

Received: 2007.09.18  
Accepted: 2008.04.15  
Published: 2008.05.14

## Nowe oblicza arginazy. Część I. Struktura i właściwości

### New insights into arginase. Part I. Structure and characteristics

Magdalena Mielczarek-Puta, Alicja Chrzanowska, Anna Barańczyk-Kuźma

Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Warszawie

#### Streszczenie

Arginaza (amidnohydrolaza, EC 3.5.3.1) występuje niemal na każdym poziomie ewolucji – jej obecność stwierdzono u bakterii, drożdży, roślin, bezkręgowców i kręgowców. W wątrobie zwierząt ureotelicznych, gdzie aktywność enzymu jest najwyższa, arginaza uczestniczy w procesie detoksykacji amoniaku. Aktywność arginazy w tkankach pozawątrobowych jest znacznie mniejsza, a jej funkcja nie jest w pełni wyjaśniona – prawdopodobnie jest związana z metabolizmem L-argininy. Enzym ten jest oligomerem, zbudowanym z podjednostek o masie 20–40 kDa, dla którego optimum pH wynosi 10,0, a pełna aktywność katalityczna zależy od obecności jonów manganowych. Inhibitorami arginazy są m.in. prolina i ornityna oraz produkt pośredni w syntezie tlenu azotu – N<sup>G</sup>-hydroksy-L-arginina. U ssaków arginaza występuje w postaci dwóch izoenzymów (AI – tzw. arginaza wątrobowa i AII – pozawątrobowa) będących produktami różnych genów (*ARG1* i *ARG2*). Izoenzymy arginazy różnią się składem podjednostkowym, umiejscowieniem komórkowym (AI jest postacią cytosolową, AII mitochondrialną), a także właściwościami fizyko-chemicznymi, kinetycznymi i immunologicznymi. Izoformy AI i AII są enzymami o dużej swoistości substratowej. W większości tkanek występują oba izoenzymy, a ich ekspresja ulega zmianie w zależności od stanu czynnościowego i potrzeb metabolicznych. Mimo różnic w składzie aminokwasowym izoenzymów arginazy pochodzących z różnych organizmów mają one wysoce konserwatywne regiony, odpowiedzialne za strukturalne i katalityczne właściwości enzymu.

**Słowa kluczowe:** arginaza • izoenzymy

#### Summary

Arginase (amidohydrolase, EC 3.5.3.1) is present in all living organisms, i.e. bacteria, yeasts, plants, invertebrates, and vertebrates. In ureolitic organisms, arginase expresses the highest activity in the liver, where it takes part in ammonia detoxification. Arginase activity is much lower in extrahepatic tissues and its physiological function is still poorly understood; however, it seems to be involved in L-arginine metabolism. Arginase is a homotrimer consisting of 20- to 40-kDa subunits acting at a pH of 10 and in the presence of manganese ions. Proline, ornithine, and N<sup>G</sup>-hydroxy-L-arginine, an intermediate in the biosynthesis of NO, are known as competitive arginase inhibitors. Two arginase isoenzymes, AI (the so-called “hepatic arginase”) and AII (“extrahepatic arginase”) are present in mammalian tissues. There are significant differences between the isoenzymes regarding their subcellular localization, isoelectric point, substrate affinity, and immunological cross-reactivity. Arginase isoenzymes AI and AII have high substrate specificity, but the affinity to L-arginine is higher for isoenzyme AI than AII. Both isoenzymes exist in most tissues and their expressions change depending on the functional state and metabo-



lic requirements. Besides differences in the amino-acid content of the arginase isoforms within one or different species, they have highly conserved regions responsible for the structure and catalytic properties of arginase.

**Key words:** arginase • isoenzymes

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_62/11580.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_62/11580.pdf)

**Word count:** 2742

**Tables:** 1

**Figures:** 4

**References:** 74

**Adres autorki:** prof. dr hab. Anna Barańczyk-Kuźma, Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna w Warszawie, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: akuzma@amwaw.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **ABH** – kwas 2(S)-amino-6-boroheksanowy; **ARGI** – gen kodujący podjednostkę arginazy AI; **ARGII** – gen kodujący podjednostkę arginazy AII; **BEC** – S-(2-boroetylo)-L-cysteina; **CAT** – transporter aminokwasów kationowych (cationic amino acid transporter); **CRP-cAMP** – białko receptorowe dla cAMP (cAMP receptor protein); **kDa** – kilodalton; **kpz** – kilo par zasad; **L-NAME** – ester metylowy N<sup>6</sup>-nitro-L-argininy; **NO** – tlenek azotu; **NOHA** – N<sup>6</sup>-hydroksy-L-arginina; **nor-NOHA** – N<sup>6</sup>-hydroksy-nor-L-arginina; **NOS** – syntaza tlenu azotu; **pz** – par zasad.

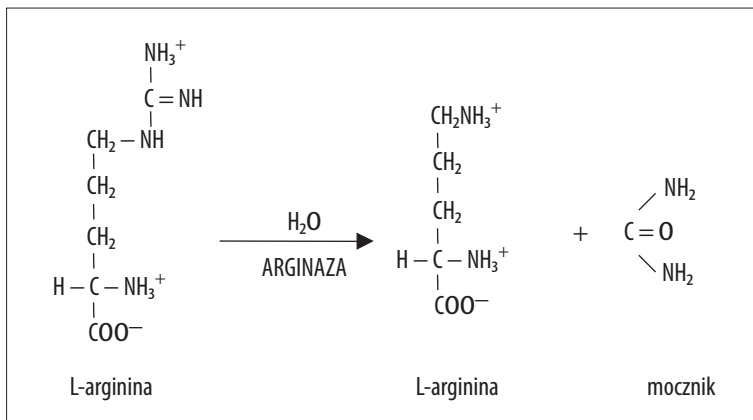
## 1. WYSTĘPOWANIE ARGINAZY

Arginaza (amidnohydrolaza L-argininy, EC 3.5.3.1) po raz pierwszy została opisana w 1904 r., kiedy to Kossel i Dakin wykazali jej obecność w tkankach zwierzęcych [36]. Czternaście lat później Clementi stwierdził, że arginaza występuje w dużych ilościach w wątrobie ssaków, a w 1928 r. Krebs i Henseleit wyjaśnili jej udział w tworzeniu mocznika. Był to pierwszy krok do odkrycia cyklicznego procesu detoksykacji amoniaku w wątrobie nazywanego cyklem Krebsa-Henseleita lub cyklem mocznikowym [13,37]. Dziś wiadomo, że arginaza katalizuje reakcję hydrolizy, prowadzącą do odszczepienia grupy guanidynowej z L-argininy i utworzenia L-ornityny i mocznika (ryc. 1).

Arginaza jest enzymem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Jej obecność stwierdzono u bakterii, drożdży, roślin, bezkręgowców i kręgowców [28]. Najwięcej doniesień naukowych dotyczy występowania arginazy w tkankach ssaków. Obecnie wiadomo, że poza wątrobą enzym

ten znajduje się w wielu innych tkankach, takich jak mózg [5,39,47,48,69], śluzówka jelita, żołądek, śledziona, grasicca [6,46,74], trzustka [59], gruczoł ślinowy [72], gruczoł mleczny [6,29], gruczoł krokowy [40,74], tarczyca [22,74], tkanki oka [35], a także w komórkach krwi (erytrocyty, płytki krwi, limfocyty, granulocyty, monocyty, makrofagi) i komórkach śródbłonna naczyń [28,34,56,74]. Mimo powszechności występowania, nie stwierdzono aktywności arginazy w erytrocytach małpy, psa, kota i szczura [51].

Główną funkcją arginazy u zwierząt ureotelicznych jest udział w procesie detoksykacji amoniaku w wątrobie. Arginaza wydaje się najważniejszym enzymem regulującym szybkość cyklu mocznikowego i pozwalającym na prawidłowy przebieg przemian azotu aminowego do mocznika. Poza wątrobą, obecność niektórych enzymów cyklu mocznikowego wykazano w jelicie cienkim świni, szczura i myszy. Stwierdzono aktywność syntetazy karbamoilofosforanowej i arginazy u świni, szczura i myszy; karbamoilotransferazy ornitowej u świni i szczura; syn-



Ryc. 1. Reakcja katalizowana przez arginazę

tetazy argininobursztynianowej u szczura i liazы argininobursztynianowej u myszy [3,27,52,55,68,70]. Badania prowadzone *in vitro* na enterocytach świni dowiodły, że komórki jelita cienkiego mają możliwość detoksykacji amoniaku, powstającego z rozpadu glutaminy [69]. Wydajność procesu detoksykacji jest jednak nieznaczna w porównaniu z wątrobą, dlatego wątpliwe jest, aby rolą arginazy w jelicie był udział w utylizacji amoniaku. Zdolność tworzenia cytruliny z amoniaku wykazano także w komórkach jelita grubego szczura [45].

W tkankach pozawątrobowych, u organizmów pozbawionych kompletu enzymów cyklu mocznikowego lub kompartmentacji komórkowej, rola arginazy sprowadza się do katabolizmu egzo- i endogennej L-argininy. Arginina jest aminokwasem niezbędnym do prawidłowego rozwoju młodych organizmów, natomiast u osób dorosłych jej suplementacja jest wskazana w przypadku urazów, oparzeń i zaburzenia czynności nerek [71]. Arginaza tkanek pozawątrobowych utrzymuje optymalne stężenie tego aminokwasu w komórkach i może być jednym z czynników odpowiedzialnych za utrzymanie prawidłowego stężenia mocznika we krwi u pacjentów z genetycznie uwarunkowanymi blokami enzymatycznymi cyklu mocznikowego [11]. Dostępność L-argininy w komórce regulowana jest m.in. na poziomie jej transportu przez błonę plazmatyczną. Obecnie wiadomo, że arginina, podobnie jak inne kationowe aminokwasy, jest transportowana do wnętrza komórek przez wysoce swoiste nośniki białkowe, określane jako układ przenośników  $y^+$ ,  $b^{0,+}$ ,  $B^{0,+}$ ,  $y^+L$ . Około 70% argininy jest przenoszona za pośrednictwem niewrażliwego na pH i niezależnego od jonów  $Na^+$  układu  $y^+$ , którego efektywne działanie jest możliwe dzięki obecności białek przenośnikowych CAT [14,18,60].

## 2. IZOENZYMЫ ARGINAZY W TKANKACH SSAKÓW

### 2.1. Ogólna charakterystyka

Od ponad 30 lat badane jest zjawisko odmienności molekularnej arginazy metodami chromatograficznymi, elektroforetycznymi i immunologicznymi. Pierwsze, opublikowane już w 1970 r. prace wykazały istnienie w tkankach człowieka czterech różnych izoform arginazy. Badania późniejsze wskazywały na obecność trzech izoenzymów arginazy w tkankach ssaków [4,20]. Obecnie wiadomo, że u ssaków występują dwa izoenzymy arginazy – arginaza AI zbudowana z trzech podjednostek „L”, której obecność po raz pierwszy stwierdzono w wątrobie oraz arginaza AII zbudowana z trzech podjednostek „K” (po raz pierwszy opisana w nerce) [11,28]. Do niedawna uważano, że arginaza AI jest charakterystyczna tylko dla hepatocytów, a jej główną funkcją jest udział w procesie detoksykacji amoniaku. Dziś wiadomo, że poza wątrobą jest ona obecna także w erytrocytach, makrofagach, płucach, gruczole ślinowym, żołądku, skórze, jelicie, przelyku, trzustce, śledzionie oraz węzłach chłonnych [34,43,49,54,72]. Arginaza AII występuje w nerce, jelicie, żołądku, mózgu, tarczycy, przysadce, płucach, prostaty, sercu, łożysku, macicy, jądrach, skórze, gruczole krokowym, mięśniach szkieletowych i makrofagach [22,23,43,44,67,74]. Poza tym istnieje coraz więcej dowodów na jej obecność w komórkach wątroby [22,44,67]. Z tego powodu stosowany powszechnie podział na arginazę wątrobową (AI) i pozawątrobową

Tabela 1. Porównanie izoenzymów arginazy [11,16]

Właściwości	Arginaza AI Arginaza AII	
	cytosol	mitochondrium
Lokalizacja komórkowa	cytosol	mitochondrium
Masa podjednostki (kDa)	35	40
Punkt izoelektryczny	9,3	6,8
Optymalne stężenie jonów $Mn^{2+}$ (mM)	20,0	2,0
Optymalne pH	9,9	10,0
Reakcja z przeciwciałami anty AI	+	-
Hamowanie przez prolinę	±	++
Hamowanie przez ornitynę	++	±

– nerkową (AII) stracił na aktualności, gdyż w większości tkanek występują oba izoenzymy, a ich ekspresja ulega zmianie w zależności od stanu czynnościowego i potrzeb metabolicznych [11].

Izoformy arginazy różnią się składem podjednostkowym, umiejscowieniem komórkowym (AI jest postacią cytosolową, AII mitochondrialną), właściwościami immunologicznymi, biochemicznymi i kinetycznymi oraz wrażliwością na inhibitory [28]. Podstawowe różnice pomiędzy arginazą AI i AII przedstawiono w tabeli 1.

### 2.2. Swoistość substratowa i powinowactwo

Izoformy AI i AII są enzymami o dużej swoistości substratowej, która zależy od obecności grupy guanidynowej, długości i charakteru łańcucha bocznego oraz ułożenia podstawników przy węglu  $\alpha$ . Największe powinowactwo arginaza wykazuje do L-argininy, ale hydrolizuje także amid L-argininy, kwas L-argininowy, agmatynę, L-kanawaninę, L-homoargininę i L-tioargininę. Natomiast D-arginina, kwas guanidynomasłowy i  $N^G$ -metylo-L-arginina nie są substratami arginazy [1,24].

Izoforma AI wykazuje większe powinowactwo do L-argininy niż izoforma AII. Wartość  $K_m$  dla obu arginaz waha się w szerokim zakresie, 0,02–20 mM dla izoformy AI i 0,3–45 mM dla izoformy AII [19,28]. Tak odmienne wartości wynikają prawdopodobnie z zastosowania różnych metod i warunków oznaczania. I tak,  $K_m$  wyznaczone w pH 9,5 dla arginazy AI i arginazy AII wynosi odpowiednio 0,02 mM i 0,3 mM. Warunki pH zbliżone do fizjologicznych zmniejszają powinowactwo enzymu do substratu.  $K_m$  dla AI w pH 8,5 wynosi 0,08 mM, natomiast  $K_m$  dla AII w pH 7,0 wzrasta do 4,8 mM [7,16,19].

### 2.3. Aktywatory i inhibitory

Do najczęściej opisanych fizjologicznych aktywatorów arginazy AI i AII należą jony manganawe ( $Mn^{2+}$ ). Wśród arginaz niższych organizmów rolę aktywatorów mogą pełnić jony  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  i  $Cd^{2+}$  [1].

Aktywność arginazy AI i AII jest hamowana przez aminokwasy rozgałęzione (Val, Leu, Ile), kationy metali ciężkich (Cu, Hg, Cd), anion cytrynianowy i fluorkowy oraz



puryny i pirymidyny [8,16,54,63,64,65]. Również azotyny, w przeciwieństwie do azotanów, mogą hamować aktywność arginazy z wątroby wołu i makrofagów myszy [26]. Hamujący wpływ wykazuje także ester metylowy N<sup>G</sup>-nitro-L-argininy (L-NAME), który należy do silnych inhibitorów NOS [53]. Ponadto aktywność obu izoenzymów arginazy hamują N<sup>G</sup>-hydroksy-L-arginina (NOHA) i jej analog N<sup>G</sup>-hydroksy-nor-L-arginina (nor-NOHA), a także kwas borowy i jego pochodne, takie jak kwas 2(S)-amino-6-boroheksanowy (ABH) i S-(2-boroetylo)-L-cysteina (BEC) [1,7,15,17,19,33].

Zrozumienie mechanizmu hamowania, a także poznanie różnic w strukturze izoenzymów arginazy, umożliwi opracowanie selektywnych inhibitorów, które w przyszłości mogą być przydatne w terapii wielu schorzeń.

### 3. BUDOWA MOLEKULARNA ISOENZYMÓW ARGINAZY

Istnieją dwa odrębne geny kodujące izoenzymy arginazy [58]. Gen *ARG I* dla podjednostki arginazy AI ma długość 11,5 kbp i mieści się na długim ramieniu chromosomu 6 w pozycji 6q23 [57]. Składa się on z 8 eksonów o zróżnicowanej długości od 73 pb (ekson 2) do 587 pb (ekson 8). Spośród 7 intronów, najmniejszy (intron 6) złożony jest z 186 pb, a największy (intron 1) z 3,6 kbp. Między genami arginazy I różnych gatunków istnieje duże podobieństwo, np. pomiędzy genami szczura i człowieka istnieją fragmenty homologiczne w 84%. Sekwencja promotora genu 5'-TATAA-3' *ARG I* człowieka jest klasyczną sekwencją promotora „TATA-box” i znajduje się w pozycji od -28 do -24 od miejsca startu transkrypcji. Sekwencja 5'-AGCCAG-3' zlokalizowana w pozycji od -72 do -67 wiąże czynnik transkrypcyjny CTF/NF1. Natomiast w pozycji od -366 do -359 znajduje się sekwencja wzmacniająca 5'-GAGGAAAG-3', podobna do wirusowych i komórkowych sekwencji wiążących czynniki wzmacniające. Na nici antysensownej w rejonach od -319 do -333, od -225 do -239 oraz nici sensownej w rejonie od -74 do -60 są umiejscowione miejsca odpowiedzialne za wiązanie hormonów glikokortykosteroidowych. W pozycji od -289 do -282 położona jest sekwencja 5'-TGAAGTCA-3' podobna do sekwencji rozpoznawanej przez kompleks CRP-cAMP (cAMP receptor protein) [61]. Gen *ARG II* kodujący podjednostkę ludzkiej arginazy AII znajduje się na 14 chromosomie w pozycji q24.1–24.3 [22].

Liczne prace eksperymentalne pozwoliły poznać strukturę cDNA ludzkiej arginazy AI i AII. Wiadomo, że na końcach 5' i 3' cDNA izoformy AI znajdują się nieulegające translacji sekwencje o długości 56 pb i 423 pb [25]. Według różnych autorów, cDNA ludzkiej arginazy AII zawiera na końcu 5' nieulegającą translacji sekwencję złożoną z 20 lub 16 pb, a na końcu 3' nieulegającą translacji fragment o długości 272 lub 788 pb. Oba izoenzymy arginazy na końcach 3' mają sekwencję poli(A) [23,44]. mRNA ludzkiej arginazy AI ma wielkość 1,6 kbp, natomiast arginazy AII 1,5–1,8 kbp. Monomer arginazy AI jest złożony z 322 reszt aminokwasowych (AA) i kodowany przez nukleotyd długości 966 pb, podczas gdy monomer arginazy AII zawiera 354 aminokwasy i jest kodowany przez 1062 pb [23,25,44,67]. Zaprojektowany na podstawie sekwencji nukleotydowej łańcuch polipeptydowy monomeru arginazy AI ma masę cząsteczkową 34,7 kDa, a arginazy II wy-

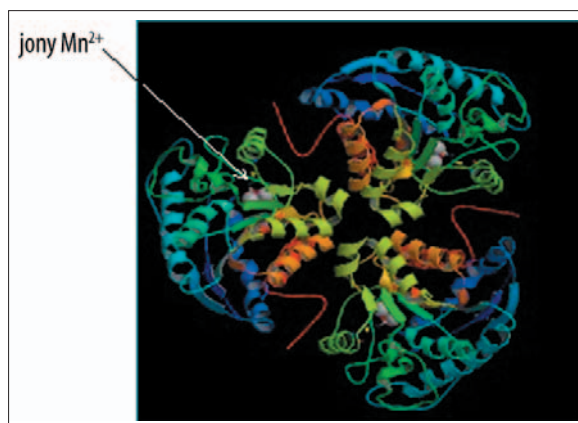
nosi około 40 kDa, co jest zgodne z wartościami uzyskanymi eksperymentalnie [16,23,25]. Różnica 32 AA pomiędzy arginazą AI i AII wynika z obecności dodatkowych reszt aminokwasowych na N- i C-końcu białka AII. Uważa się, że zlokalizowana na N-końcu 18-aminokwasowa sekwencja sygnałowa umożliwia transport białka do mitochondrium, a niedojrzała postać obecna w cytosolu jest prawdopodobnie chroniona przez białka szoku termicznego [21,23,62]. Wewnątrz mitochondrium prekursor enzymu ulega przekształceniu do postaci dojrzałej w wyniku odcięcia sekwencji sygnałowej. Nie jest znana dokładna pierwszorzędowa struktura AA sekwencji sygnałowej, ale wiadomo że nie ma ona aminokwasów kwaśnych, zawiera natomiast liczne reszty argininy, lizyny i seryny. Przypuszcza się, że miejsce odcięcia znajduje się pomiędzy Ser-22 a Val-23 [23]. Zaproponowana przez Colleluori i wsp. [16] sekwencja 10. pierwszych AA N-końca dojrzałej postaci arginazy AII sugeruje obecność drugiego, potencjalnego miejsca odcięcia sekwencji sygnałowej pomiędzy Val-26 a Ala-27. Obie dojrzałe postaci „Val 23” i „Ala 27” ulegają ekspresji, ale postać „Ala 27” nie wykazuje aktywności enzymatycznej. Dlatego autorzy sugerują, że pierwsze cztery aminokwasy N-końca dojrzałej postaci arginazy AII są niezbędne do utrzymania trzeciorzędowej struktury enzymu i właściwej konformacji białka [16,23].

Izoformy arginazy tego samego typu (AI lub AII) pochodzące z różnych organizmów wykazują większe podobieństwo niż różne izoenzymy w obrębie jednego gatunku. Homologia sekwencji białkowej ludzkich arginaz AI i AII wynosi 53–62%, a homologia arginazy AI i AII u *Xenopus leavis* (żaba szponiasta) jest rzędu 49%. Natomiast arginazy AII człowieka i *Xenopus leavis* są identyczne w ponad 70%, a arginazy AI tych samych gatunków w 64%. Homologia sekwencji białkowej arginaz szczura i człowieka jest jeszcze większa i wynosi 87% pomiędzy izoformami AI i 83% pomiędzy izoformami AII. Tak duże podobieństwo arginaz różnych gatunków może być dowodem, że oba izoenzymy wywodzą się ze wspólnego genu, którego duplikacja nastąpiła przed lub na wczesnym etapie ewolucji płazów. Wydaje się, że jako pierwsza pojawiła się izoforma AII [23,50,67].

### 4. STRUKTURA ISOENZYMÓW ARGINAZY

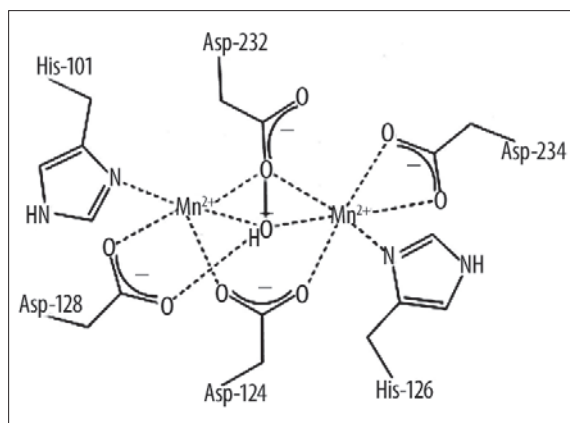
Pomimo odmiennych właściwości kinetycznych, immunologicznych i fizyko-chemicznych obydwa izoenzymy arginazy mają wysoce konserwatywne regiony, odpowiedzialne za strukturalne i katalityczne właściwości enzymu, a także podobną trójwymiarową strukturę przestrzenną [28]. Najdokładniej poznano i opisano właściwości arginazy pochodzącej z tkanek szczura, która wykazuje duże podobieństwo do arginaz z tkanek innych ssaków [4,64]. Biorąc pod uwagę lokalizację narządową, do najlepiej zbadanych należą arginazy wątrobowe i nerkowe oraz arginazy z makrofagów i fibroblastów.

Obie izoformy arginazy ssaków są homotrimerami o różnej masie cząsteczkowej (ryc. 2). Masa cząsteczkowa arginazy AI wynosi 105 kDa, a arginazy AII 129 kDa [16,30]. Arginaza obecna w wątrobie szczura jest białkiem o budowie globularnej i wymiarze jednej podjednostki 40×50×40 Å. Każdy monomer zawiera elementy o strukturze α i β (88). Arginaza AII człowieka i arginaza



Ryc. 2. Struktura przestrzenna ludzkiej arginazy AI [19]; ryc. pobrano z bazy danych RCSB PDB (PROTEIN BATA BANK) [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org); motyw S zaznaczono na czerwono, jony manganu przedstawiono jako szare punkty. Każdy monomer wiąże dwa jony manganu

AI szczura wykazują identyczną lokalizację przestrzenną fragmentów o strukturze  $\alpha$  i  $\beta$  łańcucha polipeptydowego [7]. Aminokwasy C-końca każdego monomeru arginazy tworzą charakterystyczny motyw w kształcie litery S, a interakcje pomiędzy resztami aminokwasowymi każdej podjednostki warunkują strukturę czwartorzędową cząsteczki enzymu. Stabilizacja trimeru jest możliwa poprzez wiązania wodorowe, jonowe oraz siły van der Waalsa. Oddziaływania te stanowią około 54% wszystkich interakcji na poziomie podjednostek arginazy [2,16,31]. Opisano, że istotnym, konserwatywnym aminokwasem determinującym strukturę trimeru jest arginina położona w pozycji 308, która dzięki oddziaływaniom z Glu-262 i Asp-204 sąsiednich podjednostek utrzymuje strukturę czwartorzędową [2,12,31]. Mutacja punktowa w pozycji 308 prowadzi do zniszczenia trimeru i powstania aktywnych monomerów. Aktywność badanych wariantów R308A, R308E i R308K jest mniejsza, a dysocjacja na podjednostki zachodzi 10 razy szybciej w porównaniu z niezmienną cząsteczką enzymu. Zmutowane białko arginazy wykazuje większą wrażliwość na wysoką temperaturę. W badaniu struktury krystalograficznej wariantu R308K stwierdzono, że w dużym stężeniu, arginaza ma postać trimeru, ale interakcje Lys-308 z aminokwasami sąsiadującymi podjednostek są słabsze niż w przypadku niezmiennego wariantu Arg-308 [38]. Jednak badania arginazy pozbawionej 14 C-końcowych aminokwasów przeczą teorii, że „motyw S” i Arg-308 determinują strukturę przestrzenną enzymu [42]. Ponadto porównanie reszt aminokwasowych arginaz dwudziestu jeden różnych organizmów wykazało, że Arg-308 występuje jedynie w typie AI i AII człowieka, szczura, myszy i *Xenopus leavis*, podczas gdy w arginazach niższych organizmów zastąpiona jest innym aminokwasem [50]. Według Mora i wsp. [42] aminokwasami odpowiedzialnymi za utrzymanie czwartorzędowej struktury enzymu są wysoce konserwatywne reszty Glu-256 i Arg-255. Łańcuch boczny Glu-256 znajduje się w odległości 2,9 Å od grupy guanidynowej Arg-255 sąsiedniej podjednostki, dzięki czemu możliwe jest utworzenie wiązania jonowego pomiędzy aminokwasami. Glu-256 wydaje się jedyną wysoce konserwatywną resztą w rodzinie arginaz, zaangażowaną w interakcje pomiędzy podjednostkami. Dlatego brak Glu-256 w arginazach organizmów niższego rzędu

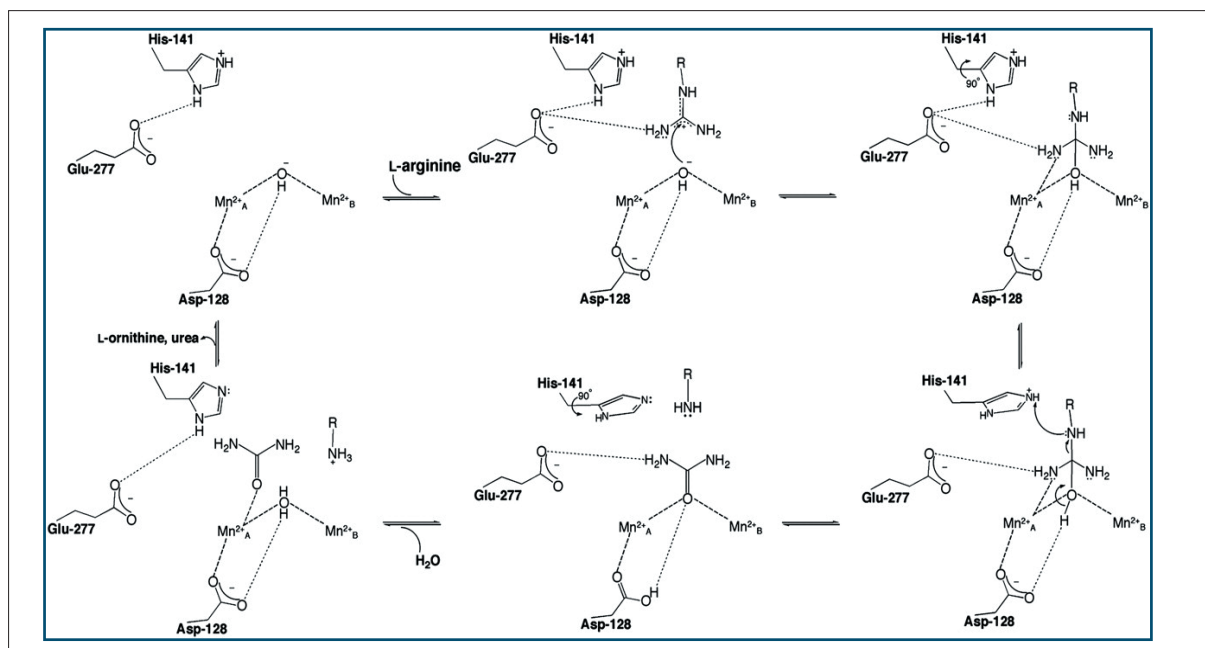


Ryc. 3. Dzumanganowe centrum aktywne arginazy AI z wątroby szczura [1,31]

może tłumaczyć ich odmienną czwartorzędową strukturę [50]. Wykazano, że C-końcowy fragment arginazy AII oprócz konserwatywnych reszt aminokwasowych, zawiera dodatkową sekwencję, której rola nie jest w pełni wyjaśniona. Być może jest ona odpowiedzialna za tworzenie oligomerów wyższego rzędu [16].

Cechą wspólną wszystkich znanych arginaz, zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych jest obecność biwalentnych kationów metali, które warunkują jej pełną aktywność katalityczną i właściwą konformację przestrzenną [9]. Arginaza ssaków jest metaloenzymem, który do pełnej aktywności wymaga obecności jonów manganu ( $Mn^{2+}$ ). Dwa jony manganu, oznaczone jako  $Mn^{2+}_A$  oraz  $Mn^{2+}_B$ , położone są w centrum aktywnym na fragmencie  $\beta$  każdej z podjednostek. Centrum dzumanganowe znajduje się na głębokości około 15 Å, natomiast odległość pomiędzy atomami manganu wynosi 3,3 Å. Głębiej usytuowany jon  $Mn^{2+}_A$  jest utrzymywany przez wiązania koordynacyjne z His-101, Asp-124, Asp-128, Asp-232 oraz jonem hydroksylowym. Silniej związany jon  $Mn^{2+}_B$  tworzy kompleks z His-126, Asp-124, Asp-232, Asp-234 oraz cząsteczką rozpuszczalnika [1] (ryc. 3). Jony  $Mn^{2+}$  odgrywają ważną rolę w aktywacji cząsteczki wody, ale także stabilizują w układzie tetraedrycznym jon hydroksylowy powstający w czasie reakcji hydrolizy. Elementy struktury enzymu wiążące jony  $Mn^{2+}$  są wysoce konserwatywne w obrębie arginaz różnych gatunków [50]. W świetle tego nie dziwi to, że opisana niedawno struktura centrum Mn(II) ludzkiej arginazy AII jest identyczna z centrum manganowym arginazy AI z wątroby szczura [7]. Lopez i wsp. [41] wykazali, że w centrum aktywnym arginazy AII jon  $Mn^{2+}_A$  jest silniej związany niż w centrum aktywnym arginazy AI.

Porównanie sekwencji aminokwasowych dwudziestu jeden arginaz różnych organizmów, m.in. człowieka, szczura i myszy wykazało istnienie dwudziestu wysoce konserwatywnych reszt aminokwasowych. Wśród nich duży procent stanowią reszty Gly, Pro i Asp, które są odpowiedzialne za prawidłowe ułożenie przestrzenne białka [50]. Ważnymi aminokwasami odpowiedzialnymi za funkcje katalityczne są His-141, Asp-181 (u niektórych gatunków zastąpiony przez Ser) i Glu-277. Wiadomo, że Asp-181 i Glu-277 tworzą wiązania jonowe z dodatnio naładowanym azotem grupy guanidynowej L-argininy, co utrzymuje



Ryc. 4. Proponowany mechanizm reakcji katalizowanej przez ludzką arginazę AI [19]

substrat w czasie reakcji i ułatwia hydrolizę [10,31,50,66]. Obecność wysoce konserwatywnych reszt aminokwasowych w obrębie rodziny arginaz determinuje prawidłową strukturę przestrzenną białka i optymalne właściwości katalityczne enzymu.

## 5. MECHANIZM REAKCJI KATALIZOWANEJ PRZEZ ARGINAZĘ

Zaproponowany przez Kanyo i wsp. [31] model reakcji katalizowanej przez arginazę składa się z czterech etapów (ryc. 4): wiązania substratu, tworzenia układu tetraedrycznego, wiązania powstałych produktów i ich dysocjacji. Wiązanie substratu polega na utworzeniu połączenia jonowego pomiędzy grupą guanidynową L-argininy a grupą karboksylową Glu-277. Oprócz Glu-277 istotną rolę w przyłączeniu i odpowiednim ułożeniu L-argininy odgrywa Thr-246 i His-141. W drugim etapie dochodzi do nukleofilowego ataku jonu hydroksylowego na grupę guanidynową. W konsekwencji powstaje tetraedryczny intermediat. Następnie z udziałem Asp-128 następuje przeniesienie protonu z jonu hydroksylowego na grupę ε-aminową argininy. Następuje rozpad tetraedrycznego intermediatu i uwolnienie L-ornityny i mocznika. W procesie tym ważną rolę katalityczną odgrywa His-141. Przypuszcza się, że His-141 przekazuje proton z otaczającego roztworu do grupy δ-aminowej ornityny. W ostatnim etapie dochodzi do przyłączenie cząsteczki wody do centrum manganowego, co powoduje przesunięcie

mocznika na koordynacyjną stronę jonu  $Mn^{2+}_A$ . Dysocjacja produktu, a także obecność w centrum katalitycznym His-141 ułatwiają jonizację cząsteczki wody związanej z metalem. Powstały z udziałem końcowego łańcucha His-141 proton zostaje przeniesiony do roztworu. Dochodzi do odtworzenia katalitycznie aktywnego jonu hydroksylowego. Dzięki zdolnościom przenoszenia protonów, His-141 często określana jest mianem czółenka protonowego, choć jej udział w katalizie wciąż wywołuje dyskusję [10,19,32]. Na obecnym etapie badań nie ma ustalonej kolejności w jakiej następuje odłączanie produktów od kompleksu arginaza-L-ornityna-mocznik.

## PODSUMOWANIE

Arginaza jest enzymem znanym od ponad 100 lat, ale dopiero rozwój nowoczesnych metod badawczych pozwolił na poznanie jej struktury i właściwości. W tkankach ssaków arginaza występuje w postaci dwóch izoenzymów AI i AII, które są produktami różnych genów. Najdokładniej zbadano i opisano arginazę obecną w tkankach szczura, która wykazuje duże podobieństwo do arginaz z tkanek innych ssaków. Arginaza jest enzymem cyklu mocznikowego, ale występuje również w tkankach pozawątrobowych, w których cykl ten nie zachodzi. Pomimo trwających intensywnych badań rola arginazy pozawątrobowej nie jest w pełni wyjaśniona.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Ash D.E.: Structure and function of arginases. *J. Nutr.*, 2004; 134: 2760S–2764S
- [2] Ash D.E., Scolnick L.R., Kanyo Z.F., Vockley J.G., Cederbaum S.D., Christianson D.W.: Molecular basis of hyperargininemia: structure-function consequences of mutations in human liver arginase. *Mol. Genet. Metab.*, 1998; 64: 243–249
- [3] Blachier F., M'Rabet-Touil H., Posho L., Darcy-Vrillon B., Duée P.H.: Intestinal arginine metabolism during development. Evidence for *de novo* synthesis of L-arginine in newborn pig erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, 1993; 216: 109–117
- [4] Borcic O., Straus B.: Separation of arginase isoenzymes from human tissues by agar gel electrophoresis. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1976; 14: 533–535

- [5] Braissant O., Gotoh T., Loup M., Mori M., Bachmann C.: L-arginine uptake, the citrulline-NO cycle and arginase II in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1999; 70: 231–241
- [6] Byrne C.R., Price K.J., Williams J.M., Brown J.F., Hanson P.J., Whittle B.J.: Nitric oxide synthase and arginase in cells isolated from the rat gastric mucosa. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; 1356: 131–139
- [7] Cama E., Colleluori D.M., Emig F.A., Shin H., Kim S.W., Kim N.N., Traish A.M., Ash D.E., Christianson D.W.: Human arginase II: crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal. *Biochemistry*, 2003; 42: 8445–8451
- [8] Carvajal N., Cerdeba S.D.: Kinetics of inhibition of rat liver and kidney arginases by proline and branched-chain amino acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986; 870: 181–184
- [9] Carvajal N., Torres C., Uribe E., Salas M.: Interaction of arginase with metal ions: studies of the enzyme from human liver and comparison with other arginases. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 1995; 112: 153–159
- [10] Cavalli R.C., Burke C.J., Kawamoto S., Soprano D.R., Ash D.E.: Mutagenesis of rat liver arginase expressed in *Escherichia coli*: role of conserved histidines. *Biochemistry*, 1994; 33: 10652–10657
- [11] Cederbaum S.D., Yu H., Grody W.W., Kern R.M., Yoo P., Iyer R.K.: Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol. Genet. Metab.*, 2004; 81(Suppl.1): S38–S44
- [12] Christianson D.W.: Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1997; 67: 217–252
- [13] Clementi A.: Sulla presenza dell' arginasi nell' organismo di qualche invertebrati. *Atti. Accad. Naz. Lincei.*, 1918; 27: 229
- [14] Closs E.I.: CATs, a family of three distinct mammalian cationic amino acid transporter. *Amino Acids*, 1996; 11: 193–208
- [15] Colleluori D.M., Ash D.E.: Classical and slow-binding inhibitors of human type II arginase. *Biochemistry*, 2001; 40: 9356–9362
- [16] Colleluori D.M., Morris S.M.Jr., Ash D.E.: Expression, purification, and characterization of human type II arginase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001; 389: 135–143
- [17] Cox J.D., Cama E., Colleluori D.M., Pethe S., Boucher J.L., Mansuy D., Ash D.E., Christianson D.W.: Mechanistic and metabolic inferences from the binding of substrate analogues and products to arginase. *Biochemistry*, 2001; 40: 2689–2701
- [18] Deves R., Boyd C.A.: Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol. Rev.*, 1998; 78: 487–545
- [19] Di Costanzo L., Sabio G., Mora A., Rodriguez P.C., Ochoa A.C., Centeno F., Christianson D.W.: Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 13058–13063
- [20] Gąsiorowska I., Poremska Z., Jachimowicz J., Mochacka I.: Isoenzymes of arginase in rat tissues. *Acta Biochim. Pol.*, 1970; 17: 19–30
- [21] Glick B., Schatz G.: Import of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Genet.*, 1991; 25: 21–44
- [22] Gotoh T., Araki M., Mori M.: Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 233: 487–491
- [23] Gotoh T., Sonoki T., Nagasaki A., Terada K., Takiguchi M., Mori M.: Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Lett.*, 1996; 395: 119–122
- [24] Han S., Moore R.A., Viola R.E.: Synthesis and evaluation of alternative substrates for arginase. *Bioorg. Chem.*, 2002; 30: 81–94
- [25] Haraguchi Y., Takiguchi M., Amaya Y., Kawamoto S., Matsuda I., Mori M.: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 412–415
- [26] Hrabak A., Bajor T., Temesi A., Meszaros G.: The inhibitory effect of nitrite, a stable product of nitric oxide (NO) formation, on arginase. *FEBS Lett.*, 1996; 390: 203–206
- [27] Hurwitz R., Kretschmer N.: Development of arginine-synthesizing enzymes in mouse intestine. *Am. J. Physiol.*, 1986; 251: G103–G110
- [28] Jenkinson C.P., Grody W.W., Cederbaum S.D.: Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.*, 1996; 114: 107–132
- [29] Jenkinson C.P., Grigor M.R.: Rat mammary arginase: isolation and characterization. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 1994; 51: 156–165
- [30] Kanyo Z.F., Chen C.Y., Daghigh F., Ash D.E., Christianson D.W.: Crystallization and oligomeric structure of rat liver arginase. *J. Mol. Biol.*, 1992; 224: 1175–1177
- [31] Kanyo Z.F., Scolnick L.R., Ash D.E., Christianson D.W.: Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature*, 1996; 383: 554–557
- [32] Khangulov S.V., Sossong T.M., Ash D.E., Dismukes G.C.: L-arginine binding to liver arginase requires proton transfer to gateway residue His141 and coordination of the guanidinium group to the dimanganese (II,II) center. *Biochemistry*, 1998; 37: 8539–8550
- [33] Kim N.N., Cox J.D., Baggio R.F., Emig F.A., Mistry S.K., Harper S.L., Speicher D.W., Morris S.M., Ash D.E., Traish A., Christianson D.W.: Probing erectile function: S-(2-boronoethyl)-L-cysteine binds to arginase as a transition state analogue and enhances smooth muscle relaxation in human penile corpus cavernosum. *Biochemistry*, 2001; 40: 2678–2688
- [34] Kim P.S., Iyer R.K., Lu K.V., Yu H., Karimi A., Kern R.M., Tai D.K., Cederbaum S.D., Grody W.W.: Expression of the liver form of arginase in erythrocytes. *Mol. Genet. Metab.*, 2002; 76: 100–110
- [35] Koshiyama Y., Gotoh T., Miyataka K., Kobayashi T., Negi A., Mori M.: Expression and localization of enzymes of arginine metabolism in the rat eye. *Curr. Eye Res.*, 2000; 20: 313–321
- [36] Kossel A., Dakin H.D.: Über die Arginase. *Z. Physiol. Chem.*, 1904; 41: 321–331
- [37] Krebs H.A.: The discovery of the ornithine cycle of urea synthesis. *Trends Biochem. Sci.*, 1928; 7: 76–78
- [38] Lavulo L.T., Sossong T.M., Brigham-Burke M.R., Doyle M.L., Cox J.D., Christianson D.W., Ash D.E.: Subunit-subunit interactions in trimeric arginase. Generation of active monomers by mutation of a single amino acid. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 14242–14248
- [39] Levillain O., Balvay S., Peyrol S.: Mitochondrial expression of arginase II in male and female rat inner medullary collecting ducts. *J. Histochem. Cytochem.*, 2005; 53: 533–541
- [40] Lexander H., Franzen B., Hirschberg D., Becker S., Hellstrom M., Bergman T., Jornvall H., Auer G., Egevad L.: Differential protein expression in anatomical zones of the prostate. *Proteomics*, 2005; 5: 2570–2576
- [41] Lopez V., Alarcon R., Orellana M.S., Enriquez P., Uribe E., Martinez J., Carvajal N.: Insights into the interaction of human arginase II with substrate and manganese ions by site-directed mutagenesis and kinetic studies. Alteration of substrate specificity by replacement of Asn149 with Asp. *FEBS J.*, 2005; 272: 4540–4548
- [42] Mora A., del Ara Rangel M., Fuentes J.M., Soler G., Centeno F.: Implications of the S-shaped domain in quaternary structure of human arginase. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1476: 181–190
- [43] Mori M., Gotoh T.: Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 275: 715–719
- [44] Morris S.M., Bhamidipati D., Kepka-Lenhart D.: Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene*, 1997; 193: 157–161
- [45] Mouillé B., Morel E., Robert V., Guihot-Joubrel G., Blachier F.: Metabolic capacity for L-citrulline synthesis from ammonia in rat isolated colonocytes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1999; 1427: 401–407
- [46] Mouille B., Robert V., Blechier F.: Adaptive increase of ornithine production and decrease of ammonia metabolism in rat colonocytes after hyperproteic diet ingestion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2004; 287: G344–G351
- [47] Nakamura H., Saheki T., Nakagawa S.: Differential cellular localization of enzymes of L-arginine metabolism in the rat brain. *Brain Res.*, 1990; 530: 108–112
- [48] Nikolic J., Bjelakovic G., Stojanovic I.: Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. *Mol. Cell. Biochem.*, 2003; 244: 125–128
- [49] Ochoa J.B., Bernard A.C., Mistry S.K., Morris S.M., Figert P.L., Maley M.E., Tsuei B.J., Boulanger B.R., Kearney P.A.: Trauma increases extrahepatic arginase activity. *Surgery*, 2000; 127: 419–426
- [50] Perozich J., Hempel J., Morris S.M.Jr.: Role of conserved residues in the arginase family. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1382: 23–37
- [51] Poremska Z.: Different species of arginase in animal tissues. *Enzyme*, 1973; 15: 198–209
- [52] Ratner S.: A radiochemical assay for argininosuccinate synthetase with [U-14C]aspartate. *Anal. Biochem.*, 1983; 135: 479–488



- [53] Reisser D., Onier-Cherix N., Jeannin J.F.: Arginase activity is inhibited by L-NAME, both *in vitro* and *in vivo*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2002; 17: 267–270
- [54] Rosenfeld J.L., Dutta S.P., Chheda G.B., Tritsch G.L.: Purine and pyrimidine inhibitors of arginase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975; 410: 164–166
- [55] Ryall J., Nguyen M., Bendayan M., Shore G.C.: Expression of nuclear genes encoding the urea cycle enzymes, carbamoyl-phosphate synthetase I and ornithine carbamoyl transferase, in rat liver and intestinal mucosa. *Eur. J. Biochem.*, 1985; 152: 287–292
- [56] Sonoki T., Nagasaki A., Gotoh T., Takiguchi M., Takeya M., Matsuzaki H., Mori M.: Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues *in vivo* by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 3689–3693
- [57] Sparkes R.S., Dizikes G.J., Klisak I., Grody W.W., Mohandas T., Heinzmann C., Zollman S., Lusic A.J., Cederbaum S.D.: The gene for human liver arginase (ARG1) is assigned to chromosome band 6q23. *Am. J. Hum. Genet.*, 1986; 39: 186–193
- [58] Spector E.B., Rice S.C.H., Cederbaum S.D.: Evidence for two genes encoding human arginase. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.*, 1980; 32: 55A
- [59] Stickings P., Mistry S.K., Boucher J.L., Morris S.M., Cunningham J.M.: Arginase expression and modulation of IL-1 $\beta$ -induced nitric oxide generation in rat and human islets of Langerhans. *Nitric Oxide*, 2002; 7: 289–296
- [60] Ścibior D., Czczot H.: Arginina- metabolizm i funkcje w organizmie człowieka. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 321–332
- [61] Takiguchi M., Haraguchi Y., Mori M.: Human liver-type arginase gene: structure of the gene and analysis of the promoter region. *Nucleic Acids Res.*, 1988; 16: 8789–8802
- [62] Terada K., Ohtsuka K., Imamoto N., Yoneda Y., Mori M.: Role of heat shock cognate 70 protein in import of ornithine transcarbamylase precursor into mammalian mitochondria. *Mol. Cell. Biol.*, 1995; 15: 3708–3713
- [63] Tormanen C.D.: Allosteric inhibition of rat liver and kidney arginase by copper and mercury ions. *J. Enzyme Inhib.*, 2001; 16: 443–449
- [64] Tormanen C.D.: Inhibition of rat liver and kidney arginase by cadmium ion. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2006; 21: 119–123
- [65] Tormanen C.D.: Substrate inhibition of rat liver and kidney arginase with fluoride. *J. Inorg. Biochem.*, 2003; 93: 243–246
- [66] Vockley J.G., Goodman B.K., Tabor D.E., Kern R.M., Jenkinson C.P., Grody W.W., Cederbaum S.D.: Loss of function mutations in conserved regions of the human arginase I gene. *Biochem. Mol. Med.*, 1996; 59: 44–51
- [67] Vockley J.G., Jenkinson C.P., Shukla H., Kern R.M., Grody W.W., Cederbaum S.D.: Cloning and characterization of the human type II arginase gene. *Genomics*, 1996; 38: 118–123
- [68] Wraight C., Lingelbach K., Hoogenraad N.: Comparison of ornithine transcarbamylase from rat liver and intestine. Evidence for differential regulation of enzyme levels. *Eur. J. Biochem.*, 1985; 153: 239–242
- [69] Wu G.: Urea synthesis in enterocytes of developing pigs. *Biochem. J.*, 1995; 312: 717–723
- [70] Wu G., Knabe D.A., Flynn N.E.: Synthesis of citrulline from glutamine in pig enterocytes. *Biochem. J.*, 1994; 299: 115–121
- [71] Wu G., Meininger C.J., Knabe D.A., Bazer F.W., Rhoads J.M.: Arginine nutrition in development, health and disease. Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2000; 3: 59–66
- [72] Yasuda N., Moriwaki K., Furuyama S.: Distribution and properties of arginase in the salivary glands of four species of laboratory mammals. *J. Comp. Physiol. [B]*, 2004; 174: 237–242
- [73] Yu H., Iyer R.K., Kern R.M., Rodriguez W.I., Grody W.W., Cederbaum S.D.: Expression of arginase isozymes in mouse brain. *J. Neurosci. Res.*, 2001; 66: 406–422
- [74] Yu H., Yoo P.K., Aguirre C.C., Tsoa R.W., Kern R.M., Grody W.W., Cederbaum S.D., Iyer R.K.: Widespread expression of arginase I in mouse tissues. Biochemical and physiological implications. *J. Histochem. Cytochem.* 2003; 51: 1151–1160