

İNSAN TİROİD DOKU ARGİNAZININ BAZI KİNETİK ÖZELLİKLERİ Some kinetic properties of human thyroid tissue arginase

Necip İlhan¹

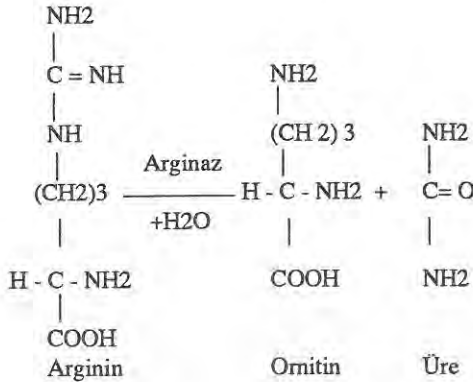
Özet: Bu çalışma ile insan tiroid doku arginazının bazı kinetik özelliklerini incelemek amaçlanmıştır. Arginaz aktivitesi Tiyosemikarbazid Diasetil Monoksim Üre(TDMU) yöntemi ile ölçüldü. Tiroid arginazının aktivasyonu için 55 derecede preinkübasyon ve Mangan(Mn++) iyonlarının gerekli olduğu bulundu. Tiroid arginazı için en uygun inkübasyon süresi 30 dakika ve optimal pH 9.6 olarak saptanmıştır. Enzimin doğal substratı olan L-Arginine karşı Km'i 2 mM olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Arginaz, Kinetik özellikler

Summary: This work was designed to examine some kinetic properties of human thyroid arginase. The arginase activity was determined by Thiosemicarbazide Diacetylmonoxsime Urea (TDMU) method. For the activation of the enzyme preincubation at 55 °C and the presence of Mn++ cations are required. Optimal incubation time for thyroid arginase was founded as 30 minutes and optimal pH of arginase was around 9.6. The Km of arginase for arginine was around 2 mM.

Key Words: Arginase, Kinetic properties

Arginaz (L-Arginin amidinohidrolaz, E.C:3.5.3.5) üre döngüsünün son enzimidir ve varlığı ilk defa 1904 yılında Kossel ve Dakin tarafından sitoplazmada bulunmuştur (1).



Arginaz enzimi esas olarak karaciğer dokusunda bulunur. Enzime karaciğer dışındaki diğer dokularda da rastlanırsa da bu dokulardaki aktivitesi daha düşüktür. Bu dokuların başlıcaları eritrosit, lökosit, trombosit, iskelet ve kalb kası, beyin, bağırsak, böbrek, tiroid, tükürük bezleri, plasenta, deri ve testislerdir (2,3).

Arginaz enziminin kinetik özellikleri çeşitli dokularda birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur. Arginaz enziminin maksimum aktivite gösterebilmesi için bazı metal iyonlarına kofaktör olarak ihtiyaç vardır. Enzimin +2 değerlikli metal iyonları; Mn++, Ni++, Co++, V++, Cd++ ile 55 °C'de preinkübasyonu sonucu maksimum aktivite elde edilmiştir (1,2,4,5).

Preinkübasyonun sıçan karaciğer arginazı üzerine etkisi Schimke tarafından gösterilmiştir. Schimke, sıçan karaciğer dokusunun 55 °C'de preinkübasyonunun enzim aktivitesini Mn++ iyonları varlığında % 110 arttırdığını bulmuştur (6). Colombo ve Kornska(2) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise Mn++ iyonlarının varlığında ve 55 °C'de yapılan preinkübasyon sonucunda eritrosit

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi ELAZIĞ.
Biyokimya. Y.Doç.Dr.¹.

Geliş tarihi: 30 Mayıs 1994

arginazının başlangıç enzim aktivitesinin 2-6 kat, karaciğer arginazının ise 4-5 kat arttığı gösterilmiştir (2). Argininin hidrolizi için optimal pH'nın 9.4-9.8 arasında olduğu ve hidroliz sonucu açığa çıkan üre döngüsü ürünlerinden ornitin enzimini inhibe ettiği açıklanmıştır(1).

Bu araştırmanın amacı; üre döngüsünün son basamağını katalize eden bir enzim olan arginazın insan tiroid bezinde varlığını saptamak ve bu enzimin tiroid dokusundaki kinetik özellikleri ile biyokimyasal koşullarını optimize etmektir.

MATERYAL VE METOD

Çalışma materyali; Fırat Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Genel Cerrahi Kliniğinde tiroidektomi ameliyatı olan kişilerden sağlanmıştır. Doku örnekleri enzim aktivitesi tayin edilinceye kadar -20 °C 'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Doku örneklerinde enzim aktivitesi ölçüleceği zaman dokular derin dondurucudan çıkarılarak buz içinde homojenize edilmiştir. Doku örnekleri homojenize edilmeden önce iki süzgeç kağıdı arasında kurutulmuş ve sonra tam bir gram olarak tartılarak pH'sı 7.4 olan 0.01 M Tris HCl tamponu içinde 1/10 oranında dilüe edilmiştir. Bu işlemden sonra doku örnekleri Tris-HCl tamponu içinde parçalanarak homojenizatör (Potter-Elvenjem, cam-cam) içinde homojenize edilmiştir (7). Homojenatlar soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlar çift katlı gazlı bezden süzülerek enzim aktivite tayini için enzim kaynağı olarak -20 °C'de saklanmıştır. Doku homojenatlarının enzim aktivitesi, dokular -70 °C'de saklandığı zaman bir yıl bozulmadan kalabilmektedir (2,7).

Bu çalışmada tiroid doku arginaz aktivitesi Tiyo-semikarbazid - Diasetilmonoxim - Üre (TDMU) yöntemi ile ölçülmüştür(8). Bu çalışmada 1 ünite enzim aktivitesi şu şekilde tarif edilmiştir: Bir saatde 37°C 'de L- argininden 1 µM üre oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesidir.

Ünite: µM üre /mg protein /saat

Tiroid dokusunun protein düzeyleri modifiye Lowry yöntemi ile saptanmıştır (9).

BULGULAR

Tiroid arginazı için en uygun inkübasyon süresini saptamak amacı ile enzim değişik zaman süreçlerinde inkübasyona tabi tutularak argininin hidrolizi izlenmiştir. Şekil 1'de görüldüğü gibi üre sentezindeki artış zamana bağlı olarak 30 dakikaya kadar doğrusal olup, bu sürenin sonunda doğrusallık yerini hiperbolik bir görünüme bırakmıştır. Bundan dolayı enzim için en uygun inkübasyon süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir

Tiroid arginazı üzerine preinkübasyon ısısının etkisi şekil 2'de görülmektedir. Mangan II Klorür varlığında enzimin aktivasyonu için en uygun preinkübasyon ısısı 55 °C olarak belirlenmiştir.

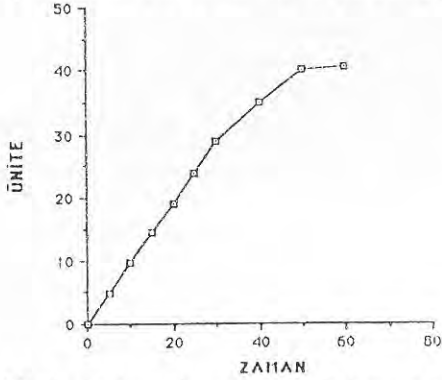
Tiroid Arginaz aktivitesi için en uygun preinkübasyon süresini saptamak amacı ile enzim 55°C'de Mangan II Klorür varlığında değişik zaman süreçlerinde preinkübasyona bırakılmıştır. Şekil 3'de de görüldüğü gibi maksimum enzim aktivitesini elde etmek için gerekli preinkübasyon ısısı 20 dakika olarak belirlenmiştir.

Tiroid arginazının optimal pH'sını saptamak için pH 6'dan pH 11.5'e kadar olan sınırlar içinde farklı tampon sistemleri kullanılmıştır. Bu tampon sistemleri pH 6-8 arası fosfat, pH 8-9 arası Tris HCl, pH 9-11.5 arası ise karbonat tamponlarıdır. Şekil 4'de görüldüğü gibi enzim en yüksek aktiviteyi karbonat tamponu ile pH 9.6'da vermiştir. Bu pH enzim için optimal pH olarak kabul edilmiştir.

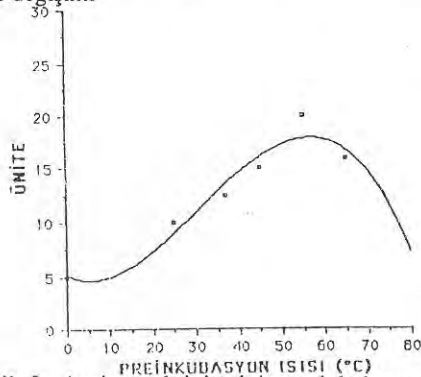
Farklı derişimlerdeki Mn⁺⁺ iyonlarının tiroid arginaz aktivitesine olan etkileri incelenmiştir. Bu amaçla preinkübasyon işlemi 1-10 mM arasında değişen MnCl₂ varlığında yapılmıştır. Şekil 5'de görüldüğü gibi enzim en yüksek aktiviteyi 2.5 mM MnCl₂ konsantrasyonunda göstermiştir. Preinkübasyon ortamına MnCl₂ ilave edilmediği zamanda bir miktar enzim aktivitesi saptanmıştır. 2.5 mM MnCl₂ varlığında enzim aktivitesinin 1.6 kat artış gösterdiği saptanarak, enzimin en uygun aktivatörünün Mn⁺⁺ iyonları olduğu belirlenmiştir.

Tiroid arginazı için optimal koşullar belirlendikten sonra enzimin doğal substratı olan L-Arginine karşı Km'i tesbit edilmiştir. Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Michaelis-Menten kinetiği ile incelenmiştir (Şekil 6). Şekil 6'da görüldüğü gibi 2.5 mM'a kadar olan L-Arginin konsantrasyonlarında aktivitede lineer bir artış (First Order Kinetik) görülmüş ve bu konsantrasyondan sonra eğri doğrusallığını kaybederek hiperbolik bir görünüm kazanmıştır. 16 mM L-Arginin konsantrasyonundan sonra ise enzim substratı ile doygunluğa ulaşmış ve enzim artış sıfır derece (Zero Order) kinetiğine uymuştur.

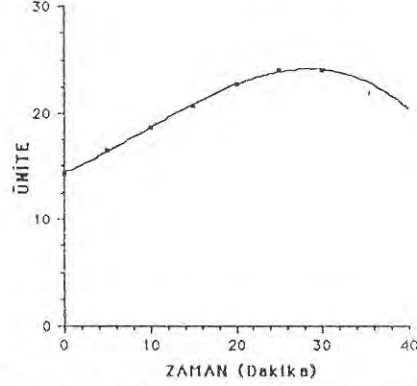
Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Eadie-Hofstee kinetik yöntemi ile değerlendirilmiştir (Şekil 7). Her iki kinetik yöntemde de tiroid arginazının L-Arginine karşı olan Km' i 2mM civarında bulunmuştur.



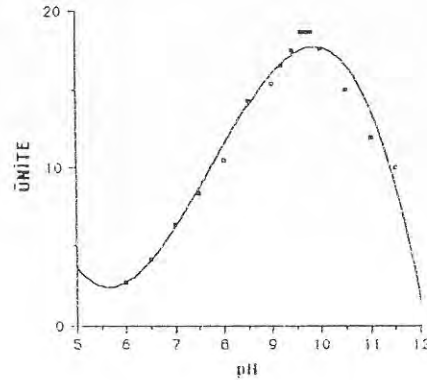
Şekil 1. Arginaz aktivitesinin inkübasyon zamanına göre değişimi



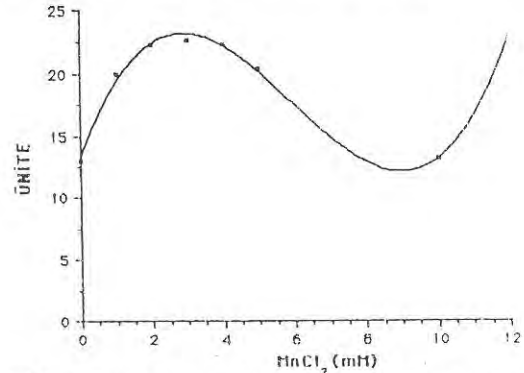
Şekil 2. Arginaz aktivitesinin preinkübasyon ısısına bağlı olarak değişimi



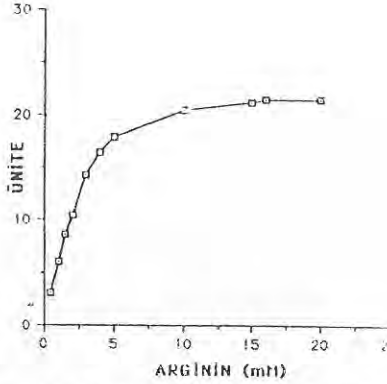
Şekil 3. Tiroid arginaz aktivitesinin preinkübasyon zamanına bağlı olarak değişimi



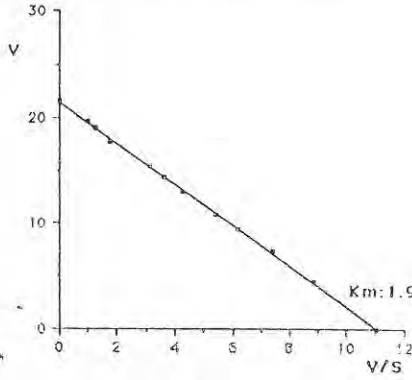
Şekil 4. Tiroid arginaz aktivitesinin pH'ya göre değişimi



Şekil 5. Tiroid arginaz aktivitesinin MnCl₂ derişimine bağlı olarak değişimi



Şekil 6. Tiroid arginaz aktivitesinin arginin konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi



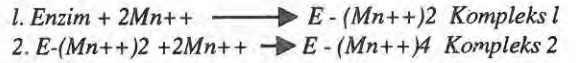
Şekil 7. Tiroid arginazının L- arginine karşı olan Km'nin Eadie-Hofstee yöntemi ile saptanması

TARTIŞMA

Bu çalışmada tiroid bezi arginazı için en uygun preinkübasyon süresi 20' olarak bulunmuş ve enzimin 2.5 mM MnCl₂ varlığında 55 °C'de 20' preinkübasyona tabi tutulması sonucu enzimin aktivitesinin arttığı saptanmıştır (Şekil 3,5).

Hellerman yaptığı bir çalışmada Mn⁺⁺ iyonlarının enzim ile substrat arasında metal bir köprü kurduğunu ve enzim - Mn⁺⁺- Arginin kompleksinin oluşmasının enzimi aktive ettiğini göstermiştir. Schimke tarafından yapılan çalışmada ise sıçan karaciğer dokusunun Mn⁺⁺ iyonları varlığında 55 °C'de preinkübasyonunun enzim aktivitesini %110

arttırdığı saptanmıştır. Ratner ise sıçan ve sığır arginazları üzerine preinkübasyon ve MnCl₂'ün etkisini daha değişik bir yaklaşımla açıklamıştır(10). Buna göre sıçan ve sığır arginazları dört alt birimden meydana gelmekte ve her alt birime bir Mn⁺⁺ iyonu bağlanmaktadır.



oluşmaktadır. Kompleks 1 kompleks 2'den % 50 daha az aktif olup preinkübasyon işlemi kompleks 1'in kompleks 2'ye dönüşümü için gerekli olan ısı ve zamanı sağlamaktadır. Bu çalışmalardan da görüldüğü gibi preinkübasyon aşamasında Mn⁺⁺ iyonları enzime bağlanarak enzimin aktivitesini ve dayanıklılığını arttırmaktadır. Bu çalışmada tiroid arginazının 2.5 mM MnCl₂ varlığında 55 °C'de 20' preinkübasyona bırakılmasının enzim aktivitesini yaklaşık olarak % 160 oranında arttırdığı bulunmuştur.

Arginazın pH'sının yapılan çalışmaların bir çoğunda 9.3-9.7 arasında değiştiği saptanmıştır (1,5).İnsan fetal ve erişkin dokularında Spector'un(7) yaptığı çalışmalarda arginazın optimal pH'nın 9.5-11.0 arasında değiştiği bulunmuştur. Gülen ve Ozan'ın (11,12) yaptığı çalışmalarda bir parazit olan Fasciola hepaticanın arginazı için optimal pH 10.5 olarak bulunurken sığır tükrük arginazının pH'ı 9.2 ile 9.3 arasında olduğu tesbit edilmiştir.

Bu çalışmada tiroid bezi arginazının optimal pH'ı 9.6 olarak bulunmuş ve pH profili asimetric bir görünüm göstermiştir (Şekil 4).

Tiroid bezi arginazının arginine karşı olan Km'i araştırıldığında Km'in 2 mM civarında olduğu bulunmuştur. Sıçan karaciğer arginazının Km'i 10-20 mM arasında değişmektedir (8). Yine insan karaciğer, böbrek, gastrointestinal ve beyin arginazlarının Km değerlerinin 8-18 mM arasında değiştiği Spector (7) tarafından bildirilmiştir. Ozan(12) tarafından yapılan çalışmada ise sığırların tükrük bezleri, eritrosit ve karaciğer arginazlarının Km'leri tayin edilmiştir. Km değerleri tükrük bezlerinde 5-5.5 mM, eritrositlerde 2.5 mM karaciğerde ise 2.3 mM civarında bulunmuştur. Bitkilerden soya fasulyesi arginazının ise Km'i 83 mM civarında saptanmıştır (13).

KAYNAKLAR

1. King J. *Practical clinical enzymology*. D. Von Nostrand Company London 1974,pp 220-225.
2. Colombo JP, Konarska L. Arginase., In: Bergmayer, H.U. ed. *Methods of enzymatic analysis 3rd.ed.* Weinheim: Verlag Chemie.1984, pp 285-294.
3. Konarska L, Tomazewski L. *Studies on L-Arginase in developing rat small intestine, brain and kidney:Ontogenic evolution of arginase isoenzymes.*Biochem. Med. Metab. Biol.1986; 35:156-169.
4. Gargnata LC, Bonds JS. *Assay and kinetics of arginase.* Anal. Biochem.1986; 154: 388-394.
5. Mallerup B. *Colorimetric method for rabbit determination of serum arginase.* Clin.Chem. 1967; 13-10: 900-908.
6. Schimke RT. *Adaptive characteristic of ürea cycle enzymes in the rat.* The J.Biol.Chem.1982; Vol: 237-2 .
7. Spector EB, Rice SCH, Moedjone S, Bernard B, et.al. *Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues.* Biochem. Med.1982; 28: 165-175 .
8. Özdemir,Y, Ozan S, Özdemir N, Gürsu F , et al.*The evaluation of methods used for the measurement of arginase activity. I. Marmara Tıp Günleri ,Biyokimya Sektiyonu.*1988; 11.
9. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurements with the Folin Fenol reagent.* J. Biol. Chem. 1951; 193: 265.
10. Özdemir N.*Moniezia benedeni arginazının özellikleri.* Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Bilim Dalı Doktora Tezi. Elazığ.1990.
11. Gülen Ş.*Faciola hepatica'da arginaz enzimi ve özellikleri.* Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 1987 ; I(1-A) :95- 112.
12. Ozan S, Gülen Ş. *Sığır tükrüğünde arginaz enzimi ve özelliklerinin tükrük bezleri eritrosit ve karaciğer arginazları ile karşılaştırılması.* Doğa,TU,Vet ve Hay. Der. 1989; 13-2.
13. Kang JH, Cho YD. *Purification and properties of arginase from Soybean,Glycine max,Axis.Plant.Physiol* 1990; 93:11230-1234.