıştır. Kolon hacmi : 50 ml.



Şekil 2. Sığır rumen doku arginazının Sefadeks G-150 jel filtrasyonu. o- 28 nm'de absorbanans, •- Arginaz aktivitesi. 20 ml/saat akış hızında 3 ml'lik fraksiyonlar toplanmıştır. Kolon hacmi : 135 ml.

tamponunun 1,5 ml'sinde bu standartlar sırası ile 7,5 - 15 - 4,5 - 3 mg olarak çözülmüş ve kolona uygulanmıştır. Arginazın elüsyonunda dengeleme tamponundaki KCl yerine % 0,9 oranında NaCl içeren tampon kullanılmıştır; 3 ml'lik fraksiyonlar toplanmış, elüsyon hacimleri (Ve) saptanmıştır. Arginazın elüsyon hacmi 280 nm'de absorbans ve enzimatik aktivitenin ölçülmesiyle belirlenirken, herbir standart ve blue dekstranın elüsyon hacimleri 280 nm'de absorbansın ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Void volümün (Vo) ölçülmesinde Blue dekstran (3 mg) kullanılmıştır.

b-Subünitelerin molekül ağırlığının tayini:

SDS-PAGE ve Sefadeks G-100 jel filtrasyon ile gerçekleştirilmiştir.

SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi): Discontinuous SDS-PAGE tekniği kullanılmıştır. Laemmli (25) metodu, vertikal slab jel (10 x 8 cm) Hoefer SE 250 sistemine (Hoefer Scientific Instruments, ABD) uygun olarak modifiye edilmiştir. Bir mm kalınlığında jeller hazırlanmış ve stacking jelde % 3, resolving jelde % 11 akrilamid kullanılmıştır. Güç kaynağı, sabit akım modunda (20 mA /jel) kullanılmış ve soğutma, çeşme suyu ile gerçekleştirilmiştir.

SDS-PAGE sonucunda birden fazla band görüldüğünden subünite molekül ağırlığının belirlenmesinde sefadeks G-100 jel filtrasyon işleminin de yapılması gerekli görülmüştür.

Sefadeks G-100 jel filtrasyon: Bu işlem için saflaştırılmış sığır rumen doku arginazı önce EDTA ile muamele edilmiş ve subünitelerine ayrılması sağlanmıştır. Saflaştırılmış ve kısmen liyofilize edilmiş enzimin 1,5 ml'si 50 mM-EDTA ile 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir (3, 26). Sefadeks G-100 kolonu (2,5 x 20,5 cm), 0,1 M KCl içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) tamponuyla dengelenmiştir. Standart olarak Albumin (66 000), Karbonik anhidraz(29 000), Sitokrom c (12 400) kullanılmıştır. Standartlar % 5 gliserol içeren dengeleme tamponunun 1,5 ml'de sırası ile 13 - 4,5 - 3 mg olacak şekilde çözülmüş ve sefadeks G-100 kolonuna uygulanmıştır. EDTA ile muamele edilen arginazın elüsyonu 1 mM EDTA ve % 0,9 NaCl içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) tamponuyla sağlanmıştır; 1,7 ml'lik fraksiyonlar toplanmış, 280 nm'de absorbansları ölçülerek protein içeriği ve enzim aktivitesi kontrol edilmiş, elüsyon hacimleri (Ve) saptanmıştır. Void volümün (Vo) ölçülmesinde Blue dekstran (3 mg) kullanılmıştır.

Bulgular

Arginaz oligomer formunda aktiftir ve enzimin oligomer formları (izoenzimleri) iyon değişim kromatografisiyle ayrılabilir. Sığır rumen doku arginazının farklı iyonik formlarının dağılımı kromatografiyle incelenmiştir. Rumen arginazı pH 8 'de anyon-değişim kolonuna bağlandığından arginaz aktivitesinin, ön tamponla yıkama ile elüe edilen fraksiyonların hiçbirinde tespit edilemediği, arginazın tümünün kolona bağlandığı ve Şekil 1'de görüldüğü gibi aktivitenin tuz gradientiyle (0,25-0,3 M NaCl içeren, 10 mM pH'sı 8 olan Tris-HCl tamponu ile) tek bir simetrik pik halinde elüe edildiği saptanmıştır. Şekil 1 tipik elüsyon modelini göstermektedir. Bu sonuç sığır rumen doku arginazının tek bir iyonik formunun (izoenziminin) olduğunu göstermektedir.

Sefadeks G-150 jel filtrasyon basamağında da aktivite tek bir pik halinde görülmüştür (Şekil 2).

Homojenat hazırlanırken tamponda kullanılacak optimal $MnCl_2$ konsantrasyonunun saptanması amaçlanmış ve en iyi sonuçlar 50 mM $MnCl_2$ içeren tamponda elde edilmiştir (Tablo 1). Daha düşük ve daha yüksek $MnCl_2$ konsantrasyonları kullanıldığında solüsyonların bulanıklılığı artmış ve aktivitenin düştüğü gözlenmiştir.

Sığır rumen doku arginazı bu saflaştırma basamakları sonunda % 9,59 verimle 145,90 kat saflaştırılmıştır. Başlangıçta spesifik aktivitesi 2,21 olan arginazdan, kısmi saflaştırma sonunda, spesifik aktivitesi 145,90 misli artırılarak 322,45 olan kısmen saf arginaz elde edilmiştir (Tablo 2). Kısmi olarak saflaştırılmış arginaz, kendi molekül ağırlığı ve subünitelerin molekül ağırlıklarının, zamana ve sıcaklığa bağlı stabilitenin saptanması amacı ile kullanılmıştır.

Sefadeks G-150 kolonundaki jel filtrasyonla nativ enzimin molekül ağırlığı $122\ 500 \pm 2\ 500$ Da olarak bulunmuştur (Şekil 3).

Enzimin subünitelerinin molekül ağırlığı; saflaştırılmış enzimin, SDS-PAGE (Şekil 4)'e uygulanmasıyla ve EDTA ile muameleden sonra sefadeks G-100 jel filtrasyonla (Şekil 5) saptanmıştır. EDTA'nın varlığında enzimin inaktif subünitelerine dissosiyeye olduğu ve Mn iyonlarının varlığında subünitelerin nativ formu oluşturmak üzere tekrar birleştiği saptanmıştır. Hem SDS-PAGE hem de sefadeks G-100 jel filtrasyonla enzimin tek tip subüniteden kurulmadığı (subünitelerin benzer olmadığı)

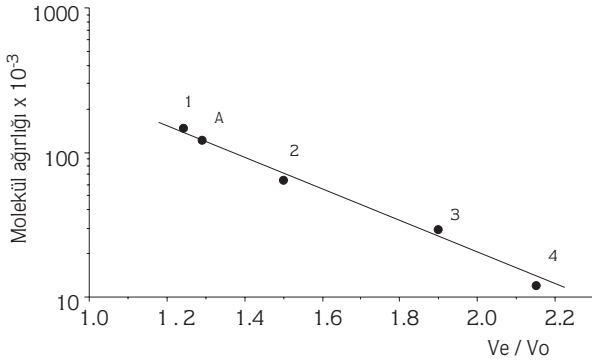
Değişen Mn ⁺² konsantrasyonu	Protein	Arginaz aktivitesi	Spesifik aktivite
mM	mg/ml	Ünite	Ünite/ mg protein
0	16,75	10,24	0,61
5	14,49	45,13	3,11
10	13,53	48,58	3,59
50	13,17	54,34	4,12
100	28,08	53,53	1,90
200	46,99	42,48	0,90

Tablo 1. Homojenattaki arginaz aktivitesinin Mn⁺² iyon konsantrasyonuna bağımlılığı.

Tablo 2. Siğir rumen doku arginazının saflaştırılması.

Saflaştırma basamakları	Total enzim aktivitesi (Ünite)	Total protein (mg)	Verim (%)	Spesifik aktivite (Ünite/mg protein)	Saflaştırma (Misli)
Homojenat	3157,64	1422,96	100	2,21	-
Homojenat süpernatantı	3094,18	1176,28	97,99	2,63	1,19
60 °C'de ısıtma	3046,67	816	96,48	3,73	1,68
Asetonla muamele	2525,93	157,68	79,99	16,01	7,24
%45-60 (NH ₄) ₂ SO ₄ doygunluğu	1459,80	29,66	46,23	49,21	22,26
DEAE-sephacel kromatografisi	824,74	10,32	26,11	79,91	36,15
Sefadex G-150 jel filtrasyonu	303,11	0,94	9,59	322,45	145,90

Ünite = µmol üre / saat

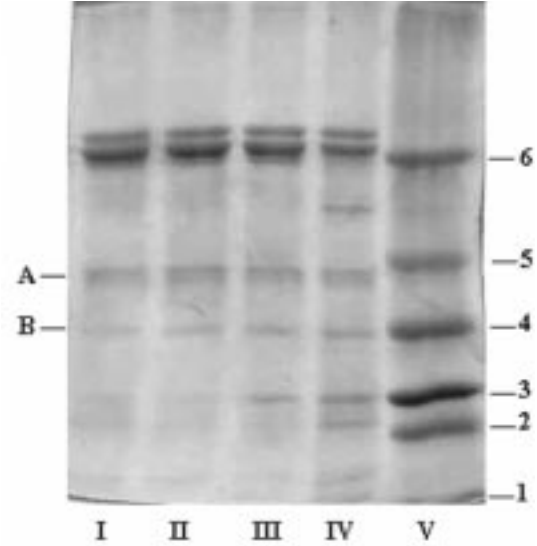
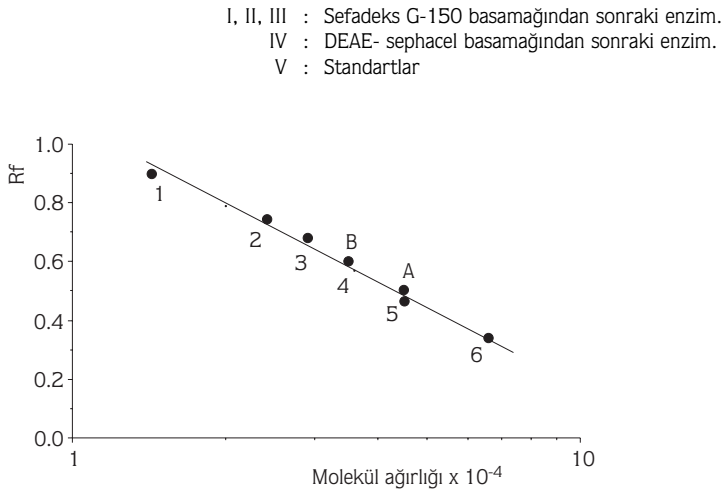


Şekil 3. Siğir rumen doku arginazının molekül ağırlığının tayini. Standartlar: 1- Alkol dehidrogenaz, 150 000. 2- Albumin, 66 000. 3- Karbonik anhidraz, 29 000. 4- Sitokrom c, 12 400. A- Saflaştırılmış siğir rumen doku

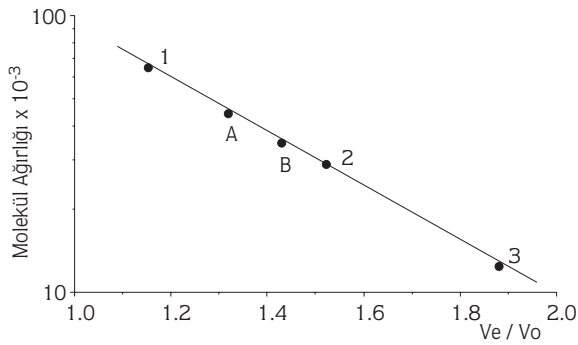
44 000 ± 1 000 ve 34 500 ± 500 Da molekül ağırlığında iki farklı subüniteden meydana geldiği bulunmuştur. Nativ enzim molekül ağırlık ve subünitelerin molekül ağırlık oranı, nativ enzimin trimerik yapıda olduğunu ve ikisi 45 000 ve biri 35 000 molekül ağırlıklı 3 subünitenin biraraya gelerek toplam 125 000 molekül ağırlıklı

oligomerik yapıdaki nativ enzimi oluşturduğu saptanmıştır. Bu veriler nativ enzimin oligomer yapıda olduğunu ve ancak 3 homolog subüniteden oluşmadığını göstermektedir.

Enzimin aktivitesini koruyabildiği sıcaklık ve sürenin saptanması yani enzimin saklanması için gereken şartların (süre ve sıcaklık) tespit edilmesi için enzimin zamana ve sıcaklığa karşı direnci ölçülmüştür. Bu amaçla saflaştırılmış enzim oda sıcaklığı, buzdolabı ve derin dondurucuda porsiyonlar halinde bekletilmiş ve belirli zaman aralıklarındaki aktivite kaybı ölçülmüştür. Şekil 6'da görüldüğü gibi her üç ortamda da enzim dayanıksız olup, hızla aktivitesini kaybetmektedir. En fazla aktivite kaybı oda sıcaklığında olmasına karşın, derin dondurucuda da aktivite kaybının süratli olduğu gözlenmiş ve yaklaşık 9 gün içerisinde aktivitenin yarıya, 30 gün içerisindeyse % 85'lere gerilediği bulunmuştur. Derin dondurucuda saklama sırasında bile hızlı aktivite kaybının görülmesi enzim çalışmalarının çok kısa süre içerisinde bitirilmesinin zorunluluğunu göstermektedir.



Şekil 4. SDS-PAGE ile siğir rumen doku arginazının subünitlerinin molekül ağırlığının tayini.
 Standartlar: 1- α -Laktalbumin, 14 200. 2- Tripsinojen, 24 000. 3- Karbonik anhidraz, 29 000. 4-Gliseraldehit- 3-P- dehidrogenaz, 36 000. 5- Yumurta albumini, 45 000. 6- Siğir albumini, 66 000. A ve B- Saflaştırılmış siğir rumen doku arginazının subünitleri (A-45 000 B-35 000).



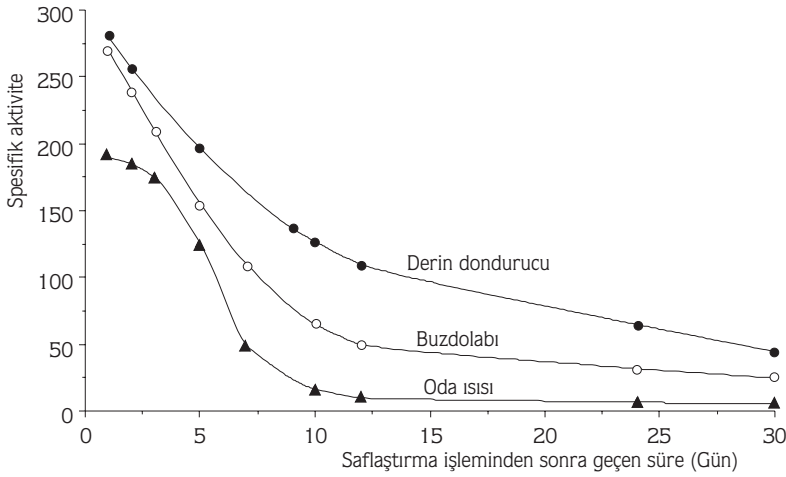
Şekil 5. Sefadex G-100 jel filtrasyonu ile siğir rumen doku arginazının subünitlerinin molekül ağırlığının tayini.
 Standartlar: 1- Albumin, 66 000. 2- Karbonik anhidraz, 29 000. 3- Sitokrom c, 12 400. A ve B- Saflaştırılmış siğir rumen doku arginazının subünitleri (A- 45 000, B- 35 000).

Arginaz DEAE-sephacel kolonuna bağlanmakta ve 0,25-0,3 M NaCl ile elüe edilmektedir (Şekil 1). Bu basamakta elüsyon tamponunda $MnCl_2$ kullanılmamış ve arginaz KCl yerine NaCl ile elüe edilmiştir. İyon değişimi basamağında pH 8'de tampon içerisindeki $MnCl_2$ presipitat oluşumuna yol açmıştır (28). Alkali pH'da arginaz aktivitesini de etkileyen Mn^{+2} 'nin Mn^{+4} 'e okside olması (29) nedeniyle bu basamakta tampondan $MnCl_2$ çıkarılmıştır. Berüter ve ark. (29) insan karaciğer ve eritrositlerinden arginazın saflaştırılmasında DEAE-sellüloz basamağında tampondaki KCl'in aktivite tayinini interfere ettiğini ve düşük aktiviteye neden olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada da aynı sonuç elde edildiğinden KCl yerine NaCl kullanılmasına karar verilmiştir.

Tartışma

Rat meme (7) ve böbrek (17) arginazi soğuk asetonla yapılan işlemde denatüre olarak aktivitesini büyük ölçüde kaybettiğinden rat meme ve böbrek arginazının saflaştırılmasında bu basamaktan kaçınılmıştır. Rat meme ve böbrek arginazının aksine, rumen doku arginazi rat karaciğer arginazi (27) gibi soğuk asetonla işlem ile denatüre olmaz. Siğir rumen doku arginazi saflaştırılmadaki ısı ile işlem (60 °C 20') basamağında, rat meme (55 °C 20') ve böbrek (58 °C 1') arginazının aksine rat karaciğer arginazi (60°C 25') gibi ısıya daha dayanıklıdır.

Yapılan çeşitli çalışmalarda arginazın multiple formları (izoenzimleri) tespit edilmiştir (2-5,7-10,30-32). Arginazın farklı canlı ve dokulardaki multiple formlarını belirten bu çalışmaların aksine, siğir rumen doku arginazının, DEAE-sephacel kromatografi profilinde tek bir arginaz piki olarak elüe edildiği bulunmuştur (Şekil 1). Bu sonuç iyon değişim kromatografisi ile tek bir arginaz piki elde edilen diğer çalışmalarla uyumludur. İnsan plasentası (33), lökemik lenfosit ve granülositleri (34), mandibular tükürük bezi-A₃ (5), tükürüğü-A₁ (6) ile soya (28) ve boğa testisi-A₁ (35)'nden siğir rumen doku



Şekil 6. Saflaştırılmış siğir rumen doku arginazı üzerine farklı saklama ortamları ve zamanın etkisi.

arginazı gibi tek arginaz formu elde edilmiştir. Siğir rumen doku arginazının DEAE-sephacel kromatografi ile ayrılabilen tek bir anyonik formunun varlığı ilk olarak gösterilmiştir.

S. cerevisia'den saflaştırılmış arginazın sefadeks G-200 jel filtrasyonda aktivite içeren fraksiyonları toplanıp -19 °C'de saklandığında enzimin en azından 2 ay stabil kaldığı tespit edilmiştir (36). Hirsch-Kolb ve ark. (10), çeşitli memeli hayvanların karaciğerinden saflaştırdıkları arginazın derin dondurucuda birkaç hafta boyunca aktivite kaybı göstermediğini gözlemlerken, saf soya arginazının +4 °C'de en az 1 ay dayanıklı olduğu bulunmuştur (28). İnsan böbrek A₁, karaciğer A₅ formları -20 °C'de depolandığında molekül ağırlığının uzun zaman 120 000 olarak kaldığı, halbuki A₂, A₃, A₄ formlarının çok daha az dayanıklı olduğu ve özellikle de arginaz A₂'nin süratle subünitelere dissosiyeye olduğu bulunmuştur (5).

Sefadeks G-150 basamağından sonra siğir rumen doku arginazının incelenen her üç ortamda da aktivitesini kaybettiği saptanmıştır (Şekil 6). Berüter ve ark. (29) insan eritrositinden arginazın saflaştırılması sırasında benzer inaktivasyonu gözlemlemişler ve saflaştırılmış eritrosit arginazının +4 °C'de 3 gün bekletilme sonrasında aktivitesini tamamen kaybettiğini bildirmişlerdir.

Tükürük arginazı ise rumen doku arginazı ve diğer arginazların tersine 0 °C'de depolanmada daha dayanıklıdır ve 2 gün sonrasında hiç görülmeyen aktivite kaybının, bir hafta sonra ancak % 20'lere ulaşabildiği gözlenmiş, fakat -10 °C'de aşırı derecede dayanıksız olduğu ve bir gün sonrasında aktivite kaybının % 50'lere ulaştığı saptanmıştır (6). Rat böbrek arginazı saflaştırılmış siğir rumen doku arginazına benzer şekilde -

15 °C'de 12 günde total aktivitesinin % 75 'ini kaybettiği halde, aksine 4 °C'de aynı sürede aktivitesini kaybetmediği bulunmuştur (17). Enzimin elde edilmesinin düşüklüğünün (Tablo 2) enzimin dayanıklı olmaması ve hızlı aktivite kaybetmesinden (Şekil 6) ileri gelebileceği düşünülmüştür.

Farklı türlerden elde edilen subünite molekül ağırlıkları birbirine yakındır; örneğin, *B. caldovelox* 31 (37), *A. nidulans* 40 (38), *N. crassa* 38,3 (39), *E. coli* 35 (40), rat böbrek arginazı 30 (3), insan lökemik granülosit ve lenfositleri 37 (34), karaciğeri (29) ve eritrositi 35 (29,41), yer solucanı sindirim sistemi 27 (42), siğir karaciğeri için 42 (31) kDa'dur. Sadece soya arginazında 60 kDa'luk çok daha büyük subünitenin varlığı bulunmuştur (28).

Nativ enzim molekül ağırlık ve subünitelerin molekül ağırlık oranı arginazların monomer, dimer, trimer, tetramer, heksamer, oktamer formlarına sahip olduğunu göstermektedir.

Günümüze kadar saflaştırılmış arginazlar molekül ağırlıklarına göre 3 sınıf içerisinde toplanabilir. Bu sınıflardan ilkini düşük molekül ağırlıklı monomer (40,42) ya da dimer (43) yapıları arginazlar oluştururken, ikincisini orta molekül ağırlıklı proteinleri içeren 120 kDa'luk trimerik veya tetramerik arginazlar (2,5,8,10,26,29,30,34-36,38,41,44,45), üçüncü grubuysa daha büyük molekül ağırlıklı proteinleri içeren yaklaşık 200-250 kDa molekül ağırlığındaki heksamer veya oktamer yapıları arginazlar oluşturur (37,39,45,46).

Nativ siğir rumen doku arginazının molekül ağırlığı sefadeks G-150 jel filtrasyonla 125 000 (Şekil 3),

subünitelerin molekül ağırlığı SDS-PAGE (Şekil 4) ve sefades G-100 jel filtrasyonda (Şekil 5) 45 000 ve 35 000 olarak bulunmuş ve bu bulguların sığır rumen doku arginazının iki farklı subüniteden oluşan trimer yapıda olduğunu gösterdiği kanısına varılmıştır. Sığır rumen doku arginazı molekül ağırlığı ve subünite sayısı ile 2. sınıfa sokulabilir, ancak iki farklı molekül ağırlığına sahip subünite içermesi ile diğer arginazlardan farklıdır. Sığır rumen doku arginazının molekül ağırlığı diğer üreotelik türlerde ölçülen molekül ağırlıklarının sınırları içerisinde yer almaktadır. Ancak rumen doku arginazı üzerinde çalışılmadığından bu çalışmanın bulguları ancak diğer doku arginazları ile karşılaştırılabilir.

Çalışmalar sırasında aktivite tayinlerinde enzim aktivitesinin değişken olduğu farkedilmiştir. Rumen doku arginazının aktivitesindeki değişkenliğin molekül ağırlıkları farklı subünitelerin her zaman uygun dördüncül yapıyı oluşturamamalarından ileri gelebileceği söylenebilir.

Arginazın farklı subünite yapılarının önemi tam olarak ortaya konulmamış olmasına karşın, enzim aktivitesinin regülasyonunda önemli olabileceği belirtilmiştir (45). Spolarics ve Bond (47) kontrol ve streptozotosin ile muamele edilmiş diabetik farelerin karaciğerinden saflaştırdıkları arginazın SDS-PAGE 'de iki subünite formu gösterdiğini ve bu subünitelerin yaklaşık 35 000 ve 38 000 Da molekül ağırlığına sahip olduklarını bulmuşlardır. SDS-PAGE jelinde saflaştırılan subünitelerin dansitometrisinde 35 000 Da'luk subünitin, 38 000 Da'luk subünitenin yaklaşık iki katı kadar olduğu saptanmıştır. Arginaz subünitelerinin çokluğunun, farklı genlerin varlığından ya da arginaz proteininin posttranslasyonel modifikasyonlarından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür.

Rat karaciğer arginazının, dansitometreyle hesaplanan 3:1 oranlı 39,5 ve 37 kDa'luk 2 farklı subünite içerdiği gösterilmiş ve karaciğerde sentezlenen sadece bir fraksiyonun da sınırlı posttranskripsiyonel ya da posttranslasyonel modifikasyon bulguları saptanmış, hücrelerdeki arginazın regülasyonunun tüm inceliklerinin anlaşılabilmesinin farklı molekül ağırlığına sahip iki

subünitenin orjininin bulunması ve subünitelerin nasıl bir dördüncül yapıyla nativ enzimi oluşturduklarının ortaya konulmasıyla sağlanabileceğini belirtmişlerdir (48).

İnsan dokularından karaciğer A_5 (ana form), A_2 ; böbrek A_1 (ana form), A_4 ; mandibular tükürük bezi A_3 formları olmak üzere 5 izoenzim izole edilmiştir (5). Rat ve insan böbrek A_1 formu ve karaciğer A_5 formu immunolojik uyumsuzluk gösterirken, A_2 , A_3 , A_4 hem anti- A_1 hem de anti- A_5 serumuyla reaksiyon vermesi nedeniyle, böbrek için ana form olan A_1 ve karaciğer için ana form olan A_5 'in farklı, fakat tek tip subüniteden kurulduğu, A_2 , A_4 ve A_3 'ün bu subünitelerin her ikisini içeren bir hibrit yapısı sonucu 2 tip antijenik nitelikte bölgeye sahip olduğu öne sürülmüştür (5,9).

Yine insan eritrositlerinden izole edilen A_2 ve A_4 , A_1 ve A_5 antikorlarıyla direkt olarak reaksiyon verdiği için ana arginaz formlarının her ikisinin antijenik determinantının karakteristiğine sahip olduğu ve eritrosit arginazlarının da (A_2 ve A_4) iki ana arginaz formunun subünitelerine tekabül eden subünitelerin iki tipinin bir hibridi olduğu gösterilmiştir (8).

Sığır rumen doku arginazının 2 farklı molekül ağırlıklı subüniteden kurulmuş olması ve enzimin DEAE-sephacel kromatografisi davranışıyla, rat bağırsak, böbrek, beyin (2,3) arginaz izoenzimlerinin DEAE-selüloz kromatografisi davranışı karşılaştırıldığında, sığır rumen doku arginazı anyonik A_4 formuna, insan eritrositi (8), karaciğeri ve böbreği (5) ile karşılaştırıldığında A_2 formuna oldukça benzerdir. A_2 ve A_4 formunun prolin metabolizmasında görev aldığı bilinmektedir (3,7,13,16,17).

Bu çalışmada kullanılan saflaştırma işlemlerinin sığır rumen doku arginazının saflaştırılmasında yeterli olduğu, ancak antikorların eldesi gibi daha ileri düzeyli çalışmalarda affinite kromatografisi gibi daha hassas yöntemlerin kullanılması gerektiği, rumen dokusundaki bu tek anyonik formun hangi izoenzim olduğunun, affinite kromatografisi gibi daha duyarlı saflaştırma yöntemleri ve immunolojik yöntemlerle gerçekleştirilebileceği söylenebilir.

Kaynaklar

1. Powers G.S., Meister T.: Urea Synthesis and Ammonia Metabolism. In: "The Liver: Biology and Pathobiology". Edited by I. Arias, H. Popper, D. Schachter, D.A. Shafritz. Raven Press, New York, 251-263, 1982.
2. Konarska L., Tomaszewski L.: Studies on L-Arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. I. Ontogenic Evolution of Arginase Isoenzymes, Biochem. Med. Met. Biol. 1986; 35: 156-169.

3. Skrzypek-Osiecka I., Robin Y., Porembaska Z.: Purification of Rat Kidney Arginases A1 and A4 and Their Subcellular Distribution. *Acta Biochim. Polon.* 1983; 30: 83-92.
4. Van Elsen A.F., Leroy J.G.: Arginase Isoenzymes in Human Diploid Fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975; 62: 191-198.
5. Zamecka E., Porembaska Z.: Five Forms of Arginase in Human Tissues. *Biochem. Med. Met. Biol.* 1988; 39: 258-266.
6. Konarska L., Tomaszewski L., Colombo J.P., Terheggen H.G.: Human Salivary Arginase and Its Deficiency in Argininaemia. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1985; 23: 337-342.
7. Jenkinson C.P., Grigor M.R.: Rat Mammary Arginase: Isolation and Characterization. *Biochem. Med. Met. Biol.* 1994; 51: 156-165.
8. Lubońska M.K., Zamecka E., Porembaska Z.: The Isolation and Immunological Properties of Two Arginase Forms from Human Erythrocytes. *Biochem. Med. Met. Biol.* 1988; 39: 247-257.
9. Porembaska Z., Zamecka E.: Immunological Properties of Rat Arginases. *Acta Biochim. Polon.* 1984; 31: 223-227.
10. Hirsch-Kolb H., Heine J.P., Kolb H.J., Greenberg D.M.: Comparative Physical-Chemical Studies of Mammalian Arginases. *Comp. Biochem. Physiol.* 1970; 37: 345-359.
11. Brusdeilins M., Kühner R., Schumacher K.: Purification, Affinity to Anti-human Arginase Immunoglobulin-Sepharose 4B and Subunit Molecular Weights of Mammalian Arginases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985; 840: 79-90.
12. Aminlari M., Vaseghi T.: Arginase Distribution in Tissues of Domestic Animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 1992; 103 B: 385-389.
13. Carvajal N., Cederbaum S.D.: Kinetics of Inhibition of Rat Liver and Kidney Arginases by Prolin and Branched-Chain Amino Acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1986; 870: 181-184.
14. Konarska L., Tomaszewski L., Rolczyk U.: Studies on L-arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. *Biochem. Med. Met. Biol.* 1984; 35: 170-178.
15. Remesar X., Arola LI., Palou A., Alemany M.: Activities of Amino Acid Metabolizing Enzymes in the Stomach and Small Intestine of Developing Rats. *Reprod. Nutr. Develop.* 1985; 25: 861-866.
16. Yip M.C., Knox W.E.: Function of Arginase in Lactating Mammary Gland. *Biochem. J.* 1972; 127: 893.
17. Kaysen G., Strecker H.J.: Purification and Properties of Arginase from Rat Kidney. *Biochem. J.* 1973; 133: 779-788.
18. Martincic T., Krvavica S.: Enzymatic Investigations in the Mucosa of the Rumen. II. On the Presence of Arginase in the Rumenal Mucosa of Cattle. *Vet. Arh. Zagreb.* 1964; Svezak 3-4: 90-93.
19. Harmeyer J., Kurelec B., Hill H.: Über Funktionen der Arginase, Urease und Ornithin-transcarbamylase. 2. Mitteilung: Ornithintrans-carbamylase Funktion. *Zbl. Vet. Med.* 1968; Reihe A, 15: 510-516.
20. Kurelec B., Harmeyer J., Hill H.: Über Funktionen der Arginase, Urease und Ornithin-transcarbamylase. 1. Mitteilung: Arginase- und Urease Funktion. *Zbl. Vet. Med.* 1968; Reihe A, 15: 460-469.
21. Geyer J.W., Dabich D.: Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. *Analy. Biochem.* 1971; 39: 412-417.
22. Erişir M.: Sığır Rumen Doku Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. *Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.* 1997.
23. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1971; 193: 265-275.
24. Andrews P.: Estimation of the Molecular Weights of Proteins by Sefadex Gel-Filtration. *Biochem. J.* 1964; 91: 222-233.
25. Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T, *Nature.* 1970; 227: 680-685.
26. Porembaska Z., Grabon W., Zelazowska E., Czacot H., Zamecka E.: Nonidentity of Subunits of Human Kidney Arginase A1 and Human Liver Arginase A5. *Acta Biochim. Pol.* 1993; 40: 465-470.
27. Schimke R.T. Arginase (Rat liver). *Methods Enzymol.* A.1970; 17: 313-317.
28. Kang J.H., Cho Y.D.: Purification and Properties of Arginase from Soybean, *Glycine max*, Axes. *Plant Physiol.* 1990; 93: 1230-1234.
29. Berüter J., Colombo J.P., Bachmann C.: Purification and Properties of Arginase from Human Liver and Erythrocytes. *Biochem. J.* 1978; 175: 449-454.
30. Konarska L., Tomaszewski L.: Studies on L-Arginase of the Small Intestine. I. Topographical Distribution and Some Properties of the Small Intestine L-Arginase in the Rat. *Biochem. Med.* 1975; 14: 250-262.
31. Türkoğlu S., Özer İ.: Resolution of Multiple Forms of Bovine Liver Arginase by Chromatofocusing. *Int. J. Biochem.* 1991; 23: 147-151.
32. Tarrab R., Rodriguez J., Huitron C., Palacios R., Soberon G.: Molecular Forms of Rat-Liver Arginase. Isolation and Characterization. *Eur. J. Biochem.* 1974; 49: 457-468.
33. Porta R., Esposito C., Martin A., Pietra G.D.: Arginase from Human Full-Term Placenta. *Biochem. J.* 1976; 159: 579-583.
34. Reyero C., Dorner F.: Purification of Arginases from Human-Leukemic Lymphocytes and Granulocytes: Study of Their Physicochemical and Kinetic Properties. *Eur. J. Biochem.* 1975; 56: 137-147.
35. Nadolska-Lutyk J., Grabon W., Porembaska Z.: Arginase in Bull Testis. *Acta Biochim. Pol.* 1990; 37: 377-384.
36. Penninckx M., Simon J.P., Wiame J.M.: Interaction between Arginase and L-Ornithine Carbamoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 1974; 49: 429-442.

37. Patchett M.L., Daniel R.M., Morgan H.W.: Characterisation of Arginase from the Extreme Thermophile "*Bacillus caldovelox*". Biochim. Biophys. Acta. 1991; 1077: 291-298.
38. Dzikowska A., Le Caer J.P., Jonczyk P., Weglenski P.: Purification of Arginase from *Aspergillus nidulans*. Acta Biochim. Pol. 1994; 41: 467-471.
39. Borkovich K.A., Weiss R.L.: Purification and Characterization of Arginase from *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 1987; 262: 7081-7086.
40. Ikemoto M., Tabata M., Miyake T., Kono T., Mori M., Totani M., Murachi T.: Expression of human liver arginase in *Escherichia coli*. Purification and properties of the product. Biochem. J. 1990; 270: 697-703.
41. Ikemoto M., Tabata M., Murachi T., Totani M.: Purification and Properties of Human Erythrocyte Arginase. Ann. Clin. Biochem. 1989; 26: 547-553.
42. Campbell J.W., Reddy S.R.R.: A Low Molecular Weight Arginase in the Earthworm. Biochim. Biophys. Acta. 1968; 159: 557-560.
43. Grol M., Schumacher K.: Purification and Biochemical Characterization of Human Liver-Derived Inhibitory Protein (LIP). J. Immunol. 1983; 130: 323-326.
44. Harell D., Sokolovsky M.: Beef Liver Arginase. Isolation and Molecular Properties. Eur. J. Biochem. 1972; 25: 102-108.
45. Reddy S.R.R., Campbell J.W.: Molecular Weights of Arginase from Different Species. Comp. Biochem. Physiol. 1970; 32: 499-509.
46. Hartenstein R.: Characteristics of Arginase from the Fresh-Water Crayfish, *Cambarus bartoni*. Comp. Biochem. Physiol. 1971; 40B: 781-795.
47. Spolarics Z., Bond J.S.: Comparison of Biochemical Properties of Liver Arginase from Streptozocin-Induced Diabetic and Control Mice. Archs. Biochem. Biophys. 1989; 274: 426-433.
48. Diez A., Fuentes J.M., Prada F., Campo M.L., Soler G.: Immunological Identity of the Two Different Molecular Mass Constitutive of Liver Arginase. Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1994; 375: 537-541.