

L-CANAVANİN, BİR JACKBEAN (*Canavalia ensiformis*) ARGİNAZ İNHİBİTÖRÜ

L-canavanine, an inhibitor of jackbean (*canavalia ensiformis*) arginase

M Ferit Gürsu¹, Sait Çelik²

Özet : L-Canavanin yapısal bir arginin analogu olup bitkilerde azot metabolizmasında önemli fonksiyonları olan non-protein bir amino asittir. Bu çalışmada arginaz enzimi Jackbean'den kısmen saflaştırılarak, saflaştırılan enzimin bazı biyokimyasal özellikleri ve L-canavanin'in Jackbean arginazı üzerine etkisi araştırılmıştır. Jackbean'den arginaz, homojenizasyon, bir saat ısıtma, amonyumsülfat ile % 55 saturasyon ve diyaliz olmak üzere başlangıçta spesifik aktivitesi 15 misli artırılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin biyokimyasal ve kinetik özellikleri incelendiğinde tam aktivasyon için Mn iyonlarına ihtiyaç gösterdiği ve preinkübasyon basamağına ilave edilen Mn iyonlarının enzimin aktivitesini % 116 arttırdığı tespit edilmiştir. Gerek Michaelis-Menten gerekse Eadie-Hofstee'ye göre enzimin L-arginine karşı Km değeri 65 mM olarak bulunmuştur. L-canavanin, Mn iyonlarıyla beraber preinkübasyona konulduğunda enzim kompetatif olarak inhibe olmaktadır. Enzim, Mn iyonları, L-arginin ve L-canavanin'le beraber preinkübasyon ortamına konulduğunda inhibisyon azalmaktadır. Mn iyonları yokluğunda inhibisyon daha da artmaktadır. Sonuç olarak, Jackbean'den arginaz kısmen saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin kinetik özellikleri optimize edilerek, ilk kez bir bitki arginazı üzerine L-canavanin'in inhibitör etkisi gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Arginaz, Canavanin

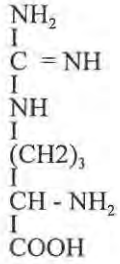
Summary: L-Canavanine {2-amino-4-(guanidinooxy) butyric acid}, a non-protein amino acid that is structurally analogous to arginine, has an important function in the nitrogen metabolism of plants. In this study, some biochemical properties of arginase enzyme were partially purified from Jackbean, and the effect of L-Canavanine on this enzyme was investigated. Arginase is purified from Jackbean (*canavalia ensiformis*, a tropical legume) by homogenization, heating an hour, 55 % saturation with NH₄(SO₄)₂ and dialysing and increasing specific activity 15 times the beginning. When the biochemical kinetic properties of purified enzyme were examined, it was determined that the enzyme needed Mn ions for full catalytic activity and the addition of Mn ions to the preincubation step increased the enzyme activity by 116 %. According to Michaelis -Menten or Eadie-Hofstee, Km of arginase, for the L-arginine was found to be 65 mM. When L-canavanine was added to preincubation medium with Mn ions, the enzyme was inhibited competitively. If the enzyme was added into preincubation medium a long with Mn ions, L-arginine and L-canavanine its inhibition decreased. In the absence of Mn ions, the inhibition increased markedly. Finally, arginase was partially purified from Jackbean and the inhibitory effect of L-canavanine on a plant arginase was shown for the first time by optimizing the kinetic properties of the enzyme.

Key Words: Arginase, Canavanine

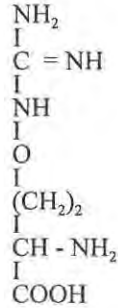
*XV. Gevher Nesibe Tıp Günleri, 27-30 Mayıs 1997, Kayseri Fırat Üniversitesi S.M.Y.O. ELAZIĞ, Tıbbi Laboratuvar Programı. Doç.Dr.¹, Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi ELAZIĞ, Kimya. Doç.Dr.².

Geliş tarihi: 28 Mayıs 1997

L-canavanin {2 - amino -4-(guanidooksi) butirik asit} yapısal bir arginin analogu olup bitkilerde azot metabolizmasında görevli non-protein bir amino asittir (1-3).



L-arginin



L-canavanin

Jackbean (gemici fasülyesi) tropikal bölgelerde yetişen bir fasülye türü olup yüksek oranda üreaz, canalin redüktaz ve arginaz enzimi içerir(4,5). Arginaz (L-arginin amidinohidrolaz , EC. 3.5.3.1.) L-arginini üre ve ornitine hidrolize eden Krebs-Henseleit döngüsünün son enzimidir. Sadece üreotelik canlılarda bulunmayıp bazı ürikotelik canlılarda ve jackbean gibi yüksek bitkilerde de bulunmuştur(3,6). Arginaz enziminin Krebs-Henseleit döngüsü ile üre sentez edemeyen canlı ve dokulardaki işlevi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Campell(7) üreotelik olmayan canlılardaki arginazın varlığını evrim ile açıklamaya çalışmıştır. Buna göre evrimin ilk dönemlerinde bütün canlılarda üre döngüsü bulunmakta idi. Fakat bazı canlılar çevre koşulları ile uyum sağlamak için bazı biyokimyasal değişimlere uğradılar. Bu değişimler sonucunda üre döngüsünün diğer enzimleri kayboduğu halde arginazın varlığını koruduğunu ileri sürmüşlerdir.

Arginaz enzimi maksimum aktivasyon için Mn⁺⁺ iyonlarına kofaktör olarak gereksinim duyar(8). Arginazın tetramerik bir yapıya sahip olduğu ve tetramerik yapının oluşması için Mn iyonlarının gerekli olduğu Muszynska (9) tarafından bildirilmiştir. Ayrıca Mn iyonları enzimin ısıya karşı dayanıklılığını artırmakta ve inaktivasyonlara karşı daha dayanıklı hale getirmektedir(8). Kolombo ve Konarska (6) tarafından yapılan çalışmalarda Mn⁺⁺ iyonları varlığında ve 55°C de preinkübasyon uygulandığında eritrosit arginazının 4 -5 kat arttığı gösterilmiştir.

Arginaz enziminin bilinen bir çok inhibitörü vardır. L-amino asitlerden ornitin ve lizin enzimi kompetitif inhibe etmektedir(10). İnsan eritrosit arginazı L-canavanin , oktapin ve arginino süksinat ile non kompetitif tarzda inhibisyon yaptığı gösterilmiştir (11). Kang ve arkadaşları(12) Soya fasülyesinden izole ettikleri arginaz üzerine putressin , spermin ve spermidin gibi poliaminlerin aktivatör olduğunu göstermişlerdir. Ag , Hg gibi ağır metal iyonları ile pCMBA(parakloromerküri- benzoik asit) ve NEM (n.etilmalemit) enzimin bilinen inhibitörleridir (13,14). Üreotelik canlılarda ve dokularda bulunan arginaz enziminin L-arginine karşı ilgisinin bir ölçüsü olarak bilinen Km'i 5- 10 mM iken (8,11) Soya fasülyesinden elde edilen arginazın Km'i 83 mM olarak bulunmuştur(12).

Bu çalışmada, bir arginin analogu olan canavanin'in jackbean'dan kısmen saflaştırılan arginaz enzimi üzerine etkileri araştırılmak istenmiştir. Jackbean'den arginazın saflaştırılması ve canavanin'in inhibitör etkisi ilk kez tarafımızdan çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Araştırma materyali olan jackbean ülkemizde yetişmemekte olup Florida Üniversitesinden sağlanmıştır. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

Arginaz aktivitesinin ölçüm esası: L-argininden arginazla oluşan ürenin spektrofotometrik TDMU yöntemi ile ölçülmesi ile yapılmıştır (15). Bu yöntemde enzim 55°C de Mn iyonlarıyla preinkübasyona tabi tutulmuş daha sonra L-arginin ve karbonat tamponu bulunan inkübasyon ortamına alınarak 37°C de inkübe edilmiştir. İnkübasyonu müteakip reaksiyon asit karışımı ile durdurmuş oluşan üre diasetilmonoksim ve tiyosemikarbazid ihtiva eden renk ayracı ilave edilerek renk oluşumu sağlanmıştır. Bu rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak 520 nm de ölçülmesiyle aktivite tayin edilmiştir. Bir arginaz ünitesi 1 mg protein başına L-argininden arginaz ile 1 saatte oluşturduğu ürenin µmol cinsinden

ifadesidir. Örneklerdeki protein ölçümleri Lowry metoduna göre çalışılmıştır(16).

Arginazın saflaştırılmasına 200 gr olarak tartılan Jacbean'in omni mikserde toz haline getirilerek başlanmış bundan sonraki aşamalarda enzim saflaştırma usullerine tamamıyla uyulmaya çalışılmıştır.

1-Tamponda Homojenizasyon :

Toz haline getirilmiş jackbean'den 100 gr alınarak homojenizasyon çözeltisi (100 mM Tris-HCl , 10 mM 2-merkaptoetanol ve 50 mM MnCl₂) ile homojenize edilmiş, homojenatlar iki kat tülbentten süzülerek, bir gece + 4 o C de karıştırıcı sürekli karıştırılarak bekletilmiştir. 17000 RPM de santrifüje edilerek süpernatant alınmıştır. Protein ve arginaz aktivitesi tayin edilmiştir.

2-İstenilmeyen Proteinlerin Isı İle Uzaklaştırılması:

Süpernatant 60 °C de yarım saat bekletilerek denatüre proteinler 17000 RPM de santrifüje edilerek uzaklaştırılmıştır.

3-Amonyum Sülfat İle % 55 Satürasyon ve Diyaliz:

Süpernatant amonyum sülfat ilavesi ile % 55 oranında doyurulmuş , amonyum sülfat satürasyonu sonucu proteinler çöktürülmüştür. Çöktürülen homojenizasyon çözeltisi ile yeniden yıkanarak diyaliz torbalarına alınmıştır. Enzim süpernatantı 100 mM Tris-HCl (pH=7.2) tamponuna karşı bir gece diyalize edilmiştir. Diyaliz daha sonra bir gece

de distile suya karşı yapılarak 48 saatlik ve iki aşamalı diyaliz işlemi yapılmıştır. Diyaliz sırasında distile su sürekli değiştirilmiş, daha sonra diyalizat 17000 RPM 'de santrifüje edilerek süpernatant alınmıştır.

4-Aseton İle Muamele :

Süpernatant toplam hacminin bir misli oluncaya kadar saf soğuk aseton dan damla damla ilave edilerek , elde edilen çöktürülenler daha sonra yeniden homojenizasyon çözeltisi ile geriye kazanılmıştır. Toplam hacim 220 ml dir.

BULGULAR

Tablo I'de görüldüğü gibi jackbean'den görüldüğü gibi jackbean'den arginaz % 57 verimli 15 misli daha saf olarak elde edilmiş ve daha ileri bir saflaştırmaya gidilmemiştir. Saflaştırılan enzimin bazı kinetik özellikleri optimize edilmiştir.

Tablo II'de görüldüğü gibi 10 dakikalık preinkübasyon aşaması iki kısma ayrılmış birinci preinkübasyon basamağına Mn iyonları ilave edildiğinde arginaz aktivitesi % 116 daha artarak %216 ya kadar yükselmiştir. L-canavanin ikinci preinkübasyona ilave edildiğinde arginaz aktivitesinde %30 dolaylarında azalmalar görülmüştür. L-canavanin birinci preinkübasyona , Mn iyonları ise ikinci preinkübasyona konulduğunda inhibisyon daha da artmaktadır. L-canavanin inkübasyon ortamına ilave edildiği zaman inhibisyon etkisinin azaldığı görülmektedir.

Table I. Jackbeanden arginazın kısmen saflaştırılması

	Hacim (ml)	Mg/ml Protein	Toplam Protein	Ünite/ml arginaz akt.	Toplam ünite	Verim %	Spesifik aktivite
Tamponda Homojenizasyon	400	40.5	16200	66.5	26600	100	1.64
Isı ile istenmeyen proteinlerin uzaklaş.	310	22	6820	103.3	32023	83	4.7
Amonyum sülfat ile doyurma ve diyaliz	250	14	350	143	3575	74.4	102
Aseton ile muamele	220	8.5	1870	207.5	45666	57	24.5

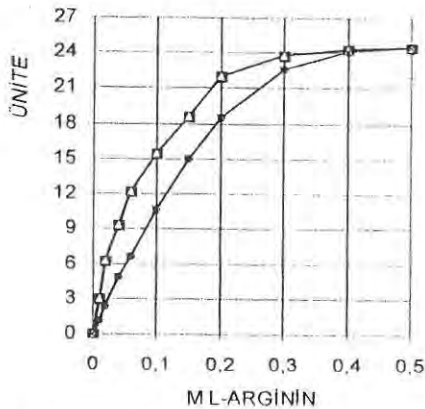
Tablo II. MnCl₂, L-Canavanin ve preinkübasyonun Jackbean'den kısmen saflaştırılan arginaz aktivitesi üzerine etkileri.

1.PREİNKÜBASYON 55 °C DE 5 DAK.	2.PREİNKÜBASYON 55 °C DE 5 DAK.	ARGİNAZ AKTİVİTESİ ÜNİTE	% DEĞİŞİM
Distile su	-	11.3	100
5 mM MnCl ₂	-	24.4	216
5 mM MnCl ₂	25 mM L-Canavanin	17.7	156
25 mM L-Canavanin	-	13.7	121
25 mM L-Canavanin	5 mM MnCl ₂	15.2	134.5
5 mM MnCl ₂	25 mM L-Canavanin*	19.1	169

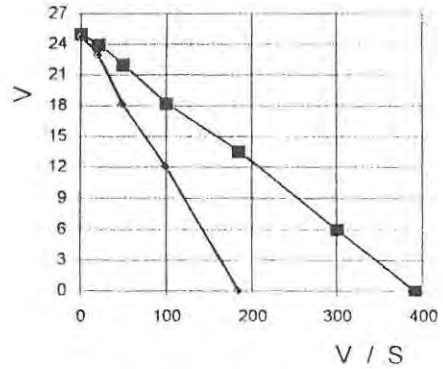
* İnkübasyon ortamına ilave edilmiştir

Şekil 1'de görüldüğü gibi L-canavanin jackbean arginazını kompetitif tarzda inhibe etmektedir. Michaelis-Menten'e göre değerlendirilen şekilde V_{max}'lar aynı Km 'ler ise daha farklıdır. Jackbean arginazının L-arginine karşı Km' 65 mM üre olarak bulunmuşken L-canavanine karşı Km 125 mM üre dolaylıdır.

Şekil 2 Jackbeanden kısmen saflaştırılan arginaz enzimine karşı substrat yoğunluğunun ve L-canavanin'in etkilerini göstermektedir. Şekil 2'de Eadie-Hofstee' ye göre değerlendirildiğinde jackbean arginazının L-arginine karşı Km'i 65 mM, L-canavanin'in ise 125 mM olarak bulunmuştur.



Şekil 1. Jackbean'den kısmen saflaştırılan arginaz enzimi üzerine substrat yoğunluğunun ve L-Canavalin'in etkileri



Şekil 2. L-Canavanin'in inhibitör etkisinin Eadie-Hofstee'ye göre gösterilmesi

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada bir tropikal fasulye türü olan jackbean'den arginaz % 57 verimle spesifik aktivitesi 15 misli arttırılarak saflaştırılmış ve her bir saflaştırma aşamasında enzim kayıplarının önlenmesi için azami itina gösterilmiştir. Homojenizasyon 2-merkaptetanol içeren Tris tamponuyla yapılarak enzimin yapısındaki fonksiyonel -SH grupları korunmuş aynı şekilde aseton ilavesi aşamasında da soğuk aseton (-20 °C) kullanılmıştır. İstenmeyen proteinler ısı ile

uzaklaştırılmış diyaliz işlemi hem tampona hem de distile suya karşı yapılarak küçük moleküler ağırlıklı maddeler ortamdaki atılmıştır. Safılaştırılan enzimin bazı kinetik özellikleri araştırılmış, enzimin tam aktivasyon için Mn iyonlarına gereksinim gösterdiği ve Mn⁺⁺ iyonları varlığında enzimin aktivitesinin % 116 oranında arttığı tespit edilmiştir. Birçok araştırmacı, arginazın Mn⁺⁺ iyonlarına kofaktör olarak ihtiyaç gösterdiğini rapor etmiş, Mn iyonlarının enzim-Mn ve L-arginin kompleksinin oluşumunu sağladığı ve dayanıklılığını arttırdığını bildirmişlerdir (8,9). Bizim çalışmamız bu sonucu destekleyici nitelikte olup Mn iyonlarının yokluğunda enzim aktivitesi önemli oranda azalmaktadır. Bu çalışmanın sonucunda, pH, preinkübasyon ısısı ve zamanı gibi diğer arginazlara ait benzer biyokimyasal özellikler ortaya konulmuştur.

Preinkübasyon 10 dakika ve 55 °C olarak yapılmış, L-canavanin ve Mn iyonlarının etkilerini araştırmak için preinkübasyon iki kısma ayrılmıştır. L-canavalin ikinci preinkübasyon aşamasında ilave edildiğinde arginaz aktivitesi %30 dolayında azalmaktadır. Enzim sadece L-canavanin ile preinkübe edildiğinde aktivitedeki azalma % 60 dolaylarına yükselmiştir. L-canavanin birinci preinkübasyonda Mn iyonları ise ikinci preinkübasyona ilave edildiğinde enzimin aktivitesi yükselmektedir. Enzim Mn iyonları ile daha dayanıklı hale geldiğinden aktivasyonda belirgin bir yükselme görülmekte fakat hiçbir zaman sadece Mn iyonları ile yapılan preinkübasyon değerine erişmemektedir. L-canavanin'in bu etkisi gerek Michaelis-Menten'e gerekse de Eadie-Hofstee'ye göre araştırıldığı zaman arginazın kompetitif inhibitörü olduğu tespit edilmiştir. Her iki şekilde de jackbean'den kısmen saflaştırılan enzimin L-arginine karşı Km'i 65 mM üre olarak bulunmuştur. Bu sonuç üreotelik canlı ve dokularda bulunan arginazın Km'lerinden oldukça yüksektir. Soya fasüyesinden saflaştırılan arginazın Km'i 83 mM olarak bulunmuş(12) Jackbean'den tarafımızdan saflaştırılan arginazın Km değeri ise 65 mM bulunarak bu sonuç desteklenmektedir. Yapısal bir arginin analogu olan L-canavanin'in bir bitki

arginazı üzerine bu inhibisyon etkisi ve kinetik özellikleri ilk kez tarafımızdan çalışılmıştır. Bu çalışmanın bitkilerde azot metabolizması üzerine yapılacak çalışmalara katkıda bulunacağına inanmaktayız.

KAYNAKLAR

1. Korpela TK, Lorenz H, and Laaks S. A specific arginase-based assay for L-canavanine in leguminous plants. *Journal Biochem Biophys Methods*. 1982; 7: 67-70.
2. Rosenthal GA. Purification and characterization of the higher plant enzyme L-canavalin reductase. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 1784-1788.
3. Michelangeli C. L-canavanine influences feed intake, plasma basic amino acid concentrations and kidney arginase activity in chicks. *J Nutr* 1994; 124: 1081-1087.
4. Gürsu MF, Gülen Ş. Jackbean (*canavalia ensiformis*) ve soya fasüyesi (*glycine max*) üreazlarının kısmen saflaştırılması ve özellikleri. XI. Ulusal Biyoloji Kongresi Özet Kitabı 1992, ss 155-162.
5. Takishima, K. The structure of Jackbean urease, the complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. *Eur J Biochem* 1988; 175:151-165.
6. Colombo JP. L. Arginase. In: Bergmayer H U (ed), *Methods of enzymatic analysis*. (3rd ed). Verlag Chemie, Weinheim 1984, pp 285-294.
7. Campell JW. Arginine and urea biosynthesis in the land planarian: its significance in biochemical evolution. *Nature* 1965; 208, 1999-1301.
8. Ozan S, Gürsu F, Doğrul M, ve ark. Tiyürenin ve Mn katyonlarının (Mn⁺⁺)'nin moniezia expansa arginazı üzerine etkisi. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* 1993; 17: 299-303.
9. Muszynska G, Wojtczak M. Influence of immobilization on conformation of rat liver arginase. *Int J Biochem* 1979;10: 665-668.
10. Carvajal N, Cederbaum, SD. Kinetics of inhibition of rat liver and kidney arginases by proline and branched-chain amino acids.

- Biochem Biophysic Acta* 1986; 870: 181-184.
11. Ikemoto M, Takata M, Murachi T, et all. *Purification and Properties of Human Erythrocyte Arginase. Ann Clin Biochem* 1989; 26: 547-553.
 12. Kang JH, Cho YD. *Purification and properties of arginase from soybean, glycine max, axes. Plant Physiol* 1990; 93: 1230-1234.
 13. Gürsu MF. *Çeşitli türlerin humor vitreuslarında üre ve kaynaklarının araştırılması. 1993, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.*
 14. İlhan, N. *İnsan tiroid doku arginazının kinetik özellikleri. 1992, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.*
 15. Özdemir Y, Ozan S, Özdemir N, et all. *The Evolution of the methods used for the measurement of arginase activity. Acta Medica Mediterranea* 1994; 10: 171-174.
 16. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et all. *Protein measurements with the folin fenol reagent. J Biol Chem* 1951, pp 193.