

KISMEN SAFLAŞTIRILAN SIĞIR KARACİĞER ARGİNAZININ KİNETİK ÖZELLİKLERİ ve BAZI KİMYASAL BİLEŞİKLERİN ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşegül Ayyıldız* • İsmail Hakkı Gökhan**

ÖZET

Bu çalışmada, olası tıbbi uygulamalara muhtemel bir hedef olarak siğir karaciğerinden arginaz enzimi kısmen saflaştırılarak, bazı kinetik özellikleri incelenmiştir. Saflaştırılan enzimin önce arginin substratı için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_m değeri 4.5 mM olarak hesaplanmıştır. Daha sonra sodyum siyanid, prolin, çinko klorür, sodyum dietilditiyokarbamat, histidin ve gentamisin' in enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sodyum siyanidin enzim üzerinde karışık, prolin ve $ZnCl_2$ ' nin yarışmalı inhibisyon meydana getirdiği, sodyum dietilditiyokarbamat, histidin ve gentamisin'in enzim aktivitesine dene- nen konsantrasyonlarda gözlemlenebilen bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Arginaz, saflaştırma, kinetik, inhibitör, siğir, karaciğer

SUMMARY

Investigation of The Kinetic Properties of partially Purified Bovine Liver arginase and The Effect of Some Chemical Compounds On Enzyme Activity

In this study, arginase was partially purified from bovine liver and some of its kinetic properties were investigated for evaluation of possible medical applications. The K_m value for its natural substrate arginine was determined as 4.5 mM by plotting the Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk graphics. Then, effect of sodium cyanide, proline, zinc chloride, sodium diethyldithiocarbamate, histidine and gentamycin on enzyme activities were investigated. Sodium cyanide was found to be a mixed type inhibitor of the enzyme whereas proline and $ZnCl_2$ were competitive inhibitors. Addition of sodium-diethyldithiocarbamate, histidine and gentamycin caused no observable effect on the enzyme activity within the experimental concentrations.

Keywords: Arginase, purification, kinetics, inhibitors, bovine, liver

Arginaz (E.C. 3.5.3.1), üre döngüsünün son basamağında L-arginini, üre ve ornitine hidroliz eder. Memelilerde karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda aktivitesi belirlenmiştir (1,2). Arginazın aktif formu herbiri 35.000'lik üç alt üniteden oluşan, farklı dokularda 105-120.000 Daltonluk bir yapı oluşturan, bir mangan metalloenzimidir (3,4).

Biyolojik sistemlerde arginaz enziminin önem taşıdığı başlıca metabolik yollar, üre döngüsü, prolin ve poliaminlerin biyosentez yolu (5) ve sitotoksik NO radikalini sentezleyen nitrik oksit sentaz (NOS) enzimiyle, paylaştığı substrat için girdiği yarışma yoludur (6).

Arginaz enziminin kanserli hücrelerde normal hücrelere göre daha fazla miktarda bulunduğu, kolo-

rektal kanserler (7), epidermal papillomalar (8), sinir dokusu tümörleri (9), prostat karsinomu (10) ve mide kanserlerinde (11) gösterilmiştir. Serum arginaz aktivitesinin arttığı diğer başlıca patolojik durumlar, karaciğer hücre harabiyeti, hemolitik anemiler (12) ve miyokard enfarktüsüdür (13).

Serum arginaz aktivitesinin düşük olduğu bir durum ise enzim defektinin otozomal resesif geçiş gösterdiği argininemidir. Argininemide plazma ve BOS'da arginin konsantrasyonu artar (14).

Bu çalışmada siğir karaciğer arginazının moleküler yapısı, belirlenen bazı kinetik özellikleri yönünden, literatür ışığında bazı diğer hayvanlardan elde edilen arginazlarla karşılaştırılmıştır. Bu yolla, siğir karaciğer kaynaklı arginazın, argininemide replas-

* Uzm.Dr. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD

** Prof.Dr. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD

man amaçlı kullanılabilirliği, ya da aktivitenin arttığı kanser gibi durumlarda inhibitör ilaç hedefi olup olamayacağının bir ön değerlendirmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METODLAR

Çalışmamızda, önce arginaz enzimi sığır karaciğerinden Harrel ve Sokolowsky'nin metodu (15) esas alınarak kısmen saflaştırıldı. Saflaştırma işleminin her basamağında total protein miktarları Lowry metoduyla (16) ve enzim aktivitesi Chinard metoduyla (17) ölçüldü. Kısmen saflaştırma işleminin sonunda ise enzimin arginin substratına karşı Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek Km değeri hesaplandı. Bundan sonra arginazın kinetik özelliklerini tespit için deneyler yapıldı. Bu deneylerde sodyum siyanid, prolin, çinko klorür, sodyum dietilditiyokarbamat, histidin ve gentamisin gibi değişik etkenlerin enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelendi.

Arginaz saflaştırma metodu olarak Harrell ve Sokolowsky metodundaki basamaklardan aşağıda belirtilenler, açıklanan değişikliklerle aynen uygulandı. Buna göre, sığır karaciğerinden arginazın kısmen saflaştırılması için ham homojenat metotta önerildiği ölçülerde önce asetonla, sonra %55 doymunlukta amonyum sülfatla çöktürüldü. Elde edilen materyal dializle arındırıldı ve jel filtrasyonu için Sepha-

dex G-150 kolonundan karbonat tamponuyla elue edildi (15,19). Toplanan 82 fraksiyon içinde aktivitesi en yüksek bulunanlar kinetik çalışmada kullanıldı.

Arginaz aktivitesini IU/ lt birimiyle hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı.

Numunenin arginaz aktivitesi = OD₅₁₅ numune x Faktör (IU/lt), olarak hesaplandı

(Faktör = 125)

$$\text{Faktör} = \frac{30\mu\text{M}}{0,8} \times \frac{1}{15 \text{ dk.}} \times 50$$

30 / 0,8 = standart konsantrasyonu / OD515 standart

1 / 15 = 1 / deney süresi

50 = seyreltme faktörü

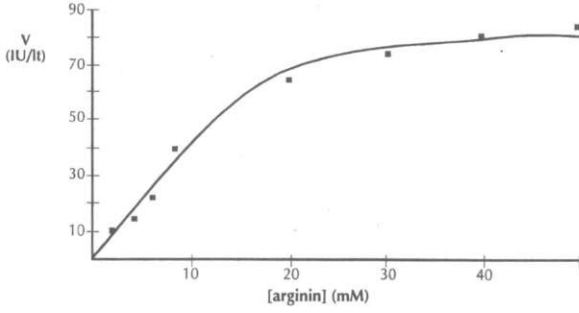
BULGULAR

Yapılan saflaştırma işlemiyle elde edilen en yüksek spesifik aktiviteli fraksiyonda enzim aktivitesinin başlangıçtaki ham homojenattan 24 kez daha fazla olduğu belirlenmiştir. (Tablo 1)

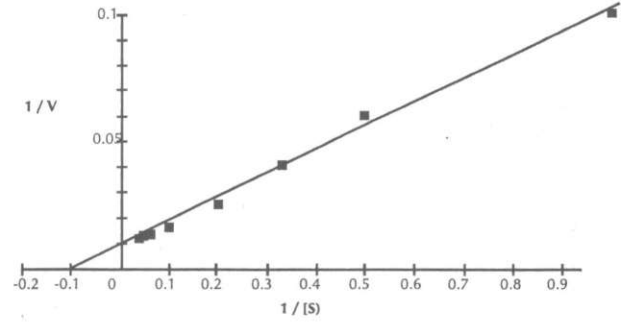
Bu fraksiyonla yapılan kinetik çalışmalarda 75 mM karbonat tamponunda (pH 9,8) 37°C da L-arginin substratı için Km değeri 4,5 mM olarak bulunmuştur. İlgili Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Sığır karaciğerlerinden arginaz enziminin saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	Hacim (ml)	Total protein (mg)	Total aktivite (IU)	Spesifik Aktivite IU/mg	Saflaştırma oranı	% verim
Homojenat	500	18,5	28100	1518	1	100
Asetonla Çöktürme	270	2,16	9450	4375	2,87	33,6
Amonyum sülfatla çöktürme	60	0,6	3750	6250	4,11	13,3
Sefadeks G-150	3	0,0043	158	36754	24,17	0,0056



Şekil 1. Artan substrat konsantrasyonları için arginaz aktivitesi.



Şekil 2. Değişen arginin substrat konsantrasyonları için Lineweaver-Burk eğrisi

Deneye katılan etkenlerden sodyum siyanid, çinko klorür ve prolinin artan konsantrasyonlarının enzim aktivitelerini baskılayıcı etkisi belirlenirken (Şekil 3, 4, 5) histidin, sodyum dietilditiyokarbamat ve gentamisin denenilen konsantrasyonlarda ve koşullarda aktiviteye etki etmemişlerdir (Şekil 6, 7, 8).

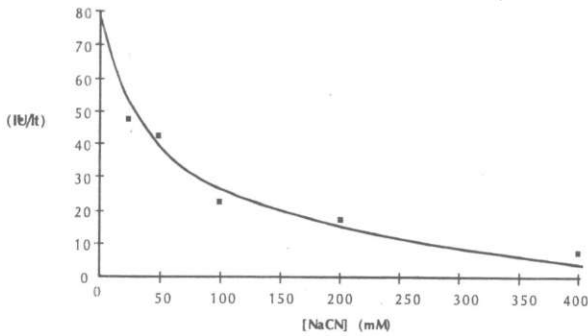
Sabit etken konsantrasyonunun artan substrat konsantrasyonlarında serum aktivitesine etkisinin incelenmesi amacıyla iki değişik konsantrasyonda NaCN, ZnCl₂, ve prolinin etken olarak kullanıldığı deneylerde elde edilen verilerle çizilen Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri sırasıyla Şekil 9a ve 9b, 10a ve 10b ve 11a 11b'de gösterilmiştir. Buna göre ZnCl₂ ve prolin enzimi kompetitif olarak inhibe etmekte, NaCN ise karışık tipte inhibisyon yapmaktadır.

Histidin, Sodyum dietil ditiyokarbamat ve gentamisin ise in vitro ortamda denenilen koşul ve konsantrasyonlarda enzim aktivitesine etki etmemişlerdir.

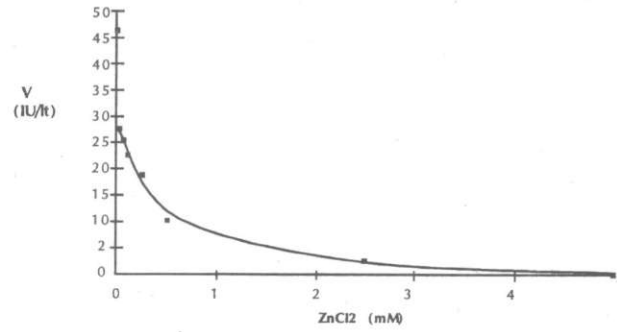
TARTIŞMA

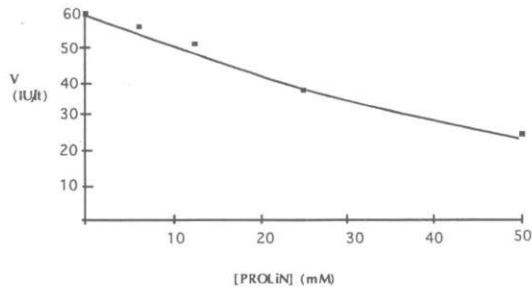
Arginaz klinik biyokimya laboratuvarlarında tanı ve tedavinin takibinde rutin olarak kullanılan bir enzim değildir. Bunun sebebi, enzimin vücutta hemen hemen her dokuda bulunması, bu yüzden çeşitli hastalıkların tanısında özgünlüğünün düşük olmasıdır. Arginazın farklı izoenzimlerini belirleyecek ayırıcı testlere ise bu güne dek yapılmış olan klinik uygulamalarda rastlanmamaktadır.

Çeşitli tür ve dokulardan elde edilen arginazların L-arginin için Km değerleri 2-18 mM arasında bildirilmiştir. Km farklılıkları farklı türlerin benzer dokularında da görülmektedir (20). Bu çalışmada sığır karaciğerinden 24 kez saflaştırılan arginazın L-arginin için Km değeri 4,5 mM olarak belirlenmiştir. Harrel ve Sokolowsky'nin orjinal metodlarında spesifik aktivite, DEAE sellüloz, SE sefadeks kromatografisi, izoelektrik odaklama gibi yöntemlerin de uygulanmasıyla başlangıç materyaline göre 790 kez daha yüksek olarak belirlenmiştir. Karaciğer arginazının

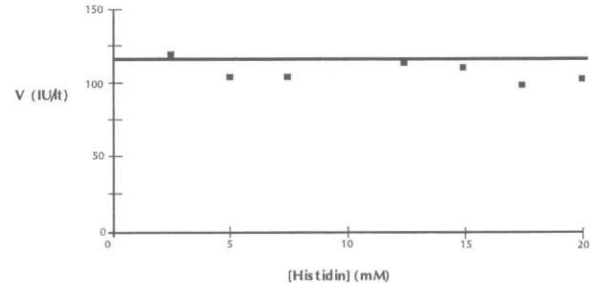


Şekil 3. Artan NaCN konsantrasyonlarının arginaz aktivitesine etkisi

Şekil 4. Artan ZnCl₂ konsantrasyonlarının arginaz aktivitesine etkisi



Şekil 5. Artan prolin konsantrasyonlarının arginaz aktivitesine etkisi



Şekil 6. Artan histidin konsantrasyonlarında arginaz aktivitesi

saflaştırılmasındaki güçlük ve verim düşüklüğü göz önüne alındığında, eritrositlerin arginaz için daha iyi bir kaynak oluşturabileceği düşünülmüş, ancak eritrosit ve karaciğer arginazlarının identikliği kesin olmadığından (21) son olarak klonlama ile (22) karaciğer arginazının tüm cDNA'sı *E. coli*'de bir ekspresyon plazmidiyle elde edilmiş, her 1g *E. coli* için 10 mg arginaz proteiniyle yüksek verim elde edilmiştir. Aynı çalışmada elde edilen klonlanmış insan karaciğer arginazının, saflaştırılmış eritrosit arginazıyla immunolojik çapraz reaktivite gösterdiği ve amino asit kompozisyonunun diğer türlerden elde edilen karaciğer arginazıyla kıyaslandığında en çok insan eritrosit arginazıyla benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızdaki safsızlıklar, substratın, enzime afinitesine etki ediyor olabilir. Proteinin yapısına dair çıkarımlara ulaşmak için enzimin daha saf halde elde edilmesi gerekir. Ancak bu çalışmadaki koşullarda elde edilen arginazın K_m 'si literatürde 10,5 olarak belirlenen insan karaciğer arginazı K_m 'sinden düşüktür (15).

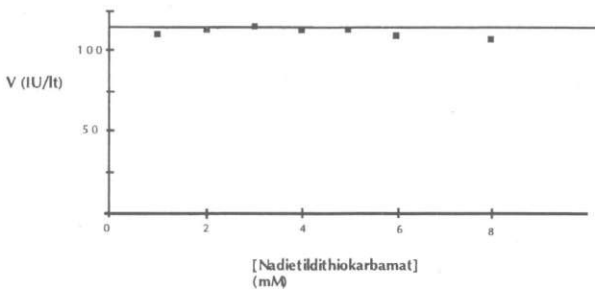
Bu bilgiden hareketle herhangi bir kaynaktan doğrudan ya da çeşitli kimyasal ya da genetik moleküler modifikasyonlarla elde edilebilecek düşük K_m değerli bir arginazın arginine artmış afinitesiyle argininemi tedavisinde bir çeşit arginin şelatörü gibi kul-

lanılabilmesi mümkün olabilir. Enzim üzerindeki kimyasal modifikasyonların arginazın immünojenik özelliğiyle birlikte K_m değerini de değiştirebileceği bildirilmiştir (23).

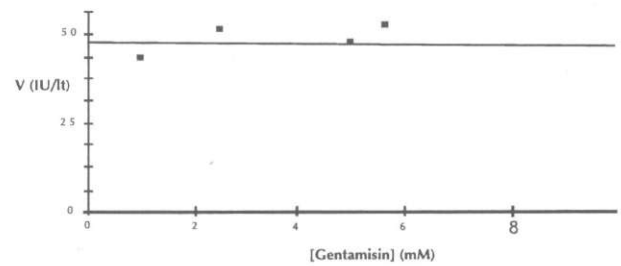
Yapılan deneylerde efektörlerden NaCN'in arginaz enziminde karışık tipte bir inhibisyon yaptığı belirlenmiştir. Bu tip inhibisyon kompetitif ve nonkompetitif inhibisyonun bir birleşimi olarak kabul edilir. Burada inhibitör var olduğu sürece [S] ne kadar artarsa artsın, enzim non-produktif ESI veya SI formunu sentezleyecektir.

Burada inhibisyon CN'nin bir nükleofil olarak disulfid bağlarına saldırması ve enzimi denatüre etmesiyle de gerçekleşiyor olabilir.

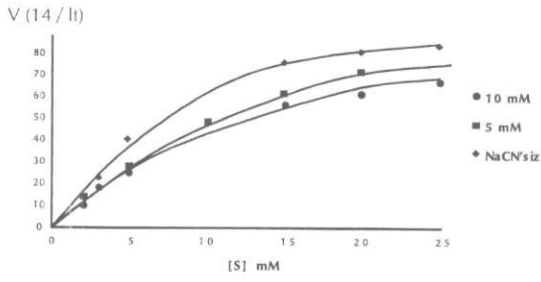
Yapılan çalışmalarda Zn'nun arginaza bağlanma enerjisinin Mn'a göre yüksek olduğu bildirilmiştir (25). $ZnCl_2$ 'un arginaz aktivitesini baskıladığı bilinmekte ancak inhibisyonun mekanizması bilinmemektedir. Bu çalışmada $ZnCl_2$ 'un yarışmalı inhibitör olarak davrandığı gösterilmiştir. Bu bulgu da Green ve arkadaşlarının kurduğu Zn'nun enzimle oluşturduğu kompleksin enzimin dinamik yapısını stabilize ederek "induced-fit" özelliğine engel olabileceği hi-



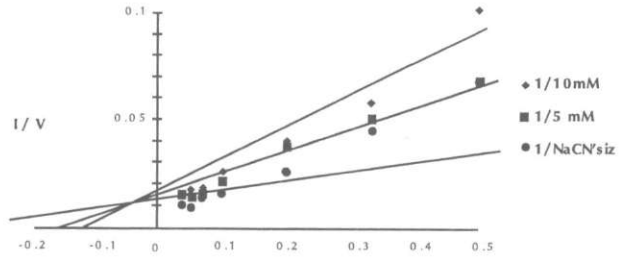
Şekil 7. Artan Sodyum dietilditiyokarbamat konsantrasyonlarının arginaz aktivitesine etkisi



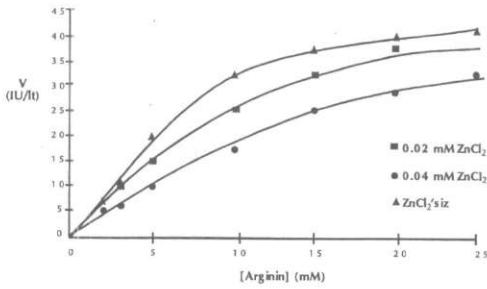
Şekil 8. Artan konsantrasyonlarda gentamisin'in arginaz aktivitesine etkisi



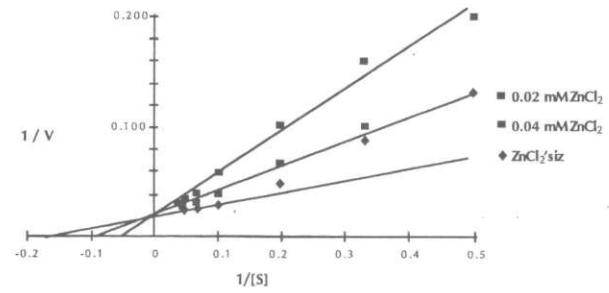
Şekil 9a. Sabit NaCN ve artan Substrat konsantrasyonlarında arginaz aktivitesi



Şekil 9b. Sabit NaCN ve artan substrat konsantrasyonları için Lineveaver-Burk eğrisi



Şekil 10a. Sabit ZnCl2 ve artan arginin konsantrasyonlarında arginaz aktivitesi



Şekil 10b. Sabit ZnCl2 konsantrasyonlarında artan substrat konsantrasyonları için Lineveaver-Burk eğrisi

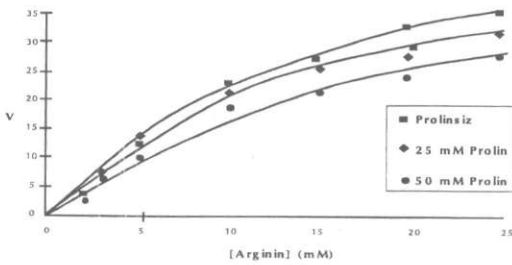
potenzini de aktif bölgeye bağlanma teorisini desteklemesi yönünden onaylamaktadır.

1945'le Hunter ve Downs, çeşitli amino asitlerle arginaz molekülünün bağ yapma enerjilerini belirleyip karşılaştırdıklarında, arginaza afinitesi yüksek olan ve doğal substrat L-arginin'le yarıştığı bilinen L-lizin ve ornitin'in bağ enerjilerini sırasıyla 3,72 ve 3,82 kcal/mol olarak bildirmişlerdir. Histidinin bağ enerjisiyse -0,82 olarak bulunmuştur (24). Arginaz molekülünün histidinle spontan kompleks oluşturmaya yatkınlığının düşüklüğü bu çalışmada da gösterilmiştir.

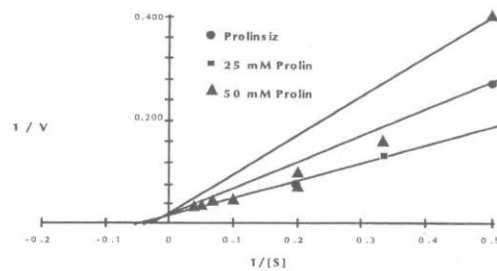
Prolin sentez yolu arginazla başlamaktadır. Elde edilen sonuçlar, prolinin kullanılan in vitro koşullarda arginazın bir yarışmalı inhibitörü olduğunu gös-

termektedir. Sentezlenebilecek prolin türevi yapısında etkin inhibitörler arginin için arginazla yarışan NOS (Nitrik oksit sentetaz) yolunun organizmada hızlandırılması amacıyla arginazın baskılanması ve bu yolla örneğin tümör büyümesinin yavaşlatılması ve tümör ölümünün hızlandırılması için denenebilir.

Bu çalışmada, pek çok dokuda aktivitesi bulunan bir enzim olan arginazın, sığır karaciğerinden 24 kez saflaştırılmış homojenat içindeki formunun Km değeri belirlenmiş ve bazı kimyasal bileşiklerin enzim aktivitesine etkileri araştırılmıştır. Bu ön çalışma gelecekteki olası yeni klinik tanı ve tedavi metodlarında arginazı araştırma konusu olarak irdelenecek araştırmacılara ek bir bilgi kaynağıdır.



Şekil 11a. Sabit prolin ve artan arginin konsantrasyonları için arginaz aktivitesi



Şekil 11b. Sabit prolin konsantrasyonlarında artan substrat konsantrasyonları için Lineveaver-Burk eğrisi

KAYNAKLAR

1. Aminlari M. Novel colorimetric method for assaying arginase activity. *Clin Biochem.* 25:431-436, 1992.
2. Halifeoğlu I. İnsan karaciğer, eritrosit ve uterus doku arginazinin kinetik özellikleri. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü. 1993
3. Grody Ö., Dizikes Gj., Cederbaun SD. Human arginase isoenzymes. *Isoenzymes Curr Top Biol Med Res*, 13:181-214, 1987
4. Bauscur L., Cabello J., Veliz M., Gonzales A. Molecular Forms of human liver arginase *Bochem. Biophys. Acta*, 128, 149-54, 1966.
5. Williams-Ashman HG., Canellakis ZN. Polyamines in mammalian Biology and Medicine. The University of Chicago Press. *Perspective in Biology and Medicine.* 421-451, 1979.
6. Gotoh T, Sonoki T, Nagasaki A, Terada K, Takiguchi M, Mori M. Molecular cloning for cDNA for non-hepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *Febbs Lett.* 1996;395:119-22
7. Leu SY., Wang SR., Clinical significance of arginase in colorectal cancer. *Cancer*, 70:5, 733-736, 1992.
8. Koza RA., Megosh LC., Palmieri M., O'Brien TG. Constitutively elevated levels of ornithine and polyamines in mouse epidermal papillomas. *Carcinogenesis*, 12:9, 1619-1625, 1991.
9. Trapeznikova SS., Navasardians DG., Levchenko LI., Comparative study of the activity of arginase isoenzymes in brain tumors of humans and experimental animals. *Vopr Med Khim.* 32:6, 29-34. 1986.
10. Harris BE., Pretlow TP., Bradley EL., Arginase activity in prostatic fluid of patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 43:6, 3008-3012, 1983.
11. Wu CW., Chi CW., Tsay SH., The effects of arginase on neoplasm I. The role of arginase in the immunosuppressive effects of extract from gastric cancer. *Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Cha Chih.* 20:4, 279-289, 1987.
12. Tietz NW. *Clinical Guide to Laboratory Tests.* Ed. NW. Tietz. WB Saunders Company, Philadelphia. 1990.
13. Porembaska Z., Kedra M., Early diagnosis of myocardial infarction by arginase activity determination. *Clin. Chem. Acta*, 60:3, 355-361, 1975.
14. Terheggen HG, Lavinha F, Colombo JP. Familial hyperargininemia. *J. Genet. Hum.* 1972;20:69-84
15. Harrell D., Sokolowsky M., Beef liver arginase. Isolation and Molecular Properties. *Eur J. Biochem.* 25, 102-108, 1972.
16. Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Rondall R. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;183:265-275
17. Chinard FP. Photometric estimation of proline and ornithine. *J. Biol Chem.* 199:91-95, 1952.
18. Spector EB., Jenkinson CP., Grigor., MR., Kern RM., Cederbaum SD., Subcellular location and differential antibody specificity of arginase in tissue culture and whole animals. *Int J Dev Neurosci.* 12:4, 337-42, 1994.
19. Akbay A. Siğir karaciğer arginazinin kısmen saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin araştırılması. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi. Ankara, 1997
20. Musznka G, Severina OL, Lobyeva LW. Characteristics of arginases from plant, ureotelic and uricotelic organisms. *Acta Biochem Pol.* 1972;19:235-242
21. Ikemoto M., Tabata M., Murachi T. Purification and properties of human erythrocyte arginase. *Ann. Clin Biochem.* 26:4, 547-553 1989.
22. 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
23. Savoca KV., Abuchowski A., van Es T., Davis FF., Palczak NC. Preparation of a non immunogenic arginase by the covalent attachment of polyethylene glycol. *Biochim Biophys Acta*, 578:1, 47-53, 1979.
24. Segel I. *Enzyme Kinetics.* A Wiley Interscience Publication, New York, 1975.
25. Green SM., Ginsburg A., Lewis MS., Hensley P. Roles of metal ions in the maintenance of the tertiary and quaternary structure of arginase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266:32, 21474-81, 1991