

Prolidaz; Önemi ve güncel yaklaşımlar

Dr. Ahmet Çelik

Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

I. Kahramanmaraş Biyokimya Günleri
7-9 Kasım 2013
Kahramanmaraş

Başlıklar

- Tarihçe ,Tanım ve genel özellikleri
- Klinik önemi
- Ölçüm yöntemi
- Güncel yaklaşımlar

Tarihçe

- Bergman ve Fruton, bilinen dipeptidazlardan farklı olarak glisin-prolini hidrolize eden bir enzimi 1937 yılında tanımladılar.
- Bu enzim Prolidaz olarak isimlendirildi ve birçok hayvan dokusunda varlığı gösterildi.

Tanım

- Prolidaz,
- karboksil terminal pozisyonda prolin veya hidroksiprolin içeren imidodipeptidlerin ve imidotripeptidlerin (X-Pro, X-Hidroksiprolin) peptid bağıını hidrolize eder.
- Manganeze bağımlı, metalloproteinazdır.
- Serbest prolin temin eder.

- Prolidaz, hücre içinde, prokollojen, kollojen ve prolin veya hidroksiprolin içeren proteinlerin katabolizmasında rol oynar.

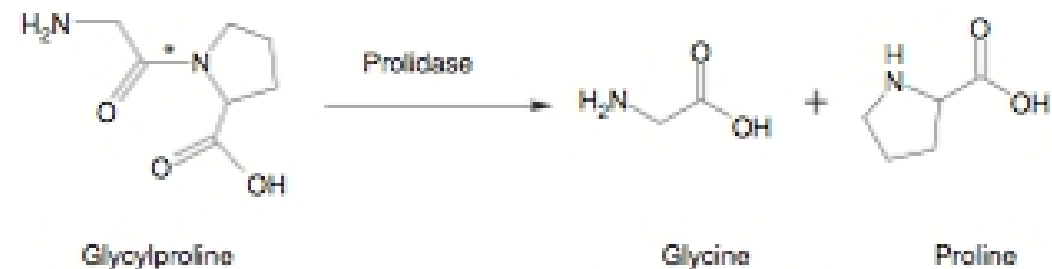
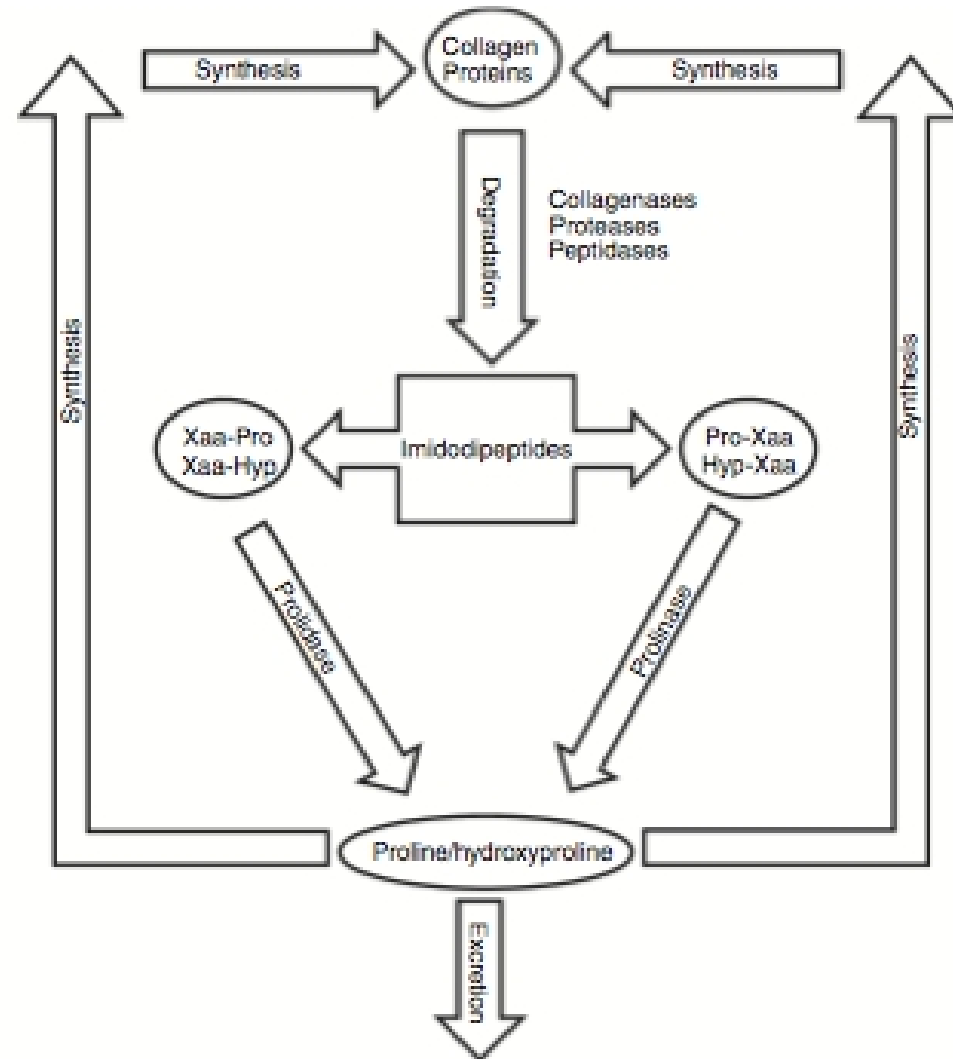


Figure 2 The prolidase reaction involving the dipeptide Gly-Pro in which the amide bond is highlighted.

- Prolin yeniden döngüye girer ve yeni protein sentezinde kullanılırken hidroksiprolin idrarla atılmaktadır.



Klinik önemi

- Kollojen özellikle bağ dokusunda olmak üzere çoğu dokuda bol miktarda bulunur.
- Prolidaz, Kollajen metabolizmasında, yeni matriks oluşumunda ve hücre büyümesinde rol alır.
- Kollajen yapısındaki amino asitlerin çoğu prolin ve hidroksiprolinden oluşur.
- Kollajen esansiyel prolin rezervuarıdır.
- Hem prolidazın hem de kollajenin geniş doku dağılımı, bu enzimin birçok klinik durumla ilişkili olduğunu düşündürmüştür.

Ölçüm Yöntemi

- Prolidaz enzim aktivitesi ölçümü yöntemi için en sık olarak **Chinard** tarafından tanımlanan **Ninhidrin rxn** kullanılmaktadır.
- Bu rxn daha sonradan **Myara** ve ark. tarafından bazı değişiklikler yapılarak optimize edilmiştir.



PHOTOMETRIC ESTIMATION OF PROLINE AND ORNITHINE

By FRANCIS P. CHINARD*

*(From the Departments of Physiological Chemistry and of Medicine, School of Medicine,
The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland)*

(Received for publication, June 6, 1952)

Some years ago Grassmann and von Arnim (1, 2) described in detail a red reaction product of proline and ninhydrin formed at pH 7; it was suggested that this reaction product might be of use as a measure of the concentration of proline in biological materials. Hydroxyproline gave a similar though not identical reaction product. More recently, Van Slyke *et al.* (3), in studies of the ninhydrin method for the gasometric estimation of free amino acids, reported that, at a pH of approximately 1.0, a red water-insoluble reaction product is formed by proline with ninhydrin; lysine forms a black product and ornithine a red one. No significant amounts of color are formed with most other amino acids at a pH near 1.0.

- Bu yöntemde,
- Enzim, MnCl_2 ile 2 saat pre-inkübasyon yapıp aktive edilir (1. aşama),
- Gly-Pro substratı ile ($K_m = 2.9 \text{ mM}$) 30 dakika inkübe edilir (2. aşama),
- Açığa çıkan prolin miktarı ölçülerek (Ninhidrin rxn) enzim aktivitesi hesaplanır (3. aşama).

- Prolidaz aktivitesi,
- serum, plazma, eritrosit ve lökositlerde, amniyon sıvısında
- intestinal mukoza, böbrek, karaciğer, beyin, kalp, uterus ve timus gibi çeşitli dokularda gösterilmiştir.



Yöntem Bildirisi [Technical Report]

Yayın tarihi 29 Mayıs, 2007 © TurkJBiochem.com

[Published online 29 May, 2007]

Prolidazın Mutlak Aktivitesini Değerlendirmede Fotometrik Enzim Aktivitesi Ölçüm Metodunun Optimizasyonu

[Optimization of the Photometric Enzyme Activity Assay For Evaluating Real Activity of Prolidase]

Ömer Özcan,
Mustafa Gültepe,
Osman Metin İpçioğlu,
Burhanettin Bolat,
Hüseyin Kayadibi

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Biyokimya ve
Klinik Biyokimya Bölümü, Üsküdar, İSTANBUL

ÖZET

Prolidaz, prolin içeren dipeptidlerin (X-Pro) peptid bağıını koparan ve kollajen metabolizmasında yer alan önemli bir enzimdir. Prolidaz aktivitesi genellikle prolidaz tarafından açığa çıkarılan prolinin miktarının fotometrik olarak ölçüldüğü yöntemlerle belirlenir. Çalışmada amacımız, bu prolidaz aktivitesi ölçüm yönteminin mutlak aktiviteyi yansıtır yansıtmadığını araştırmaktır. Yöntemdeki mangan iyonlarıyla yapılan aktivasyon işlemi, proteinlerin çöktürülmesi ve okuma basamakları incelenmiştir. Analiz içi ve analizler arası % varyasyon katsayısı % 10'un üzerinde olan yöntem ile bir test için 6-8 saat zaman harcanmaktadır. Mangan içeren aktive edici reaktif inkübasyon süresince stabil kalmamaktadır ve derişimi enzim aktivasyonu için uygun değildir. Bu nedenlerle, fotometrik yöntemin, man-

I. Pre-inkübasyon aşamasının optimizasyonu

Tris tamponun pH'ı düşürülerek MnCl_2 'nin çökmediği ve preinkübasyon aşamasının 30 dk'ya düşürülebileceği görülmüş

2. Çöktürme basamağının ortadan kaldırılması

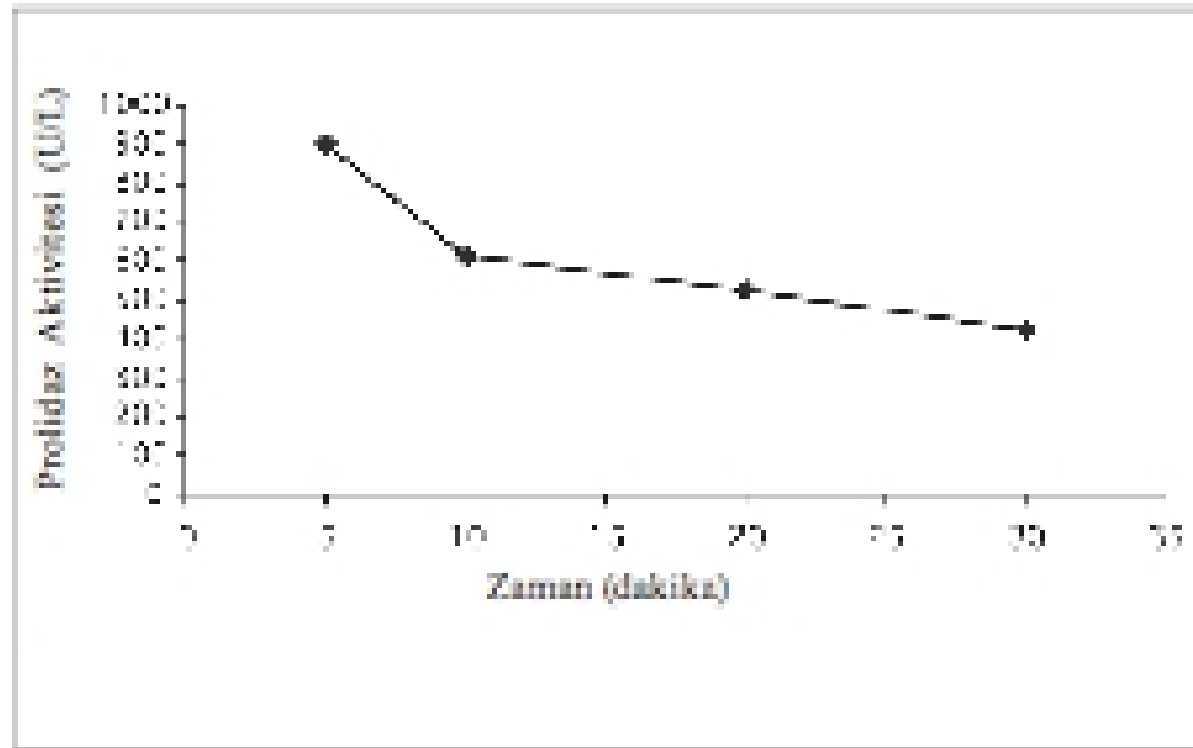
TCA eklenerek sağlanan asit ile enzimim inaktivasyon aşaması Asetik asit ile yapılmıştır.

Aynı pH'daki Ninhidrin eklenerek bu aşama tek tüpte halledilmiştir.

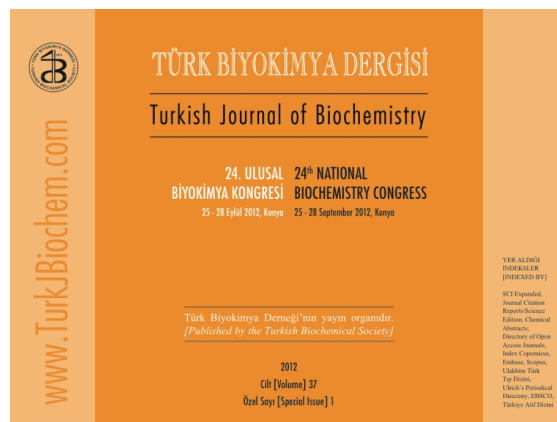
- Fizyolojik durumda ortamda var olan ve açığa çıkan prolinin enzimi inhibe ettiği bilinmektedir (Mock ve ark. 1990).

Analiz ortamındaki Prolinin inhibisyonunun incelenmesi

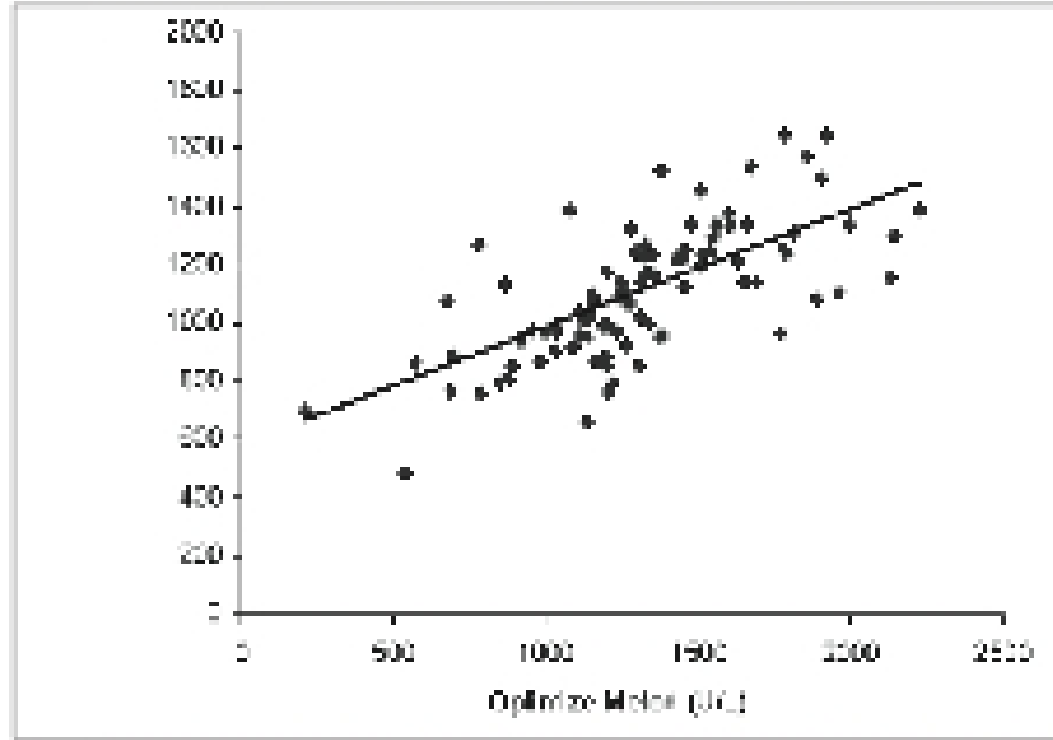
- Enzim tarafından Gly-Pro substratının parçalanması ile açığa çıkan prolinin inhibitör etkisini anlamak için serum havuzu örneğinde prolidaz enzim aktivitesi 5-30 dk. aralığındaki rxn sürelerine göre ölçülmüştür.
- Süre azaldıkça aktivitenin azalması açığa çıkan prolinin aktivitede düşüşe neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 5. Prolidaz aktivitesinin tepkime süresine göre değişimi



- **Metod karşılaştırması**
- modifiye metodun klasik metoda göre SPA'ni anlamlı olarak yüksek ölçtüğü (ortamdaki prolinin inhibitör etkisi)
- Metodlar arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu



Şekil 6. Klasik p-nitrofenol metodu ile modifiye (optimize) p-nitrofenol metodunun karşılaştırılması ($r=0.544$ ve $p<0.001$)



Turk J Biochem, 2007; 32 (1) ; 12 –16.

:

Prolidaz eksikliği

- Oldukça nadir karşılaşılan otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalıktır.
- Hastalığın semptomları çok değişken olup
- Kronik tekrarlayan enfeksiyonlar, mental retardasyon, splenomegali ve cilt lezyonları görülebilmektedir

Tanı:
Eritrosit, lökosit
ve deri kültür
fibroblastlarında
prolidaz
aktivitesinin
ölçümü ile konur

Güncel yaklaşımlar

- Prolidaz aktivitesindeki sapmalar, kanserlerde ve fibrozis ile karakterize birçok durumda yararlı bir belirteç olabilir.
- Prolin prodrug kullanımı (Anti-kanser ted.)
- topikal ve parenteral uygulama (PD)
- Proflaktik ve post-exposure tedavi (Org. fosf. Zeh)
- Rekombinant mikrobial Prolidaz kullanımı ile ilgili çalışmalar

REVIEW ARTICLE

Prolidase function in proline metabolism and its medical and biotechnological applications

R.L. Kitchener and A.M. Grunden

Department of Microbiology, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA

Keywords

biotechnology, degradation, diagnosis, enzymes, peptides.

Correspondence

Amy M. Grunden, Department of Microbiology, North Carolina State University, 4550A Thomas Hall, Box 7615, Raleigh, NC 27695, USA. E-mail: amgrunde@ncsu.edu

2012/0177: received 30 January 2012, revised 2 April 2012 and accepted 10 April 2012

doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05310.x

Summary

Prolidase is a multifunctional enzyme that possesses the unique ability to degrade imidodipeptides in which a proline or hydroxyproline residue is located at the C-terminal end. Prolidases have been isolated from archaea and bacteria, where they are thought to participate in proline recycling. In mammalian species, prolidases are found in the cytoplasm and function primarily to liberate proline in the final stage of protein catabolism, particularly during the biosynthesis and degradation of collagen. Collagen comprises nearly one-third of the total protein in the body, and it is essential in maintaining tissue structure and integrity. Prolidase deficiency (PD), a rare autosomal recessive disorder in which mutations in the *PEPD* gene affect prolidase functionality, tends to have serious and sometimes life-threatening clinical symptoms. Recombinant prolidases have many applications and have been investigated not only as a

Artmış bulunan çalışmalar

- Bipolar Disorder
 - Meme Ca, Akciğer Ca,
 - Endometrial Ca
 - Keloid formasyonu,
Melanoma
 - Erektile disfonksiyon
 - Talassemia major
 - H. Pylori
 - Kr. karaciğer Hst
 - Hipertansiyon
- KOAH, Asthma
Dilate
Kardiyomiyopati
Osteoartrit
Kronik Pankreatit



Teşekkürler....