

**NADPH-SİTOKROM P450 REDÜKTAZ ENZİMİNİN  
VAN GÖLÜ BALIĞI KARACİĞER  
MİKROZOMLARINDAN SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASAL  
MADDELERİN ENZİM AKTİVİTESİ  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Müslüm KUZU**

**Doktora Tezi  
Kimya Anabilim Dalı  
Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ  
2012  
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

NADPH-SİTOKROM P450 REDÜKTAZ ENZİMİNİN VAN GÖLÜ  
BALIĞI KARACİĞER MİKROZOMLARINDAN SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASAL MADDELERİN  
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Müslüm KUZU

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM  
2012

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TEZ ONAY FORMU**

**NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enziminin Van Gölü Bahğı Karaciğer Mikrozomlarından Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasal Maddelerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ danışmanlığında, Müslüm KUZU tarafından hazırlanan bu çalışma 16/12/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu** (..../....) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

İmza :

Üye : Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Doktora Tezi

NADPH-SİTOKROM P450 REDÜKTAZ ENZİMİNİN VAN GÖLÜ BALIĞI  
KARACİĞER MİKROZOMLARINDAN SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE BAZI KİMYASAL MADDELERİN ENZİM AKTİVİTESİ  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Müslüm KUZU

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

Bu çalışmada Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarından NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisinin iki basamaklı uygulanması ile 0,20463 EÜ x mg<sup>-1</sup> spesifik aktivitesiyle %54,4 verimle 38 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflığını kontrol etmek ve monomer molekül kütleini belirlemek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve tek bant gözlemlendi. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için monomer molekül kütleini 70 kDa olarak belirlendi. Enzim için yapılan karakterizasyon çalışmalarında optimum iyonik şiddet, optimum pH, optimum sıcaklık, stabil pH, E<sub>a</sub>, ve Q<sub>10</sub> değerleri belirlendi. Enzimin sitokrom c ve NADPH substratları için K<sub>M</sub> ile V<sub>max</sub> değerleri belirlendi. Ayrıca enzim için k<sub>cat</sub> ve V<sub>0</sub> değerleri de hesaplandı. Enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin, antibiyotiklerin ve akvaryum balıkçılığında kullanılan ilaçların etkileri araştırıldı. İnhibisyon etkisi gösteren metallerin IC<sub>50</sub> değerleri ve K<sub>i</sub> sabitleri hesaplandı.

**2012, 125 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** NADPH-sitokrom P450 redüktaz, Van Gölü balığı, inhibisyon, metal, antibiyotik

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE FROM VAN LAKE FISH LIVER MICROSOMES AND INVESTIGATION OF SOME CHEMICAL SUBSTANCES' EFFECTS ON THE ENZYME ACTIVITY

Müslüm KUZU

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Prof.Dr.Mehmet ÇİFTÇİ

In this study, NADPH-cytochrome P450 reductase was purified from Van Lake fish liver microsomes by first and second DEAE-cellulose column chromatograph with 0,20463 EUxmg<sup>-1</sup> of specific activities, 54,4% of purification yield and 38 of purification folds. Purity of the enzyme was identified, and monomer molecular weight of the enzyme was determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. SDS-PAGE results showed a single band and the molecular weight of NADPH-cytochrome P450 reductase was determined as 70 kDa. In addition to these, optimum ionic strength, optimum pH, optimum temperature, stable pH, E<sub>a</sub>, and Q<sub>10</sub> values were determined for enzyme in performed kinetic studies. K<sub>M</sub> and V<sub>max</sub> were determined for NADPH and cytochrome c. Additionally, k<sub>cat</sub> and V<sub>0</sub> values were calculated for enzyme. Effects of some metals ions, antibiotics and some drugs used in the aquarium fishery on the activity of the enzyme were investigated. IC<sub>50</sub> values and K<sub>i</sub> values of metals showing the inhibition effect were calculated.

**2012, 125 pages**

**Keywords :** NADPH-cytochrome P450 reductase, Van Lake fish, inhibition, metal, antibiotic

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunmuş olduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmalarım esnasında bilgi, tecrübesi ve yönlendirici telkinleri ile benden yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sürecinde kıymetli tavsiyeleri ve yönlendirmeleri ile yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVLİOĞLU ve Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca bölüm imkanlarını kullanımına sunan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Abdullah MENZEK'e, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e ayrıca teşekkürü bir borç bilirim. Benden yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım Sayın Ebru AKKEMİK'e ve biyokimya araştırma laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma içten şükranlarımı sunarım.

Doktora öğrenimim boyunca benden destek, sabır ve anlayışını esirgemeyen eşime, hayatımın bütün dönemlerinde aldığım kararlarda arkamda duran ve desteğini sunan aileme, çalışmam sürecinde desteklerini esirgemeyen eşimin ailesine gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Müslüm KUZU

Aralık 2012

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET .....                                                                                                        | i    |
| ABSTRACT .....                                                                                                    | ii   |
| TEŞEKKÜR .....                                                                                                    | iii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                                              | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                             | ix   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                                           | xii  |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....                                                                                             | 1    |
| 1.1. Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemi .....                                                              | 4    |
| 1.2. Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemi ve NADPH-sitokrom P450<br>Redüktaz .....                           | 9    |
| 1.3. NADPH-sitokrom P450 Redüktaz Enzimi Genel Özellikleri .....                                                  | 13   |
| 1.4. CPR Enziminin Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemi Dışında Görev<br>Aldığı Diğer Metabolik Yollar ..... | 19   |
| 1.5. Amaç .....                                                                                                   | 22   |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....                                                                                   | 23   |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....                                                                                | 37   |
| 3.1. Materyal .....                                                                                               | 37   |
| 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....                                                                         | 37   |
| 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar .....                                                                        | 37   |
| 3.1.3. Çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları .....                                                 | 38   |
| 3.2. Yöntem .....                                                                                                 | 45   |
| 3.2.1. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal pelet çözeltisinin hazırlanması .....                                 | 45   |
| 3.2.2. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz<br>enziminin saflaştırılması .....       | 46   |
| 3.2.2.a. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarının çözülmesi .....                                                | 47   |
| 3.2.2.b. DEAE kolonunun hazırlanması .....                                                                        | 48   |
| 3.2.2.c. Birinci DEAE-selüloz kolon kromatografisi .....                                                          | 49   |
| 3.2.2.d. İkinci DEAE-selüloz kolon kromatografisi .....                                                           | 49   |

|                                                                                                                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.3. Van Gölü Balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin karakterizasyon çalışmaları .....                                                                             | 50        |
| 3.2.3.a. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum pH'nın bulunmasına yönelik çalışmalar .....                                                       | 50        |
| 3.2.3.b. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar .....                                           | 50        |
| 3.2.3.c. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar .....                                                | 50        |
| 3.2.3.d. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışmalar .....                                                         | 51        |
| 3.2.3.e. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) ve $Q_{10}$ değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar .....             | 51        |
| 3.2.3.f. NADPH ve sitokrom c substratları İçin $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar .....                                                                              | 52        |
| 3.2.3.g. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz enziminin sitokrom c substratı için $k_{cat}$ ve özgülük sabitinin ( $V_0$ ) bulunmasına yönelik çalışmalar .....     | 52        |
| 3.2.3.h. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin tabii molekül kütesinin tayini ..... | 53        |
| 3.2.4. Van Gölü balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine bazı ilaç ve metal iyonlarının <i>in vitro</i> etkilerinin belirlenmesi .....    | 54        |
| 3.3. Analitik Metotlar .....                                                                                                                                                                     | 55        |
| 3.3.1. Protein tayini .....                                                                                                                                                                      | 55        |
| 3.3.1.a. Kalitatif protein tayini .....                                                                                                                                                          | 55        |
| 3.3.1.b. Lowry yöntemi ile protein tayini .....                                                                                                                                                  | 55        |
| 3.3.2. NADPH-sitokrom P450 redüktazın aktivite tayini .....                                                                                                                                      | 56        |
| 3.3.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi .....                                                                                                                                                 | 57        |
| 3.3.3.a. Yığma ve ayırma jellerinin hazırlanması .....                                                                                                                                           | 59        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>                                                                                                                                                              | <b>60</b> |

|                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik .....                                                                                                                                                 | 60 |
| 4.2. Van Gölü Balığı Karaciğerinden NADPH-sitokrom P450 Redüktaz Enziminin 1. ve 2. DEAE İyon Değişim Kromatografisi İle Saflaştırılma Sonuçları .....                                                               | 60 |
| 4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrol Sonuçları ....                                                                                                                                 | 61 |
| 4.4. Van Gölü Balığı Karaciğerinden Saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 Redüktaz Enzimi Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar .....                                                                          | 62 |
| 4.4.1. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesi tayinine yönelik sonuçlar ....                                                                                                                              | 62 |
| 4.4.2. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin SDS-PAGE ile molekül kütlesinin belirlenmesine yönelik sonuçları                                                                  | 63 |
| 4.4.3. Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum pH çalışma sonuçları.....                                                                                                         | 64 |
| 4.4.4. Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar .....                                                                           | 65 |
| 4.4.5. Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları.....                                                                            | 67 |
| 4.4.6. Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları.....                                                                                   | 68 |
| 4.4.7. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) ve $Q_{10}$ değerlerinin belirlenmesi .....                                   | 69 |
| 4.4.8. Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin NADPH substratı için $K_M$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve özgülük sabiti ( $V_0$ ) değerlerinin hesaplanması .....                              | 70 |
| 4.4.9. Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c substratı için $K_M$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve özgülük sabiti ( $V_0$ ) değerlerinin hesaplanması .....                         | 71 |
| 4.5. Bazı İlaç ve Metal İyonlarının Van Gölü Balığı Karaciğerinden Saflaştırılan NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi Çalışmalarına Ait Sonuçlar .....                     | 73 |
| 4.5.1. Van Gölü balığı karaciğerinden saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine gentamisin, oksitetrasiklin, kanamisin, benzalkonium klorid ve akriflavin ilaçlarının <i>in vitro</i> etkileri ..... | 73 |

|                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.5.2. Van Gölü balığı karaciğerinden saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının <i>in vitro</i> etkileri ..... | 78  |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....                                                                                                                     | 95  |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                                                       | 114 |
| ÖZ GEÇMİŞ .....                                                                                                                                       | 126 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                   |                                                          |
|-------------------|----------------------------------------------------------|
| Å                 | : Angstrom                                               |
| ADP               | : Adenozin difosfat                                      |
| cDNA              | : Komplementer deoksiribonükleik asit                    |
| CPR               | : NADPH-sitokrom P450 redüktaz                           |
| CYP               | : Sitokrom P450 türleri                                  |
| DEAE              | : Dietilaminoetil                                        |
| DNA               | : Deoksiribonükleik asit                                 |
| E.C.              | : Enzim kod numarası                                     |
| E.Ü.              | : Enzim Ünitesi                                          |
| ER                | : Endoplazmik retikulum                                  |
| FAD               | : Flavin adenin dinükleotid                              |
| FMN               | : Flavin mononükleotid                                   |
| hnRNA             | : Heteronükleer ribonükleik asit                         |
| I                 | : İnhibitör                                              |
| IC <sub>50</sub>  | : Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu  |
| K <sub>i</sub>    | : Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti            |
| K <sub>M</sub>    | : Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit              |
| mRNA              | : Haberci ribonükleik asit                               |
| NADP <sup>+</sup> | : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat                  |
| NADPH             | : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat indirgenmiş form |
| QR                | : Kinon redüktaz                                         |
| ROS               | : Reaktif oksijen türleri                                |
| SDS-PAGE          | : Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi  |
| SOD               | : Süperoksit dismutaz                                    |
| TCDD              | : 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin                    |
| Tris              | : Trihidroksimetil amino metan                           |
| V                 | : Hacim                                                  |
| V <sub>max</sub>  | : Maksimum hız                                           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. CYP'ler tarafından reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi .....                                                                                                             | 6  |
| Şekil 1.2. Monooksijenaz sisteminde redüktaz enziminin rolü.....                                                                                                                         | 10 |
| Şekil 1.3. Temel P450 katalitik devri.....                                                                                                                                               | 11 |
| Şekil 1.4. CPR enziminin elektron sağladığı sistemler .....                                                                                                                              | 14 |
| Şekil 1.5. Mikrozomal sitokrom P450 sisteminde elektron akışı.....                                                                                                                       | 18 |
| Şekil 1.6. Endoplazmik retikulumda elektron zincirinin fizyolojik fonksiyonu ve<br>elektron transferi .....                                                                              | 21 |
| Şekil 2.1. Tabii redüktazın membranlara bağlanma şekilleri ile alakalı iki muhtemel<br>alternatif konformasyon .....                                                                     | 25 |
| Şekil 2.2. (A) CPR enzimi üç boyutlu yapısı. ve (B) CPR proteinin kofaktör<br>tanımda görevli bölgelerini gösteren topoloji diyagramı .....                                              | 31 |
| Şekil 2.3. Konformasyonal denge.. .....                                                                                                                                                  | 33 |
| Şekil 4.1. Lowry metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart<br>grafik .....                                                                                       | 60 |
| Şekil 4.2. SDS-PAGE fotoğrafı. 5, 6, 7 nolu kuyular Van Gölü balığı karaciğerinden<br>saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi, 2 ve 3 nolu kuyular Standart<br>proteinler..... | 62 |
| Şekil 4.3. Jel filtrasyon kolonundan alınan standart proteinlerin tüp sayısına karşılık<br>280 nm'deki absorbans değerleri .....                                                         | 63 |
| Şekil 4.4. Jel filtrasyon sonucu çizilen log MK-K <sub>av</sub> grafiği.....                                                                                                             | 63 |
| Şekil 4.5. Saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için logMK/R <sub>f</sub> rafiği<br>.....                                                                                   | 64 |
| Şekil 4.6. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için aktivite-pH grafiği .....                                                                                                            | 65 |
| Şekil 4.7. pH'sı 8,8 olan fosfat tamponu kullanılarak NADPH-sitokrom P450<br>redüktaz enzimi için aktivite-[K-fosfat] mM grafiği.....                                                    | 66 |
| Şekil 4.8. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için sıcaklık-aktivite grafiği .....                                                                                                      | 67 |
| Şekil 4.9. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi stabil pH için aktivite-zaman<br>grafiki .....                                                                                            | 68 |

|                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.10.</b> Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği ..... | 69 |
| <b>Şekil 4.11.</b> NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin NADPH için Lineweaver-Burk grafiği .....                                                                        | 71 |
| <b>Şekil 4.12.</b> NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c için Lineweaver-Burk grafiği .....                                                                   | 72 |
| <b>Şekil 4.13.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine kanamisin ilacı etkisinin % aktivite-[I] grafiği.....                            | 74 |
| <b>Şekil 4.14.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine oksitetrasiklin ilacı etkisinin % aktivite-[I] grafiği .....                     | 75 |
| <b>Şekil 4.15.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine gentamisin ilacı etkisinin % aktivite-[I] grafiği.....                           | 76 |
| <b>Şekil 4.16.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine benzalkonium klorid ilacı etkisinin % aktivite-[I] grafiği.....                  | 77 |
| <b>Şekil 4.17.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine akriflavin ilacı etkisinin % aktivite-[I] grafiği.....                           | 78 |
| <b>Şekil 4.18.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine $Pb^{+2}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği .....                           | 79 |
| <b>Şekil 4.19.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine $Fe^{+3}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği. ....                           | 80 |
| <b>Şekil 4.20.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine $Ni^{+2}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği. ....                           | 81 |
| <b>Şekil 4.21.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine $Cd^{+2}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği. ....                           | 82 |
| <b>Şekil 4.22.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine $Zn^{+2}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği.....                            | 83 |
| <b>Şekil 4.23.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine $Tl^{+}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği.....                             | 84 |
| <b>Şekil 4.24.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine $Co^{+2}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği. ....                           | 85 |

|                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.25.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi<br>üzerine $\text{Ca}^{+2}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği.....                                         | 86 |
| <b>Şekil 4.26.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi<br>üzerine $\text{As}^{+5}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği.....                                         | 87 |
| <b>Şekil 4.27.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi<br>üzerine $\text{Mn}^{+2}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği .....                                        | 88 |
| <b>Şekil 4.28.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi<br>üzerine $\text{Al}^{+3}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği .....                                        | 89 |
| <b>Şekil 4.29.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi<br>üzerine $\text{Hg}^{+2}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği .....                                        | 90 |
| <b>Şekil 4.30.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminde<br>$\text{Hg}^{+2}$ iyonu için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-<br>Burk grafiği. .... | 90 |
| <b>Şekil 4.31.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi<br>üzerine $\text{Ag}^{+}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği .....                                         | 91 |
| <b>Şekil 4.32.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminde<br>$\text{Ag}^{+}$ iyonu için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk<br>grafiği .....   | 92 |
| <b>Şekil 4.33.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi<br>üzerine $\text{Cu}^{+2}$ iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği .....                                        | 93 |
| <b>Şekil 4.34.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminde<br>$\text{Cu}^{+2}$ iyonu için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-<br>Burk grafiği ..... | 93 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 1.1.</b> Faz I ve II reaksiyonu enzimleri. ....                                                                                                                                                            | 3  |
| <b>Çizelge 3.1.</b> Van Gölü balığı tipik karaciğer mikrozomal sitokrom P450 çözeltisinin hazırlanışı.....                                                                                                            | 47 |
| <b>Çizelge 4.1.</b> Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimine ait 1. ve 2. DEAE iyon değişimi sonrası saflaştırma tablosu.....                                                                 | 61 |
| <b>Çizelge 4.2.</b> Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....                                                          | 64 |
| <b>Çizelge 4.3.</b> Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için fosfat tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....                     | 66 |
| <b>Çizelge 4.4.</b> Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık (°C)-aktivite ölçüm sonuçları çizelgesi ...                                                     | 67 |
| <b>Çizelge 4.5.</b> Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin stabil pH için zaman- aktivite ölçüm sonuçları çizelgesi .....                                                                  | 68 |
| <b>Çizelge 4.6.</b> Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum sıcaklık, $E_a$ ve $Q_{10}$ tayini sonuçları.....                                       | 70 |
| <b>Çizelge 4.7.</b> Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin NADPH için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin hesaplanması için ölçüm sonuçları çizelgesi .....                                    | 70 |
| <b>Çizelge 4.8.</b> Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin hesaplanması için ölçüm sonuçları çizelgesi .....                               | 72 |
| <b>Çizelge 4.9.</b> Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin NADPH ve sitokrom c substratları için hesaplanan $K_M$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve $V_0$ değerlerine ilişkin toplu sonuçlar..... | 72 |
| <b>Çizelge 4.10.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine kanamisinin etkisi .....                                                                                               | 73 |

|                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 4.11.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine oksitetrasiklin etkisi .....     | 74 |
| <b>Çizelge 4.12.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine gentamisin etkisi .....          | 75 |
| <b>Çizelge 4.13.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine benzalkonium klorid etkisi ..... | 76 |
| <b>Çizelge 4.14.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine akriflavin etkisi .....          | 77 |
| <b>Çizelge 4.15.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine $Pb^{+2}$ iyonunun etkisi .....  | 78 |
| <b>Çizelge 4.16.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine $Fe^{+3}$ iyonunun etkisi.....   | 79 |
| <b>Çizelge 4.17.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine $Ni^{+2}$ iyonunun etkisi.....   | 80 |
| <b>Çizelge 4.18.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine $Cd^{+2}$ iyonunun etkisi.....   | 81 |
| <b>Çizelge 4.19.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine $Zn^{+2}$ iyonunun etkisi .....  | 82 |
| <b>Çizelge 4.20.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine $Tl^{+}$ iyonunun etkisi .....   | 83 |
| <b>Çizelge 4.21.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine $Co^{+2}$ iyonunun etkisi.....   | 84 |
| <b>Çizelge 4.22.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine $Ca^{+2}$ iyonunun etkisi .....  | 85 |
| <b>Çizelge 4.23.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine $As^{+5}$ iyonunun etkisi .....  | 86 |
| <b>Çizelge 4.24.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine $Mn^{+2}$ iyonunun etkisi.....   | 87 |
| <b>Çizelge 4.25.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine $Al^{+3}$ iyonunun etkisi.....   | 88 |
| <b>Çizelge 4.26.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine $Hg^{+2}$ iyonunun etkisi.....   | 89 |

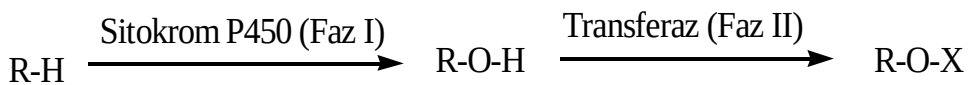
|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 4.27.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerinei $\text{Ag}^+$ iyonunun etkisi. ....                   | 91 |
| <b>Çizelge 4.28.</b> Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerinei $\text{Cu}^{+2}$ iyonunun etkisi.....                 | 92 |
| <b>Çizelge 4.29.</b> İlaçların ve metal iyonlarının Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine etkilerinin sonuçları ..... | 94 |

## 1. GİRİŞ

İnsan ve hayvan organizmaları yaşamları sürecinde birçok kimyasal maddenin zararlı etkilerine maruz kalmaktadırlar. Organizmanın normal işleyişi için gerekli olmayan bu yabancı kimyasal maddelere ksenobiyotik denir. Endüstri devrimi sonrasında kimyasal madde üretimi ve sayısal miktarında büyük artışlar olmuştur. Günümüzde yaklaşık olarak 5 000 000 kimyasal madde bilinmektedir ve bunların 70 000'i ev gereksinimleri, tarım, endüstri ve tıpta kullanıldığı bildirilmiştir (Vural 2005).

Hiçbir besleyici değeri olmayan bu kimyasal bileşikler solunum, beslenme ve absorpsiyon yoluyla canlı metabolizmalarına dahil olurlar. Yüksek organizasyonlu canlılarda bu kimyasalların metabolize edilmesi bakterilerden tamamıyla farklıdır. Bakteriler bu toksik maddeleri küçük grupların dönüşümleri vasıtasıyla potansiyel kullanışlı metabolitlere dönüştürebilen spesifik enzimlere sahipken hayvan organizmalarında bu maddelerin atılımını sağlayan sistemler gelişmiştir (Jakoby and Ziegler 1990).

Ksenobiyotiklerin kimyasal dönüşümü olarak tanımlanabilecek biyotransformasyon mekanizmaları Faz I ve Faz II reaksiyonları olmak üzere iki grupta toplanabilir. Lipofilik karakterdeki ksenobiyotikler Faz I reaksiyonları ile hidrofilik karakter kazanırken Faz II reaksiyonlarıyla konjugasyon ile organizmadan atılır ya da sentez reaksiyonlarına katılır. Faz I reaksiyonları yükseltgenme, indirgenme ve hidroliz olaylarını kapsarken Faz II reaksiyonları sentez ve konjugasyonu kapsar (Vural 2005). Faz II reaksiyonları sitokrom P450'ler tarafından üretilen karsinojenlerin inaktivasyonunu ve ilaçların eliminasyonunu sağlar. Faz I ve II enzimleri arasındaki denge bir kimyasalın metabolik kaderini belirler (Gonzalez and Yu 2006). Faz I ve II reaksiyonları sonucu bir kimyasalın metabolik akıbeti;



şeklinde özetlenebilir (Meunier *et al.* 2004).

Hayvansal dokularda bu ksenobiyotiklerin dönüşümünü sağlayan yaklaşık 30 enzim ailesi bulunmaktadır. Bu enzim aileleri marifetiyle ksenobiyotikler vücuttan daha çabuk atılabilir ya da farmakolojik olarak daha az aktif hale getirilebilir. Enzim ailelerinin benzer metabolik işlevlerinin yanı sıra ortak özellikleri, geniş bir substrat aralığının olması, lipofilik bileşik tercihi, vücudun büyük bölümünde bulunmalarıyla birlikte bazı noktalarında yoğunlaşmaları ve özellikle yüksek organizasyonlu canlılarda ksenobiyotiklere maruz kalma durumunda indüklenebilmeleridir (Jakoby and Ziegler 1990).

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyon reaksiyonlarını katalizleyen önemli enzimler karaciğerde bulunurken sınırlı miktarda akciğer, barsak ve böbrekte, daha az miktarlarda da deri, testis, plasenta ve adrenal bezde aktiftirler. Faz I reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerin önemli bir kısmı lipit ve proteinlerden oluşan, birçok hücrenin stoplazmasında ağ şeklinde bulunan bir membran olan endoplazmik retikulumda yerleşmişlerdir. Dolayısıyla membrana bağlı olan bu enzimler membranlara geçebilen lipofilik ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunu sağlar (Vural 2005).

Karaciğer dokusu homojenize edildiğinde tubuler endoplazmik retikulumun parçalanması sonucu oluşan membran fragmanları mikrozom adı verilen mikrovezikülleri oluşturur. Faz I reaksiyonlarında görev alan enzimlerin büyük çoğunluğu bu mikrozomlarda bulunduğundan mikrozomal enzimler olarak da adlandırılır (Vural 2005). Çizelge 1.1’de ksenobiyotik metabolizmasında görev alan Faz I ve Faz II reaksiyon tipleri ve enzimleri verilmiştir.

**Çizelge 1.1:** Faz I ve II reaksiyonu enzimleri (Vural 2005; Chen 2012)

|                             |                               |                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Faz I Reaksiyonları</b>  | Oksidatif Enzimler            | Sitokrom P450<br>Flavin Monooksijenaz<br>Ksantin Oksidaz<br>Amin Oksidaz<br>Lipoksijenaz<br>Alkol Dehidrogenaz<br>Aldehit Oksidaz<br>Peroksidaz<br>Süperoksit Dismutaz |
|                             | Redüktif Enzimler             | Sitokrom P450 Redüktaz<br>Nitroredüktaz<br>Azoredüktaz<br>Keto-redüktaz<br>Glutasyon Peroksidaz                                                                        |
|                             | Hidrolitik Enzimler           | Karboksilesteraz<br>Epoksit Hidrolaz<br>Amidazlar                                                                                                                      |
| <b>Faz II Reaksiyonları</b> | Konjugasyon Enzimleri         | Glukuronozil transferaz<br>Sulfotransferaz<br>Glutasyon S-transferaz<br>Glukozil transferaz<br>Tiyol transferaz<br>Amid sentezi (transačilaz)<br>Metiltransferaz       |
|                             | Konjugasyon Enzimi Olmayanlar | Kinon Redüktaz<br>Epoksit Hidrolaz                                                                                                                                     |

Mikrozomlarda bulunan ve çok sayıda üyesi bulunan bu enzim ailelerinden biri de hem grubu içeren sitokrom P450 türlerinin oluşturduğu, hemen hemen bütün canlılarda

bulunan, bilinen 6 000'den fazla üyesi olan monooksijenaz enzim sistemidir (Maréchal *et al.* 2008). Sitokrom P450 enzimleri Faz I enzimleri arasında en önemlileridir (Gonzalez and Yu 2006).

### 1.1 Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemi

Sitokrom P450'ler ilk olarak Omura and Sato (1962) tarafından yapılan çalışma ile isimlendirilmiştir. İlk zamanlarda tek bir enzimden oluştuğu, 1960'ların ortalarına kadar da ilaç ve steroid metabolizması ile alakalı olduğu bildirilmiştir. 1970'lerin sonlarına doğru altı P450 enziminin varlığı tahmin edilmiş ancak enzimin membrana bağlı olması ve hidrofobik doğası saflaştırılmasını engellediğinden protein sayısı doğru olarak belirlenememiştir. Ancak 1980'lerin başlarında mRNA saflaştırılmasındaki gelişmelerin bütün sitokrom P450 (CYP) proteinlerini kodlayan cDNA'yı izole edilmesine fırsat verdiği ve bundan sonraki klonlama çalışmalarının düzinelerce enzimi ortaya çıkardığı kaydedilmiştir. Sekans karşılaştırmaları sonucunda insan ve bakteri CYP'leri arasında büyük benzerliklerin olduğu gösterilmiştir. Üç milyar yıl önce de var olduğu bilinen bu tür bakteriler ile insan CYP süperfamilyasının bu benzerliğinin genetik olarak aynı atadan geldiğini desteklediği bildirilmiştir (Nebert and Russell 2002).

CYP enzimleri 400-530 arasında aminoasitten oluşan proteinlerdir (Büyükdoğan 2007) ve aminoasit dizilerindeki benzerliklerinin % miktarına göre familya ve alt familyalara ayrılır. %40 ve daha fazla benzerlik gösteren proteinler arap rakamıyla ifade edilen familyaya dahil edilirken %55 ve daha fazla benzerlik gösteren proteinler ise bir harf ile belirtilen alt familyaya dahil edilir (Nebert and Russell 2002). Son numara ise enzimi kodlayan genin numarasıdır (Büyükdoğan 2007). CYP türleri isimlendirilirken önce aileyi belirten numara, sonra alt aileyi belirten harf ve en sonunda gen numarası yazılır. Yani isimlendirme;

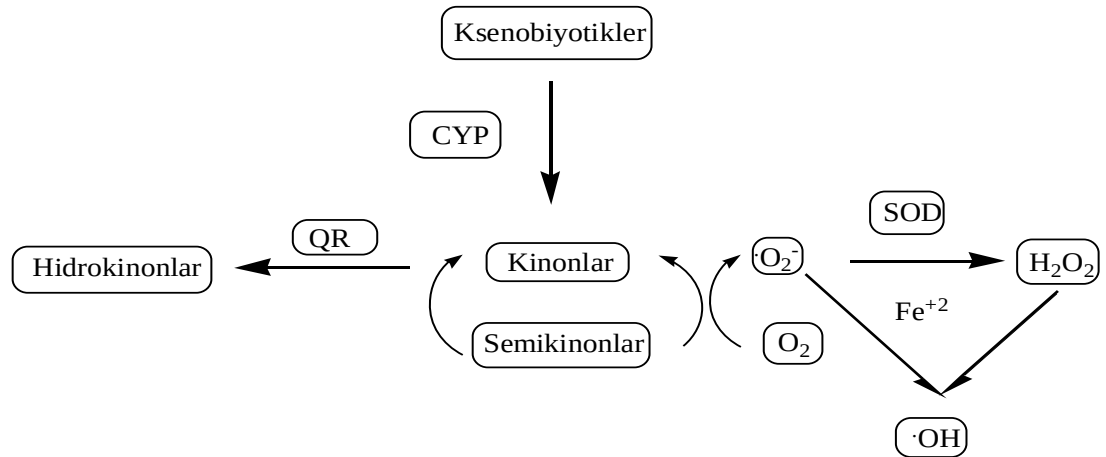
|     |   |        |   |            |   |        |                   |
|-----|---|--------|---|------------|---|--------|-------------------|
| CYP | + | numara | + | harf       | + | numara |                   |
|     |   | (aile) |   | (alt aile) |   | (gen)  |                   |
| CYP |   | 1      |   | A          |   | 1      | şeklinde yapılır. |

Moleküler biyoloji ve genomikteki gelişmeler sayesinde P450 enzimlerinin biyokimyasal karakteristiği ortaya konulabilmiştir. Böylece çoğunlukla karaciğerde ilaçları metabolize ettiğine inanılan enzim sistemi hakkında şaşırtıcı sonuçlar çıkmıştır. İlk olarak, sitokrom P450'ler geniş bir aralıkta farklı kimyasal yapılardaki endojen moleküllerin küçük gruplarında oksidatif, peroksidatif ve redüktif değişimlerde rol oynar. Şimdiye kadar tanımlanan endojen substratları doymuş ve doymamış yağ asitleri, eikosanoidler, steroller ve stereoidler, safra asitleri, vitamin D3 türevleri, retinoidler ve üroporfirinojenlerdir. İkincisi, çoğu sitokrom P450 enzimleri ilaçları, çevresel kimyasalları ve atıkları, doğal bitkisel ürünleri içeren ekzojen bileşikler metabolize edebilirler. Üçüncüsü, yabancı kimyasalların detoksifikasyonu başarıyla sonuçlanmasına karşılık P450 enzimlerinin görev aldığı reaksiyonlarda kanser riskini, özürlü doğum oranını artıran ve diğer zararlı etkilere sebep olan toksik metabolitler de üretilebilir. Dördüncüsü, çoğu P450 enziminin ekspresyonu bir substratın birikmesiyle indüklenebilir (Nebert and Russell 2002).

Sitokrom P450 enzim sistemi yetişkin eritrositleri ve iskelet kası haricinde bütün ökaryotik hücrelerde ve prokaryotlarda bulunan (Özerol 1996) çok geniş bir skalada ekzojen ve endojen maddelerin metabolizması ve biyosentezinde önemli rol oynayan enzim ailesidir. Memelilerde bu enzimler, çevresel toksinleri ve terapötik ilaçları da içeren xenobiyotiklerin metabolizmasında görev alırlar (Maréchal *et al.* 2008). Sitokrom P450 monooksijenazlar; amfitaminler ve p-asetaminofen gibi çoğu ilaçları, benzen, pridin, toluen ve aseton gibi endüstriyel solventleri, benzopren, TCDD, poliklorürlü bifeniller gibi polisiklik aromatik hidrokarbonları ve alkil halojenürleri, kimyasal karsinojenleri, forat ve tiokarb gibi insektisitleri, paration gibi pestisitleri, diklorofenil gibi herbisitleri, sabun ve deodorantların içerdikleri kimyasalları, kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ajanları, nitrozoaminler, N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin gibi mutajenleri, amino azo boyaları, diazo bileşikler, aromatik aminleri, heterosiklik bileşikler, nitrofuranları, terpenler, epoksitler, karbamatları, izosafrol ve safrol türevlerini, antioksidanları, gıda katkı maddelerini ve fermente alkollü içecekleri içeren ekzojen bileşiklerin metabolizmasını katalizler (Çelik 2002).

Hücresel bir kromofor olan sitokrom P450 enzimleri hem grubu içeren ve organizmanın hemen hemen her yerinde bulunan, indirgenmiş formlarının CO'e bağlı halleri 450 nm'de absorpsiyon bandı veren monooksijenazlardır (Schlichting *et al.* 2000; Nebert and Russell 2002). P450'ler karsinogenezden ilaç metabolizmasına, steroidlerin ya da lipidlerin biyosentezinden ksenobiyotiklerin indirgenmesiyle biyoremidasyonu ve sentez için kullanışlı hale getirilebilmesine kadar birçok hayati olayda rol alır. P450'ler katalizörsüz ancak çok yüksek sıcaklıklarda yürütülebilen ve spesifik olmayan ürünlerin olduğu aktif olmayan hidrokarbonların stereospesifik hidroksilasyon reaksiyonlarını fizyolojik sıcaklıkta katalizler (Schlichting *et al.* 2000).

CYP süper gen ailesinin ürünü olan CYP enzimleri, endoplazmik retikulumun ikili fosfolipit katmanına gömülü olarak bulunan, en önemli ksenobiyotik metabolize eden enzimlerdendir. Substratların CYP tarafından metabolize edilmesi esnasında moleküler oksijenden bir molekül kullanılmasına karşın çoğu CYP'ler substratın doğasına bağlı olarak daha fazla oksijen tüketir ve  $H_2O_2$  ya da süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ) üretilmesine neden olur (Namazi 2009). Bunu takip eden reaksiyonlarla  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$  de  $Fe^{+2}$  katalizli Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları ile hidroksil radikaline ( $\cdot OH$ ) dönüştürülebilir. Çoğu ksenobiyotikler CYP'ler vasıtasıyla toksik kinonlara dönüştürülür. Yükseltgenme ve indirgenmeye duyarlı ajanlar olan bu kinonlar  $O_2^-$  üretebilen semihidrokinon/hidrokinonlara indirgenir (Bickers and Athar 2006).



**Şekil 1.1.** CYP'ler tarafından reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi (Bickers and Athar 2006)

Bütün sitokrom P450 enzimlerinin iki oksijen atomunu bağladığı bilinir. Bu bağlanmalar O<sub>2</sub> molekülü üzerinden olduğu gibi tromboksan sentezi ve allen oksit sentezinde peroksit üzerinden olur. Oksijen atomları hemoglobin ve miyoglobinde olduğu gibi hem demirine bağlanır. Ancak burada hemoglobinde olduğunun tersi olarak demir atomu sistein aminoasidinin anyonik tiyol grubunun sülfür atomuna kuvvetli şekilde bağlanmıştır. Bu şekilde bağlanma demirin porfirin halkasının elektron yoğunluğunu değiştirerek hem grubuna oksijeni aktive etme özelliği verir ve moleküler oksijen iki oksijen atomuna ayrılır. Bir oksijen atomu su molekülü oluştururken diğeri substrat molekülüne girer ve hidroksillenmiş ürün oluşturulur.

Monooksijenaz enzim sistemi tarafından katalizlenen reaksiyon tipleri;

- Alifatik ya da aromatik karbon hidroksilasyonu,
- Çift bağın epoksidasyonu,
- Heteroatom (S-, N-, X-) oksijenasyonu ve N- hidroksilasyonu,
- Heteroatom (O-, S-, N-) dealkilasyonu,
- Oksidatif grup transferi,
- Ester parçalanmaları,
- Dehidrojenasyon,
- Redüktif dehalojenasyon, azo-, nitro- redüksiyonu,
- İzomerizasyon,

reaksiyonlarının yanı sıra tüm P450 türleri tipik bir hemoprotein olarak peroksidaz aktivitesi de gösterir (Zuber *et al.* 2002).

CYP enzimleri genel olarak iki sınıfa ayrılabilir. Bakteriyel ve mitokondriyel enzimler bir sınıfı oluştururken diğer sınıfı mikrozomal enzimler oluşturur (Özerol, 1996). Diğer yandan elektron transport bileşenlerine göre de CYP sistemleri dört gruba ayrılır;

1. FAD kofaktörü içeren, NADPH spesifik adrenodoksin redüktaz ve ferrodoksin tipi demir-sülfür (Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>) proteini olan adrenodoksin proteinlerini içeren mitokondriyel sistemler.
2. FAD ve FMN kofaktörlerini içeren NADPH spesifik P450 redüktaz enzimini içeren mikrozomal sistemler.

3. Fonksiyonel olarak mitokondriyel elektron transfer proteinlerine benzeyen bir ferrodoksin redüktaz ve bir de ferrodoksin içeren bakteriyel P450cam tipi sistemler.
4. Mikrozomal P450 sistemine benzer, P450 redüktaz ve sitokrom P450 domainlerini içeren büyük, çözünebilir tek bir proteinden oluşan bakteriyel P450meg tipi sistemler (Hanukoglu 1996).

Memelilerde CYP enzimleri kabaca iki sınıfa ayrılabilir. Birinci tip CYP enzimleri çeşitli biyolojik fonksiyonları olan küçük molekül kütleli regülatörlerin biyosentezi için gereklidir. Örneğin steroid hormonlarının kolesterolden sentezi çok spesifik birkaç CYP enzimi tarafından gerçekleştirilir. İkinci tip CYP enzimleri ise ilaçları, gıda koruyucuları, birçok toksik madde ve karsinogenleri içeren çeşitli bileşiklerin metabolizmasında görev alır. Bu tip CYP enzimlerinin aktif oldukları yerler oldukça farklıdır. İlaçların hücre içine girdikleri yerler olan karaciğer, gastrointestinal bölgelerde ve akciğer, burun mukozası, böbrek, kan, cilt ya da kan hücreleri gibi doku ve organlarda aktiftirler (Zuber *et al.* 2002).

Mikrozomların CO bağlayan pigmentleri olan CYP'ler b sitokrom tipi protoporfirin IX içeren hem proteinlerdir. Başlangıçta tek bir protein olarak tanımlanan CYP'ler bilinen bütün taksonomi, genomik ve protein sekanslarının tamamında 781 gen ailesinde 7500'den fazla hayvan CYP izoformu karakterize edilmiştir. 110 CYP familyasından 18'i omurgalılarda bulunmaktadır. Sadece bir memeli türünde ise toplam fonksiyonel CYP geni sayısı 60 ile 120 arasında değişmektedir (Hodgson 2010 ). Bütün canlı türleri baz alındığında ise 11 500 farklı CYP proteininin varlığı bildirilmiştir (Nelson 2009).

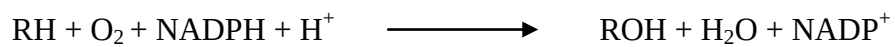
Bitkilerde küçük moleküllerin fazla olmasından dolayı bu organizmaların çoğu P450 enzimini içerdiği tahmin edilmektedir. Örneğin küçük hardal bitkisi *Arabidopsis thaliana* 249 aktif CYP geni ve 24 fonksiyonel olmayan psödogen ihtiva eder ki bu da toplam gen sayısının %1'ine tekabül eder. Benzer şekilde pirinç bitkisinde ise 324 fonksiyonel gen rapor edilmiştir (Nebert and Russell 2002). İnsan genomunda ise 57 CYP geni ve 59 psödogen belirlenmiş, bunlar da 18 familya ve 43 alt familya oluşturmaktadır (Nelson 2009). İnsanlarda bu CYP genleri tarafından kodlanan

proteinlerin büyük çoğunluğu steroidlerin, safra asitlerinin, yağ asitlerinin, eikosanoidlerin ve diğer yağda çözünebilir vitaminlerin metabolizmasında gerekli iken yaklaşık 15 tanesi ilaç ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında görev alır. Ksenobiyotikleri metabolize eden bu CYP'lerin büyük bir kısmı karsinogenleri de aktive ederler. Geriye kalan 15 kadar 'orphans' olarak adlandırılan CYP türünün ise fonksiyonu henüz bilinmemektedir (Guengerich 2003).

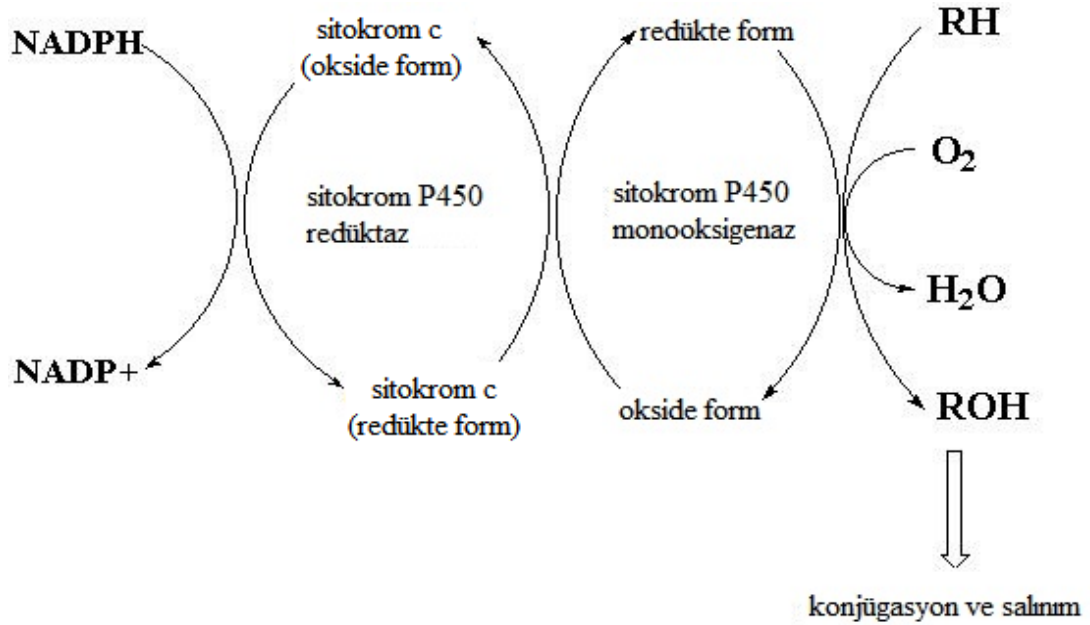
## **1.2 Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemi ve NADPH-sitokrom P450 Redüktaz**

Sitokrom P450 reaksiyonları özellikle karışık fonksiyonlu oksidasyon reaksiyonlarıdır. CYP'ler *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* gibi enterik bakteriler haricinde öbakteriler ve arkeobakterilerden insanlara kadar bütün canlılarda bulunur ve substrat aralığı mikroorganizmalarda terpenlerden, memelilerde steroidlere kadar uzanan çok geniş yelpazede doğal ürünleri içerir. Ayrıca insanlarda enzimler tarafından gerçekleştirilen ilaç metabolizmasının %75'i CYP'ler vasıtasıyla yürütülür (Guengerich and Isin 2008). Memelilerde CYP türlerin büyük çoğunluğu endoplazmik retikulumda bulunurken az bir kısmı ise mitokondride lokalize olmuştur. Bununla birlikte mikrozomal olduğu bildirilen bazı CYP türlerinin önemli fraksiyonlarının da mitokondride bulunduğu ortaya çıkarılmıştır (Guengerich 2003).

CYP'ler endoplazmik retikulumda bulunan ve ilaç, çevre kirliliğine yol açan maddeler, çözücüler, diğer yabancı maddelerin olduğu kadar lipidlerde çözünen endojen substratların metabolizmasında önemli olduğu gösterilen bir elektron transfer zincirinin terminal bileşenidir. Bu enzim sistemi sayesinde lipid-çözünebilir substratlar bir oksijen atomu ilavesiyle daha çok suda çözünebilir hale çevrilir (Backes and Kelley 2003). CYP'ler tarafından katalizlenen bu en yaygın monooksijenaz reaksiyonu;



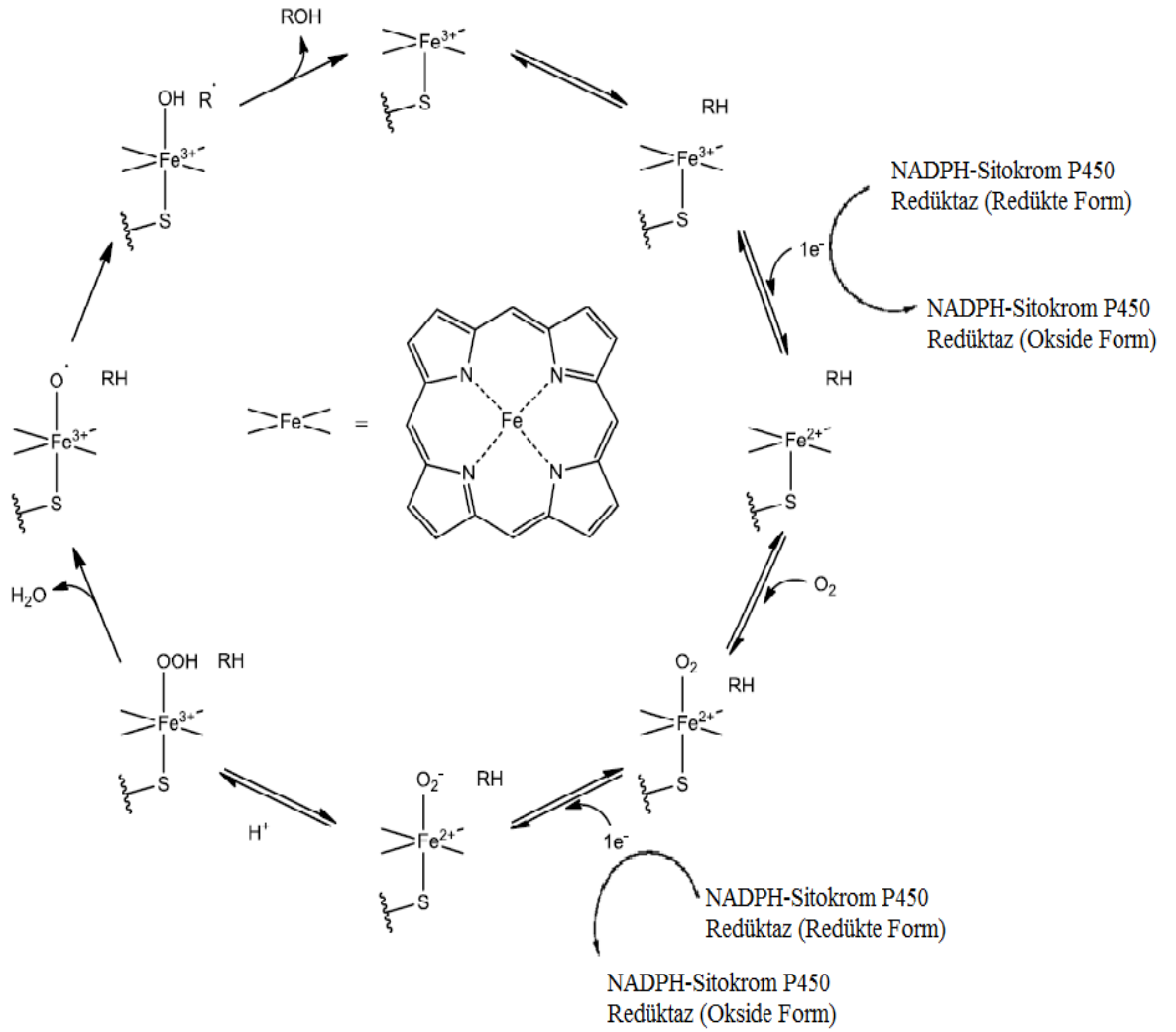
olarak verilebilir (Iyanagi 2005).



**Şekil 1.2.** Monooksijenaz sisteminde redüktaz enziminin rolü

Bu monooksijenaz reaksiyonlarında reaksiyonun gerçekleşebilmesi için P450 oksijene bağlanmak zorundadır. Fakat sitokrom P450'nin okside formu ( $\text{Fe}^{+3}$ ) oksijeni bağlayamazken indirgenmiş formu bağlayabilmektedir. Bunun için gerekli olan indirgeyici elektronları P450 türleri NADPH'tan direkt olarak alamaz. Ancak lipidlerin kolaylaştırıcı fonksiyonu ile NADPH-sitokrom P450 redüktaz üzerinden bu elektronları alabilir (Çelik 2008).

Şekil 1.3'de sitokrom P450'ler tarafından katalizlenen temel monooksijenaz reaksiyonu devri verilmiştir. Burada ilk olarak substrat (RH) sitokrom P450'nin aktif bölgesindeki hem grubuna bir su molekülü çıkararak sıkı bir şekilde bağlanır. Oksijen hem grubuna bağlanır ve bir elektron transferi ile aktif hale getirilir. Böylece oldukça reaktif okso Fe (V) türü oluşturulur. Bu da substrat ile etkileşerek R-H bağına bir oksijen atomu sokulmasıyla hidroksil grubu ilavesini sağlar.



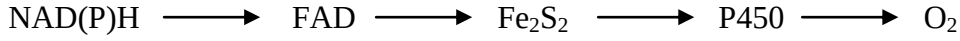
**Şekil 1.3.** Temel P450 katalitik devri (Adams 2010)

Endoplazmik retikulumdaki (ER) bu elektron transport zincirinin temel bileşenlerinin sitokrom P450, bir flavoprotein olan NADPH-sitokrom P450 redüktaz (CPR) ve fosfolipidler olduğu Lu *et al.* (1969) tarafından yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. ER'deki CYP'lerin tamamı tek bir flavoproteinle, CPR ile etkileşir, elektron alır ve elektron akışı;



şeklinde gerçekleşir (Guengerich 2003).

Mitokondrial CYP'ler ise demir-sülfür proteini olan adrenodoksin ve FAD içeren bir flavoprotein olan adrenodoksin redüktaz proteinlerinin görev aldığı bir elektron transport zincirini kullanır. Buradaki elektron akışı ise;



olarak verilmiştir (Guengerich 2003, Anonymous 2012).

NADPH destekli katalitik aktivitenin gerçekleşebilmesi, P450 ve redüktazın 1/1 (M/M) oranında oluşturduğu fonksiyonel kompleksi gerektirir (Backes and Kelley 2003). Bu protein-protein kompleksinin oluşumunun düzenlenmesi monooksijenaz aktivitesindeki verimliliği artırarak serbest radikaller oluşumunu minimize etmeye yardımcı olur (Hanukoglu 1996).

Sitokrom  $b_5$  ve NADH-sitokrom  $b_5$  redüktaz gibi P450 sistemi ile etkileşim içerisinde olan diğer protein bileşenleri kataliz oranını etkileyebilirler (Backes and Kelley 2003). Örneğin testislerde bulunan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi progesterondan androstenedion eldesinden sorumlu sitokrom P450 sisteminde esansiyel bir enzimdir (Inano *et al.* 1988). Bu membrana bağlı elektron transport zincirinin temel bileşenleri NADPH-sitokrom P450 redüktaz, NADH-sitokrom  $b_5$  redüktaz, sitokrom P-450 ve sitokrom  $b_5$ 'tir (Morimoto *et al.* 1976).

Ayrıca fosfolipitler de monooksijenaz aktivitelerinde önemli bir rol oynar. Fosfolipit konsantrasyonu ve kompozisyonu yalnızca kataliz oranını etkilemekle kalmaz katalitik aktivitenin ifade edilip edilmeyeceğini belirleyebilir (Backes and Kelley 2003).

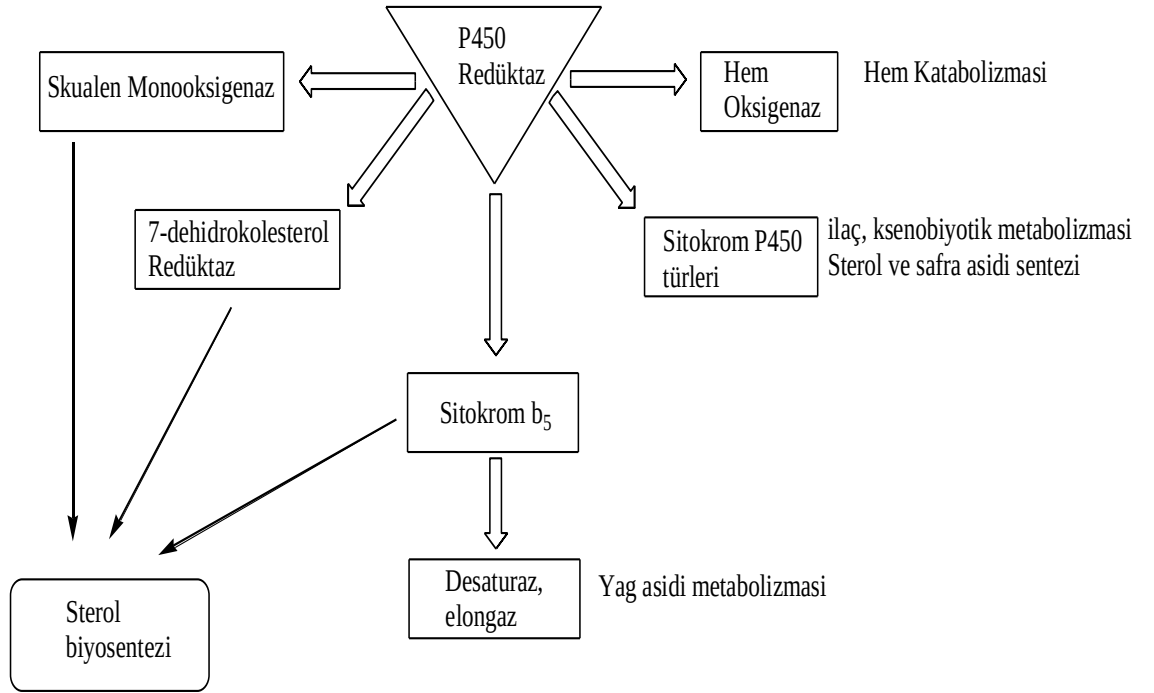
Çoğu dokularda bazı istisnalar dışında sitokrom P450 miktarı CPR'den çok fazladır. P450 oranı redüktaz miktarına oranla koku epitel hücrelerinde 2:1-3:1 (Reed *et al.* 1986), beyin hücrelerinde 1:3 (Gherzi-Egea *et al.* 1989) olmakla birlikte indüklenme durumuna bağlı olarak karaciğerde redüktaz miktarına oranı 10:1 ile 20:1 arasında değişebilmektedir. Fonksiyonel redüktaz-P450 kompleksi 1/1 oranında olmasına karşılık redüktaz her bir P450'ye elektron sağlamak zorundadır. Bazı P450 enzimlerinin

redüktaza daha fazla afinitesi olması durumunda elektronlar tercihen bu P450 türlerine akar. Neticede kısıtlı redüktaz için diğer P450'ler ile yarışmada daha az kabiliyetli olan P450'ler elektronları almalarına olanak sağlayan farklı mekanizmalara sahip olmak zorundadırlar. Aksi taktirde bunlar metabolik olarak inaktif olacaklardır (Backes and Kelley 2003). Miwa *et al.* (1979) tarafından yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar redüktaz ile CYP'ler arasında dinamik bir etkileşimin varlığını desteklemektedir. Böylelikle redüktaz enzimi mikrozomal membranlarda lateral difüzyon ile birden fazla P450 molekülünü indirgeyebileceği bildirilmiştir.

Sitokrom P450 monooksijenaz sistemi tarafından katalizlenen oksidatif reaksiyonların membrana bağlı proteinler olan CPR ve sitokrom P450'ye bağımlı olduğu bilinmektedir. Redüktaz enzimi kataliz sürecinde indirgeyici elektronların NADPH'tan sitokrom P450'ye transferinde rol alır. Yapılan çalışmalarda sitokrom P450 ile CPR arasında mikrozomal membranlarda rijit ya da kümelenmiş bir düzenlenmenin olduğu ileri sürülmüştür. Ancak sonraki çalışmalarda karaciğer mikrozomlarında membrana bağlı enzimlerin hızlı lateral hareketliliğine izin veren akıcı lipid matriksin olduğu belirtilmiştir (Miwa *et al.* 1979).

### 1.3. NADPH-sitokrom P450 Redüktaz Enzimi Genel Özellikleri

NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi (E.C 1.6.2.4) çoğu ökaryotik hücrelerin endoplazmik retikulumunda bulunan, bazı oksijenaz enzimleri için elektron sağlayıcı proteindir. Bu oksijenazlar, çoğu ilaç ve gıda maddelerinin matabolizması, steroid hormonları ve diğer ekstraselüler lipid sinyal molekülleri sentezinde görev alan sitokrom P450 enzim ailesi, hem grubunun bilirubine indirgenmesinde ilk basamağı katalizleyen ve bir hemoprotein olan hem oksijenaz ve sterol sentezi yolunda ikinci enzim olan skualen monooksijenazdır. NADPH-sitokrom P450 redüktaz (CPR) ayrıca sterol sentezi yolunda 7-dehidroksikolesterol redüktaz enzimine ve sterol sentezi ile yağ asit desaturaz ve elongaz yollarını destekleyen sitokrom b<sub>5</sub>'e de elektron verebilir (Porter 2001).



**Şekil 1.4.** CPR enziminin elektron sağladığı sistemler

NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi Paine *et al.* (2005) bildirdiğine göre ilk olarak 1940 yılında maya hücrelerinden saflaştırılmış ve FMN içeren NADPH bağımlı sitokrom c redüktaz ismi verilmiştir (Haas *et al.* 1940). Memeli CPR enzimi ise ilk olarak Horeker tarafından 1950 yılında domuz karaciğerinden izole edilmiş ve enzimin ayrıca FAD kofaktörünü içerdiği belirlenmiştir (Horecker 1950). Enzimin içermiş olduğu bu flavinler redüksiyon durumuna göre, görünür absorbanlarındaki değişim sayesinde enzimin redoks özelliklerinin belirlenmesinde faydalı olmuştur (Paine *et al.* 2005).

Yapılan ilk çalışmalarda karaciğer mitokondrilerinde lokalize olduğu düşünülen NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin, daha sonra yapılan çalışmalar ile endoplazmik retikulumda (mikrozomlarda) bulunduğu, ilaç ve steroid hidroksilasyonu ile alakalı mikrozomal elektron transport zinciriyle bağlantısı olduğu tespit edilmiştir (Phillips and Langdon 1962).

CPR enzimi büyük sitozolik domaine ilaveten hidrofobik parça içeren amfipatik bir proteindir. FAD ve FMN içeren hidrofilik peptid doğal enzimin spektral karakteristiğini muhafaza eder ve sitokrom c'nin redüksiyonunu katalizleyebilir. Hidrofobik kısım ise P450 monooksijenaz reaksiyonlarında redüktaz ile P450'lerin uygun etkileşimi için esansiyeldir (Çelik 2008).

Proteolitik olarak parçalanmış CPR enzimi sitokrom c ve diğer çoğu sentetik elektron alıcıları indirgeyebilirken doğal substratı olan P450 türlerini indirgeyememektedir (Lu *et al.* 1969). CPR'nin fizyolojik rolünü belirlemede karşılaşılan zorlukların, saflaştırma esnasında kullanılan tripsin ya da lipaz ile muamele sonucu enzimin aktivitesini kaybetmesinden dolayı olduğu belirlenmiştir. Bunun sebebinin ise enzimin fosfolipid ikili tabaka ve P450 ile etkileşiminden sorumlu, ilk 60 ya da daha fazla aminosit rezidüsünden oluşan membrana bağlanma bölgesi olan amino ucunun kopması olduğu bildirilmiştir (Paine *et al.* 2005).

CPR enzimi FMN ve FAD içeren flavoproteinler arasında gen füzyonu sonucu oluştuğuna inanılan diflavin redüktazların küçük bir ailesi için bir prototiptir (Porter and Kasper 1986). Bu görüşe kaynak olarak redüktaz enziminin N-terminal bölgesinin FMN içeren bakteriyel flavodoksin ile C-terminal bölgesinin ise FAD içeren ferrodoksin NADP<sup>+</sup> redüktaz ile homolojisinin olmasıdır (Smith *et al.* 1994). Enzim, nitrik oksit sentaz (McMillan *et al.* 1992) metionin sentaz redüktaz (Leclerc *et al.* 1998) ve NR1 (Paine *et al.* 2000) ile birlikte memelilerde bulunan FAD ve FMN bağlanma bölgelerinin ikisini de içeren dört enzimden birisidir. Jensen and Moller'in (2010) bildirdiğine göre bakterilerde ise diflavin ailesinin üyeleri sülfid redüktaz (SİR, Ostrowski *et al.* 1989) ve *bacillus megaterium* bakterisinde bulunan P450 domaini ile flavin bağlayan domainlerin birleştiği P450BM3 (Narhi and Fulco 1986) enzimleridir. Memelilerde bulunan bu dört enzim arasında yapısal olarak büyük benzerlikler olmasına karşın bazı önemli farklılıklar vardır. Örneğin metionin sentaz redüktaz ve NR1 CPR enzimi ile aynı domainlere sahipken membrana bağlanmak için gerekli olan aminoasit dizilimine sahip değildir. Dolayısıyla bu enzimler sitozoliktir. Nitrik oksit sentazda ise

redüktaz bölgesi hem domaini ile birleşmiş ve kalmodulin bağlama bölgesi oluşmuştur (Paine *et al.* 2005).

Bir flavoprotein olan enzimin hidrofilik olan katalitik bölgesi endoplazmik retikulumun sitozolik yüzeyinde iken N-terminal ucunda bulunan hidrofobik  $\alpha$ -heliks transmembran bölgesi ile endoplazmik retikulum membranına bağlanır (Vogel and Lumper 1986; Zhang *et al.* 2003; Laursen *et al.* 2010). Enzimin hücre içindeki temel redoks partneri monooksijenaz enzim ailesini oluşturan sitokrom P450 türleridir (Morant *et al.* 2003).

Çok sayıda ekzojenik ve endojenik bileşenlerin metabolizmasını katalizleyen karaciğer mikrozomal monooksijenaz sistemi memelilerde ve balıklarda sitokrom P450, NADPH-sitokrom P450 redüktaz ve fosfolipidler olmak üzere üç bileşene ayrılır ve enzimin sıcaklığa karşı stabilitesini fosfolipid bileşenleri sağlar (Lu *et al.* 1969, Arinc *et al.* 1976). Strobel *et al.* (1970) tarafından yapılan çalışmada ise bu fosfolipid bileşenlerinin fosfatidilkolin olduğu belirlenmiştir. Fosfolipidler monooksijenaz aktivitesinde önemli rol oynarlar. Fosfolipid konsantrasyonu ve konformasyonu aktiviteyi etkilemekle kalmaz tümüyle aktivite kaybına da neden olabilir (Backes and Kelley 2003). Das and Sligar (2009) tarafından yapılan çalışmada da membranların CPR enziminin redoks potansiyelini belirlemede etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte anyonik lipidlerin CPR enziminin redoks potansiyelini, CPR'den sitokrom P450'ye elektron transferini gerçekleştirmede bazı prosesleri termodinamik açıdan daha elverişli hale getirdiği bildirilmiştir.

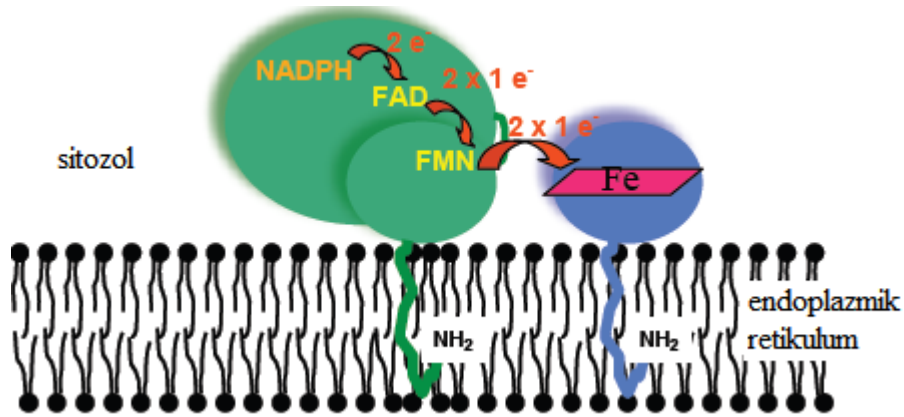
Lu and Coon (1968) tarafından yapılan çalışmalarda yağ asidi hidroksilaz enziminin aktivite gösterebilmesi için sitokrom c, sitokrom P450 redüktaz ve fosfolipidlere ihtiyacı olduğu bulunmuştur. Sitokrom P450 sisteminden farklı olarak NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi elektronları yağ asidi uzama sisteminde olduğu gibi sitokrom c, sitokrom b<sub>5</sub>, hem oksijenaz gibi diğer redoks proteinlerine de aktarabilir (Laursen *et al.* 2010). Enzim, sitokrom c kullanan monooksijenaz reaksiyonlarındaki elektron transportu işlevinin yanı sıra terapatik olarak çok önemli antitümör ilaçları, antibiyotikler, aromatik nitro bileşikler, böcek öldürücüler ve diğer çevre kirleticilerini

içeren çeşitli kimyasalların redüksiyon reaksiyonlarını katalizleme fonksiyonu da vardır (Aoi *et al.* 1981; Kappus 1986; Sinha 1989). Örneğin doksorubisin, mitomisin C, tirapazamin ve indolokinon gibi antitümör ilaçların özellikle NADPH-sitokrom P450 redüktaz gibi selüler oksidoredüktazlar tarafından redüktif aktivasyonu, tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivitenin önemli derecede yükselmesine yol açabilen DNA'ya kovalent bağlanmasıyla sonuçlanır (Kostrzewa-Nowak *et al.* 2007).

NADPH-sitokrom P450 redüktaz flavoproteini NADPH'tan aldığı elektronları FMN ve FAD prostetik grupları vasıtasıyla sitokrom P450 türlerine aktarmasının yanı sıra sitokrom c, potasyum ferrisiyanid ve 2,6-dikloroindofenol (DCIP) gibi eksojen elektron alıcılarına (Smith *et al.* 1994), benzotriazine SR4233 (Walton *et al.* 1992) ve mitomisin c (Keyes *et al.* 1984) gibi terapatik olarak önemli bileşiklere de elektronlarını aktararak bu bileşikleri indirgeyebilmektedir. CPR ayrıca hem oksijenaz, yağ asidi uzama sistemi, sitokrom b<sub>5</sub>'e de elektron verebilir ve moleküler oksijenin bir elektron redüksiyonu ile lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Smith *et al.* 1994).

Redüktaz enzimi ilk olarak bulunan eşit oranda FMN ve FAD (1/1) içeren proteindir. Smith *et al.* (1994) tarafından yapılan çalışmada redüktaz enziminin FAD ve FMN bağlayan domainlerinin direkt olarak etkileşim içerisinde olmasına gerek olmadığı bildirilmiştir. Ancak proteine bağlanmış flavinin stabilitesini sağlamak ve etkili bir elektron transferi için bu domainler arasında etkileşimin olmasının gerekli olabileceği vurgulanmıştır. Redüktaz enziminin FAD/NADPH domainleri *E. coli* hücrelerinde eksprese edilmiş ve bazı bileşiklerin redüksiyonunu katalizlediği belirlenmiştir (Smith *et al.* 1994). Bu sonuç Kurzban and Strobel (1986) tarafından yapılan FMN'nin direkt olarak NADPH'tan elektron alamayacağını belirlenlendiği çalışma ile de desteklenmiştir. Redüktaz tarafından katalizlenen ve P450 türlerinin elektron alıcısı olarak görev aldığı katalitik döngüde üç kural vardır. NADPH elektronlarını yalnızca FAD'ye verir, FMNH<sub>2</sub>'den FMNH'ye elektron çıkışı sınırlıdır ve redüktaz flavinler arasında bir elektron transferi ile bir, iki ve üç elektronlu durumlar arasında gidip gelir. Böylece NADPH bir elektron transfer edilmiş enzimi (FAD/FMNH') indirgeyerek FADH<sub>2</sub>/FMNH' oluşturur. Bu noktada elektron vericisi olarak davranan FADH<sub>2</sub>/FMNH<sub>2</sub>

flavinler arasında hızlı elektron geçişi ile oluşturulur. Bir elektron FMNH<sub>2</sub>'den sitokrom P450'ye aktarılırken redüktaz diradikal halde kalır. FAD/FMNH<sub>2</sub>'nin tekrar oluşmasından sonra ikinci elektron yine FMNH<sub>2</sub>'den P450'ye verilir (Kurzban and Strobel 1986). Daha önceden de Vermillion *et al.* yaptığı çalışmada elektron akışının; NADPH → FAD → FMN → Sitokrom P450 şeklinde gerçekleştiği bildirilmiştir (Vermillion *et al.* 1981).



**Şekil 1.5.** Mikrozomal sitokrom P450 sisteminde elektron akışı (Wohlever 2008)

\*Sol kısımda sitokrom P450 redüktaz, sağ kısımda ise sitokrom P450 hem demiri

Burada elektronlar NADPH'tan sitokrom P450 türlerinin prostetik grubunda bulunan demir atomuna aktarılır (Laursen *et al.* 2010). Enzimin sitokrom c kadar bazı boya türleri, kinonlar ve ferrisiyanidler üzerinde de indirgeyici özelliği vardır (Crankshaw *et al.* 1979). Ancak sitokrom c ve sitokrom P450 türleri elektronları enzimin FMN bağlayan bölgesi üzerinden alırken (Widdowson 2010) ferrisiyanid gibi ikinci tip elektron alıcılar elektronları FAD bağlayan bölgesi üzerinden alabilirler (Murataliev *et al.* 2004).

Birden fazla substratı olan enzim reaksiyonları için iki kinetik mekanizma şeması vardır. Bunlar Ping-Pong ile düzenli ve rasgele Bi-Bi kinetik mekanizmalarıdır. Ping-Pong mekanizmasında ilk substrat bağlanır ve ikinci substrat bağlanmadan önce salıverilir. Bi-Bi kinetik mekanizmasında ise substratlar enzime aynı anda bağlanır ve üçlü kompleks oluşturur. Bu kompleks substratlar ayrılmadan önce reaktif ara ürün

görevi görür (Cleland 1977). Karasinek (Wilson and Hodgson 1971; Mayer and Prough 1977) ve *Spodoptera eridania* (Crankshaw *et al.*, 1979) üzerinde yapılan çalışmalarda CPR enzimi için Ping-Pong mekanizması önerilmiş ancak Murataliev *et al.* (1999) tarafından yapılan çalışmada karasinek CPR enziminin rasgele Bi-Bi kinetik mekanizmasına göre işlediğine dair çok güçlü kanıtlar bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca sitokrom c redüksiyonu kullanılarak enzim aktivitesinde hız kısıtlayıcı basamak ta belirlenmiştir. Yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar NADPH'tan FAD'ye hidrit transfer hızının bütün reaksiyon hızının yaklaşık yarısına eşit olduğunu göstermiştir. Bu verilerin hidrit transferi ve akabinde FAD redüksiyon hızının hız kısıtlayıcı basamak olduğunu belirttiği ifade edilmiştir (Murataliev *et al.* 1999).

1980'lerin sonlarına doğru saf proteinin elde edilebilmesi ile birlikte CPR geni ve proteini birçok farklı türlerden klonlanmış ve sekans analizi yapılabilmektedir. Bu çalışmalarla birlikte enzimin yapısını ve fonksiyonunu etkileyen faktörler belirlenmiştir. Ayrıca üç boyutlu yapıları bilinen flavoproteinler ile bu proteinler arasında yapılan aminoasit sekans karşılaştırması ile yaşamsal süreçte korunan diziler belirlenebilmiştir (Çelik 2002).

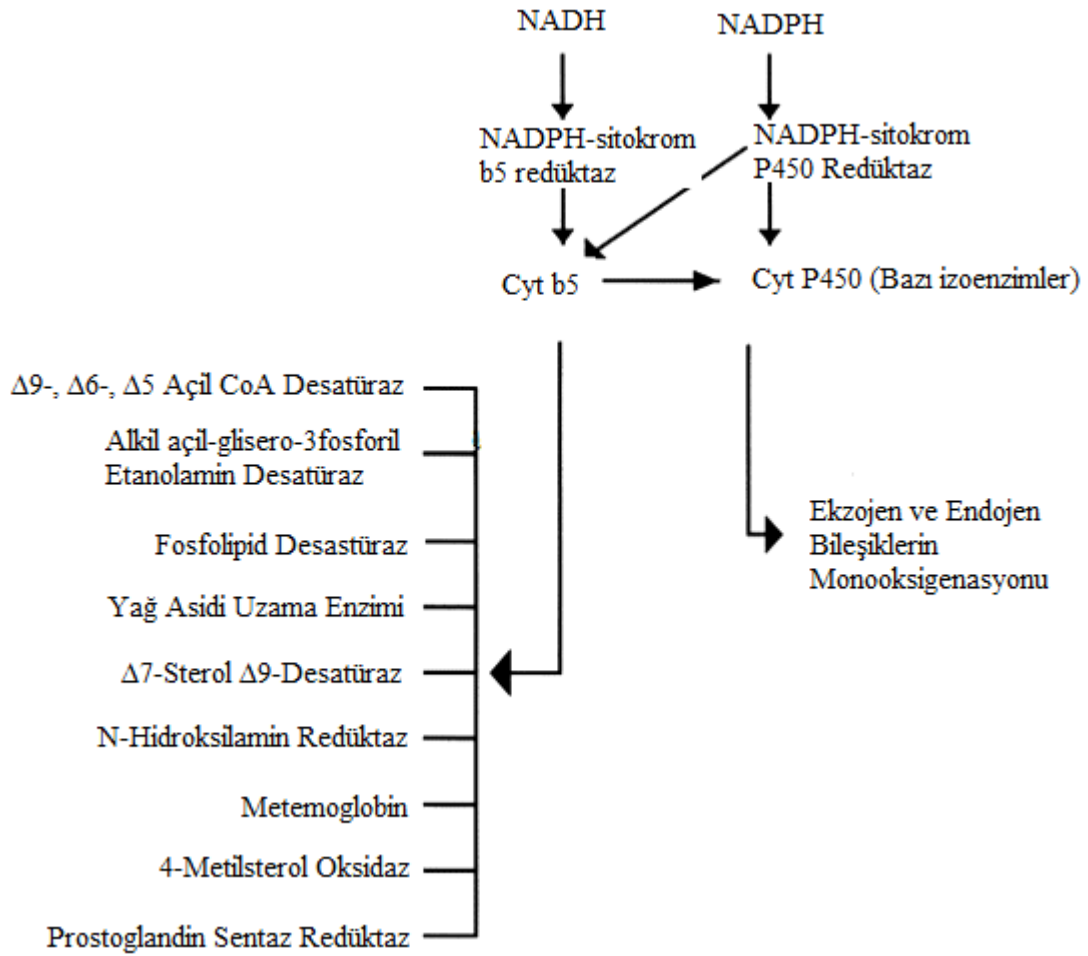
#### **1.4. CPR Enziminin Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemi Dışında Görev Aldığı Diğer Metabolik Yollar**

CPR enzimi çoğu metabolik yolda anahtar rolde görev alır ve bu yüzden birden fazla bağlayabildiği ve etkileştiği hücre içi partneri vardır. Bu sitokrom P450 türleri dışındaki partnerleri skualen monooksijenaz, hem oksijenaz, yağ asit desatüراز ve sitokrom b<sub>5</sub>'tir. Hücre içi etkileştiği partnerlerden de anlaşılacağı üzere CPR enziminin geniş alanda farklı biyolojik proseslerdeki gerekliliği hücre aktiviteleri yönünden önemini artırmaktadır (Widdowson 2010).

Skualen monooksijenaz kolesterol biyosentezinde, skualen sentazdan sonra ve lanosterol sentazdan önceki, ikinci basamakta görev alır ve skualendeki C-C çift bağının

epoksidasyonunu katalizleyerek genel bir sitokrom P450 tipi oksidasyon ile 2,3-oksidoskualen oluşumunu sağlar. Bu enzim FAD içerir ve ökaryotik hücrelerde endoplazmik retikuluma bağlı olarak bulunur. Sitokrom P450 gibi hem grubu içermeyen enzim sitokrom P450'ye benzer şekilde indirgeyici elektronlar için NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimine bağımlıdır (Laden *et al.* 2000).

Sitokrom b<sub>5</sub> NADH bağımlı yağ asidi desatüraz ve uzama metabolik yollarının bir bileşenidir. Bunlara ilaveten sitokrom b<sub>5</sub> hemoglobin redüksiyonu, plazmojenlerin sentezi, metiyonin sentezi için gereklidir ve çoğu P450 reaksiyonların aktivitesini hızlandırabilir. Sitokrom b<sub>5</sub> NADH bağımlı bir flavoprotein olan NADH-b<sub>5</sub> redüktaz tarafından indirgenirken ayrıca CPR enzimi tarafından da indirgenebilmektedir (Guengerich 2005). Ilan *et al.* (1981) yapmış oldukları çalışmada NADPH destekli mikrozomal yağ asidi zinciri uzama reaksiyonlarında CPR enziminin gerekliliğini belirlemişlerdir. CPR enziminin indirgeyici elektronları yağ asidi uzama sistemine sitokrom b<sub>5</sub> üzerinden sağlayabildiği gibi direkt olarak ta aktarabildiğini bildirmişlerdir (İlan *et al.* 1981).



**Şekil 1.6.** Endoplazmik retikulumda elektron zincirinin fizyolojik fonksiyonu ve elektron transferi (Arinç and Çakir 1999)

Lipid peroksidasyonu, doymamış yağların serbest radikal zincir reaksiyonu ile bozunmasıdır. Bu olay hücre membranında bulunan çoklu doymamış lipidleri çok hızlı bir şekilde etkileyerek membranların zarar görmesine neden olabilir (Widdowson 2010). Sevanian *et al.* (1999) tarafından yapılan çalışmada NADPH ve  $\text{ADP-Fe}^{3+}$  bağımlı lipid peroksidasyonlarında CPR enziminin ve sitokrom P450'nin gerekliliği belirlenmiştir. Sitokrom P450 bağılı monooksijenaz reaksiyonlarında olduğu gibi bu enzimlerin oksijen molekülünün indirgenmesi için iki elektron sağlayabileceği bildirilmiştir. İlk elektron  $\text{ADP-Fe}^{3+}$ 'nin indirgenmesinde ve  $\text{O}_2$ 'nin bağlanarak  $\text{ADP-Fe}^{3+}\text{-O}_2^-$  perferryl radikalinin oluşmasında kullanılır. Bu da çoklu doymamış yağdan (LH) bir proton kopararak (LH) serbest radikalinin oluşmasına neden olur. LH Serbest radikali ise

moleküler oksijenle reaksiyona girerek peroksit serbest radikalinin (LOO) oluşmasını sağlar. İkinci elektronun peroksit radikale aktarılması ile de lipid hidroperoksit (LOOH) oluşur (Sevanian *et al.* 1990).

Hem oksijenaz, biliverdin ve CO oluşturmak üzere  $\alpha$ -methene köprüsünde hem proteininin oksidasyonu için gerekli olan bir mikrozomal enzimdir. Burada oluşan biliverdin daha sonra biliverdin redüktaz tarafından bilirubine çevrilir. Hem oksijenaz tarafından katalizlenen bu hem oksidasyonu için NADPH ve O<sub>2</sub> gereklidir. Yapılan çalışmalarda aktif hem oksijenazın elektronları CPR enziminden aldığı belirlenmiştir (Schacter *et al.* 1972).

### 1.5. Amaç

Canlılar yaşamları sürecinde beslenme, adsorbsiyon ve solunum yoluyla birçok yabancı maddeleri metabolizmalarına dahil ederler. Canlı bünyesinde bu eksojen maddelerin metabolize edilmesinden bazı enzim sistemleri sorumludur ve en önemlilerinden birisi de sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemidir. Bu sistemin temel bileşenleri sitokrom P450, NADPH-sitokrom P450 redüktaz ve fosfolipitlerdir. CPR enzimi ksenobiyotik metabolizmasındaki görevinin yanı sıra ayrıca yağ asidi, steroid, hem metabolizmalarında ve bazı ilaçların biyoredüktif aktivasyonunda görev almaktadır. Bu özelliklerinden dolayı enzim üzerinde kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Ancak literatürde bölge insanı için önemli bir gıda kaynağı ve ticari olarak önem arz eden, ayrıca endemik bir tür olan Van Gölü balığı karaciğeri monooksijenaz enzim sistemi hakkında bir bilgiye rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışmanın amacı NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi saflaştırılarak biyolojik ve kinetik özelliklerini belirlemek ve böylece ksenobiyotik metabolizması ve karaciğer mikrozomal monooksijenaz enzim sistemi hakkında detaylı bilgiler vererek bu sistemin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmaktır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

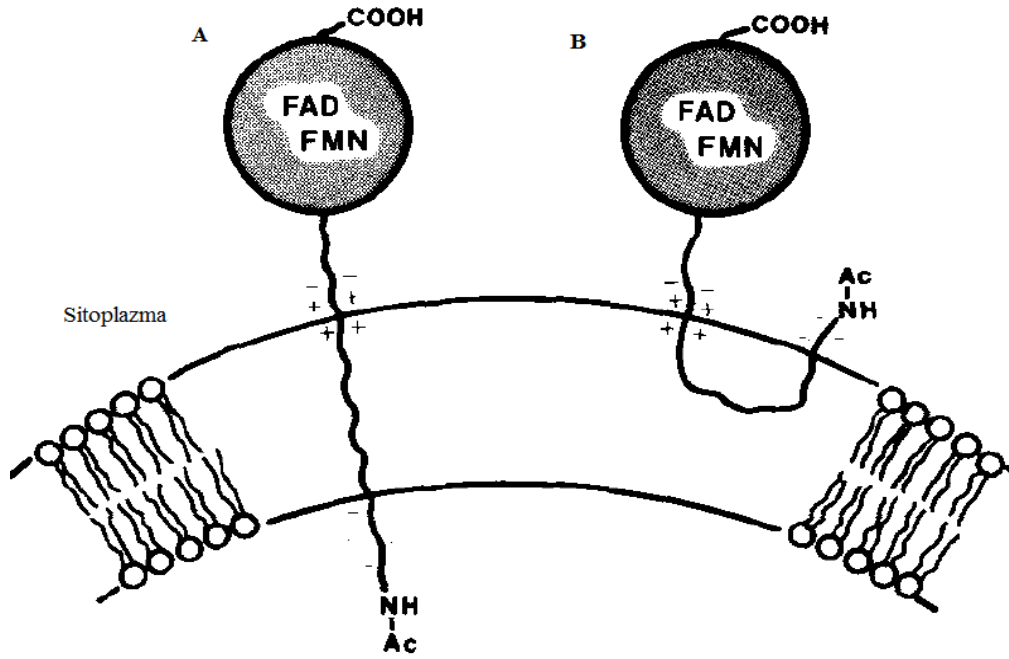
İlk olarak Hass *et al.* (1940) tarafından 1940 yılında maya hücrelerinde ferrisitokrom c'nin trifosfopridin nükleotid (TPNH<sub>2</sub>) ile indirgenmesi reaksiyonunun sitokrom c redüktaz tarafından katalizlendiği belirtilmiş ve Horecker tarafından memelilerde CPR enzimi domuz karaciğerinden aseton tozu ekstraktının tripsin ile muamele edilmesi ile saflaştırılmıştır. Molekül kütlesi 68 kDa olarak belirlenen enzimin protein ve flavin fraksiyonlarına ayrılabilceği, proteinin FAD ve FMN tarafından reaktif edildiği tespit edilmiş olmakla birlikte CPR enziminin FAD'yi içerdiği belirlenmiştir (Horecker 1950). Ancak yapılan bu çalışmalarda enzimin intraselüler lokalizasyonu bilinmediğinden biyolojik rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Williams and Kamin'in (1962) bildirdiğine göre Strittmatter and Velick (1956) sitokrom c redüksiyonunu katalizleyen farklı bir mikrozomal fraksiyon gözlemişler ve bunun Horecker tarafından izole edilen TPNH-sitokrom c redüktaza benzer olabileceğini önermişlerdir. Daha sonradan Phillips (1957) tarafından yapılan çalışmalar ise mikrozomal TPNH-sitokrom c redüktaz enziminin varlığını doğrulamıştır (Williams and Kamin 1962).

Master *et al.* bildirdiğine göre (1975) 1962 yılında Williams and Kamin ile Phillips and Langdon tarafından yapılan ayrı ayrı çalışmalarda enzimin mikrozomal olduğu belirlenmiş, kinetik ve fiziksel özellikleri çalışılmıştır. 1950 yılında Horecker, 1962 yılında Williams and Kamin ile Phillips and Langdon, 1963 yılında Nishibayashi *et al.*, 1970 yılında Omura and Takesue tarafından yapılan çalışmalarda enzimin sadece FAD prostetik grubu içerdiği belirtilmiştir. Ancak 1965 yılında Master *et al.* enzimin iki mol flavin içerdiğini öne sürmüş, Master and Ziegler ise 1971 yılında mol kütlesinin 68 kDa olduğunu ve bir molünün iki mol flavine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. 1973 yılında Iyanagi and Mason yapmış oldukları çalışmalarda sıçan ve domuz karaciğeri mikrozomlarından elde ettikleri CPR preparatlarının eşit miktarlarda FAD ve FMN içerdiğini belirlemişlerdir (Master *et al.* 1975).

1950 ile 1968 arasında geçen dönemde birçok farklı substrat denenmesine karşın proteolitik olarak çözünür hale getirilmiş olan enzimin fizyolojik aktivitesi belirlenememiştir (Çelik 2002). Ancak bu şekilde proteaz ile muamele edilerek saflaştırılan ve monomemerik molekül kütlesi 71 kDa olarak belirlenen redüktaz enziminin sitokrom c, ferrisiyanid, 2,6-diklorfeno indofenol ve neotetrazolyum gibi doğal olmayan substratlara elektron aktarabilirken fizyolojik substratı olan P450'lere elektron aktaramadığı belirlenmiştir. Daha sonra enzim tabii halinde değişik kaynaklardan mikrozomal membranların deterjan ile çözünür hale getirilmesi ile saflaştırılmıştır. Tabii halde saflaştırılan bu redüktazın proteaz kullanılarak saflaştırılan redüktazdan yaklaşık 50 aminoasit rezidüsü kadar fazlalık ihtiva ettiği ve molekül kütlesinin 77 kDa olduğu tespit edilmiştir. Bu tabii redüktaz doğal substratı olan sitokrom P450'ye elektronlarını aktarabildiği, ancak sitokrom c'yi indirgemedi proteaz kullanılarak saflaştırılan redüktazdan daha az aktif olduğu bildirilmiştir (Black and Coon 1982).

Black *et al.* (1979) tarafından yapılan çalışmada tavşan karaciğeri mikrozomlarından redüktaz enzimi hem deterjan hem de proteaz kullanılarak saflaştırılmış, tabii enzimin molekül kütlesi 77,7 kDa bulunmuştur. Proteaz kullanılarak saflaştırılan redüktaz enziminin ise tabii redüktazın sitokrom P450'lere ve mikrozomal membranlara bağlanmasını sağlayan, aminoasit kompozisyonu ve çözünürlük özelliklerinden anlaşılacağı üzere hidrofobik doğası olan, enzimin N-terminal bölgesinde bulunan 6,1 kDa'luk küçük bir peptid ile flavin prostetik gruplarını bulunduran 71,2 kDa'luk büyük peptide ayrıldığı belirlenmiştir (Black *et al.* 1979).

Tabii redüktazın sentetik ve mikrozomal membranlara hızlı bir şekilde bağlanabildiği gösterilmiş ve hidrofobik bölgenin membranlara bağlanma şekilleri ile alakalı iki muhtemel alternatif konformasyon belirtilmiştir. Birincisi, NH<sub>2</sub> ve COOH uçları membranın zıt taraflarında bulunduğu ve hidrofobik parçanın ikili tabaka boyunca geçtiği konformasyon, ikincisi ise her iki ucun da sitoplazmik tarafta bulunduğu ve apolar bölgenin "U" şeklinde gömüldüğü konformasyondur.



**Şekil 2.1.** Tabii redüktazın membranlara bağlanma şekilleri ile alakalı iki muhtemel alternatif konformasyon (Black and Coon 1982)

\***A:**  $\text{NH}_2$  ve  $\text{COOH}$  uçları zıt taraflarda, **B:**  $\text{NH}_2$  ve  $\text{COOH}$  uçları aynı tarafta

Sıçan karaciğer hücrelerinde yapılan direk ferritin-immunoelektron mikroskobu çalışmalarında sitokrom P450 sisteminin özellikle endoplazmik retikulum ve çekirdek zarından oluşan mikrozomal veziküllerde lokalize olduğu, golgi membranlarında, plazma membranlarında, salgı vezikül membranları ve lizozomal membranlarda bulunmadığı, NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin de sitokrom P450 sistemi ile benzer dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (Aoi *et al.* 1981).

Arınç and Philpot'un (1976) bildirdiğine göre Buege and Aust tarafından 1975 yılında yapılan çalışmalarda sıçan akciğer mikrozomlarından CPR enzimi saflaştırılmış ancak elde edilen preparatlarda hidroksilasyon reaksiyonlarındaki katalitik özellikleri belirlenememiştir. Daha önceden kendilerinin yapmış oldukları çalışmada ise (Philpot *et al.* 1975) tavşan akciğer mikrozomlarının sodyumdeoksikolat ile muamele edilmesiyle elde edilen CPR preparatlarında ise akciğer multifonksiyonel oksidaz sisteminde 7-etoksikumarin deetilasyonu ya da benzafetamin *N*-demetilasyon reaksiyonlarını desteklemediği bildirilmiştir. Ancak yapmış oldukları çalışmada tavşan

akciğer mikrozomlarını sodyum kolat ile muamele etmişler ve elde ettikleri CPR preparatların yukarıda bahsedilen reaksiyonları multifonksiyonel oksidaz sisteminde desteklediğini belirlemişlerdir (Arınç and Philpot 1976).

CPR enziminin saflaştırılması için birçok metot kullanılmıştır. Mikrozomların çözünür hale getirilebilmesi için çeşitli deterjan kombinasyonları denenmiş ve en iyi sonuçlar Emulgem 911 ya da Renex 690 gibi polietoksialkilaril eterlerle elde edilmiştir. Yasukochi and Master'in bildirdiğine göre Golf *et al.* (1974) tarafından yapılan çalışmada, redüktaz enzimini sitokrom c'yi sefaroze 4B'ye bağlayarak hazırlamış oldukları afinite kolonundan 1M KCl ile elüe edememişlerdir. Ancak kendi yapmış oldukları çalışmada Renex 690 ve sodyum deoksikolat deterjanları ile çözünür hale getirdikleri sıçan karaciğer mikrozomlarından CPR enzimini 2', 5'-ADP-Sefaroz 4B afinite kolonu ile ilk defa biyospesifik afinite kromatografisi yöntemi kullanarak saflaştırmışlardır. Çalışmada DEAE-selüloz ve ultrajel AcA 34 kolon kromatografilerini de kullanarak sıçan karaciğer mikrozomlarında CPR enzimini %40 verimle 126 kat saflaştırmışlar ve molekül kütlelerinin ise 78 kDa olduğunu belirlemişlerdir (Yasukochi and Master 1976).

Hamster karaciğeri mikrozomlarının chaps deterjanı ile çözünür hale getirildikten sonra afinite kolonu kullanılarak %58 verimle 59,5 kat saflaştırıldığı ve SDS-PAGE ile monomer molekül kütlelerinin 76 kDa olduğu bildirilmiştir (Ardies *et al.* 1987).

Kobay faresi karaciğeri (Kobayashi and Rikans 1984), kobay faresi polimorfonükleer lökositleri (Sakane *et al.* 1984), domuz karaciğeri (Yasukochi *et al.* 1980; Haniu *et al.* 1986), domuz böbreği (Yasukochi *et al.* 1980), domuz testisleri (Kuwada *et al.* 1985), koyun karaciğeri ve akciğeri (Iscan and Arinc 1986, 1988), tavşan peritoneal nötrofilleri (Laporte *et al.* 1991), insan karaciğeri (Guengerich *et al.* 1981), insan plasental mikrozomları (Muto and Tan 1986), insan nötrofil membranları (Nisimoto *et al.* 1994), sığır karaciğeri (Arinc and Celik 2002), insan beyni (Ravindranath *et al.* 1990), sıçan karaciğeri (Shephard *et al.* 1983; Porter and Kasper 1985), sıçan beyni (Bergh and Strobel 1992), sıçan testisleri (Hiroshi and Bun-ichi 1986), mikrozomlarından

saflaştırılan memeli sitokrom P450 redüktazın fonksiyonel ve yapısal özellikleri detayları ile tespit edilmiş ve bazı kinetik, yapısal ve fonksiyonel farklılıkları belirlenmiştir.

*Spodoptera eridania* larvalarından elde edilen mikrozomal çözeltinin bromelain ile muamele edilerek proteolitik olarak parçalandığı ve sephadex G-100 jel filtrasyon ile 1. ve 2. DEAE iyon değişim kromatografi teknikleri kullanılarak %33,3 verimle 405 kat saflaştırıldığı, molekül kütesinin ise 70 kDa olduğu bildirilmiştir (Crankshaw *et al.* 1979). CPR enzimi ayrıca karasinek (Vincent *et al.* 1983) gibi omurgasız canlılardan, nohut (Loerwald *et al.* 1996), nane (Ponnamperuma and Croteau 1996) gibi bitkilerden ve *rhizopus nigricans* (Makovec and Breskvar 1998) gibi ipliksi mantarlardan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Yapılan çalışmalarda enzimin farklı canlı alemlerinde tersiyer yapısının iyi korunmuş olması katalitik etkisini ve önemini göstermiştir (Jensen and Moller 2010).

Balık türlerinde ise sinarit balığı (*Stenotomus chrcsops*) karaciğerinden 225 kat saflaştırılmış ve molekül kütesi 82,6 kDa olarak bulunmuştur (Klotz *et al.* 1983). Ayrıca gökkuşağı alabalığı karaciğeri (Williams *et al.* 1983) ve ilarya balığı karaciğeri (Sen and Arinc 1997) mikrozomlarından saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

CPR enzimi monoksigenaz reaksiyonlarında elektron taransportu görevinin yanı sıra terapatik olarak önemli olan antitümör ajanları, antibiyotikler, aromatik nitro bileşikler, azo-boyalar ve kinonlar gibi yabancı kimyasalları da indirgeyebilir (Çelik 2002). NADPH-bağımlı indirgenme reaksiyonlarında reaktif oksijen türleri, karbon merkezli serbest radikaller ve reaktif metabolitlerin dönüşümleri sağlanabilir. Enzim reaktif oksijen türlerini direkt veya indirekt mekanizmalarla üretebilir. Direkt mekanizmalar süperoksit üretimi, selüler  $Fe^{+3}$ 'ün redoks döngüsü, kinonlardan hidroksil radikali, kinoidlerden serbest semikinon radikallerinin üretimini kapsar. Sitokrom P450 monooksigenaz sistemi vasıtasıyla da indirekt olarak süperoksit ve hidrojen peroksit üretimine katkı sağlar. Örneğin kinonlar redüktaz tarafından bir elektron transferi ile nükleik asit ve proteinlere kovalent olarak bağlanabilen, böylece genotoksisite ve

sitotoksositeye yol açan semikinon radikallerine indirgenebilir. Başka bir yol olarak semikinonlar moleküler oksijene bir elektron transfer ederek, moleküler oksijeni bir seri reaksiyon ile hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ) kadar hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) de üreten süperoksit anyon radikaline dönüştürebilirler. Hidroksil radikali en reaktif oksijen türüdür ve DNA sarmalının parçalanmasından, lipid peroksidasyonundan ve kinonların redoks dönüşümleri sürecinde enzim inaktivasyonlarından sorumlu olduğu bilinir. Bu özelliklerinden dolayı enzimin inhibisyonu ile karaciğerdeki farklı hastalık türlerinde reaktif oksijen türleri üretimi ve oksidatif stresin azaltılabileceği bildirilmiştir (Kappus 1986; Lu 1991; Halliwell and Auroma 1991; Pillai *et al.* 2010).

Örneğin bazı tümör türlerinin klinik tedavisinde kullanılan ve biyoredüktif alkilleyici ajan olan mitomisin c, EO9, aktive edilerek sitotoksik türlere dönüşebilmesi için indirgenmesi gerekir. Bailey *et al.* (2001) yapmış oldukları çalışmada EO9'un CPR enzimi tarafından aktive edilerek serbest radikal ve DNA'ya zarar veren türlerin oluşumunda rolü olduğunu kanıtlamışlardır. Çelik and Arınç (2008) tarafından yapılan çalışmada ise yine kanser tedavisinde kullanılan idarubisinin koyun akciğeri CPR enzimi tarafından biyoredüktif aktivasyonu aerobik koşullarda reaktif oksijen türleri üreterek DNA zincirinin kopmasına neden olan redoks aktif metabolitlerin oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. Bir naftokinon türevidir olan lapakolün CPR enzimi tarafından metabolize edilmesi sürecinde yine reaktif oksijen türleri, süperoksit anyon radikali ve hidroksil radikali üretildiği belirlenmiştir (Kumagai *et al.* 1997). Stiborova *et al.* (2008) tarafından yapılan çalışmada ise antitümör ve anti-HIV aktivitesi sergileyen, etkisini DNA'ya kovalent bağlanarak gösteren eliptisinin biyoaktivasyonunda CPR enziminin etkisi araştırılmış, CPR'den yoksun farelerde normal farelere göre karaciğerde eliptisin-DNA birleşme ürününün %65 civarında daha az olduğu belirlenmiştir.

Sıçan ve bakteri CPR enziminin üç boyutlu yapısını belirlemeye yönelik çalışmalarda flavin katalitik bölgelerin birbirini sardığı ve çok yakın olduğu belirlenmiştir. Böylece flavinler arası elektron akışı için uygun pozisyon alındığı, bununla birlikte P450 gibi potansiyel elektron alıcıların flavinden hem grubuna elektron transferini sağlamak için

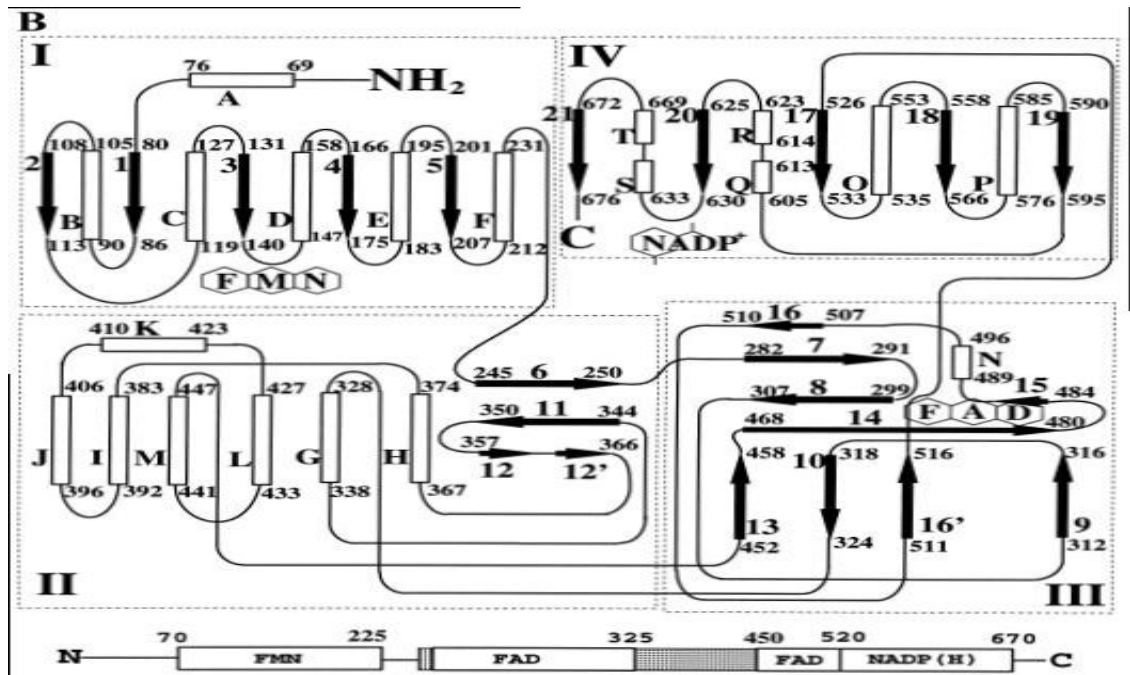
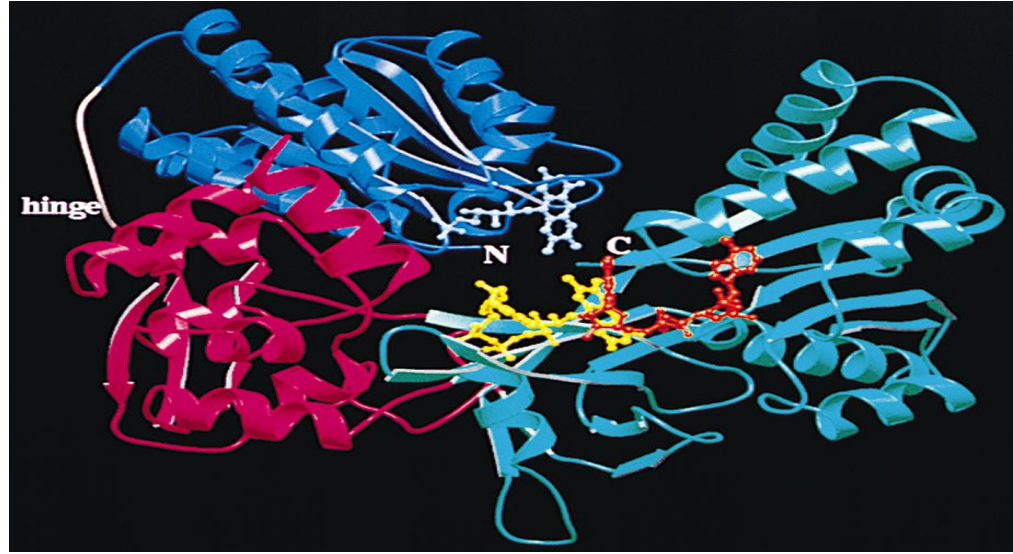
uygun mesafede bulunmasının sağlanamadığı anlaşılmıştır. Genel görüşe göre domainlerin düzenli hareketi enzimin üç boyutlu yapısının açılmasına neden olduğu, bunun neticesinde FMN bağlanma domainin önce çözücüyle ve nihayetinde P450 ile etkileştiği, bağlayıcı domainin rolünün bu hareketin kontrolü ve CPR'nin katalitik döngüsünün flavinlerin redoks durumlarına uyumu ile zaman uyumunu sağlamak olduğu bildirilmiştir (Aigrain *et al.* 2009).

Enzimin N-terminal membrana bağlanma domaini ile bazı yapısal domainlerden oluşan hidrofilik C-terminal domaini olmak üzere iki farklı fonksiyonel domaine sahip olduğu bildirilmiştir. *E.coli*'de eksprese edilen sıçan CPR enzimi tripsin ile muamele edilerek 2,6 Å çözünürlükte X-ray kristalografisi ile yapısı belirlenmiş ve molekülün N-terminalden C-terminale kadar FMN bağlanma domaini, bağlanma domaini, FAD ve NADPH bağlanma domainleri olmak üzere dört yapısal domainden oluştuğu bildirilmiştir. FMN bağlanma domaini flavodoksinin yapısına benzerken iki C-terminal dinükleotid bağlanma domaini ferrodoksin NADP<sup>+</sup> redüktaz (FNR) ile benzerlik gösterdiği, bağlanma domaininin ise FMN ile FNR benzeri domain arasında bulunduğu bildirilmiştir. İki flavin izoalloksazin halkası yan yana olduğu, aralarında 4 Å'luk bir mesafenin bulunduğu ve FMN bağlanma domaini yakınındaki kase şeklindeki yüzeyin sitokrom c ve diğer fizyolojik redoks partnerleri için bağlanma bölgesi oluşturduğu belirlenmiştir (Wang *et al.* 1997).

Çözünmüş kristal proteinin sekans analizi sonucu N-terminal rezidüsünün Ile-57 olduğu, ancak kristalografik elektron yoğunluğundan elde edilen sonuçlarda Val-64 olduğu belirlenmiş bunun da CPR enziminin N-terminal hidrofobik domain ucunun değişkenliğini kanıtladığı bildirilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar bütün enzimin bu bölgesinin proteolitik parçalanmalara karşı oldukça savunmasız ve duyarlı olduğunu gösterdiği belirtilmiş ve enzimin bütün olarak kristal halde elde edilememesinin ve üç boyutlu yapısının belirlenememesinin sebebi böylece açıklanmıştır (Wang *et al.* 1997).

Şekil 2.2.A'da görülen FMN bağlanma domaini beş  $\alpha$  heliks yapı tarafından yandan sarılmış beş sıkı, paralel  $\beta$  tabaka ile  $\beta$  tabakanın C-terminal kısmının ucuna yerleşmiş

FMN'den oluřtuđu, FAD bađlanma domainin merkezinin antiparalel dűz  $\beta$  silindir yapısında, NADPH bađlanma domainin ise bir  $\alpha$  heliks tarafından sarılmış paralel beř sıkı  $\beta$  tabakadan oluřtuđu bildirilmiřtir. İki flavin domaini arasında bulunan bađlanma domaini 240 ile 270 ve 325 ile 450 arasındaki rezidűlerden oluřtuđu ve çođunlukla  $\alpha$  heliks yapıda bulunduđu belirlenmiřtir. řekil 2.2.B'de gűrűlen heliks F ile 6 nolu iplikçik arasındaki lopun kristal yapıda net olarak belirlenemediđi, FMN domaini ile bađlanma domaini arasında bir eklem noktası oluřturduđu, FMN domaini ile bađlanma domaini arasındaki rezidűlerin çođunlukla hidrofilik olduđu dolayısıyla bu bűlgedeki etkileřimlerin elektrofilik olduđu bildirilmiřtir. Bađlanma domaini ile FAD bađlanma domaini arası ve FAD ile NADPH bađlanma domainleri arasındaki kısımların gűreceli olarak daha hidrofobik olduđu, bu űç domainin lineer sekanslarının birbirine sarılmış durumda bulunduđu ve bu nedenle de domainlerin fonksiyonel olarak birbirinden ayrılamayacađı belirtilmiřtir. Molekűlűn bűtűn olarak řeklinin 50 Å derinliđinde 70 Å geniřliđinde ve 60 Å yűksekliđinde oval kase yapısında bulunduđu bildirilmiřtir. řekil 2.2'de N-terminal bađlanma gűlgesinden yoksun enzimin űç boyutlu yapısı verilmiřtir.



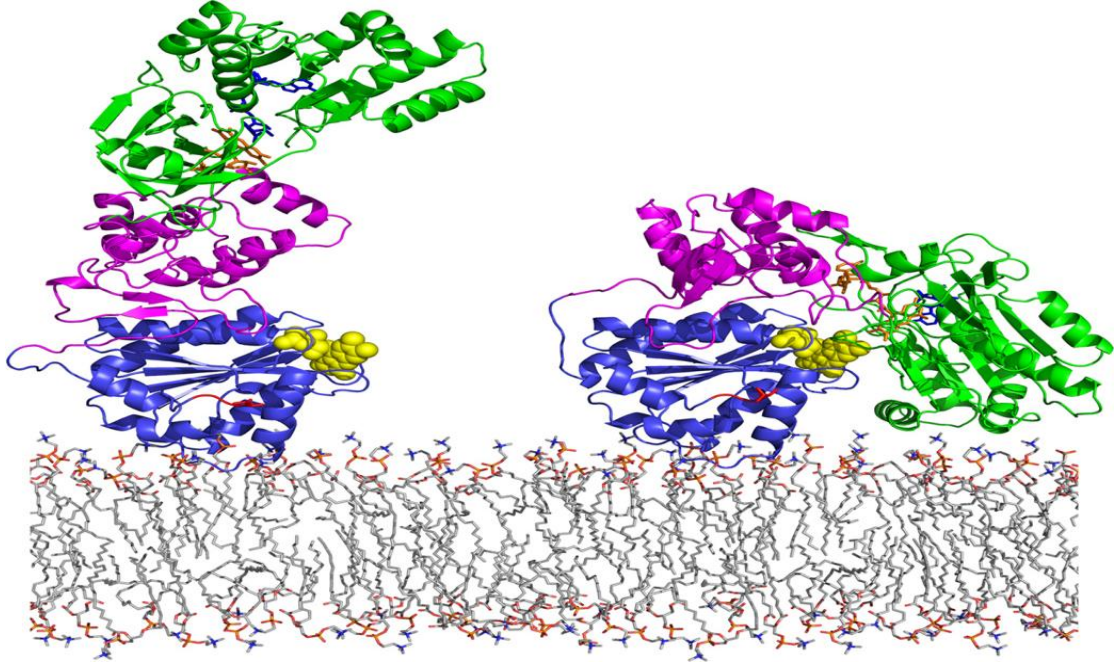
**Şekil 2.2.** (A) CPR enzimi üç boyutlu yapısı, (B) CPR proteinin kofaktör tanımda görevli bölgelerini gösteren topoloji diyagramı (Wang *et al.* 1997)

\*Mavi, FMN bağlanma bölgesi, kırmızı bağlanma domaini, yeşil, FAD ve NADPH bağlanma domainleri. Kofaktörler küre ve çubuk şeklinde gösterilmiş, FMN açık mavi, FAD sarı, NADP<sup>+</sup> turuncu, eklem (hinge) bölgesi pembe renk ile verilmiştir.  $\alpha$  heliks açık silindir,  $\beta$  tabakalar koyu oklar, düzensiz sargılar ise çizgi olarak verilmiştir. I FMN, II bağlanma, III FAD ve IV NADP<sup>+</sup> bağlanma domainleri.  $\alpha$  heliks harf ile  $\beta$  tabakalar ise sayı ile işaretlenmiştir. Lineer diyagramda kofaktör bağlanma bölgeleri belirtilmiş, çizgili kutular ise bağlanma domainini göstermektedir. Sayılar aminoasit sekansını belirtir. Lineer yapıda FAD ve bağlanma bölgeleri birbirine girmiştir

Molekülde flavinlerin ksilen halkalarının 7. ve 8. metil grupları üzerinden 150°'lik açı ile birbirine bağlandığı ve bu yapının interflavin elektron transferinde aminoasit rezidülerindeki atomların görev almadığının kanıtı olduğu bildirilmiştir. CPR ile sitokrom c arasında kenetlenmenin sağlandığı durumda FMN ve hem grubu arasındaki uzaklığın minimize edildiği, iki molekül arasında maksimum temas alanı oluşturulduğu ve bu noktada FMN ile sitokrom c'nin hem grubu arasındaki mesafenin 9 Å'un altına düştüğü belirlenmiştir. Zincir 5 ile heliks F arasındaki kısmın CPR'nin sitokrom c ve sitokrom P450'ye bağlanmasını sağlayan asidik rezidüleri içerdiği bildirilmiştir. Ayrıca bu kısmın sitokrom P450 bağlanma bölgesinin büyük bir bölümünü oluşturduğu ve sitokrom b<sub>5</sub> bağlanma yüzeyi ile de büyük ölçüde örtüştüğü belirtilmiştir. CPR enziminin elektron transfer mekanizmasında, membran bağlı fizyolojik elektron transfer partnerleri ile membran domaini arasındaki hidrofobik etkileşimlerin yukarıda bahsedilen iyonik etkileşimlere ilaveten önemli rol oynadığı bildirilmiştir. NADPH molekülünün CPR molekülünün sitoplazmik kısmına bağlanmakta olduğu ve amino ucunun membran tarafına yöneldiği, sitokrom c ve diğer elektron transfer partnerlerinin FMN ile direkt etkileşebilecek şekilde molekülün ön tarafından bağlandığı kaydedilmiştir (Wang *et al.* 1997).

Ellis *et al.* (2009) yapmış oldukları çalışmada CPR enziminin kapalı ve açık olmak üzere iki konformasyonu arasında denge olduğunu kanıtlayan deneysel bulgular elde etmişlerdir. Açık konformasyonda çözücüye maruz kalan FMN koenziminin hem demirine elektron transferini sağladığı, kapalı konformasyonun ise FAD'den FMN'ye elektron transferi sağladığı bildirilmiştir. Şekil 2.3'de enzimin kapalı ve açık formları verilmiştir. Açık ve kapalı konformasyonlarda FMN bağlanma domaininin membran yüzeyinin tam üzerinde bulunduğu öngörülmüştür. FAD/NADPH bağlanma domaininin ise bu durumun tersi olarak kapalı konformasyondan açık konformasyona geçişte membran yüzeyinden daha yukarıya çıktığı düşünülmektedir. FMN ve bağlantı domaini bir eklem ile birleşmesi FMN bağlantı domaininin hareketinin belirlenmesinde kritik öneme sahip olduğu bildirilmiştir. Bu eklem 15 aminoasitten oluştuğu ve bütün türlerde korunduğu, bu bölgedeki dört aminoasitlik delesyon sonucu elde edilen mutant proteinin üç boyutlu yapısının ciddi şekilde değiştiği ve FMN'den hem demirine

elektron transferini sağlayabilirken interflavin elektron transferini gerçekleştiremediği kaydedilmiştir (Hamdane *et al.* 2009).



**Şekil 2.3.** Konformasyonel denge (Ellis *et al.* 2009)

\*Sağda kapalı, solda ise açık form verilmiştir. FMN bağlanma domaini mavi, bağlanma domaini eflatun, FAD bağlanma domaini yeşil, FMN sarı, FAD turuncu ve NADPH ise mavi renk ile verilmiştir

CPR enziminin kapalı yapısı FAD-FMN elektron transferi için optimum konformasyon olmasına rağmen bu konformasyon FMN bağlanma domaini ile CYP'ler arasındaki etkileşim için uygun olmadığı, bunun ise CPR enziminin CYP ile etkileşimini sağlayan rezidülerin FMN koenzimini çevreleyen rezidülerin yakınında olduğunu gösterdiği bildirilmiştir. CPR'nin kapalı konformasyonunda bu rezidüler proteinin içine gömülü olduğundan elektronların NADPH'tan CYP'ye CPR aracılığı ile aktarılması sırasında enzimin büyük konformasyonel değişimlere uğraması gerektiği bildirilmiştir. Sıçan CPR enziminin karboksil ucundaki triptofan rezidüsündeki (W677) bir delesyon ya da süstitüsyonun NADP<sup>+</sup>'nin daha kuvvetli bağlandığının belirlendiği çalışma ile NADPH'ın enzime bağlanmasının C-terminal ucunda bulunan bir tirozin ya da triptofan rezidüsü tarafından düzenlendiği kanıtlanmıştır. NADP<sup>+</sup>'nin riboz-nikotinamid parçasındaki elektron yoğunluğunun düşük olması bu kısmın esnek olduğunu ve interflavin elektron transferi sırasında konformasyon değiştirdiğini gösterdiği,

indirgenmiş FAD'nin elektronları uygun yönelme ve koenzimler arasında yakınlık sağlandığında teker teker FMN'ye aktardığı ve NADP<sup>+</sup>'nin bağlanması bu elektron akışını hızlandırdığı bildirilmiştir. NADP<sup>+</sup>'nin bağlanması esnasında görülen konformasyonel değişikliklerin NAD<sup>+</sup> bağlanması esnasında gözlenmemesi NADP<sup>+</sup>'nin 2'-fosfat grubunun optimum elektron transferi için kritik öneme sahip olduğunu gösterdiği kaydedilmiş, gliserolün ise elektron transfer hızını viskoz yapısından dolayı konformasyon değişimini kısıtladığı için elektron transferini negatif yönde etkilediği belirtilmiştir (Laursen *et al.* 2010).

Tavşan karaciğer CPR enzimi için cDNA klonu kullanılarak mRNA sekansı belirlenmiş ve klonun karaciğer redüktaz mRNA'sına komplementer 2 269 nükleotid içerdiği, şifrelediği 679 aminoasitten hesaplanan molekül kütlelerinin ise 79 583 dalton olduğu kaydedilmiştir. Klonlanan cDNA'nın 68 nükleotitlik poliA kuyruğu ihtiva eden 193 nükleotitlik kodlanmayan 3' bölgesi ile kodlanmayan 39 nükleotitlik 5' bölgesi ihtiva ettiği bildirilmiş, bu cDNA'nın nükleotit sekansının sıçan redüktaz ile %85, aminoasit sekansının ise %91 benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (Katagiri *et al.* 1986). Haniu *et al.* (1989) tarafından insan karaciğer CPR enziminin aminoasit sekansı belirlenerek 676 aminoasit ihtiva ettiği, diğer memeli CPR enzimleri ile %92-95 homoloji gösterdiği, sekans farklılıklarının amino ve karboksil uçlarında bulunan hidrofilik bölgelerde olduğu bildirilmiştir.

Porter'in (1991) bildirdiğine göre CPR enziminin sekansı ilk olarak sıçanlarda belirlenmiş, memeli CPR enzimlerinin yaklaşık %90 sekans benzerliği gösterdiği, alabalık ile %79, bakteri ile de % 33 sekans benzerliği tespit edilmiştir. Fare CPR geni fare karaciğer cDNA kütüphanesinden izole edilerek analizi yapılmış ve 678 amino asiti şifrelediği bildirilmiştir. Amino asit sekansının sıçan, insan, tavşan ve domuz CPR enzimi sekansı ile yaklaşık %90 benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Ohgiya *et al.* 1992).

İnsan CPR geni 50 kb büyüklüğünde tek bir gen tarafından kodlanmakta olduğu ve 7 numaralı kromozomda lokalize olduğu, biri şifrelemeye katılmayan 16 ekzon bölgesine sahip olduğu ve 680 aminoasitlik bir proteini kodladığı bildirilmiştir (Flück *et al.* 2007).

Çelik'in bildirdiğine göre (2002) Porter *et al.* (1990) ile Shen and Kasper (1993) tarafından yapılan çalışmalar sonucu belirlenen CPR'nin ekzon yapısı enzimin bakteriyel flavodoksin ve ferrodoksin NADP<sup>+</sup> redüktaz enzim genleri arasında gen füzyonu sonucu olduğu görüşünü desteklediği belirlenmiştir. Ekzon 2'nin membran bağlanma domaini, ekzon 3'ün bağlanma domaini, ekzon 4, 5 ve 6'nın FMN bağlanma domaini, ekzon 6 ve 7'nin sitokrom c ve sitokrom P450 bağlanma bölgesini, ekzon 12, 13, 14 ve 15'in FAD ve NADPH bağlanma domainlerini şifreledikleri bildirilmiştir. Ekzon 12'nin FAD izoalloksazin halkasını, 13'ün ise pirofosfat bağlanma bölgesini şifrelediği, 13, 14 ve 15'in ise NADPH bağlanma domaini şifrelediği kaydedilmiştir. Ekzon 8, 9, 10 ve 11'in şifrelediği bölgenin ise fonksiyonu belirlenememekle birlikte interflavin elektron transferinin düzenlenmesi için iki flavinin uygun pozisyonda bir araya getirilmesi için polipeptidin doğru konumda olmasını sağlayan bölgeyi şifrelediğinin düşünüldüğü bildirilmiştir.

Dee *et al.* (1985) tarafından yapılan çalışmada adrenokortikotropik (ACTH) hormonunun sıgır adrenokortikal hücrelerde redüktazın protein ve mRNA seviyesini artırdığı belirlenmiştir. Yetişkin sıçanlarda tiroid hormonunun CPR enzimi ekspresyonu üzerine düzenleyici etkisi çalışılmış, hipofiz bezinin alınması sonucu tiroid hormonu salgılanmayan sıçanlarda veya bir antitiroid ilacı olan metimazol uygulanan sıçanlarda karaciğer mikrozomal P450 redüktaz aktivitesinin ve protein miktarının hem erkek hem de dişi sıçanlarda %75-80 azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca karaciğer dışındaki dokularda da mikrozomal P450 redüktaz aktivitesinde karaciğer dokusunda olduğu kadar olmasa da (testis haricinde böbrek, akciğer, kalp, böbrek üstü bezlerinde hipotiroid sıçanlarda %30-50 azalma) tiroid hormonu eksikliğine bağlı azalma gözlenmiştir (Ram and Waxman 1992).

Li *et al.* (2001) tarafından yapılan çalışmada ise tiroid hormonu ile (T3) muamele edilen sıçanlarda hnRNA seviyesinin 8 saat içinde 4 kat arttığını ve böylece olgun mRNA seviyesinin yükseldiği belirlenmiştir. Tiroid hormonun posttranskripsiyonel safhadaki etkisi de incelenmiş ve sitoplazmik mRNA poliA kuyruğunu 12 saat içinde 105 nükleotid uzattığını, bu uzamanın sitoplazmik mRNA yarı ömrünü 6 kat azalttığını

ancak poliadenilasyon etkisinin 16 saat içinde kaybolduğunu bildirmişlerdir (Liu and Waxman 2002).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1.Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin (BSA), N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), emulgen (polioksietilen nonilfenileter), aminokaproik asit ( $\epsilon$ -ACA), fenilmetilsülfonil florür (PMSF), bütildihidroksi toluen (BHT), trihidroksimetil amino metan (Tris), sodyum kolat hidrat (kolat), 2'-AMP,  $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat tetrasodyum tuz hidrat indirgenmiş form (NADPH), 1,4-ditioeritritol (DTT), gliserol, sitokrom c, akrilamid, glutalaldehit, sephadex G-100, N,N'-metilen bisakrilamid, Coomassie brilliant blue G-250, Coomassie brilliant blue R-250, brom timol mavisi, amonyum persülfat, molecular weight marker (M.W. 20,000-250,000), N-(2-Hidrokietyl)piperazine-N'-(2-etanesülfonik asid) (HEPES), folin reaktifi (phenol reagent), jel filtrasyon için molekül kütlesi standartları Sigma Chemical Comp.'den; 2', 5'-ADP-Sefaroz 4B Pharmacia'dan; sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, fosforik asit, etanol, metanol, izopropanol, asetik asit, sodyum asetat, potasyum klorür E. Merck AG'den; Etilendiamintetraasetik asit (EDTA),  $\beta$ -merkaptotanol, gümüş nitrat ve formaldehit Fluka'dan, protein marker V peqGOLD/peqlab'dan, sodyum hidroksit, potasyum fosfat Riedel de Haen'den, DE52 dietilaminoetil iyon değişim jeli Whatman'dan, glisin ICN Biomedicals Inc'den temin edilmiştir.

##### 3.1.2.Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Ultra santrifüj : Beckman Coulter  
Soğutmalı santrifüj : Hermle Z 323 K (Germany)  
Spektrofotometre : Beckman Coulter DU 730

|                                   |                                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| pH metre                          | : Schott pH-Meter CG840                                   |
| Elektroforez tankı                | : BIO RAD (dikey)                                         |
| Peristaltik pompa                 | : Ismatec                                                 |
| Karıştırıcı (Shaker)              | : GFL 3025                                                |
| Karıştırıcı (Vorteks)             | : Fisons whirli-mixer                                     |
| Hassas terazi                     | : Gecavery (UK)                                           |
| Otomatik pipet                    | : Eppendorf                                               |
| Çalkalayıcı                       | : Midi Dual 14                                            |
| Manyetik karıştırıcı              | : Chiltern Hotplate Magnetic Stirrer HSB1                 |
| Saf su cihazı                     | : Barnstead Easy Pure UV/U                                |
| Su banyosu                        | : Nüve                                                    |
| Kar makinesi                      | : Scotsman AF-20 (Automatic ice machines)                 |
| Güç kaynağı                       | : 1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135 |
| Buzdolapları                      | : Siemens                                                 |
| Derin dondurucu (-20°C'ye kadar): | Sanyo Medical Freezer                                     |
| Derin dondurucu (-85°C'ye kadar): | Sanyo Ultra Low                                           |

### 3.1.3. Çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

**Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarının hazırlanmasında ve enzimin saflaştırılmasında kullanılan çözeltiler**

1. 2 mM EDTA içeren soğuk %1,5'lik KCl çözeltisi (Karaciğerleri yıkamada kullanılan çözelti): 0,0584 g EDTA ve 1,5 g KCl alınarak yeteri miktarda saf suda çözülüp hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2. 2 mM EDTA, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM  $\epsilon$ -ACA içeren % 1,15'lik KCl çözeltisi (Homojenat hazırlamada kullanılan çözelti): 0,0584 g EDTA, 0,00435 g PMSF, 0,0033 g  $\epsilon$ -ACA ve 1,15 g KCl uygun miktarda saf suda sırası ile çözüldü ve hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**3.** 2 mM EDTA içeren %10'luk gliserol çözeltisi (Mikrozomal peletin alındığı çözelti): 0,0584 g EDTA ve 10 ml gliserol uygun miktarda saf su ile çözüldükten sonra hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**4.** %25 gliserol, 2 mM EDTA, 20  $\mu$ M BHT, 0,1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM  $\epsilon$ -ACA (aminokaproik asit), %0,5 Emulgen 913, %0,5 Na-kolat içeren pH'sı 7,5 olan 20 mM potasyum fosfat tamponu (Mikrozomal pelet çözeltisini deterjanla çözünebilir hale getirmek için kullanılan tampon çözelti); 0,348 g  $K_2HPO_4$ , 25 ml gliserol, 0,0584 g EDTA, 0,0004 g BHT, 0,0015 g DTT, 0,0044 g PMSF, 0,0033 g  $\epsilon$ -ACA, 0,5 ml Emulgen 913 ve 0,5 g sodyum kolat uygun miktarda saf suda çözüldükten sonra pH'sı seyreltik HCl ile 7,5'e ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**5.** Jelin hazırlanmasında kullanılan çözelti 0,2 M Tris/HCl pH 7,5 tamponu (24,2 g Tris alındı. 800 ml saf suda çözüldü, pH-metre kullanılarak 1 M HCl ile pH 7,5 ayarlandı ve son hacim saf suyla 1 L'ye tamamlandı.

**6.** %20 gliserol, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM  $\epsilon$ -ACA, %0,5 Emulgen 913, %0,2 kolat içeren 20 mM potasyum fosfat, pH 7,7 (İyon değişim kromatografisinde kullanılan dengeleme ve yürütme tamponu); 1,16 g EDTA, 0,03 g DTT, 0,086 g PMSF, 0,066 g  $\epsilon$ -ACA, 10 ml emulgen, 4 g sodyum kolat 400 ml gliserol ve 5,44 g  $KH_2PO_4$  alındıktan sonra 1500 ml saf suda çözüldü. pH'sı 7,7'ye ayarlandıktan sonra hacim 2 litreye tamamlandı.

**7.** Elüsyon tamponu: 0,05 M KCl içeren elüsyon çözeltisi için 0,3728 g KCl 80 ml 5 numaralı tampon içerisinde çözüldükten sonra hacmi yine 5 numaralı tampon ile 100 ml'ye tamamlandı. 0,1 M için 0,7456 g, 0,15 M için 1,1184 g, 0,2 M için 2,9824 g, 0,3 M için 4,4736 g KCl alınarak yukarıdaki işlemler yapıldı.

**Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:**

1. 300 mM K-fosfat (pH 8,0) /0,1 mM EDTA: 4,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 0,003 g EDTA tartılarak 90 ml saf suda çözüldü, pH 8,0'a ayarlandı ve toplam hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandı.
2. Sitokrom c çözeltisi: 0,0048 g sitokrom c aktivite ölçüm tamponunda çözülerek son hacim tampon ile 10 ml'ye tamamlandı.
3. NADPH çözeltisi: 0,0042 g NADPH 5 ml saf suda çözülerek hazırlandı.
4. %0,05 (w/v) sığır serum albumin çözeltisi: 0,005 g sığır serum albümin proteini alınarak yeteri miktarda saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
5. HEPES tamponu: Hazır süspansiyon halinde alınan 1 M'lık HEPES tamponundan 60 ml alınarak pH'sı 1M olan NaOH ile 8,0'a ayarlandıktan sonra hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
6. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan sitokrom c çözeltisi: 0,0096 g sitokrom c uygun miktar HEPES'te çözülerek son hacim HEPES tamponu ile 10 ml'ye tamamlandı.

**Lowry yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler:**

1. 0,8 N NaOH çözeltisi: 32 g (0,8 mol) NaOH tartılarak yeteri miktarda suda çözülerek son hacim saf suyla bir litreye tamamlandı.
2. Lowry reaktifi A: 0,2 g sodyum tartarat ve 10 g sodyum karbonat 55 ml 1 N NaOH içinde çözüldükten sonra toplam hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.

3. Lowry reaktifi B: 2 g sodyum tartarat ve 1 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  yeteri miktarda 0,1 N NaOH içinde çözüldükten sonra toplam hacim 0,1 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlandı.

4. Lowry reaktifi C: Ticari folin reaktifinin saf suyla 1/2 (V/V) oranında karıştırılması ile taze olarak hazırlandı.

#### **Elektroforez için kullanılan çözeltiler:**

1. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin tartılarak 450 ml saf suda çözüldü. %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

2. Ayırma jeli tamponunun hazırlanması; 12,11 g Tris (1 M) 80 ml saf suda çözüldü. Seyreltik HCl ile pH 8,8'e ayarlandıktan sonra saf su ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3. Yığılma jeli tamponunun hazırlanması; 12,11 g Tris (1 M) 80 ml saf suda çözüldükten sonra seyreltik HCl ile pH 6,8'e ayarlandı ve hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4. Jel çözeltisinin hazırlanması (%30 Akrilamid, %0,8 Bisakrilamid çözeltisi); 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g saf su karıştırılarak çözüldü.

5. %10 SDS çözeltisi; 10 g SDS saf su içerisinde yavaşça karıştırılarak çözülüp hacim 100 ml'ye tamamlandı.

6. %10 Amonyum per sülfat çözeltisi; 1 g amonyum per sülfat uygun miktar saf suda çözülerek son hacim 10 ml'ye saf su ile tamamlandı.

7. %0,1'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.

**8.** Numune Tamponu; 0,5 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0), 1 ml %10'luk SDS ve 1 ml %100'lük gliserin, 1 ml %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampon kullanılmadan hemen önce, 950 µl numune tamponunda 50 µl olacak şekilde β-merkaptotanol ilave edildi. Örnekler sulandırma tamponu ile 1/3 oranında sulandırıldı.

### **Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler**

**1.** Tespit çözeltisi: 30 ml %96'lık etanol ve 10 ml asetik asit karıştırılarak saf su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**2.** Redüksiyon çözeltisi: 4,8 gram sodyum asetat 45 ml etanol, 80 ml saf su karıştırıldı. Sodyum asetat çözündükten sonra asetik asit ile pH 6,0'a ayarlandı. Daha sonra 0,234 mg sodyum tiyosülfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ve 4 ml glutalaldehit (%75'lik) eklenip hacim saf su ile 150 ml'ye tamamlandı.

**3.** Boyama çözeltisi: 150 mg gümüş nitrat, 150 ml saf su ve 30 µl formaldehit karıştırıldı. Bu boyama çözeltisi boyama işlemine başlamadan 7-8 dakika önce koyu renkli cam şişede hazırlanıp kullanılana kadar karanlıkta bekletildi.

**4.** Birinci yıkama çözeltisi: 3,75 g sodyum karbonat, 270 ml saf su ve 120 µl formaldehit karıştırıldı.

**5.** İkinci yıkama çözeltisi: 1 ml gliserol, 12,5 ml asetik asit ve 236,5 ml saf su karıştırıldı.

### **Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözeltiler**

1. 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl pH 7,5 (jel filtrasyon kolonunun paketlenmesi, dengelenmesi ve satandartların çözülmesi için kullanılan tampon): 6,055 g Tris, 7,45 g KCl alınarak 950 ml saf suda çözüldükten sonra pH 7,5'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

### **Çalışmamızda kullanılan metal çözeltiler**

1. 0,1 M  $\text{AgNO}_3$  çözeltisi: 0,169 gr  $\text{AgNO}_3$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

2. 0,1 M  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi: 0,297 gr  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

3. 0,1 M  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi: 0,291 gr  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

4. 0,1 M  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi: 0,308 gr  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

5. 0,1 M  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi: 0,249 gr  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

6. 2 mM  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  çözeltisi: 0,0068 gr  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

7. 0,1 M  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi: 0,237 gr  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

**8.** 0,1 M  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi: 0,246 gr  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

**9.** 0,1 M  $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi: 0,251 gr  $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

**10.** 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi: 0,110 gr  $\text{CaCl}_2$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

**11.** 40 mM  $\text{As}_2\text{O}_5$  çözeltisi: 0,092 gr  $\text{As}_2\text{O}_5$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

**12.** 0,1 M  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisi: 0,331 gr  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

**13.** 0,1 M  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi: 0,666 gr  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

**14.** 0,1 M  $\text{Tl}_2\text{SO}_4$  çözeltisi: 0,5048 gr  $\text{Tl}_2\text{SO}_4$  tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

#### **Çalışmada kullanılan antibiyotik ve etken madde çözeltilerinin hazırlanması**

**1.** 0, 403 M oksitetrasiklin çözeltisi: 200 mg oksitetrasiklin dihidrat tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 1 ml'ye tamamlandı.

**2.** 0, 429 M Kanamisin sülfat çözeltisi: 250 mg kanamisin sülfat tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 1 ml'ye tamamlandı.

3. 0,069 M Gentamisin sülfat çözeltisi: 80 mg gentamisin sülfat tartılıp uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 2 ml'ye tamamlandı.

4. 0,0165 M benzalkonium klorid çözeltisi: 700 mg benzalkonium klorid uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

5. 0,00935 M akriflavin çözeltisi: 209,7 mg akriflavin uygun miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal pelet çözeltisinin hazırlanması**

Van Gölü balıkları Edremit kıyılarından balık ağı ile yakalandıktan sonra derhal buz içerisine alındı. Laboratuara getirilen balıklar dekapite edilerek karaciğerleri alındı. Karaciğerler mikrozomal çözelti hazırlanıncaya kadar -80°C'de bekletildi.

Mikrozomlar yaklaşık 12-15 adet balık karaciğerinden hazırlandı. Laboratuarda -80°C'den çıkarılan karaciğer numuneleri 2 mM EDTA içeren %1,5'lik soğuk KCl çözeltisi ile yıkandı. Bundan sonraki bütün çalışmalar 0-4°C arasında gerçekleştirildi. Bir filtre kağıdı üzerinde bekletilerek süzülmesi ve kuruması sağlanan karaciğerler bıçak yardımıyla yaklaşık 100 mg ağırlığındaki küçük parçalara ayrıldı. Yeteri miktarda küçültülmüş karaciğer parçaları 2 mM EDTA, 0,25 mM PMSF ve 0,25 mM  $\epsilon$ -ACA içeren %1,15'lik KCl çözeltisi içerisinde homojenizatör kullanılarak homojenat hazırlandı. Homojenizatör 15 saniyelik aralıklarla 10 saniye çalıştırıldı ve bu işlem 4-5 defa tekrarlandı. Bu işlemde kullanılan çözelti hacmi karaciğer ağırlığının 2,5 katı olarak belirlendi. Balıklarda bol miktarda bulunan çoklu doymamış yağlarda lipid peroksidasyonunu önlemek için homojenattaki EDTA konsantrasyonu 2 mM olarak kullanıldı.

Elde edilen homojenat 18 000 g'de 40 dakika santrifüj edilerek hücre parçaları, çekirdek ve hücre mitokondrisi çöktürüldü. Endoplazmik retikulum ve diğer çözünebilen hücre fraksiyonları içeren süpernatant Buchner hunisi vasıtasıyla çift kat filtre kağıdı kullanılarak ve gevşek çökeltinin süpernatanta bulaşmasından kaçınarak süzüldü.

Mikrozomlar 210 000 g'de ultrasantrifüj kullanılarak 60 dakika santrifüj edilerek süpernatant çözeltisinden çöktürüldü. Süpernatant dikkatli bir şekilde boşaltıldı ve yumuşak bir pelet oluşturan mikrozomlar 2 mM EDTA içeren %1,5'lik KCl çözeltisi ile çözüldü ve 210 000 g'de 60 dakika santrifüj edilerek tekrar çöktürüldü. Oluşan süpernatant tekrar uzaklaştırıldı.

Yıkanan mikrozomal pelet 2 mM EDTA içeren %10'luk gliserol çözeltisi içinde çözüldü. Çözme işleminde karaciğerin her bir gramı için 0,5 ml süspansiyon çözeltisi kullanıldı. Homojen bir süspansiyon elde etmek için homojenizatör kullanıldı.

Böylece elde edilen 25-40 mg/ml derişiminde protein içeren mikrozomal süspansiyon ependorf tüpleri içerisinde -80°C'de NADPH-sitokrom P450 redüktaz saflaştırmak üzere saklandı.

### **3.2.2. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin saflaştırılması**

NADPH-sitokrom P450 Redüktaz balık karaciğeri dokusundan saflaştırıldı. Bu işlemde ilk olarak karaciğer hücre mikrozomları elde edildi. Daha sonra hazırlanan bu mikrozomal çözelti deterjanla muamele edilerek çözünebilir hale getirildi. Elde edilen süpernatant sırasıyla birinci ve ikinci DEAE-selüloz iyon değişim kolonuna tatbik edildi.

### 3.2.2.a. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarının çözülmesi

Karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi, karaciğer mikrozomlarının Emulgen 913 ve sodyum kolat ile muamele edilmesi ile çözünebilir hale getirildi. Sitokrom P450'nin yüksek oranda çözünebilmesi için 5 mg/ml mikrozomal protein, %25 gliserol, 2 mM EDTA, 20 µM BHT, 0,1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM ε-ACA, %0,5 Emulgen 913, %0,5 Na-kolat içeren 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,5) kullanıldı. Van Gölü balığı tipik karaciğer mikrozomal sitokrom P450 çözeltisinin hazırlanışı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Van Gölü balığı tipik karaciğer mikrozomal sitokrom P450 çözeltisinin hazırlanışı

| Stok Çözeltisi                      | Alınması Gereken Miktar | Final Konsant. |
|-------------------------------------|-------------------------|----------------|
| 1 M Potasyum Fosfat Tamponu, pH 7,5 | 2,5 ml                  | 20 mM          |
| Gliserol                            | 30 ml                   | %25            |
| 100 mM EDTA, pH 7,5                 | 0,55 ml                 | 2 mM           |
| 100 mM BHT                          | 0,025 ml                | 20 µM          |
| DTT                                 | 2 mg                    | 0,1 mM         |
| 100 mM ε-ACA                        | 0,31 ml                 | 0,25 mM        |
| 100 mM PMSF                         | 0,31 ml                 | 0,25 mM        |
| Saf su                              | 59,3 ml                 | -              |
|                                     |                         |                |
| Mikrozomlar (32 mg/ml)              | 19,5 ml                 | 5 mg/ml        |
| %10 (v/v) Emulgen 913               | 6,25 ml                 | %0,5           |
| %10 (w/v) Na-kolat                  | 6,25 ml                 | %0,5           |
| Son Hacim                           | 125 ml                  | -              |

İlk olarak mikrozom sulandırma tamponu (Çizelge 3.1'de birinci kısım) hazırlandı ve mikrozomlar bu tampona ilave edildikten sonra kuvvetli bir şekilde çalkalandı. Emulgen 913 ve sodyum kolat sırayla ve manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak damla damla

10 dakika içerisinde ilave edildikten sonra buz banyosu içerisinde 40 dakika daha karıştırılmaya devam edildi. Daha sonra deterjanla parçalanmış mikrozomları içeren süspansiyon 210 000 g'de 60 dakika santrifüj edildi. Berrak sarı süpernatant alındı ve pelet atıldı.

### 3.2.2.b. DEAE kolonunun hazırlanması

DEAE iyon değişim kromatografisinde kullanılan kolon dolgu materyali hazır olarak satın alındığından şişirme işlemine gerek kalmadı. Islak iyon değişim jelinden birinci DEAE-selüloz kolonu için 20 g, ikinci DEAE-selüloz kolonu için 10 g tartılarak 15-30 ml/g oranında ve konsantr (0,2-1 M) potasyum fosfat tamponu ile karıştırıldı ve 2-3 dakika bekletildi. Daha sonra karışımın pH'sı asit veya baz ile 7,5'e ayarlandı. Jelin bir süre dibe çökmesi beklendi. Daha sonra süpernatant dekante edildi. Dibe çöken jel tekrar tampon ile 30 ml/g oranında süspanse edildi. Uygun hacmi ölçülebilen bir cam silindire tatbik edilen karışımın dibe çökmesi beklendi. Bekleme süresi  $t=n.h$  formülünden hesaplandı.

Burada ;

$t$ = zaman (dakika)

$h$ = jelin kolon içerisindeki yüksekliği (cm)

$n$ = 1,3 ile 2,4 arasında değişen bir faktör

Dibe çöken jelin hacmi hesaplandı ve bu hacim kolon tatbikinden sonra elde edilen yatak hacmine eşit olduğu belirlendi. Süpernatant derhal dekante edildi. Daha sonra 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,7) ile kolona tatbik edildi ve yatak hacminin 6-8 katı hacimde tampon ile kolon yıkandı. Böylece kolon örneğin tatbikine hazır hale gelmiş oldu.

### 3.2.2.c. Birinci DEAE-selüloz kolon kromatografisi

Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant tampon A (%20 gliserol, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM  $\epsilon$ -ACA, %0,5 Emulgen 913, %0,2 kolat içeren 20 mM potasyum fosfat, pH 7,7) ile dengelenen DEAE-selüloz iyon değişim kolonuna uygulandı ve akış hızı 45 ml/saat olacak şekilde ayarlandı. Kolon, 300 ml tampon A ile yıkandı.

Yıkama işlemi bittikten sonra elüsyon işlemine geçildi. Elüsyon sırasıyla 100'er ml 0,05 M KCl, 0,1 M KCl, 0,15 M KCl, 0,2 M KCl ve 0,3 M KCl içeren tampon A ile yapıldı. İşlem sırasında kolondan enzimin 0,15 M KCl içeren tampon A uygulamasından sonra geldiği gözlemlendi.

### 3.2.2.d. İkinci DEAE-selüloz kolon kromatografisi

Birinci DEAE-selüloz kolonundan elde edilen yüksek miktarda aktivite gösteren NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi içeren 0,15 M KCl ihtiva eden tampon A fraksiyonları, bir kısma iki kısım dengeleme tamponu ilave edilerek seyreltildikten sonra %20 gliserol, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 mM  $\epsilon$ -ACA, %0,5 Emulgen 913 ve %0,2 Na-kolat içeren 20 mM potasyum fosfat (pH 7,7) tamponu ile dengelenmiş ikinci DEAE-selüloz kolonuna tatbik edildi. Örnek kolona uygulandıktan sonra tampon A ile kolon yıkandı. Bu işlemi takiben sırasıyla 0,075M KCl, 0,15 M KCl ve 0,3 M KCl ihtiva eden tampon A ile elüsyon işlemi yapıldı. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin yine 0,15 M KCl içeren tampon A çözeltisi tatbik edildikten sonra geldiği gözlemlendi.

### **3.2.3. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin karakterizasyon çalışmaları**

#### **3.2.3.a. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum pH'nın bulunmasına yönelik çalışmalar**

Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'sı 6,6, 7,0, 7,4, 7,7, 8,0 olan 0,3 M K-fosfat ve pH'sı 8,2 olan 0,3 M Tris/HCl tamponları hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesi belirlendi.

#### **3.2.3.b. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar**

Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla optimum pH'da 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500 ve 1800 mM K-Fosfat tamponları kullanılarak sitokrom c çözeltisi hazırlandı ve böylece enzim için optimum iyonik şiddet tespit edildi.

#### **3.2.3.c. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar**

Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı soğutmalı su banyosu kullanıldı. Aktivite ölçümü için gerekli olan tampon ve substratları ihtiva eden karışım küvet içerisinde ilgili sıcaklığa ayarlı su banyosunda su banyosunun sıcaklığına ulaşıncaya kadar bekletildi. 0°C ile 70°C arasında 10'ar °C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı.

### **3.2.3.d. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışmalar**

Stabil pH'yı belirlemek amacıyla fosfat tamponundan pH 7,2, 7,6, 7,8, 8,0 ve Tris-HCl tamponundan pH 8,2, 8,4 ve 8,8 olan tamponlar hazırlandı. 0,5 ml enzim 0,5 ml bu tamponlardan olmak üzere ependorf tüplerine alındı. Başlangıçta, 12 saat sonu, 24 saat sonu ve takiben 24 saat arayla 4 gün daha aktivite ölçümleri yapıldı. Enzim aktivitesi-saat grafiği çizilerek sonuçlar değerlendirildi.

### **3.2.3.e. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) ve $Q_{10}$ değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar**

Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum sıcaklığı belirleme işlemi yapıldıktan sonra  $E_a$  ve  $Q_{10}$  değerlerinin belirlenmesi amacıyla optimum sıcaklık çalışmasından elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları ( $\log k$ ) alındı. Sıcaklık değerleri Kelvin cinsinden hesaplandı ve grafikte  $1/T \times 1000^{-1}$  olarak ifade edildi (Danişan *et al.* 2004). Daha sonra bu grafikten faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde edildi ve bu eğrinin eğimi hesaplandı. Eğim değeri kullanılarak aşağıdaki formülden aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) hesaplandı.

$$Eğim = \frac{-E_a}{2,303 \times R}$$

(Segel 1975; Wilson 1971; Onganer *et al.* 1998). Daha sonra bir enzim için, 10 ° C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı olan  $Q_{10}$  değeri, aralarında 10° C fark olan iki aktivite değerinden yüksek olanın düşük olan aktivite değerine bölünmesi ile hesaplandı (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

### 3.2.3.f. NADPH ve sitokrom c substratları için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c ve NADPH substratları için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini belirlemek için sabit sitokrom c konsantrasyonunda NADPH'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADPH için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADPH'nin sabit konsantrasyonunda sitokrom c'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve sitokrom c için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Lineweaver and Burk 1934).

### 3.2.3.g. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz enziminin sitokrom c substratı için $k_{cat}$ ve özgülük sabitinin ( $V_0$ ) bulunmasına yönelik çalışmalar

Sitokrom c için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri 2.2.3.f'de anlatıldığı şekilde hesaplandıktan sonra  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplanması için gerçekleştirilen deneyde kullanılan enzim çözeltisinde kantitatif protein tayini yapılarak toplam enzim ( $E_T$ ) miktarı bulundu. Enzimin turnover sayısını gösteren  $k_{cat}$  değeri

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_T}$$

formülü kullanılarak hesaplandı.

Çeşitli enzimlerin katalitik etkilerinin veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasında kullanılan özgülük sabiti ( $V_0$ ),

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M}$$

formülünden hesaplandı (Nelson and Cox 2005).

### **3.2.3.h. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin tabii molekül kütlelerinin tayini**

Jel filtrasyon kromatografisi ile enzimin tabii molekül kütlelerinin belirlemek amacıyla önceden 40 ml yatak hacmi elde etmek için 3 g Sephadex G-100, 500 ml saf su içine alındı. 90°C’de su banyosunda bekletilerek jelin (Sephadex G-100) şişirilmesi sağlandı. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu vakumu ile uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali 100 mM KCl içeren ve pH 7,5 olan 50 mM Tris-HCl tamponuyla dolu kolona, içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatle paketlenerek aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini belirlemek için üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH ve 280 nm’de absorbans değerleri aralıklarla ölçüldü ve bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi. Kolonun akış hızı 25 ml/h olarak ayarlandı. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılacak olan standart grafiği elde edebilmek için kolondan önce standart proteinler geçirildi. Standart olarak, blue dekstran; 2 000 kDa, maya alkol dehidrogenaz; 150 kDa, albumin (sığır serum); 66 kDa sığır eritrosit karbonik anhidraz; 29 kDa, sitokrom c 12,4 kDa ayrı ayrı kolona uygulandı (Keha and Küfrevioğlu 2004).

Kolon dengeleme işlemi gerçekleştirildikten sonra jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi. Kolona standart protein çözeltilerinden 2’şer ml tatbik edildi. Kolona uygulanan protein çözeltisi jel tarafından tamamen emildikten sonra üzerine birkaç ml elüsyon tamponu 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl (pH 7,5) ilave edilerek tekrar jele emdirildi. Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla dolduruldu. Elüatlar 1’er ml kısımlar halinde ependorf tüplerinde toplandı. Elüsyon tamponu kör olarak kullanıldı ve toplanan elüatların 280 nm’de absorbansları ölçülerek kaydedildi. Elüsyon işlemine 280 nm’deki absorbans değerleri 0,05 oluncaya kadar devam edildi. Enzim elüe edilirken tüplerde 550 nm’de aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm’de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Enzimin molekül kütlelerini belirlemek üzere her bir protein için  $K_{av}$  değerleri ve Log MK değerleri

hesaplandı. Log MK- $K_{av}$  grafiği çizildikten sonra Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz enziminin  $K_{av}$  değeri belirlenerek grafik yardımıyla enzimin doğal halinin molekül kütlesi hesaplandı.

Aşağıdaki formül kullanılarak  $K_{av}$  değeri hesaplandı ve Log MK- $K_{av}$  grafiği çizildi.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

$V_o$ = void hacim,  $V_e$ = elüsyon,  $V_t$ = kolon yatak hacmi

### **3.2.4. Van Gölü balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine bazı ilaç ve metal iyonlarının *in vitro* etkilerinin belirlenmesi**

İlaçların ve bazı metal iyonlarının enzimlerin aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla kuvvet ortamına farklı miktar ve konsantrasyonlarda ilaç ve metal iyonu katılarak aktivite değerleri ölçüldü. Burada yapılan aktivite ölçümlerinde fosfat tamponu yerine 0,3 M pH 8,0 olan HEPES tamponu kullanıldı. Çünkü fosfat tamponu sisteminde kadmiyum ve nikel gibi metal iyonlarının çöktüğü daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Bozcaarmutlu and Arınç 2007). İlaç ve metal iyonlarının inhibisyon etkileri mümkün olan en düşük konsantrasyonlarda ön denemelerle belirlendi.  $IC_{50}$  değerlerin belirlenmesi için % aktivite-[I] inhibitör konsantrasyonu grafiği çizildi. Bu amaçla aktivite ölçümleri 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda yapıldı.

Bu ilaç ve metal iyonlarından inhibisyon etkisi gösterenler için  $K_i$  değerlerini belirlemek amacıyla enzimlerin aktivitesini yarıya düşüren ilaç konsantrasyonu ile bu değer altında ve üstünde iki sabit ilaç ve metal iyonu konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Uygun substrat konsantrasyonlarını belirlemek için ön denemeler yapıldı. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon türleri belirlendi. Grafik denkleminde inhibisyon türüne göre aşağıdaki formüllere göre  $K_i$  sabitleri belirlendi.

Yarışmasız inhibisyon için;

$$V_{max}^I = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Yarışmalı inhibisyon için;

$$K_M = \frac{K_M^I}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

### 3.3. Analitik Metotlar

#### 3.3.1. Protein tayini

##### 3.3.1.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Kromatografi işlemlerinde eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda bu metod yardımıyla kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbandsları spektrofotometrede köre karşı okundu.

##### 3.3.1.b. Lowry yöntemi ile protein tayini

Mikrozomal çözelti eldesi, deterjanla çözünür hale getirilmesi ve saflaştırma basamaklarında elde edilen çözeltilerdeki protein miktarı tayinleri Lowry yöntemi ile yapıldı. Bu yöntem Folin reaktifinin aromatik amino asitlerle indirgenmesi esasına dayanmaktadır . Bu yöntemin hassasiyeti 1-200 µg’dır (Nelson and Cox 2005).

Protein tayini işlemi için önce standart bir eğri hazırlandı. Bunun için 8 ayrı ependorf tüpüne standart serum albumin çözeltisinden (0,5 mg/ml); 0, 20, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 µl pipetlendi ve daha sonra toplam hacimler destile suyla 600 µl 'ye tamamlandı. Her bir tüpe %24'lük TCA çözeltisinden 200 µl ilave edilerek karıştırıldı. Böylece enzimlerin denatüre olarak çökmesi sağlandı. Tüpler 5 dakika kadar 1500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra proteinler tüp tabanına çöktüğünden üstteki sıvı döküldü ve tüpler baş aşağı çevrildi. 1-2 dakika kadar süzgeç kâğıdı üzerinde tutularak içindeki sıvı kısmının tamamen uzaklaşması sağlandı. Her tüpe 450 µl reaktif karışımı eklenerek karıştırıldı ve daha sonra 2x300 µl Lowry reaktifi C, iki kısım halinde 1-2 dakika zaman aralığıyla ilave edilerek iyice karıştırıldı. 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 750 nm'de 1. tüpe karşı bütün tüpler sırasıyla okundu. Absorbans değerleri, µg proteine karşılık grafiğe geçirilerek standart grafik elde edildi. Bu işlemlere paralel olarak, uygun miktarlarda numune 2 ayrı tüpe alınarak aynı şekilde çalışıldı ve sonuçlar standart grafik kullanılarak hesaplandı (Robyt and White 1987).

Deney sırasında kullanılan reaktif karışımının hazırlanışı: 25 birim 0,8 N NaOH, 18 birim Lowry reaktifi A, 2 birim Lowry reaktifi B ihtiyaç duyulduğu kadar karıştırıldı. Bu işlem deneyden hemen önce yapıldı.

### 3.3.2. NADPH-sitokrom P450 redüktazın aktivite tayini

NADPH-sitokrom P450 Redüktaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Master *et al.* (1967) yöntemine göre belirlendi. Aktivite tayininin esası 550 nm'de indirgenmiş sitokrom c'nin oranının belirlenmesine dayanır. Aktivite tespiti enzim tarafından sitokrom c'nin indirgenmesi ve indirgenen sitokrom c'nin 550 nm'de sebep olduğu absorbans artışının belirlenmesi ile yapıldı. Bu indirgenme reaksiyonu oda sıcaklığında 0,3 M, pH 8,0 olan potasyum fosfat tamponu içerisinde vuku bulur. Reaksiyon karışımı 0,92 ml sitokrom c (0,3 M, pH 8,0 olan potasyum fosfat tamponu içerisinde 0,48 mg/ml sitokrom c), 0,1 ml NADPH (1mM konsantrasyonunda ve taze olarak hazırlanmış) çözeltisi ve uygun miktarda sitokrom P450 redüktaz örneği (0,08 ml) içerir. Reaksiyon NADPH çözeltisinin ilavesi ile başlatıldı ve 60-180 saniye arasında dakikada bir olmak

üzere oda sıcaklığında 550 nm’de absorbans değişimi spektrofotometre ile 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanılarak takip edildi. Enzim aktivitesi  $19,6 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  ekstinksiyon katsayısı kullanılarak sitokrom c’nin indirgenmiş ve okside formlarının absorbans farkından;  $EU/ml = \frac{\Delta A_{550 \text{ test}} - \Delta A_{550 \text{ blank}}}{19,6} \cdot \frac{1,1}{(df)}$  formülü kullanılarak hesaplandı.

Burada;

1,1= Toplam hacim (ml)

df= Seyreltme faktörü

19,6= sitokrom c’nin okside ve redükte formları arasındaki ekstinksiyon katsayısı farkı

0,08= kullanılan enzim miktarı (ml)

### 3.3.3. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970). Bunun için elektroforez plakaları önce sırasıyla su ve alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Ayırma jelin üst kısmında izobütanolden bir katman oluşturuldu. 30 dakika jelin donması beklendi. Jel donduktan sonra üst kısımdaki izobütanol tamamen uzaklaştırıldı. Müteakiben yığma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığma jelinin katılaşması beklenirken ısılatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatılarak jelin kuruması önlendi. Yığma jelinin katılaşması için 30 dakika bekletildikten sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 10 µg protein olacak şekilde

hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1/1 oranında numune tamponu ve gliserol katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak (+) anot ve (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 30 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip burada yığıldı. Sonra akım 120 volt'a çıkartılarak numuneler jelin alt sınırına gelene kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak %0,1 Coomassie Brilliant Blue R, %50 metanol, %12 glisial asetik asit içeren boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak %7 glisial asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi içerisinde proteinlere tutunmayan boyar maddeyi uzaklaştırmak için yıkama işlemine tabi tutuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi. Protein miktarının az olduğu numune uygulamalarında ise jel gümüş boyamaya tabi tutuldu. Bu işlemde jel önce tespit çözeltisinde 30 dakika çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Daha sonra jel redüksiyon çözeltisine alındı ve 30 dakika redüksiyon çözeltisinde bekletildi. 3 defa 5'er dakika saf su ile yıkanan jel gümüş boyama çözeltisine alındı. 20 dakika boyama işlemine tabi tutulan jel birinci yıkama çözeltisine alındıktan sonra bantların belirginleştiği görülür görülmez ikinci yıkama çözeltisine alındı. 20 dakika ikinci yıkama çözeltisinde bekletilen jelin fotoğrafı çekildi.

### 3.3.3.a. Yığma ve ayırma jellerinin hazırlanması

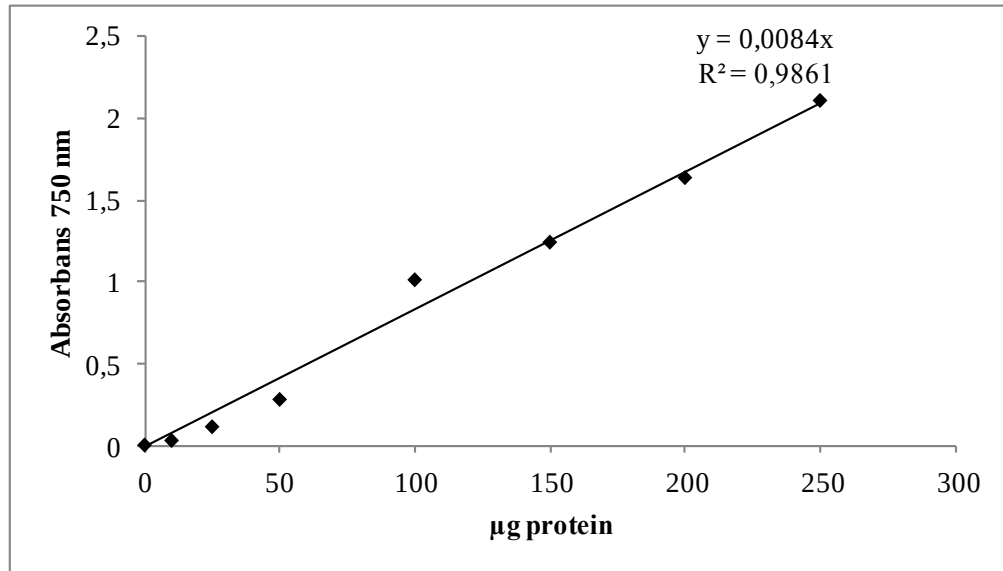
Yığma ve ayırma jellerini hazırlamak için aşağıdaki pipetlemeler yapıldı.

| Bileşenler                                                             | Ayırma Jeli (%10) | Yığma Jeli (%3) |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|
| Destile Su (ml)                                                        | 3,13              | 2,45            |
| 1 M Tris pH 8,8 (ml)                                                   | 5                 | -               |
| 1 M Tris pH 6,8 (ml)                                                   | -                 | 0,41            |
| %10 SDS (ml)                                                           | 0,2               | 0,03            |
| %10 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (ml) | 0,1               | 0,03            |
| TEMED (ml)                                                             | 0,13              | 0,03            |
| Toplam Hacim                                                           | 8,56              | 2,95            |

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Lowry yöntemiyle yapıldı. Bu amaçla öncelikle standart grafik hazırlandı. Enzim çözeltilerindeki protein tayinleri Lowry yöntemiyle yapıldıktan sonra Şekil 4.1'deki standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı.



Şekil 4.1. Lowry metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

##### 4.2. Van Gölü Balığı Karaciğerinden NADPH-sitokrom P450 Redüktaz Enziminin 1. ve 2. DEAE İyon Değişim Kromatografisi İle Saflaştırılma Sonuçları

Sodyum kolat ve emulgen 913 deterjanları ile çözünür hale getirilen Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal çözeltisi önce 1. DEAE-selüloz iyon değişim kolonuna yüklendi. Elüsyon sonucu aktivitenin en yüksek olduğu tüpler birleştirilerek iyon değişim kolonu dengeleme tamponu ile ½ oranında seyreltildikten sonra 2. DEAE-selüloz iyon değişim

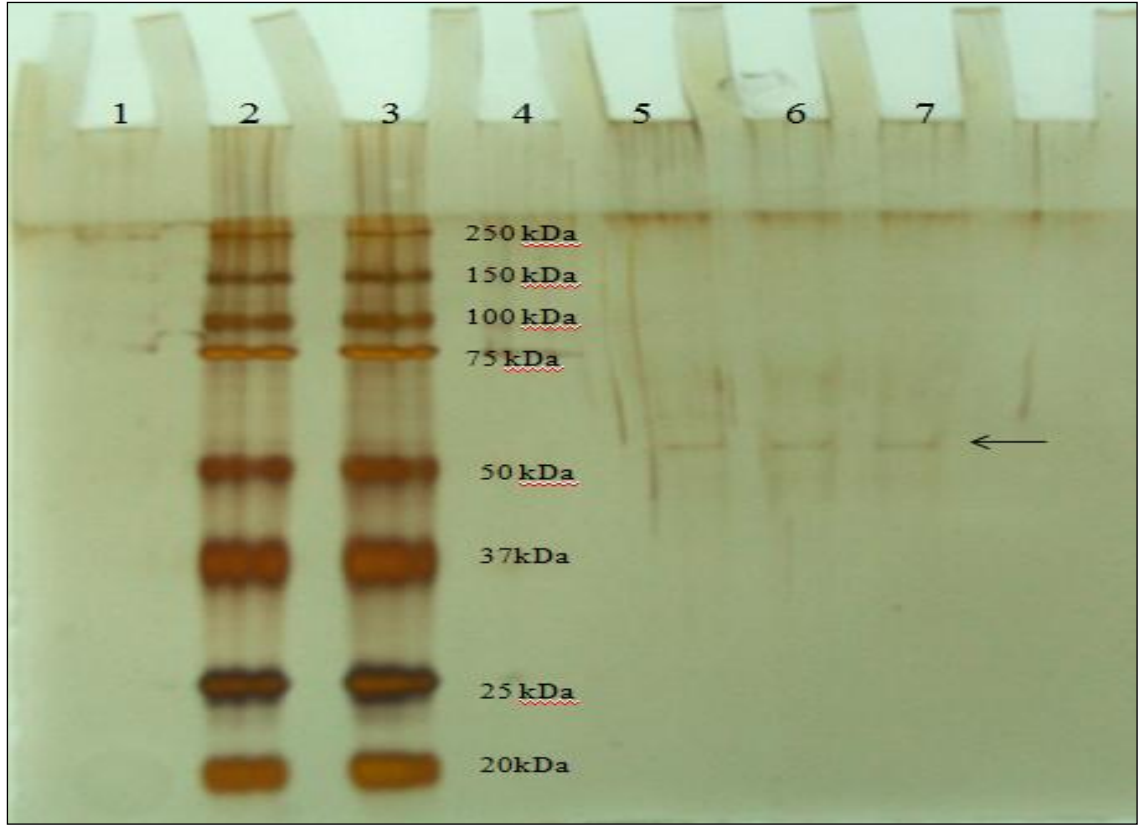
kolonuna yüklendi. Elüatlar 2,5 ml'lik kısımlar halinde alındı ve aktivitenin en yüksek olduğu tüpler birleştirildi.

**Çizelge 4.1.** Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimine ait 1. ve 2. DEAE iyon değişimi sonrası saflaştırma tablosu

| Numune türü       | Aktivite (EÜ/ml) | Toplam hacim (ml) | Protein (mg/ml) | Toplam protein (mg) | Toplam aktivite | Spesifik aktivite (EÜ/mg) | % Verim | Saflaştırma katsayısı |
|-------------------|------------------|-------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------------|---------|-----------------------|
| Çöz. Mik. Çözelti | 0,01987          | 28,5              | 3,685           | 105,0225            | 0,5663          | 0,00539                   | 100     | 1                     |
| 1. DEAE           | 0,00867          | 39,58             | 0,1417          | 5,6085              | 0,3432          | 0,06119                   | 60,6    | 11,35                 |
| 2. DEAE           | 0,01193          | 25,81             | 0,0583          | 1,5047              | 0,3079          | 0,20463                   | 54,4    | 38                    |

#### 4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi ile Enzim Saflığının Kontrol Sonuçları

Enzim saflaştırıldıktan sonra kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofözezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapıldı. 2.DEAE-selüloz kolonundan alınan elüatlar kuyulara yüklendi. Jelin boyanması işleminde protein miktarı çok az olduğundan gümüş boyama tekniği kullanıldı. Yapılan işlem sonucu tek bant elde edildi ve elde edilen bandın fotoğrafı çekilerek Şekil 4.2’de verildi.

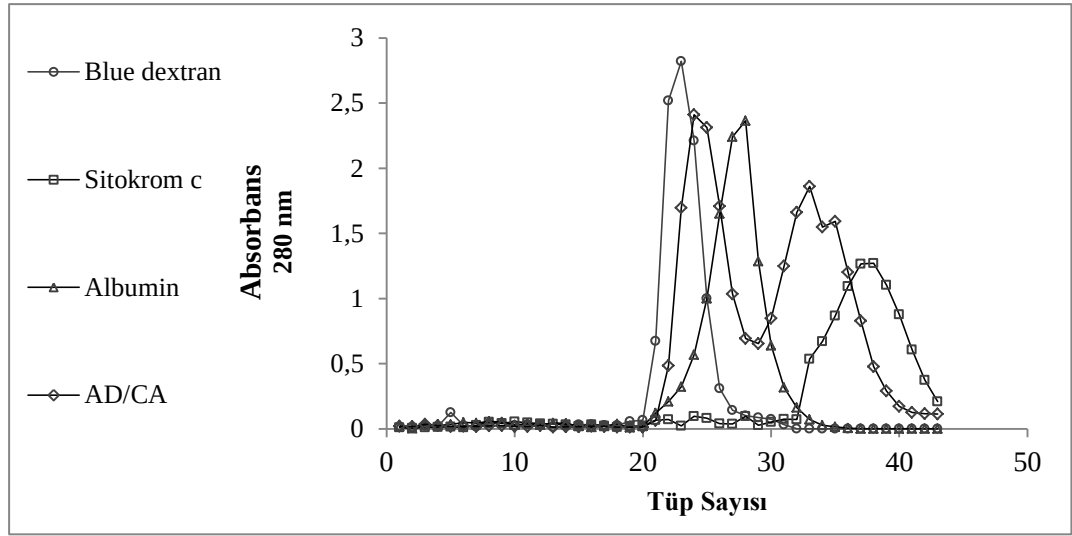


**Şekil 4.2.** SDS-PAGE fotoğrafı. 5, 6, 7 nolu kuyular Van Gölü balığı karaciğerinden saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi, 2 ve 3 nolu kuyular Standart proteinler (250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 20 kDa)

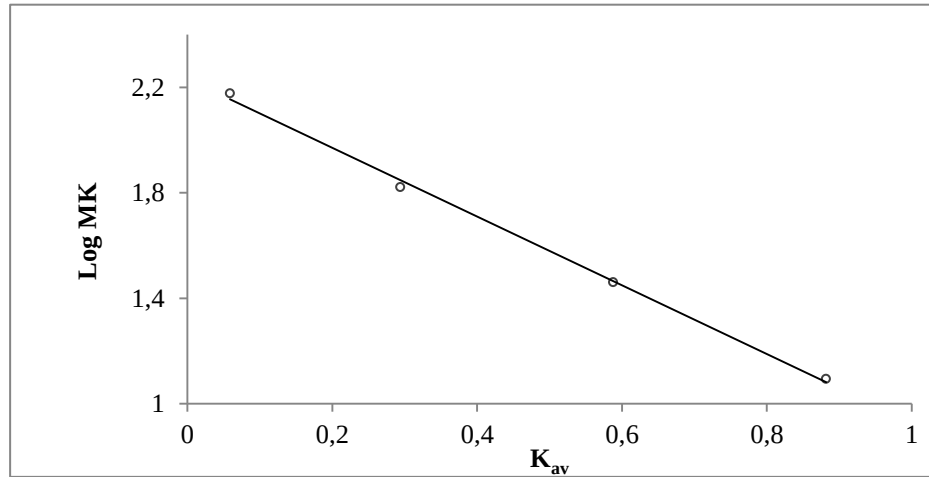
#### 4.4. Van Gölü Balığı Karaciğerinden Saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 Redüktaz Enzimi Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar

##### 4.4.1. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesi tayinine yönelik sonuçlar

Jel filtrasyon kromatografisi uygulamasında kolondan önce blue dekstran geçirildi. Daha sonra standart proteinler ve ardından 2.DEAE-selüloz kolonundan elüe edilen enzim çözeltisi bölüm 3.2.3.h’de anlatıldığı şekilde yüklendi. Kolondan alınan elüatlarda 280 nm’de absorbans ölçümü yapılarak Şekil 4.3’deki grafik çizildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Şekil 4.4’de log  $M_K$ - $K_{av}$  grafiği çizildi. Elüe edilen enzimin 550 nm’de aktivite değerlerine bakıldığında blue dextrandan önce geldiği görüldü. Bunun ise enzimin deterjan ile oluşturduğu agregatlardan kaynaklandığı anlaşıldı.



**Şekil 4.3.** Jel filtrasyon kolonundan alınan standart proteinlerin tüp sayısına karşılık 280 nm'deki absorbans değerleri

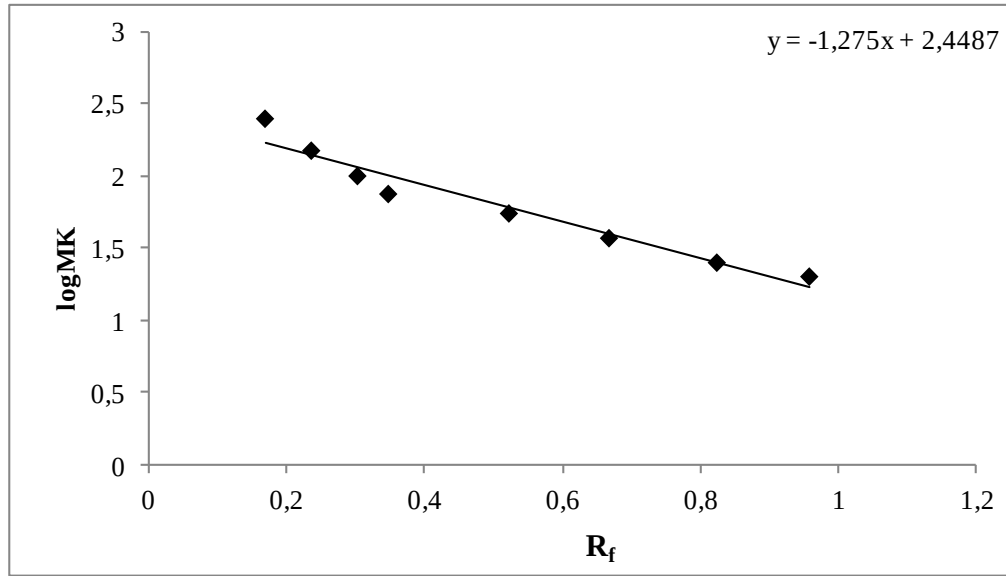


**Şekil 4.4.** Jel filtrasyon sonucu çizilen log MK- $K_{av}$  grafiği

#### 4.4.2. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin SDS-PAGE ile molekül kütesinin belirlenmesine yönelik sonuçları

2. DEAE-selüloz kolonundan elde edilen saf enzim SDS-PAGE'de yürütülerek fotoğrafı çekildi (Şekil 4.2). Standart proteinlerin molekül kütlelerinin logaritmaları, jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek hesaplanan  $R_f$  değerlerine karşı grafik edilerek

(Şekil 4.5) Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin monomer molekül kütlesi 70 kDa olarak hesaplandı.



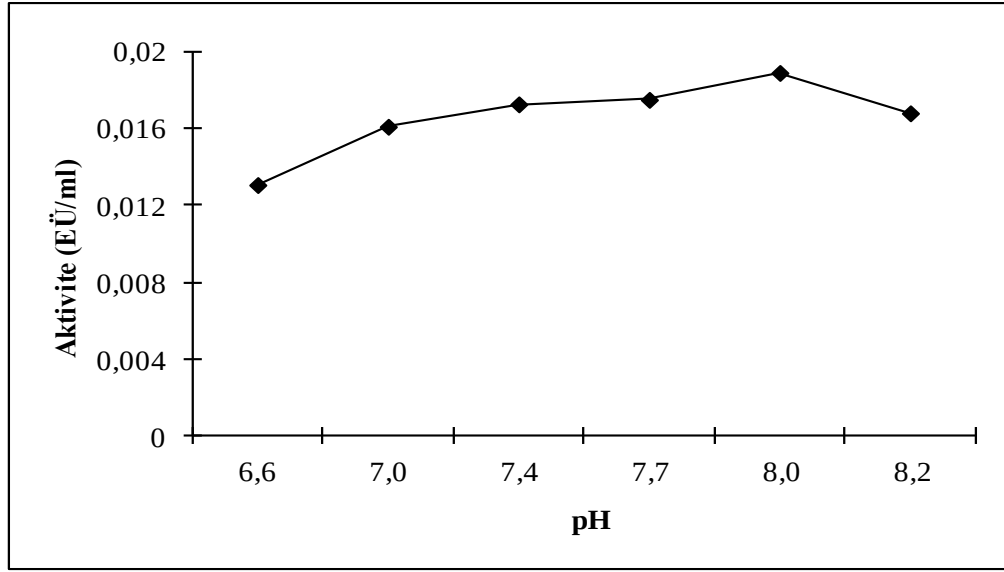
**Şekil 4.5.** Saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için logMK/R<sub>f</sub> grafiği

#### 4.4.3. Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum pH çalışma sonuçları

Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi optimum pH'sı 6,6-8,2 aralığında çalışıldı (Çizelge 4.2). Bunun için pH 6,6 ile 8,0 aralığı için 300 mM fosfat tamponu ve pH 8,2 için ise 300 mM Tris/HCl tampon çözeltileri kullanılarak enzimin aktivitesi belirlendi. Enzim için optimum pH 8,0 olan fosfat tamponu olarak belirlendi (Şekil 4.6).

**Çizelge 4.2.** Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

| pH               | 6,6    | 7,0    | 7,4    | 7,7    | 8,0    | 8,2    |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Aktivite (EÜ/ml) | 0,0131 | 0,0161 | 0,0173 | 0,0175 | 0,0189 | 0,0168 |



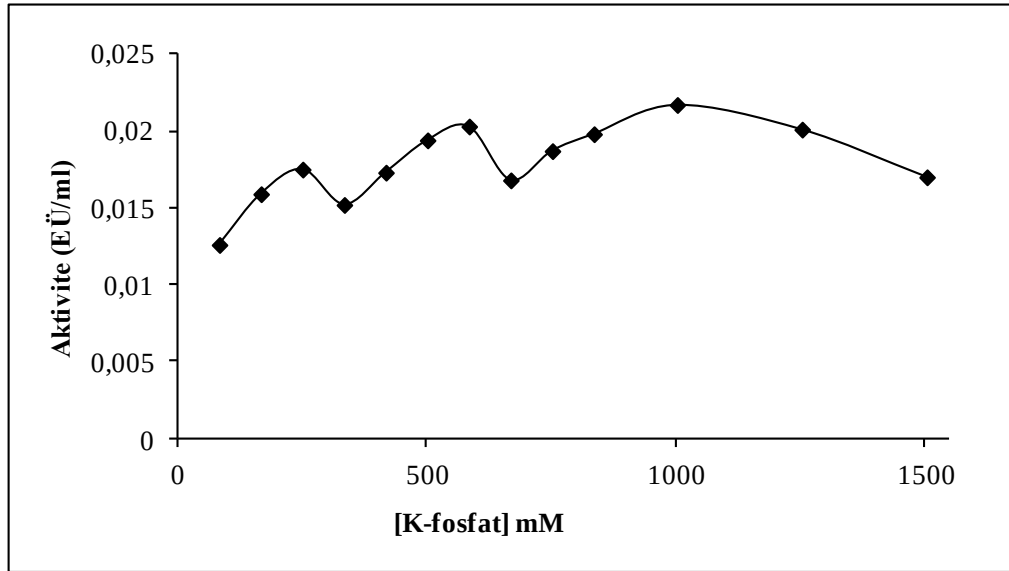
**Şekil 4.6.** NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için aktivite-pH grafiği

#### **4.4.4. Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar**

NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi için en uygun iyonik şiddetinin belirlenmesi için daha önceki çalışmalarla uygunluğu belirlenen fosfat tamponu kullanıldı. Bu amaçla optimal pH'daki değişik fosfat konsantrasyonlarında tampon çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler ile aktivite ölçümünde kullanılan sitokrom c çözeltisi hazırlandı (Çizelge 4.3). Bu konsantrasyonlarda aktivite ölçümleri yapılarak kullanılan fosfat konsantrasyonlarına karşı aktivite değerleri grafiği çizildi (Şekil 4.7). Yapılan çalışmalar sonucu Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için en yüksek aktivitenin kuvvet içi konsantrasyonu 1003,6 mM ve pH'sı 8,0 olan fosfat tamponu ile elde edildiği saptandı.

**Çizelge 4.3.** Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için fosfat tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

| Fosfat derişimi (mM) | Aktivite (EÜ/ml) | Fosfat derişimi (mM) | Aktivite (EÜ/ml) |
|----------------------|------------------|----------------------|------------------|
| 83,6                 | 0,0126           | 669,1                | 0,0168           |
| 167,3                | 0,0159           | 752,7                | 0,0187           |
| 250,9                | 0,0175           | 836,4                | 0,0198           |
| 334,5                | 0,0152           | 1003,6               | 0,0217           |
| 418,2                | 0,0173           | 1254,5               | 0,0201           |
| 501,8                | 0,0194           | 1505,5               | 0,017            |
| 585,5                | 0,0203           |                      |                  |



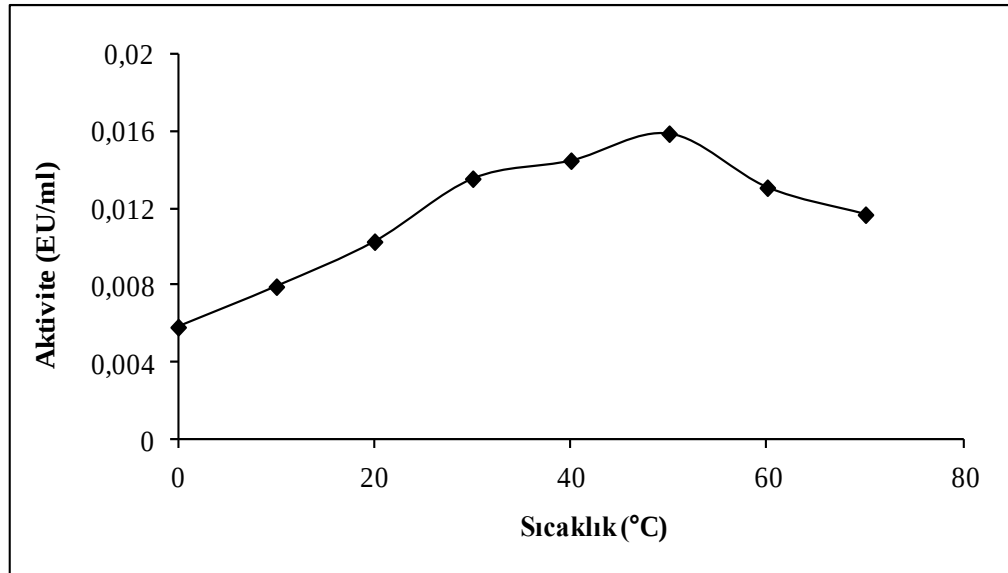
**Şekil 4.7.** pH'sı 8,0 olan fosfat tamponu kullanılarak NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için aktivite-[K-fosfat] mM grafiği

#### 4.4.5. Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip pH'sı 8,0 olan 1,2 M fosfat tampon çözeltisi kullanıldı. 0°C ile 70°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere aktivite ölçümleri yapıldı (Çizelge 4.4). Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 50°C olarak tespit edildi (Şekil 4.8).

**Çizelge 4.4.** Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık (°C)-aktivite ölçüm sonuçları çizelgesi

| Sıcaklık (°C)    | 0        | 10       | 20       | 30       | 40       | 50       | 60       | 70       |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Aktivite (EÜ/ml) | 0,005846 | 0,007951 | 0,010289 | 0,013563 | 0,014498 | 0,015901 | 0,013095 | 0,011692 |



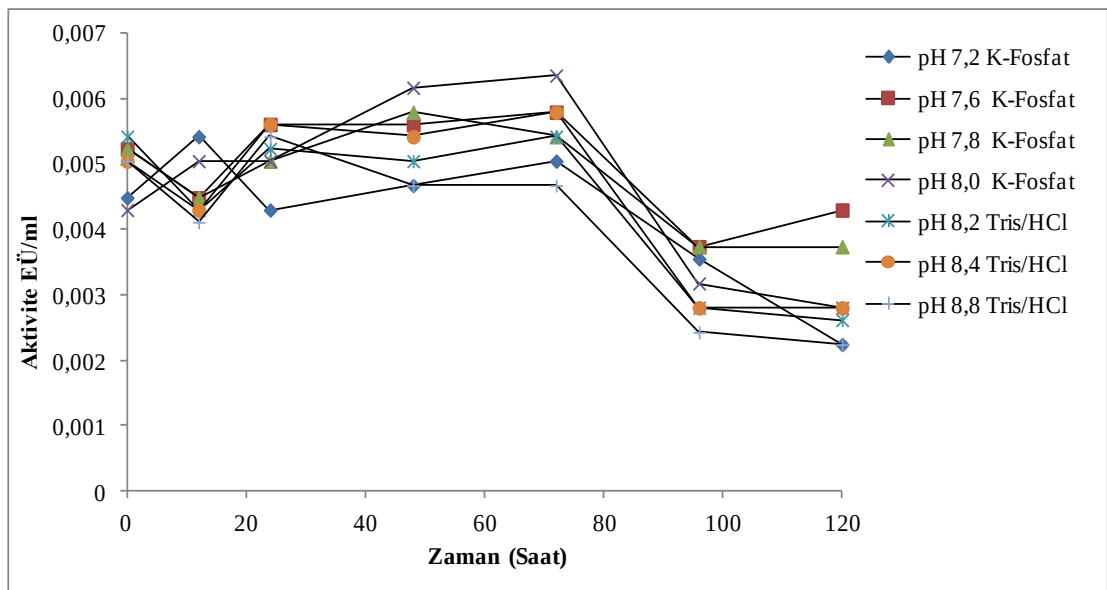
**Şekil 4.8.** NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için sıcaklık-aktivite grafiği

#### 4.4.6. Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için bölüm 3.2.3.d'te anlatıldığı şekilde çalışmalar yapıldı ve elde edilen aktivite ölçüm sonuçları (Çizelge 4.5) zamana karşı grafik edildi (Şekil 4.9). Enzim için stabil pH'nın 7,6 olduğu belirlendi.

**Çizelge 4.5.** Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin stabil pH için zaman- aktivite ölçüm sonuçları çizelgesi

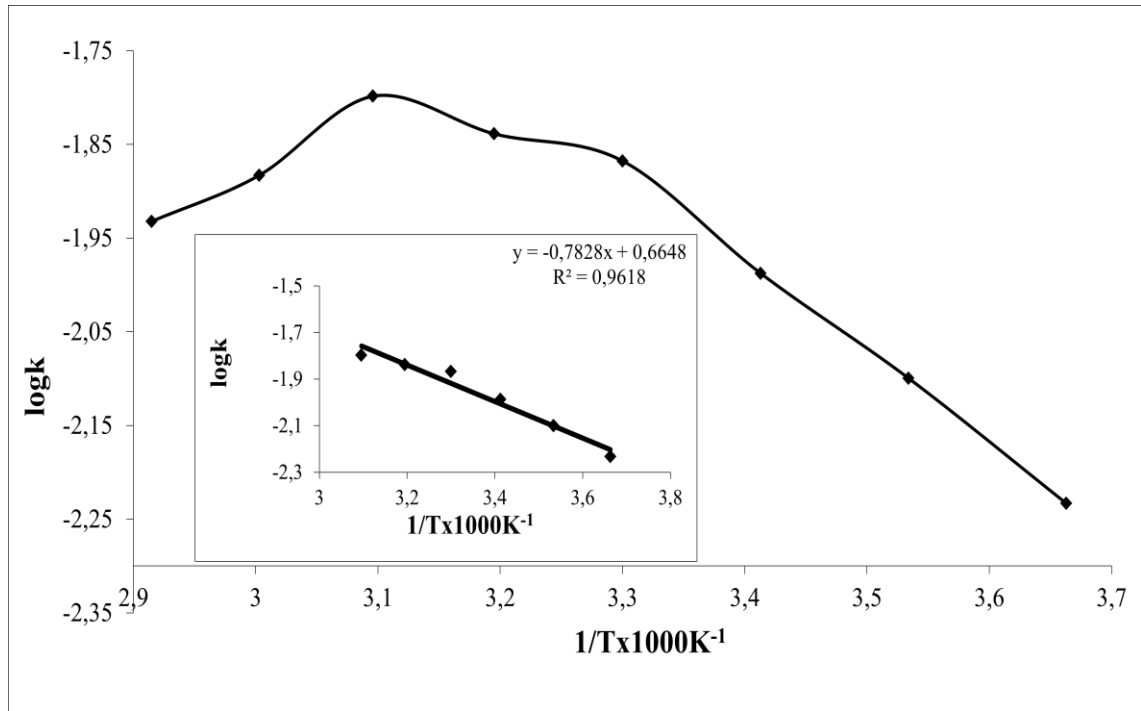
|              | Aktivite (EÜ/ml) |          |          |          |          |          |          |
|--------------|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Zaman (Saat) | pH 7,2           | pH 7,6   | pH 7,8   | pH 8,0   | pH 8,2   | pH 8,4   | pH 8,8   |
| 0            | 0,004490         | 0,005238 | 0,005238 | 0,004303 | 0,005425 | 0,005051 | 0,005051 |
| 12           | 0,005425         | 0,004490 | 0,004490 | 0,005051 | 0,004303 | 0,004303 | 0,004116 |
| 24           | 0,004303         | 0,005612 | 0,005051 | 0,005051 | 0,005238 | 0,005612 | 0,005425 |
| 48           | 0,004677         | 0,005612 | 0,005799 | 0,006173 | 0,005051 | 0,005425 | 0,004677 |
| 72           | 0,005051         | 0,005799 | 0,005425 | 0,006361 | 0,005425 | 0,005799 | 0,004677 |
| 96           | 0,003554         | 0,003741 | 0,003741 | 0,003180 | 0,002806 | 0,002806 | 0,002432 |
| 120          | 0,002245         | 0,004303 | 0,003741 | 0,002806 | 0,002619 | 0,002806 | 0,002245 |



**Şekil 4.9.** NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi stabil pH için aktivite-zaman grafiği

#### 4.4.7. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) ve $Q_{10}$ değerlerinin belirlenmesi

Optimum sıcaklık çalışması sonucu elde edilen veriler kullanılarak  $E_a$  ve  $Q_{10}$  değerleri hesaplandı. Bunun için; optimum sıcaklıktaki aktivite değerlerinin logaritmaları alınarak  $\log k$ 'ya karşı  $1/(T \times 1000)^{-1}K$  grafikleri çizildi. Bu grafiklerden faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde edildi ve Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için  $E_a$  ve  $Q_{10}$  değerleri hesaplandı (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

**Çizelge 4.6.** Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum sıcaklık,  $E_a$  ve  $Q_{10}$  tayini sonuçları

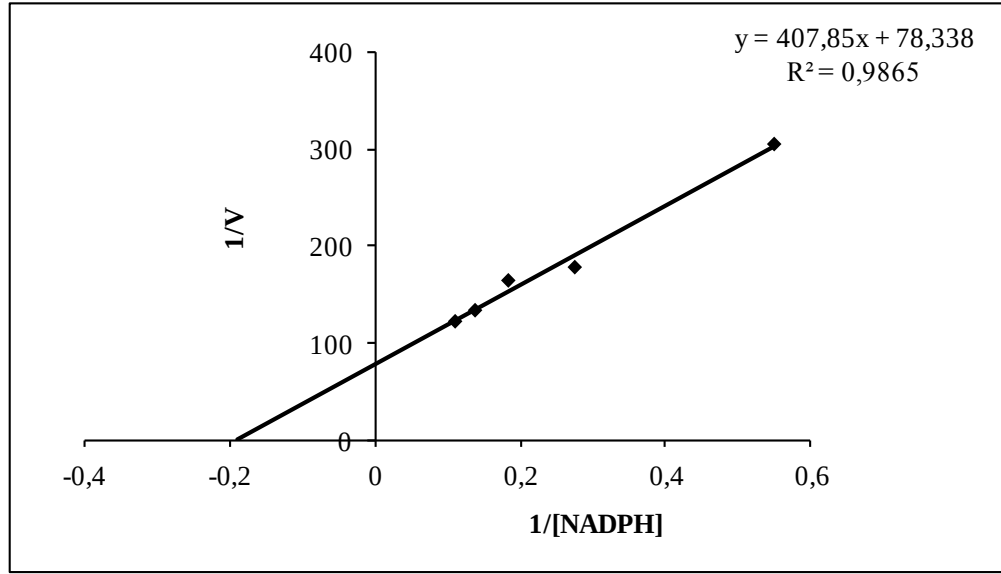
|                                         | NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz |
|-----------------------------------------|------------------------------|
| Optimum Sıcaklık (°C)                   | 50                           |
| Aktivasyon Enerjisi ( $E_a$ ) (kal/mol) | 3,5821                       |
| $Q_{10}$                                | 1,21                         |

**4.4.8. Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin NADPH substratı için  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  ve özgülük sabiti ( $V_0$ ) değerlerinin hesaplanması**

Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin NADPH için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin hesaplanması amacıyla 0,1 mM konsantrasyonundaki NADPH çözeltisinden 20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu$ l alınarak aktivite ölçümü yapıldı (Çizelge 4.7). Daha sonra NADPH'nin kuvvet içi konsantrasyonu hesaplandı. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak  $K_M = 5,208 \mu\text{M}$  ve  $V_{max} = 12,76 \times 10^{-3} \text{ EÜ/ml}$  olduğu tespit edildi (Şekil 4.11). Daha sonra bulunan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri kullanılarak enzimin NADPH substratı için turnover sayısını gösteren  $k_{cat}$  değeri hesaplandı ve buradan enzimin özgülük sabiti değeri ( $V_0$ ) tespit edildi. Yapılan hesaplamalar sonucunda NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin NADPH substratı için  $k_{cat} = 2\,625,67 \text{ s}^{-1}$  ve  $V_0 = 504,16 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  olarak bulundu (Çizelge 4.9).

**Çizelge 4.7.** Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin NADPH için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin hesaplanması için ölçüm sonuçları çizelgesi

|                                |        |        |        |        |        |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1/V                            | 305,45 | 178,18 | 164,48 | 133,64 | 122,18 |
| 1/[NADPH]<br>( $\mu\text{M}$ ) | 0,55   | 0,275  | 0,183  | 0,138  | 0,11   |



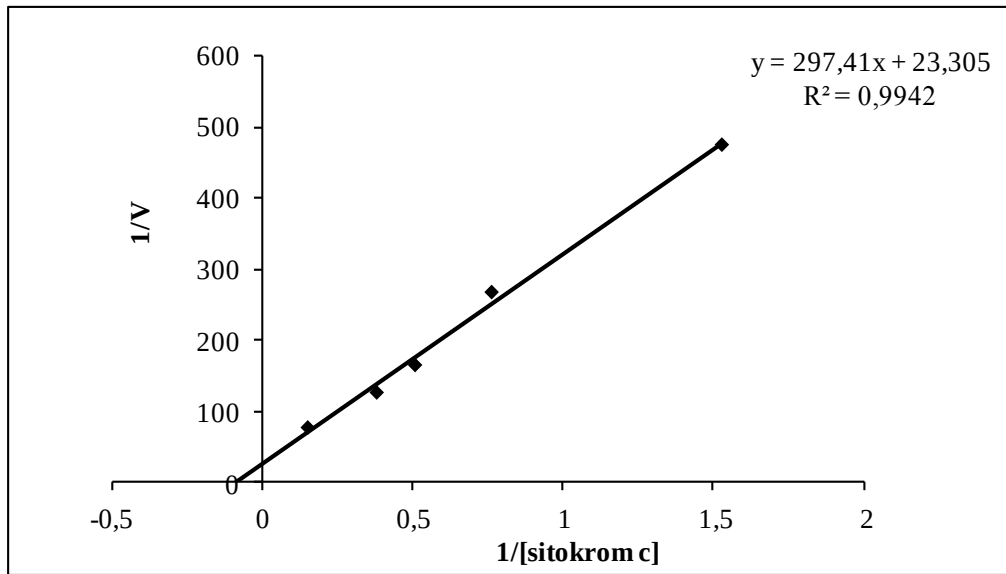
**Şekil 4.11.** NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin NADPH için Lineweaver-Burk grafiği

#### 4.4.9. Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c substratı için $K_M$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve özgülük sabiti ( $V_0$ ) değerlerinin hesaplanması

Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin hesaplanması amacıyla 0,0036 mM konsantrasyonundaki sitokrom c çözeltisinden 200, 400, 600, 800  $\mu$ l ve 0,036 mM konsantrasyonundaki sitokrom c'den ise 200  $\mu$ l alınarak aktivite ölçümü yapıldı (Çizelge 4.8). Daha sonra sitokrom c'nin kuvvet içi konsantrasyonu hesaplandı. Lineweaver- Burk grafiği kullanılarak  $K_M = 12,82 \mu\text{M}$  ve  $V_{max} = 42,9 \times 10^{-3} \text{ EÜ/ml}$  olduğu tespit edildi (Şekil 4.12). Daha sonra bulunan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri kullanılarak enzimin sitokrom c substratı için turnover sayısını gösteren  $k_{cat}$  değeri hesaplandı ve buradan enzimin özgülük sabiti değeri ( $V_0$ ) tespit edildi. Yapılan hesaplamalar sonucunda NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c substratı için  $k_{cat} = 9\ 000,62 \text{ s}^{-1}$  ve  $V_0 = 702,076 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  olarak bulundu (Çizelge 4.9).

**Çizelge 4.8.** Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin hesaplanması için ölçüm sonuçları çizelgesi

|                              |        |        |        |        |       |
|------------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 1/V                          | 475,15 | 267,27 | 164,48 | 125,78 | 76,36 |
| 1/[sitokrom c] $\mu\text{M}$ | 1,529  | 0,764  | 0,509  | 0,382  | 0,153 |



**Şekil 4.12.** NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sitokrom c için Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 4.9.** Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin NADPH ve sitokrom c substratları için hesaplanan  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  ve  $V_0$  değerlerine ilişkin toplu sonuçlar

|                   | $K_M$ ( $\mu\text{M}$ ) | $V_{max}$ (EÜ/ml)      | $k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) | $V_0$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) |
|-------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>NADPH</b>      | 5,208                   | $12,76 \times 10^{-3}$ | 2625,67                       | 504,16                                    |
| <b>Sitokrom c</b> | 12,82                   | $42,9 \times 10^{-3}$  | 9000,62                       | 702,076                                   |

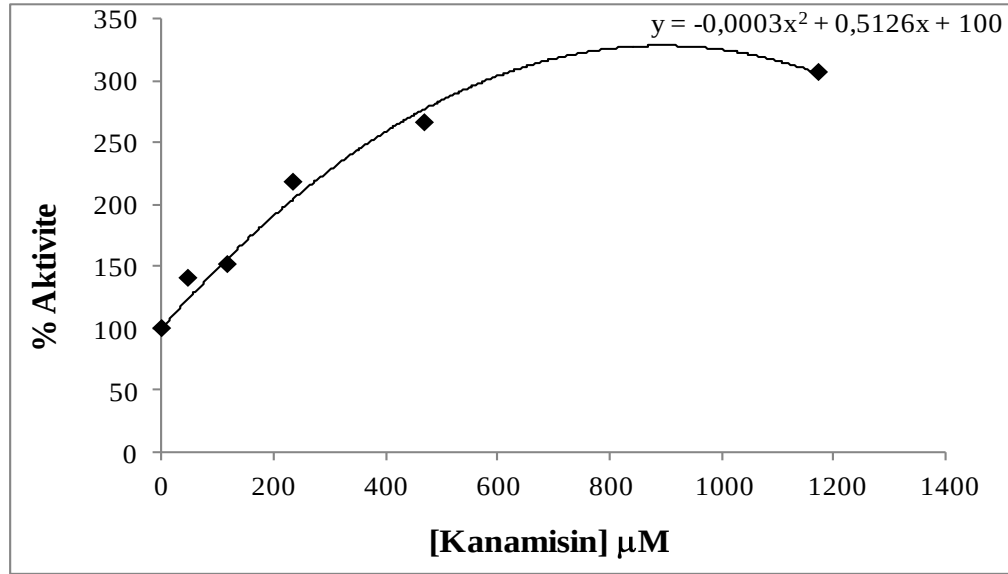
#### 4.5. Bazı İlaç ve Metal İyonlarının Van Gölü Balığı Karaciğerinden Saflaştırılan NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi Çalışmalarına Ait Sonuçlar

İlaç ve metal tuzlarından hazırlanan stok çözeltiler kullanılarak Van Gölü balığı karaciğerinden saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi aktivitesi üzerine kanamisin, oksitetrasiklin, gentamisin, benzalkonium kloridin, akriflavin ilaçlarının etkileri incelendi. Bunun yanısıra  $Pb^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $As^{+5}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Tl^{+}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Ag^{+}$  ve  $Cu^{+2}$  iyonlarının da enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlendi. İnhibisyon etkisi gösterip göstermediklerine bakıldı. İnhibisyon etkisi gösterenlerin  $IC_{50}$  değeri, inhibisyon etkilerinin güçlü olanların ise  $K_i$  sabitleri hesaplandı.

##### 4.5.1. Van Gölü balığı karaciğerinden saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine gentamisin, oksitetrasiklin, kanamisin, benzalkonium klorid ve akriflavin ilaçlarının *in vitro* etkileri

**Çizelge 4.10.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine kanamisinin etkisi

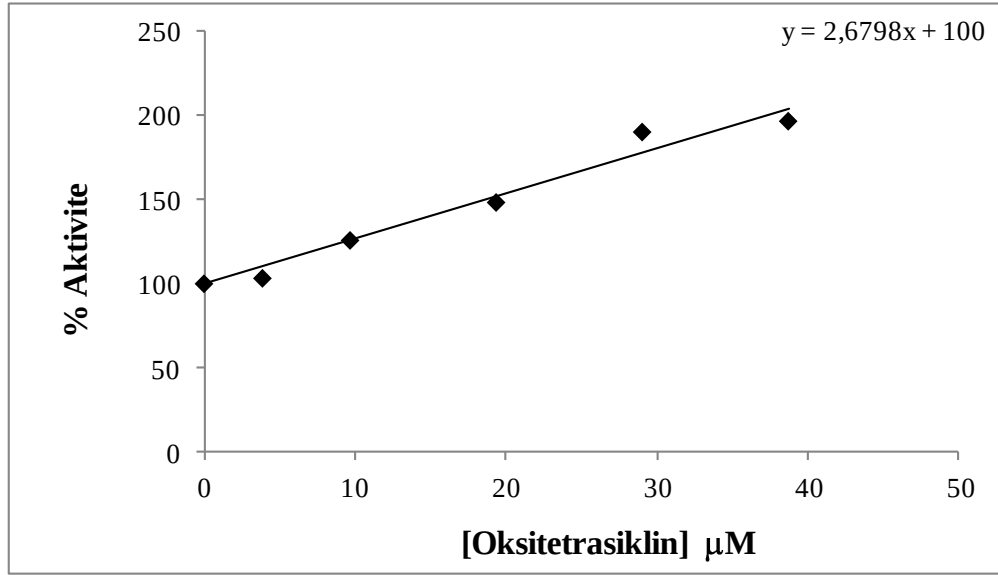
| [Kanamisin] $\mu$ M | % Aktivite |
|---------------------|------------|
| Kontrol             | 100        |
| 46,9                | 140,7      |
| 117,3               | 151,9      |
| 234,5               | 218,5      |
| 468,99              | 266,7      |
| 1172,5              | 307,4      |



**Şekil 4.13.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine kanamisin ilacı etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.11.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine oksitetrasiklin etkisi

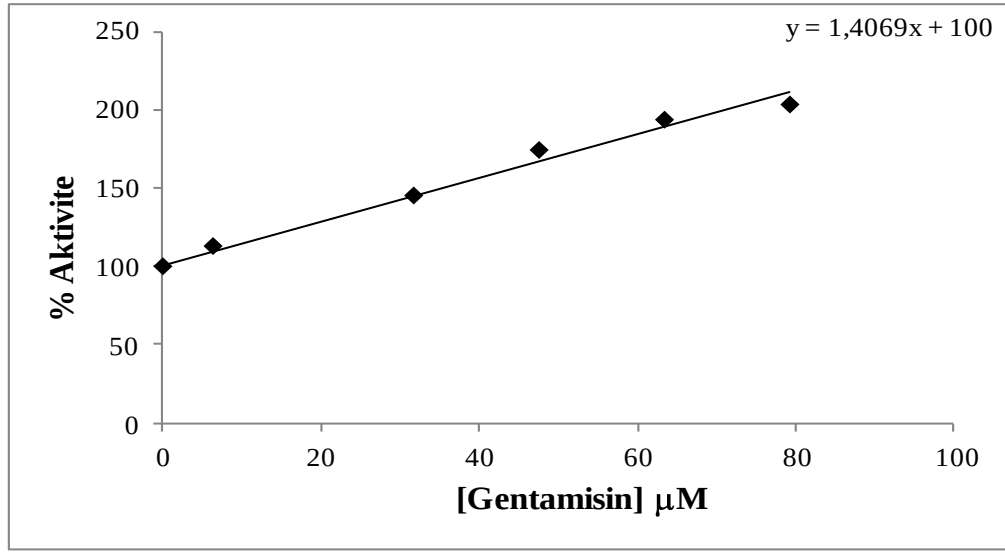
| [Oksitetrasiklin] $\mu\text{M}$ | % Aktivite |
|---------------------------------|------------|
| Kontrol                         | 100        |
| 3,869816                        | 103,2258   |
| 9,674541                        | 125,8065   |
| 19,34908                        | 148,3871   |
| 29,02362                        | 190,3226   |
| 38,69816                        | 196,7742   |



**Şekil 4.14.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine oksitetrasiklin ilacı etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.12.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine gentamisin etkisi

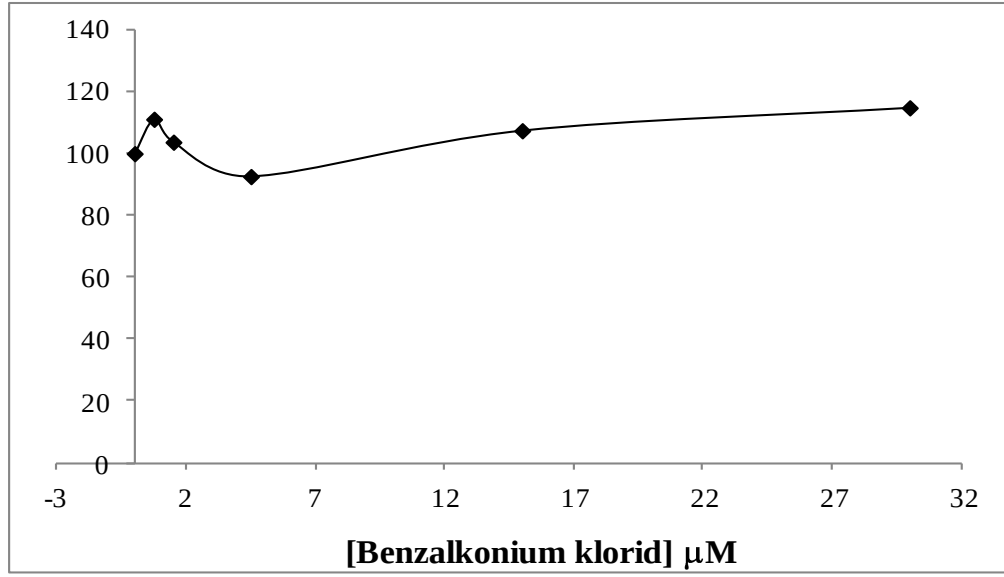
| [Gentamisin]µM | % Aktivite |
|----------------|------------|
| Kontrol        | 100        |
| 6,34           | 112,9      |
| 31,72          | 145,2      |
| 47,58          | 174,2      |
| 63,44          | 193,5      |
| 79,3           | 203,2      |



**Şekil 4.15.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine gentamisin ilacı etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.13.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine benzalkonium klorid etkisi

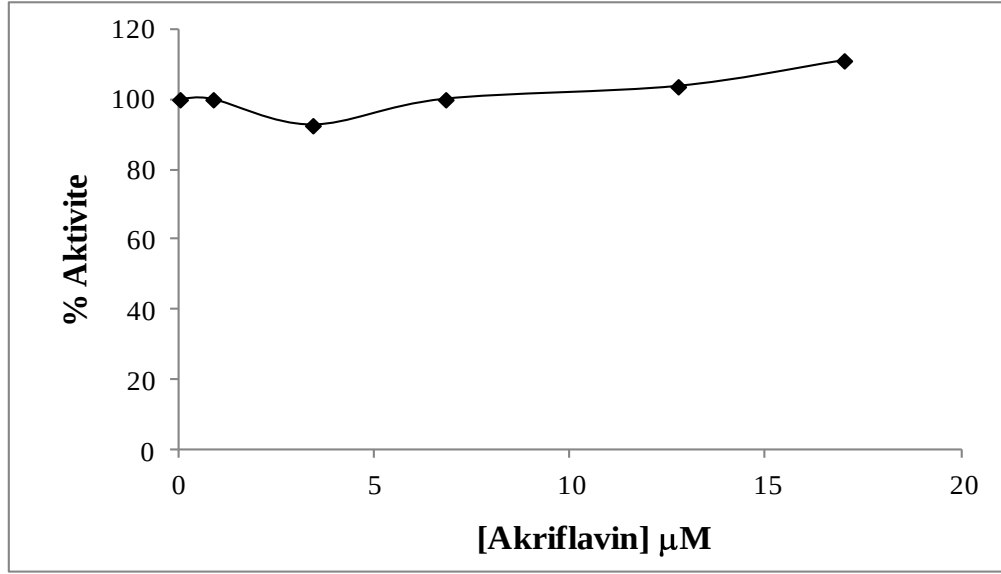
| [Benzalkonium klorid]μM | % Aktivite |
|-------------------------|------------|
| Kontrol                 | 100        |
| 0,75                    | 111,1111   |
| 1,5                     | 103,7037   |
| 4,5                     | 92,59259   |
| 15                      | 107,4074   |
| 30                      | 114,8148   |



**Şekil 4.16.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine benzalkonium klorid ilacı etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.14.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine akriflavin etkisi

| [Akriflavin] $\mu\text{M}$ | % Aktivite |
|----------------------------|------------|
| Kontrol                    | 100        |
| 0,85                       | 100        |
| 3,4                        | 92,59      |
| 6,8                        | 100        |
| 12,75                      | 103,7      |
| 17                         | 111,11     |

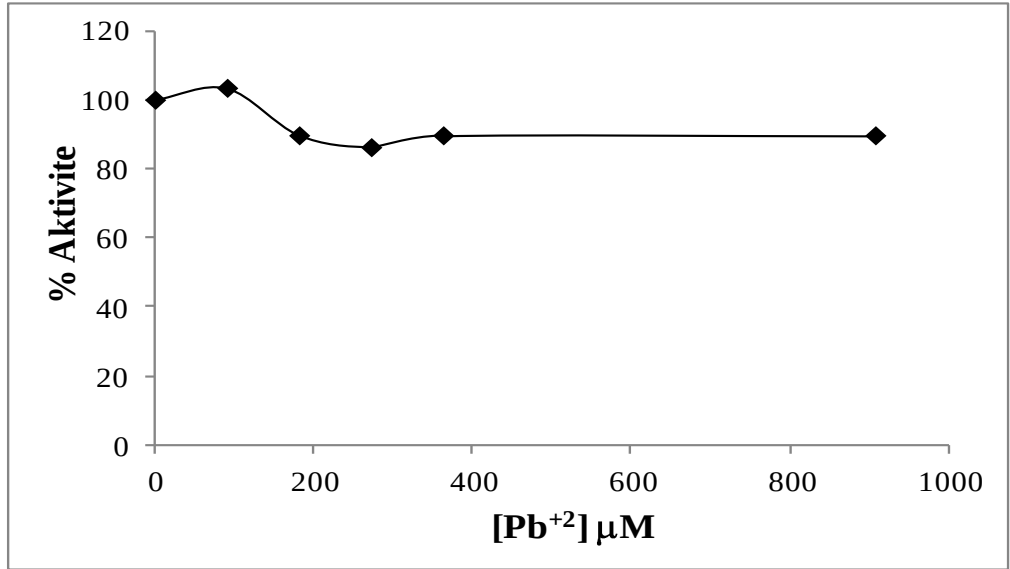


**Şekil 4.17.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine akriflavin ilacı etkisinin % aktivite-[I] grafiği

#### 4.5.2. Van Gölü balığı karaciğerinden saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının *in vitro* etkileri

**Çizelge 4.15.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine  $\text{Pb}^{+2}$  iyonunun etkisi

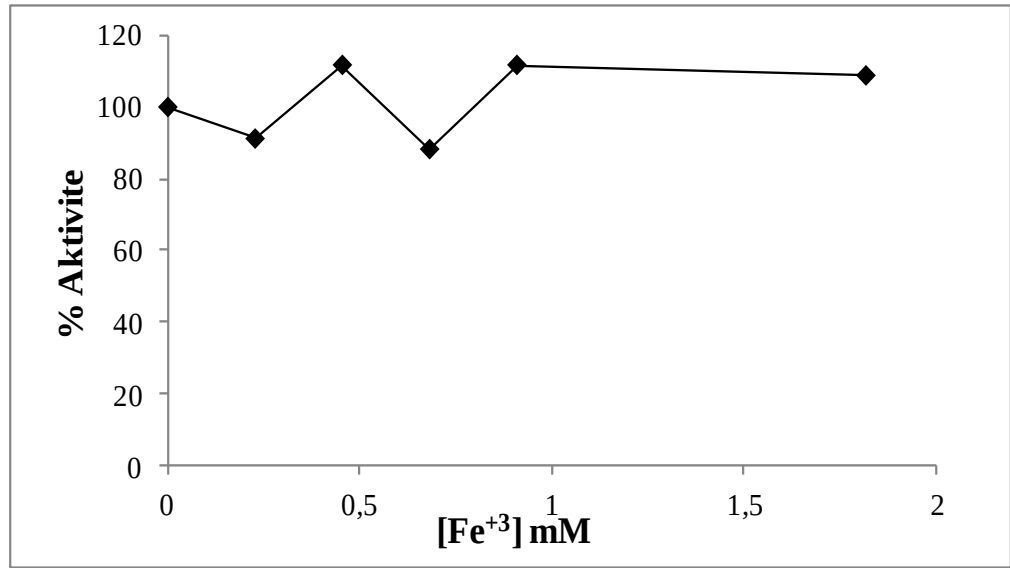
| $[\text{Pb}^{+2}]\mu\text{M}$ | % Aktivite |
|-------------------------------|------------|
| Kontrol                       | 100        |
| 90,91                         | 103,45     |
| 181,82                        | 89,66      |
| 272,73                        | 86,21      |
| 363,64                        | 89,66      |
| 909,09                        | 89,66      |



**Şekil 4.18.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine Pb<sup>2+</sup> iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.16.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Fe<sup>3+</sup> iyonunun etkisi

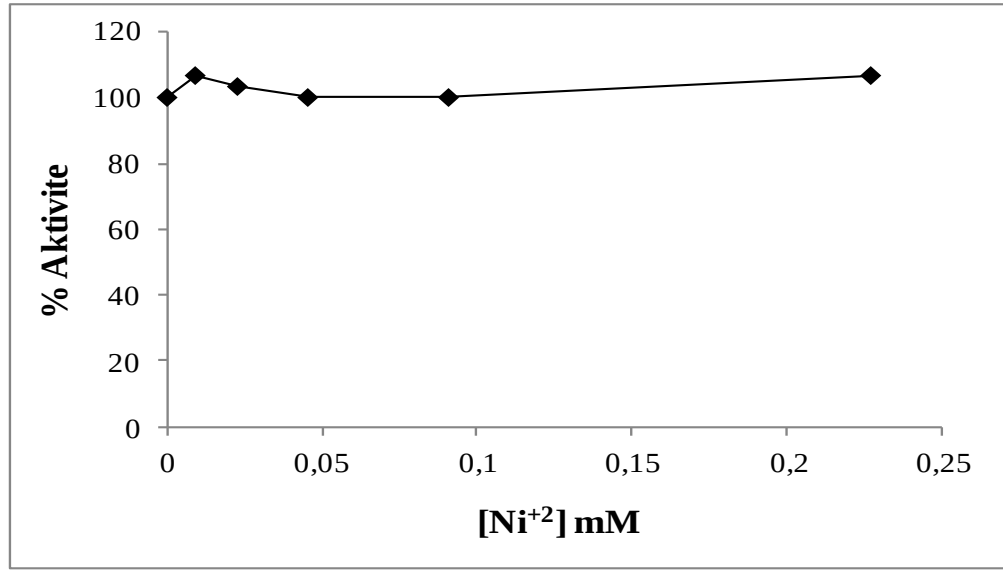
| [Fe <sup>3+</sup> ]mM | % Aktivite |
|-----------------------|------------|
| Kontrol               | 100        |
| 0,23                  | 91,2       |
| 0,45                  | 111,8      |
| 0,68                  | 88,2       |
| 0,91                  | 111,8      |
| 1,82                  | 108,8      |



**Şekil 4.19.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine  $\text{Fe}^{+3}$  iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.17.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine  $\text{Ni}^{+2}$  iyonunun etkisi

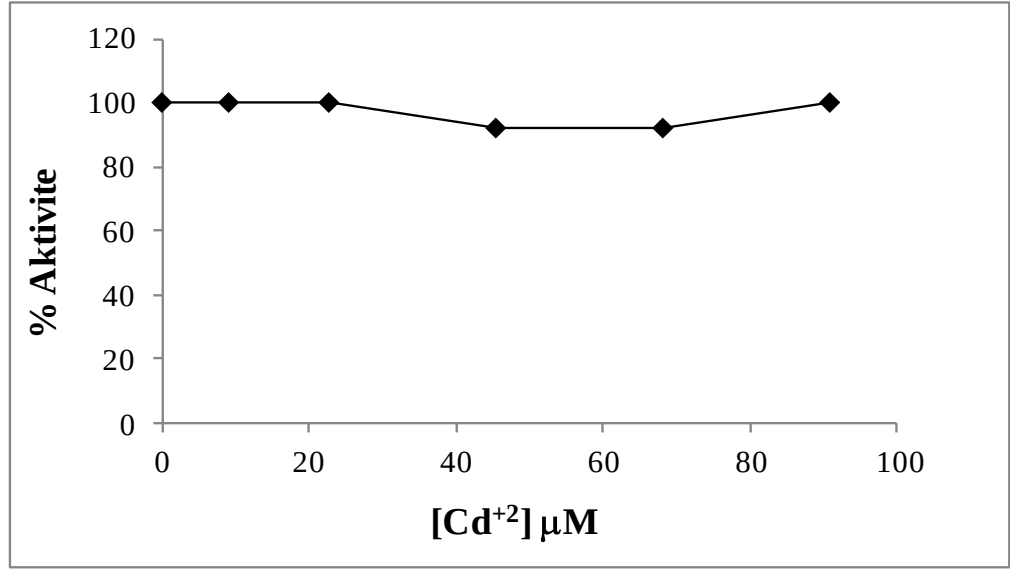
| $[\text{Ni}^{+2}] \text{mM}$ | % Aktivite |
|------------------------------|------------|
| Kontrol                      | 100        |
| 0,0091                       | 106,7      |
| 0,0227                       | 103,3      |
| 0,0455                       | 100        |
| 0,0909                       | 100        |
| 0,2273                       | 106,7      |



**Şekil 4.20.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine  $\text{Ni}^{+2}$  iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.18.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine  $\text{Cd}^{+2}$  iyonunun etkisi

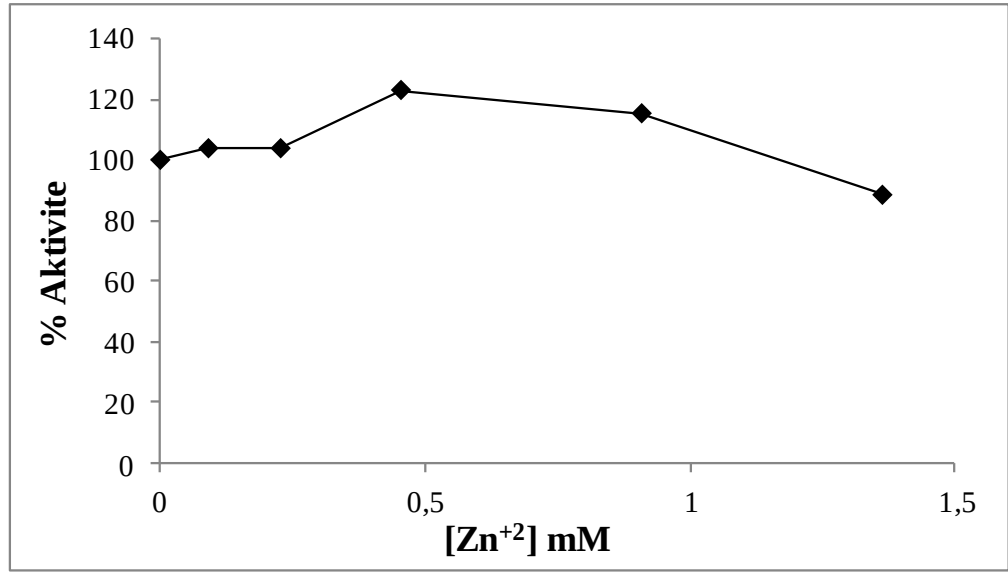
| $[\text{Cd}^{+2}]\mu\text{M}$ | % Aktivite |
|-------------------------------|------------|
| Kontrol                       | 100        |
| 9,09                          | 100        |
| 22,73                         | 100        |
| 45,45                         | 92         |
| 68,18                         | 92         |
| 90,91                         | 100        |



**Şekil 4.21.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine Cd<sup>2+</sup> iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.19.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine Zn<sup>2+</sup> iyonunun etkisi

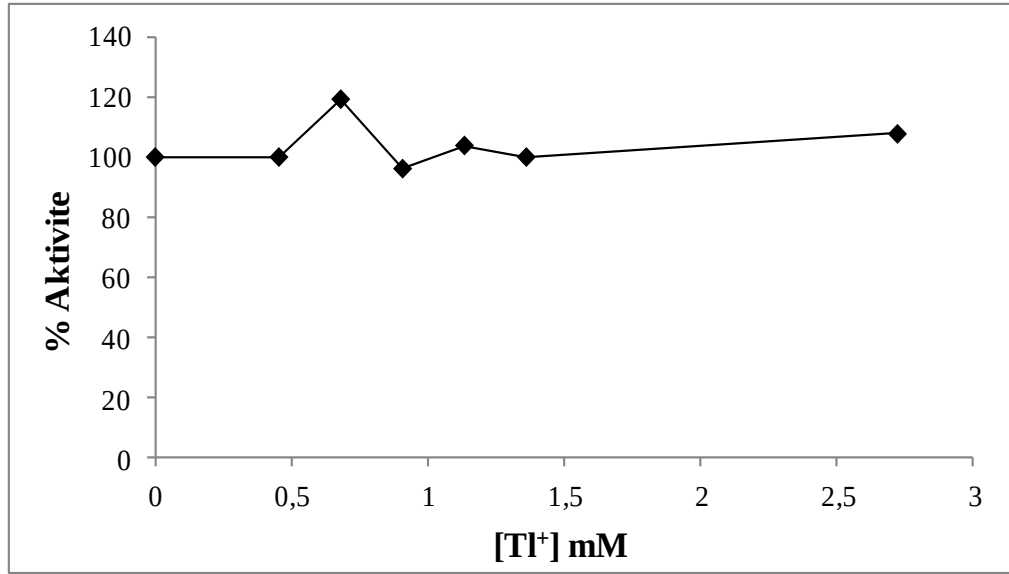
| [Zn <sup>2+</sup> ]mM | % Aktivite |
|-----------------------|------------|
| Kontrol               | 100        |
| 0,091                 | 103,8      |
| 0,227                 | 103,8      |
| 0,455                 | 123,1      |
| 0,909                 | 115,4      |
| 1,364                 | 88,5       |



**Şekil 4.22.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine  $Zn^{+2}$  iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.20.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine  $Tl^{+}$  iyonunun etkisi

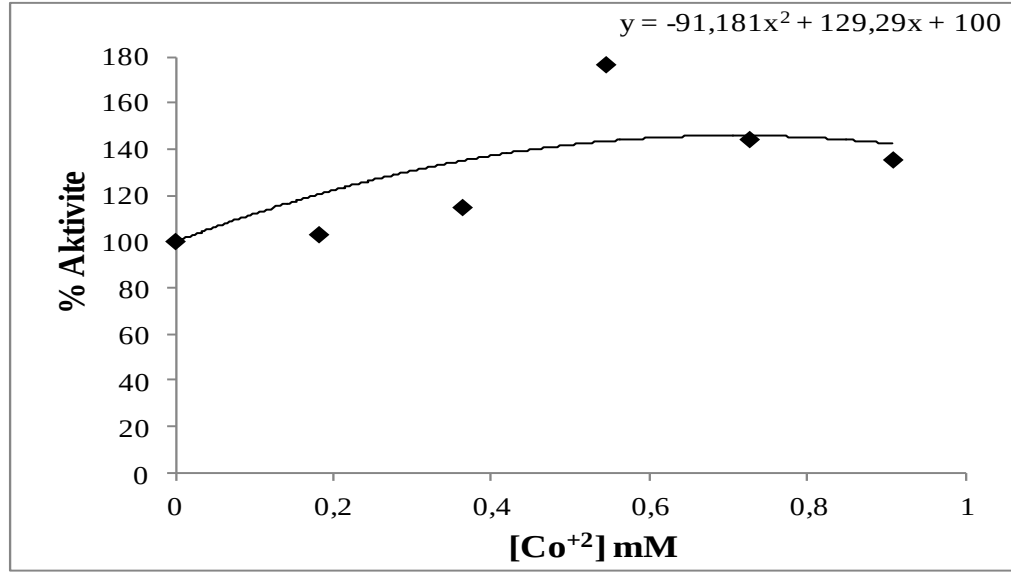
| [ $Tl^{+}$ ]mM | % Aktivite |
|----------------|------------|
| Kontrol        | 100        |
| 0,45           | 100        |
| 0,68           | 119,2      |
| 0,91           | 96,2       |
| 1,14           | 103,8      |
| 1,36           | 100        |



**Şekil 4.23.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine  $Tl^+$  iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.21.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine  $Co^{+2}$  iyonunun etkisi

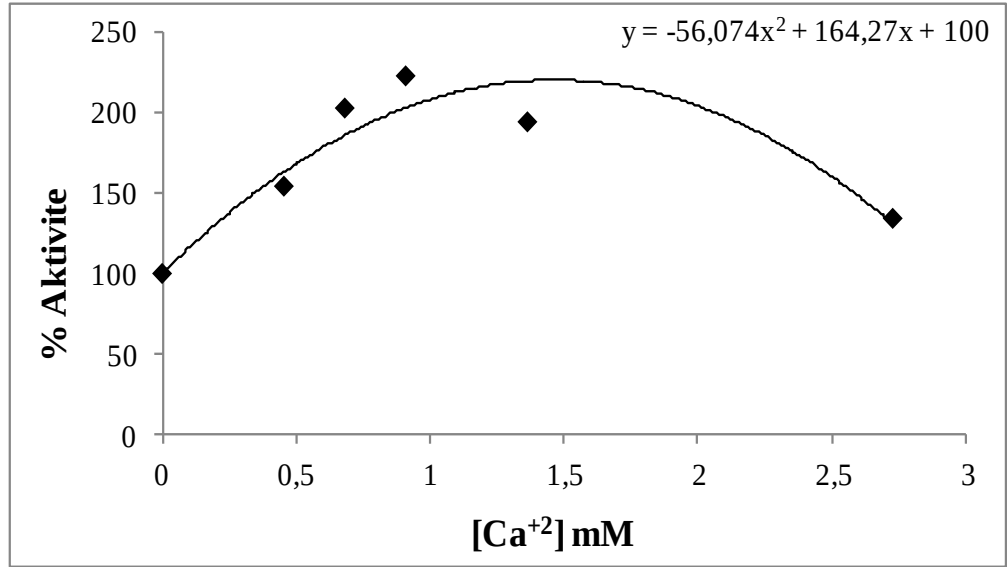
| $[Co^{+2}]mM$ | % Aktivite |
|---------------|------------|
| Kontrol       | 100        |
| 0,18          | 102,9      |
| 0,36          | 114,7      |
| 0,55          | 176,5      |
| 0,73          | 144,1      |
| 0,91          | 135,3      |



**Şekil 4.24.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine  $\text{Co}^{+2}$  iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.22.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun etkisi

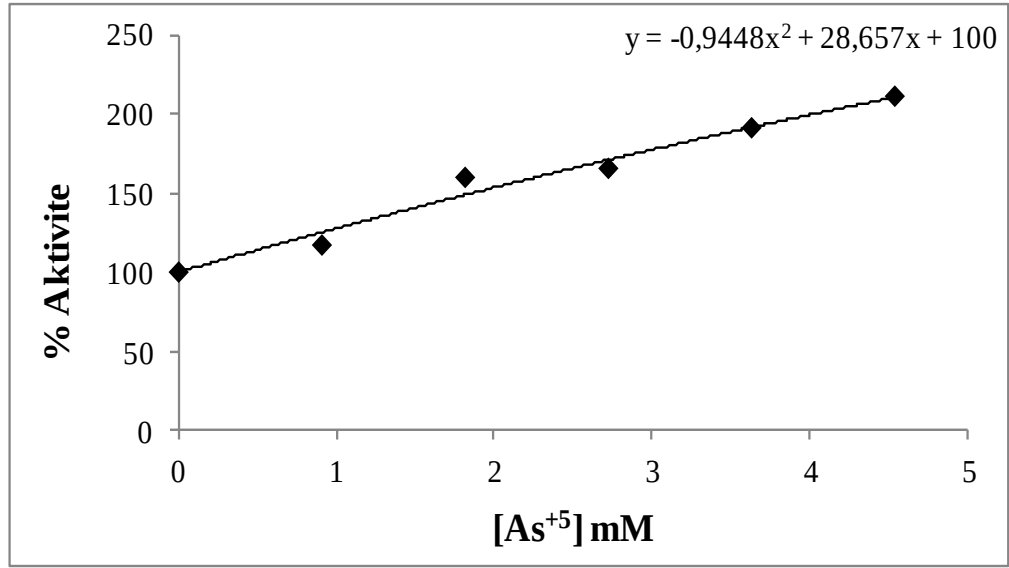
| [Ca <sup>+2</sup> ]mM | % Aktivite |
|-----------------------|------------|
| Kontrol               | 100        |
| 0,45                  | 154,3      |
| 0,68                  | 202,9      |
| 0,91                  | 222,9      |
| 1,36                  | 194,3      |
| 2,73                  | 134,3      |



**Şekil 4.25.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine  $Ca^{+2}$  iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.23.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine  $As^{+5}$  iyonunun etkisi

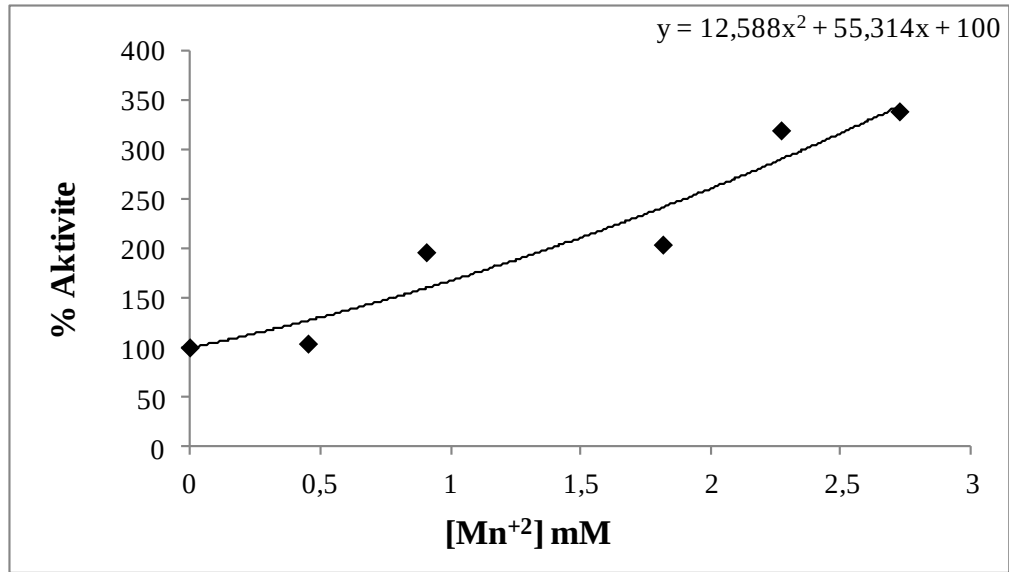
| $[As^{+5}]$ mM | % Aktivite |
|----------------|------------|
| Kontrol        | 100        |
| 0,91           | 117,1      |
| 1,82           | 160        |
| 2,73           | 165,7      |
| 3,64           | 191,4      |
| 4,55           | 211,4      |



**Şekil 4.26.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine  $As^{+5}$  iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.24.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine  $Mn^{+2}$  iyonunun etkisi

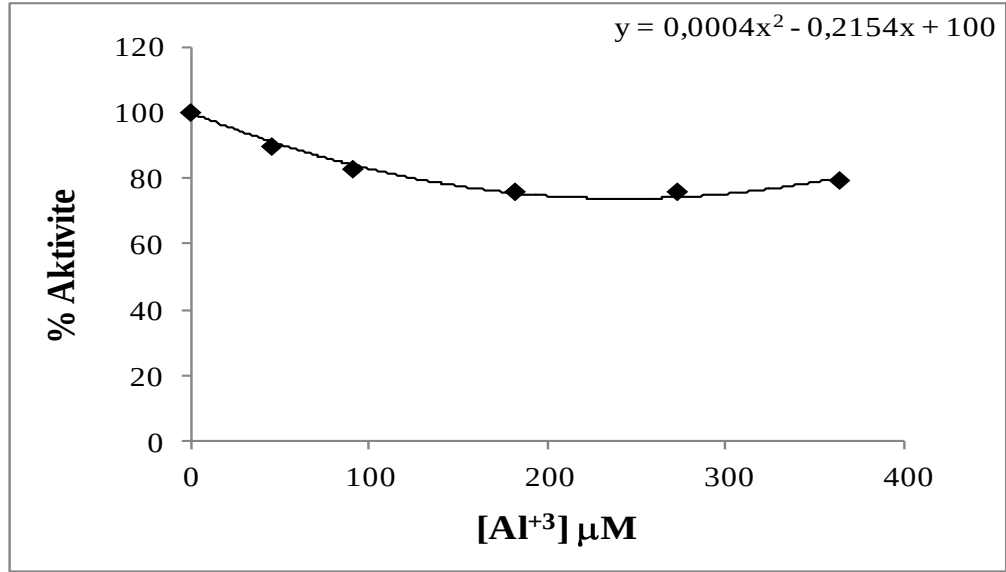
| $[Mn^{+2}]mM$ | % Aktivite |
|---------------|------------|
| Kontrol       | 100        |
| 0,45          | 103,8      |
| 0,91          | 196,2      |
| 1,82          | 203,8      |
| 2,27          | 319,2      |
| 2,73          | 338,5      |



**Şekil 4.27.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine  $Mn^{+2}$  iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.25.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine  $Al^{+3}$  iyonunun etkisi

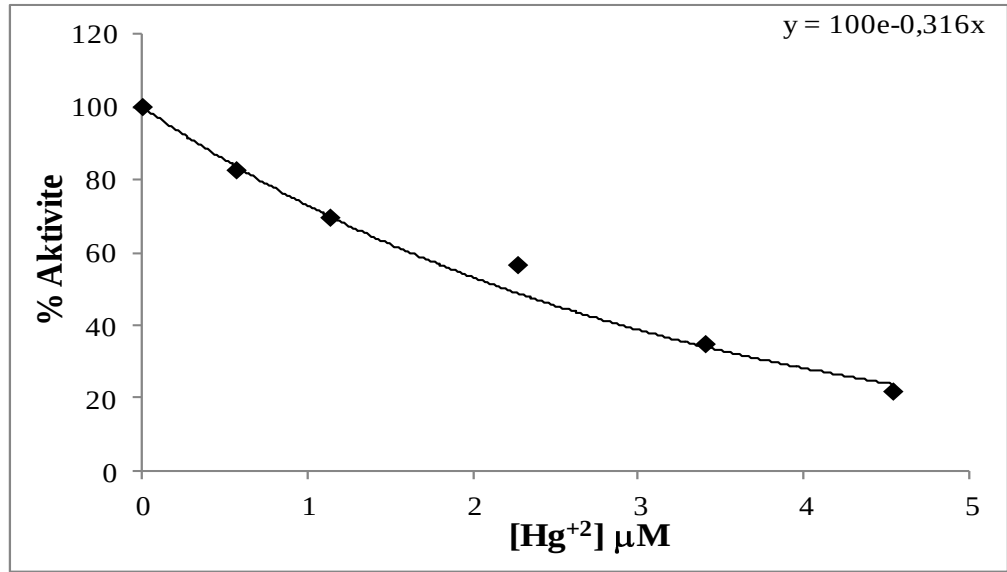
| $[Al^{+3}]\mu M$ | % Aktivite |
|------------------|------------|
| Kontrol          | 100        |
| 45,45            | 89,7       |
| 90,91            | 82,8       |
| 181,82           | 75,7       |
| 272,73           | 75,7       |



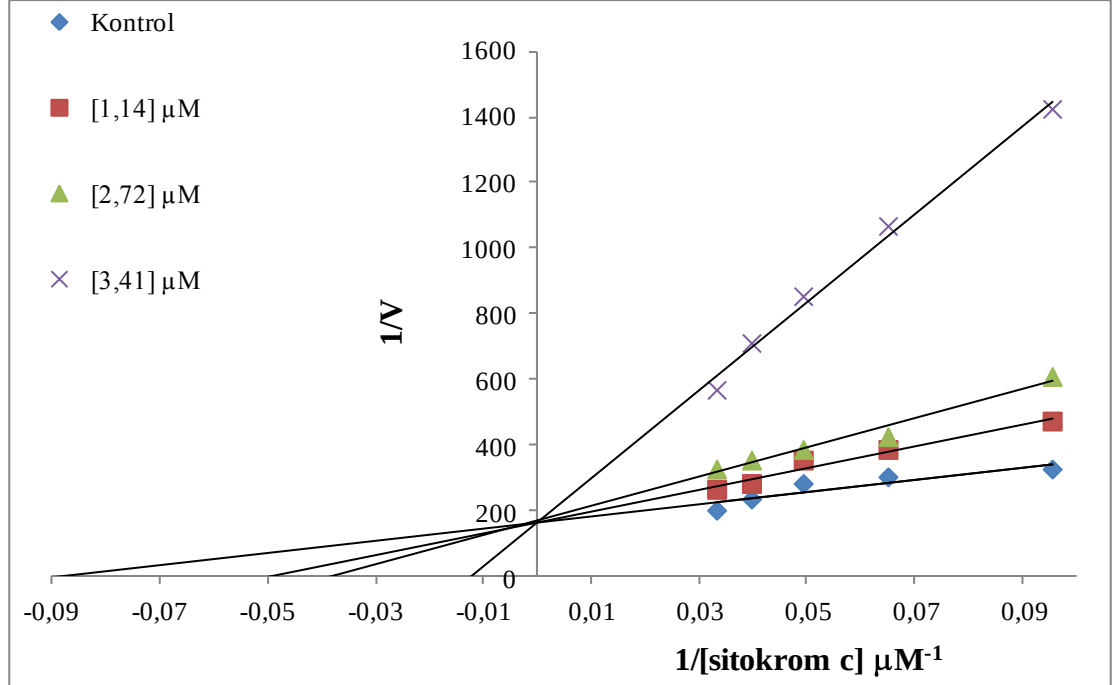
**Şekil 4.28.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine  $\text{Al}^{+3}$  iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 4.26.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine  $\text{Hg}^{+2}$  iyonunun etkisi

| $[\text{Hg}^{+2}]\mu\text{M}$ | % Aktivite |
|-------------------------------|------------|
| Kontrol                       | 100        |
| 0,57                          | 82,6       |
| 1,14                          | 69,6       |
| 2,27                          | 56,5       |
| 3,41                          | 34,8       |
| 4,55                          | 21,7       |



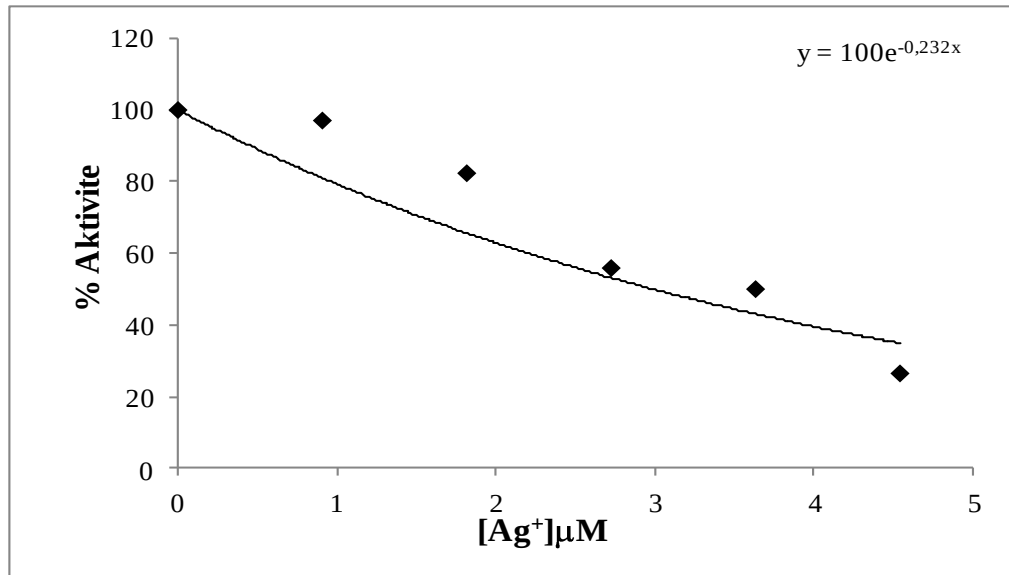
**Şekil 4.29.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine  $\text{Hg}^{+2}$  iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği



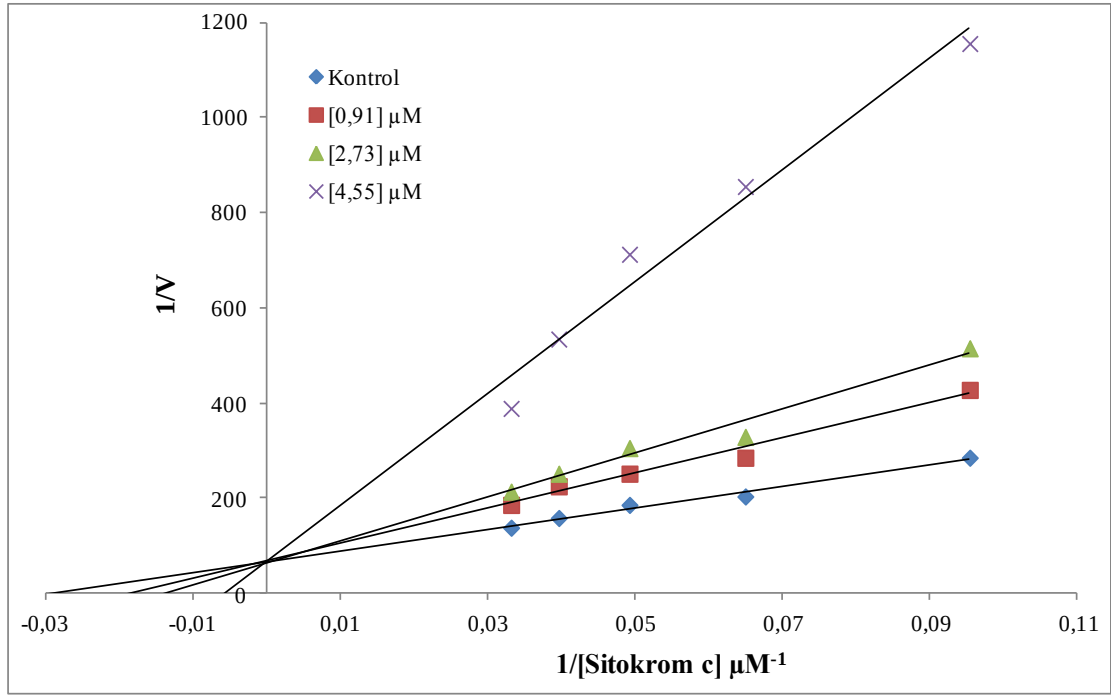
**Şekil 4.30.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminde  $\text{Hg}^{+2}$  iyonu için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 4.27.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine  $\text{Ag}^+$  iyonunun etkisi

| $[\text{Ag}^+]\mu\text{M}$ | % Aktivite |
|----------------------------|------------|
| Kontrol                    | 100        |
| 0,91                       | 97,1       |
| 1,82                       | 82,4       |
| 2,73                       | 55,9       |
| 3,64                       | 50         |
| 4,55                       | 26,5       |



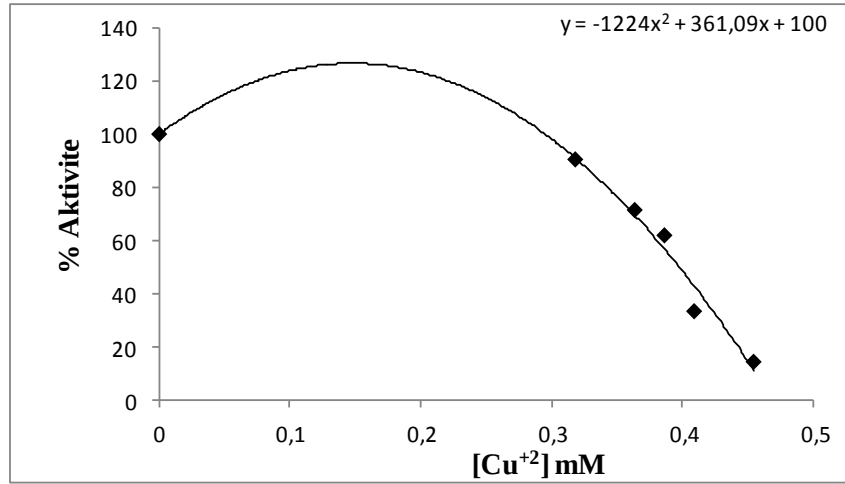
**Şekil 4.31.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine  $\text{Ag}^+$  iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği



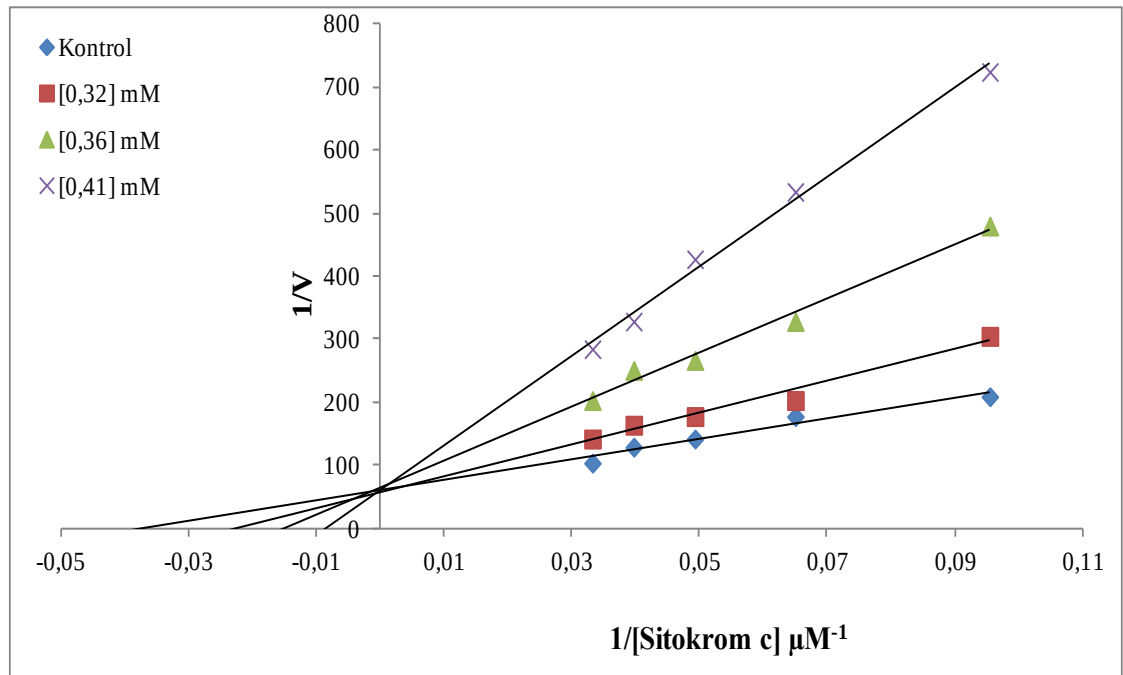
**Şekil 4.32.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminde  $\text{Ag}^+$  iyonu için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 4.28.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun etkisi

| $[\text{Cu}^{+2}]\text{mM}$ | % Aktivite |
|-----------------------------|------------|
| Kontrol                     | 100        |
| 0,32                        | 90,5       |
| 0,36                        | 71,4       |
| 0,39                        | 61,9       |
| 0,41                        | 33,3       |
| 0,45                        | 14,3       |



**Şekil 4.33.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu etkisinin % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 4.34.** Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminde  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 4.29.** İlaçların ve metal iyonlarının Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine etkilerinin sonuçları

| Etkin Madde            | IC <sub>50</sub> (μM)            | Ortalama K <sub>i</sub> (μM) | İnhibisyon Türü |
|------------------------|----------------------------------|------------------------------|-----------------|
| Hg <sup>+2</sup>       | 2,1935                           | 1,36±0,63                    | Yarışmalı       |
| Ag <sup>+</sup>        | 2,9877                           | 1,60±0,76                    | Yarışmalı       |
| Cu <sup>+2</sup>       | 397,66                           | 279,79±176,9                 | Yarışmalı       |
| Al <sup>+3</sup>       | Zayıf inhibisyon etkisi gösterdi |                              |                 |
| Pb <sup>+2</sup>       | Etki etmedi                      |                              |                 |
| Fe <sup>+3</sup>       | Etki etmedi                      |                              |                 |
| Ni <sup>+2</sup>       | Etki etmedi                      |                              |                 |
| Cd <sup>+2</sup>       | Etki etmedi                      |                              |                 |
| Zn <sup>+2</sup>       | Etki etmedi                      |                              |                 |
| Tl <sup>+</sup>        | Etki etmedi                      |                              |                 |
| Co <sup>+2</sup>       | Aktive etti                      |                              |                 |
| Ca <sup>+2</sup>       | Aktive etti                      |                              |                 |
| As <sup>+5</sup>       | Aktive etti                      |                              |                 |
| Mn <sup>+2</sup>       | Aktive etti                      |                              |                 |
| Kanamisin<br>sülfat    | Aktive etti                      |                              |                 |
| Oksitetrasiklin        | Aktive etti                      |                              |                 |
| Gentamisin<br>sülfat   | Aktive etti                      |                              |                 |
| Benzalkonium<br>klorid | Etki etmedi                      |                              |                 |
| Akriflavin             | Etki etmedi                      |                              |                 |

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi FAD ve FMN prostetik gruplarını içeren, elektron transfer eden flavoproteinler ailesine ait bir enzimdir. Sitokrom P450 ailesine ait birçok üye çoğu ksenobiyotik ve endojen bileşiklerin oksidatif metabolizmasında bu enzime ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca enzimin sitokrom P450'ler tarafından katalizlenen reaksiyonlarda kısıtlayıcı olarak görev aldığı da bilinmektedir (Portal *et al.* 2008).

Çalışmada kaynak olarak kullanılan Van Gölü balığı (*Chalcalburnus tarichi*, Pearl mullet) sazangiller ailesinin bir üyesidir ve yalnızca Van Gölü havzasında yaşayan endemik bir türdür. Farklı bir ekosisteme sahip olan Van Gölü dünyada bilinen en büyük soda gölüdür. Suyu yüksek derecede alkalidir (pH 9,8) ve tuzluluk oranı ise %19'dur. Bu alkaline ve tuzlu su gölde Van Gölü balığı dışında başka hiçbir hayvan türünün yaşamına izin vermemektedir (Sarı 2008) .

NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi daha önce yapılan çalışmalarda birçok farklı doku ve kaynaklardan saflaştırılmış, biyokimyasal, immunolojik ve yapısal özellikleri çalışılmıştır. Ancak yapılan literatür taramalarında bölge insanı için önemli bir besin kaynağı ve ekonomik değere sahip endemik bir tür olan Van Gölü balığı karaciğeri NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi hakkında herhangi bir bilgiye rastlanılmamıştır. Yapılan bu çalışmada enzim Van Gölü balığı karaciğerinde yüksek saflıkta elde edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca enzim aktivitesi üzerine bazı ilaç ve metal iyonlarının *in vitro* etkileri incelenmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışma kapsamında CPR enzimi Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarından iyon değişim kromatografisinin iki basamakta uygulanması ile yüksek saflıkta elde edildi. Bu amaçla hazırlanan karaciğer homojenatından mikrozomlar yüksek devirde santrifüj işlemi ile çöktürüldükten sonra sodyum kolat ve emulgen deterjanları ile çözünür hale getirildi. Böylece membranlara bağlı CPR enzimi tabii hali ile çözelti ortamına alındı. Elde edilen mikrozomal çözelti ilk olarak 1. DEAE

selüloz iyon değişim kromatografisine tabi tutuldu. Buradan elde edilen enzim içeren elüatlar seyreltildikten sonra 2. DEAE selüloz iyon değişim kromatografisine tabi tutuldu. 2. DEAE selüloz iyon değişim kolonundan enzim yüksek saflıkta elde edildi. Elde edilen enzim preparatları saflığının kontrolü amacı ile SDS-PAGE'ye tabi tutuldu. PAGE jelinde görülen tek banttandır enzimin saf halde elde edildiği anlaşıldı. Daha sonra enzimin tabii molekül ağırlığının belirlenmesi amacı ile 2.DEAE kolonunda elde edilen saf enzim preparatı jel filtrasyon kolonuna tatbik edildi. Ancak enzimin void hacimde geldiği, bunun ise enzimin deterjanla oluşturduğu agregatlardan kaynaklandığı anlaşıldı. Enzimin monomer molekül ağırlığının belirlenmesi için saf enzim preparatı ve protein molekül kütlesi standartları SDS-PAGE'ye yüklendi.  $R_f$  değerlerine karşı molekül kütlelerinin logaritmaları grafik edilerek elde edilen standart grafikten enzimin molekül kütlesi 70 kDa olarak bulundu. Enzimin optimum pH'sının tespiti amacıyla yapılan çalışmada enzimin pH 8,0'da en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Enzim için farklı fosfat konsantrasyonlarında aktivite ölçümü yapıldı ve enzim için optimum iyonik şiddetin yaklaşık 1 M olduğu tespit edildi. Çalışma kapsamında enzimin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 0 ile 70 °C aralığında aktivite ölçümleri yapılarak enzimin optimum sıcaklığının 50 °C olduğu belirlendi. Stabil pH'nın belirlenmesi için yapılan çalışmada ise enzim pH'ları 7,2 ile 8,8 arasında değişen tampon ortamında 4 °C'de inkübe edilerek belirli aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı. Yapılan ölçümler neticesinde enzimin pH'sı 7,6 olan fosfat tamponunda daha fazla stabil kaldığı görüldü. Optimum sıcaklık çalışmasından elde edilen sonuçlar kullanılarak enzim için ayrıca aktivasyon enerjisi ve  $Q_{10}$  değerleri hesaplandı. Yapılan çalışma kapsamında enzimin substratlarından NADPH için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi için 5 farklı NADPH konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlardan Lineweaver-Burk grafiği çizilerek  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri bulundu. Bu değerler kullanılarak enzimin NADPH substratı için  $k_{cat}$  ve  $V_0$  değerleri hesaplandı. Aynı işlemler sitokrom c substratı için de yapılarak enzimin sitokrom c için  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  ve  $V_0$  değerleri hesaplandı.

Yapmış olduğumuz çalışmada CPR enzimin karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra bazı ilaç ve metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Bu amaçla

kanamisin, oksitetrasiklin, gentamisin, benzalkonium klorid ve akriflavin ilaçları ile  $Pb^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Tl^{+}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $As^{+5}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Ag^{+}$  ve  $Cu^{+2}$  metal tuzlarının stok çözeltileri hazırlandı. Enzim aktivitesine etkisi çalışılan her ilaç ve metal iyonu için 5 farklı konsantrasyonda aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan ölçümler neticesinde çalışılan konsantrasyonlarda ilaçlardan kanamisin, oksitetrasiklin ve gentamisinin enzim aktivitesini artırırken benzalkonium klorid ve akriflavinin aktiviteye etkisinin bulunmadığı belirlendi. Metal iyonlarında ise çalışılan konsantrasyonlarda  $Pb^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Tl^{+}$  iyonlarının enzim aktivitesine etki etmediği,  $Co^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $As^{+5}$  ve  $Mn^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi artırdığı belirlendi. Enzim aktivitesine etkisi çalışılan  $Al^{+3}$  iyonunun zayıf inhibisyon etkisi gözlenirken  $Hg^{+2}$ ,  $Ag^{+}$  ve  $Cu^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi kuvvetli inhibe ettiği tespit edildi. Kuvvetli inhibisyon etkisi gösteren metaller için  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri hesaplandı. Bu amaçla 5 farklı sitokrom c konsantrasyonunda ayrı ayrı uygun olan üç farklı inhibitör konsantrasyonu için aktivite ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucu elde edilen değerler kullanılarak kuvvetli inhibisyon etkisi gösteren her bir metal için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden faydalanılarak metallerin  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri hesaplandı. Buna göre  $Hg^{+2}$  nin enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği,  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerlerinin sırasıyla 2,1936  $\mu M$  ile 1,36 $\pm$ 0,63  $\mu M$  olduğu belirlendi.  $Ag^{+}$  nın da enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği ve  $IC_{50}$  değerinin 2,9877  $\mu M$ ,  $K_i$  değerinin ise 1,60 $\pm$ 0,76  $\mu M$  olduğu bulundu.  $Cu^{+2}$  iyonunun ise enzimi yine yarışmalı olarak inhibe ettiği belirlenerek  $IC_{50}$  değeri 397,66  $\mu M$ ,  $K_i$  değeri 279,79 $\pm$ 176,9 olarak hesaplandı.

Yasukochi and Masters (1976) tarafından yapılan çalışmada DEAE-selüloz, 2', 5'- ADP sefaroze 4B afinite kolonu, LKB ultrajel AcA 34 kolonları kullanılarak sıçan karaciğer CPR enzimi %40 verimle 126 kat saflaştırılmış ve molekül kütlesi ise 78 kDa olarak bulunmuştur.

Omurgasızlarda yapılan bir çalışmada, *Spodoptera eridania* larval midgutlarından elde edilen mikrozomal çözeltinin bromelain ile muamele edilmesi sonucu elde edilen preparatın sephadex G-100 kolonu, birinci ve ikinci DEAE iyon değişim kolonuna tatbik edilmesi ile uygulanan saflaştırma prosedürü sonucu CPR enziminin %33,3

verimle 405 kat saflaştırıldığı, molekül kütlesinin 70 kDa olduğu bildirilmiş, aynı yöntemle sıçan karaciğerinden de 144 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir (Crankshaw *et al.* 1979).

Wang *et al.* (1980) tarafından yapılan CPR enziminin insan karaciğerinden saflaştırılması ve sıçan karaciğerinden saflaştırılan CPR enzimi ile karşılaştırılması çalışmasında, kolat deterjanı ve PMSF gibi proteaz inhibitörleri kullanıldığı bildirilmiştir. İnsan karaciğer CPR enziminin saf olarak elde edilemediği ancak %80'den büyük bir kısmının 70 kDa'luk noktada bant verdiği ve bu enzim preparatının P450 bağımlı hidroksilasyon aktivitesi gösterdiği aktarılmıştır.

Domuz testis mikrozomları yine deterjanla çözünür hale getirilerek sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, 2', 5'- ADP sepharose 4B afinite kromatografisi ve izoelektrik odaklama kromatografi teknikleri kullanılarak %1,23 verimle 731 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile yapılan molekül kütlesi tayininde jelde 78 kDa kütlesine rastlayan kesimde kalın bir bant ile 60 ve 15 kDa kütlesine rastlayan kesimde iki tane ince bant olmak üzere üç bant görüldüğü bildirilmiş, bunun da enzimin olası proteolitik parçalanmasından kaynaklandığı nakledilmiştir (Kuwada *et al.* 1985).

Ardies *et al.* (1987) hamster karaciğerinden elde ettikleri mikrozomal çözeltiyi chaps (3-[(3 kolamidopropil) dimetilamino] propansülfonik asit) deterjanı kullanarak çözünür hale getirdikten sonra 2', 5'- ADP agaroz afinite kolonu kullanarak %58 verimle 59,5 kat saflaştırmışlar ve monomer molekül kütlesini ise SDS-PAGE ile 76 kDa olarak belirlemişlerdir.

Sinarit balığı (*Stenotomus chrysops*) karaciğerinden CPR enzimi 225 kat saflaştırılmış ve molekül kütlesi 82,6 kDa olarak nakledilmiştir (Klotz *et al.* 1983). Kaynak olarak gökkuşağı alabalığı karaciğerinin kullanıldığı bir başka çalışmada da enzimin molekül kütlesi 76 kDa olarak aktarılmıştır (Williams *et al.* 1983). İlyaya balığı (*Liza saliens*) karaciğerinden saflaştırılan CPR enziminin ise molekül kütlesi 77 kDa olarak

bildirilmiştir. Bu çalışmada da yine iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi ve hidroksilapatit kolon kromatografisini içeren saflaştırma yönteminin uygulandığı ve %17,5 verimle 438,3 kat saflaştırıldığı aktarılmıştır (Sen and Arinc 1997).

Yapmış olduğumuz çalışmada bütün basamaklardaki kantitatif protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı. Bu yöntem hassasiyetinin yüksek olması (1-200 µg) ve yapılan literatür taramalarında çoğunlukla tercih edilmesi sebebiyle seçildi.

Yapılan bu çalışmada Van Gölü balığı karaciğerinden elde edilen mikrozomal çözelti anyonik safra asidi deterjanı olan sodyum kolat ve noniyonik bir deterjan olan emulgen 913 ihtiva eden bir çözelti ile çözünür hale getirildi. Bu çözelti ayrıca ε-ACA ve PMSF gibi proteaz inhibitörlerini içermektedir. Çünkü enzimin proteolitik parçalanmalara karşı oldukça hassas olduğu bilinmektedir. Çözünür hale getirilen mikrozomal çözeltiden enzim tek basamakta 2', 5'- ADP sepharose 4B afinite kolonu ile saflaştırılmaya çalışıldı. Bu amaçla kolon pH'sı 6,0, 6,5, 6,8, 7,0, 7,1 ve 7,7 olan dengeleme tamponu ile dengelendi. Ancak hiçbir denemede enzim kolona tutunmadı. Daha sonra afinite kolonu öncesinde enzim preparatı önce birinci ve ikinci DEAE-selüloz iyon değişim kolonuna tabi tutuldu. Elde edilen enzim elüatları bazı safsızlıkları içermekte idi. Bu nedenle elüatlar tekrar 2', 5'- ADP sepharose 4B afinite kolonuna tatbik edildi. Burada da kolon önce pH'sı, 6,2, 6,5, 6,8, 7,1, 7,5, 7,7 ve 8,0 olan 50 mM fosfat içeren dengeleme tamponu ile dengelendi. Ancak yine enzimin kolona tutunması sağlanamadı.

Widdowson'un (2010) bildirdiğine göre daha önce yapılan çalışmalarda standart 2', 5'- ADP sepharose kolonunun rekombinant *A. gambiae* CPR enziminin saflaştırılmasında zayıf reçine etkileşimleri nedeniyle sürekli başarısız olduğu vurgulanmış ve bu inhibisyon çalışmaları ile de desteklenmiştir.

Enzimin saf halde elde edilebilmesi için birinci DEAE-selüloz kolonuna uygulanan miktar azaltılarak yıkama süresi uzatıldı. Elüsyon işlemi ise gradientli tuz

konsantrasyonu ile yapıldı. Buradan elde edilen enzim elüatları tekrar ikinci DEAE-selüloz kolonuna tatbik edildi. İkinci DEAE-selüloz kolonu uygulamasında da yine yıkama süresi uzatıldı ve elüsyon gradientli tuz konsantrasyonu ile yapıldı. Bu şekilde uygulanan saflaştırma prosedürü sonucunda elde edilen enzimin SDS-PAGE’de yürütülmesi sonucu tek bant görüldü.

Karaciğer homojenatı hazırlanmasından ikinci DEAE-selüloz kolonundan enzim elüe edilinceye kadar geçen bütün basamaklarda enzim aktivite kaybını en aza indirmek için kar ile soğutma yapıldı. Santrifüj basamaklarında ise soğutmalı santrifül ile ortam sıcaklığı 4°C’de sabit tutuldu. Saflaştırma basamaklarındaki protein miktarı Lowry metoduna göre yapıldı. Enzimin aktivite ölçümü Master *et al.* (1967) yöntemine göre oda sıcaklığında spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu yöntem ile enzimin NADPH’a bağımlı sitokrom c’yi indirgemesi sonucu indirgenmiş sitokrom c’nin 550 nm’de sebep olduğu absorbans artışına bakıldı. Enzimin saflaştırma tablosunun hazırlanmasında, karakterizasyonu ve bütün kinetik çalışmalarda bu yöntemle göre aktivite ölçümü yapıldı.

CPR enzimi yapılan çalışma ile Van Gölü balığı karaciğerinden %54,4 verim ile 38 kat saflaştırıldı. Enzimin saflığı ve monomer molekül kütlesi SDS-PAGE ile belirlendi. SDS-PAGE jeli üzerinden enzim için  $R_f$  değeri hesaplanarak, yine aynı jel üzerinde yürütülen standart proteinlerin  $R_f$  değerleri ile molekül kütlelerinin logaritmaları kullanılarak çizilen standart grafikten enzimin monomer molekül kütlesi tespit edildi. Buna göre enzimin  $R_f$  değeri 0,4739 ve bu değere karşılık gelen molekül kütlesi ise 70 kDa olarak bulundu.

Enzimin tabii molekül kütlesini belirlemek için saf halde elde edilen enzim sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisine tabi tutuldu. Ancak enzimin void hacimde geldiği gözlemlendi. Kuwada *et al.* (1985) tarafından yapılan çalışmada da uygulanan AC-34 jel filtrasyon sonucunda aktivite görülen tüplerin  $K_{av}$  değerleri hesaplandığında elüatların molekül kütlesinin 70 ve 640 kDa olduğu gözlenmiş ve 640 kDa’luk değer enzim ile detejanın oluşturduğu agregatlardan kaynaklandığı belirtilmiştir. Yine Serabjit-Singh *et*

*al.* bildirdiğine göre (1979) tavşan karaciğer redüktaz enzimin proteolitik parçalanması sonucu iki farklı form oluştuğu, sephakril S-200 jel filtrasyon kromatografisi uygulandığında parçalanma ürününün 68 kDa'luk BSA ile aynı hacimde gelmesi, tabii redüktazın ise voit hacimde gelmesinin tabi redüktazın agregat oluşturma eğilimini gösterdiği belirtilmiştir.

Optimum pH çalışmaları sonucunda Van Gölü balığı karaciğeri CPR enzimin optimum pH'sının 8,0 olduğu belirlendi. Koyun akciğeri mikrozomlarından saflaştırılan mikrozomal CPR enzimi için pH 6,2 ile 8,4 arasında aktivite ölçümü yapıldığı ve aktivitenin pH 7,8'e kadar yükseldiği ve pH 8,4' e kadar da yaklaşık olarak sabit kaldığı bildirilmiştir (İşcan and Arınç 1985). Laporte *et al.* (1991) tarafından yapılan çalışmada da tavşan peritoneal nötrofillerinden saflaştırılan CPR enzimin aktivitesinin pH 7,5 ile 8,5 arasında maksimum olduğu aktarılmıştır. Şen (1997) tarafından yapılan çalışmada ise ilarya balığı karaciğerinden saflaştırılan CPR enzimi için en yüksek aktivitenin pH 7,4 ile 7,8 arasında gözlemlendiği aktarılmıştır.

CPR enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik çalışmalar sonucunda enzimin yaklaşık 1 M küvet içi konsantrasyonuna sahip fosfat tamponunda en yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Ancak saflaştırma tablosu hazırlanmasında ve kinetik çalışmalarda 0,3 M'lık fosfat tamponu kullanıldı. Çünkü küvet içi fosfat konsantrasyonunun 1 M olduğu durumlarda küvet ortamının bulanıklaştığı ve ölçümlerin bazen tutarlı sonuçlar vermediği belirlendi. Enzim için optimum iyonik şiddetin yüksek olmasının nedeni Noznesensky and Schenkman (1992) tarafından, elektron transferinin yüksek iyonik şiddet sebebiyle enzim ile yüklü redoks partnerleri arasındaki elektrostatik etkileşimin nötralize edilmesi sonucu uyarılması, olarak açıklanmıştır.

CPR enzimi için yapılan optimum sıcaklık çalışmalarında enzimin 50°C'de en yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Optimum sıcaklık çalışmasına literatürde rastlanılmamışsa da Arınç and Çelik (2002) tarafından sığır karaciğeri mikrozomlarından

saflaştırılan CPR enziminin sıcaklığa karşı stabilitesi çalışılmış ve enzimin 25°C’de gliserollü ortamda gliserolsüz ortama göre daha stabil olduğu belirlenmiştir.

Stabil pH çalışması sonucunda enzimin pH 7,6’da uzun süre stabil kaldığı belirlendi. Enzimin stabil kaldığı sürenin uzun olmasına enzim preparatı içinde bulunan gliserolün de etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Enzim için yapılan kinetik çalışmalarda hesaplanan spesifik aktivite değeri 0,20463 EÜ/ml olarak bulunmuştur. Enzimin substratlarından NADPH için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile 5,208  $\mu M$  ve  $12,76 \times 10^{-3}$  EÜ/ml olarak hesaplandı. Sitokrom c için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri ise sırasıyla 12,82  $\mu M$  ve  $42,9 \times 10^{-3}$  EÜ/ml olarak bulundu.  $V_0$  ve  $k_{cat}$  değerleri de her iki substrat için ayrı ayrı hesaplandı. Hesaplama sonucu NADPH için sırasıyla 504,16  $\mu M^{-1}s^{-1}$  ve 2 625,67  $s^{-1}$  olarak, sitokrom c için ise sırasıyla 702,076  $\mu M^{-1}s^{-1}$  ve 9000,62  $s^{-1}$  olarak tespit edildi. Şen (1997) tarafından yapılan çalışmada ilarya balığı (*liza saliens*) redüktaz enzimi için spesifik aktivite 52,6  $\mu M/dk/mg$  protein ve sitokrom c için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 7,69  $\mu M$  ve 47,6  $\mu M/dk/mg$  olarak bildirilmiştir. Mori *et al.* (2006) tarafından Afrika kurbağası (*Xenopus laedis*) karaciğerinden yapılan çalışmada ise redüktaz enziminin spesifik aktivitesi 23,8 ünite/dk/mg protein olarak tespit edilmiştir. *Spodoptera eridania* midgutlarından saflaştırılan CPR enziminin sitokrom c ve NADPH için  $K_M$  değerleri sırasıyla  $34,1 \pm 1,9 \mu M$  ve  $46,6 \pm 4,2 \mu M$  olarak hesaplandığı bildirilmiştir (Crankshaw *et al.* 1979).

Yapılan bu çalışma kapsamında sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemi ve ksenobiyotik metabolizması için oldukça önemli olan CPR enzimi Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarından iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı ve optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet, optimum pH ve stabil pH’sı gibi özellikleri belirlendi. Bununla birlikte enzimin substratlara olan ilgisinin bir ölçüsü olan  $K_M$  sabiti sitokrom c ve NADPH için ayrı ayrı ve yine  $V_{max}$  değeri de her iki substrat için Lineweaver-Burk grafikleriyle hesaplandı. Bütün bu karakterizasyon işlemleri

yapıldıktan sonra bazı ilaç ve metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine olan etkilerinin incelenmesine geçildi.

Hayvan sağlığında ve akvaryum balıkçılığında kullanılan bazı ilaçlar ile bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Çalışmalar esnasında tampon olarak HEPES tamponu seçildi. Çünkü deneme çalışmalarında HEPES tamponunun fosfat tamponuna göre daha sağlıklı sonuçlar verdiği alınan ölçüm sonuçlarının birbiriyle uyumlu olmasından anlaşıldı. Bozcaarmutlu and Arınç (2007) tarafından yapılan çalışmada da fosfat tamponunun kadmiyum ve nikel gibi bazı metal iyonları ile fosfat tuzu halinde çökelti oluşturduğu belirtilmiştir. Bu kapsamda önce hayvan sağlığında kullanılan ve etken maddesi kanamisin, oksitetrasiklin ve gentamisin olan antibiyotiklerin etkisi incelendi.

Mantar, bakteri ve aktinomisitler gibi canlı mikroorganizmalar tarafından üretilen veya sentezle sentetik olarak elde edilen, düşük miktarlarda bile bakterilerin gelişimini durduran veya tamamen öldüren maddelere antibiyotik denilmektedir. Yavaş gelişme, hızlı gelişme ve dinlenme dönemleri olmak üzere üç çoğalma evresine sahip olan bakterilere antibiyotikler hızlı ve yavaş gelişme dönemlerinde etki etmektedir. Etki mekanizması hücre duvarı sentezini engelleyerek, sitoplazmik zarın geçirgenliğini bozarak, nükleik asit sentezini durdurarak, ara metabolizmayı değiştirerek veya protein sentezini engelleyerek olabilmektedir (Akkan ve Karaca 2003).

Yapmış olduğumuz çalışma kapsamında enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenen ilaçlardan kanamisin aminoglikozid bir antibiyotiktir. Kanamisinin *Streptomyces kanamyceticus*'un fermantasyonu ile üretildiği ve sülfat tuzu halinde kullanılmakta olduğu aktarılmıştır. *E. coli*, *Proteus species*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter* gibi bakterilerden kaynaklı çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığı, ayrıca *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin neden olduğu tüberküloz hastalığının ikincil tedavisinde kullanıldığı belirtilmiş ve diğer aminoglikozidler gibi ototoksik ve nefrotoksik etkiye sahip olduğu aktarılmıştır (Manyanga *et al.* 2010).

Etkilerine karşı direnç gösteren bakteri suşlarının oluşmasına karşın ülkemizde özellikle veteriner hekimlik alanında yaygın olarak kullanılan tetrasiklin grubu bir antibiyotik olan oksitetrasiklin geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı etkili olan tetrasiklin grubu antibiyotiklerin *aktinomiset* türleri, *klamidia*, mikoplazma türleri, *spiroketler* ve *riketsia* türlerine karşı da kullanıldığı belirtilmiştir (Gürel 2009). Birleşik Devletler Federal İlaç İdaresi (FDA) tarafından balık yetiştiriciliğinde kullanımına izin verilen oksitetrasiklinin etkisini bakterilerin gelişimini engelleyerek gösterdiği belirtilmiştir. Oksitetrasiklinin balıklarda *Flavobacterium columnare* bakterisinin neden olduğu columnaris hastalığı, edwardsiyeloz hastalığı ve kızıl ağız hastalıklarından korunma ve tedavisinde önerildiği aktarılmıştır (Serezli *et al.* 2005).

Bakteri öldürücü antibiyotik olan gentamisin farklı hayvan hücre kültürlerinde etkisinin çalışıldığı, 50-100 µg/ml konsantrasyon aralığında insan, maymun, fare, balık, sığır ve hamster hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (Dodds and Roberts 1980). Ancak Benzer vd. (2006) bildirdiğine göre insan ve hayvanlarda gram negatif bakteriler başta olmak üzere birçok mikroorganizmaya karşı kullanılan bir aminoglikozid antibiyotik olan gentamisinin terapötik dozlarda böbrek hasarına neden olabildiği, bu ilacı kullanan hastaların yaklaşık %20'sinde akut böbrek yetmezliği görüldüğü aktarılmıştır.

Çalışmamızda CPR enzimi aktivitesine etkisi incelenen bu ilaçlar etken madde olarak 250 mg/ml kanamisin eşdeğer kanamisin sülfat, 200 mg/ml oksitetrasiklin baza eşdeğer oksitetrasiklindihidrat ve 40 mg/ml gentamisin eşdeğer gentamisin sülfat içermektedir. Kinetik çalışma sonucunda ilaçların üçünün de enzimi belirtilen konsantrasyonlarda aktive ettiği tespit edildi. Çalışılan konsantrasyonlarda kanamisin etken maddesi aktiviteyi yaklaşık 3 kat, oksitetrasiklin yaklaşık 2 kat ve yine gentamisinin de aktiviteyi yaklaşık 2 kat artırdığı gözlemlendi.

Pillai and Mehvar (2011) tarafından daha önceden yapmış oldukları bir çalışmada P450 indüksiyonu ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin arttığı bunun da karaciğer

hasarına neden olduğu (iskemi-redperfüzyon), inhibisyonu ile de azaldığı belirlenmiştir. Tannik asit (TA) muamelesinin CPR aktivite kaybının yanında ROS üretimini de azalttığı ve hücrenin reperfüzyondan 20 dk sonra yaşama yeteneğini önemli ölçüde yükselttiği bildirilmiştir. Portal *et al.* (2008) aktardığı bilgilerde de CPR'nin P450'ler tarafından katalizlenen reaksiyonlarda hız kısıtlayıcı olduğu belirtilmiştir. Yine Pillai and Mehvar (2011)'ın aktardığına göre CPR'nin indirekt olarak P450 monooksijenaz enzim sistemi vasıtasıyla ve direkt olarak ta moleküler oksijenden süperoksit üretimi ile ROS üretimini sağladığı bilinmektedir. Bütün bu bilgiler ışığında enzimin çalışılan ilaçlar ile aktivitesinin arttığı göz önünde bulundurulsa ROS'nin üretimi artabileceği ve böylece hücre hasarlarına neden olabileceği düşünülmektedir. Enzimin aktivitesinin artması ile direkt olarak aerobik koşullarda moleküler oksijenin indirgenmesi sonucu süperoksit radikali üretimi artabileceği gibi enzimin P450 reaksiyonlarında hız kısıtlayıcı olduğu düşünüldüğünde P450 reaksiyon hızının artması ve bu yolla da indirekt olarak ROS üretiminin artabileceği düşünülmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışma kapsamında akvaryum balıklarında kullanılan ağız ve yüzgeç küfü gibi bakteriyel hastalıkların tedavisinde, bakterilerin neden olduğu ikincil infeksiyonların tedavisinde yararlanılan benzalkonium kloridin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Benzalkonium kloridin ayrıca gıda endüstrisinde üretim aşamalarında ve yüzey alanlarında gıda güvenliğini sağlamak amacıyla dezenfektan ve yüzey aktif ajan olarak, ilaçların antimikrobiyal olarak korunmasında ve yine sağlık tesislerinde dezenfektan ve antiseptik olarak kullanıldığı aktarılmıştır (Fazlara and Ekhtelat 2012).

Yine bu kapsamda akriflavinin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Akriflavinin akvaryum balıkçılığında *aeromonas* ya da *pseudomonas* gibi bakterilerden kaynaklı infeksiyonlar kadar columnaris hastalıkları, yüzgeç çürümesi, kanat çürümesi gibi tipik bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olduğu bilinmektedir. Ayrıca Hassan *et al.* (2011) tarafından yapılan çalışmada da akriflavinin kolonda veya rektumda oluşan bir kanser türü olan kolorektal kanserin tedavisinde kullanılabilecek bir ilaç olduğu belirlenmiştir.

CPR enzimi aktivitesi üzerine etkisi incelenen benzalkonium klorid ve akriflavin etken maddelerinin çalışılan konsantrasyon aralıklarında aktivite üzerine lineer bir etkisi gözlenmedi.

Kimyasal olarak sentezlenen organik bileşiklerin aksine metaller yerkürede doğal olarak bulunmaktadır. Bu metaller ya hava, yüzey suları ve toprak (yeraltı suları) gibi doğal yollardan ya da insanoğlunun aktiviteleri nedeniyle su sistemlerine taşınmaktadırlar. Endüstrideki hızlı gelişmenin bir sonucu olarak son yıllarda akuatik sistem metal kirliliği ile karşı karşıya kalmıştır.

Ağır metal söyleminin kesin bir tanımı olmamakla birlikte yoğunluk bu tanımın yapılmasında kullanılan en yaygın faktör olduğu ve spesifik yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$ 'den fazla olan metallerin bu sınıfa dahil edildiği bildirilmiştir. İnsan sağlığı için ağır metal kaynaklı tehdidin yoğunlukla kurşun, kadmiyum, arsenik ve civa ile ilişkili olduğu nakledilmiştir. Bu ağır metallerin sağlık için yan etkilerinin bilinmesine rağmen insanoğlu tarafından kullanımının arttığı belirtilmiştir. Örneğin civa altın madenciliğinde, arsenik ahşap korumasında ve kurşun tetraetil ise petrol katkı maddesi olarak kullanıldığı aktarılmıştır (Järup 2003).

Bozcaarmutlu (2007) tarafından selenyum, bakır, çinko, demir ve manganez gibi metallerin biyolojik sistemde önemli rol oynamaları sebebiyle esansiyel oldukları ancak kadmiyum, civa, alüminyum ve talyum gibi esansiyel olmayan metallerin eser miktarlarda bile toksik etkiye sahip olduğu aktarılmıştır. Ancak çoğu metalin esansiyel olsun ya da olmasın insan sağlığı için ciddi risk oluşturabileceği ve ekosistemin kendisi üzerinde yan etkiler sergileyebileceği vurgulanmıştır (Bozcaarmutlu and Arınç 2007). Ölümcül seviyenin altında sürekli olarak ağır metal iyonlarına maruz kalınması balıklarda büyüme bozukluklarına ve lipid metabolizmasının değişmesine sebep olduğu bildirilmiştir. Ayrıca metal kontaminasyonuna maruz kalmış göllerde yaşayan balıklarda da gonad büyüklükleri ve hormon seviyelerinde de değişimlerin olduğu aktarılmıştır (Levesque *et al.* 2002).

Çalışma kapsamında  $Pb^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $As^{+5}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Tl^{+}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Ag^{+}$  ve  $Cu^{+2}$  metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendi.

Kurşun elektrik batarya endüstrisi başta olmak üzere çoğu endüstriyel kullanımlar için önemli bir metaldir. Bununla birlikte araçlarda tüketilen yakıtlarda bulunan kurşun atmosferik kurşun miktarının yaklaşık %90'ını oluşturduğu bildirilmiştir. Bebek ve çocuklarda kurşunun merkezi sinir sisteminin zihinsel ve davranışsal gelişimini kritik derecede etkilediği, güncel korunma stratejilerinin bu noktada odaklandığı belirtilmiştir (Goyer 1990). Demir metalinin küçük çocuklarda doku gelişimi için esansiyel olduğu belirtilmiş ve beyin dokusunda yaşamın ilk anından itibaren bulunduğu vurgulanmıştır. Ayrıca sinirsel miyelinleşme olayına katıldığına bilinmekte olduğu, büyüme ve bağışıklığı etkileyebileceği aktarılmıştır. Ancak canlıda gereğinden fazla miktarda bulunması halinde serbest radikallerin üretilmesine ve böylece hücre fonksiyonlarının ve enzimatik aktivitelerin inhibe edilmesine sebep olacağı belirtilmiştir (Iannotti *et al.* 2006). Nikelin çevreye geniş ölçüde yayıldığı, hava, su ve toprakta bulunabileceği, doğal atmosferik nikel kaynağının volkanik küllerden, toprak ve taşların aşınmasından oluştuğu belirtilmiştir. Nikel 2008 yılında yılın alerjisi olarak kabul edilmiştir. Dünya üzerinde çalıştığı iş nedeniyle nikel metaline maruz kalan işçilerin kan, ürin ve vücut dokularında nikel seviyesinde artışlar gözlenmiştir. Nikelin solunması insanlarda akciğer, burun ve sinüs kanserine neden olduğu, mide ve gırtlak kanserini de tetiklediği belirtilmiştir (Duda-Chodak and Blaszczyk 2008). Navas-Acien *et al.* (2004) tarafından kurşun ve kadmiyumun toksik ve karsinogen olduğu belirtilmiştir. Bu elementlerin kardiyovasküler etkilerinin kan basıncını artırarak gösterdikleri, oksidatif stresi artırdıkları, nitrik oksit üretimini baskıladıkları, böbrekte fonksiyon bozukluklarına sebep oldukları bildirilmiştir.

Çinko genelde toksik olmayan metal olarak sınıflandırılmaktadır. Bunun nedenleri yüzlerce biyolojik olayda esansiyel olması, sağlıklı bir yaşam için dietlerde bulunmasının gerekliliği, doğada bol miktarda bulunması, insan için tavsiye edilen günlük çinko alımının 8-15 mg ile çoğu diğer esansiyel elementlerden fazla olması, yaşlanma ile vücutta toplanmaması olarak verilmiştir. Ancak çinko klorür gibi bazı

Çinko tuzlarının belirli konsantrasyonlarda epitel dokulara zarar verebildiği, soluma, temas ve oral yoldan alınması durumunda lokal patalojik etkilere sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca çok fazla çinko alımının pankreatik enzimlerin seviyelerini ve serumdaki lipoprotein miktarlarını etkilediği aktarılmıştır (Walsh *et al.* 1994). Talyum en toksik ağır metallerden birisidir. Birçok gelişmiş ülkede kemirgen öldürücü olarak uygulanması ve yeni teknoloji alanlarında yükselen kullanımı insan ve hayvanların talyuma maruz kalma riskini artırmaktadır. Talyumun muhtemel toksik etkisini proteinlerin slfihidril gruplarına bağlanarak, hücresel solunumu inhibe ederek, riboflavin ve riboflavin temelli kofaktörler ile etkileşerek ve kalsiyum dengesini bozarak gösterebileceği belirtilmiştir (Mulkey and Oehme 1993).

Çalışılan metal iyonlarından  $Pb^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Tl^{+}$ 'nin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. Bu metal iyonlarından  $Zn^{+2}$ 'nin sıçan karaciğeri CPR enzimi üzerine etkisi Kim *et al.* (2002) tarafından çalışılmış ve aktiviteye bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bozcaarmutlu and Arınç (2007) tarafından da  $Zn^{+2}$ 'nin ilarya balığı karaciğer CPR enzimi aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı belirtilmiş bununla birlikte  $Ni^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$ 'nin enzim aktivitesini inhibe ettiği aktarılmıştır. İnhibisyon türü yarışmasız olarak belirlenmiş  $Ni^{+2}$  için  $K_i$  ve  $IC_{50}$  değerlei sırasıyla  $329 \pm 50,3 \mu M$  ve  $143 \mu M$  olarak,  $Cd^{+2}$  için ise sırasıyla  $72,8 \pm 3,5 \mu M$  ile  $33 \mu M$  olarak verilmiştir. Casalino *et al.* (2000) tarafından yapılan çalışmada da kadmiyumun *in vivo* olarak sıçanlara uygulanması sonucu sıçan karaciğer mikrozomal CPR enzim aktivitesi, uygulamadan 6 saatlik zaman diliminde arttığı ancak bu noktadan sonra önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bozcaarmutlu (2007) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise  $Tl^{+3}$ 'n enzimi *in vitro* olarak inhibe ettiği, inhibisyon türünün yarışmasız olduğu,  $K_i$  ve  $IC_{50}$  değerlerinin sırasıyla  $5,6 \pm 0,24 \mu M$  ile  $3 \mu M$  olduğu aktarılmıştır. Bozcaarmutlu *et al.* (2011) tarafından yapılan birdiğer çalışmada ise  $Pb^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$ 'nin sığır karaciğerinden saflaştırılan CPR enzimini inhibe ettiği, bu üç metal iyonu için  $IC_{50}$  değerinin sırasıyla  $0,027 \text{ mM}$ ,  $0,059 \text{ mM}$  ve  $2,9 \text{ mM}$  olduğu belirlenmiştir. Ayrıca  $K_i$  değerlerinin de Lineweaver-Burk ve Dixon grafikleri ile sırasıyla  $0,03 \text{ mM}$ ,  $0,04 \text{ mM}$  ve  $2,0 \text{ mM}$  olduğu tespit edilmiştir.

Kobalt canlılar için esansiyel bir oligoelementtir (eser miktarda bulunan) ve B<sub>12</sub> vitamin bileşiminine girmektedir. Genel popülasyon dikkate alındığında kobalta maruz kalınan temel kaynaklar yiyecek ve içecekler olarak aktarılmıştır. Endüstride ise kobalt tozu üretimi, ağır metallerin üretimi ve kullanımlarında, kobalt alaşımlarında ve elmas parlatımında kullanılan disklerde bulunduğu belirtilmiştir. Kobaltın vücutta temel olarak hedef aldığı organların ise cilt ve solunum sistemi olduğu aktarılmıştır (Lauwerys and Lison 1994). Arsenik toprak, hava, su ve gıdalarda doğal olarak bulunan ve insanların bu nedenle tabii olarak maruz kaldığı bir elementtir. Endüstride yarı iletken üretiminde çalışan işçiler ile bazı tarım çalışanlarının arsenik içeren ot öldürücüler kullanarak arseniğe maruz kaldıkları bilinmektedir. Arseniğin insan sağlığı üzerine cilt, iç organ kanserleri, kardiyovasküler ve nörolojik yan etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Abernathy *et al.* 1999). Kalsiyumun ise kemik yapısına girmesinin yanı sıra Yamashita *et al.* (1986) tarafından nöronların uyarılması kadar sinaptik transmisyonunda da esansiyel bir rol oynadığı aktarılmıştır. Manganın ise vücuda başlıca solunum yoluyla girdiği diğer yan etkilerinin yanı sıra sinir sistemine zarar verdiği aktarılmıştır (Levy and Nassetta 2003).

Yapılan çalışma neticesinde elde edilen sonuçlarda Co<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, As<sup>+5</sup>, Mn<sup>+2</sup>, nin enzim aktivitesini artırdığı gözlemlendi. Çalışılan konsantrasyon aralıklarında metal iyonlarının sırasıyla enzim aktivitesini yaklaşık olarak %176, %222, %211 ve %338'e kadar artırdığı gözlemlendi. Ancak Kim *et al.* (2002) tarafından yapılan çalışmada Co<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup> iyonlarının aktiviteye herhangi bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. Metallerin aktivasyon etkisi önceden belirtilen nedenlerden ötürü direkt ya da indirekt olarak ROS türlerinin üretimini artırabileceği düşünülmektedir.

P450 bağımlı monooksijenaz enzim sistemi yağ asidi ve steroid sentezinde görev aldığından ve CPR enziminin de bu sistemin esansiyel bir bileşeni olması nedeniyle bu enzimin inhibisyonunun belirtilen endojen bileşiklerin sentezini inhibe edebileceği belirtilmiştir. Steroid ve lipidlerin sentezinin azalması ise balıklarda büyümeyi ve üreme kapasitesini etkileyebileceği bildirilmiştir. Bunların yanı sıra CPR enziminin balıklarda

inhibisyonu toksik ksenobiyotiklerin birikimine ve böylece popülasyon değişimlerine neden olabileceği ifade edilmiştir (Bozcaarmutlu and Arinç 2007).

Dünyanın birçok yerinde balığın insanlar için temel besin kaynağı olması nedeniyle çevre ve gıda kaynaklarındaki metal kontaminasyonunda balıklar kadar insanların da etkilenebileceği belirtilmektedir. P450 proteinleri insanlarda CPR enzimi ile birlikte kolesterol, steroidler, prostasiklinler ve tromboksan A2 gibi önemli endojen substratların sentezinde gerekli enzimlerdir. Ayrıca P450 izoformları insanlarda ilaç ve ksenobiyotiklerin büyük bölümünün oksidatif metabolizmasından sorumlu olduğundan CPR'nin inhibisyonunun ksenobiyotiklerin etki sürelerini uzatabileceği ve böylece ksenobiyotik toksisitesini artırabileceği ya da azaltabileceği, endojen bileşikler metabolizmasını etkileyebileceği vurgulanmıştır (Bozcaarmutlu and Arinç 2007).

Mori *et al.* (2006) fare üzerinde yapılan çalışmalarda CPR enziminin fonksiyonel bozukluğu sinir yolu, kalp sistemi, gözler, kol ve bacaklarda anormal durumlara neden olduğu aktarmışlardır. Ayrıca kendilerinin yapmış oldukları çalışmada da beyin CPR'sinden yoksun fareler ile normal fareler kıyaslanmış, CPR geninin korku koşullanması ve hafızada yeni bir rolünün kanıtlandığı bildirilmiştir.

Gümüş tuzları gibi çözünür gümüş bileşiklerinin akıl hastalıkları tedavisinde, epilepsi, nikotin bağımlılığı, gastroenterit ve frengi ile belsoğukluğu gibi hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Ayrıca gümüş eşya, mücevherat ve fotoğraf endüstrisi başta olmak üzere üretimde de birçok alanda kullanıldığı aktarılmıştır. Sağlığa olan en yaygın etkisi ise cilt ve gözlerde görüldüğü, solunum sistemine de zarar verdiği belirtilmiştir (Drake and Hazelwood 2005). Alüminyum yeryüzü katmanında en çok bulunan üçüncü elementtir. İçme sularında, yiyeceklerde ve bazı farmasötik preparatlarda bulunan alüminyumun endüstriyel kullanımının artmasına rağmen bu toksik metalin ekosisteme olan yan etkilerinin iyi bilinmediği aktarılmıştır. Yapılan çalışmalarda Alzheimer hastalığı, hematopoez, kemik yumuşaması ve adinamik kemik hastalıkları ile ilişkisi olduğunun kanıtlandığı aktarılmıştır (Bozcaarmutlu 2007). Bakırın kanda plazma proteinlerine bağlı ve albumin ile küçük moleküllere gevşek

olarak bağılı olmak üzere (serbest form) iki farklı formda bulunduğu, ikinci grubu oluşturan serbest bakırın ROS üreterek protein, lipidler ve DNA'ya zarar verdiği aktarılmıştır (Brewer 2010). Civanın yerkürede doğal olarak bulunan bir element olduğu, volkanik aktiviteler, yangınlar, akarsu, göl ve baraj taşınımları, okyanus akıntıları ve biyolojik prosesler neticesinde çevreye doğal yollardan yayıldığı aktarılmıştır. İnsanların solunum, oral ve deri yoluyla civanın organik formlarına maruz kaldıkları bildirilmiştir. Organik civaya maruz kalmanın başlıca etkileri nörolojik, sindirim sistemi organları, solunum sistemi, karaciğer, cilt, bağışıklık ve böbreklerde görüldüğü aktarılmış, çoğu popülasyon için organik civaya maruz kalmanın temel sebeplerinden biri metilciva kontaminasyonu içeren balık ve kabuklu deniz ürünleri tüketimi olduğu belirtilmiştir (Risher *et al.* 2002).

Yapmış olduğumuz çalışmada  $Al^{+3}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Ag^{+}$  ve  $Cu^{+2}$  iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir.  $Al^{+3}$  iyonu enzimi kısmi olarak inhibe etmiş ancak çalışılan konsantrasyon aralıklarında %25 oranının altına inilememiştir. Bozcaarmutlu (2007) tarafından yapılan çalışmada ilarya balığı karaciğeri CPR enzimi üzerine etkisi incelenmiş, metal iyonunun enzimi yarışmasız olarak inhibe ettiği ve  $K_i$  ile  $IC_{50}$  değerleri ise sırasıyla  $8,9 \pm 0,24 \mu M$  ve  $34 \mu M$  olarak verilmiştir.

Bu çalışma kapsamında  $Hg^{+2}$  iyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde  $Hg^{+2}$ 'in enzim aktivitesini yarışmalı olarak inhibe ettiği belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği vasıtasıyla  $K_i$  değeri  $1,36 \pm 0,63 \mu M$  olarak hesaplandı. Yapılan kinetik çalışma sonucunda  $IC_{50}$  değeri ise  $2,1935 \mu M$  olarak hesaplandı. Bozcaarmutlu and Arınç (2007) tarafından yapılan çalışmada  $Hg^{+2}$ 'in enzimi yarışmasız olarak inhibe ettiği,  $IC_{50}$  değerinin  $0,07 \mu M$  ve  $K_i$  değerinin ise  $0,048 \pm 0,0002 \mu M$  olduğu aktarılmıştır.

Van Gölü balığı karaciğer CPR enziminin çalışılan konsantrasyon aralıklarında  $Ag^{+}$  iyonu tarafından yarışmasız olarak inhibe edildiği belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği vasıtasıyla  $K_i$  değeri  $1,6 \pm 0,76 \mu M$ ,  $IC_{50}$  değeri ise  $2,9877 \mu M$  olarak hesaplandı.

Yapılan literatür taramasında  $Ag^+$  ile ilgili *in vitro* olarak herhangi bir inhibisyon çalışmasına rastlanmamıştır.

$Cu^{+2}$  iyonunun enzim aktivitesine etkisi incelendiğinde enzimin  $Cu^{+2}$  iyonu tarafından yarışmalı olarak inhibe edildiği belirlendi. İnhibisyona ait  $K_i$  değeri Lineweaver-Burk grafiği vasıtasıyla  $279,79 \pm 176,9 \mu M$  olarak belirlendi.  $IC_{50}$  değeri ise  $397,66 \mu M$  olarak hesaplandı. Kim *et al.* (2002) tarafından yapılan çalışmada CPR enzimin sitokrom c redüksiyon aktivitesinin  $Cu^{+2}$  iyonu tarafından *in vitro* olarak inhibe edildiği ve bu inhibisyona ait  $IC_{50}$  değerinin ise  $5,8 \mu M$  olduğu aktarılmıştır. Yapılan çalışmada ayrıca  $Cu^{+2}$ 'nin P450 monooksijenaz enzim sistemini de hem P450'leri hem de CPR enzimini inhibe ederek etkilediği belirtilmiştir.

Çalışılan metal iyonlarından  $Hg^{+2}$ ,  $Ag^+$  ve  $Cu^{+2}$ 'nin enzim aktivitesini  $\mu M$  seviyesindeki konsantrasyonlarda inhibe ettiği ve bütün inhibisyon türlerinin ise yarışmalı olduğu belirlendi. Ağır metal iyonlarına maruz kalınması ölümcül seviyenin altında olsa bile süreklilik arzettiği zaman balıklarda büyüme bozukluklarına ve lipid metabolizmasının değişmesine sebep olduğu, ayrıca metal kontaminasyonuna maruz kalmış göllerde yaşayan balıklarda da gonad büyüklükleri ve hormon seviyelerinde değişimlerin olduğu bilindiğinden ağır metal kontaminasyonuna maruz kalmış akuasistemlerde, balık popülasyonunun bundan büyük ölçüde etkilenebileceği düşünülmektedir. Ayrıca balık ve kabuklu deniz mahsüllerinin insanlar tarafından kullanılan başlıca besin kaynaklarından biri olduğu ve insanoğlunun ağır metallere bu yollarla maruz kaldığı düşünüldüğünde, metallerin CPR enzimi üzerindeki inhibisyonunun insan sağlığını bu şekilde etkileyebileceği belirtilmelidir.

### **Sonuç olarak;**

1. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarından DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisinin iki basamakta uygulanması ile %54,4 verim ile 38 kat saflaştırıldı.

2. Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin monomer molekül kütlesi SDS-PAGE ile 70 kDa olarak tespit edildi.
3. Saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi için optimum pH değeri 8,0 olarak belirlenirken kuvvet içi optimum iyonik şiddet konsantrasyonu 1 M olarak tespit edildi.
4. Optimum sıcaklık çalışmaları sonucu enzim için optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak bulundu.
5. Enzimin en uzun süre stabil kaldığı pH değeri 7,6 olarak tespit edildi.
6. Enzim için  $E_a$  ve  $Q_{10}$  değerleri optimum sıcaklık çalışmasından elde edilen sonuçlar kullanılarak hesaplandı ve sırasıyla 3,5821 kal/mol ile 1,21 olarak bulundu.
7. Van Gölü balığı karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  ve  $V_0$  değerleri NADPH için sırasıyla 5,208 $\mu$ M, 17,76 $\times 10^{-3}$  EÜ/ml, 2 625,67 s<sup>-1</sup>, 504,16  $\mu$ M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> olarak, sitokrom c için ise sırasıyla 12,82  $\mu$ M, 42,9 $\times 10^{-3}$  EÜ/ml, 9000,62 s<sup>-1</sup> ve 702,076  $\mu$ M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> olarak belirlendi.
8. Enzim aktivitesi üzerine etkisi çalışılan kanamisin, oksitetrasiklin ve gentamisin ilaçlarının Van Gölü balığı karaciğer mikrozomlarında saflaştırılan CPR enzimini çalışılan konsantrasyon aralıklarında aktive ettiği, benzalkonium klorid ve akriflavin ilaçlarının ise enzim aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı belirlendi. Yapmış olduğumuz çalışma kapsamında Pb<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> ve Tl<sup>+</sup> metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde aktiviteye etkilerinin olmadığı, Co<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, As<sup>+5</sup>, Mn<sup>+2</sup> iyonlarının ise enzim aktivitesini artırdığı tespit edildi. Aktiviteye etkisi çalışılan diğer metal iyonlarından Al<sup>+3</sup> ün aktiviteyi zayıf olarak inhibe ettiği, Hg<sup>+2</sup> nin kuvvetli inhibisyon etkisi gösterdiği, inhibisyon mekanizmasının yarışmalı olduğu belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak Hg<sup>+2</sup> için IC<sub>50</sub> değeri 2,1935  $\mu$ M ve K<sub>i</sub> değeri de 1,36 $\pm$ 0,63  $\mu$ M olarak hesaplandı. Ag<sup>+</sup> ve Cu<sup>+2</sup> iyonlarının da enzimi kuvvetli inhibe ettiği, inhibisyon mekanizmalarının yarışmalı olduğu bulundu. Yine Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri Ag<sup>+</sup> ve Cu<sup>+2</sup> iyonları için sırasıyla 2,9877  $\mu$ M ve 1,60 $\pm$ 0,76  $\mu$ M ile 397,66  $\mu$ M ve 279,79 $\pm$ 176,9  $\mu$ M olarak bulundu.

**KAYNAKLAR**

- Abernathy, C. O., Liu, Y., Longfellow, D., Aposhian, H. V., Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzerl, R., Rossman, T., Thompson, C., and Waalkes, M., 1999. Arsenic: Health Effects, Mechanisms of Actions, and Research Issues. *Environmental Health Perspectives*, 107, (7), 593-597.
- Adams, S. E., 2010. Molecular Similarity and Xenobiotic Metabolism. Phd disseertation, Trinity College, San Francisco.
- Aigrain, L., Pompon, D., Moréra, S., Truan, G., 2009. Structure of the open conformation of a functional chimeric NADPH cytochrome P450 reductase. *EMBO reports*, 10(7), 742-747.
- Akkan, H. A., Karaca, M., 2003. Veteriner İç Hastalıklarında Antibiyotiklerin Kullanımı. *YYÜ Vet Fak Derg.*, 14(2), 72-77.
- Anonymous. [http://en.wikipedia.org/wiki/P450-containing\\_systems](http://en.wikipedia.org/wiki/P450-containing_systems) (10.09.2012)
- Aoi, K., Fujii-Kuriyama, Y. and Tashiro, Y., 1981. Intracellular Distribution of NADPH-Cytochrome c Reductase In Rat Hepatocytes Studied By Direct Ferritin-Immunoelectron Microscopy. *J. Cell Set.*, 50, 181-198.
- Ardies, C. M., Lasker, J. M., Bloswick, B. P., and Lieber, C. S., 1987, Purification of NADPH:Cytochrome c (Cytochrome P-450) Reductase from Hamster Liver Microsomes by Detergent Extraction and Affinity Chromatography. *Analytical Biochemistry*, 162, 39-46.
- Arınç, E., and Philpot, R. M., 1976, Preparation and Properties of Partially Purified Pulmonary Cytochrome P-450 from Rabbits. *The Journal of Biological Chemistry*, 251( 11), 3213-3220.
- Arinc, E. and Celik, H., 2002. Biochemical Characteristics of Purified Beef Liver NADPH-Cytochrome P450 Reductase. *J. Biochem Molecular Toxicology*, 16(6), 286-297.
- Arinc, E. Philpot, R. M., and Fouts, J. R., 1976. Partial purification of hepatic microsomal cytochrome P450 and NADPH-cytochrome c reductase from little skate, *Raja erinacea*, and reconstitution of mixed-function oxidase activity. *Fedn. Proc.*, 36, 666.
- Arınç, E., Çakir, D., 1999. Simultaneous purification and characterization of cytochrome b<sub>5</sub> reductase and cytochrome b<sub>5</sub> from sheep liver. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31, 345-362.
- Backes, W. L. and Kelley, R. W., 2003. Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes. *Pharmacology & Therapeutics*, 98, 221– 233.
- Bailey, S. M., Lewis, A. D., Patterson, L. H., Fisher, G. R., Knox, R. J., Workman, P., 2001. Involvement of NADPH: cytochrome P450 reductase in the activation of indoloquinone EO9 to free radical and DNA damaging species. *Biochemical Pharmacology*, 62, 461–468.
- Benzer, F., Ateşşahin, A., Karahan, İ., 2006. Yüksek Dozda Gentamisin Verilen Ratlarda Karaciğer ve Böbrek Arginazı Üzerine Manganez Klorürün Etkileri. *F. Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 20(3), 239-243.
- Bergh, A. F., Strobel, H. W., 1992. Reconstitution of the Brain Mixed Function Oxidase System: Purification of NADPH-Cytochrome P450 Reductase and Partial

- Purification of Cytochrome P450 from Whole Rat Brain. *Journal of Neurochemistry*, 59, 575-581.
- Bickers, D. R., and Athar, M., 2006. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 2565–2575.
- Black, S. D. and Coon, M. J., 1982. Structural Features of Liver Microsomal NADPH cytochrome P-450 Reductase Hydrophobic Domain, Hydrophilic Domain, and Connecting Region. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 25, 5929-5938.
- Black, S. D., French, J. S., Williams, C. H., and Coon, M. J., 1979. Role of A Hydrophobic Polypeptide in The N-Terminal Region of NADPH-cytochrome P-450 Reductase in Complex Formation With P-450<sub>LM</sub>. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 91(4), 1528-1535.
- Bozcaarmutlu, A., 2007. Mechanism of Inhibition of Purified Leaping Mullet (*Liza saliens*) NADPH-Cytochrome P450 Reductase by Toxic Metals: Aluminum and Thallium. *J Biochem Molecular Toxicology*, 21 (6), 340-347.
- Bozcaarmutlu, A., and Arinç, E., 2007. Effect of mercury, cadmium, nickel, chromium and zinc on kinetic properties of NADPH-cytochrome P450 reductase purified from leaping mullet (*Liza saliens*). *Toxicology in Vitro*, 21; 408–416.
- Bozcaarmutlu, A., Celik, H., Arinç, E., 2011. Inhibition mechanisms of lead, cadmium and nickel for the purified bovine liver NADPH-cytochrome P450 reductase. *Toxicology Letters* 205, 192.
- Brewer, G. J., 2010. Copper toxicity in the general population. *Clinical Neurophysiology*, 121(4), 459-460.
- Buege, A. J., and Aust, S. D., 1975. Comparative studies of rat liver and lung NADPH-cytochrome c Reductase. *Biochim. Biophys. Acta*, 385, 371-379.
- Büyükdoğan, M., 2007. Kolorektal Kanserli Hastalarda Sitokrom P450 (CYP2C9 ve CYP2C19) Enzim Genetik Polimorfizmi. Doktora tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Casalino, E., Calzaretti, G., Sblano, C., Landriscina, C., 2000. Cadmium-Dependent Enzyme Activity Alteration Is Not Imputable to Lipid Peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383(2), 288-295.
- Chen, C-H., 2012. Activation and Detoxification Enzymes, Functions and Implications. Springer, 191 p, New York.
- Cleland, W. W., 1977. Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalysed reactions by kinetic studies. *Advanced Enzymology*, 45, 273-387.
- Crankshaw, D. L., Hetnarski, K. and Wilkinson, C. F., 1979. Purification and Characterization of NADPH-Cytochrome c Reductase from the Midgut of the Southern Armyworm (*Spodoptera eridania*). *Biochem. J.*, 181, 593-605.
- Çelik, H., 2002. Biochemical and Immunological Characterization of Beef Liver NADPH-cytochrome P450 Reductase. MS Thesis, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Ankara.
- Çelik, H., 2008. Enzym-Catalyzed Reductive Activation of Anticancer Drugs Idarubicin and Mytomicin C. Phd dissertation, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Ankara.

- Çelik, H., and Arınç, E., 2008. Bioreduction of Idarubicin and Formation of ROS Responsible for DNA Cleavage by NADPH-Cytochrome P450 Reductase and its Potential Role in the Antitumor Effect. *J Pharm Pharmaceut*, 11(4) 68-82.
- Danişan, A., Ceyhan, D., Ögüs, I. H. and Özer, N., 2004. Purification and Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Rat Small Intestine. *Protein J*, 23, 317-324.
- Das, A., and Sligar, S. G., 2009. Modulation of the Cytochrome P450 Reductase Redox Potential by the Phospholipid Bilayer. *Biochemistry*, 48(51), 12104-12112.
- Dee, A., Carlson, G., Smith, C., Masters, B. S., Waterman, M. R., 1985. Regulation of synthesis and activity of bovine adrenocortical NADPH-cytochrome P-450 reductase by ACTH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 128(2), 650-656.
- Dodds, J. H., and Roberts, L. W., 1981. Some Inhibitory Effects of Gentamicin on Plant Tissue Cultures. *In Vitro*, 17(6), 467-470.
- Drake, P. L., and Hazelwood, K. J., 2005. Exposure-Related Health Effects of Silver and Silver Compounds: A Review. *Ann. occup. Hyg.*, 49(7), 575-585.
- Duda-Chodak, A., Blaszczyk, U., 2008. The Impact of Nickel On Human Health. *J. Elementol.*, 13(4), 685-696.
- Ellis, J., Gutierrez, A., Barsukov, I. L., Huang W.-C., Grossmann, J. G., and Roberts, G. C. K., 2009. Domain Motion in Cytochrome P450 Reductase. Conformational Equilibria Revealed By NMR and Small-Angle X-Ray Scattering. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(52), 36628-36637.
- Fazlara, A., and Ekhtelat, M., 2012. The Disinfectant Effects of Benzalkonium Chloride on Some Important Foodborne Pathogens, 2012. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 12(1), 23-29.
- Flück, C. E., Nicolo, C., Pandey, A. V., 2007. Clinical, structural and functional implications of mutations and polymorphisms in human NADPH P450 oxidoreductase. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 21, 399-410.
- Gherzi-Egea, J. F., Minn, A., Daval, J. L., Jayyosi, Z., Arnould, V., Souhaili-El Amri, H., and Siest, G., 1989. NADPH:cytochrome P-450(c) reductase: Biochemical characterization in rat brain and cultured neurons and evolution of activity during development. *Neurochemical Research*, 14(9), 883-888.
- Golf, S. W, Graef, V, Staudinger, H., 1974. Studies on the mechanism of the delta-4-3-oxosteroid-5alpha-reduction in rat liver microsomes. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 355, 1063-1069.
- Gonzalez F. J., and Yu, A-M., 2006. Cytochrome P450 and Xenobiotic Receptor Humanized Mice. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46, 41-64.
- Goyer, R. A., 1990. Lead Toxicity: From Overt to Subclinical to Subtle Health Effects. *Environmental Health Perspectives*, 86, 177-181.
- Guengerich, F. P. and Isin, E. M., 2008. Mechanisms of Cytochrome P450 Reactions. *Acta Chim. Slov.* 55, 7-19.
- Guengerich, F. P., 2003. Cytochromes P450, Drugs, and Diseases, *Molecular Interventions*, 3(4), 195-204.
- Guengerich, F. P., 2005. Reduction of cytochrome b<sub>5</sub> by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 440, 204-211.

- Guengerich, F. P., Wang P., and Mason P. S., 1981. Immunological Comparison of Rat, Rabbit, and Human Liver NADPH-Cytochrome P-450 Reductases. *Biochemistry*, 20, 2379-2385.
- Gürel, H., 2009. Sığırlarda solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler. *Vet Hekim Der Derg.*, 80(3), 29-33.
- Halliwell, B. and Auroma, O. I., 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.*, 281, 9-19.
- Hamdane, D., Xia, C., Im S.-C., Zhang, H., Kim, J.-J. P., and Waskell, L., 2009. Structure and Function of an NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase in an Open Conformation Capable of Reducing Cytochrome P450. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(17), 11374-11384.
- Haniu, M., Iyanagi, T., Miller, P., Lee, T. D., and Shively, J. E., 1986. Complete amino acid sequence of NADPH-cytochrome P450 reductase from porcine hepatic microsomes. *Biochemistry*, 25, 7906-7911.
- Haniu, M., McManus, M. E., Birkett, D. J., Lee, T. D., and Shively, J. E., 1989. Structural and Functional Analysis of NADPH-Cytochrome P-450 Reductase from Human Liver: Complete Sequence of Human Enzyme and NADPH-Binding Sites. *Biochemistry*, 28, 8639-8645.
- Hanukoglu, I., 1996. Electron transfer proteins of cytochrome P450 systems. *Adv. Mol. Cell. Biol.*, 14, 29-55.
- Hass, E., Horecker, B. L. and Hogness, T. T., 1940. The Enzymatic Reduction of Cytochrome c: Cytochrome c Reductase. *J. Biol. Chem.*, 136, 747-774.
- Hassan, S., Laryea, D., Mahteme, H., Felth, J., Fryknäs, M., Fayad, W., Linder, S., Rickardson, L., Gullbo, J., Graf, W., Pahlman, L., Glimelius, B., Larsson, R., and Nygren, P., 2011. Novel activity of acriflavine against colorectal cancer tumor cells. *Cancer Sci*, 102, 2206-2213.
- Hiroshi, I., and Bun-ichi T., 1986. Purification of NADPH-cytochrome P-450 reductase from microsomal fraction of rat testes, and its chemical modification by tetranitromethane. *Journal of Steroid Biochemistry*, 25, 21-28.
- Hodgson, E., 2010. *A Textbook of Modern Toxicology*. Wiley-Blackwell, 672 p, New Jersey.
- Horecker, B. L., 1950. Triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase in liver. *J Biol Chem*, 183, 593-605.
- Iannotti, L. L., Tielsch, J. M., Black, M. M., and Black, R. E., 2006. Iron supplementation in early childhood: health benefits and risks. *Am J Clin Nutr*, 84, 1261-76.
- Ilan, Z., Ilan, R., and Cinti, D. L., 1981. Evidence for a New Physiological Role of Hepatic NADPH:Ferricytochrome (P-450) Oxidoreductase: Direct Electron Input to The Microsomal Fatty Acid Chain Elongation System. *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 1066-1072.
- Inano, H., Kurihara, S. and Tamaoki, B., 1988. Inactivation of Rat Testicular NADPH-Cytochrome P-450 Reductase By 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonate. *J. steroid Biochem.*, 29(2), 227-232.
- Iscan, M. Y. and Arinç, E., 1986. Kinetic and structural properties of biocatalytically active sheep lung microsomal NADPH-cytochrome c reductase. *Int. J. Biochem.*, 18, 731-741.

- Isçan, M. Y. and Arınc, E., 1988. Comparison of highly purified sheep liver and lung NADPH-cytochrome P450 reductases by the analysis of kinetic and catalytic properties. *Int. J. Biochem.*, 20, 1189–1196.
- Iyanagi, T., 2005. Structure and function of NADPH-cytochrome P450 reductase and nitric oxide synthase reductase domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 520–528.
- Jakoby, W. B. and Ziegler, D. M., 1990. The Enzymes of Detoxication. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(34), 20715–20718.
- Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68, 167–182.
- Jensen, K., Møller, B.L., 2010. Plant NADPH–cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry*, 71, 132–141.
- Kappus, H., 1986. Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochem. Pharmacol.*, 35(1), 1–6.
- Katagiri, M., Murakami, H., Yabusaki, Y., Sugiyama, T., Okamoto, M., Yamano, T., and Ohkawa H., 1986. Molecular cloning and sequence analysis of full length cDNA for rabbit liver NADPH-cytochrome P450 reductase mRNA. *J. Biochem.*, 100, 945–954.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2004. *Biyokimya. Aktif yayınevi*, 647 s., Erzurum.
- Keyes, S. R., Fracasso, P. M., Heimbrook, D. C., 1984. Role of NADPH: Cytochrome c Reductase and DT-Diaphorase in the Biotransformation of Mitomycin C. *Cancer Res*, 44, 5638–5643.
- Kim, J.S., Ahn, T., Yim, S.K., Yun, C.H., 2002. Differential effect of copper (II) on the cytochrome P450 enzymes and NADPH-cytochrome P450 reductase: Inhibition of cytochrome P450 catalyzed reactions by copper (II) ions. *Biochemistry*, 41, 9438–9447.
- Klotz, A. V., Stegeman, J. J. and Walsh, C., 1983. An aryl hydrocarbon hydroxylating hepatic cytochrome P450 from the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 226, 578–592.
- Kobayashi, S. and Rikans, L. E., 1984. Kinetic Properties of guinea pig liver microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77, 313–318.
- Kostrzewa-Nowak, D., Paine, M. J. I., Korytowska, A., Serwatka, K., Piotrowska, S., Wolf, C. R., Tarasiuk, J., 2007. Bioreductive activation of mitoxantrone by NADPH cytochrome P450 reductase. Implications for increasing its ability to inhibit the growth of sensitive and multidrug resistant leukaemia HL60 cells. *Cancer Letters*, 245, 252–262.
- Kumagai, Y., Tsurutani, Y., Shinyashiki, M., Homma-Takeda, S., Nakai, Y., Yoshikawa, T., Shimojo, N., 1997. Bioactivation of lapachol responsible for DNA scission by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 3, 245–250.
- Kurzban, G. P., and Strobel, H. W., 1986. Preparation and characterization of FAD-dependent NADPH-cytochrome P450 reductase. *J. Biol. Chem.* 261,7824–7830.
- Kuwada, M., Ohsawa, Y. and Horie, S., 1985. Purification of NADPH-cytochrome c reductase from swine testis microsomes by chromatofocusing and

- characterization of the purified reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 830, 45-51.
- Laden, B. P., Tang, Y., and Porter, T. D., 2000. Cloning, Heterologous Expression, and Enzymological Characterization of Human Squalene Monooxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 374, 381-388.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 15;227(5259), 680-685.
- Laporte, F., Doussiere, J., Mechin, V. and Vignais, P. V., 1991. NADPH - cytochrome c reductase from rabbit peritoneal neutrophils: Purification, properties and function in the respiratory burst. *Eur. J. Biochem.*, 196, 59-66.
- Laursen, T., Jensen, K., Møller, B. L., 2010. Conformational changes of the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase in the course of electron transfer to cytochromes P450. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814(1), 132-138.
- Lauwerys, R., and Lison, D., 1994. Healthy risks associated with cobalt exposure-an overview. *Science of The Total Environment*, 150(1-3), 1-6.
- Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C., Song, D., Watkins, D., Heng, H. H. Q., Rommens, J. M., Scherer, S. W., Rosenblatt, D. S., and Gravel, R. A., 1998. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc. Natl. Acad.*, 95, 3059-3064.
- Levesque, H. M., Moon, T.W., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca Xavescens*) chronically exposed to metals in the Weld. *Aquatic Toxicology*, 60, 257-267.
- Levy, B. S., and Nassetta, W. J., 2003. Neurologic effects of manganese in humans: a review. *Int J Occup Environ Health*, 9(2), 153-63.
- Li, H.-C., Liu, D., and Waxman, D. J., 2001. Transcriptional Induction of Hepatic NADPH: Cytochrome P450 Oxidoreductase by Thyroid Hormone. *Molecular Pharmacology*, 59(5), 987-995.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 57, 685.
- Liu, D. and Waxman, D. J., 2002. Post-Transcriptional Regulation of Hepatic NADPH Cytochrome P450 Reductase by Thyroid Hormone: Independent Effects on Poly(A) Tail Length and mRNA Stability. *Molecular Pharmacology*, 61(5), 1089-1096.
- Loerwald, B., Clemens, S., and Barz, W., 1996. Purification and Characterization of the NADPH cytochrome P-450 (Cytochrome C) Reductase from Chickpea. *J. Plant Physiol.*, 149, 633-635.
- Lu, A. Y. H., Junk, K. W., and Coon, M. J., 1969. Resolution of the cytochrome P450 containing omega-hydroxylation system of liver microsomes into three components. *J. Biol. Chem.*, 244, 3714-3721.
- Lu, A. Y., 1991. NADPH-dependent cytochrome P450 reductase. In *Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds*, Eds., Arinç E., Schenkman, J. B., and Hodgson, E. Plenum Press, New York, 135-147.
- Lu, A.Y., Coon, M. J., 1968. Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 243(6), 1331-1332.

- Makovec, T., and Breskvar, K., 1998. Purification and Characterization of NADPH-Cytochrome P450 Reductase from Filamentous Fungus *Rhizopus nigricans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 357, 310-316.
- Manyanga, V., Dhulipalla, R. L., Hoogmartens, J., Adams, E., 2010. Improved liquid chromatographic method with pulsed electrochemical detection for the analysis of kanamycin. *Journal of Chromatography A*, 1217, 3748-3753.
- Maréchal, J-D., Kemp, C. A., Roberts, G. C. K., Pain M. J. I., Wolf, C. R. and Sutcliffe M. J., 2008. Insights into drug metabolism by cytochromes P450 from modelling studies of CYP2D6-drug interactions. *British Journal of Pharmacology*, 153, 82-89.
- Masters, B. S. S., Prough, R. A. and Kamin, H., 1975. Properties of Aerobic and Anaerobic Half-Reduced States of NADPH-Cytochrome c Reductase. *Biochemistry*, 14(3), 607-613.
- Masters, B. S. S., Williams, C. H., Kamin, H., 1967. The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver, *Methods in enzymology*, Colowick, S. P., Kaplan, N. O., Academic Press, New York, 10, 565-573.
- Mayer, R. T. and Prough, R. L., 1977. Purification and characterisation of NADPH-cytochrome c (P450) reductase from the house fly *Musca domestica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 57B, 81-87.
- Mcmillan, K., Bredt, D. S., Hirsch, D. J., Snyder, S. H., Clark, J. E. and Masters, B. S. S., 1992. Cloned, Expressed Rat Cerebellar Nitric Oxide Synthase Contains Stoichiometric Amounts of Heme, Which Binds Carbon Monoxide. *Proc. Natl. Acad.*, 89, 11141-11145.
- Meunier B., De Visser S. P., and Shaik S., 2004, Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.*, 104, 3947-3980.
- Miwa, G. T., West, S. B., Huang, M-T., Lu, A. Y. H., 1979. Studies on the Association and NADPH-Cytochrome c Reductase durin Catalysis in a Reconstituted Hydroxylating Systems. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(13), 5695-5700.
- Morant, M., Bak, S., Moller, B.L., Werck-Reichhart, D., 2003. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14(2), 151-162.
- Mori, T., Yamazaki, A., Kinoshita, T., Imaoka, S., 2006. Purification of NADPH-P450 reductase (NPR) from *Xenopus laevis* and the developmental change in NPR expression. *Life Sciences* 79, 247-251.
- Morimoto, T., Matura, S., Sasaki, S., Tashiro, Y. and Omura, T., 1976. Immunocemical and Immunoelectron Microscope Studies on Localization of NADPH-Cytochrome c Reductase on Rat Liver Microsomes. *The Journal of Cell Biology*, 68, 189-201.
- Mulkey, J. P., Oehme, F. W., 1993. A review of thallium toxicity. *Veterinary and Human Toxicology*, 35(5), 445-453.
- Murataliev, M. B., Ariño, A., Guзов, V. M. and Feyereisen, R., 1999. Kinetic mechanism of cytochrome P450 reductase from the house fly (*Musca domestica*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 233-242.
- Murataliev, M. B., Feyereisenb, R., Walker, F. A., 2004. Electron transfer by diflavin reductases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1698(1), 1-26.

- Muto, N., Tan, L., 1986. Purification and Properties of Human Placental NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biochem Cell Biol.*, 64, 184-193.
- Namazi, M. R., 2009. Cytochrome-P450 enzymes and autoimmunity: expansion of the relationship and introduction of free radicals as the link. *Journal of Autoimmune Diseases*, 6:4.
- Narhi, L.O., Fulco, A.J., 1986. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.*, 261, 7160–7169.
- Navas-Acien, A., Selvin, E., Sharrett, A. R., Calderon-Aranda, E., Silbergeld, E., Guallar, E., 2004. Lead, Cadmium, Smoking, and Increased Risk of Peripheral Arterial Disease. *Circulation*, 109(25), 3196-3201.
- Nebert, D. W., Russell, D. W., 2002. Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*, 360, 1155-1162.
- Nelson, D., 2009. Cytochrome P450 Homepage, <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450>
- Nelson, D. L., and Cox, M. M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, çeviri edt. Kılıç, N., Palme Yayıncılık, 1152 s., Ankara.
- Nisimoto, Y., Otsuka-Murakami, H. and Iwata, S., 1994. NADPH-cytochrome c reductase from human neutrophil membranes: purification, characterization and localization. *Biochem. J.* 297, 585-593.
- Voznesensky, A. I., and Schenkman, J. B., 1992. Inhibition of cytochrome-P450 reductase by polyols has an electrostatic nature. *Eur. J. Biochem.* 210, 741 - 746.
- Ohgiya, S., Goda, T., Ishizaki, K., Kamataki, T., Shinriki, N., 1992. Molecular cloning and sequence analysis at mouse NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1171(1), 103-105.
- Omura, T., and Sato, R., 1962. A New Cytochrome in Liver Microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 237(4), 1375-1376.
- Onganer, Y., Şakiroğlu, H. and Küfrevioğlu, O. I., 1998. Temperature effect on polyphenol oxidase and investigation of thermodynamic functions. *Chim. Acta Turcica*, 26, 41-46
- Ostrowski, J., Barber, M.J., Rueger, D.C., Miller, B.E., Siegel, L.M., Kredich, N.M., 1989. Characterization of the flavoprotein moieties of NADPH-sulfite reductase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Physicochemical and catalytic properties, amino acid sequence deduced from DNA sequence of *cysJ*, and comparison with NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* 264, 15796-15808.
- Özerol, E., 1999. Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri. *Journal of Turgut Özal Medical Center* 3(3), 257-275.
- Paine, M. J. I., Garner, A. P., Powell, D., Sibbald, J., Sales, M., Pratt, N., Smith, T., Tew, D. G. and Wolf, C. R., 2000. Cloning and Characterization of a Novel Human Dual Flavin Reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 1471–1478.
- Paine, M. J. I., Scrutton, N. S., Munro, A. W., Gutierrez, A., Roberts, G. C. K., Wolf, C. R., 2005. Electron Transfer Partners of Cytochrome P450. *Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry*, Paul R. Ortiz de Montello. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 115-148.

- Phillips, A. H. and Langdon, R. G., 1962. Hepatic Triphosphopyridine Nucleotide-Cytochrome c Reductase: Isolation, Characterization, and Kinetic Studies. *The Journal of Biological Chemistry*, 237(8), 2652-2660.
- Phillips, A. H., 1957. Doctoral Dissertation, The Johns Hopkins University, Baltimore.
- Philpot, R. M., Arinc, E., Fouts, J. R., 1975. Reconstitution of the rabbit pulmonary microsomal mixed-function oxidase system from solubilized components. *Drug Metab Dispos.*, 3(2), 118-26.
- Pillai, V. C., and Mehvar, R., 2011. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics And Drug Metabolism, Inhibition of NADPH–Cytochrome P450 Reductase by Tannic Acid in Rat Liver Microsomes and Primary Hepatocytes: Methodological Artifacts and Application to Ischemia–Reperfusion Injury. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(8), 3495-3505.
- Pillai, V. C., Yesudas, R., Shaik, I. H., Thekkumkara, T. J., Bickel U., Srivenugopal K. S., and Mehvar R., 2010. Delivery of NADPH-Cytochrome P450 Reductase Antisense Oligos Using Avidin-Biotin Approach. *Bioconjugate Chem.*, 21, 203–207.
- Ponnamperuma, K., Croteau, R., 1996. Purification and Characterization of an NADPH-Cytochrome P450 (Cytochrome c) Reductase from Spearmint (*Mentha spicata*) Glandular Trichomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 329, 9-19.
- Portal, P., Villamil, S. F., Alonso, G. D., De Vas, M. G., Flawia', M. M., Torres, H. N., Paveto, C., 2008. Multiple NADPH–cytochrome P450 reductases from *Trypanosoma cruzi* Suggested role on drug resistance. *Molecular & Biochemical Parasitology* 160, 42–51.
- Porter, T. D. and Kasper, C. B., 1985. Coding nucleotide sequence of rat NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase cDNA and identification of flavin-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 973–977.
- Porter, T. D. and Kasper, C. B., 1986, NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry*, 25 (7), 1682–1687.
- Porter, T. D., 1991. An unusual yet strongly conserved flavoprotein reductase in bacteria and mammals. Elsevier Science Publishers Ltd, UK, 0376-5067/91/\$02.00.
- Porter, T. D., 2001. University of Kentucky College of Pharmacy, <http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR.htm>
- Porter, T. D., Beck, T. V., and Kasper, C. B., 1990. NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase gene organization correlates with structurel domains of protein. *Biochemistry*, 29, 1682-1687.
- Ram, A. and Waxman, D., J., 1992. Thyroid Hormone Stimulation of NADPH P450 Reductase Expression in Liver and Extrahepatic Tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(5), 3294-3301.
- Ravindranath, V., Anandatheerthavarada, H. K., Shankar, S. K., 1990. NADPH cytochrome P-450 reductase in rat, mouse and human brain. *Biochemical Pharmacology*, 39, 1013-1018.
- Reed, C. J., Lock, E. A., De Matteis, F., 1986. NADPH:cytochrome P-450 reductase in olfactory epithelium. Relevance to cytochrome P450-dependent reactions. *Biochem. J.*, 240, 585-592.

- Risher, J. F., Murray, H. E., and Prince, G. R., 2002. Organic mercury compounds: human exposure and its relevance to public health. *Toxicology and Industrial Health*, 18, 109-160.
- Robyt, J. F., and White, B. J., 1987. *Biochemical techniques: Theory and Practice*. Brooks/Cole Pub. Co., 407 p., Monterey, California.
- Sakane, F., Takahashi, K., and Koyama, J., 1984. Purification and Characterization of a Membrane-Bound NADPH-Cytochrome c Reductase Capable of Catalyzing Menadione-Dependent  $O_2^-$  Formation in Guinea Pig Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Biochem.*, 96, 671-678.
- Sari, M., 2008. Threatened fishes of the world: Chalcalburnus Tarichi (Pallas 1811) (*Cyprinidae*) living in the highly alkaline Lake Van, Turkey. *Environ Biol. Fish*, 81, 21-23.
- Schacter, B. A., Nelson, E. B., Marver, H. S., and Masters, B. S. S., 1972. Immunochemical Evidence for an Association of Heme Oxygenase with the Microsomal Electron Transport System. *The Journal of Biological Chemistry*, 247, 3601-3607.
- Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A. M., Maves, S. A., Benson, D. E., Sweet, R. M., Ringe, D., Petsko, G. A., Sligar, S. G., 2000. The Catalytic Pathway of Cytochrome P450cam at Atomic Resolution. *Science*, 287, 1615-1622.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*, John Wiley & Sons Inc, New York, p: 403.
- Segel, I.H., 1975. *Enzyme Kinetics*. C. John Wiley and Sons, New York.
- Sen, A. and Arinc, E., 1997. Purification and Characterization of Cytochrome P450 Reductase from Liver Microsomes of Feral Leaping Mullet (*Liza saliens*). *J. Biochem Molecular Toxicology*, 12, 103-113.
- Serabjit-Singh, C. J., Wolf, C. R., and Philpot, R. M., 1979. The Rabbit Pulmonary Monooxygenase System Immunochemical and Biochemical Characterization of Enzyme Components. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(19), 9901-9907.
- Serezli, R., Çağırğan, H., Okumuş, İ., Akhan, S., Balta, F., 2005. The Effect of Oxytetracycline on Non-Specific Immune Response in Sea Bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 31-35.
- Sevanian, A., Nordenbrand, K., Kim, E., Ernster, L., and Hochstein, P., 1990. Microsomal Lipid Peroxidation: The Role of NADPH-Cytochrome P450 Reductase and Cytochrome P450. *Free Radical Biology & Medicine*, 8, 145-152.
- Shen, A., and Kasper, C. B., 1993. Protein and gene structure and regulation of NADPH-cytochrome P450 reductase. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, Ed: J. B. Schenkman, and H. Greim. Springer-Verlag Press, New York, USA, 35-39.
- Shephard, E. A., Pike, S. F., Rabin, B. R., and Phillips, I. R., 1983. A Rapid One-Step Purification of NADPH-Cytochrome c (P-450) Reductase from Rat Liver Microsomes. *Analytical Biochemistry*, 129, 430-433.
- Sinha, B. K., 1989. Free radicals in anticancer drug pharmacology. *Chem.-Biol. Interactions*, 69, 293.

- Smith, G. C. M., Tew, D. G., and Wolf, C. R., 1994. Dissection of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase into distinct functional domains. *Biochemistry*, 91, 8710-8714.
- Stiborová, M., Arlt, V. M., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Kotrbová, V., Moserová, M., Hudeček, J., Phillips, D. H., Frei, E., 2008. Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: Studies with the hepatic NADPH:Cytochrome P450 reductase null mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 226, 318-327.
- Strittmatter, P., and Velick, S. F., 1956. The isolation and properties of microsomal cytochrome. *J. Biol. Chem.* 221, 253-264.
- Strobel, H. W., Lu, A. Y. H., Heidema, J. and Coon, M. J., 1970. Phosphatidylcholine Requirement in the Enzymatic Reduction of Hemoprotein P-450 and in Fatty Acid, Hydrocarbon and Drug Hydroxylation. *J. Biol. Chem.*, 245, 4851-4853.
- Şen, A., 1997. Purification and Characterization of Cytochrome P4501A1 And Cytochrome P450 Reductase From Ferak Leaping Mullet (*Liza Saliens*) Liver Microsomes. Phd dissertation, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Ankara.
- Vermilion, J. L., Ballou, D. P., Massey, V., and Coon, M. J., 1981. Separate Roles for FMN and FAD in Catalysis by Liver Microsomal NADPH-cytochrome P-450 Reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 266-277.
- Vincent, D.R., Moldenke, A. F., Terriere, L.C., 1983. NADPH-cytochrome P-450 reductase from the house fly, *Musca domestica*: Improved methods for purification, and reconstitution of aldrin epoxidase activity, *Insect Biochemistry*. 13, 559-566.
- Vogel, F. and Lumper, L., 1986. Complete structure of the hydrophilic domain in the porcine NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biochem. J.*, 236, 871-878.
- Vural, N., 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, 659 s., Ankara.
- Walsh, C. T., Sandstead, H. H., Prasad, A. S., Newberne, P. M., and Fraker, P. J., 1994. Zinc: Health Effects and Research Priorities for the 1990s. *Environ Health Perspect*, 102( 2), 5-46.
- Walton, M.I., Wolf, C.R., Workman, P., 1992. The role of cytochrome P450 and cytochrome P450 reductase in the reductive bioactivation of the novel benzotriazine di-N-oxide hypoxic cytotoxin 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1 ,4-dioxide (SR 4233, WIN 59075) by mouse liver. *Biochemical Pharmacology*, 44, 251-259.
- Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S. S., and Kim J-J. P., 1997. Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Biochemistry*. 94, 8411-8416.
- Wang, P., Mason, P. S., and Guengerich, F. P., 1980. Purification of Human Liver Cytochrome P-450 and Comparison to the Enzyme Isolated from Rat Liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 199(1), 206-219.
- Widdowson, P., 2010. Biochemical and Biophysical Characterisation of *Anopheles Gambiae* NADPH-Cytochrome P450 Reductase. Doctor in Philosophy, University of Liverpool, Liverpool.

- Williams, C. H. and Kamin, H., 1962. Microsomal Triphosphopyridine Nucleotide-Cytochrome c Reductase of Liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 237, 587-595.
- Williams, D. E., Becker, R. R., Potter, D. W., Guengerich, F. P., and Buhler, D. R. 1983. Purification and comparative properties of NADPH-cytochrome P450 reductase from rat and rainbow trout: differences in temperature optima between reconstituted and microsomal trout enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 225, 55-66.
- Wilson, J. E., 1971. An expeditious method for determining the activation energies of enzymatic reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 147(2), 471-474.
- Wilson, T. G., and Hodgson, E., 1971. Microsomal NADPH-cytochrome c reductase from the house fly, *Musca domestica*: properties of the purified enzyme. *Insect Biochemistry*, 1, 171-180.
- Wohlever, M. L., 2008. Altering the Electron Transfer Mechanism of Cytochrome P450 Reductase Through a Single Point Mutation. A Senior Honors Thesis, The Ohio State University, Ohio.
- Yamashita, Y., Ogawa, H., and Taniguchi, K., 1986. Differential effects of manganese and magnesium on two types of slowly adapting cutaneous mechanoreceptor afferent units in frogs. *European Journal of Physiology*, 406, 218-224.
- Yasukochi, Y., and Masters, B. S. S., 1976. Some Properties of a Detergent-solubilized NADPH-Cytochrome c (Cytochrome P-450) Reductase Purified by Biospecific Affinity Chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, 251, 5337-5344.
- Yasukochi, Y., Okita, R. T., and Masters, B. S. S., 1980. Comparison of properties of detergent-solubilized NADPH-cytochrome P450 reductases from pig liver and kidney: immunological, kinetic and reconstitutive properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 202, 491-498.
- Zhang, H., Gruenke, L., Saribas, A. S., Im, S., Shen, A. L., Kasper, C. B., and Waskell, L., 2003. Preparation and Characterization of a 5'-DeazaFAD T491V NADPH-Cytochrome P450 Reductase. *Biochemistry*, 42, 6804-6813.
- Zuber, R., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P., 2002. Cytochrome P450 and experimental models of drug metabolism. *J. Cell. Mol. Med.*, 6(2), 189-198.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1983 yılında Çorum ili Kargı ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kargı ilçesinde tamamladıktan sonra 1999 yılında Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2003 yılında buradan mezun olduktan sonra aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. 2006 yılında yüksek lisans eğitimini bitirdikten sonra aynı enstitüde doktora eğitimine başladı. 2009 yılında Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi'ne araştırma görevlisi olarak atandı. 2012 yılında doktora eğitimini bitiren araştırmacı evlidir.