

**NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enziminin Sığır Karaciğer  
Mikrozomlarından Preparatif Ölçekte Saflaştırılması,  
Antikor Elde Edilmesi ve Enzimin İmmünolojik, Kinetik,  
Biyokatalitik ve Diğer Fonksiyonel Özelliklerinin  
Karakterizasyonu**

**Proje No: 106T139**

Prof.Dr. Emel ARINÇ  
Dr. Haydar ÇELİK

Temmuz 2009  
Ankara

## ÖNSÖZ

NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi değişik dokuların endoplazmik retikulumunda bulunan integral bir membran enzimidir ve sitokrom P450 monooksijenaz sisteminin gerekli bir bileşenidir. Bu enzim, aerobik ortamda, NADPH'den gelen indirgeyici eşdeğerlikleri sitokrom P450'ye transfer ederek gerek ilaç ve ksenobiyotiklerin oksidatif metabolizmasında gerekse, steroidler, yağ asitleri, prostaglandinler, safra asitleri gibi endojen maddelerin biyosentezinde veya biyodegradasyonundaki monooksijenaz reaksiyonlarında önemli bir rol oynar. Bu enzim aynı zamanda, tek başına, bazı anti-kanser ilaçların ve antibiyotiklerin redükleyici metabolizmasında, lipit peroksidasyonunda ve genotoksisite ve sitotoksisite ile sonuçlanan reaktif oksijen türlerinin oluşumunda da katalizör olarak işlev görür.

NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi sıçan, tavşan, fare, kobay gibi birçok küçük laboratuvar hayvanlardan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Ancak bu enzimin sığır ve diğer besin üreten çiftlik hayvanlarındaki karakterizasyonu ve ilaç ve ksenobiyotik metabolizmasındaki rolü ile ilgili çalışmalar ise hemen hemen hiç yoktur. Bu hayvanlar, şehirleşme ve sanayileşmedeki hızlı gelişmeye ve fabrikaların ve yerleşim alanlarının otlak alan ve mera yakınlarına kadar ilerlemesine de paralel olarak, herbisitler, pestisitler, kanserojen maddeler, ağır metaller, veteriner ilaçlar ve diğer pek çok kimyasallara yoğun olarak maruz kalmaktadır. Hayvan vücuduna değişik yollarla giren bu kimyasalların büyük bir kısmı sitokrom P450 redüktaz ve sitokrom P450 redüktaz-sitokrom P450 monooksijenaz sistemi tarafından metabolize edilmektedir. Bazı durumlarda metabolizma sonucu oluşan ve vücuttan atılamayan reaktif ve toksik metabolitler hayvanın et, süt ve yumurta gibi insanlar tarafından tüketilen ürünlerinde birikebilmektedir. Bu da insan sağlığı için risk teşkil etmektedir.

Laboratuvarımızda uzun yıllardan beri koyun karaciğer ve akciğer mikrozomal sitokrom P450-P450 redüktaz monooksijenaz sistemi ile çalışılmaktadır. Sitokrom P450 redüktaz koyun karaciğer ve akciğer dokularından saflaştırılmış ve birçok özellikleri karakterize edilmiştir (İşcan ve Arınç, 1986 ve 1988; Arınç ve Aydoğmuş, 1990; Adalı ve ark.'ları, 1996). Ayrıca, laboratuvarımızda, dünyada ilk kez, biyokatalitik olarak aktif, amfipatik yapıdaki NADPH-sitokrom P450 redüktaz sığır karaciğerinden saflaştırılmış ve bazı biyokatalitik ve spektral özellikleri aydınlatılarak ortaya çıkan bulgular rapor edilmiştir (Arınç ve Çelik, 2002). Ancak, yapılan bu çalışmalar ön bir çalışma niteliğinde olup, sığır karaciğer P450 redüktaz enziminin biyokatalitik ve diğer özelliklerinin detaylı olarak karakterize edilmesi gerekmekte idi. Ayrıca, sığır sitokrom P450 redüktaz enzimine karşı antikor üretilmemiş ve

sığır P450 redüktaz enzimi immünolojik olarak karakterize edilmemişti. Dolayısıyla, NADPH-sitokrom P450 redüktazın sığır karaciğer dokusundan preparatif düzeyde ve yüksek bir özgül aktivite ile saflaştırılması, saflaştırılan enzimin birtakım fonksiyonel ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ile daha ileri seviyede karakterize edilmesi ve saflaştırılan enzime karşı biyoteknolojik ve farmasötik uygulamaları olan poliklonal antikorlar üretilerek enzimin immünolojik karakterizasyonunun yapılması amacı ile TÜBİTAK'a bu konuda bir proje önerisi ile müracaat ettik. Proje önerimizin TÜBİTAK tarafından desteklenmesi uygun görüldü ve böylece 106T139 no'lu proje ortaya çıktı.

Sitokrom P450 redüktaz enzimi sığır karaciğer dokusundan daha önce uygulanan metot üzerinde (Arınç ve Çelik, 2002) çalışılarak saflaştırma esnasında kullanılan deterjan ve proteolitik enzim inhibitör konsantrasyonlarının ve DEAE-selüloz ve afinite kolon kromatografi prosedürlerinin optimize edilmesi ile çok daha fazla miktarda ve daha yüksek bir özgül aktivite ile preparatif ölçekte ve biyokatalitik olarak aktif formda elde edildi. Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı daha önce elde edilenle benzer olarak 76.000-78.000 dalton arasında bulunurken, absorpsiyon spektrumu flavoproteinlerin karakteristik özelliklerini gösterdi. Saflaştırılmış enzimin, sentetik lipid fosfatidilkolin dilauril ve saflaştırılmış fenobarbital muamele edilmiş tavşan karaciğer sitokrom P450B4'ü içeren yeniden oluşturulmuş sistemlerde ki benzfetamin N-demetilasyon reaksiyonunu katalizleyebildiği gösterilerek biyokatalitik olarak aktif formda olduğu bulundu. Tavşan karaciğer P450B4 enziminin amino asit sırası bilindiği ve P450B4 olarak sınıflandırıldığı için (Arınç, 1993), benzfetamin N-demetilasyon enzim aktivitesini yeniden oluşturma ("reconstitution") çalışmaları esnasında bu P450 kullanıldı. Saflaştırılmış enzimin sitokrom c redüktaz aktivitesinin stabilitesi 37°C'de %20 gliserol varlığında ve yokluğunda belirlendi ve elde edilen sonuçlar koyun akciğer P450 redüktazı ile mukayese edildi. Gliserolün her iki enzimin de stabilitesini arttırdığı ve sığır karaciğer P450 redüktazın koyun akciğer P450 redüktazına göre çok daha dayanıklı bir enzim olduğu gösterildi. Saflaştırılmış enzimin nikel, kadmiyum ve kurşun gibi bazı ağır metal tuzları ile etkileşmesi, hem mekanizma hem de inhibisyon neticesinde meydana gelebilecek toksik etkinin kaynağına ışık tutacağı düşünülerek incelendi. Test edilen metaller içerisinde en yüksek inhibisyona kurşun ( $K_i$  değeri 0.03 mM) sebep olurken, bunu kadmiyum ( $K_i$  değeri 0.04 mM) takip etti. Bu netice de, Pb ve Cd gibi ağır metallerin redüktaz enzimini inhibe ederek monooksijenazların detoksifikasyon işlevini engellediğini ve sonucu kimyasal karsinogenesis kadar giden toksik etkide önemli bir rol oynadığını işaret etmektedir.

Proje kapsamında, saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazına karşı daha önce hiç üretilmemiş olan poliklonal antikolar üretilerek biyokimya, farmakoloji, toksikoloji ve onkoloji alanlarında ve ilaç sanayiinde ve bir takım biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanı mevcut olan endüstriyel bir ürün elde edilmiş oldu. Anti-sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz antikoları ve saflaştırılmış koyun akciğer P450 redüktazına karşı üretilen antikolar kullanılarak, sığır ve koyun P450 redüktazlarının immünolojik benzerlikleri ortaya kondu. Mikrozomlar ve saf enzimler kullanılarak yürütülen Western-blot deneyleri her iki redüktazın immünolojik olarak benzer olduğunu ve ortak epitoplara veya antijenik belirleyiciler içerdiğini gösterdi.

Proje kapsamında yürütülen başka bir çalışma da, antikanser tedavisinde kullanılan sentetik bir antrasiklin türevi olan idarubisin ilacının moleküler düzeydeki etki mekanizmasının, sitokrom P450 redüktaz enzimi ve spektrofotometrik enzim ölçüm metotları ve DNA kırılım deneyleri kullanılarak aydınlatılması ile ilgilidir. Bu mekanizma, bu çalışma kapsamında ilk kez aydınlatılmış ve 2008 yılında basılmıştır (Çelik and Arınç, 2008). Böylece, bu çalışmada, ilk defa olarak, saflaştırılmış sitokrom P450 redüktazın, idarubisinin, biyoindirgenmesini katalizleyerek DNA'ya hasar veren ürünlerin oluşumuna neden olduğu gösterildi. Elde edilen sonuçlar bu çalışmada model bir bileşik olarak kullanılan mitomisin C ile mukayese edildi. Sığır karaciğer, koyun akciğer ve fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan P450 redüktazlar ile yürütülen enzim assayleri, idarubisinin, saflaştırılan tüm P450 redüktazlar tarafından, 340 nm'de NADPH oksidasyonunun ölçülmesiyle gösterildiği üzere, mitomisin C'den yaklaşık iki-kat daha fazla hızda indirgendiğini gösterdi. İdarubisin ve mitomisin C'nin süperoksit radikal oluşturma hızının, bu ilaçların sitokrom P450 redüktaz tarafından bir-elektron indirgenmesiyle orantılı olması gözönüne alınarak, idarubisinin, sitokrom P450 redüktaz tarafından biyoaktivasyona uğrayarak reaktif ve/veya redoks aktif metabolit oluşturma potansiyeli bakımından mitomisin C'ye göre daha etkili bir sitotoksik ilaç olduğu gösterildi. Diğer bir nokta da, saflaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktazın, sığır karaciğer ve fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer sitokrom P450 redüktazları ile kıyaslandığında, hem idarubisinin hem de mitomisin C'nin indirgenmesini katalizlemede daha az etkili olduğu idi. Bu fonksiyonel farklılığın, değişik türlerden saflaştırılan sitokrom P450 redüktazların, amino asit dizilimlerindeki farklılıklar sonucu ortaya çıkan üç-boyutlu yapılarındaki farklılıktan kaynaklanabileceği düşünüldü. İdarubisinin neden olduğu DNA hasarının mekanizmasında hangi ürünlerin rol aldığının belirlenebilmesi için, öncelikli olarak plazmit DNA deneylerinin optimize edilmesi gerekiyordu. Bu nedenle, idarubisinle indüklenen DNA hasarının artan redüktaz enzimi ve antikanser ilaç miktarına ve artan inkübasyon zamanına göre nasıl

değiştiği saptandı. Bir ön deneme kapsamında yapılan bu çalışmalarda koyun akciğer redüktaz enzimi kullanıldı. Ayrıca, idarubisin kullanılarak yürütölen plazmid DNA deneyleri aynı reaksiyon şartları altında mitomisin C ile tekrar edildi ve elde edilen sonuçlar mukayese edildi.

Sonuçta, idarubisinin etki mekanizması aydınlatılarak, NADPH-sitokrom P450 redüktazın idarubisin varlığında aerobik şartlar altında DNA zincir kırıklarına neden olan reaktif oksijen türleri “ROS” oluşturduğu tespit edildi. Böylece, sitokrom P450 redüktaz biyoindirgenmesiyle ortaya çıkan bu yolun, idarubisinin antitümör etkisine potansiyel olarak katkıda bulunan bir mekanizma olabileceği hususu öngöröldü (elik ve Arınç, 2008). Bu çalışmanın sonuçları, sitokrom P450 redüktazın, kanser tedavi stratejilerinde terapatik ajan olarak, mitomisin C veya idarubisin gibi biyoredüktif ilaçlarla birlikte gen-güdümlü enzim önilaç terapi (“gene-directed enzyme prodrug therapy”) stratejilerinde kullanılabileceğini desteklemektedir

Son olarak da, bu araştırmada redüktaz enziminin ağır metallere etkileşimini inceleyen Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Kimya Bölümü’nden Doç. Dr. Azra Bozcaarmutlu, ve bazı Western-blot analizleri esnasında bizlere yardımcı olan Dr. şevki Arslan ve Cihan Tanrıkut’a teşekkür ederiz.

Ayrıca, araştırmayı 106T139 no’lu proje ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Temel Bilimler Araştırma Grubu’na teşekkür ederiz.

Prof. Dr. Emel ARINÇ

## İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ .....	9
ŞEKİL LİSTESİ.....	11
ÖZET .....	14
ABSTRACT .....	16
1. GİRİŞ.....	18
1.1 GENEL BİLGİLER .....	18
1.1.1 Mikrozomal Sitokrom P450 Redüktaz ve Sitokrom P450 Monoksijenaz Sisteminin Fizyolojik Fonksiyonları .....	18
1.1.2 Mikrozomal Sitokrom P450 Redüktaz ve Sitokrom P450 Monoksijenaz Reaksiyonlarının Mekanizması .....	19
1.1.3 NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Sitokrom b5 ve Sitokrom b5 Redüktaz İle Katalize Edilen Reaksiyonlardaki Rolü:.....	21
1.1.4 NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enziminin İndirgeyici Aktivitesine Dayanan Biyoredüktif Antikanser İlaçlar.....	24
1.1.5 Mikrozomal Sitokrom P450 Redüktaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Özellikleri.....	24
2. YÖNTEMLER.....	31
2.1 Sığır Karaciğer Mikrozomlarının Hazırlanması .....	31
2.2 Sığır Karaciğer Mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Saflaştırılması .....	32
2.2.1 Sığır Karaciğer Mikrozomlarının Çözünürleştirilmesi .....	32
2.2.2 İlk DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi .....	33
2.2.3 İkinci DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi.....	35
2.2.4 Adenozin 2', 5'-Difosfat-Sefaroz 4B (Afinite) Kolon Kromatografisi.....	35
2.2.5 Hidroksiapatit Kolon Kromatografisi .....	35
2.3 Fenobarbital Muamele Edilmiş Tavşan Karaciğer Mikrozomlarından NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Saflaştırılması .....	36
2.4 Fenobarbital Muamele Edilmiş Tavşan Karaciğer Mikrozomlarından Sitokrom P4502B4 Saflaştırılması .....	36
2.5 Koyun Akciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Saflaştırılması .....	38
2.6 SDS-PAGE Elektrofrezisi .....	38
2.7 Analitik Yöntemler.....	40
2.7.1 Protein Tayini .....	40
2.7.2 Sitokrom P450 Konsantrasyonu Tayini.....	40
2.7.3 NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesi Tayini.....	41

2.7.4 Sitokrom b5 Konsantrasyonu Tayini .....	41
2.7.5 NADH-Sitokrom b5 Redüktaz Aktivitesi Tayini.....	42
2.7.6 Saflaştırılmış NADPH-Sitokrom P450 Redüktazların Toplam Flavin İçeriğinin Tayini.....	42
2.7.7 Emulgen 913 ve Kolat Deterjanlarının Birlikte Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesine Olan Aktivatör Etkisinin Tayini.....	42
2.7.8 Çeşitli Konsantrasyonlarda ki Triton X-100 Deterjanının Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesine Olan Aktivatör Etkisinin Tayini.....	43
2.7.9 Rekonstitüsyon Çalışmaları İçin Fosfatidilkolin Dilauroil Vesiküllerinin Hazırlanması .....	43
2.7.10 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazı ve Tavşan Karaciğer CYP2B4'ü İçeren Yeniden Oluşturulmuş ("Reconstituted") Sistemlerde ki Benzfetamin N-Demetilasyon Aktivitesinin Tayini .....	44
2.7.11 Ağır Metallerin Saf Sığır Karaciğer Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesine Etkisi .	44
2.7.12 Saflaştırılmış NADPH-Sitokrom P450 Redüktazlar Tarafından Mitomisin C ve İdarubisin İndirgenmesinin NADPH Oksidasyonu İle Ölçülmesi .....	45
2.8 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazına Karşı Poliklonal Antikorlar Üretilmesi.....	46
2.9 Saflaştırılmış Koyun Akciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazına Karşı Poliklonal Antikorlar Üretilmesi.....	47
2.10 Western-Blot Analizi .....	48
2.11 Plazmid DNA Zincir Kırılım Deneyleri .....	48
3. BULGULAR .....	50
3.1 Sığır Karaciğer Mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Saflaştırılması .....	50
3.2 Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Saflığının SDS-PAGE ile Analizi.....	55
3.3 Fenobarbital Muamele Edilmiş Tavşan Karaciğer Mikrozomlarından NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Saflaştırılması .....	58
3.4 Fenobarbital Muamele Edilmiş Tavşan Karaciğer Mikrozomlarından Sitokrom P450B4 Saflaştırılması .....	60
3.5 Koyun Akciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Saflaştırılması .....	63
3.6 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Kinetik, Katalitik ve Yapısal Özelliklerinin Karakterizasyonu .....	67
3.6.1 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi .....	67

3.6.2 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Spektral Özellikleri.....	67
3.6.3 Emulgen 913 ve Kolat Deterjanlarının Birlikte Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesine Olan Aktivatör Etkisi .....	68
3.6.4 Çeşitli Konsantrasyonlarda ki Triton X-100 Deterjanının Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesine Olan Aktivatör Etkisi .....	69
3.6.5 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Biyokatalitik Aktivitesi; Yeniden Oluşturulmuş Sistemlerdeki Benzfetamin N-Demetilasyon Aktiviteleri .....	70
3.6.6 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer P450 Redüktaz ve Koyun Akciğer P450 Redüktaz Enzimlerinin Stabilitelerinin Karşılaştırılması .....	71
3.7 Metal İyonlarının Saf Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	73
3.8 Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın İmmünolojik Karakterizasyonu ...	80
3.8.1 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazına Karşı Poliklonal Antikor Üretilmesi ve Western-Blot Analizleri .....	80
3.8.2 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer ve Koyun Akciğer P450 Redüktazlarına Karşı Üretilen Poliklonal Antikorların Mukayesi .....	81
3.9 Antikanser İlaç İdarubisin'in Etki Mekanizmasının Saflaştırılmış NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enzimleri Kullanılarak Araştırılması .....	85
3.9.1 NADPH Oksidasyonu Ölçülerek İdarubisin İndirgenme Hızlarının Tayini .....	85
3.9.2 Plazmid DNA Zincir Kırılım Deneyi Sonuçlarının Analizi.....	87
3.9.3 İdarubisinin NADPH-Sitokrom P450 Redüktazı Tarafından Biyoredüktif Aktivasyonu Esnasında Reaktif Oksijen Türleri ("ROS") Oluşumunun Gösterilmesi.....	90
3.9.4 İdarubisinin Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazı Tarafından Biyoredüktif Aktivasyonunun Plazmit DNA Deneyleri ile Gösterilmesi .....	94
4. TARTIŞMA .....	96
5. SONUÇ .....	105
Referanslar.....	108



## TABLO LİSTESİ

### TABLO

2.1	Sığır karaciğer mikrozoamlarından NADPH-sitokrom P450 redüktazın çözünürleştirilmesi için tipik bir preparasyon .....	34
3.1	NADPH-sitokrom P450 redüktazın sığır karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılması .....	51
3.2	NADPH-sitokrom P450 redüktazın fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılması .....	60
3.3	Sitokrom P450B4'ün fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılması .....	63
3.4	NADPH-sitokrom P450 redüktazın koyun akciğer mikrozoamlarından saflaştırılması .....	65
3.5	Emulgen 913 ve kolat deterjanlarının birlikte sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesine olan aktivatör etkisi .....	69
3.6	Saf sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine metallerin etkisi .....	76
3.7	Saf sığır karaciğer NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine metallerin etki mekanizması ve Ki değerleri .....	78
3.8	Saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikoların değişik mikrozoamlarla ve saf sitokrom P450 redüktazlarla oluşturduğu bandların densitometrik analiz sonuçları .....	83
3.9	Saflaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikoların değişik mikrozoamlarla ve saf sitokrom P450 redüktazlarla oluşturduğu bandların densitometrik analiz sonuçları .....	85
3.10	Sığır karaciğerinden, fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğerinden ve koyun akciğerinden saflaştırılan sitokrom P450 redüktazların katalizlediği NADPH oksidasyonu ile belirlenen idarubisin ve mitomisin C indirgenmeleri.....	87
3.11	Artan inkübasyon zamanının, kofaktör NADPH ve saflaştırılmış koyun akciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz varlığında, idarubisinle ve mitomisin C ile indüklenen plazmid DNA zincir kırıklarının oluşumuna olan etkisi .....	89
3.12	Artan ilaç konsantrasyonunun, kofaktör NADPH ve saflaştırılmış koyun akciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz varlığında, idarubisinle ve mitomisin C ile indüklenen plazmid DNA zincir kırıklarının oluşumuna olan etkisi .....	89

3.13 Artan enzim miktarının, kofaktör NADPH ve saflaştırılmış koyun akciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz varlığında, idarubisinle ve mitomisin C ile indüklenen plazmid DNA zincir kırıklarının oluşumuna olan etkisi .....	90
3.14 Radikal süpürücülerinin hidroksil radikalle, idarubisinle ve mitomisin C ile indüklenen DNA zincir kırıklarına karşı koruyucu etkileri .....	92

## ŞEKİL LİSTESİ

### ŞEKİL

- 1.1 NADPH-sitokrom P450 redüktazın, NH<sub>2</sub> – and COOH- terminal bölgelerinin mikrozomal membranın karşı taraflarında (A) ya da aynı tarafında (B) olduğu olası oryantasyonları .....20
- 1.2 (A) Mikrozomal sitokrom P450'ye bağlı monoksijenaz sisteminin reaksiyon mekanizması (Lehninger, 1975'den alınmıştır) (B) Sitokrom P450'ye bağlı monoksijenaz sisteminin endoplazmik retikulum membranındaki üç boyutlu yapısı ....22
- 1.3 Endoplazmik retikulumda bulunan elektron transport zinciri ve NADH ile NADPH'e bağlı reaksiyonların birbiri ile ilişkisi .....23
- 2.1 Sığır karaciğer mikrozomlarından NADPH-sitokrom P450 redüktazın saflaştırılması için uygulanan yöntem .....33
- 2.2 Fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından NADPH-sitokrom P450 redüktazın saflaştırılması için uygulanan yöntem .....37
- 2.3 Fenobarbital muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından sitokrom P450B4 saflaştırılması için uygulanan yöntem .....39
- 2.4 Sitokrom P450'ye bağlı monooksijenazlar tarafından katalizlenen benzfetamin N-demetilasyon reaksiyonu .....45
- 2.5 NADPH-sitokrom P450 redüktazla katalizlenen idarubisin ve mitomisin C'nin kofaktör NADPH varlığında indirgenmesi .....46
- 3.1 Sığır karaciğer NADPH sitokrom P450 redüktazın saflaştırılmasında ilk DEAE-selüloz kolon kromatografisinin elüsyon profili .....52
- 3.2 İlk DEAE-selüloz kromatografisinden elde edilen kısmen saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazın ikinci DEAE-selüloz kolon (2.6 x 8.0 cm) kromatografisinin elüsyon profili .....53
- 3.3 Kısmen saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazın 2'-5'-ADP-sefaroz kolonunda (0.7 x 8.0 cm) afinite kromatografisinin elüsyon profili .....54
- 3.4 Sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazın saflaştırılmasında hidroksiapatit kolon (1.5 x 2.1 cm) kromatografisinin elüsyon profili .....56
- 3.5 Sığır karaciğer mikrozomlarından NADPH-sitokrom P450 redüktazın saflaştırılmasını 4 tane referans proteinle gösteren %8.5'lik poliakrilamit jeli .....57

3.6	Fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer NADPH sitokrom P450 redüktazın saflaştırılmasında ilk DEAE-selüloz kolon kromatografisinin elüsyon profili .....	59
3.7	Fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer sitokrom P450B4'ün saflaştırılmasında ilk DEAE-selüloz kolon kromatografisinin elüsyon profili .....	62
3.8	Fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından sitokrom P450B4 saflaştırılmasını 5 tane referans proteinle gösteren %8.5'lik poliakrilamit jeli .....	64
3.9	Koyun akciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazın saflaştırılmasında değişik aşamaları gösteren SDS-PAGE analizi .....	66
3.10	Hidroksiapatit kolonundan elüe edilen sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazın en son saflaştırılmış preparasyonunun absorpsiyon spektrumu .....	68
3.11	Artan miktarlarda saflaştırılmış sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazın, 0.2 nmol saflaştırılmış tavşan karaciğer CYP2B4 ve sentetik lipid fosfatidilkolin dilauorol içeren yeniden oluşturulmuş sistemlerdeki benzfetamin N-demetilasyon aktivitesine olan etkisi .....	71
3.12	Sığır karaciğer (A) ve koyun akciğer (B) P450 redüktazlarının 37°C'de %20 gliserol varlığında ve yokluğunda sıcaklığı karşı dayanıklılıkları .....	72
3.13	Nikel iyonunun saf sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	74
3.14	Kadmiyum iyonunun saf sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	74
3.15	Kurşun iyonunun saf sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	75
3.16	Nikel iyonunun saf sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin mekanizma çalışması. Dixon Grafiği.....	77
3.17	Kadmiyum iyonunun saf sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin mekanizma çalışması. Dixon Grafiği .....	79
3.18	Kurşun iyonunun saf sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin mekanizma çalışması. Dixon Grafiği.....	80
3.19	Saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikolar kullanılarak elde edilen karaciğer ve akciğer mikrozomlarının ve saflaştırılmış P450 redüktaz enzimlerinin Western-blot analiz sonuçları.....	82
3.20	Saflaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikolar kullanılarak elde edilen karaciğer ve akciğer mikrozomlarının ve saflaştırılmış P450 redüktaz enzimlerinin Western-blot analiz sonuçları.....	84

3.21 İdarubisinin, kofaktör NADPH varlığında, saflaştırılmış koyun akciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazla (P450R) katalizlenen redüktif aktivasyonu sonucu indüklenen plazmid DNA zincir kırıklarına karşı radikal süpürücülerin koruyucu etkilerini gösteren agaroz jel elektroforezi .....	91
3.22 Mitomisin C'nin, kofaktör NADPH varlığında, saflaştırılmış koyun akciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazla (P450R) katalizlenen redüktif aktivasyonu sonucu indüklenen plazmid DNA zincir kırıklarına karşı radikal süpürücülerin koruyucu etkilerini gösteren agaroz jel elektroforezi .....	93
3.23 pBR322 plazmid DNA'nın saflaştırılmış siğir karaciğer P450 redüktaz ve NADPH kofaktörü bulunan ortamda idarubisin (A) ve mitomisin C (B) ile olan aerobik inkübasyonunu gösteren agaroz jel fotoğrafı .....	95
4.1 NADPH-sitokrom P450 ve kofaktör NADPH varlığında idarubisinle indüklenen DNA hasarının mekanizması .....	104

## ÖZET

NADPH-sitokrom P450 redüktaz sitokrom P450 bağımlı monooksijenaz sisteminin vazgeçilmez bir bileşenidir ve bu sistemde indirgeyici eşdeğerliklerin NADPH'den sitokrom P450'ye transferini katalize eder. Bununla birlikte, sitokrom P450 redüktaz tek başına, bazı antikanser ilaçların, antibiyotiklerin redükleyici metabolizmasında, lipit peroksidasyonunda ve genotoksisite ve sitotoksisite ile sonuçlanan reaktif türlerin oluşumunda da önemli bir rol oynar. Sitokrom P450 redüktaz sıçan, tavşan, kobay ve fare gibi küçük laboratuvar hayvanlarından biyokatalitik aktivitesini koruyarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Öte yandan, sitokrom P450 redüktazın sığır gibi besin üreten çiftlik hayvanlarındaki karakterizasyonu ve ilaç ve ksenobiyotik metabolizmasındaki rolü ile ilgili çalışmalar ise sınırlı kalmıştır. Laboratuvarımızda, dünyada ilk kez, sitokrom P450 redüktaz sığır karaciğer dokusundan biyokatalitik olarak aktif, amfipatik yapıda saflaştırılıp, bazı biyokatalitik ve spektral özellikleri karakterize edilmiştir (Arınç ve Çelik, 2002; J. Biochem. Mol. Toxicol., 16, 286- 297). Ancak bu çalışmalar, bir ön çalışma niteliğinde değerlendirilebilir.

Bu çalışmada ise sığır karaciğer redüktazın immünolojik, biyokatalitik, kinetik ve diğer birtakım fonksiyonel özellikleri daha ayrıntılı olarak karakterize edildi. Enzim sığır karaciğer dokusundan daha önce tarif edilen metodun optimize edilmesi ile preparatif düzeyde ve daha yüksek bir özgül aktivite ile saflaştırıldı. Özgül aktivitesi, ilk preparatın iki misli olarak saptandı. Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı daha önce elde edilenle benzer olarak 76.000-78.000 dalton arasında bulunurken, absorpsiyon spektrumu flavoproteinlerin karakteristik özelliklerini gösterdi. Deterjanlar Emulgen 913, kolat ve Triton X-100'ün sığır karaciğer P450 redüktaz aktivitesi üzerindeki *in vitro* etkileri hem saf enzim hem de mikrozomlar kullanılarak detaylı olarak incelendi. Elde edilen sonuçlar, bu deterjanların test edilen konsantrasyonlarda ve karışımlarda sığır karaciğer P450 redüktazın aktivitesini %17 ile %40 arasında arttırdığını gösterdi. Bu sonuçlar, saflaştırma işlemi sırasında sitokrom P450 redüktazın sığır karaciğer mikrozomlarından çözünürleştirilmesi için gereken uygun Emulgen 913 ve kolat konsantrasyonlarını göstermiş oldu. Saflaştırılmış enzimin, sentetik lipit fosfatidilkolin dilaurol ve saflaştırılmış fenobarbital muamele edilmiş tavşan karaciğer sitokrom P4502B4'ü içeren yeniden oluşturulmuş sistemlerde ki benzfetamin N-demetilasyon reaksiyonunu katalizleyebildiği gösterilerek biyokatalitik olarak aktif formda olduğu bulundu. Tavşan karaciğer P4502B enziminin amino asit sırası bilindiği ve P4502B4 olarak sınıflandırıldığı için (Arınç, 1993), benzfetamin N-demetilasyon enzim aktivitesini yeniden oluşturma ("reconstitution") çalışmaları esnasında bu P450 kullanıldı. Saflaştırılmış enzimin sitokrom c redüktaz aktivitesinin stabilitesi 37°C'de %20 gliserol varlığında ve yokluğunda

belirlendi ve elde edilen sonuçlar koyun akciğer P450 redüktazı ile mukayese edildi. Gliserolün her iki enzimin de stabilitesini arttırdığı ve sığır karaciğer P450 redüktazın koyun akciğer P450 redüktazına göre çok daha dayanıklı bir enzim olduğu gösterildi. Ni<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> ve Pb<sup>+2</sup> metal iyonlarının saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz aktivitesi üzerindeki *in vitro* etkileri aydınlatıldı. Tüm test edilen metaller saflaştırılmış enzimin aktivitesini yarışmacı olmayan bir biçimde (“noncompetitive”) inhibe etti. Test edilen metaller içerisinde, saflaştırılmış enzimin en güçlü inhibitörü Pb<sup>+2</sup> (K<sub>i</sub> değeri: 0.03 mM) iken bunu kadmiyum takip etti (K<sub>i</sub> değeri: 0.04 mM). Böylece kurşun ve kadmiyumun nikel metaline göre saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerinde çok ciddi toksik etkileri olduğu gösterildi. Proje kapsamında ilk kez olarak sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazına karşı poliklonal antikolar üretildi. Böylece, biyokimya, farmakoloji, toksikoloji ve onkoloji alanlarında, ilaç sanayiinde ve bir takım biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanı mevcut olan endüstriyel bir ürün elde edilmiş oldu. Hem saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktazına hem de saflaştırılmış koyun akciğer P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikolar kullanılarak yürütülen Western-blot deneyleri sığır karaciğer ve koyun akciğer sitokrom P450 redüktazların immünolojik olarak benzer olduklarını ve benzer epitopları veya antijenik belirleyicileri paylaştıklarını gösterdi.

Bu çalışma kapsamında, saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz ve diğer saflaştırılmış P450 redüktazlar (koyun akciğer P450 redüktazı ve fenobarbital muamele edilmiş tavşan karaciğer P450 redüktazı) kullanılarak antikanser ilaç idarubisinin etki mekanizması moleküler düzeyde aydınlatılmaya çalışıldı. Bu amaçla yürütülen deneyler model bir bileşik olarak kullanılan mitomisin C ile tekrar edildi ve elde edilen sonuçlar mukayese edildi. İlk defa olarak, sitokrom P450 redüktazın, idarubisin’in, DNA tek zincir kırıklarının oluşumu ile sonuçlanan redüktif biyoaktivasyonunu katalize edebileceği gösterildi. DNA hasar mekanizması, idarubisin’in sitokrom P450 redüktaz ile aerobik şartlar altında redoks döngüsüne girerek reaktif oksijen türleri oluşturmasını (“ROS”) gerektirdi. Böylece, idarubisinin moleküler düzeydeki etki mekanizması ilk defa olarak bu çalışma kapsamında aydınlatıldı. Sitokrom P450 redüktaz ile ortaya çıkan bu yol, idarubisinin antitümör etkisine potansiyel olarak katkıda bulunan bir mekanizma olarak öngörüldü (Çelik ve Arınç 2008; J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 11(4), 68-82).

**Anahtar kelimeler:** Sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazı; Preparatif saflaştırma; Enzim karakterizasyonu; Poliklonal antikor üretimi; Metal inhibisyonu; Toksik etki; Antikanser ilaçlar; İdarubisin; Mitomisin C; Redüktif biyoaktivasyon; ROS; DNA hasarı.

## ABSTRACT

NADPH-cytochrome P450 reductase is an obligatory component of the microsomal cytochrome P450 dependent monooxygenase system where it catalyzes the transfer of reducing equivalents from NADPH to cytochrome P450. The cytochrome P450 reductase, by itself, also plays an important role in the reductive metabolism of some anticancer drugs and antibiotics as well as in lipid peroxidation and production of reactive species that can result in genotoxicity and cytotoxicity. The cytochrome P450 reductase has been purified from small laboratory animals such as the rat, rabbit, guinea-pig and mouse in a biocatalytically active form and characterized. On the other hand, studies related with the characterization of cytochrome P450 reductase and its role in the metabolism of drugs and xenobiotics in veterinary animals like beef have remained limited. In our laboratory, cytochrome P450 reductase was purified from beef liver tissue in a biocatalytically active amphipathic form for the first time and some biocatalytic and spectral properties were characterized (Arınc and Çelik, 2002; J. Biochem. Mol. Toxicol., 16, 286- 297). However, these studies can be considered as preliminary studies.

In this study, immunologic, biocatalytic, kinetic and other functional properties of beef liver reductase were further characterized in detail. The enzyme was purified from beef liver tissue on a preparative-scale and with a higher specific activity by optimizing the previously described method. The specific activity was found as twice of the previous preparation. The molecular weight of the purified enzyme was found to be between 76.000-78.000 dalton as the P450 reductase obtained previously and its absorption spectrum showed the characteristics of flavoproteins. The *in vitro* effects of detergents Emulgen 913, cholate and Triton X-100 on the activity of beef liver P450 reductase were evaluated using both purified enzyme and microsomes. The results obtained demonstrated that, at various concentrations and mixtures tested, these detergents increased the activity of beef liver P450 reductase between 17% and 40%. These results demonstrated the appropriate concentrations of Emulgen 913 and cholate required for the solubilization of P450 reductase from beef liver microsomes during the purification process. The purified enzyme was found to be in biocatalytically active form as shown by its ability to catalyze the benzphetamine N-demethylation reaction in reconstituted systems containing purified phenobarbital-treated rabbit liver cytochrome P4502B4 and phosphatidylcholine dilauroyl as a synthetic lipid. Since the aminoacid sequence of rabbit liver P4502B is known and it is classified as P4502B4 (Arınc, 1993), this P450 was used in reconstitution studies of benzphetamine N-demethylation enzyme activity. Stability of cytochrome c reductase activity of the purified



enzyme was determined at 37°C in the presence and absence of 20% glycerol and the results obtained were compared with sheep lung P450 reductase. It was shown that glycerol enhanced the stability of both enzyme and beef liver P450 reductase was found to be much more stable compared to sheep lung P450 reductase. The *in vitro* effects of the metal ions Ni<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> and Pb<sup>+2</sup> on the activity of the purified beef liver P450 reductase were elucidated. All the metals ions tested inhibited the activity of the purified enzyme in a noncompetitive manner. Of the metal ions tested, Pb<sup>+2</sup> (K<sub>i</sub> value: 0.03 mM) was the most potent inhibitor of the purified enzyme, which was followed by cadmium (K<sub>i</sub> value: 0.04 mM). Thus, it was demonstrated that lead and cadmium have more serious toxic effects on the purified cytochrome P450 reductase with respect to nickel metal. In this project, polyclonal antibodies were produced against beef liver cytochrome P450 reductase for the first time. Thus, an industrial product with many uses in biochemistry, pharmacology, toxicology, pharmaceutical industry and in some biotechnological applications was obtained. The Western-blot experiments using the polyclonal antibodies raised against both purified beef liver P450 reductase and purified sheep lung P450 reductase showed that beef liver and sheep lung P450 reductases are immunologically similar and share common epitopes or antigenic determinants.

In this study, it was tried to clarify the action mechanism of anticancer drug idarubicin at the molecular level by using purified beef liver P450 reductase and other purified P450 reductases (sheep lung P450 reductase and phenobarbital-treated rabbit liver P450 reductase). The experiments conducted for this purpose were repeated with mitomycin C, used as a model compound, and the results obtained were compared. It was demonstrated, for the first time, that cytochrome P450 reductase can catalyze the reductive bioactivation of idarubicin with resulting formation of DNA single strand breaks. The mechanism of DNA damage involved the redox cycling of idarubicin with cytochrome P450 reductase under aerobic conditions to generate “reactive oxygen species” (ROS). Thus, the action mechanism of idarubicin at the molecular level was demonstrated for the first time within this study. This pathway with cytochrome P450 reductase was proposed to potentially contribute to the antitumor effect of this anticancer agent. (Çelik and Arınç 2008; J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 11(4), 68-82).

**Keywords:** Beef liver NADPH-cytochrome P450 reductase; Preparative purification; Enzyme characterization; Polyclonal antibody production; Metal inhibition; Toxic effect; Anticancer drugs; Idarubicin; Mitomycin C; Reductive bioactivation; ROS; DNA damage.

## 1. GİRİŞ

NADPH-sitokrom P450 redüktaz (EC 1.6.2.4; NADPH-ferrihemoprotein oksidoredüktaz) değişik dokuların endoplazmik retikulumunda bulunan membrana bağlı bir flavoproteindir. Bu enzim sitokrom P450'ye bağlı monooksijenaz sisteminin vazgeçilmez bir bileşenidir ve indirgeyici eşdeğerliklerin NADPH'den sitokrom P450'ye transferini katalize eder. Sitokrom P450 redüktaz ve sitokrom P450'den oluşan monooksijenazlar, O<sub>2</sub> ve NADPH'nin bulunduğu ortamda, ilaçlar da dahil olmak üzere binlerce kimyasal maddenin (ksenobiyotiklerin) ve steroid hormonları, prostaglandinler, retinoik asit gibi endojen maddelerin oksidatif hidroksilasyon reaksiyonlarını katalize ederler (Lu ve Coon, 1968; Lu ve ark.'ları, 1969; Lu ve Levin, 1974; Arınç, 1995a; Munro ve ark.'ları, 2001). Zararlı kimyasalları, zararsız hale dönüştürme işlemine ilave olarak, bu monooksijenazlar, ksenobiyotiklerin, toksik, karsinogenik ve mutajenik etkiyle sonuçlanan metabolik aktivasyonlarından da sorumludurlar. Mikrozoal sitokrom P450 monooksijenaz sistemindeki elektron transfer görevinin yanısıra NADPH'ye bağlı sitokrom P450 redüktaz, ayrıca bazı antikanser ilaçların, antibiyotiklerin redükleyici metabolizmasında, lipid peroksidasyonunda ve genotoksisite ve sitotoksisite ile sonuçlanan reaktif oksijen türlerinin oluşumunda da önemli bir rol oynar. Mitomisin C gibi kanser tedavisinde kullanılan önilaçlar ("prodrug"), P450 redüktaz enziminin redükleyici aktivitesi neticesinde hücre içinde aktif ilaç haline dönüşürler. Bu nedenle sitokrom P450 redüktaz, biyoredüktif antikanser ilaçların dizaynında ve geliştirilmesinde çok önemli bir enzimdir (Sinha, 1989; Lu, 1991; Halliwell ve Auroma, 1991; Bailey ve ark.'ları, 2001; Rooseboom ve ark.'ları, 2004).

### 1.1 GENEL BİLGİLER

#### 1.1.1 Mikrozoal Sitokrom P450 Redüktaz ve Sitokrom P450 Monooksijenaz Sisteminin Fizyolojik Fonksiyonları

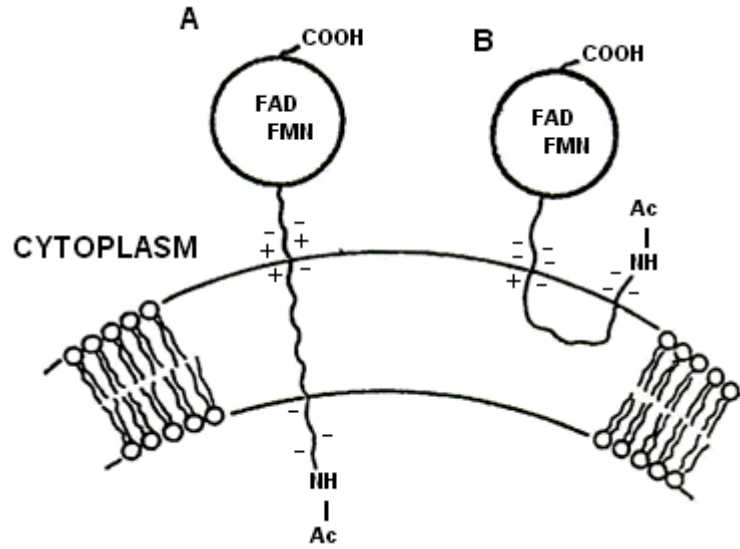
NADPH-sitokrom P450 redüktaz ve sitokrom P450'den (CYP) oluşan monooksijenaz sistemi, ilaçlar da dahil olmak üzere, yapıları farklı binlerce organik kimyasal maddenin oksidatif biyotransformasyonunu katalize edebildiğinden, ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol oynayan en önemli enzim sistemlerinden biridir. Sitokrom P450'ler bakteriden insana kadar değişik organizmalarda bulunan hemoprotein süperailisini oluşturur.

Monooksijenazların sübstrat özgülüğü, sitokrom P450 izozimleri tarafından sağlanır. Sitokrom P450 izozimlerinin katalize ettiği çok değişik reaksiyonlar için gerekli olan elektronlar ise NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi tarafından sağlanır. NADPH-sitokrom P450 redüktaz ve sitokrom P450'den oluşan monooksijenaz sistemi canlılarda iki önemli rol üstlenirler; 1) Steroitler, yağ asitleri, prostaglandinler, safra asitleri, retinoit, vitamin D, vitamin A, üroporfirinojen, lökotrien ve tromboksan gibi endojen maddelerin biyosentezinde veya biyodegradasyonundaki monooksijenaz reaksiyonlarını katalize ederler, 2) Çevresel olarak maruz kalınan endüstriyel çözücüler, kimyasal karsinojenler, kemoterapetik ajanlar, antibiyotikler, polisiklik aromatik ve halojenli hidrokarbonlar, bazı fungal toksinler, mutajenler, aromatik aminler, heterosiklikler, nitrofuranlar, insektisitler, pestisitler, herbisitler ve ilaçlar gibi binlerce kimyasal maddenin oksidatif biyotransformasyonunu katalize ederler. Uzun yıllar, sitokrom P450 redüktaz-sitokrom P450 monooksijenaz sisteminin vazifesinin, vücuda alınan lipofilik (yağ seven) maddeleri hidrofilik (su seven) maddelere çevirerek vücuttan atılmasını sağlamak ve böylece vücudu zehirli maddelerden temizlemek olduğuna inanıldı. Son otuz yılda yapılan çalışmalar, bu hipotezin her kimyasal madde için doğru olmadığını, bazı kimyasalların daha toksik maddelere (benzpiren epoksit, benzantrasen 7,8 oksit, aflatoksin B1 eposit gibi) bu enzim sistemi tarafından dönüştürüldüğünü gösterdi. Bu oluşan kimyasalların kanser oluşumuna sebep oldukları daha sonraki çalışmalarda gösterildi. (Vermillion ve Coon, 1978; Arınç, 1993; Arınç, 1995a; Werck-Reichhart ve Feyereisen, 2000; Arınç ve ark.'ları, 2000; Anzenbacher ve Anzenbacherova, 2001; Nebert ve Russell, 2002).

### **1.1.2 Mikrozomal Sitokrom P450 Redüktaz ve Sitokrom P450 Monooksijenaz Reaksiyonlarının Mekanizması**

Monooksijenaz reaksiyonlarında terminal oksidaz olarak görev yapan sitokrom P450, hem metabolize olacak olan kimyasal maddenin bağlandığı hem de oksijen bağlanmasıyla oksijen aktivasyonunun gerçekleştiği bir proteindir. Bu enzime oksijen bağlanabilmesi için önce içerdiği üç değerlikli demir iyonunun, iki değerlikli demire indirgenmesi gerekir. Bu reaksiyon, hücrede bulunan sitokrom P450 redüktaz enzimi tarafından katalizlenir. Birkaç komponentten oluşan böyle karmaşık enzim sistemlerinde ki her üyenin fonksiyonunun anlaşılabilmesi ve enzimatik mekanizmanın belirlenebilmesi için, bu sistemdeki komponentlerin önce birbirlerinden ayrılması, saf olarak elde edilmesi, daha sonra da bu komponentlerin birer birer ortama ilave edilerek enzimatik reaksiyonlara ne gibi katkı sağladıklarının belirlenmesi gerekir. Buradaki mekanizma da bu şekilde yapılan rekonstitüsyon çalışmaları neticesinde aydınlatılmıştır.

Sitokrom P450 redüktaz, FMN ve FAD içeren bir flavoprotein olup, endoplazmik retikulumda membrana bağlı olarak bulunan integral bir proteindir. Molekül ağırlığı 76000-79000 arasında değişen redüktaz, başlıca iki peptitten oluşmaktadır. Sitozolde bulunan ve FMN ve FAD içeren hidrofilik peptit doğal enzimin spektral özelliklerini korurken, hidrofobik peptit bu enzimin membrana bağlı kısmını teşkil eder ve redüktazın sitokrom P450 ya da sitokrom b5 ile uygun etkileşimini sağlar (Şekil 1.1). Redüktaz enzimi ancak amfipatik yapıda, yani hem hidrofilik hem de hidrofobik peptitleri içerdiği zaman, sitokrom P450'deki Fe(III)'ü, Fe(II)'ye indirger. Tripsin ile membranlardan çözünürleştirilerek saflaştırılan hidrofilik redüktaz, P450'ye bağlı monooksijenazlar reaksiyonunu katalize etmez, fakat sitokrom c'yi indirger (İşcan ve Arınç, 1986 ve 1988; Lu, 1991). Uzun yıllar, sitokrom c'nin mitokondriyel bir protein olduğu göz önüne alınarak, sitokrom c'den P450 enziminin yapay ("artificial") süstratı olarak bahsedilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda apoptosis esnasında sitokrom c'nin mitokondriden sitozole geçtiğinin gösterilmesi, bu enzimin apoptosiste de bir fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir.



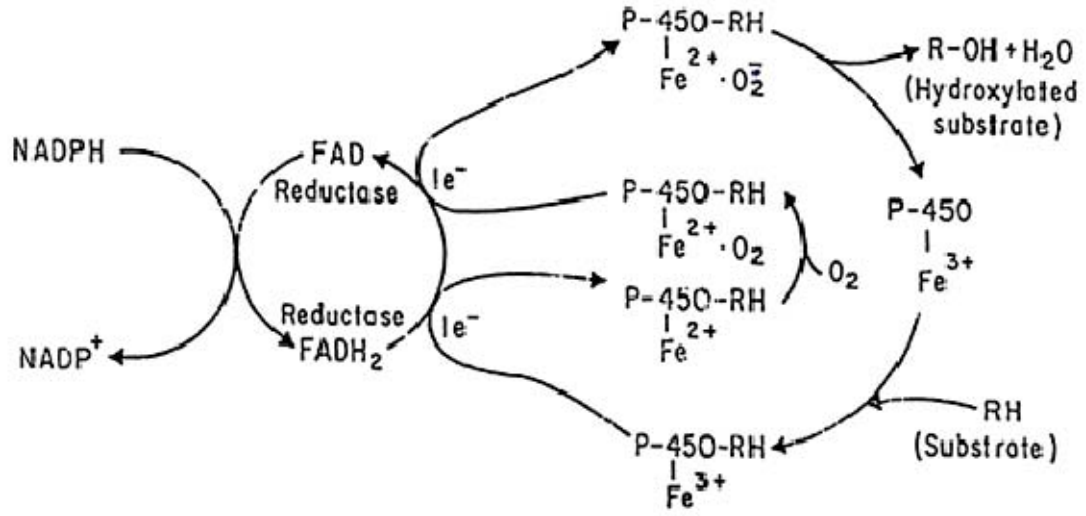
**Şekil 1.1** NADPH-sitokrom P450 redüktazın, NH<sub>2</sub> – and COOH- terminal bölgelerinin mikrozomal membranın karşı taraflarında (A) ya da aynı tarafında (B) olduğu olası oryantasyonları (Black ve Coon, 1982'den alınmıştır).

Şekil 1.2'de sitokrom P450 tarafından katalizlenen mikrozomal monooksijenaz reaksiyonunun mekanizması verilmektedir. İlk önce, sübstrat, RH, P450( $Fe^{+3}$ )'ye kovalent olmayan bağlarla bağlanır, daha sonra P450( $Fe^{+3}$ ), NADPH'den redüktaz enzimi kanalıyla gelen bir elektron ile P450( $Fe^{+2}$ )'ye indirgenir. Bunu takiben, oksijen ( $O_2$ ), P450 ( $Fe^{+2}$ )'ye, nonkovalent olarak bağlanır ve NADPH'den P450 redüktaz kanalıyla gelen ikinci elektron ile indirgenerek, süperoksit radikaline ( $O_2^- \cdot$ ) dönüşür. Bundan sonraki basamağın mekanizması daha aydınlatılmamıştır. Şekil 1.2 (A)'da gösterildiği üzere, bu basamakta, molekülün içinde gerçekleşen bir oksidasyon-redüksiyon reaksiyonu neticesinde R-OH ve  $H_2O$  oluşur. Şekil 1.2 (B)'de gösterildiği üzere, test tüpünde, monooksijenaz aktivitesinin rekonstitüsyonu için fosfatidilkolin dilaurol yapısında bir lipit gereklidir.

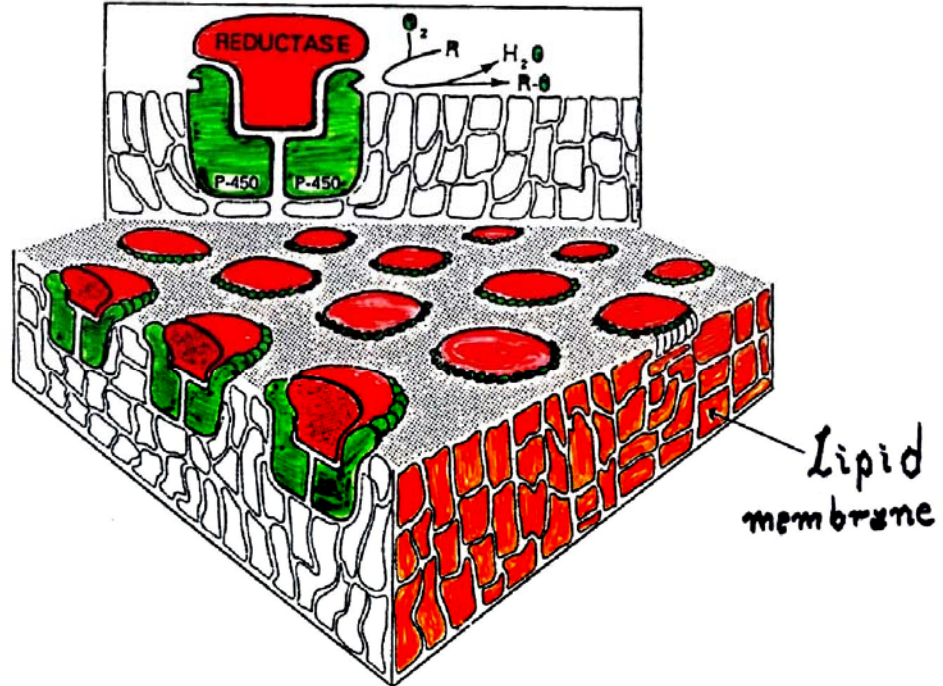
### **1.1.3 NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Sitokrom b5 ve Sitokrom b5 Redüktaz İle Katalize Edilen Reaksiyonlardaki Rolü:**

NADPH-sitokrom P450 redüktazın sitokrom P450'ye bağlı monooksijenaz sistemindeki elektron transfer görevinin yanısıra, bazı şartlarda, sübstrat ve P450 izoziminin türüne bağlı olarak, mikrozomlarda NADH kofaktörü ile çalışan bir diğer elektron transport sisteminin üyesi olan sitokrom b5 enzimine de elektron transfer edebileceği bulunmuştur (Cohen ve Estabrook, 1971; Chiang, 1981; Arınç ve ark.'ları, 1994, 1995b). Şekil 1.3 bu iki sistemin birbiriyle nasıl keşistiğini göstermektedir. NADH'ye bağlı sitokrom b5 sistemi ise endoplazmik retikulumda lipit metabolizmasının uzatma ve desaturasyon gibi değişik reaksiyonlarını katalize eder. Bu reaksiyonlar esansiyel doymamış yağ asitlerinin, prostaglandinlerin ve siklik AMP'nin sentezi açısından son derece önemlidir (daha fazla bilgi için Arınç, 1991'e bakınız).

A

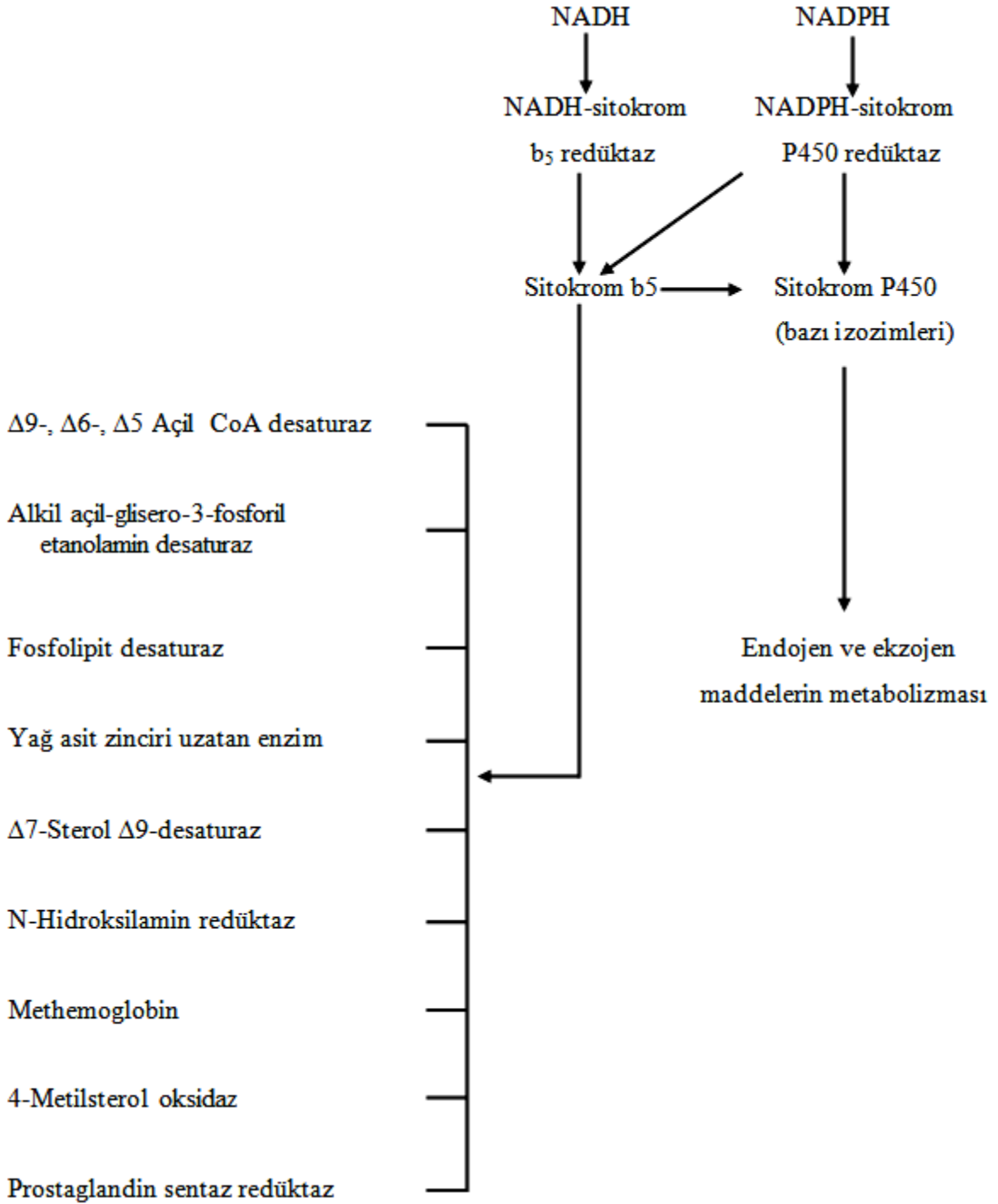


B



Three-dimensional concept of the monooxygenase system in the endoplasmic reticulum. R, substrate [Reproduced from Ref. 48 with permission from Dr. W. Junk Publishers].

**Şekil 1.2 (A)** Mikrozomal sitokrom P450'ye bağlı monoksijenaz sisteminin reaksiyon mekanizması (Lehninger, 1975'den alınmıştır) **(B)** Sitokrom P450'ye bağlı monoksijenaz sisteminin endoplazmik retikulum membranındaki üç boyutlu yapısı



**Şekil 1.3** Endoplazmik retikulumda bulunan elektron transport zinciri ve NADH ile NADPH'e bağlı reaksiyonların birbiri ile ilişkisi (Arınç ve Çakır 1999'dan alınmıştır).

#### **1.1.4 NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enziminin İndirgeyici Aktivitesine Dayanan Biyoredüktif Antikanser İlaçlar**

Sitokrom P450 redüktaz, aerobik ortamda NADPH ve bazı koşullarda da NADH'den gelen elektronları, sitokrom P450 ve sitokrom b5'e transfer ederek, ilaç ve diğer ksenobiyotiklerin ve steroid hormonları ve prostaglandinler gibi endojen maddelerin oksidatif metabolizmasını katalize ettiği gibi, tek başına terapatik antitümör ilaçların ve antibiyotiklerin indirgenmesini de kataliz eder. Mitomisin C gibi, sitokrom P450 redüktaz enziminin indirgeyici aktivitesi neticesinde metabolik aktivasyona uğrayarak aktif hale geçen önilaçlar kanser tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır.

NADPH-sitokrom P450 redüktaz, biyoredüktif antikanser ilaçların metabolik aktivasyonunda rol alan en önemli enzimlerden biridir ve bu ilaçların 1-elektron indirgenmesini katalize eder. Bu 1-elektron indirgenmesine bağlı olarak biyoredüktif antikanser ilaçlar sitotoksik ve genotoksik türlere dönüşürler. Redüksiyon sonucu oluşan bu sitotoksik ve genotoksik türler ise hücre içerisinde değişik makromoleküllere kovalent olarak bağlanırlar ve farklı tümör tiplerinin tedavisinde etkilerini gösterirler. NADPH'e bağlı bu redüktif reaksiyonlarda genotoksisite ve sitotoksisite ile sonuçlanan reaktif oksijen türleri, karbon merkezli serbest radikaller ve reaktif metabolitler oluşur. Kinon bileşiklerinin durumunda 1-elektron indirgenmesi semikinon serbest radikallerinin oluşması ile sonuçlanır. Aerobik şartlarda semikinon radikalleri redoks döngüsü ile kolaylıkla kendiliğinden okside olur ve kinon rejenerasyonuna ve süperoksit anyon radikallerinin oluşmasına neden olur. Süperoksit anyon radikalleri, hidrojen peroksit ve sonrasında oldukça toksik hidroksil radikallerine dönüşerek lipid peroksidasyonuna ve DNA'da kırılmalara neden olur. Oluşan semikinon radikalleri hipoksik şartlarda ise daha kalıcıdır ve nükleik asitlere, proteinlere ve diğer makromoleküllere kovalent olarak bağlanarak hipoksik solid tümör hücrelerinin öldürülmesinde etkilerini gösterirler (Kappus, 1986; Sinha, 1989; Powis, 1989; Taatjes ve ark.'ları, 1997; Kumagai ve ark.'ları, 1997; Gutierrez, 2000; Kovacic ve Osuna, 2000; Bailey ve ark.'ları, 2001; Rooseboom ve ark.'ları, 2004).

#### **1.1.5 Mikrozomal Sitokrom P450 Redüktaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Özellikleri**

NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enzimi ilk olarak 1950 yılında Horecker tarafından, domuz karaciğer dokusunun toz haline getirilmiş aseton ekstraktının tiripsin ile muamele edilmesi ile izole edildi (Horecker, 1950). Enzim, sitokrom c'yi redüklediği için NADPH-



sitokrom c redüktaz olarak isimlendirildi. Daha sonra, Williams ve Kamin (1962) ve Philips ve Langdon (1962) tarafından ayrı ayrı lipaz ve tripsin kullanılarak karaciğer mikrozomlarından çözünürleştirilmiş olarak elde edildi. Bu çalışmalar enzimin endoplazmik retikulumda bulunduğunu gösterdi. İlk kez, 1973'de Iyanagi ve Mason, NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin iki flavin molekülü, FAD ve FMN içerdiğini gösterdi. Sonraki çalışmalarda da, FAD'nin NADPH'den elektron alan flavin olduğu, daha sonra da bu elektronun kofaktör FMN'e transfer edildiği gösterildi (Vermilion ve Coon, 1978; Kurzban ve Strobel, 1986). Bu durumda NADPH'den elektron transfer işlemi sitokrom P450 veya diğer elektron alabilen moleküllere şu şekilde olmaktadır:



İlk yapılan saflaştırma çalışmalarında, redüktaz enzimi endoplazmik retikulumdan tiripsin gibi hidrolitik enzimlerle muamele edilerek çözünürleştirildi ve saflaştırıldı. Bu yöntem ile saflaştırılan enzim yalnız sitokrom c gibi yapay sübstratları indirgedi. Bilindiği üzere, sitokrom c endoplazmik retikulumda bulunmaz mitokondride bulunur. Bundan dolayı da bu enzimin fizyolojik reaksiyonlardaki rolü Lu ve Coon'un 1968 yılındaki yayına kadar anlaşılamadı. Lu ve Coon, tavşan karaciğer mikrozomlarından sitokrom P450 ve P450 redüktazı deterjanlar kolat ve deoksikolat kullanarak çözünürleştirdi ve birbirlerinden ayırarak kısmen saflaştırılmış olarak elde etti ve mikrozomal monooksijenaz sisteminin üç elemandan oluştuğunu gösterdi. Bu elemanlar sitokrom P450, NADPH'ye bağlı sitokrom P450 redüktaz ve lipid idi. Bu elemanlar, test tüpünde birleştirildikleri zaman (rekonstitüsyon), NADPH ve O<sub>2</sub> bulunan ortamda yağ asitlerinin ω-oksidasyonunu katalize ettiler. Bundan sonraki çalışmalarda, bu yeniden oluşturulmuş ("reconstituted") mikrozomal monooksijenaz sisteminin daha önce anlatıldığı üzere birçok ilaç, steroid ve yabancı organik bileşiklerin hidroksilasyon reaksiyonlarını da katalize ettiği gösterildi. Deterjan kullanılarak çözünürleştirilen ve saflaştırılan redüktazın moleküler ağırlığının, hidrolitik enzimlerle saflaştırılandan (hidrolitik olarak çözünürleştirilmiş redüktaz yaklaşık 71000 Da) daha büyük olduğu (deterjan ile çözünürleştirilmiş redüktaz yaklaşık 77000 Da) ve ilave bir hidrofobik peptid içerdiği bulundu. Molekül ağırlığı 71000 olan, FAD ve FMN içeren hidrofobik redüktazın, potasyum ferrisiyanit, menadion, diklorofenolindofenol ve sitokrom c'yi indirgediği, fizyolojik substratı olan sitokrom P450'yi indirgediği anlaşıldı. Bu hidrofobik peptidin, redüktaz enziminin biyolojik membranlara bağlanması, sitokrom P450 ve sitokrom b5 ile uygun etkileşim kurması ve sitokrom P450 ve b5'e elektron transfer etmesi için gerekli olduğu gösterildi. Bu suretle enzimin fizyolojik rolü de saptandı.

Önemli olan diğer bir husus da, farklı türlerden ve dokulardan saflaştırılan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin, tüm türlerde tek bir gen tarafından kodlandığı bilinmesine rağmen, bazı çalışmalarda sitokrom P450'ye bağlı monooksijenaz sisteminin sübstrat tercihini etkileyebileceğinin gösterilmesidir. Örneğin, 3-MC (3-metilkolantrin) uygulanmış sıçanlardan kısmen saflaştırılan redüktazın aynı miktardaki fenobarbital-uygulanmış sıçanlardan saflaştırılan redüktaza göre benzfetamin N-demetilasyonunu katalizlemede sadece %50-60 etkili olduğu bulunmuştur (Lu ve ark.'ları, 1972). Ancak bu tercih testosteron, benzpiren ve klorsiklizinin monooksijenaz reaksiyonlarında görülmemiştir. Bir başka çalışmada, "scup" (bir balık türü) karaciğer P4503A (P450A)'nın "scup" redüktazı ile yeniden oluşturulmuş sistemde biraraya getirildiği zaman sıçan redüktazına göre etoksikumarin O-deetilaz hidroksilasyonunda daha fazla aktivite gösterdiği ancak bu tercihin "scup" karaciğer P4501A (P450E)'si ile görülmediği rapor edilmiştir (Klotz ve ark.'ları, 1986). İşcan ve Arınç (1988), koyun akciğer redüktazının aynı miktardaki koyun karaciğer redüktazına göre, koyun karaciğer sitokrom P450'si ve 3-MC (3-metilkolantrin) uygulanmış sıçan karaciğer sitokrom P448'si bulunan ortamda benzpiren reaksiyonunu katalizlemede sırasıyla %36.5 ve %14.8 etkili olduğunu göstermiştir. Her iki redüktaz ise anilin 4-hidroksilasyon ve etilmorfin N-demetilasyon reaksiyonlarını yeniden oluşturulmuş sistemde aynı ölçüde desteklemiştir. Saflaştırılmış P450 redüktazların, bazı monooksijenaz reaksiyonlarında bazı sitokrom P450'lere olan tercihinin (yukarıdaki örneklerde olduğu gibi) moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu konudaki çalışmalar, çeşitli türlerden elde edilen P450 redüktazlar kullanılarak devam etmektedir.

Deterjanla çözümlenmiş NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin saflaştırılmasındaki en büyük gelişme afinite kolonlarının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. 2',5'-ADP (Yasukochi ve Master, 1976) ve NADP<sup>+</sup> (Dignam ve Strobel, 1977) afinite ligantlarının sentezi, yeni kolonların dizayn edilmesini ve P450 redüktaz enziminin daha hızlı ve daha yüksek verimle saflaştırılmasını mümkün kılmıştır. Akciğer dokusundan ise, P450 redüktaz enzimi, biyokatalitik olarak aktif bir halde ilk kez Arınç ve Philpot tarafından saflaştırılmıştır (Arınç ve Philpot, 1976). Daha sonra NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi sıçan, tavşan, fare, kobay gibi birçok küçük laboratuvar hayvanlardan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Saf proteinin varlığı ile NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin tek bir gen tarafından sentezlendiği bulunmuş ve geni klonlanmıştır. Genin ve saf proteinin DNA ve amino asit dizilimi bulunmuştur (detaylar için Arınç, 1995a'ya bakınız). Ayrıca, balıklardan saflaştırılan P450 redüktaz enziminin de bazı biyokatalitik ve kinetik özellikleri karakterize edilmiştir (Klotz ve ark.'ları, 1983; Şen ve Arınç, 1998; Arınç ve Bozcaarmutlu, 2003). Öte yandan, sitokrom P450 redüktazın sığır ve diğer besin üreten çiftlik hayvanlarındaki

karakterizasyonu ve ilaç ve ksenobiyotik metabolizmasındaki rolü ile ilgili çalışmalar ise sınırlı kalmıştır. Laboratuvarımızda uzun yıllardan beri koyun karaciğer ve akciğer mikrozomal sitokrom P450-P450 redüktaz monooksijenaz sistemi ile çalışılmaktadır. Sitokrom P450 redüktaz koyun karaciğer ve akciğer dokularından saflaştırılmış ve birçok özellikleri karakterize edilmiştir (İşcan ve Arınç, 1986 ve 1988; Arınç ve Aydoğmuş, 1990; Adalı ve ark.'ları, 1996).

Sığır ve diğer besin üreten çiftlik hayvanları çevresel olarak birçok kimyasallara, herbisitlere, kanserojen maddelere, pestisitlere, ağır metallere, gıda katkı maddelerine ve veteriner ilaçlara (antibiyotikler veya illegal olarak kullanılan büyüme faktörleri gibi) yoğun olarak maruz kalmaktadır. Aynı zamanda, endüstri ve sanayii alanındaki ve şehirleşmedeki hızlı gelişmeye paralel olarak fabrikaların ve yerleşim alanlarının otlak alan ve mera yakınlarına kadar ilerlemesi, bu hayvanların fabrika atıklarında, atmosfere bırakılan zehirli gazlarda ve arabaların egsoz dumanlarında bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonlara, halojenli hidrokarbonlara, endüstriyel çözücülere, prokarsinojen kimyasallara ve ağır metallere maruz kalmasına neden olmaktadır. Bu ilaçların ve kimyasalların büyük bir çoğunluğu ise sitokrom P450 izozimleri ve sitokrom P450 redüktaz tarafından metabolize edilmektedir. Bunun sonucu olarak bazı durumlarda reaktif ve toksik metabolitler oluşabilmekte ve bunlar vücuttan atılamadığı zaman hayvanın yalnız karaciğer dokusunda değil onun yenilen diğer ürünlerinde de (et, süt ve sakatat gibi) birikebilmektedir. Bu da insan sağlığı için risk teşkil etmektedir (Natsuhori ve ark.'ları, 1997; Kennedy ve ark.'ları, 2000; Sivapathasundaram ve ark.'ları, 2001; Courtheyn ve ark.'ları, 2002; Boxall ve ark.'ları, 2003). Sığır kaynaklı ürünlerin (et, süt ve sakatat) çok yüksek besleyici değeri olmasına ve de insanlar tarafından çokca tüketilmesine rağmen, literatürde sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazın ilaç ve ksenobiyotik metabolizmasındaki rolü ile ilgili hemen hemen hiç bir bilgi yoktur. Bu amaçla, laboratuvarımızda, dünyada ilk kez, biyokatalitik olarak aktif, amfipatik yapıdaki NADPH-sitokrom P450 redüktaz sığır karaciğerinden saflaştırılmış ve bazı biyokatalitik ve spektral özellikleri aydınlatılarak ortaya çıkan bulgular rapor edilmiştir (Arınç ve Çelik, 2002). Yapılan bu çalışmalar ön bir çalışma niteliğinde olup, sığır karaciğer P450 redüktaz enzimin biyokatalitik ve diğer özelliklerinin detaylı olarak karakterize edilmesi gerekmektedir. Ayrıca, sığır sitokrom P450 redüktaz enzimine karşı antikor üretilmemiş ve sığır P450 redüktaz enzimi immünolojik olarak karakterize edilmemiştir. Dolayısıyla bu projede, NADPH-sitokrom P450 redüktazın sığır karaciğer dokusundan büyük ölçekte (preparatif düzeyde) ve yüksek bir özgül aktivite ile saflaştırılması, saflaştırılan enzime karşı biyoteknolojik ve farmasötik uygulamaları olan poliklonal antikorlar üretilerek enzimin

immünolojik karakterizasyonunun yapılması ve enzimin birtakım fonksiyonel ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ile daha ileri seviyede karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

Proje kapsamında, öncelikle saflaştırma işlemi sırasında sitokrom P450 redüktazın sığır karaciğer mikrozomlarından çözünürleştirilmesi için gereken uygun Emulgen 913 ve kolat konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu deterjanların ve ek olarak Triton X-100 deterjanının P450 redüktaz aktivitesine olan etkileri saf enzim veya mikrozomlar kullanılarak belirlenmiştir. Saflaştırılmış enzimin karakterize edilmesi amacı ile moleküler ağırlığı elektroforetik olarak belirlenmiş ve enzimin spektral özellikleri aydınlatılmıştır. Saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktazın biyokatalitik olarak aktif olduğu, saflaştırılmış tavşan karaciğer CYP2B4 ve sentetik lipid içeren yeniden oluşturulmuş sistemlerde ki benzfetamin N-demetilasyon aktivitesinin ölçülmesi ile belirlenmiş ve her iki enzimin artan konsantrasyonlarının aktiviteye olan etkileri çalışılmıştır. Saflaştırılan sığır karaciğer P450 redüktazın sıcaklığa karşı dayanıklılığı %20 gliserol varlığında ve yokluğunda belirlenerek, enzimin stabilitesi koyun akciğer P450 redüktazı ile mukayese edilmiştir. Ayrıca, sığırların çevresel olarak maruz kaldığı birtakım ağır metallerin karaciğer dokusunda ki sitokrom P450 redüktaz enzimine olan olası toksik etkileri belirlenmiş ve enzim aktivitesi üzerinde ne tip bir inhibisyona neden olduğu araştırılmıştır.

Sığır karaciğer P450 redüktazın immünolojik olarak karakterize edilebilmesi amacı ile enzime karşı poliklonal antikorlar üretilmiştir. Ayrıca proje kapsamında koyun akciğer P450 redüktazına karşı da poliklonal antikorlar üretilmiştir. Üretilen antikorlar, mikrozomal numuneler ve saf enzimler kullanılarak sığır karaciğer ve koyun akciğer P450 redüktazların immünolojik benzerlikleri Western-blot tekniği ile ortaya konmuştur.

Bu çalışmalara ek olarak, antikanser ilaç idarubisinin etki mekanizması saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz ve saflaştırılan diğer P450 redüktazlar kullanılarak moleküler düzeyde araştırılmıştır. Bu amaçla enzim assayleri ve plazmit DNA deneyleri yürütülmüştür. İdarubisinle ile yürütülen bu deneyler model bir bileşik olarak kullanılan mitomisin C ile de tekrar edilmiş ve elde edilen sonuçlar mukayese edilmiştir. Mitomisin C doğal bir bileşiktir ve mitomisin sınıfı bileşikler içerisinde genel kullanım için onay alınan ve klinikte en çok kullanılan tek kinon içeren alkilasyon yapan ajandır. Mitomisin C'nin metabolik aktivasyonunda rol alan en önemli enzimlerden biri NADPH-sitokrom P450 redüktazdır (Cummings ve ark.'ları, 1998; Beall ve Winski, 2000; Rooseboom ve ark.'ları, 2004). Dolayısıyla, bu çalışmada mitomisin C model bir bileşik olarak kullanılmıştır. Mitomisin C'nin redüktif biyoaktivasyonuna yönelik laboratuvarlarda gerçekleştirilen çalışmalarda genelde

sıçan veya fare karaciğerinden saflaştırılan P450 redüktaz enzimi kullanılmıştır. Mitomisin C etkisinin moleküler mekanizmasında ki en önemli özellik bu ilacın bir önilaç olarak varolması ve DNA çapraz bağlanmasına ve alkilasyona neden olan aktivitelerinin ortaya çıkması için kinon kısmının indirgenmeye ihtiyaç duymasındır (Iyer ve Szybalski, 1964). İlacın bu özelliği ona seçici olarak hipoksik tümör hücrelerini öldürmesi potansiyelini vermiştir (daha fazla bilgi için Seow ve ark.'ları, 2004'e bakınız). Mitomisin C'nin etki mekanizmasının aydınlatılması ve sentetik türevlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar halen yoğun olarak sürdürülmektedir (Lown, 1983; Powis, 1987; Spanswick ve ark.'ları, 1998; Beall ve Winski, 2000; Begleiter, 2000; Bradner, 2001).

İdarubisinin de ait olduğu antrasiklin grubu ilaçlar, katı tümörlerin ve lenfoma, akut lenfositik lösemi ve akut miyelositik lösemi gibi hematolojik tümörlerin tedavisi için antikanser kemoterapide yaygın olarak kullanılan klinik olarak etkili kinon-içeren antibiyotiklerin geniş bir sınıfını temsil eder (Minotti ve ark.'ları, 2004; Doroshow, 2006). Bu çalışma da kullanılan idarubisin ise yarı sentetik bir antrasiklin ilaç olup, antrasiklinlerin antineoplastik aktivitelerinin geliştirilmesi ve kardiyotoksik özelliklerinin azaltılması çalışmalarında sentezlenen binlerce kimyasal içerisinde, klinik denemeler aşamasına kadar ulaşmış ve klinik kullanım için onay almış birkaç analogdan biridir (Borchmann ve ark.'ları, 1997). İdarubisinin kimyasal yapısı doğal bir antrasiklin olan daunorubisine benzemektedir, yalnız idarubisin daunorubisinden farklı olarak aglikon kısmında ki D halkasında karbon-4 pozisyonunda metoksi grubu içermemektedir. İdarubisin, diğer doğal antrasiklinlerden farklı olarak oral biyoyararlanımı, farmakokinetiği, toksisitesi ve antitümör aktivitesine göre benzersiz özelliklere sahiptir. Antrasiklinlerin antitümör etkileri için önerilen çeşitli mekanizmalardan biri DNA hasarına ve lipid peroksidasyonuna neden olan serbest radikal oluşumudur (Sinha, 1989; Powis, 1989; Taatjes ve ark.'ları, 1997; Gewirtz, 1999; Doroshow, 2006). Antrasiklinler tarafından serbest radikal oluşumu, bu bileşiklerin hücrel oksidoredüktazlar tarafından biyoredüktif aktivasyonunu gerektirir. Özellikle, 1-elektron indirgeyici enzim olan NADPH-sitokrom P450 redüktazın bu işlemde önemli bir rol aldığı ileri sürülmektedir. Antrasiklinlerin biyoredüktif aktivasyonları ve etkilerinin moleküler mekanizmaları üzerindeki çalışmalar genelde doğal bir antrasiklin olan doksorubisin kullanılarak yürütülmüştür. Doksorubisinin pekçok saflaştırılmış enzim tarafından biyoindergenmesine dair çok sayıda makale yayınlanmıştır (Powis, 1989 ve Doroshow, 2006'ya bakınız). İdarubisinin ise diğer antrasiklinlere nazaran pekçok avantajlı özellikleri olmasına rağmen, NADPH-sitokrom P450 redüktaz tarafından biyoredüktif aktivasyonu hakkında bizim bilgimize göre daha önce yayınlanmış herhangi bir makale bulunmamaktadır (bu çalışma kapsamında yayınlanan makale haricinde, bakınız Çelik ve Arınç, 2008). Bir ilacın fonksiyonel gruplarının modifikasyonunun veya uzaklaştırılmasının o

ilacın fizikokimyasal ve hücresele enzimlere bağlanma afinitesi gibi biyolojik özelliklerini etkileyebileceği göz önüne alınırse bu hususun özellikle önemli olduğu görülecektir.

İdarubisinin neden olduğu DNA hasarının mekanizmasını belirleyebilmek amacı ile öncelikli olarak, plazmit DNA deneyleri optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla DNA hasarının artan inkübasyon zamanı ile artan ilaç ve enzim konsantrasyonlarına bağlı olarak nasıl değıştiği saptanmıştır. Bu deneyler mitomisin C kullanılarak ta tekrar edilmiş ve her iki ilacın DNA hasar verici potansiyelleri mukayese edilmiştir. Son olarak sitokrom P450 redüktaz ve kofaktör NADPH varlığında idarubisinle indüklenen DNA hasarında hangi ürünlerin rol aldığını belirlemeye yönelik çalışmalar yürütülmüş ve DNA hasarının mekanizması aydınlatılmıştır.

## 2. YÖNTEMLER

### 2.1 Sığır Karaciğer Mikrozoamlarının Hazırlanması

Ankara-Sincan'daki bir mezbahanedeki 2 yaşında, Holstein cinsi, iyi beslenmiş, sağlıklı bir sığırın karaciğeri hayvan kesilir kesilmez alındı, safra kesesi, kese patlatılmadan karaciğerden kesilerek uzaklaştırıldı ve karaciğer dokusu buz içerisinde soğukta muhafaza edilerek laboratuvara getirildi. Karaciğer dokusu önce soğuk suda, sonra %1.15'lik KCl çözeltisi içerisinde fazla kanı uzaklaştırmak için yıkandıktan sonra, yağ ve bağ dokusundan temizlendi. Sığır karaciğer mikrozoamları laboratuvarımızda daha önce uygulanan yöntemle hazırlandı (Arınç ve Çelik, 2002). Bu yöntemle göre, fazla kan ve diğer dokulardan temizlenen karaciğer dokusu kağıt havlu üzerinde kurularak tartıldı ve makas ile küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra, her 1 gram dokuya 3 ml solüsyon eklenecek şekilde %1.15 KCl, 2 mM EDTA, pH 7.7, 0.25 mM  $\epsilon$ -amino kaproik asit ( $\epsilon$ -ACA) ve 0.1 mM fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) içeren homojenizasyon solüsyonu içinde "Commercial Waring Blender" kullanılarak homojenize edildi. Daha sonra homojenat, hücre çekirdeği, mitokondri ve hücre parçalarını uzaklaştırmak için 10800xg'de Sigma 3K30 tipi santrifüj (Sigma 3K30 refrigerated centrifuge, Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Germany) ve 12159 no'lu rotor kullanılarak 25 dakika santrifüj edildi. Endoplazmik retikulum ve diğer hücre komponentlerini içeren süpernatant kısım alınarak iki katlı sargı bezinden geçirildi. Mikrozoamlar, süpernatant solüsyonun T880 rotoru ile 45000 rpm (145215xg)'de 50 dakika (Sorvall-Kombi ultrasantrifuge, Du Pont Company, Newton, Connecticut, USA) santrifüj edilmesi ile çöktürüldü. Daha sonra, mikrozomal pellet %1.15 KCl ve 2 mM EDTA içeren solüsyon ile manuel olarak cam teflon homojenizatör kullanılarak süspansiyon edildi ve yeniden 145215xg'de 50 dakika ultrasantrifüjle çöktürüldü.

Daha sonra çöken mikrozoamlar %25 gliserin ve 1 mM EDTA içeren solüsyonla her bir gram sığır karaciğerine 0.5 ml solüsyon eklenecek şekilde manuel olarak teflon-cam homojenizatör kullanılarak yeniden süspansiyon edildi. Mikrozomal süspansiyonlar daha sonra küçük plastik şişelere ve ependorf tüplere bölündü, azotlandı ve enzim aktiviteleri tayini için sıvı azot içerisinde, sitokrom P450 redüktaz saflaştırılması içinse -86°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

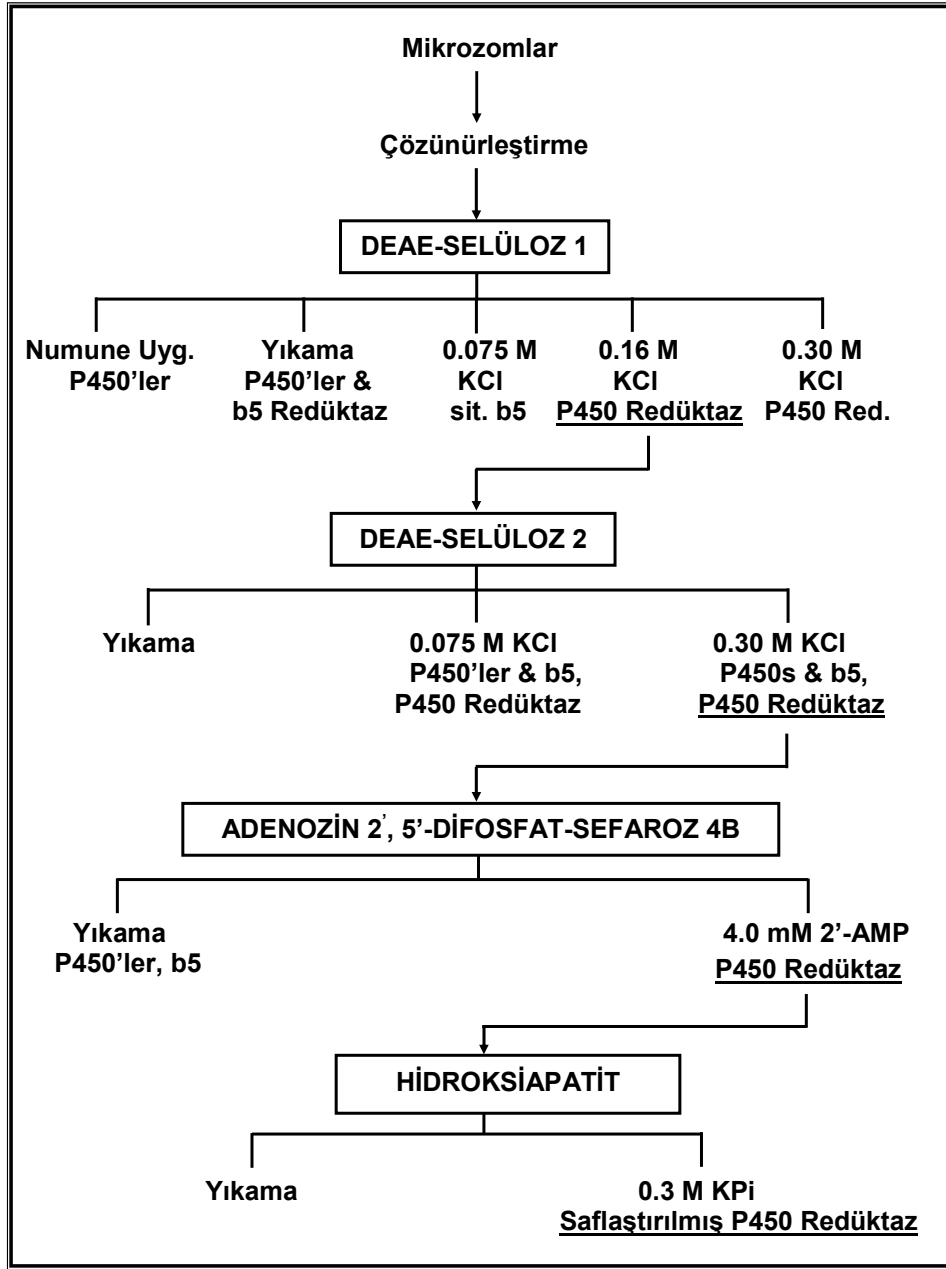
## 2.2 Sığır Karaciğer Mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Saflaştırılması

NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin sığır karaciğer dokusundan saflaştırılması işlemi iki kez tekrar edildi. İlk saflaştırma işlemi sonunda sitokrom P450 redüktaz enzimi sığır karaciğer dokusundan seyreltik olarak elde edildi. Seyreltik olarak elde edilen enzimle iyi bir antikor preparasyonu elde edilemeyeceği için saflaştırma işlemi birkez daha yapıldı. Bu nedenle, aşağıda ki kısımlarda ikinci saflaştırma işlemi sırasında uygulanan prosedür ayrıntılı olarak anlatılmaktadır. Sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz, deterjanla çözünürleştirilmiş mikrozomlardan, Arınç ve Çelik (2002) tarafından tarif edilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak, SDS-PAGE sonuçlarının gösterdiği üzere homojen bir şekilde saflaştırıldı. 3016 mg protein içeren sığır karaciğer mikrozomlarından NADPH-sitokrom P450 redüktazın saflaştırılması için uygulanan prosedür Şekil 2.1'de gösterilmektedir. Saflaştırma prosedürü, deterjanla çözünürleştirilmiş mikrozomların birbirini takip eden DEAE-selüloz kolonlarında anyon değişim kromatografisini, bu kolonlarda kısmen saflaştırılan redüktazın adenozin 2', 5'-difosfat-Sefaroz 4B kolonunda afinite kromatografisini ve son olarak redüktazın daha ileri seviyede saflaştırılması ve konsantre edilmesi için hidroksiapatit kolonunda adsorbsiyon kromatografisini gerektirdi. Sığır karaciğer P450 redüktazın saflaştırılmasında ki esas basamak, ilk olarak Yasukochi ve Master (1976) tarafından gösterilen adenozin 2', 5'-difosfat-Sefaroz 4B kolonunda ki afinite kromatografisidir.

### 2.2.1 Sığır Karaciğer Mikrozomlarının Çözünürleştirilmesi

Sığır karaciğer P450 redüktaz, mikrozomlardan deterjanlar Emulgen 913 ve sodyum kolat kullanılarak çözünürleştirildi. Mikrozomların çözünürleştirilmesi 5.5 ve 6.0 mg/ml arası mikrozomal protein, 10 mM potasyum fosfat pH 7.85 tamponu, %20 gliserol, 2 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.25 mM  $\epsilon$ -ACA, 0.5 mM PMSF, %1 Emulgen 913 ve %0.4 kolat içeren ortamlarda yapıldı. Sığır karaciğer mikrozomal sitokrom P450 redüktazın çözünürleştirilmesi için tipik bir preparasyon Tablo 2.1'de gösterilmektedir. İlk olarak mikrozom seyreltme tamponu (Tablo 2.1.'in üst kısmı) hazırlandı ve daha sonra mikrozomlar bu tampona ilave edilerek karıştırıldı. Sonra, deterjanlardan ilk olarak Emulgen 913 ve daha sonra kolat hazırlanan bu süspansiyona toplam 10 dakika içerisinde damla damla olacak şekilde eklendi ve solüsyon buz içerisinde 40 dakika daha manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Daha sonra deterjanlarla çözünürleştirilmiş mikrozomal süspansiyon T880 rotoru ile 45000 rpm (145215xg)'de 50 dakika (Sorvall-Kombi ultrasantrifuge, Du Pont Company, Newton, Connecticut, USA) döndürülerek çöktürüldü. Açık sarı süpernatant kısım alınarak pelet atıldı.





**Şekil 2.1** Sığır karaciğer mikrozomlarından NADPH-sitokrom P450 redüktazın saflaştırılması için uygulanan yöntem

### 2.2.2 İlk DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi

Ultrasantrifüj sonucu elde edilen açık sarı süpernatant daha önce tampon A (20 mM potasyum fosfat pH 7.85, %20 gliserol, 2 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.25 mM  $\epsilon$ -ACA, 0.25 mM PMSF, %0.5 Emulgen 913 ve %0.2 kolat) ile saatte 150 ml akış hızı ile dengelenen DEAE-

**Tablo 2.1** Sığır karaciğer mikrozomlarından NADPH-sitokrom P450 redüktazın çözünürleştirilmesi için tipik bir preparasyon

Stok Solüsyonlar	Alınacak Miktar (ml)	Son Konsantrasyon
1 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.85	0.7	10 mM
Gliserol*	12.6	%20
100 mM EDTA, pH 7.85**	1.28	2 mM
DTT	0.0011 g	0.1 mM
100 mM $\epsilon$ -ACA	0.175	0.25 mM
100 mM PMSF	0.35	0.5 mM
Distile su	33.1	—
Microzomlar (34.4 mg/ml)	12	5.90 mg/ml
%10 (v/v) Emulgen 913	7	%1.00
%10 (w/v) Na-kolat	2.8	%0.40
Son Hacim	70	—

\* Emulgen 913 solüsyonu ve mikrozomlar içerisinde bulunan miktar gözönüne alındı.

\*\* Mikrozomlarda bulunan miktar gözönüne alındı.

selüloz (3.0 x 40.0 cm) kolonuna uygulandı. Safılaştırma işlemi sırasında elde edilen fraksiyonların 418 nm'deki absorbans değerleri hem grubu içeren proteinlerin tayini için Shimadzu UV-1200 (Shimadzu Corporation, Analytical Instruments Division, Kyoto, Japan) spektrofotometre ile ölçüldü. Aynı zamanda fraksiyon toplayıcısına bağlı hassas bir spektrofotometre ile fraksiyonların 405 nm'deki absorbans değerleri sürekli olarak kaydedildi. Numune uygulamasını takiben kolon tampon A ile yoğun bir şekilde (yaklaşık 2650 ml) kolon akış hızı saatte yaklaşık 120 ml olacak şekilde yıkandı. Kolonun yıkanması sırasında sırasıyla sitokrom P450'ler ve NADH-sitokrom b5 redüktaz kolondan çıktı. Kolondan artık sitokrom b5 redüktazın çıkması bittiğinde ve fraksiyonların 418 nm'deki absorbans değerleri yaklaşık olarak sıfırlandığında, 0.075 M KCl tampon A içerisinde kolona uygulandı ve sitokrom b5 bariz bir tepe oluşturarak kolondan çıktı. Sitokrom P450 redüktazın az miktardaki sitokrom b5 ile kolondan ayrılması ise 0.16 M KCl tuzunun tampon A içerisine eklenmesi ile başarılıydı. Tampon A içerisindeki KCl tuz konsantrasyonunun 0.3 M'a çıkartılması ise geriye kalan sitokrom P450 redüktazın ve sitokrom b5'in kolondan çıkmasına neden oldu.

### 2.2.3 İkinci DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi

İlk DEAE-selüloz kolonundan 0.16 M KCl tuz içeren tampon A ile elde edilen ve birleştirilen P450 redüktaz fraksiyonları potasyum fosfat tamponu içermeyen tampon B (30 mM potasyum fosfat pH 7.85, %20 gliserol, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.25 mM  $\epsilon$ -ACA, 0.25 mM PMSF ve %0.5 Emulgen 913) ile 6.67 kez seyreltildi ve ikinci DEAE-selüloz kolonuna (2.6 x 8.0 cm) uygulandı. Numune uygulamasından sonra kolon tampon B ile yıkandı. Daha sonra 0.075 M KCl içeren tampon B'nin kolona uygulanması sitokrom b5'in, sitokrom P450'lerin ve bir miktar P450 redüktazın kolondan ayrılmasını sağladı. Esas P450 redüktaz tepesi ise tampon B içerisindeki KCl tuz konsantrasyonunun 0.3 M' a çıkartılarak kolona uygulanması ile oluştu. P450 redüktaz bu aşamada yaklaşık 5.6 kez konsantre edildi.

### 2.2.4 Adenozin 2', 5'-Difosfat-Sefaroz 4B (Afinite) Kolon Kromatografisi

İkinci DEAE-selüloz kolonundan 0.3 M KCl içeren tampon B ile elde edilen ve birleştirilen sitokrom P450 redüktaz fraksiyonları tampon C'ye karşı (50 mM potasyum fosfat pH 7.1, %20 gliserol, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.25 mM  $\epsilon$ -ACA, 0.25 mM PMSF ve %0.1 Emulgen 913) bir gece diyaliz edildi. Daha sonra diyaliz edilen numune daha önce tampon C ile dengelenen Adenozin 2', 5'-difosfat-Sefaroz 4B kolonuna (0.7 x 8.0 cm) uygulandı. Numune sitokrom P450 redüktazın kolona tutunması için oldukça düşük bir hızda (saatte 2.0 ml) kolona uygulandı. Kolon daha sonra yoğun bir şekilde yaklaşık 216 ml 0.2 M potasyum fosfat tamponu içeren tampon C ile (70 kolon hacmi) yıkandı. Numunenin kolona uygulanması ve kolonun yıkanması aşamalarında sitokrom P450 redüktaz neredeyse tüm sitokrom b5 ve sitokrom P450'lerden arındırıldı. Yıkama 418 nm'deki absorbans değerlerinin sıfırlanmasından sonra da devam etti. Bu aşamadan sonra kolon yaklaşık 4 kolon hacmi kadar 20 mM potasyum fosfat tamponu içeren tampon C ile yıkandı ve sitokrom P450 redüktaz kolondan 4.0 mM 2'AMP ve 20 mM potasyum fosfat içeren tampon C'nin kolona uygulanması ile çıktı.

### 2.2.5 Hidroksiapatit Kolon Kromatografisi

Sitokrom P450 redüktazın daha ileri seviyede saflaştırılması ve inhibitör 2'-AMP'den ve deterjan Emulgen 913'ten arındırılması hidroksiapatit kolon kromatografisi (1.5 x 2.1 cm) ile başarılıydı. Kolon önceden tampon D (20 mM potasyum fosfat pH 7.1, %20 gliserol, 0.1 mM

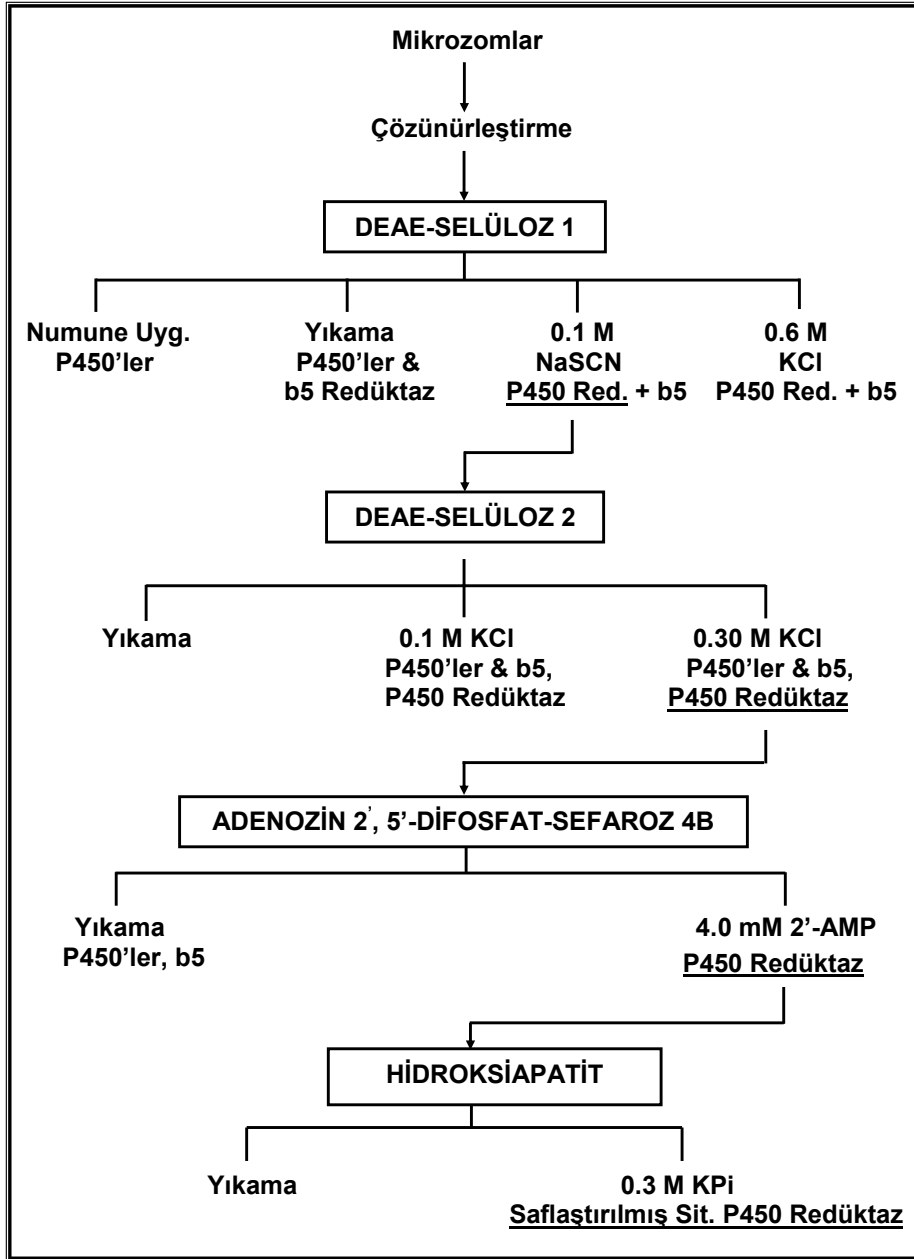
EDTA, 0.1 mM DTT, 0.1 mM  $\epsilon$ -ACA, 0.1 mM PMSF ve %0.25 kolat) ile dengelendi. Numune uygulanmasından sonra kolon Emulgen 913 miktarını gösteren 280 nm'deki absorbans değerlerinin sıfırlanmasına kadar tampon D ile yıkandı ve bunu takiben sitokrom P450 redüktaz kolondan konsantre bir şekilde 0.3 M potasyum fosfat içeren tampon D'nin kolona uygulanması ile alındı. Safılaştırılan sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz poliklonal antikor üretimi ve daha sonraki çalışmalar için 0.5 ml'lik alikotlar şeklinde sıvı azot içerisinde muhafaza edildi.

### **2.3 Fenobarbital Muamele Edilmiş Tavşan Karaciğer Mikrozoamlarından NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Safılaştırılması**

Tavşan karaciğer sitokrom P450 redüktazı sığır karaciğer P450 redüktaz ile mukayese çalışmalarında kullanılmak üzere fenobarbital ile muamele edilmiş karaciğer mikrozoamlarından oldukça yüksek bir oranda safılaştırıldı. Fenobarbital diğer birçok enzim (CYP2B4, epoksit hidrolaz) gibi sitokrom P450 redüktaz enziminin de tavşan karaciğerinde ki sentezini artırır, indükler. Fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozoamları laboratuvarımızda daha önce uygulanan yöntemle hazırlandı (Adalı ve Arınç, 1990). Sodyum-fenobarbital tavşanlara 7 gün süre ile içme suları içerisinde %0.1'lik konsantrasyonda (1mg/ml) verildi. Fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer dokusundan NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi, deterjanla çözünürleştirilmiş mikrozoamlardan, laboratuvarımızda P450 redüktazın değişik dokulardan ve türlerden safılaştırılması için geliştirilmiş halihazırda varolan prosedürlerde (İşcan ve Arınç, 1986; İşcan ve Arınç, 1988; Arınç ve Aydoğmuş, 1990; Şen ve Arınç, 1998; Arınç ve Çelik, 2002) bazı ufak değişiklikler yapılarak safılaştırıldı. Yaklaşık 2992 mg protein içeren fenobarbital muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozoamlarından sitokrom P450 redüktaz Şekil 2.2'de gösterilen prosedür uygulanarak safılaştırıldı.

### **2.4 Fenobarbital Muamele Edilmiş Tavşan Karaciğer Mikrozoamlarından Sitokrom P450B4 Safılaştırılması**

Sitokrom P450B4 izozimi (LM2), fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozoamlarından, safılaştırılmış sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazın biyokatalitik olarak aktif olup olmadığını belirlemek için yapılacak rekonstitüsyon deneylerinde kullanılmak üzere safılaştırıldı. Sitokrom P450B4'ün fenobarbital ile muamele



**Şekil 2.2** Fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozoamlarından NADPH-sitokrom P450 redüktazın saflaştırılması için uygulanan yöntem

edilmiş tavşan karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılması, Adalı ve Arınç (1990) tarafından tarif edilen ve laboratuvarımızda daha önce kullanılan yöntemde bazı ufak değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. Adalı ve Arınç tarafından tarif edilen yöntem Haugen ve Coon (1976) ve Wolf ve ark.'ları (1980) tarafından tarif edilen prosedürlerin birleştirilmesi ve birtakım değişiklikler yapılması ile oluşturulmuştur. Saflaştırma prosedürü deterjan ile

çözünürleştirilmiş ve polietilen glikol ile fraksiyonlandırılmış tavşan karaciğer mikrozomlarının DEAE-selüloz kolonunda iyon değişim kromatografisini, birinci hidroksiapatit kolonunda adsorbsiyon kromatografisini ve oktil-Sefaroz CL-4B kolonunda hidrofobik etkileşim kromatografisini gerektirdi. Oktil-Sefaroz CL-4B kolonundan elde edilen kısmen saflaştırılmış sitokrom P4502B4 daha sonra ikinci hidroksiapatit kolonuna uygulandı ve bu aşamayı DEAE-selüloz kolonunda iyon değişim kromatografisi takip etti. Son olarak, sitokrom P4502B4 üçüncü bir hidroksiapatit kolonunda daha da ileri seviyede saflaştırıldı ve konsantre edildi. Sitokrom P4502B4'ün fenobarbital ile muamale edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması için uygulanan yöntem Şekil 2.3'te özet olarak ana aşamaları ile verilmektedir. Tavşan karaciğer ve akciğer mikrozomal CYP2B4'ün benzer yapısal, biyokatalitik ve immünojenik özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir (daha fazla bilgi için Arınç, 1993'e bakınız).

## **2.5 Koyun Akciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Saflaştırılması**

Koyun akciğer sitokrom P450 redüktazı sığır karaciğer P450 redüktaz ile mukayese çalışmalarında kullanılmak üzere mikrozomlardan oldukça yüksek bir oranda saflaştırıldı. NADPH-sitokrom P450 redüktazın deterjanla çözünürleştirilmiş koyun akciğer mikrozomlarından saflaştırılması, laboratuvarımızda daha önce NADPH-sitokrom P450 redüktazın koyun akciğer dokusundan saflaştırılması için geliştirilmiş mevcut prosedürlerde (İşcan ve Arınç, 1986 ve 1988; Arınç ve Aydoğmuş, 1990) bazı ufak değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. Koyun akciğer sitokrom P450 redüktazın saflaştırılması işleminde sığır karaciğer ve tavşan karaciğer P450 redüktazların saflaştırılması prosedürlerinde uygulanan aynı ana basamaklar (bakınız Şekil 2.1 ve Şekil 2.2) kullanıldı.

## **2.6 SDS-PAGE Elektrofrez**

Sığır karaciğer, tavşan karaciğer ve koyun akciğer mikrozomlarından saflaştırılan sitokrom P450 redüktaz ve tavşan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan sitokrom P4502B4 enzimlerinin saflık dereceleri Laemmli (1970) metodu ile belirlendi. Sığır karaciğer, tavşan karaciğer ve koyun akciğer dokularından hazırlanan mikrozomlar ve saflaştırılmış fraksiyonlar SDS-poliakrilamid jel elektrofrezinde sabit akım altında yürütülerek proteinlerin birbirlerinden ayrılması sağlandı. Elektrofrez tamamlandığında jel boyama solüsyonu ile boyanarak protein bandlarının görülmesi sağlandı.



## 2.7 Analitik Yöntemler

### 2.7.1 Protein Tayini

Mikrozomlardaki ve saflaştırılmış fraksiyonlardaki protein miktarı, Lowry ve arkadaşlarının (1951) tarif ettiği yöntemle tayin edildi. Uygun miktarlardaki numuneler belirli oranlarda seyreltilerek, standart protein miktarının lineer olduğu aralığa getirildi. Daha sonra uygun oranlarda seyreltilmiş numunelerden 0.1 ml, 0.25 ml ve 0.5 ml'lik alikotlar alındı. Test tüpü içerisindeki alikotların hacmi, 0.5 ml'lik son hacime distile su ile tamamlandı. Bütün tüplere 2.5 ml Lowry alkalın-bakır solüsyonu (%2 bakır sülfat, %2 sodyum potasyum tartarat ve 0.1 N NaOH içeren %20 sodyum karbonat solüsyonu, 1:1:100 oranında yazılan sırada hazırlandı) eklendi, tüp içerikleri karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra, herbir tüpe 0.25 ml 1 N Folin solüsyonu eklenerek tüp içerikleri vorteks yardımı ile hemen karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen tüplerde oluşan renk 660 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü. Son olarak, beş değişik konsantrasyonda (20, 50, 100, 150 ve 200 µg BSA/ml distile su) sığır (bovine) serum albumin (BSA) proteini kullanılarak, numunelerin bilinmeyen protein konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için bir standart eğri oluşturuldu.

### 2.7.2 Sitokrom P450 Konsantrasyonu Tayini

Mikrozomlarda ve saflaştırılmış fraksiyonlarda ki sitokrom P450 konsantrasyonu, Omura ve Sato metodu (1964) ile Hitachi U-2800 Çift Işık Yollu Spektrofotometrede ışık yolu 1 cm olan küvetler kullanılarak tayin edildi. Saflaştırma prosedürünün değişik aşamalarında elde edilen fraksiyonlardan ve saflaştırılmış numunelerden alınan alikotlar (0.1 – 2.0 ml) test tüp içerisine konuldu ve 6.0 ml'lik son hacime sitokrom P450 dilüsyon tamponu (%30 gliserin ve 1 mM EDTA içeren 0.1 M potasyum fosfat tamponu, pH. 7.5) ile seyreltildi. Numune olarak mikrozomlar kullanıldığında ise 0.2 – 0.5 ml'lik alikotlar 5.4 ml'ye sitokrom P450 dilüsyon tamponu ile seyreltildi ve daha sonra %10'luk stok solüsyondan 0.6 ml kolat %1'lik son konsantrasyonu elde etmek için seyreltilmiş mikrozomlara eklendi. Tüp içerikleri vorteks yardımı ile çok iyi karıştırıldı. Seyreltilen numune eşit olarak iki küvete bölündü ve bu küvetler spektrofotometrenin numune ve referans bölmelerine yerleştirildi ve taban çizgisi kayıt edildi. Her iki küvetteki seyreltilmiş numuneler sodyum ditiyonit ile indirgendikten sonra karbon monoksit fark spektrumları alındı. Sitokrom P450 miktarı, 400 nm ile 600 nm arasında



çizilecek spektrumda, 490 nm'de okunacak absorbansın (O.D) 450 nm'de okunacak absorbanstan (O.D) çıkarılması ile elde edilen  $\Delta O.D$ 'den ve ekstinksiyon katsayısı olarak 91  $mM^{-1}cm^{-1}$  alınmasıyla hesaplandı.

### 2.7.3 NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesi Tayini

NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi, Masters ve arkadaşlarının (1967) tarif ettikleri yöntemde bazı değişiklikler yapılarak tayin edildi. Enzim aktivitesi 0.3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.7 içeren ortamda oda sıcaklığında (25°C) spektrofotometrik olarak ölçüldü. Yöntem, NADPH bulunan bir ortamda sitokrom c'nin 550 nm dalga boyundaki indirgenme hızının ölçülmesine bağlıdır. Tipik bir reaksiyon ortamı 0.7 ml sitokrom c (son konsantrasyon: 0.775 ml reaksiyon hacmi içinde 80.2 nmol; stok: 0.3 M potasyum fosfat tamponu içinde 1.1 mg sitokrom c), 0.025 ml NADPH (son konsantrasyon: 0.775 ml reaksiyon hacmi içinde 127.7 nmol; stok: 1 ml soğuk distile su içinde 3.3 mg NADPH) ve uygun miktarda sitokrom P450 redüktaz numunesi (0.01-0.05 ml) içerdi. Reaksiyon, NADPH kofaktörünün reaksiyon karışımına eklenmesiyle başlatıldı ve enzim aktivitesi iki dakika Hitachi U-2800 Çift Işık Yollu Spektrofotometrede 550 nm'de 1.0 cm'lik ışık yolu olan küvetler kullanılarak takip edildi. Enzim aktivitesi ekstinksiyon katsayısı 19.6  $mM^{-1}cm^{-1}$  alınarak hesaplandı (Yonetani, 1965). Bir ünite aktivite, bir dakikada 1 mikromol sitokrom c'yi yukarıda anlatılan şartlarda indirgeyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

### 2.7.4 Sitokrom b5 Konsantrasyonu Tayini

Sitokrom b5 konsantrasyonu Nishibiyashi ve Sato (1968) tarafından tarif edilen yöntemle göre belirlendi. 1 mM EDTA içeren pH'sı 7.5 olan 0.1 M potasyum fosfat tamponu içinde seyreltilen numuneler iki eşit parçaya bölündü ve numune küvetindeki numune bir miktar sodyum ditiyonit ile indirgindikten sonra sitokrom b5'in ditiyonit-indirgenmiş eksi oksitlenmiş fark spektrumu ışık yolu 1 cm olan küvetler kullanılarak kaydedildi. Sitokrom b5 miktarı, 400 nm ile 500 nm arasında çizilecek spektrumda, 424 nm'de okunacak absorbansın (O.D) 410 nm'de okunacak absorbanstan (O.D) çıkarılması ile elde edilen  $\Delta O.D$ 'den ve ekstinksiyon katsayısı olarak 185  $mM^{-1}cm^{-1}$  alınmasıyla hesaplandı.

### **2.7.5 NADH-Sitokrom b5 Redüktaz Aktivitesi Tayini**

Sitokrom b5 redüktaz aktivitesi Strittmatter ve Velick (1957) metodu ile NADH bulunan bir ortamda potasyum ferrisiyanitin 420 nm dalga boyundaki indirgenme hızının spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tayin edildi. Enzim aktivitesi ekstinksiyon katsayısı  $1.02 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  alınarak hesaplandı.

### **2.7.6 Saflaştırılmış NADPH-Sitokrom P450 Redüktazların Toplam Flavin İçeriğinin Tayini**

Saflaştırılmış sitokrom P450 redüktazların konsantrasyonları, Cerletti ve Siliprandi (1958) tarafından tarif edilen metoda göre, saflaştırılmış enzimlerin eşit miktarlarda FMN ve FAD içerdiği farzedilerek, enzimlerin toplam flavin içeriklerinin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tayin edildi. Toplam flavin içeriği, 450 nm'de okunacak absorbanın (O.D) 600 nm'de okunacak absorbanstan (O.D) çıkarılması ile elde edilen  $\Delta\text{O.D}$ 'den ve ekstinksiyon katsayısı olarak  $11.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  alınmasıyla hesaplandı.

### **2.7.7 Emulgen 913 ve Kolat Deterjanlarının Birlikte Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesine Olan Aktivatör Etkisinin Tayini**

NADPH-sitokrom P450 redüktazın sığır karaciğer dokusundan saflaştırılabilmesi için enzimin öncelikle mikrozomlardan çözünürleştirilmesi gerekmektedir. Çözünürleştirme işlemi ise hem Emulgen 913 hem de kolat deterjanı bulunan ortamda gerçekleştirilmektedir. Bu deterjanların farklı P450 redüktazların aktivitesine olan etkileri laboratuvarımızda daha önce çalışılmıştır. Bu çalışmada ise sığır karaciğer P450 redüktaz aktivitesinin, değişik konsantrasyonlarda Emulgen 913 ve kolat karışımlarından benzer şekilde etkilenip etkilenmediği incelenmiştir. Emulgen 913 ve kolat deterjanlarının birlikte sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesine olan aktivatör etkisi, %1 Emulgen 913 ve artan miktarlarda ki kolat konsantrasyonlarında belirlendi. Enzim aktivitesi 0.3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.7 içeren ortamda oda sıcaklığında ( $25^{\circ}\text{C}$ ) spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tipik bir reaksiyon ortamı 0.7 ml sitokrom c (son konsantrasyon: 0.775 ml reaksiyon hacmi içinde 80.2 nmol; stok: 0.3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.7 içinde 1.1 mg sitokrom c), 0.025 ml NADPH (son konsantrasyon: 0.775 ml reaksiyon hacmi içinde 127.7 nmol; stok: 1 ml soğuk distile su içinde 3.3 mg NADPH), uygun miktarda sığır karaciğer mikrozomları veya

seyreltilmiş saf sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz numunesi (0.01-0.05 ml) ve belirtilen konsantrasyonlarda Emulgen 913 ve kolat içerdi. Sığır karaciğer mikrozomları ve saf enzim reaksiyon ortamına konulmadan önce 0.3 M potasyum fosfat tamponu (pH 7.7) ve %20 gliserol içeren çözelti ile uygun oranlarda seyreltildi. Reaksiyon, NADPH kofaktörünün reaksiyon karışımına konulmasıyla başlatıldı ve enzim aktivitesi iki dakika Hitachi U-2800 Çift Işık Yollu Spektrofotometrede 550 nm'de 1.0 cm'lik ışık yolu olan küvetler kullanılarak takip edildi. Enzim aktiviteleri kısım 2.7.3'te tarif edildiği şekilde hesaplandı.

### **2.7.8 Çeşitli Konsantrasyonlarda ki Triton X-100 Deterjanının Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesine Olan Aktivatör Etkisinin Tayini**

Triton X-100 deterjanının sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesine olan aktivatör etkisi, %0.125, %0.5 ve %1.0 deterjan konsantrasyonlarında incelendi. Enzim aktivitesi 0.3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.7 içeren ortamda oda sıcaklığında (25°C) spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tipik bir reaksiyon ortamı 0.7 ml sitokrom c (son konsantrasyon: 0.775 ml reaksiyon hacmi içinde 80.2 nmol; stok: 0.3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.7 içinde 1.1 mg sitokrom c), 0.025 ml NADPH (son konsantrasyon: 0.775 ml reaksiyon hacmi içinde 127.7 nmol; stok: 1 ml soğuk distile su içinde 3.3 mg NADPH), uygun miktarda sığır karaciğer mikrozomları (0.01-0.05 ml) ve yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda Triton X-100 içerdi. Sığır karaciğer mikrozomları reaksiyon ortamına konulmadan önce 0.3 M potasyum fosfat tamponu (pH 7.7) ve %20 gliserol içeren çözelti ile uygun oranlarda seyreltildi. Reaksiyon, NADPH kofaktörünün reaksiyon karışımına konulmasıyla başlatıldı ve enzim aktivitesi iki dakika Hitachi U-2800 Çift Işık Yollu Spektrofotometrede 550 nm'de 1.0 cm'lik ışık yolu olan küvetler kullanılarak takip edildi. Enzim aktiviteleri kısım 2.7.3'te tarif edildiği şekilde hesaplandı.

### **2.7.9 Rekonstitüsyon Çalışmaları İçin Fosfatidilkolin Dilaurol Vesiküllerinin Hazırlanması**

Fosfatidilkolin dilaurol miselleri, rekonstitüsyon çalışmalarında aşağıda tarif edildiği üzere bir lipit zarı ortamı yaratmak için hazırlandı. Tipik bir preparasyonda, lipit vesikülleri 2.0 mg fosfatidilkolin dilaurol'ün 1.0 ml %0.05 kolat içerisinde süspanse edilmesi ile hazırlandı. Lipit misellerini elde etmek için tüp içerisindeki süspanسیون bir buz kabı içerisinde uygun bir mikro ucu olan bir sonik "dismembrator" (Fisher Scientific Artec Systems Corporation,

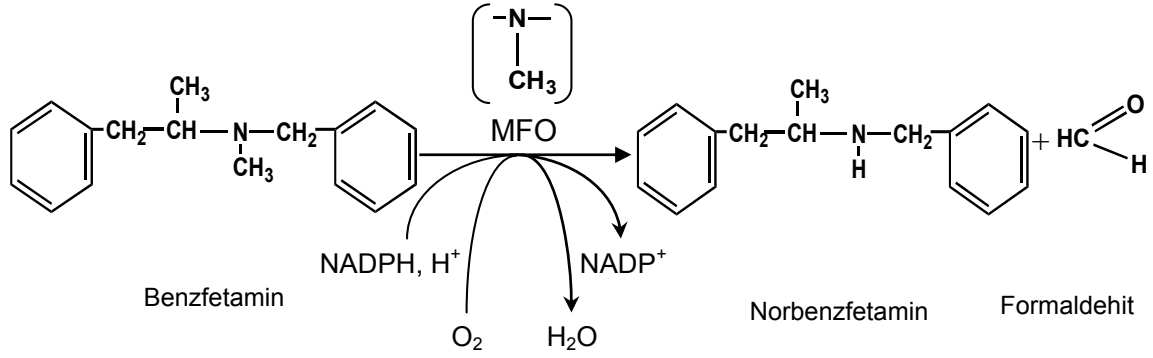
Farmingdale, New York, USA) ile 50 watt'lık çıkışta, 20 saniyelik periyotlarda ve sonikasyonlar arasında 15 saniye olacak şekilde beş kez sonikasyona maruz bırakıldı.

### **2.7.10 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazı ve Tavşan Karaciğer CYP2B4'ü İçeren Yeniden Oluşturulmuş ("Reconstituted") Sistemlerde ki Benzfetamin N-Demetilasyon Aktivitesinin Tayini**

Saflaştırılmış sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazın biyokatalitik olarak aktif olduğu, saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz, tavşan karaciğer CYP2B4 ve sentetik lipit fosfatidilkolin dilaurol içeren test tüplerinde ki benzfetamin N-demetilasyon reaksiyonu aktivitesinin ölçülmesi ile belirlendi. Yöntem, biyokatalitik olarak aktif sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazın kofaktör NADPH'den aldığı elektronları tavşan karaciğer sitokrom P4502B4'e transfer etmesi ve böylece sitokrom P4502B4'ün benzfetamin N-demetilasyon reaksiyonunu kataliz etmesine dayanmaktadır (Şekil 2.4). Bu amaçla, uygun miktarlardaki saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz ve tavşan karaciğer CYP2B4 izozimi, sentetik lipit fosfatidilkolin dilaurol içeren ortamda biraraya getirildi ve 20 dakika oda sıcaklığında arasına karıştırılarak inkübe edildi. Benzfetamin N-demetilasyon aktivitesi, reaksiyon sonucu oluşan formaldehitin Cochin ve Axelrod (1959) tarafından uyarlanan Nash (1953) yöntemi ile kolorimetrik olarak tayin edilmesiyle saptandı.

### **2.7.11 Ağır Metallerin Saf Sığır Karaciğer Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesine Etkisi**

Saf sığır sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine ağır metallerin etkisine değişik konsantrasyonlarda kadmiyum, nikel ve kurşun kullanılarak kısım 2.7.3'te tarif edilen spektrofotometrik yöntemde bazı değişiklikler yapılarak bakıldı. Genelde sitokrom P450 redüktaz aktivitesi fosfat tamponunda ölçülmektedir. Fakat metal inhibisyon çalışmaları yapılırken kadmiyum ve nikel gibi bazı metallerin fosfat tuzları oluşturarak bu tampon içinde çöktüğü gözlemlendi. Bu nedenle fosfat tamponu HEPES ile değiştirildi. Enzim aktivitesi 0.3 M HEPES tamponu pH 7.7 içeren ortamda oda sıcaklığında (25°C) spektrofotometrik olarak tayin edildi. Tipik bir reaksiyon ortamı 0.3 M HEPES, pH 7.7, 80 nmol sitokrom c, 130 nmol NADPH ve uygun miktarda saf protein konularak 0.8 ml son hacimde hazırlandı. Saf enzim 0.3 M HEPES (pH 7.7) ve %20 gliserol içeren çözelti ile 1:50 seyreltildi. NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesinin 4°C'de 10 saat sabit olduğu bulundu. Saf sitokrom P450 redüktaz enzimi ve 0.3 M HEPES tamponunun bulunduğu reaksiyon ortamına değişik

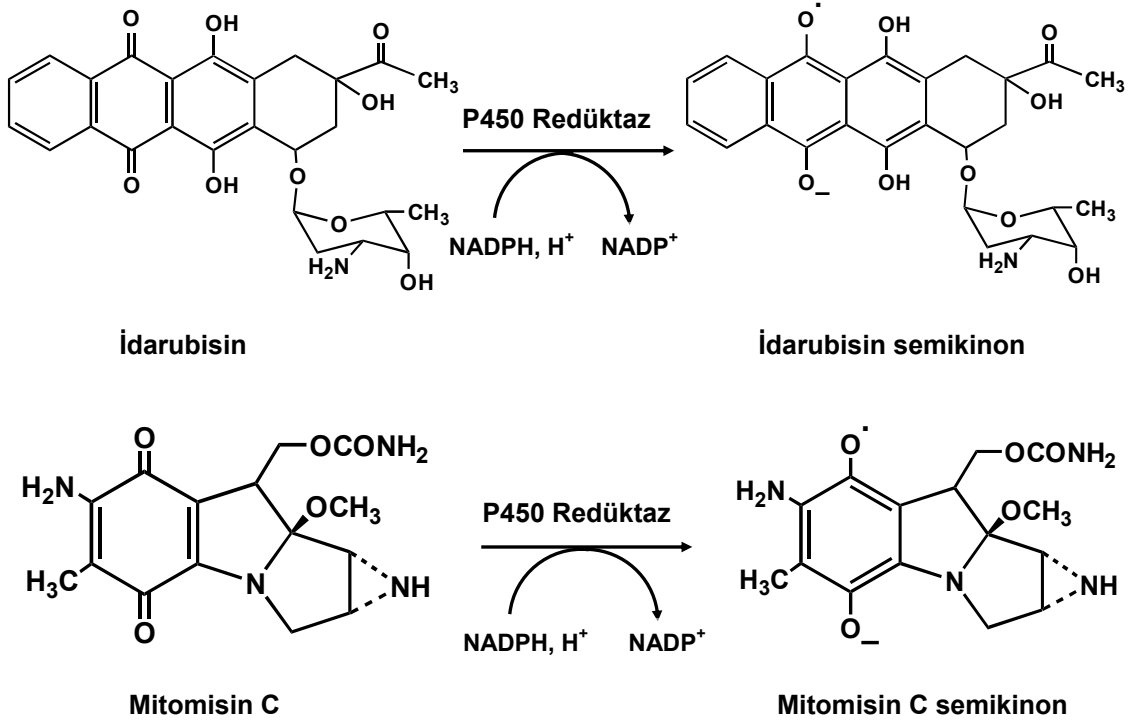


**Şekil 2.4** Sitokrom P450'ye bağlı monooksijenazlar tarafından katalizlenen benzfetamin N-demetilasyon reaksiyonu

konsantrasyonlarda metaller eklendi. Metal reaksiyon ortamına eklendikten sonra reaksiyon ortamı karıştırıldı ve hemen sitokrom c eklendi. Son olarak reaksiyon NADPH'in eklenmesi ile başlatıldı. Enzim aktivitesi iki dakika oda ısısında Hitachi U-2800 Çift Işık Yollu Spektrofotometrede ölçüldü. Enzim aktiviteleri kısım 2.7.3'te tarif edildiği şekilde hesaplandı ve metallerin IC<sub>50</sub> değerleri bulundu. İnhibisyona sebep olan metallerin inhibisyon mekanizması farklı substrat konsantrasyonlarında ve metal iyonları varlığında ölçülen aktivite değerlerinin Dixon grafiğine uyarlanması ile belirlendi.

### 2.7.12 Saflaştırılmış NADPH-Sitokrom P450 Redüktazlar Tarafından Mitomisin C ve İdarubisin İndirgenmesinin NADPH Oksidasyonu İle Ölçülmesi

Saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz ile tavşan karaciğer ve koyun akciğer sitokrom P450 redüktazları tarafından idarubisin ve mitomisin C indirgenmelerinin ilk hızları Goeptar ve ark.'ları (1993) ve Kumagai ve ark.'ları (1997) tarafından tarif edilen yöntemler temel alınarak aerobik şartlar altında NADPH kofaktör oksidasyonunun spektrofotometrik yöntemle 340 nm'de okunması ile tespit edildi. Sitokrom P450 redüktaz tarafından antikanser ilaçlar ve kofaktör NADPH varlığında katalizlenen reaksiyonlar Şekil 2.5'te gösterilmektedir. Tüm reaksiyonlar 25°C'de aerobik şartlar altında gerçekleştirildi. 1.0 ml'lik reaksiyon karışımları 0.3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.7, 0.1 mM EDTA, pH 7.7, mitomisin C (25 µM, distile su içinde çözündürüldü) veya idarubisin (25 µM, distile su içinde çözündürüldü), 0.1 mM kofaktör NADPH ve uygun miktarlarda saflaştırılmış P450 redüktaz



**Şekil 2.5** NADPH-sitokrom P450 redüktazla-katalizlenen idarubisin ve mitomisin C'nin kofaktör NADPH varlığında indirgenmesi

enzimleri içerdi. İlaçların indirgenmesi NADPH tüketiminin Hitachi U-2800 Çift Işık Yollu Spektrofotometrede 340 nm'de takip edilmesi ile ölçüldü. Enzim aktivitesi ekstinksiyon katsayısı  $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  alınarak hesaplandı. İlaç veya enzim içermeyen kontrol inkübasyonları da aynı şartlar altında gerçekleştirildi. İlaç içermeyen kontrol inkübasyonlarında ölçülen ve enzim tarafından katalizlenen çok düşük seviyedeki NADPH tüketimleri enzimatik reaksiyon hızlarından çıkartılarak reaksiyon hızları düzeltildi.

## 2.8 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazına Karşı Poliklonal Antikorlar Üretilmesi

Saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktazına karşı ilk denemede üretilen poliklonal antikorların titresi çok düşük bulundu. Bunun nedeni ilk saflaştırma işlemi sonunda elde edilen sığır karaciğer sitokom P450 redüktaz enzim preparasyonunun oldukça seyreltik olması idi. Bu nedenle, saflaştırma işlemi kısım 2.2'de anlatıldığı üzere ikinci kez tekrar edildi

ve saflaştırılan enzime karşı ikinci kez antikor elde edildi. Bu antikor preparasyonunun titresinin, özgüllüğünün ve bağlanma afinitesinin ise ilk elde edilen antikor preparasyonuna göre daha iyi olduğu görüldü.

Poliklonal antikor eldesi için 2,5 aylık Yeni Zelanda cinsi, beyaz, dişi tavşanlar 9 gün kadar hayvan evindeki kafeslerinde ortama adapte olmaları için bekletildi. Bu adaptasyon sürecinden sonra 216 µg saflaştırılmış sığır karaciğer redüktazı 0.5 ml "Freund's Complete Adjuvant" içerisinde süspansiyon edilerek tavşanın 4 ayrı yerine sırt kısmından subkutan olarak enjekte edildi. İlk enjeksiyondan 3 hafta sonra, 117 µg saf enzim bu sefer "Freund's Incomplete Adjuvant" içerisinde süspansiyon edilerek yine aynı yöntemle tavşana enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan 13 gün sonra hayvanların kulaklarından alınan kandan elde edilen serum kullanılarak antikor oluşup oluşmadığı Western-blot analizi ile test edildi. Hayvan vücudunda antikor oluştuğu bu teknik ile tespit edildikten sonra, ikinci enjeksiyonu takiben 35. günün sonunda tavşanlar anestezi altında dekapitasyonla öldürülüp elde edilen tüm kandan serum izole edildi. Elde edilen serum daha sonraki çalışmalar için antikor kaynağı olarak kullanıldı. Bu çalışmada kontrol tavşanına yalnız izotonik NaCl (% 0.9) çözeltisi verildi.

## **2.9 Saflaştırılmış Koyun Akciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazına Karşı Poliklonal Antikorlar Üretilmesi**

Saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazına karşı üretilen antikorlara ek olarak, proje kapsamındaki çalışmalarda kullanılmak üzere ayrıca saflaştırılmış koyun akciğer P450 redüktazına karşı da poliklonal antikorlar üretildi. Laboratuvarımızda daha önce saflaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktazına karşı poliklonal antikorlar başarılı bir şekilde üretilmiş olup (Çelik, 2002), proje kapsamındaki çalışmalarda kullanılmak üzere bu işlem aynı yöntemle bir kez daha tekrar edilmiştir. 2.5 aylık Yeni Zelanda cinsi dişi tavşanlar 10 gün kadar bölümümüzde bulunan hayvan evindeki kafeslerinde ortama adapte olmaları için bekletildikten sonra 200 µg saf koyun akciğer redüktazı 0.5 ml "Freund's Complete Adjuvant" içerisinde süspansiyon edilerek tavşanın 4 ayrı yerine sırt kısmından subkutan enjekte edildi. İlk enjeksiyondan 3 hafta sonra, 100 µg saf enzim bu sefer "Freund's Incomplete Adjuvant" içerisinde süspansiyon edildikten sonra yine aynı yöntemle tavşana enjekte edildi. İkinci enjeksiyonu takiben 2. haftanın sonunda hayvanların kulaklarından kan alınarak antikor oluşup oluşmadığı Western-blot analizi ile test edildi. Hayvan vücudunda antikor oluştuğu bu teknik ile tespit edildikten sonra, ikinci enjeksiyondan yaklaşık bir ay sonra tavşanlar anestezi altında dekapitasyonla öldürülüp elde edilen tüm kandan serum

izole edildi. Elde edilen serum daha sonraki çalışmalar için antikor kaynağı olarak kullanıldı. Yalnız % 0.9 NaCl verilen tavşandan elde edilen serum ise kontrol olarak kullanıldı.

## 2.10 Western-Blot Analizi

Üretilen antikorların titresi, bağlanma afinitesi ve spesifitesi Western-blot tekniği ile tayin edildi. Western-blot analizi Towbin ve ark.'ları (1979) tarafından tarif edilen yöntem kullanılarak yapıldı. Western-blot analizi antijenlerin nitroselüloz kağıdı üzerinde boyanması temeline dayalıdır. Bunun için önce mikrozomal proteinler veya saf enzimler SDS-poliakrilamit jel elektroforezine uygulandı, daha sonra elektroforezde birbirlerinden ayrılan proteinler (mikrozomlar için) Trans-blot elektroforetik transfer hücresi kullanılarak nitroselüloz kağıdına geçirildi. İmmünokimyasal yöntemle boyama, proteinleri absorbe etmiş olan nitroselüloz kağıtların önce birincil antikorlar (anti-sığır karaciğer veya anti-koyun akciğer sitokrom P450 redüktaz IgG ) ile inkübasyonu daha sonra alkalın fosfataz enzimi bağlanmış ikinci bir antikor (Keçi anti-tavşan IgG) inkübasyonu ile yapıldı. Alkalın fosfataz aktivitesinin tayini Ey ve Ashman (1986) tarafından tarif edilen yöntem kullanılarak yapıldı.

## 2.11 Plazmid DNA Zincir Kırılım Deneyleri

Saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz ile birlikte tavşan karaciğer ve koyun akciğer sitokrom P450 redüktazlarının biyoredüktif antikanser ilaçlar idarubisin ve mitomisin C biyoaktivasyonundaki rolleri, aktivasyon sonucu oluşabilecek reaktif oksijen türlerinin plazmid DNA'da oluşturduğu tek zincir kırılımına (hasara) bakılarak belirlendi. Bu amaçla, hücresiz ("cell-free") agaroz jel metodu kullanıldı. Bu metod, çift zincirli süperkatlı plazmid DNA'nın (SC, Form I), tek zincir kırılmaları ile oluşan ve agaroz jel elektroforezinde geciken migrasyon gösteren açık halkasal forma (OC, Form II) dönüşmesine dayanmaktadır. *In vitro* pBR322 plazmid DNA deneyleri daha önce başkaları tarafından tarif edilen yöntemlere (Walton ve ark.'ları, 1991; Kukielka ve Cederbaum, 1994; Shen ve Hollenberg, 1994; Garner ve ark.'ları, 1999) benzer şekilde ve birtakım değişikliklerle (bakınız Çelik ve Arınç, 2008) uygulandı. Kısaca, süperkatlı pBR322 plazmid DNA (1.0 µg), uygun miktarda saflaştırılmış sitokrom P450 redüktaz, idarubisin veya mitomisin C (100 µM), NADPH (2 mM) ve 100 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7.4 içeren 60 µl'lik reaksiyon karışımında aerobik şartlar altında 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İdarubisin ve mitomisin C ışığa duyarlı olduğu için ilaç solüsyonları koyu kahverengi şişeler içerisinde hazırlandı. Hiç bir işleme maruz



birakılmamış yalnız pBR322 plazmid DNA'sı ve reaksiyon bileşenlerinden yalnız birinin dahil edilmediği reaksiyon karışımları her bir jel elektroforezi koşusunda kontrol amaçlı kullanıldı. Ayrıca, hidroksil radikal (OH<sup>•</sup>)-indüklenmiş DNA hasarı oluşturmak için 10 µM ferrik klorür, 20 µM EDTA ve 1 mM askorbat içeren OH<sup>•</sup> oluşturan bir sistem kullanıldı (Kumagai ve ark.'ları, 1997). Reaksiyon karışımlarının azaltılmış ışık altında inkübasyonundan sonra reaksiyon inkübasyonlarından alınan 20 µl alikotlar 5 µl stop tamponu (%0.25 bromofenol mavisi, %0.5 SDS, %60 gliserol ve 5 mM EDTA) ile karıştırılarak enzim reaksiyonu durduruldu ve numuneler daha sonra Tris-borat tamponu (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA) içinde son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olan ethidium bromür içeren %1'lik agaroz jeline uygulandı. Elektroforez sonucu ayırışımı sağlanan DNA bandları bilgisayara bağlı jel görüntüleme sistemi (Infinity 3000-CN-3000 darkroom) (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee Cedex 1, France) ve "Infinity-Capt Version 12.9" yazılımı ile UV ışığı altında görüntülendi ve fotoğrafı çekildi. Oluşan DNA hasarının densitometrik analizi "Scion Image Version Beta 4.0.2" yazılımı kullanılarak yapıldı. Densitometrik analiz hesaplamalarında süperkatlı plazmid DNA (SC)'nin açık halkasal forma göre daha az ethidium bromür bağlanma kapasitesi olduğu için ölçülen SC band yoğunluklarına 1.22'lik bir düzeltme faktörü uygulandı (Fisher ve Gutierrez, 1991).

DNA hasarı, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanan %OC DNA olarak ifade edildi (Ashikaga ve ark.'ları, 2000): % OC-DNA = [*açık halkasal (OC) DNA / toplam DNA*] x 100. Reaktif oksijen süpürücülerinin OH<sup>•</sup>, idarubisin ve mitomisin C ile indüklenen DNA tek zincir kırıklarına karşı koruyucu etkileri koruma (%) olarak ifade edildi ve Ashikaga ve ark.'ları (2000) tarafından tarif edilen metod kullanılarak aşağıda gösterilen şekilde hesaplandı:

$$DNA \text{ hasarı (\%)} = \frac{\% OC-DNA \text{ (süpürücü varlığında)} - \% OC-DNA \text{ (muamele edilmemiş)}^a}{\% OC-DNA \text{ (süpürücü yokluğunda)}^b - \% OC-DNA \text{ (muamele edilmemiş)}} \times 100$$

<sup>a</sup> Hiçbir muamele edilmemiş yalnız pBR322 DNA için %OC-DNA (kontrol).

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Sığır Karaciğer Mikrozomal NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Saflaştırılması

Proje kapsamında NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi sığır karaciğer dokusundan metod üzerinde yapılan birtakım değişiklikler sonucu daha önce elde edilenden (Arınç ve Çelik, 2002) çok daha fazla miktarda ve daha yüksek bir özgül aktivite ile preparatif ölçekte elde edildi. Enzim deterjanla çözünürleştirilmiş sığır karaciğer mikrozomlarından yaklaşık 262 kez ve %10.9'luk bir verimle homojen bir şekilde saflaştırıldı. Enzimin sığır karaciğerinden saflaştırılmasında elde edilen sonuçlar Tablo 3.1'de verilmektedir.

Yöntemler kısmında anlatıldığı üzere yaklaşık 449 ünite sitokrom P450 redüktaz içeren 2879 mg deterjanlarla çözünürleştirilmiş sığır karaciğer mikrozomları ilk DEAE-selüloz kolonuna uygulandı. İlk DEAE-selüloz kolon kromatografisinin elüsyon profili Şekil 3.1'de gösterilmektedir. Numune uygulaması sırasında bazı sitokrom P450'lerin kolondan çıktığı görüldü. Numune uygulamasını takiben kolon yoğun olarak yaklaşık 2650 ml tampon A ile kolondan çıkan fraksiyonların 418 nm'deki absorbans değerleri sıfır oluncaya ve NADH-sitokrom b5 redüktazın kolondan çıkması bitene kadar yıkandı. Yıkama sırasında öncelikle sitokrom P450'ler daha sonra ise NADH-sitokrom b5 redüktaz kolondan ayrıldı. Kolondan NADH-sitokrom b5 redüktazın çıkması bittiği zaman 0.075 M KCl tuzu tampon A içerisinde kolona uygulandı ve sitokrom b5 Şekil 3.1'de görüldüğü üzere bariz bir tepe oluşturarak kolondan ayrıldı. Sitokrom P450 redüktazın bir miktar sitokrom b5 ile kolondan ayrılması ise tampon A içerisindeki KCl tuz konsantrasyonunun 0.16 M'a çıkartılması ile sağlandı. KCl tuz konsantrasyonunun daha da artırılarak 0.3 M'a çıkartılması ise geriye kalan sitokrom P450 redüktazın ve sitokrom b5'in kolondan çıkmasına neden oldu. Elüsyon profilinde görüldüğü üzere yüksek miktarda sitokrom P450 redüktaz aktivitesi içeren fraksiyonlar birleştirildi (yaklaşık 186 ml) ve bu aşamada sitokrom P450 redüktaz mikrozomlara oranla yaklaşık 10 kez saflaştırıldı. Tablo 3.1 ilk DEAE-selüloz kolonu sonunda sitokrom P450 redüktaz eldesinin mikrozomlara göre yaklaşık %71 olduğunu göstermektedir.

İlk DEAE-selüloz kolonundan elde edilen sitokrom P450 redüktaz fraksiyonları potasyum fosfat tamponu içermeyen tampon B ile 6.67 kez seyreltildi ve yöntemler kısmında anlatıldığı üzere ikinci DEAE-selüloz kolonuna uygulandı. Şekil 3.2 ikinci DEAE-selüloz kromatografisinin elüsyon profilini göstermektedir. Numune uygulaması ve kolonun yıkanması aşamalarından sonra sitokrom P450 redüktazı sitokrom b5'ten arındırmak için

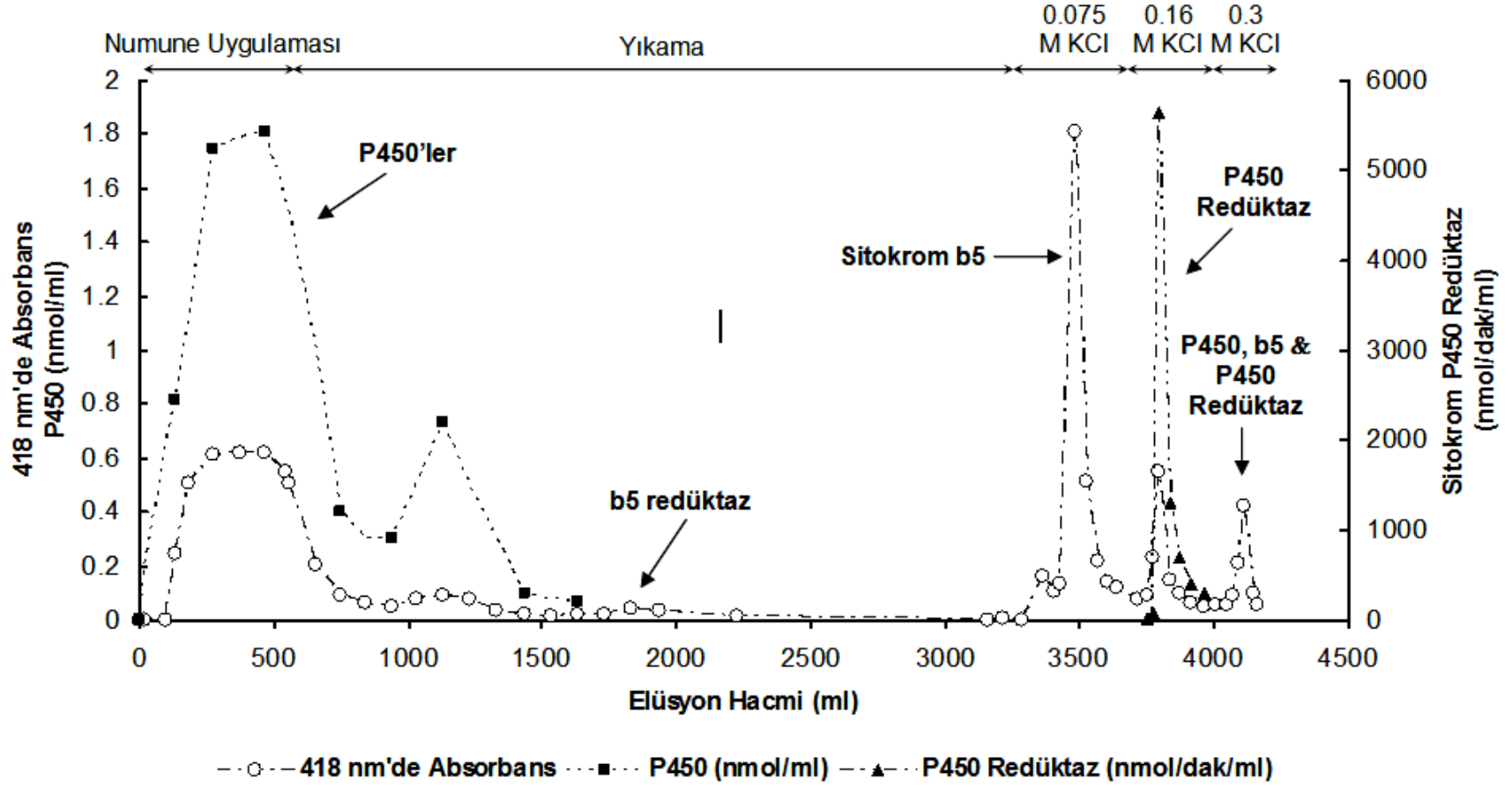
**Tablo 3.1** NADPH-sitokrom P450 redüktazın sığır karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması

Fraksiyonlar	Hacim (ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Sitokrom P450 Redüktaz			Verim %	Saflaştırma Katsayısı
			Aktivite (nmol/dak/ml)	Spesifik Aktivite (nmol/dak/mg)	Toplam Aktivite (nmol/dak)		
Mikrozomlar	80.0	37.7	4450.1	118.0	356008.0	100.0	1.0
Çözünürleştirilmiş mikrozomlar	488.0	5.90	920.7	156.1	449301.6	126.2	1.32
DEAE-Selüloz-1	186.0	1.12	1350.5	1205.8	251193.0	70.6	10.2
DEAE-Selüloz-2	33.0	2.87	5885.9	2050.8	194234.7	54.6	17.4
Adenozin 2', 5'-difosfat Sefaroz 4B	36.0	0.08	2334.0	29175.0	84024.0	23.6	247.2
Hidroksiapatit	7.0	0.18	5560.5	30891.7	38923.5	10.9	261.8

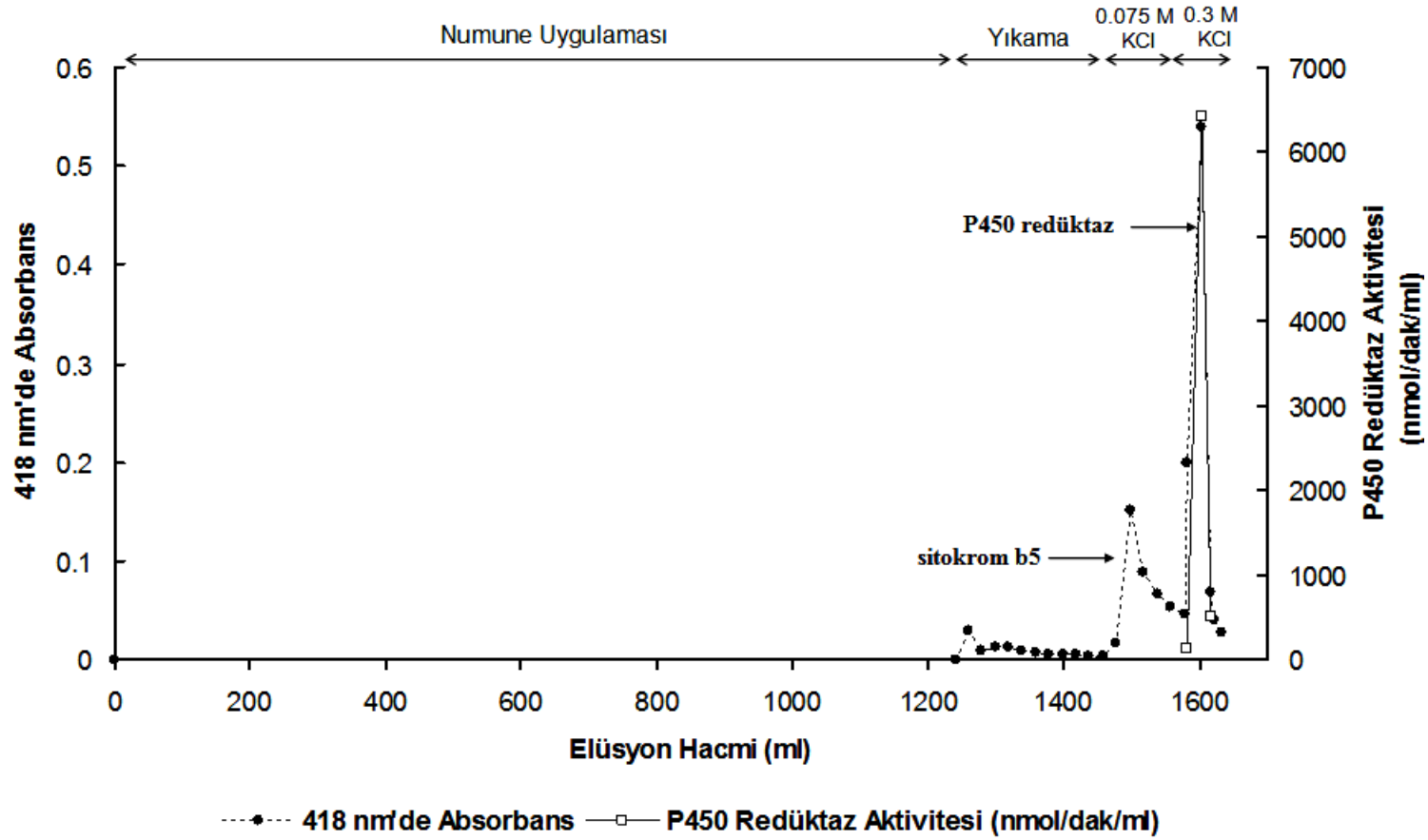
NADPH'ye bağlı sitokrom c redüktaz aktiviteleri 25°C'de 0.3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.7 içinde ölçülmüştür.

0.075 M KCl tuzu içeren tampon B kolona uygulandı. 0.3 M KCl tuzu içeren tampon B'nin kolona uygulanması ise sitokrom P450 redüktazın kolondan bariz bir tepe oluşturarak çıkmasına neden oldu. Bu kromatografi sonunda sitokrom P450 redüktaz yaklaşık 5.6 kez konsantre edildi ve mikrozomlara göre 17 kez ve yaklaşık %55 bir verimle saflaştırıldı.

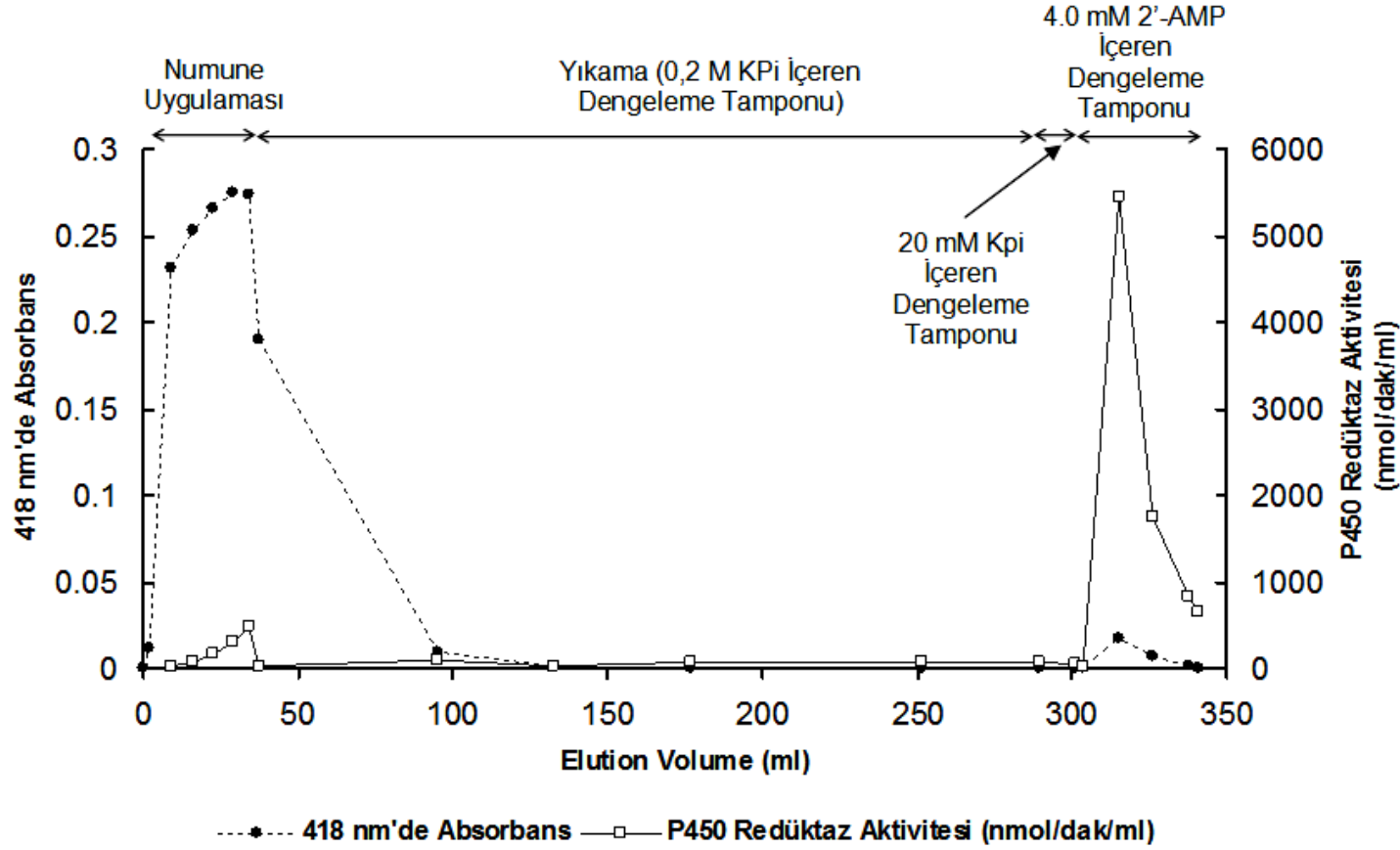
Konsantre edilen ve kısmen saflaştırılan sitokrom P450 redüktaz diyaliz edilerek adenozin 2', 5'-difosfat Sefaroz 4B kolon kromatografisine uygulandı. Tablo 3.1'de görüldüğü üzere saflaştırma katsayısındaki en çok artış bu kolon kromatografisi sonunda elde edildi. Şekil 3.3 afinite kolonunun elüsyon profilini göstermektedir. Sitokrom P450 redüktaz preparasyonu içerisinde bulunan hemen hemen tüm sitokrom b5 ve sitokrom P450'ler numune uygulaması ve kolonun yıkanması aşamalarında düşük miktarlardaki sitokrom P450 redüktaz ile kolondan ayrıldılar. Numune uygulamasından sonra kolon yoğun olarak yaklaşık 216 ml (70 kolon hacmi) kadar 0.2 M potasyum fosfat tamponu içeren tampon C ile spesifik olarak bağlanmayan proteinlerin kolondan çıkmasını sağlamak için yıkandı. Bunu takiben kolon yaklaşık 4 kolon hacmi kadar 20 mM potasyum fosfat tamponu içeren tampon C ile yıkandı. Daha sonra sitokrom P450 redüktaz kolondan 4.0 mM 2'-AMP'nin tampon C içinde



**Şekil 3.1** Sığır karaciğer NADPH sitokrom P450 redüktazın saflaştırılmasında ilk DEAE-selüloz kolon kromatografisinin elüsyon profili. Yaklaşık 449 ünite sitokrom P450 redüktaz içeren 2879 mg deterjanlarla çözünürleştirilmiş sığır karaciğer mikrozomları ilk DEAE-selüloz kolonuna (3.0 x 40.0 cm) uygulandı. Fraksiyonların 418 nm'deki absorbans değerleri, sitokrom P450 redüktaz, sitokrom b5 redüktaz aktiviteleri ve sitokrom b5 ve sitokrom P450 miktarları ölçüldü. Numune uygulamasından sonra kolon yoğun olarak tampon A ile yıkandı ve sitokrom P450 redüktaz 0.16 M KCl tuzu içeren tampon A ile kolondan elüe edildi.



**Şekil 3.2** İlk DEAE-selüloz kromatografisinden elde edilen kısmen saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazın ikinci DEAE-selüloz kolon (2.6 x 8.0 cm) kromatografisinin elüsyon profili. Fraksiyonların 418 nm'deki absorbans değerleri ve sitokrom P450 redüktaz miktarları ölçüldü. Numune uygulaması sırasında kolondan herhangi bir sitokrom elüsyonu olmadı. Sitokrom b5 kolondan 0.075 M KCl tuzu içeren tampon B ile sitokrom P450 redüktaz ise 0.3 M KCl tuzu içeren tampon B ile kolondan elüe edildi.



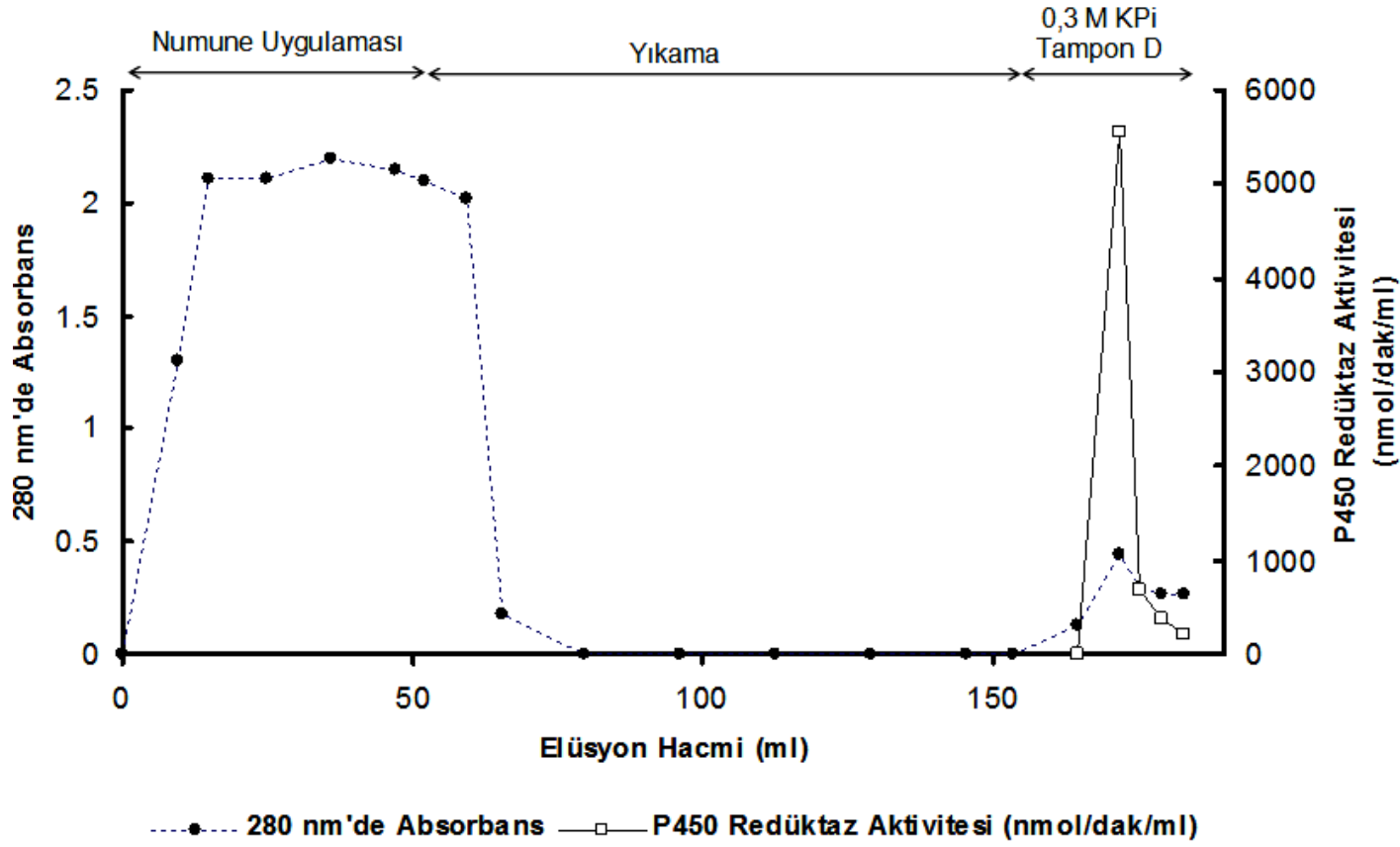
**Şekil 3.3** Kısmen saflaştırılmış siğir karaciğer sitokrom P450 redüktazın 2'-5'-ADP-sefaroze kolonunda (0.7 x 8.0 cm) afinite kromatografisinin elüsyon profili. Fraksiyonların 418 nm'deki absorbans değerleri ve sitokrom P450 redüktaz aktiviteleri ölçüldü. Yaklaşık 194 ünite sitokrom P450 redüktaz afinite kolonuna uygulandı. Numune uygulamasından sonra kolon yoğun olarak 0.2 M potasyum fosfat tamponu içeren tampon C ile bunu takiben ise bir miktar 20 mM potasyum fosfat tamponu içeren tampon C ile yıkandı. Daha sonra sitokrom P450 redüktaz kolondan 4.0 mM 2'-AMP'nin tampon C içinde kolona uygulanması ile elüe edildi.

kolona uygulanması ile alındı. Bu kromatografi sonunda sitokrom P450 redüktaz mikrozomlara göre yaklaşık 247 kez ve %23.6'lık bir verimle saflaştırıldı.

Afinite kolonundan elde edilen sitokrom P450 redüktaz fraksiyonları birleştirilerek, enzimi daha ileri seviyede saflaştırmak ve inhibitör 2'-AMP ve yeniden oluşturulmuş sistemlerde sitokrom P450 redüktaz aktivitesini inhibe ettiği bilinen deterjan Emulgen 913'ü saf enzim preparasyonundan uzaklaştırmak için hidroksiapatit kolonuna uygulandı. Şekil 3.4 hidroksiapatit kolon kromatografisinin elüsyon profilini göstermektedir. Şekil 3.4'te görüldüğü üzere numune uygulamasından sonra kolon, fraksiyonların 280 nm'deki absorbans değerleri sıfırlanıncaya kadar tampon D ile yıkandı. 280 nm'deki absorbans değerleri fraksiyonlar içerisinde bulunan deterjan Emulgen 913 ve inhibitör 2'-AMP miktarını göstermektedir. Bu aşamalardan sonra sitokrom P450 redüktaz kolondan 0.3 M potasyum fosfat tamponu içeren tampon D'nin kolona uygulanması ile konsantre bir şekilde (7.0 ml) alındı. Bu kromatografi sonundasisitokrom P450 redüktaz mikrozomlara göre yaklaşık 262 kez ve %10.9'luk bir verimle saflaştırıldı. Saflaştırılan enzim sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 0.5 ml'lik alikotlar halinde sıvı azot içerisinde saklandı.

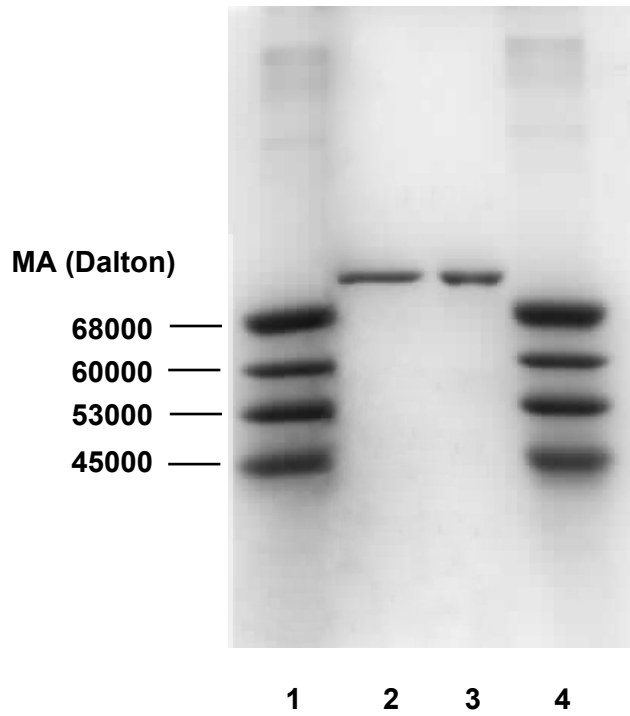
### **3.2 Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Saflığının SDS-PAGE ile Analizi**

Saflaştırma işlemi sonunda elde edilen sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz preparasyonunun saflığını göstermek amacıyla enzim denatüre edici şartlarda, SDS varlığında poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. Şekil 3.5 saflaştırılan sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazın dört değişik standart protein ile olan jel fotoğrafını göstermektedir. Şekil 3.5'te görüldüğü üzere NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi sığır karaciğer mikrozomlarından homojen bir şekilde saflaştırıldı ve % 8.5'lik slab jelde tek bir protein bandı verdi (kuyu 2 ve 3). Kuyu 2 afinite kolonundan elde edilen sitokrom P450 redüktaz fraksiyonunu, kuyu 3 ise en son hidroksiapatit kolonundan elde edilen sitokrom P450 redüktaz fraksiyonunu göstermektedir. Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı koyun akciğer ve diğer P450 redüktazlarda olduğu gibi 76.000-78.000 dalton arasında bulundu.



**Şekil 3.4** Sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazın saflaştırılmasında hidroksiapatit kolon (1.5 x 2.1 cm) kromatografisinin elüsyon profili. Fraksiyonların 280 nm'deki absorbans değerleri ve sitokrom P450 redüktaz aktiviteleri ölçüldü. Yaklaşık 84 ünite sitokrom P450 redüktaz hidroksiapatit kolonuna uygulandı. Numune uygulamasından ve kolonun yıkanmasından sonra sitokrom P450 redüktaz kolondan 0.3 M potasyum fosfat tamponu içeren tampon D'nin kolona uygulanması ile elüe edildi.



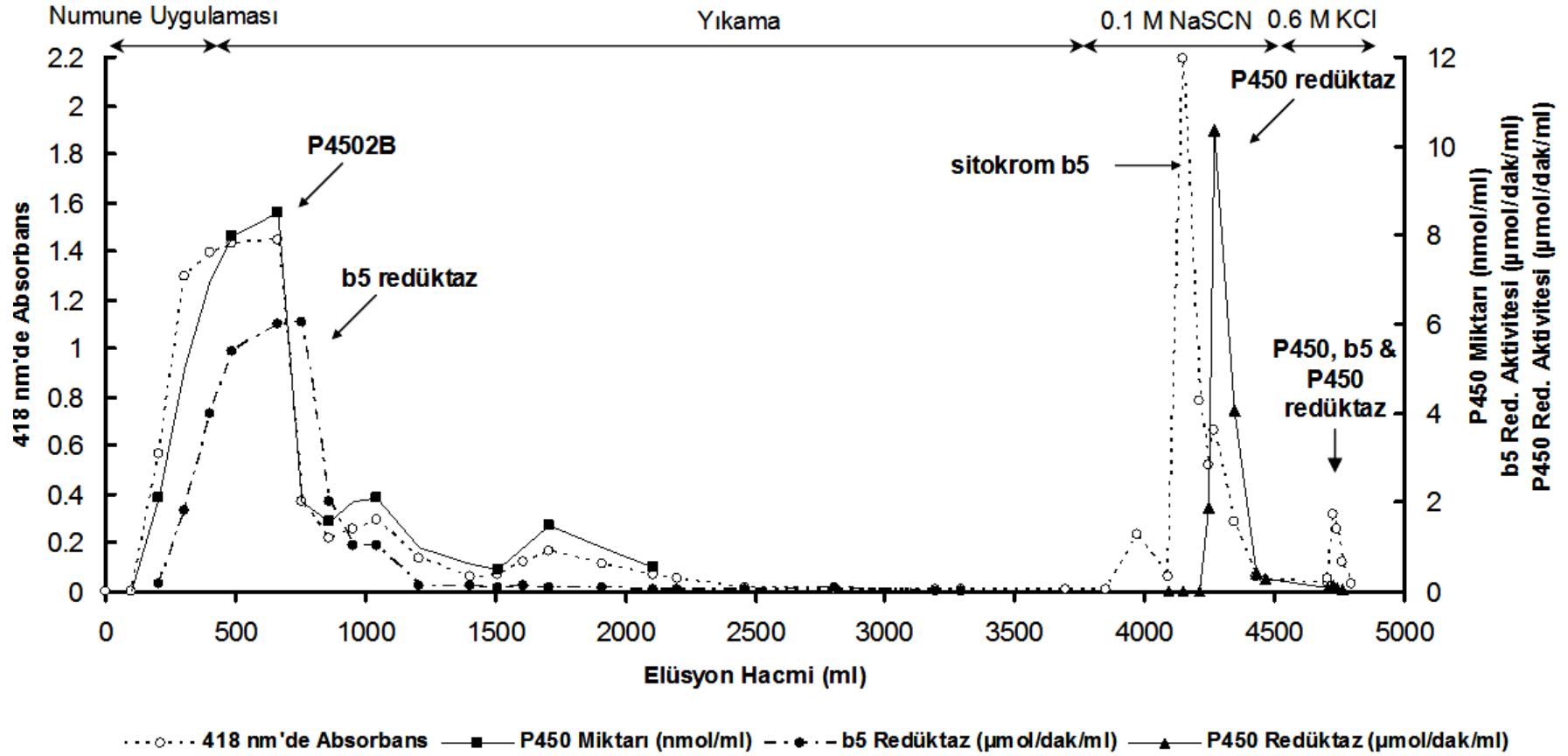


**Şekil 3.5** Sığır karaciğer mikrozoamlarından NADPH-sitokrom P450 redüktazın saflaştırılmasını 4 tane referans proteinle gösteren %8.5'lik poliakrilamid jeli. **Kuyular 1 ve 4**, Dört referans protein (BSA, katalaz, glutamat dehidrogenaz, yumurta albumini, herbiri 3.8 µg); **kuyu 2**, afinite kolonundan elde edilen sitokrom P450 redüktaz fraksiyonu (1.2 µg); **kuyu 3**, hidroksiapatit kolonundan elde edilen sitokrom P450 redüktaz fraksiyonu (0.68 µg).

### 3.3 Fenobarbital Muamele Edilmiş Tavşan Karaciğer Mikrozomlarından NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Saflaştırılması

Proje kapsamındaki çalışmalarda kullanılmak üzere NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından oldukça yüksek bir oranda saflaştırıldı. NADPH-sitokrom P450 redüktazın fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması, deterjanla çözünürleştirilmiş mikrozomların birbirini takip eden DEAE-selüloz kolonlarında anyon değişim kromatografisini, bunu takiben kısmen saflaştırılan enzimin adenozin 2', 5'-difosfat Sefaroz 4B kolonunda afinite kromatografisini gerektirdi. Enzimin daha da ileri saflaştırılması ve 2'-AMP ve Emulgen 913'ün en son enzim preparasyonundan uzaklaştırılması son bir hidroksiapatit kolonunda gerçekleştirildi. NADPH-sitokrom P450 redüktazın fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılmasında uygulanan ilk DEAE-selüloz kolon kromatografisinin elüsyon profili Şekil 3.6'da gösterilmektedir.

NADPH-sitokrom P450 redüktazın fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması sonuçları Tablo 3.2'de verilmektedir. Sitokrom P450 redüktaz, fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarına göre yaklaşık 116 kez ve %16.6'lık bir verimle saflaştırıldı. Saflaştırılmış P450 redüktazın özgül aktivitesi, sitokrom c indirgenmesi "YÖNTEMLER" kısmında tarif edildiği üzere 550 nm de spektrofotometrik olarak ölçüldüğünde 31.7 units/mg protein olarak bulundu. Saflaştırılmış tavşan karaciğer P450 redüktazın absorpsiyon spektrumu flavoproteinlerin karakteristik özelliği olan tepe noktalarını verdi ve enzimin saf olduğunu destekledi (sonuç gösterilmemiştir).



**Şekil 3.6** Fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer NADPH sitokrom P450 redüktazın saflaştırılmasında ilk DEAE-selüloz kolon kromatografisinin elüsyon profili. Yaklaşık 889 ünite sitokrom P450 redüktaz içeren 2409 mg deterjanlarla çözünürleştirilmiş tavşan karaciğer mikrozomları ilk DEAE-selüloz kolonuna (3.2 x 48.5 cm) uygulandı. Fraksiyonların 418 nm'deki absorbans değerleri, sitokrom P450 redüktaz, sitokrom b5 redüktaz aktiviteleri ve sitokrom b5 ve sitokrom P450 miktarları ölçüldü. Numune uygulamasından sonra kolon yoğun olarak dengeleme tamponu ile yıkandı ve sitokrom P450 redüktaz 0.1 M NaSCN tuzu içeren dengeleme tamponu ile kolondan elüe edildi.

**Tablo 3.2** NADPH-sitokrom P450 redüktazın fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılması

Fraksiyonlar	Hacim (ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Sitokrom P450 Redüktaz			Verim %	Saflaştırma Katsayısı
			Aktivite (nmol/dak/ml)	Spesifik Aktivite (nmol/dak/mg)	Toplam Aktivite (nmol/dak)		
Mikrozomlar	49.7	60.2	16485.1	273.8	819309.5	100.0	1.0
Çözünürleştirilmiş mikrozomlar	458.0	5.26	1941.8	369.2	889344.4	108.5	1.35
DEAE-Selüloz-1	206.5	2.86	3948.4	1380.6	815344.6	99.5	5.04
DEAE-Selüloz-2	62.5	1.48	6908.5	4667.9	431781.3	52.7	17.05
Adenozin 2', 5'-difosfat Sefaroz 4B	85.0	0.09	2178.9	24210.0	185206.5	22.6	88.4
Hidroksiapatit	6.8	0.63	19993.4	31735.6	135955.1	16.6	115.9

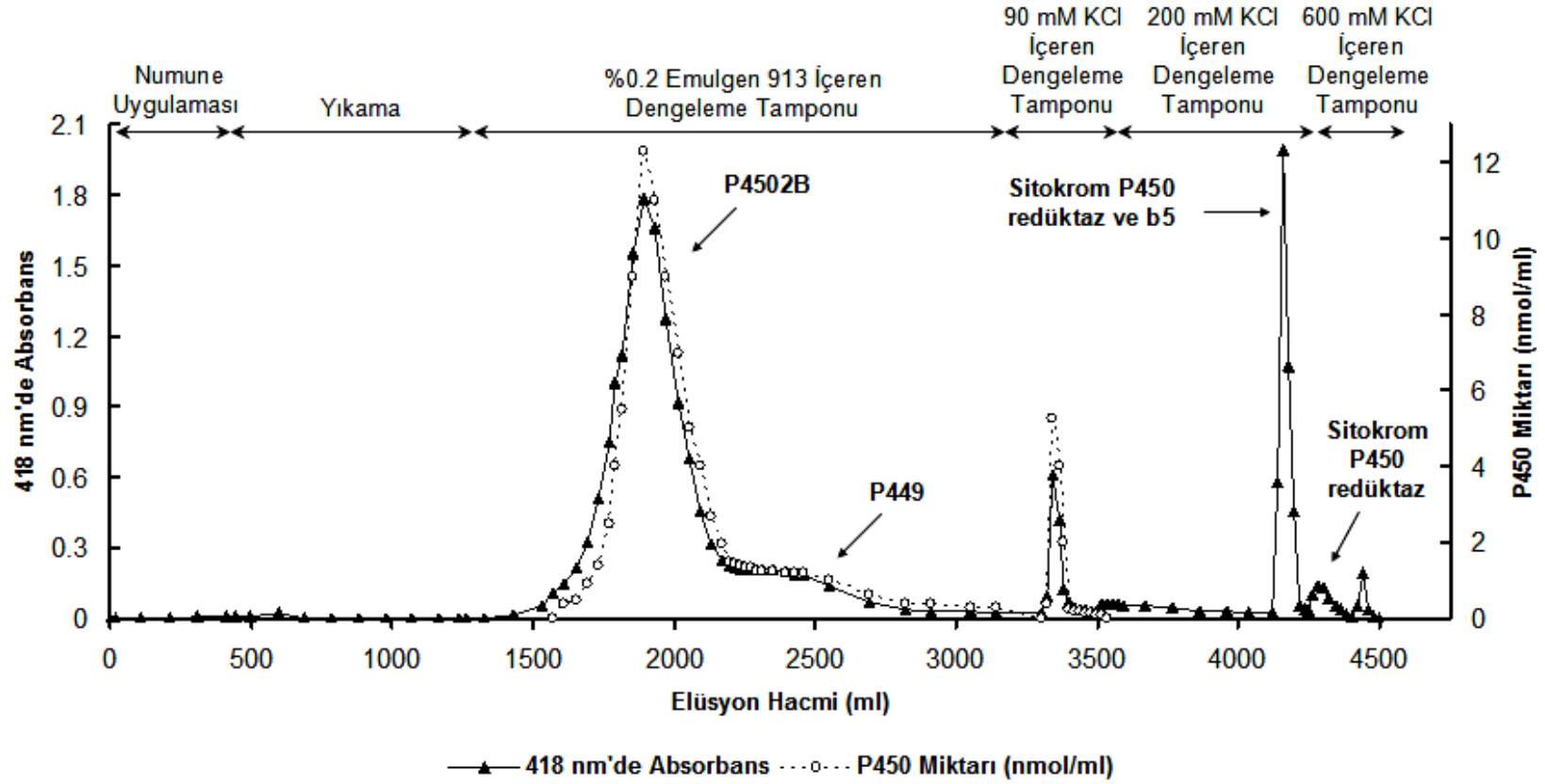
NADPH'ye bağlı sitokrom c redüktaz aktiviteleri 25°C'de 0.3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.7 içinde ölçülmüştür.

### 3.4 Fenobarbital Muamele Edilmiş Tavşan Karaciğer Mikrozoamlarından Sitokrom P4502B4 Saflaştırılması

Saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktazın biyokatalitik olarak aktif olup olmadığını belirleyebilmek amacıyla saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz, tavşan karaciğer CYP2B4 ve sentetik lipid fosfatidilkolin dilaurol içeren yeniden oluşturulmuş ("reconstituted") sistemlerde benzfetamin N-demetilaz aktivitesi ölçüldü. Bu amaçla, yeniden oluşturulmuş sistemlerde kullanılmak üzere sitokrom P4502B4 enzimi fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozoamlarından saflaştırıldı. Sitokrom P4502B4'ün fenobarbital muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılması deterjan ile çözünürleştirilmiş ve polietilen glikol ile fraksiyonlandırılmış tavşan karaciğer mikrozoamlarının DEAE-selüloz kolonunda iyon değişim kromatografisini, birinci hidroksiapatit kolonunda adsorbsiyon kromatografisini ve oktil-Sefaroz CL-4B kolonunda hidrofobik etkileşim kromatografisini gerektirdi. Oktil-Sefaroz CL-4B kolonundan elde edilen kısmen saflaştırılmış sitokrom P4502B4 daha sonra ikinci hidroksiapatit kolonuna uygulandı ve bu aşamayı DEAE-selüloz kolonunda iyon değişim kromatografisi takip etti. Son olarak, sitokrom P4502B4 üçüncü bir hidroksiapatit kolonunda daha da ileri seviyede saflaştırıldı ve konsantre edildi. Sitokrom

P4502B4'ün fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılmasında uygulanan ilk DEAE-selüloz kolon kromatografisinin elüsyon profili Şekil 3.7'de gösterilmektedir. Sitokrom P4502B4'ün fenobarbital muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması sonuçları ise Tablo 3.3'de sunulmaktadır. Sitokrom P4502B4'ün fenobarbital muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarına göre 8.5 kez ve %6'lık bir verimle saflaştırıldığı bulundu. Oldukça saflaştırılan sitokrom P4502B4'ün özgül miktarı 14.0 nmol P450/mg protein olarak hesaplandı.

Fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer sitokrom P4502B4'ün saflık derecesini belirleyebilmek amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı. Şekil 3.8 saflaştırılan tavşan karaciğer sitokrom P4502B4'ün mikrozomlar, saflaştırma işlemi sırasında değişik aşamalardan elde edilen fraksiyonlar ve beş değişik standart protein ile olan jel fotoğrafını göstermektedir. Şekil 3.8'de görüldüğü üzere sitokrom P4502B4 fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarına göre oldukça etkin bir şekilde saflaştırıldı. Saf haldeki en son enzim preparasyonu sitokrom b5, NADH-sitokrom b5 redüktaz ve NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimlerini içermiyordu.



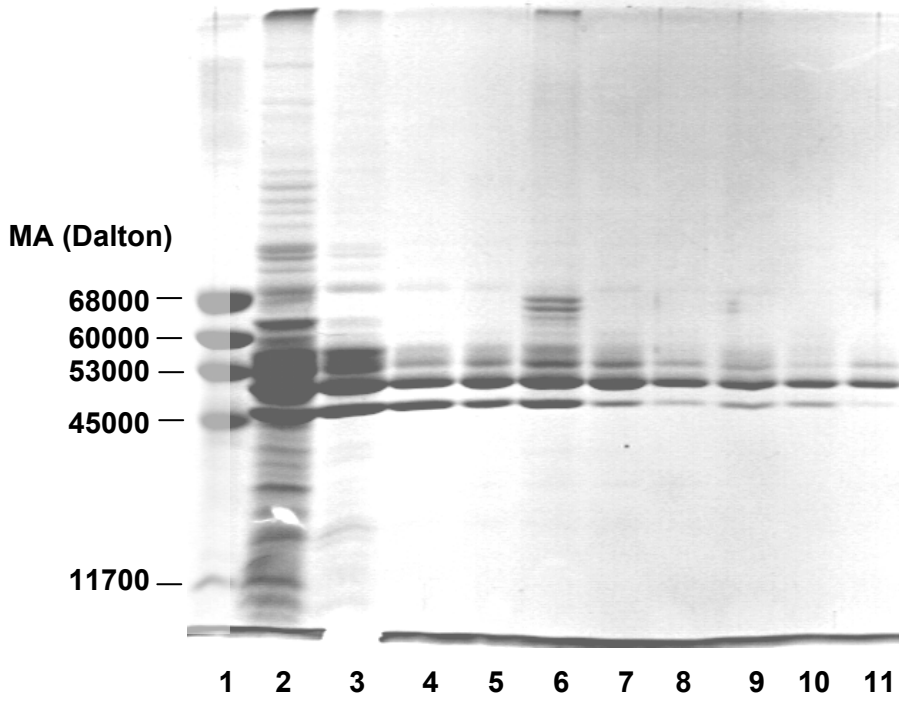
**Şekil 3.7** Fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer sitokrom P4502B4'ün saflaştırılmasında ilk DEAE-selüloz kolon kromatografisinin elüsyon profili. Yaklaşık 844 mg kolatla çözünürleştirilmiş ve PEG 6000 ile fraksiyonlandırılmış 3950.2 nmol/ml P450 içeren tavşan karaciğer mikrozomları ilk DEAE-selüloz kolonuna (2.5 x 45.0 cm) uygulandı. Fraksiyonların 418 nm'deki absorbans değerleri, sitokrom P450 redüktaz aktiviteleri ve sitokrom b5 ve sitokrom P450 miktarları ölçüldü. Numune uygulamasından sonra kolon dengeleme tamponu ile yıkandı sonra P4502B4, %0.2 Emulgen 913 içeren dengeleme tamponu ile kolondan elüe edildi.

**Tablo 3.3** Sitokrom P4502B4'ün fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması

Fraksiyonlar	Hacim (ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Sitokrom P450			Verim %	Saflaştırma Katsayısı
			P450 Miktarı (nmol/ml)	Spesifik P450 Miktarı (nmol/mg prt.)	Toplam P450 Miktarı (nmol)		
Mikrozomlar	50.0	57.6	94.8	1.65	4740.0	100.0	1.0
% 9-14 PEG 6000 fraksiyonu	99.5	8.48	39.7	4.68	3950.2	83.3	2.84
DEAE-Selüloz-1	427.5	0.95	646.0	6.80	2761.7	58.3	4.12
Hidroksilapatit-1	77.5	3.45	26.6	7.72	2064.6	43.6	4.68
oktil-Sefaroz CL-4B	422.0	0.27	2.14	7.93	903.1	19.1	4.81
Hidroksilapatit-2	51.8	2.04	16.5	8.08	852.8	18.0	4.90
DEAE-Selüloz-2	840.0	0.05	0.66	13.2	554.4	11.7	8.0
Hidroksilapatit-3	15.0	1.36	19.1	14.0	286.5	6.0	8.5

### 3.5 Koyun Akciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Saflaştırılması

Proje kapsamındaki çalışmalarda kullanılmak üzere sığır karaciğer ve tavşan karaciğer sitokrom P450 redüktaz enzimlerine ilave olarak NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi ayrıca koyun akciğer mikrozomlarından da saflaştırıldı. NADPH-sitokrom P450 redüktazın koyun akciğer dokusundan saflaştırılması prosedürü, deterjanla çözünürleştirilmiş mikrozomların birinci DEAE-selüloz kolonunda anyon-değişim kromatografisini içerdi. Koyun akciğer P450 redüktazın daha ileri düzeyde saflaştırılması ve konsantre edilmesi ikinci bir DEAE-selüloz kolonunu ve bunu takiben kısmen saflaştırılan P450 redüktazın adenozin 2', 5'-difosfat Sefaroz 4B kolonunda afinite kromatografisini gerektirdi. Son olarak, iyonik olmayan deterjan Emulgen 913 ve inhibitör 2'-AMP'yi uzaklaştırmak ve enzimi daha da saflaştırmak ve konsantre etmek için hidroksiapatit kolon kromatografisi gerçekleştirildi. Koyun akciğer mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktazın saflaştırılmasında elde edilen sonuçların özeti Tablo 3.4'te sunulmaktadır. NADPH-sitokrom P450 redüktaz koyun akciğer mikrozomlarına göre 198-kez ve %16.5'lik bir verimle saflaştırıldı. Saflaştırılan P450 redüktazın özgül aktivitesi, sitokrom c indirgenmesi "YÖNTEMLER" kısmında tarif edildiği



**Şekil 3.8** Fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından sitokrom P4502B4 saflaştırılmasını 5 tane referans proteinle gösteren %8.5'lik poliakrilamit jeli. **Kuyular 1 ve 15**, beş referans protein (BSA, katalaz, glutamat dehidrogenaz, yumurta albumini ve sitokrom c, herbiri 3,3 µg); **kuyu 2**, tavşan karaciğer mikrozomları (36.5 µg); **kuyu 3**, %9-14 PEG 6000 fraksiyonu (12.9 µg); **kuyu 4**, ilk DEAE-selüloz kolonundan elde edilen sitokrom P4502B4 fraksiyonu (4.4 µg); **kuyu 5**, ilk hidroksiapatit kolonundan elde edilen sitokrom P4502B4 fraksiyonu (3.9 µg); **kuyu 6**, oktil-Sefaroz CL-4B kolonundan elde edilen sitokrom P4502B4 fraksiyonu (3.7 µg); **kuyu 7**, ikinci hidroksiapatit kolonundan elde edilen sitokrom P4502B4 fraksiyonu (3.7 µg); **kuyu 8**, ikinci DEAEA-selüloz kolonunda numune uygulaması ve yıkama aşamalarında elue olmuş ve birleştirilmiş sitokrom P4502B4 fraksiyonları (havuz A) (1.1 µg); **kuyu 9**, ikinci DEAEA-selüloz kolonunda 0.1 M KPi ve 0.1 M KPi + %0.2 Emulgen 913 ile elue edilmiş ve birleştirilmiş sitokrom P4502B4 fraksiyonları (havuz B); **kuyular 10 ve 11**, üçüncü hidroksiapatit kolonundan (ikinci DEAE-selüloz kolonundan elde edilen havuz A ile yüklenen) sırasıyla 0.09 M KPi ve 0.2 M KPi (1.1 µg) ile elue edilen oldukça saflaştırılmış sitokrom P4502B4 fraksiyonları.

\* Üçüncü hidroksiapatit kolonundan 0.2 M KPi ile elue edilen (kuyu 11) oldukça saflaştırılmış sitokrom P4502B4 fraksiyonu (P450 miktarı: 19.1 nmol/ml) deneylerde kullanıldı.

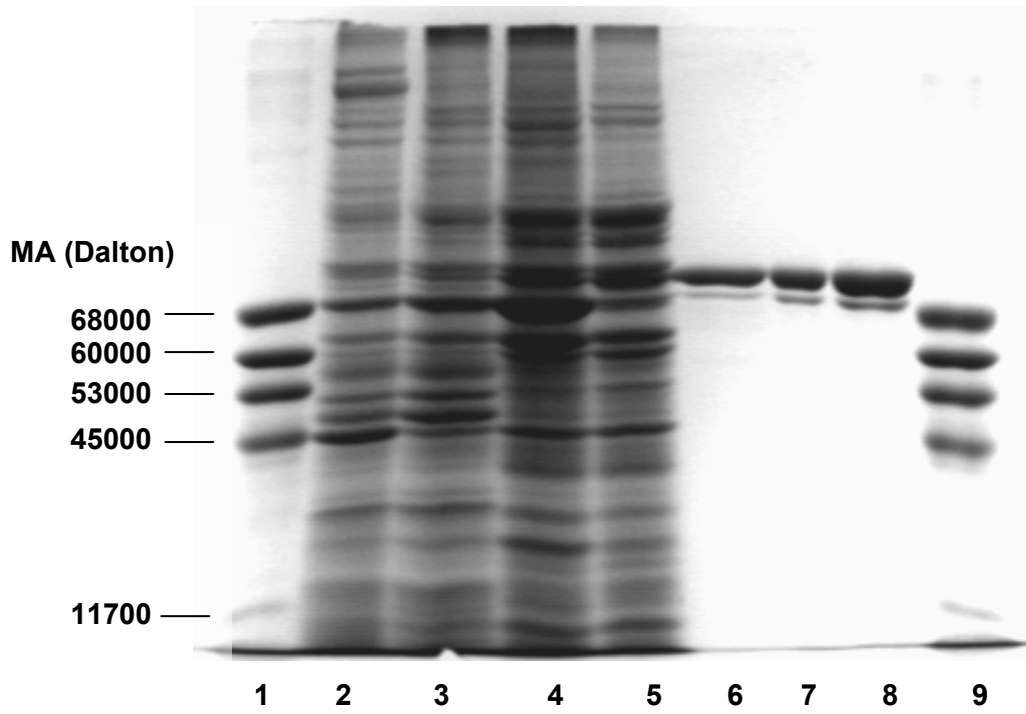


**Tablo 3.4** NADPH-sitokrom P450 redüktazın koyun akciğer mikrozomlarından saflaştırılması

Fraksiyonlar	Hacim (ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Sitokrom P450 Redüktaz			Verim %	Saflaştırma Katsayısı
			Aktivite (nmol/dak/ml)	Spesifik Aktivite (nmol/dak/mg)	Toplam Aktivite (nmol/dak)		
Mikrozomlar	195.0	26.9	4232.4	157.3	825318.0	100.0	1.0
Çözünürleştirilmiş mikrozomlar	835.0	4.24	1280.7	302.1	1069384.5	129.6	1.92
DEAE-Selüloz-1	173.0	5.13	4545.4	886.0	786354.2	95.3	5.63
DEAE-Selüloz-2	80.0	3.44	4352.7	1265.3	348216.0	42.2	8.04
Adenozin 2', 5'-difosfat Sefaroz 4B	45.0	0.13	3903.1	30023.8	175639.5	21.3	190.9
Hidroksiapatit	4.70	0.93	28911.2	31087.3	135882.6	16.5	197.6

NADPH'ye bağlı sitokrom c redüktaz aktiviteleri 25°C'de 0.3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.7 içinde ölçülmüştür.

üzere 550 nm de spektrofotometrik olarak ölçüldüğünde 31.1 ünite/mg protein olarak bulundu. En son enzim preperasyonu, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezinde tek bir band üretti (Şekil 3.9). Jel fotoğrafı kuyular 6,7 ve 8'in saf enzimle fazla doldurulduğunu göstermektedir. Bu kuyularda kalın bandın hemen altında görülen ince band, P450 redüktazın, en son enzim preperasyonunda bulunan küçük miktarlarda ki biyokatalitik olarak inaktif ve proteolitik olarak kırılmış halini göstermektedir. Saflaştırılmış koyun akciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazın absorpsiyon spektrumu enzimin saf olduğunu ayrıca destekledi (sonuç gösterilmemiştir).



**Şekil 3.9** Koyun akciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazın saflaştırılmasında değişik aşamaları gösteren SDS-PAGE analizi. **Kuyular 1 ve 9**, beş referans protein (BSA, katalaz, glutamat dehidrogenaz, yumurta albumini ve sitokrom c, herbiri 3,3 µg); **kuyu 2**, mikrozomlar (60.5 µg); **kuyu 3**, çözünürleştirilmiş mikrozomlar (95.4 µg); **kuyu 4**, ilk DEAE-selüloz kolonundan elde edilen sitokrom P450 redüktaz fraksiyonu (115.1 µg); **kuyu 5**, ikinci DEAE-selüloz kolonundan elde edilen sitokrom P450 redüktaz fraksiyonu (64.5 µg); **kuyu 6**, afinite kolonundan elde edilen sitokrom P450 redüktaz fraksiyonu (4.9 µg); **kuyular 7 ve 8**, hidroksiapatit kolonundan elde edilen sitokrom P450 redüktaz fraksiyonu (sırasıyla 3.5 µg ve 7.0 µg).

### 3.6 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Kinetik, Katalitik ve Yapısal Özelliklerinin Karakterizasyonu

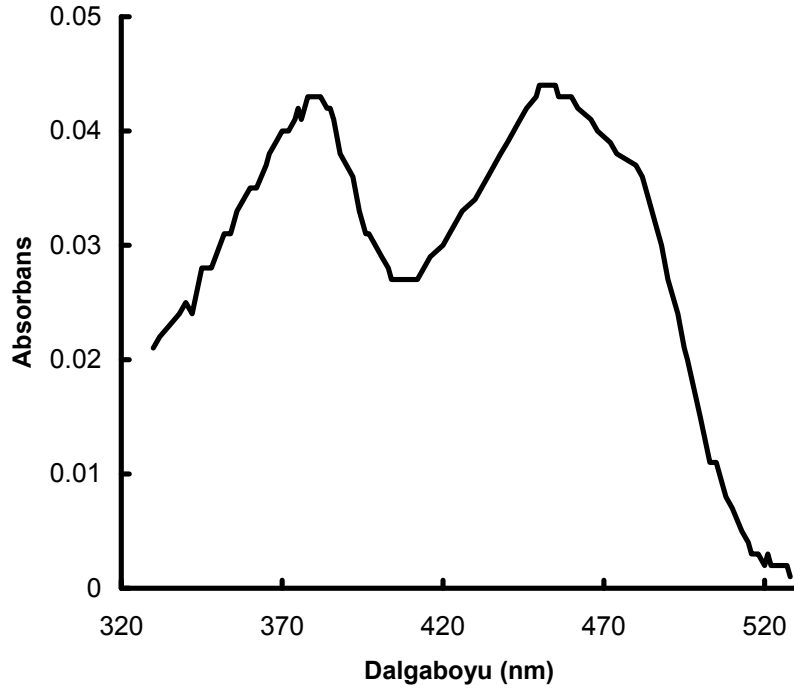
Bu çalışmalar aşağıdaki kısımlarda verilmektedir.

#### 3.6.1 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

Saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazın moleküler ağırlığı Şekil 3.5'te verilen SDS-PAGE analizinden daha önce elde edilen sığır P450 redüktazına benzer olarak (Arınç ve Çelik, 2002) ve diğer sitokrom P450 redüktazlarda olduğu gibi 76.000-78.000 dalton arasında bulundu.

#### 3.6.2 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Spektral Özellikleri

Şekil 3.10'da saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz enziminin absorpsiyon spektrumu verilmektedir. Bu şekilden görüleceği üzere saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz flavoproteinlerin karakteristik özelliği olan 455 ve 378 nm'lerde iki tepe noktası ve 478 nm civarında ise bir çukurluk göstermektedir. Absorpsiyon spektrumunda 420 nm'de herhangi bir çukurluğun olmaması saflaştırılmış enzim preparasyonunun sitokrom b5 ve sitokrom P450'ler gibi hemoproteinlerle kontamine olmadığını göstermektedir. Ayrıca saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazın  $A_{380}/A_{455}$  ve  $A_{280}/A_{455}$  değerleri sırasıyla 0.98 ve 10.09 olarak bulundu. Bu değerler saflaştırılmış kefal (*Liza saliens*) karaciğer redüktazı için 1.12 ve 11.5 (Şen ve Arınç, 1998) ve koyun akciğer redüktazı içinse 1.12 ve 8.69 (Arınç ve Çelik, 2002) olarak bulunmuştu.  $A_{280}/A_{455}$  değerinin düşük olması daha iyi hazırlanmış bir sitokrom P450 redüktaz preparasyonunu göstermektedir.



**Şekil 3.10** Hidroksiapatit kolonundan elüe edilen sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazın en son saflaştırılmış preparasyonunun absorpsiyon spektrumu. Enzimin absorpsiyon spektrumu 1.0 cm'lik küvetler kullanılarak çift ışık yollu spektrofotometrede en son saflaştırılmış preparasyon seyreltilmeden elüsyon tamponuna karşı kayıt edildi.

### **3.6.3 Emulgen 913 ve Kolat Deterjanlarının Birlikte Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesine Olan Aktivatör Etkisi**

NADPH-sitokrom P450 redüktazın sığır karaciğer dokusundan saflaştırılmasında enzimin mikrozomlardan deterjanlar kullanılarak çözünürleştirilmesi gerektiğinden, Emulgen 913 ve kolat karışımlarının enzim aktivitesine olan etkileri detaylı olarak incelendi. Deterjanlar Emulgen 913 ve kolatın birlikte sığır karaciğer P450 redüktaz aktivitesine olan aktivatör etkisi “Yöntemler” kısmında ayrıntılı olarak anlatıldığı üzere, hem sığır karaciğer mikrozomları hem de saflaştırılmış enzim kullanarak, %1 Emulgen 913 ile birlikte artan miktarlarda kolat konsantrasyonlarında incelendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.5’te sunulmaktadır.

**Tablo 3.5** Emulgen 913 ve kolat deterjanlarının birlikte sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesine olan aktivatör etkisi

Deterjan Konsantrasyonları	Sitokrom P450 redüktaz Aktivitesindeki Artış*	
	Sığır Karaciğer Mikrozomları	Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz
%1 Emulgen 913	% 24.1	%26.5
%1 Emulgen 913 + %0.2 kolat	% 29.3	%32.2
%1 Emulgen 913 + %0.4 kolat	% 34.2	%37.6
%1 Emulgen 913 + %1 kolat	% 35.6	%40.1

\* Deterjan bulunan ortamda ki sitokrom P450 redüktaz aktivitesinin artışları, kontrol aktivitesine göre % artış oranı olarak verilmiştir. Herbir ölçüm iki kez yapılan enzim aktivite tayinlerinin ortalamasını göstermektedir. İnkübasyon prosedürü “Yöntemler” kısmında ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Bu deneylerde, %1 Emulgen 913, sitokrom P450 redüktaz aktivitesini kontrol aktivitesine göre, mikrozomlar ve saf enzim kullanıldığında, sırasıyla %24.1 ve %26.5 oranında artırırken, %1 Emulgen 913 ile birlikte %0.2 kolat içeren reaksiyon ortamlarında bu artış sırasıyla %29.3 ve %32.2 seviyelerinde oldu. %1 Emulgen 913 ve %0.4 kolat içeren reaksiyon ortamlarında ise mikrozomlar kullanıldığında sitokrom P450 redüktaz aktivitesi kontrol aktivitesine göre %34.2 seviyesinde artarken, saf enzim kullanıldığında bu artış %37.6 seviyesinde oldu. En fazla aktivite ise, %1 Emulgen 913 ile birlikte %1 kolat içeren reaksiyon ortamlarında, mikrozomlar kullanıldığında %35.6 olarak, saf enzim kullanıldığında ise %40.1 olarak saptandı. Bu konsantrasyonda ki deterjan karışımının ise sitokrom P450 yi P420'ye dönüştürerek degradasyonuna neden olduğu saptandığından daha yüksek konsantrasyonlarda deterjan karışımı kullanılmamıştır.

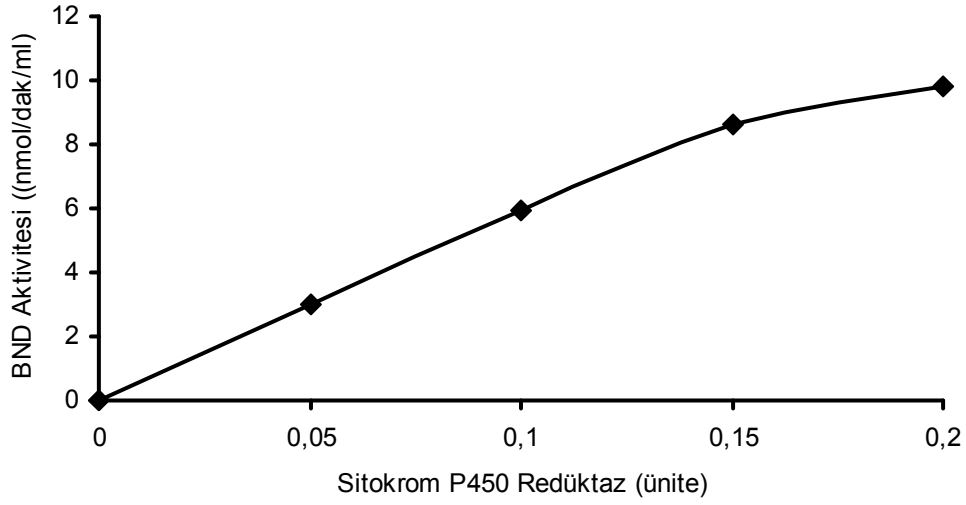
#### **3.6.4 Çeşitli Konsantrasyonlarda ki Triton X-100 Deterjanının Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesine Olan Aktivatör Etkisi**

Triton X100 deterjanının sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesine olan aktivatör etkisi “Yöntemler” kısmında anlatıldığı üzere sığır karaciğer mikrozomları

kullanılarak artan konsantrasyonlarda incelendi. Tüp içindeki son konsantrasyonu %0.125, %0.5 ve %1.0 olan Triton X-100'ün, sığır karaciğer mikrozomal sitokrom P450 redüktaz aktivitesine etkisi incelendiği zaman, %0.125 ve %0.5 konsantrasyonlarında ki Triton X-100'ün enzim aktivitesini sırasıyla %24.7 ve %23.8 oranında arttırdığı, %1 konsantrasyonda ise deterjanın enzim aktivitesindeki artışı %17.3'e düşürdüğü gözlemlendi. %1 konsantrasyonda ki Triton X 100, hem redüktaz aktivitesini, %0.125 ve %0.500 Triton X 100'e nazaran takriben %6-7 oranında azalttığından, hem de sitokrom P450 yi P420'ye dönüştürerek degradasyonuna neden olduğundan daha yüksek konsantrasyonlarda deterjan denenmemiştir.

### **3.6.5 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın Biyokatalitik Aktivitesi; Yeniden Oluşturulmuş Sistemlerdeki Benzfetamin N-Demetilasyon Aktiviteleri**

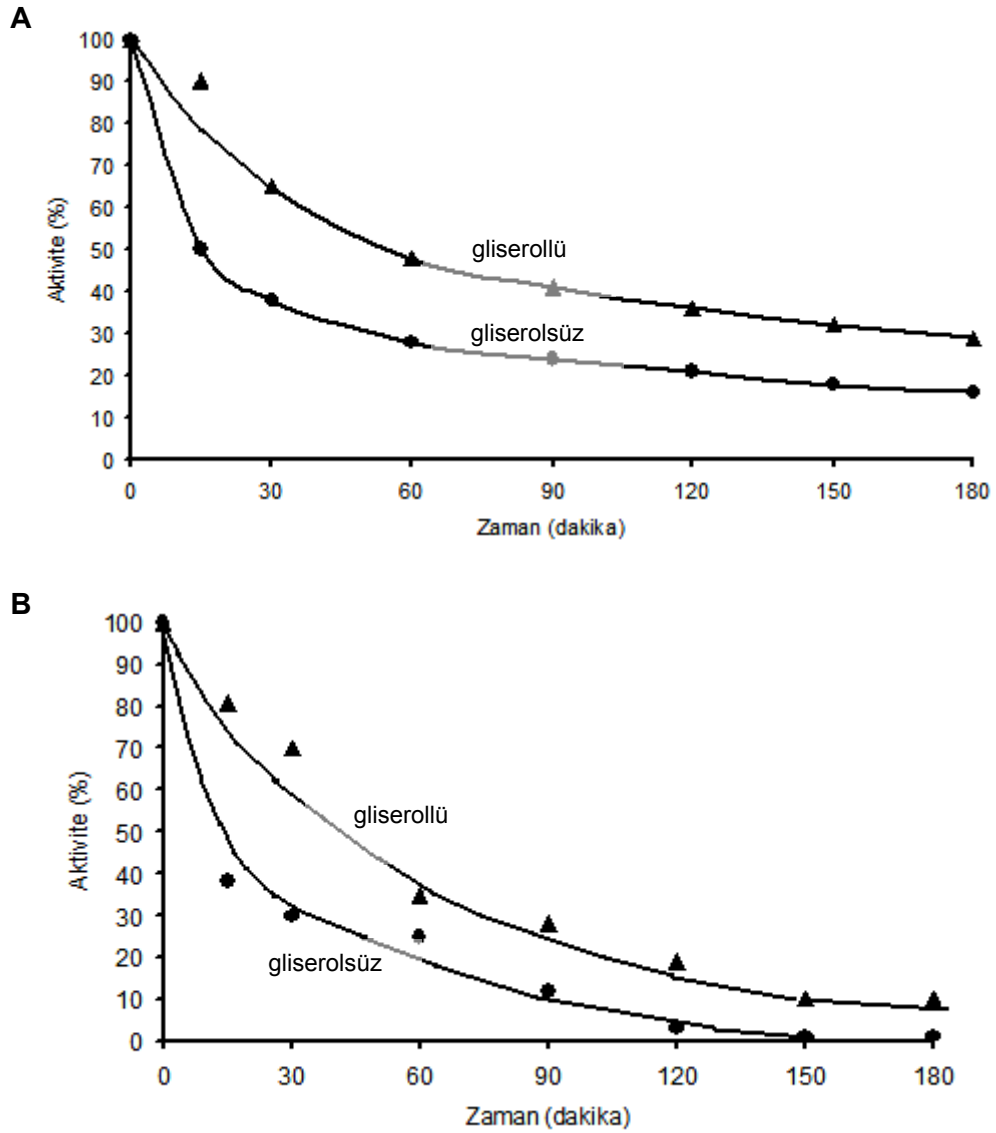
Saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktazın diğer deneylerde kullanılmasından önce, enzimin biyokatalitik olarak aktif olduğunu ve sentetik lipit içeren bir ortamda sitokrom P450 izozimi ile biraraya gelerek sitokrom P450'ye-bağlı monooksijenaz reaksiyonunu katalize edebileceğini göstermek gerekiyordu. Bu amaçla, saflaştırılmış sığır P450 redüktazın biyokatalitik aktivitesinin değerlendirilmesi için başlıca sitokrom P4502B izozimi tarafından katalizlenen benzfetamin N-demetilasyon reaksiyonu seçildi. CYP2B4 ve sitokrom P450 redüktaz sentetik lipit olarak fosfatidilkolin dilaurol bulunan ortamlarda tek başlarına önemli bir benzfetamin N-demetilasyon aktivitesi göstermedi. Saflaştırılmış sığır P450 redüktazın ve tavşan karaciğer CYP2B4'ün biyokatalitik olarak aktif olduğu ise lipit bulunan ortamda biraraya gelip benzfetamin N-demetilasyon reaksiyonunu katalize etmeleri ile gösterildi. Saflaştırılmış her iki enzimin artan konsantrasyonlarının benzfetamin N-demetilasyon aktivitesine olan etkileri test edildi. 0.1 ünite sitokrom P450 redüktaz içeren yeniden oluşturulmuş sistemlerde ki CYP2B4 miktarının 0.1 nmol'den 0.2 nmol'e artırılması aktivitenin 4.14'den ( $\text{nmol dak}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ) 5.93'e ( $\text{nmol dak}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ) çıkmasına neden oldu. Bu sonuç yeniden oluşturulmuş sistemlerde P450 redüktaz enziminin hız sınırlayıcı ("rate-limiting") enzim olduğunu gösterdi. Bundan dolayı P450 redüktazın 0.05-0.2 ünite aralığındaki artan konsantrasyonlarının 0.2 nmol CYP2B4 içeren yeniden oluşturulmuş sistemlerdeki benzfetamin N-demetilasyon aktivitesine olan etkisi incelendi (Şekil 3.11). Elde edilen sonuçlar benzfetamin N-demetilasyon aktivitesinin P450 redüktazın 0.15 ünitelik miktarına kadar doğrusal olarak arttığını, bu noktadan sonra ise aktivitedeki doğrusal artışın kaybolduğunu gösterdi.



**Şekil 3.11** Artan miktarlarda saflaştırılmış sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazın, 0.2 nmol saflaştırılmış tavşan karaciğer CYP2B4 ve sentetik lipid fosfatidilkolin dilaurol içeren yeniden oluşturulmuş sistemlerdeki benzfetamin N-demetilasyon aktivitesine olan etkisi. BND-Benzfetamin N-demetilasyon aktivitesi “Yöntemler” kısmında anlatıldığı üzere belirlendi. İnkübasyon karışımları, 0.5 ml’lik reaksiyon hacmi içerisinde 100 mM HEPES tamponu, pH 7.7, 1.5 mM benzfetamin-HCL, uygun miktarlarda biraraya getirilmiş enzimler ve 0.5 mM NADPH oluşturan sistem içerdi. Veriler, ikili ölçümlerin ortalamasını temsil etmektedir.

### 3.6.6 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer P450 Redüktaz ve Koyun Akciğer P450 Redüktaz Enzimlerinin Stabilitelerinin Karşılaştırılması

Saflaştırılmış sığır karaciğer ve koyun akciğer P450 redüktazlarının sıcaklığa karşı dayanıklılıkları, saf enzimlerin 37°C’de %20 gliserol içeren ve içermeyen ortamlarda belirli süre inkübe edilmesi sonucu ölçülen sitokrom c indirgenme hızlarının 550 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlendi (Şekil 3.12). Gliserol içeren ortamda her iki enzimin gliserol içermeyen ortama göre daha dayanıklı olduğu bulundu. Koyun akciğer P450 redüktazının sığır karaciğer P450 redüktazına göre gliserol içeren ve içermeyen ortamlarda daha az dayanıklı olduğu ve aktivitesini hızlı bir şekilde kaybettiği görüldü. Koyun akciğer P450 redüktazının 37°C’de gliserol içeren ortamda 1 saat inkübe edilmesi aktivitenin, %35’e



**Şekil 3.12** Sığır karaciğer (A) ve koyun akciğer (B) P450 redüktazlarının 37°C'de %20 gliserol varlığında ve yokluğunda sıcaklığı karşı dayanıklılıkları. Safılaştırılmış enzimler belirtilen süre kadar 37°C'de inkübe edildi ve bu sürenin sonunda enzim aktivitesi oda sıcaklığında ölçüldü. Veriler, ikili ölçümlerin ortalamasını temsil etmektedir.

düşmesine neden olurken, gliserol içermeyen ortamdaki inkübasyon sonucu bu değer %25 olarak bulundu (Şekil 3.12). Aynı şekilde sığır karaciğer P450 redüktazın 37°C'de gliserol içeren ortamda 1 saat inkübe edilmesi aktivitenin %48'e düşmesine neden olurken, bu değer gliserol içermeyen ortamdaki inkübasyon sonucu %28 olarak bulundu. Koyun akciğer P450 redüktazın gliserol içermeyen ortamda 3 saat süre ile inkübe edilmesi, aktivitenin



nerdeyse tamamen kaybolmasına neden olurken, gliserol içeren ortamdaki inkübasyon sonucu aktivitenin %10'a kadar düştüğü görüldü. Sığır karaciğer P450 redüktazın ise gliserol içeren ve içermeyen ortamlarda 3 saatlik inkübasyonu aktivitenin sırasıyla %29 ve %16'ya düşmesine neden oldu (Şekil 3.12).

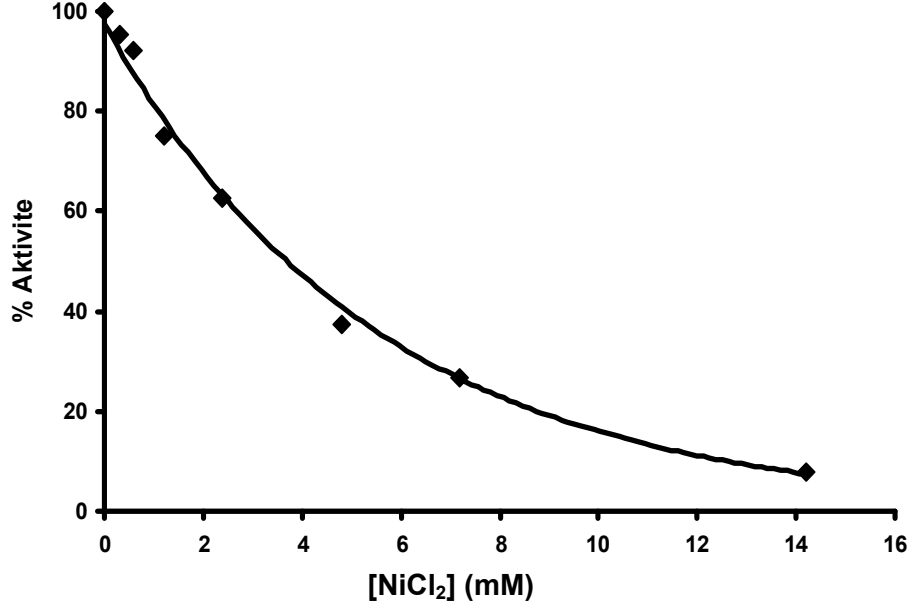
### **3.7 Metal İyonlarının Saf Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi**

Metallerin saf sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz üzerine olan etkisine değişik konsantrasyonlarda nikel, kadmiyum ve kurşun metalleri kullanılarak bakıldı. Yürütülen deneylerde test edilen metallerin konsantrasyonları arttıkça saf P450 redüktaz aktivitesinde düşüşe sebep olduğu görüldü. Şekil 3.13-3.15 sırasıyla nikel, kadmiyum ve kurşunun konsantrasyona bağlı olarak enzim aktivitesinde yol açtığı düşüşü göstermektedir. Bu grafiklerden elde edilen sonuçlardan  $IC_{50}$  değerleri  $NiCl_2$ ,  $CdCl_2$  ve  $Pb(NO_3)_2$  için sırası ile 2.92 mM, 0.06 mM ve 0.03 mM bulundu (Tablo 3.6). Bu sonuçlar test edilen metaller içinde en yüksek inhibisyona kurşunun sebep olduğunu gösterdi.

Nikel metalinin inhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde, reaksiyon ortamında nikel üç ayrı konsantrasyonda (1.2 mM, 2.4 mM ve 4.8 mM), substrat ise dört ayrı konsantrasyonda (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M ve 80  $\mu$ M) konuldu.  $1/v$  karşı  $1/[S]$  ( $1/[\text{sitokrom c}]$ ) (Lineweaver-Burk grafiği) çizildiğinde dört çizginin X-ekseni üzerinde bir noktada kesiştiği bulundu. Aynı veriler ile Dixon grafiği de çizildi ve bu grafikte de deney sonuçları X-ekseni üzerinde tek noktada kesişti (Şekil 3.16). Hem Lineweaver-Burk grafiği hem de Dixon grafiği inhibisyon mekanizmasının yarışmacı olmayan ("noncompetitive") türde olduğunu gösterdi. Dixon grafiği kinetik analizlerde mekanizmanın belirlenmesinde ve  $K_i$  değerinin hesaplanmasında genellikle kullanılan bir grafik olduğu için  $K_i$  değerinin hesaplanmasında bu grafik kullanıldı. Dixon grafiğinden  $K_i$  değeri 2 mM bulundu (Tablo 3.7).

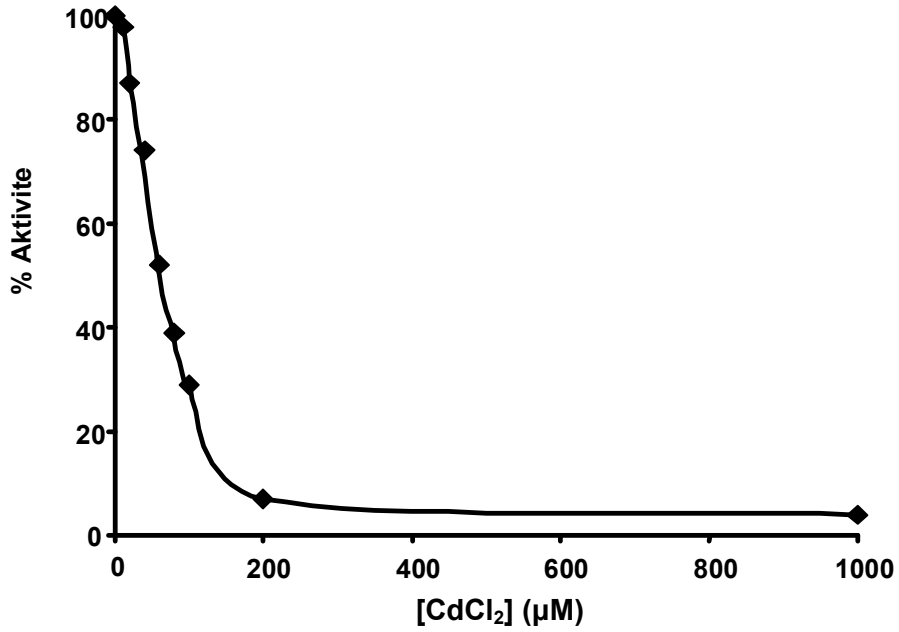
Kadmiyum metalinin inhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde, reaksiyon ortamında kadmiyum üç ayrı konsantrasyonda (40  $\mu$ M, 60  $\mu$ M ve 80  $\mu$ M), substrat ise üç ayrı konsantrasyonda (20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M ve 80  $\mu$ M) konuldu.  $1/v$  karşı  $1/[S]$  ( $1/[\text{sitokrom c}]$ ) (Lineweaver-Burk grafiği) çizildiğinde üç çizginin X-ekseni üzerinde bir noktada kesiştiği bulundu. Aynı veriler ile Dixon grafiği de çizildi ve bu grafikte de deney sonuçları X-ekseni üzerinde tek noktada kesişti. Hem Lineweaver-Burk grafiği hem de Dixon grafiği inhibisyon mekanizmasının yarışmacı olmayan ("noncompetitive") türde olduğunu gösterdi. Şekil

Saf Sığır NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enzim  
Aktivitesi Üzerine Nikel Etkisi



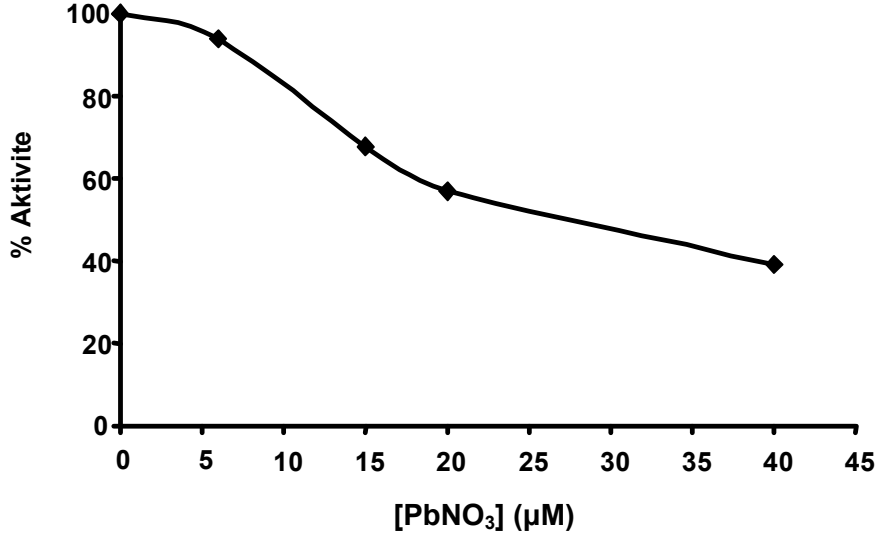
Şekil 3.13 Nikel iyonunun saf sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Saf Sığır NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enzim  
Aktivitesi Üzerine Kadmiyum Etkisi



Şekil 3.14 Kadmiyum iyonunun saf sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Saf Sığır NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enzim  
Aktivitesi Üzerine Kurşun Etkisi



**Şekil 3.15** Kurşun iyonunun saf sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

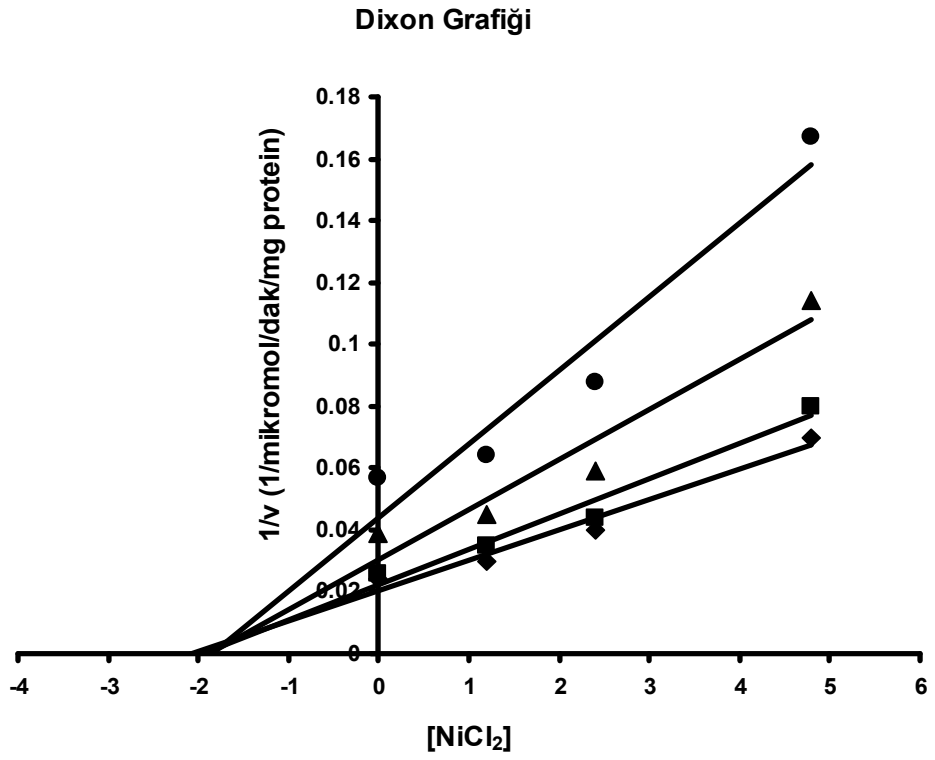
3.17’de kadmiyum metalinin saf NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine etkisinin Dixon grafiği verilmektedir. Dixon grafiğinden  $K_i$  değeri 0.04 mM bulundu (Tablo 3.7).

Kurşun metalinin inhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde, reaksiyon ortamında kurşun üç ayrı konsantrasyonda (15 µM, 20 µM ve 40 µM), substrat (sitokrom c) ise üç ayrı konsantrasyonda (20 µM, 40 µM ve 80 µM) konuldu.  $1/v$  karşı  $1/[S]$  ( $1/[\text{sitokrom c}]$ ) (Lineweaver-Burk grafiği) çizildiğinde dört çizginin X-ekseni üzerinde bir noktada kesiştiği bulundu. Aynı veriler ile Dixon grafiği de çizildi ve bu grafikte de deney sonuçları X-ekseni üzerinde tek noktada kesişti. Hem Lineweaver-Burk grafiği hem de Dixon grafiği inhibisyon mekanizmasının “noncompetitive” (yarışmacı olmayan) türde olduğunu gösterdi. Şekil 3.18’de kurşun metalinin saf NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerine etkisinin Dixon grafiği verilmektedir. Dixon grafiğinden  $K_i$  değeri 0.03 mM bulundu (Tablo 3.7).

**Tablo 3.6** Saf sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine metallerin etkisi

<b>Metal iyonları</b>	<b>Metallerin IC<sub>50</sub> değerleri *</b>
Ni <sup>+2</sup>	2.92 mM
Cd <sup>+2</sup>	0.06 mM
Pb <sup>+2</sup>	0.03 mM

\* IC<sub>50</sub> değeri sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesinde %50 inhibisyona sebep olan metal konsantrasyonudur.

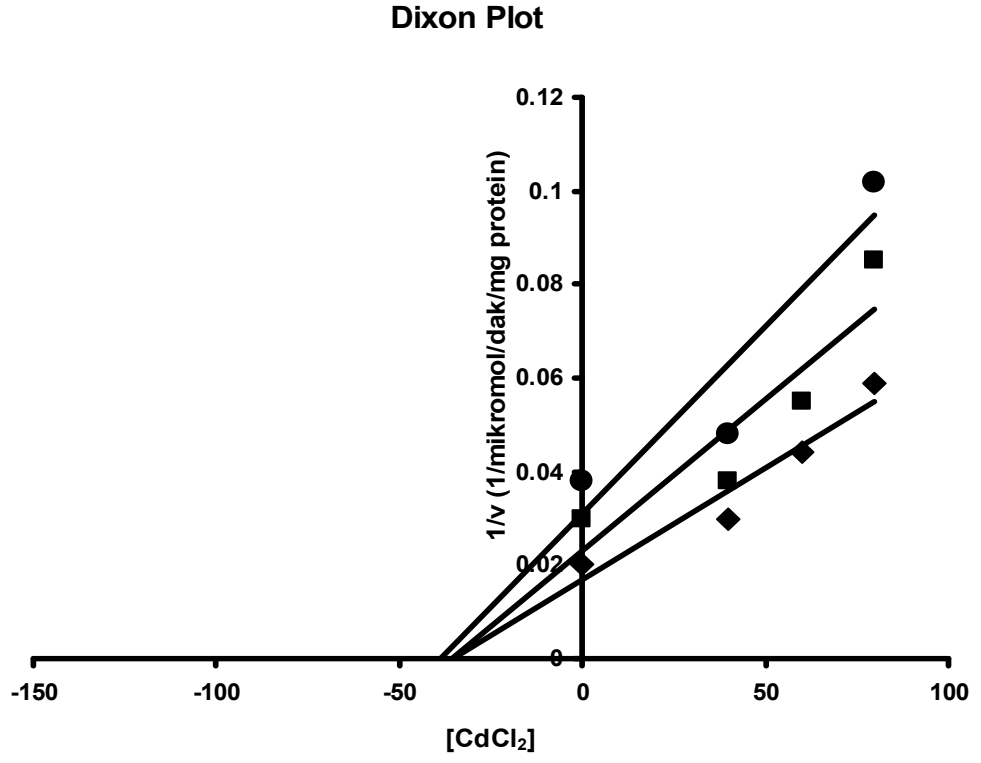


**Şekil 3.16** Nikel iyonunun saf sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin mekanizma alışması. Dixon Grafiği

**Tablo 3.7** Saf sığır karaciğer NADPH-Sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerine metallerin etki mekanizması ve  $K_i$  değerleri

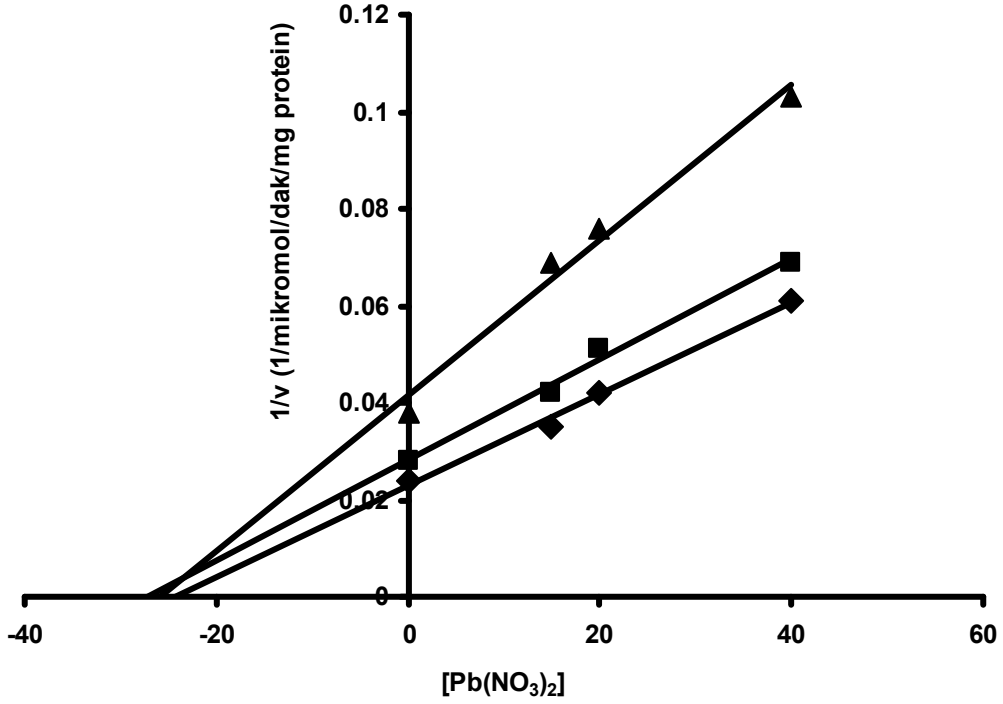
<b>Metal İyonları</b>	<b><math>K_i</math> (mM) *</b>	<b>İnhibisyon Türü</b>
$Ni^{+2}$	2	Noncompetitive
$Cd^{+2}$	0.04	Noncompetitive
$Pb^{+2}$	0.03	Noncompetitive

\*  $K_i$  değerleri Dixon grafiğinden hesaplandı.



**Şekil 3.17** Kadmiyum iyonunun saf sıgır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin mekanizma çalışması. Dixon Grafiği

### Dixon Grafiği



**Şekil 3.18** Kurşun iyonunun saf siğir karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin mekanizma alışması. Dixon Grafiği

### 3.8 Siğir Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazın İmmünolojik Karakterizasyonu

#### 3.8.1 Saflaştırılmış Siğir Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazına Karşı Poliklonal Antikor Üretilmesi ve Western-Blot Analizleri

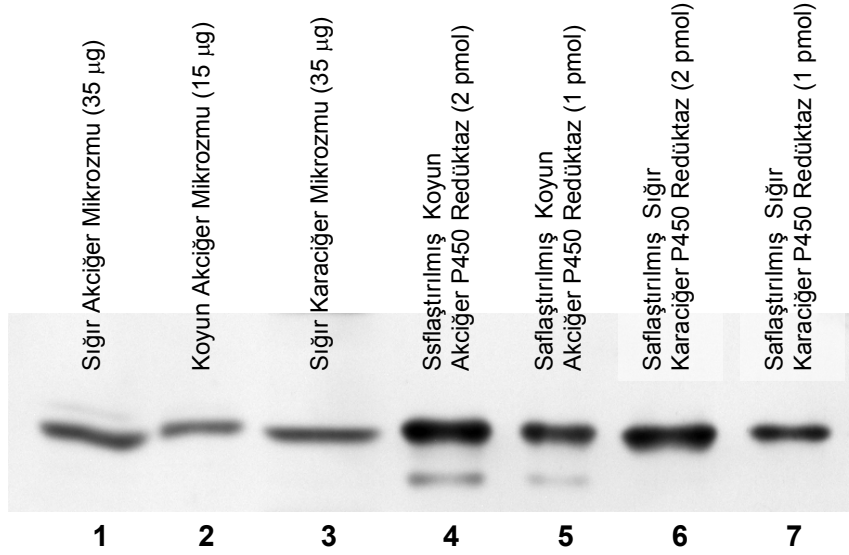
Proje kapsamında siğir karaciğer dokusundan saflaştırılan sitokrom P450 redüktaz enzimine karşı daha önce hiç üretilmemiş olan poliklonal antikorlar üretildi. Ayrıca, siğir karaciğer P450 redüktazının koyun akciğer P450 redüktazı ile olan immünolojik benzerliklerini veya farklılıklarını ortaya koymak için saflaştırılmış koyun akciğer redüktazına karşı da poliklonal antikorlar üretildi. Böylece siğir karaciğer P450 redüktazının immünolojik karakterizasyonu yapılarak, biyokimya, farmakoloji, toksikoloji ve onkoloji alanlarında ve ilaç sanayiinde ve bir takım biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanı mevcut olan endüstriyel bir ürün elde edilmiş oldu.



Şekil 3.19, saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikolar ve koyun ve sığır dokularına ait mikrozoimler ve saflaştırılmış sitokrom P450 redüktazlar kullanılarak elde edilen Western-blot analizi neticesini göstermektedir. Saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikoların, sitokrom P450 redüktaz proteinini çok daha iyi tanıdığı ve koyuluğu oldukça iyi olan spesifik bandlar verdiği görüldü (Şekil 3.19). Üretilen antikoların, sığır karaciğer, sığır akciğer ve koyun akciğer mikrozoimleri ile güçlü bir spesifik etkileşime girdiği görülürken, artan miktarlardaki saflaştırılmış koyun akciğer ve sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz enzimleri ile olan reaksiyonları ise koyuluğu oldukça yüksek olan spesifik bandlar üretti (Şekil 3.19 ve Tablo 3.8). Üretilen anti-sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz antikolarının, saflaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktaz preparasyonunda bulunan çok küçük miktarlarda ki kırılmış enzimi (enzimin membrana bağlı küçük hidrofobik peptit kısmını içermeyen yalnız hidrofilik peptit kısmı, bakınız kısım 1.1.2) de tanıdığı görüldü (Şekil 3.19 ve kuyular 4 ve 5).

### **3.8.2 Saflaştırılmış Sığır Karaciğer ve Koyun Akciğer P450 Redüktazlarına Karşı Üretilen Poliklonal Antikoların Mukayesi**

Sığır karaciğer P450 redüktazının koyun akciğer P450 redüktazı ile olan immünolojik benzerliklerini veya farklılıklarını ortaya koymak için koyun akciğer P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikolar kullanılarak aynı numunelerle Western-blot analizi tekrar edildi (Şekil 3.20). Anti-koyun akciğer P450 redüktaz antikolarının, anti-sığır karaciğer P450 redüktaz antikolarına benzer şekilde sığır karaciğer, sığır akciğer ve koyun akciğer mikrozoimleri ve saflaştırılmış koyun akciğer ve sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz enzimleri ile spesifik bir reaksiyona girdiği ve dansitesi oldukça iyi olan bandlar ürettiği görüldü (Şekil 3.20). Anti-koyun akciğer sitokrom P450 redüktaz antikolarının en güçlü spesifik bağlanmayı ise sığır karaciğer veya sığır akciğer sitokrom P450 redüktaz enzimlerine nispeten koyun akciğer sitokrom P450 redüktazı ile gösterdiği görüldü (Şekil 3.20 ve Tablo 3.9).

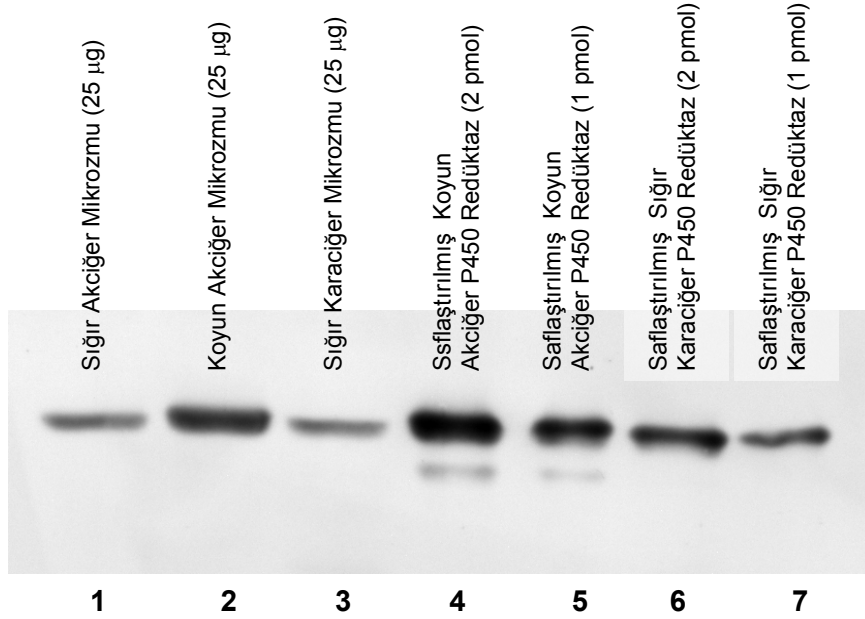


**şekil 3.19** Safılaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikorlar kullanılarak elde edilen karaciğer ve akciğer mikroozmlarının ve safılaştırılmış P450 redüktaz enzimlerinin Western-blot analiz sonuçları. **Kuyu 1:** sığır akciğer mikroozmları (35 µg); **kuyu 2:** koyun akciğer mikroozmları (15 µg); **kuyu 3:** sığır karaciğer mikroozmları (35 µg); **kuyu 4:** safılaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktazı (2 pmol); **kuyu 5:** safılaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktazı (1 pmol); **kuyu 6:** safılaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazı (2 pmol); **kuyu 7:** safılaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazı (1 pmol).

**Tablo 3.8** Saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikörlerin değişik mikrozomlarla ve saf sitokrom P450 redüktazlarla oluşturduğu bandların densitometrik analiz sonuçları

Kuyular	Nispi Pik Alanları*
1 (Sığır akciğer mik., 35 µg)	2856
2 (Koyun akciğer mik., 15 µg)	2083
3 (Sığır karaciğer mik., 35 µg)	2493
4 (Saflaştırılmış koyun akciğer P450 redüktaz, 2 pmol)	4535
5 (Saflaştırılmış koyun akciğer P450 redüktaz, 1 pmol)	3333
6 (Saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz, 2 pmol)	4356
7 (Saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz, 1 pmol)	2379

\* Western-blot deneyi “Yöntemler” kısmında anlatıldığı gibi yapılmıştır. Nitroselüloz membranda boyama sonucu ortaya çıkan bandlar, bilgisayara bağlı jel görüntüleme sistemi (Infinity 3000-CN-3000 darkroom) (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee Cedex 1, France) ve “Infinity-Capt Version 12.9” yazılımı ile görüntülendi ve fotoğrafı çekildi. Bandların densitometrik analizleri ise “Scion Image Version Beta 4.0.2 software” kullanılarak yapıldı.



**Şekil 3.20** Safılaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikolar kullanılarak elde edilen karaciğer ve akciğer mikrozomlarının ve safılaştırılmış P450 redüktaz enzimlerinin Western-blot analiz sonuçları. **Kuyu 1:** sığır akciğer mikrozomları (25 µg); **kuyu 2:** koyun akciğer mikrozomları (25 µg); **kuyu 3:** sığır karaciğer mikrozomları (25 µg); **kuyu 4:** safılaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktazı (2 pmol); **kuyu 5:** safılaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktazı (1 pmol); **kuyu 6:** safılaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazı (2 pmol); **kuyu 7:** safılaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazı (1 pmol).

**Tablo 3.9** Saflaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikörlerin değişik mikrozomlarla ve saf sitokrom P450 redüktazlarla oluşturduğu bandların densitometrik analiz sonuçları

Kuyular	Nispi Pik Alanları*
1 (Sığır akciğer mik., 25 µg)	1973
2 (Koyun akciğer mik., 25 µg)	4306
3 (Sığır karaciğer mik., 25 µg)	2000
4 (Saflaştırılmış koyun akciğer P450 redüktaz, 2 pmol)	5968
5 (Saflaştırılmış koyun akciğer P450 redüktaz, 1 pmol)	4526
6 (Saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz, 2 pmol)	4135
7 (Saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz, 1 pmol)	2656

\* Western-blot deneyi “Yöntemler” kısmında anlatıldığı gibi yapılmıştır. Nitroselüloz membranda boyama sonucu ortaya çıkan bandlar, bilgisayara bağlı jel görüntüleme sistemi (Infinity 3000-CN-3000 darkroom) (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee Cedex 1, France) ve “Infinity-Capt Version 12.9” yazılımı ile görüntülendi ve fotoğrafı çekildi. Bandların densitometrik analizleri ise “Scion Image Version Beta 4.0.2 software” kullanılarak yapıldı.

### **3.9 Antikanser İlaç İdarubisin’in Etki Mekanizmasının Saflaştırılmış NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enzimleri Kullanılarak Araştırılması**

İdarubisin antikanser tedavisinde efektif olarak kullanılan sentetik bir antrasiklin analogudur. 1950’li yıllardan beri kullanılmakta olan antikanser ilaç mitomisin C’nin etki mekanizması bilinmekle beraber, 1990’lı yıllarda piyasaya sürülen ve yan etkileri diğer antrasiklin ilaçlara nazaran daha az olan idarubisinin moleküler düzeydeki etki mekanizmasını açıklayan bir yayına şimdiye kadar rastlanmamıştır. Çalışmanın bu kısmı, antikanser ilaç idarubisinin etki mekanizmasının moleküler düzeyde aydınlatılması için yapılmıştır.

#### **3.9.1 NADPH Oksidasyonu Ölçülerek İdarubisin İndirgenme Hızlarının Tayini**

Saflaştırılmış sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazın antikanser ilaç idarubisin biyoaktivasyonundaki rolü, öncelikli olarak saflaştırılan enzimin bu ilacın bir elektron indirgenmesini katalize edebileceği ile gösterildi. İdarubisin kullanılarak yürütülen

enzim assayleri aynı reaksiyon şartları altında mitomisin C ile tekrar edildi ve elde edilen sonuçlar mukayese edildi. Mitomisin C bu çalışmada model bir biyoredüktif bileşik olarak kullanıldı. Çünkü, mitomisin C, iyi bilinen redoks aktif kinon içeren bir antikanser ilaçtır ve sitokrom P450 redüktaz tarafından 1-elektron indirgenmesine uğrayarak oksijen radikalleri üretir (Seow ve ark.'ları, 2004). Saflaştırılmış sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazı tarafından idarubisin ve mitomisin C indirgenmesinin nispi ilk hızları, "Yöntemler" kısmında ayrıntılı olarak anlatıldığı üzere aerobik şartlar altında NADPH kofaktör tüketiminin spektrofotometrik yöntemle 340 nm'de okunması ile tespit edildi. Elde edilen sonuçlar (Tablo 3.10) saflaştırılmış koyun akciğer ve tavşan karaciğer sitokrom P450 redüktazları tarafından katalizlenen indirgenme hızları ile mukayese edildi. Saflaştırılmış her üç sitokrom P450 redüktazı tarafından NADPH'ye bağlı sitokrom c indirgenmesinin özgül hızları yaklaşık 31000 nmol/dak/mg saflaştırılmış protein olarak bulundu. Tablo 3.10'da görüldüğü üzere tüm saflaştırılmış sitokrom P450 redüktazlar, idarubisin indirgenmesini mitomisin C indirgenmesine göre yaklaşık 2.1 ve 2.3 kat arasındaki daha yüksek hızlarda katalize etti. Enzim kaynağı olarak saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktazı kullanıldığı zaman idarubisin ve mitomisin C indirgenmelerinin spesifik aktiviteleri sırası ile 5673.9 ve 2452.8 nmol oksitlenmiş NADPH/dakika/mg protein bulundu. Bulunan bu hız değerleri saflaştırılmış tavşan karaciğer P450 redüktazı tarafından katalizlenenler ile hemen hemen aynı idi. Ancak, koyun akciğer P450 redüktazı idarubisin ve mitomisin C indirgenmesini katalizlemede diğer P450 redüktazlara göre daha az etkili bulundu (Tablo 3.10). Bu farklılık, değişik türlerden saflaştırılan P450 redüktazların üç-boyutlu yapılarındaki, amino asit dizisindeki farklılıkların bir sonucu olarak ortaya çıkan farklılıklardan ileri gelebilir.

Enzim ve ilaç içermeyen kontrol inkübasyonları da aynı deney şartları altında gerçekleştirildi. Enzim yokluğunda, idarubisin ve mitomisin C NADPH tarafından indirgenmedi. Her iki ilacın yokluğunda çok küçük bir endojen aktivite ölçüldü. Ölçülen bu endojen aktiviteler tam inkübasyon karışımlarında gözlenen enzimatik reaksiyon hızlarından çıkartıldı, böylelikle reaksiyon hızları düzeltildi.

**Tablo 3.10** Sığır karaciğerinden, fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğerinden ve koyun akciğerinden saflaştırılan sitokrom P450 redüktazların katalizlediği NADPH oksidasyonu ile belirlenen idarubisin ve mitomisin C indirgenmeleri

Saflaştırılmış Enzim Kaynağı	Sitokrom c İndirgenmesi <sup>a</sup> (nmol dak <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	NADPH Oksidasyonu <sup>b</sup> (nmol dak <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	
		İdarubisin ile İndüklenmiş	Mitomisin C ile İndüklenmiş
Sığır Karaciğer P450 Redüktazı	30891.7	5673.9	2452.8
Tavşan Karaciğer P450 Redüktazı	31735.6	5112.2	2425.7
Koyun Akciğer P450 Redüktazı	31087.3	3111.7	1461.6

Herbir enzim ölçümü için deneysel şartlar “Yöntemler” kısmında ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Veriler, ikili ölçümlerin ortalamasını temsil etmektedir.

<sup>a</sup> NADPH'ye-bağlı sitokrom c redüktaz aktiviteleri 25°C'de 0.3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.7 içinde ölçülmüştür.

<sup>b</sup> İnkübasyon karışımı 1.0 ml'lik reaksiyon hacmi içerisinde 25°C'de 0.3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.7, 0.1 mM EDTA, pH 7.7, idarubisin (25 µM) mitomisin C (25 µM), uygun miktarlarda saf P450 redüktazlar ve 0.1 mM NADPH içerdi.

### 3.9.2 Plazmid DNA Zincir Kırılım Deneyi Sonuçlarının Analizi

Saflaştırılmış sığır karaciğer ve koyun akciğer P450 redüktazları kullanılarak yürütülen plazmid DNA kırılması deneylerinde, bu enzimlerin idarubisin ve kofaktör NADPH varlığında DNA'ya hasar veren ürünleri oluşturduğu gösterildi. Bu durum DNA'da tek zincir kırıklarının indüklenmesinden kaynaklanan süperkatlı (SC, form I) formun, açık halkasal (OC, form II) forma dönüşmesinden anlaşıldı. P450 redüktaz ve NADPH bulunan ortamda antikanser ilaç idarubisinin neden olduğu DNA hasarının mekanizmasının belirlenmesi çalışmalarında, bu assayi optimize etmek için DNA hasarının artan redüktaz enzimi miktarına, artan antikanser ilacı miktarına ve artan inkübasyon zamanına göre nasıl değiştiğinin saptanması gerekti. Bir ön deneme kapsamında yapılan bu çalışmalarda koyun akciğer redüktaz enzimi kullanıldı. Ayrıca, idarubisin kullanılarak yürütülen plazmid DNA deneyleri aynı reaksiyon şartları altında mitomisin C ile tekrar edildi ve elde edilen sonuçlar mukayese edildi.

Artan inkübasyon zamanının, ilaç konsantrasyonunun ve enzim miktarının, saflaştırılmış koyun akciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazı varlığında, idarubisinle ve

mitomisin C ile indüklenmiş DNA zincir kırıklarının oluşmasına olan etkileri şekiller Tablo 3.11-13'te gösterilmektedir. Yürütülen deneylerde DNA hasarının derecesinin, her iki ilaç için de artan inkübasyon zamanına (5-90 dakika) (Tablo 3.11) veya ilaç konsantrasyonuna (1-400 µM) (Tablo 3.12), bunun yanısıra artan enzim miktarına (0.025-1.25 µg) (Tablo 3.13) göre arttığı bulundu. NADPH, enzim veya ilaç inkübasyon karışımlarından çıkarıldığında ise herhangi bir DNA hasarının oluşmadığı bulundu.

Tablo 3.11, idarubisinle ve mitomisin C ile indüklenmiş DNA hasarının, aynı ilaç konsantrasyonlarında artan inkübasyon zamanına göre mukayesesini göstermektedir. Plazmid DNA'nın saflaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktaz ve kofaktör NADPH varlığında idarubisinle 30 dakikalık aerobik inkübasyonunun, OC formunda kontrole nazaran yaklaşık %40'lık bir artışla sonuçlandığı, 90 dakikalık inkübasyonunun ise kontrole göre yaklaşık %75'lik bir artış ürettiği gösterildi (Tablo 3.11). Aynı şartlar altında idarubisin yerine mitomisin C kullanıldığında benzer sonuçlar elde edildi (Tablo 3.11).

Artan ilaç konsantrasyonlarının bu ilaçların kofaktör NADPH varlığında sitokrom P450 redüktaz tarafından redüktif aktivasyonları esnasında indüklenen plazmid DNA zincir kırıklarının oluşumuna olan etkisi ise Tablo 3.12'de gösterilmektedir. 100 µM konsantrasyonda, her iki ilacın, saflaştırılmış koyun akciğer P450 redüktazı varlığında, DNA kırıklarında kontrolün üzerinde %40'lık bir artışa neden olduğu, 200 ve 400 µM konsantrasyonlarda ise idarubisinin mitomisin C'ye göre DNA hasarını indüklemeye %20 ve %24 daha etkili olduğu bulundu (Tablo 3.12).

Bunlara ek olarak idarubisin ve mitomisin C ile indüklenen DNA hasarının artan enzim miktarına göre karakterizasyonu için sonuçlar Tablo 3.13'te gösterilmektedir. İdarubisinle indüklenen DNA hasarının boyutunun artan enzim miktarına bağlı olarak 0.2 µg'a kadar arttığı, bu noktadan sonra ise doygunluğa ulaşıldığı bulundu. Mitomisin C varlığında ise bu doygunluk noktasına daha yüksek bir enzim miktarında (1.0 µg) ulaşıldı (Tablo 3.13).



**Tablo 3.11** Artan inkübasyon zamanının, kofaktör NADPH ve saflaştırılmış koyun akciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz varlığında, idarubisinle ve mitomisin C ile indüklenen plazmid DNA zincir kırıklarının oluşumuna olan etkisi

İnkübasyon Zamanı (dak)	% OC-DNA <sup>a</sup>	
	İdarubisin ile İndüklenen	Mitomisin C ile İndüklenen
0	6.9	8.6
5	16.4	20.1
10	27.6	30.3
20	40.0	43.9
30	47.7	52.2
45	64.7	62.0
60	72.6	70.5
90	82.2	82.9

<sup>a</sup> Süperkatlı pBR322 DNA (1.0 µg), 100 mM sodyum fosfat tamponu, pH 7.4, içerisinde, saflaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktaz (0.1 µg), idarubisin veya mitomisin C (100 µM) ve NADPH (2 mM) ile 60 µl'lik son reaksiyon hacminde aerobik şartlar altında 37°C'de değişik zaman aralıklarında (0-90 dakika) inkübe edildi ve agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Jellerin fotoğrafı çekildi ve DNA hasarının miktarı belirlendi: % OC-DNA "Yöntemler" kısmında anlatıldığı şekliyle hesaplandı. OC, açık halkasal ("open circular") (form II).

**Tablo 3.12** Artan ilaç konsantrasyonunun, kofaktör NADPH ve saflaştırılmış koyun akciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz varlığında, idarubisinle ve mitomisin C ile indüklenen plazmid DNA zincir kırıklarının oluşumuna olan etkisi

İlaç Konsantrasyonu (µM)	% OC-DNA <sup>a</sup>	
	İdarubisin ile İndüklenen	Mitomisin C ile İndüklenen
0	9.7	9.4
1	11.1	12.4
50	46.1	40.6
100	54.1	48.3
200	72.4	52.7
400	84.7	60.9

<sup>a</sup> Süperkatlı pBR322 DNA (1.0 µg), 100 mM sodyum fosfat tamponu, pH 7.4, içerisinde, saflaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktaz (0.1 µg), NADPH (2 mM) ve değişik konsantrasyonlarda idarubisin veya mitomisin C (0-400 µM) ile 60 µl'lik son reaksiyon hacminde aerobik şartlar altında 37°C'de 30 dakika inkübe edildi ve agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Jellerin fotoğrafı çekildi ve DNA hasarının miktarı belirlendi: % OC-DNA "Yöntemler" kısmında anlatıldığı şekliyle hesaplandı. OC, açık halkasal ("open circular") (form II).

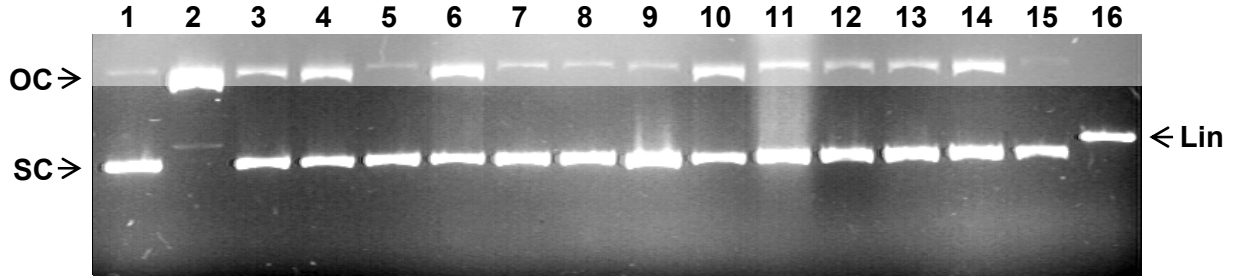
**Tablo 3.13** Artan enzim miktarının, kofaktör NADPH ve saflaştırılmış koyun akciğer NADPH-sitokrom P450 redüktaz varlığında, idarubisinle ve mitomisin C ile indüklenen plazmid DNA zincir kırıklarının oluşumuna olan etkisi

NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Miktarı (µg)	% OC-DNA <sup>a</sup>	
	İdarubisin ile İndüklenen	Mitomisin C ile İndüklenen
0	9.7	14.9
0.025	29.6	32.2
0.05	42.2	38.8
0.1	50.1	46.1
0.2	65.3	54.1
1.0	63.0	71.9
1.25	64.9	69.6

<sup>a</sup> Süperkatlı pBR322 DNA (1.0 µg), 100 mM sodyum fosfat tamponu, pH 7.4, içerisinde, NADPH (2 mM), idarubisin veya mitomisin C (0-400 µM) ve artan miktarlarda saflaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktaz (0-1.25 µg) ile 60 µl'lik son reaksiyon hacminde aerobik şartlar altında 37°C'de 30 dakika inkübe edildi ve agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Jellerin fotoğrafı çekildi ve DNA hasarının miktarı belirlendi: % OC-DNA "Yöntemler" kısmında anlatıldığı şekliyle hesaplandı. OC, açık halkasal ("open circular") (form II).

### 3.9.3 İdarubisinin NADPH-Sitokrom P450 Redüktazı Tarafından Biyoredüktif Aktivasyonu Esnasında Reaktif Oksijen Türleri ("ROS") Oluşumunun Gösterilmesi

İdarubisin tarafından oluşan DNA hasarının mekanizmasını incelemek ve bu proseste ilgisi olan radikal türleri belirlemek amacıyla, antioksidan enzimler SOD ve katalaz ve hidroksil radikal süpürücülerinden DMSO ve tiyoüre kullanıldı. Bu amaçla öncelikli olarak OH<sup>•</sup> oluşturan sistem (ferrik klorür-EDTA-askorbat) tarafından üretilen hidroksil radikallerinin DNA hasarının indüklenmesindeki etkileri gösterildi. Şekil 3.21'de görüldüğü üzere, pBR322 plazmid DNA'nın OH<sup>•</sup> oluşturan sisteme maruz bırakılması, süperkatlı formun tamamıyla açık halkasal ve lineer formlara dönüşmesine neden oldu (kuyu 2). OH<sup>•</sup>-indüklenmiş DNA zincir kırıklarının miktarının DMSO ve tiyoürenin eklenmesi ile azaldığı bulundu (kuyular 3 ve 4). Tiyoürenin 10 mM konsantrasyonda, OH<sup>•</sup>-indüklenmiş DNA hasarının önlenmesinde 50 mM konsantrasyonda ki DMSO'dan daha az koruyucu olduğu bulundu. Tiyoüre, OH<sup>•</sup>-indüklenmiş DNA zincir kırıklarına karşı %65'lik bir koruma sağlarken, plazmid DNA'nın DMSO ile muamele edilmesi zincir kırıklarında %86'lık bir azalma ile sonuçlandı (Tablo 3.14).



**Şekil 3.21** İdarubisinin, kofaktör NADPH varlığında, saflaştırılmış NADPH-sitokrom P450 redüktazla (P450R) katalizlenen redüktif aktivasyonu sonucu indüklenen plazmid DNA zincir kırıklarına karşı radikal süpürücülerin koruyucu etkilerini gösteren agaroz jel elektroforezi. “Yöntemler” kısmında anlatıldığı üzere, süperkatlı pBR322 DNA (1.0 µg), P450R (0.1 µg), idarubisin (100 µM), NADPH (2 mM) ve değişik radikal süpürücüleri ile belirtilen konsantrasyonlarda 60 µl’lik son reaksiyon hacminde aerobik şartlar altında 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. Agaroz jel elektroforezi, **kuyu 1**, plazmid DNA kontrolü; **kuyu 2**, plazmid DNA + hidroksil radikal oluşturan sistem (10 µM ferrik klorür-20 µM EDTA-1 mM askorbat); **kuyu 3**, plazmid DNA + hidroksil radikal oluşturan sistem + 50 mM DMSO; **kuyu 4**, plazmid DNA + hidroksil radikal oluşturan sistem + 10 mM tiyoüre; **kuyu 5**, plazmid DNA + idarubisin; **kuyu 6**, tam sistem (plazmid DNA + idarubisin + P450R + NADPH); **kuyu 7**, P450R içermeyen kontrol (plazmid DNA + idarubisin + NADPH); **kuyu 8**, NADPH içermeyen kontrol (plazmid DNA + idarubisin + P450R); **kuyu 9**, idarubisin içermeyen kontrol (plazmid DNA + P450R + NADPH); **kuyu 10**, tam sistem (plazmid DNA + idarubisin + P450R + NADPH); **kuyu 11**, tam sistem + SOD (42 unite); **kuyu 12**, tam sistem + katalaz (42 unite); **kuyu 13**, tam sistem + 50 mM DMSO; **kuyu 14**, tam sistem + 10 mM tiyoüre; **kuyu 15**, plazmid DNA kontrolü (0.25 µg); **kuyu 16**, plazmid DNA (0.25 µg) + PstI (20 ünite). SC, süperkatlı (“supercoiled”) (form I); OC, açık halkasal (“open circular”) (form II).

**Tablo 3.14** Radikal süpürücülerinin hidroksil radikalle, idarubisinle ve mitomisin C ile indüklenen DNA zincir kırıklarına karşı koruyucu etkileri

Muamele	Koruma (%) <sup>a</sup>	
	Hidroksil radikal (OH <sup>•</sup> ) ile indüklenmiş	
pBR322 + OH <sup>•</sup> radikal oluş. sis. <sup>b</sup> + DMSO (50 mM)	85.9	
pBR322 + OH <sup>•</sup> radikal oluş. sis. + tiyoüre (10 mM)	64.7	
	İdarubisin ile indüklenmiş	Mitomisin C ile indüklenmiş
Tam sistem <sup>c</sup> + SOD (42 unite)	85.7	86.8
Tam sistem + katalaz (42 unite)	75.6	80.3
Tam sistem + DMSO (50 mM)	71.4	85.9
Tam sistem + tiyoüre (10 mM)	57.5	63.6

DeneySEL şartlar "Yöntemler" kısmında ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

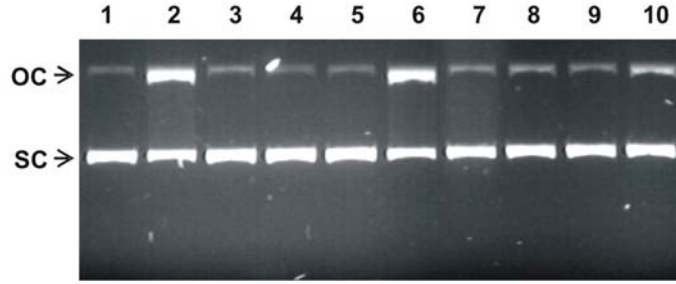
<sup>a</sup> Koruma (%) değerleri "Yöntemler" kısmında belirtilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

<sup>b</sup> Hidroksil radikal (OH<sup>•</sup>) oluşturan sistem 10 µM ferrik klorür-20 µM EDTA-1 mM askorbattan oluşmaktadır.

<sup>c</sup> Tam sistem, 60 µl'lik son reaksiyon hacminde, plazmid DNA (1.0 µg) + idarubisin (100 µM) veya mitomisin C (100 µM) + saflaştırılmış NADPH-sitokrom P450 redüktaz (0.1 µg) + NADPH (2 mM) içermektedir.

Şekil 3.21 ayrıca, idarubisinin P450 redüktazla katalizlenen biyoredüktif aktivasyonu sonucu oluşan DNA zincir kırıklarınının, pBR322 plazmid DNA'nın DMSO ve tiyoüre ile muamele edilmesi ile önemli miktarda azaldığını göstermektedir (kuyular 13 ve 14). 50 mM DMSO, DNA zincir kırıklarında %71'lik bir azalma oluştururken, plazmid DNA'nın 10 mM tiyoüre ile muamelesi %58'lik bir koruma sağladı (Tablo 3.14). Aynı şekilde, SOD ve katalazın da idarubisin ile indüklenen zincir kırıklarına karşı DNA'yı korumada oldukça etkili olduğu bulundu (Şekil 3.21, kuyular 11 ve 12). pBR322 plazmid DNA'nın SOD (42 ünite/assay) ve katalaz (42 ünite/assay) ile muamele edilmesi, idarubisinle indüklenmiş tek zincir kırıklarına karşı sırasıyla %86 ve %76'lık bir koruma sağladı (Tablo 3.14).

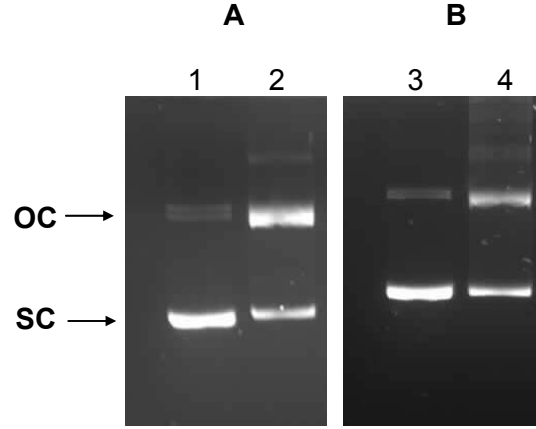
Yukarıda saflaştırılmış P450 redüktaz ve idarubisin kullanılarak yürütülen plazmid DNA deneyleri aynı reaksiyon şartları altında mitomisin C kullanılarak tekrar edildi ve elde edilen sonuçlar idarubisin kullanılarak elde edilenlerle mukayese edildi. Şekil 3.22 ve Tablo 3.14, idarubisin yerine mitomisin C kullanıldığında esasen aynı sonuçların elde edildiğini göstermektedir.



**Şekil 3.22** Mitomisin C'nin, kofaktör NADPH varlığında, saflaştırılmış NADPH-sitokrom P450 redüktazla (P450R) katalizlenen redüktif aktivasyonu sonucu indüklenen plazmid DNA zincir kırıklarına karşı radikal süpürücülerin koruyucu etkilerini gösteren agaroz jel elektroforezi. "Yöntemler" kısmında anlatıldığı üzere, süperkatlı pBR322 DNA (1.0 µg), P450R (0.1 µg), mitomisin C (100 µM), NADPH (2 mM) ve değişik radikal süpürücüleri ile belirtilen konsantrasyonlarda 60 µl'lik son reaksiyon hacminde aerobik şartlar altında 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Agaroz jel elektroforezi, **kuyu 1**, plazmid DNA + mitomisin C; **kuyu 2**, tam sistem (plazmid DNA + mitomisin C + P450R + NADPH); **kuyu 3**, P450R içermeyen kontrol (plazmid DNA + mitomisin C + NADPH); **kuyu 4**, NADPH içermeyen kontrol (plazmid DNA + mitomisin C + P450R); **kuyu 5**, mitomisin C içermeyen kontrol (plazmid DNA + P450R + NADPH); **kuyu 6**, tam sistem (plazmid DNA + mitomisin C + P450R + NADPH); **kuyu 7**, tam sistem + SOD (42 unite); **kuyu 8**, tam sistem + katalaz (42 unite); **kuyu 9**, tam sistem + 50 mM DMSO; **kuyu 10**, tam sistem + 10 mM tiyoüre. SC, süperkatlı ("supercoiled") (form I); OC, açık halkasal ("open circular") (form II).

### **3.9.4 İdarubisinin Safılaştırılmış Sığır Karaciğer NADPH-Sitokrom P450 Redüktazı Tarafından Biyoredüktif Aktivasyonunun Plazmit DNA Deneyleri ile Gösterilmesi**

Plazmid DNA'nın safılaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz, idarubisin ve kofaktör NADPH ile aerobik şartlar altında inkübasyonu, pBR322 plazmid DNA'nın süperkatlı formunun azalması ve beraberinde açık halkasal formunun artması ile sonuçlandı (Şekil 3.23, kuyu 2). Aynı şekilde plazmit DNA deneyi mitomisin C kullanılarak ta tekrar edildi ve idarubisin ile benzer bir sonuç elde edildi (Şekil 3.23, kuyu 4). Şekil 3.23'te görüldüğü üzere yalnız plazmid DNA içeren kontrol inkübasyonları, pBR322 plazmid DNA'nın yaklaşık %10'unun zaten açık halkasal form halinde olduğunu göstermektedir (kuyular 1 ve 3). Plazmid DNA'nın safılaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz ve NADPH kofaktörü bulunan ortamda her iki ilaçla olan aerobik inkübasyonu, pBR322 plazmid DNA'nın açık halkasal formunda yalnız plazmid DNA içeren kontrol inkübasyonuna göre yaklaşık %45 oranında bir artışın oluşmasına neden oldu (kuyular 2 ve 4).



**Şekil 3.23** pBR322 plazmid DNA'nın saflaştırılmış siğir karaciğer P450 redüktaz ve NADPH kofaktörü bulunan ortamda idarubisin (A) ve mitomisin C (B) ile olan aerobik inkübasyonunu gösteren agaroz jel fotoğrafı. Süperkatlı pBR322 plazmid DNA (1.0 µg), 0.9 µg saf siğir sitokrom P450 redüktaz, antikanser ilaçlar (100 µM), NADPH (2 mM) ve 100 mM sodyum fosfat tamponu, pH 7.4 içeren ortamda aerobik şartlar altında 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. **Kuyular 1 ve 3**, yalnız plazmid DNA içeren kontrol inkübasyonları; **kuyu 2**, pBR322 plazmid DNA'nın saflaştırılmış siğir karaciğer P450 redüktaz, NADPH kofaktörü ve idarubisin ile olan inkübasyonu; **kuyu 4**, pBR322 plazmid DNA'nın saflaştırılmış siğir karaciğer P450 redüktaz, NADPH kofaktörü ve mitomisin C ile olan inkübasyonu. OC, açık halkasal ("open circular") form; SC, süperkatlı ("supercoiled") form.

#### 4. TARTIŞMA

NADPH-sitokrom P450 redüktaz (NADPH:ferrihemoprotein redüktaz, E.C. 1.6.2.4) çeşitli dokuların endoplazmik retikulumunda bulunan zara-bağlı amfipatik bir proteindir ve indirgeyici eşdeğerliklerin kofaktör NADPH'ten sitokrom P450'ye transferinden sorumludur. Sitokrom P450 redüktaz, mikrozomal sitokrom P450 monooksijenaz sisteminin temel bir bileşenidir. En basit haliyle monooksijenaz sistemi, sitokrom P450 redüktaz ve sitokrom P450 adı verilen hem protein ailesinden oluşur ve çeşitli ilaçların, ksenobiyotiklerin ve steroidler, yağ asitleri ve prostaglandinleri de içeren birtakım endojen maddelerin oksidatif metabolizmasından sorumludur. Sitokrom P450 redüktaz, sitokrom P450'ye bağlı monooksijenaz sisteminde ki bu görevine ilaveten, sitokrom c, potasyum ferrisiyanit ve 2, 6-diklorofenolindofenol (DCPIP) gibi birtakım fizyolojik olmayan elektron alıcıların 1-elektron indirgenmesini de katalize edebilir. Ayrıca, sitokrom P450 redüktaz, mitomisin C ve antrasiklinler gibi terapatik önemi olan çeşitli biyoredüktif antitümör ajanların ve antibiyotiklerin redüktif metabolizmasında da önemli bir rol oynar. Sitokrom P450 redüktaz enziminin indirgeyici aktivitesi neticesinde sitotoksik ve genotoksik türlere dönüşen bu ilaçlar farklı kanser tiplerinin tedavisinde etkilerini gösterirler. Son olarak P450 redüktaz enzimi, mikrozomlarda NADH kofaktörü ile çalışan ve lipit metabolizmasının uzatma ve desaturasyon gibi değişik reaksiyonlarını katalizleyen bir diğer elektron transport sisteminin üyesi sitokrom b5'e de elektron transfer edebilir (Lu ve ark.'ları, 1969; Cohen ve Estabrook, 1971; Chiang, 1981; Black ve Coon, 1982; Kappus, 1986; Powis, 1989; Sinha,1989; Lu, 1991; Arınç, 1995a).

Sitokrom P450 redüktaz değişik türlerden ve dokulardan amfipatik formda saflaştırılmış ve yapısal, kinetik ve fonksiyonel birtakım özellikleri karakterize edilmiştir. Sitokrom P450 redüktazın saflaştırıldığı türler ve dokular arasında hint domuzu karaciğeri (Kobayashi ve Rikans, 1984), domuz karaciğeri (Yasukochi ve ark.'ları, 1980; Haniu ve ark.'ları, 1986), domuz böbreği (Yasukochi ve ark.'ları, 1980), koyun akciğer ve karaciğeri (İşcan ve Arınç, 1986 ve 1988), sıçan karaciğeri (Porter ve Kasper, 1985), tavşan karaciğeri (Katagiri ve ark.'ları, 1986), insan karaciğeri (Kamataki ve ark.'ları, 1979; Guengerich ve ark.'ları, 1981), sığır karaciğeri (Arınç ve Çelik, 2002), üç balık türü ["scup" karaciğeri (Klotz ve ark.'ları, 1983), alabalık karaciğeri (Williams ve ark.'ları, 1983) ve kefal karaciğeri (Şen ve Arınç, 1998)] ve memeli olmayan bir tür, karasinek (Mayer ve Durrant, 1979) yer almaktadır. Sitokrom P450 redüktaz ayrıca, bir bitki türünden, *Jerusalem artichoke*'tan da izole edilmiş ve izole edilmiş redüktazın diğer türlerde tanımlanan redüktazlardan immünolojik olarak farklı olduğu bulunmuştur (Benveniste ve ark.'ları, 1989).



NADPH-sitokrom P450 redüktazın saflaştırılmasına ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar yoğun olarak küçük laboratuvar hayvanları kullanılarak yürütülmüş, sığır ve besin üreten diğer çiftlik hayvanları ise yeterince çalışılmamıştır. Laboratuvarımızda bu amaçla, sitokrom P450 redüktaz enzimi koyun karaciğer ve koyun akciğer dokusundan izole edilmiş ve pekçok özelliği karakterize edilmiştir (İşcan ve Arınç, 1986 ve 1988; Arınç ve Aydoğmuş, 1990; Adalı ve ark.'ları, 1996). Ayrıca, laboratuvarımızda, sitokrom P450 redüktaz enzimi sığır karaciğer dokusundan, dünyada ilk kez biyokatalitik olarak aktif amfipatik yapıda saflaştırılmış ve bazı biyokatalitik ve spektral özellikleri bir ön çalışma niteliğinde aydınlatılmıştır (Arınç ve Çelik, 2002). Ancak, sığır karaciğer mikrozomal sitokrom P450 redüktazın immünolojik, kinetik ve diğer birtakım fonksiyonel özelliklerinin daha ileri düzeyde karakterize edilmesi gerekmekte idi.

NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi sığır karaciğerinden laboratuvarımızda daha önce uygulanmış olan prosedürde (Arınç ve Çelik, 2002) aşağıdaki kısımda özetlenen bazı değişiklikler yapılarak çok daha fazla miktarda ve daha yüksek bir özgül aktivite ile preparatif ölçekte elde edildi. Bunun için saflaştırma işlemi daha önce yayınlanmış metod üzerinde iyileştirmeler yapılarak 3 kez tekrar edildi. Bu değişiklikler arasında, sitokrom P450 redüktaz enziminin 1. DEAE selüloz kolonundan elüe edilmesinde tampon A içerisinde bulunan KCl tuzu konsantrasyonunun 0.15 M'dan 0.16 M'a çıkartılması, ikinci DEAE-selüloz kolonu aşamasında sitokrom b5'i P450 redüktaz preparasyonundan kısmen uzaklaştırmak için kolona uygulanan tampon B içerisindeki KCl tuz konsantrasyonunun 0.08 M'dan 0.075 M'a düşürülmesi yer aldı. Son olarak, afinite kolonu aşamasında sitokrom P450 redüktazın kolondan elüe edilmesi için kolona uygulanan tampon C içerisinde ki inhibitör 2'-AMP konsantrasyonu 2.5 mM'dan 4.0 mM'a çıkartıldı (bakınız kısım 2.2.4 ve Şekil 2.1). Böylece, sitokrom P450 redüktazın kolondan yayılmadan konsantre bir şekilde elüe edilmesi sağlandı (bakınız Şekil 3.3). Afinite kolonunda sığır P450 redüktazın kolona iyi tutunmasını sağlamak amacıyla, pH, koyun akciğer P450 redüktazın saflaştırılması prosedüründe uygulanan farklı olarak, daha önce uygulanan prosedürde olduğu gibi 7.1'e düşürüldü. Ayrıca sitokrom P450 redüktazın afinite kolonuna çok iyi tutunması için numune saatte 2 ml'lik çok düşük bir hızla kolona uygulandı. Sitokrom P450 redüktazın sığır karaciğer dokusundan büyük ölçekte ve iyi bir verimle elde edilebilmesi için başlangıçtaki mikrozomal süspansiyonun protein miktarı artırıldı (yaklaşık 3000 mg) ve buna bağlı olarak ilk DEAE-selüloz kolonunun kapasitesi bir miktar artırıldı (bakınız Tablo 3.1). Enzimin ilk-DEAE selüloz kolonunda uzun süre kalması sonucu oluşabilecek denatürasyonu engellemek amacıyla saflaştırmanın bu aşaması çok hızlı bir şekilde gerçekleştirildi. Ayrıca tüm saflaştırma işlemi süresince proteaz enzim inhibitörleri, EDTA ve de gliserol tampon solüsyonlar içerisinde kullanılarak P450

redüktazın stabilite ve aktivite kaybı minimuma indirilmeye çalışıldı. Sonuç olarak, saflaştırma işlemi enzimin denaturasyonunu ve aktivite kaybını engellemek ve stabilitesini korumak için mümkün olan en kısa sürede tamamlandı ve enzim yüksek bir özgül aktivite ile ve yüksek bir saflaştırma katsayısı (yaklaşık 262 kez) ile elde edildi. Saflaştırılan enzimin spesifik redüktaz aktivitesi yaklaşık 31000 nmol/dal/mg protein olarak bulundu. Bu değer, daha önceki saflaştırma işleminde izole edilen P450 redüktaz enziminin spesifik redüktaz aktivitesinden (yaklaşık 14500 nmol/dak/mg protein) iki misli daha fazla idi. Saflaştırma işlemi sonunda yaklaşık 40 ünite P450 redüktaz izole edilirken, bu değer daha önceki saflaştırma işleminde elde edilen P450 redüktaz için yaklaşık 18 ünite idi. Her iki enzim preparasyonunun da saf olduğu elektroforetik ve spektral yöntemlerle doğrulanırken, proje kapsamında elde ettiğimiz redüktazın daha önce elde edilenden 2 kattan daha fazla özgül aktiviteye sahip olması enzimin saflaştırma işlemi sırasında aktivitesini daha çok koruduğunu göstermektedir.

Saflaştırılmış sığır P450 redüktazın moleküler ağırlığı daha önce elde edilenle benzer olarak 76.000-78.000 dalton arasında bulundu ve enzimin absorpsiyon spektrumu flavoproteinlerin karakteristik özelliği olan 455 ve 378 nm'lerde iki tepe noktası ve 478 nm civarında ise bir çıkıntı gösterdi. Proje kapsamında saflaştırılmış enzimin sitokrom c redüktaz aktivitesinin stabilitesi 37°C'de %20 gliserol varlığında ve yokluğunda belirlendi ve elde edilen sonuçlar koyun akciğer P450 redüktazı ile mukayese edildi. Gliserolün her iki enzimin de stabilitesini arttırdığı ve sığır karaciğer P450 redüktazın koyun akciğer P450 redüktazına göre çok daha dayanıklı bir enzim olduğu gösterildi (bakınız Şekil 3.12).

Bu çalışmada deterjanlar Emulgen 913, kolat ve Triton X-100'ün sığır karaciğer P450 redüktaz aktivitesi üzerindeki *in vitro* etkileri hem saf enzim hem de mikrozomlar kullanılarak detaylı olarak incelendi. Elde edilen sonuçlar, bu deterjanların test edilen konsantrasyonlarda ve karışımlarda sığır karaciğer P450 redüktazın aktivitesini %17 ile %40 arasında arttırdığını gösterdi. Bu sonuçlar, saflaştırma işlemi sırasında sitokrom P450 redüktazın sığır karaciğer mikrozomlarından çözünürleştirilmesi için gereken uygun Emulgen 913 ve kolat konsantrasyonlarını göstermiş oldu (bakınız kısım 3.6.3 - 4, Tablo 3.5).

Saflaştırılmış sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazın, sentetik lipid fosfatidilkolin dilaurol ve saflaştırılmış fenobarbital muamele edilmiş tavşan karaciğer sitokrom P4502B4'ü içeren yeniden oluşturulmuş sistemlerde ki benzfetamin N-demetilasyon reaksiyonunu katalizleyebildiği gösterilerek biyokatalitik olarak aktif formda olduğu bulundu (bakınız kısım 3.6.5, Şekil 3.11). Tavşan karaciğer P4502B enziminin amino asit sırası bilindiği ve P4502B4 olarak sınıflandırıldığı için (Arınç, 1993), benzfetamin N-demetilasyon

enzim aktivitesini yeniden oluşturma (“reconstitution”) çalışmaları esnasında bu P450 kullanıldı. Bu çalışmalarda, her iki enzimin artan konsantrasyonlarının benzfetamin N-demetilasyon aktivitesine olan etkilerinin belirlenmesi, P450 redüktaz enziminin reaksiyonda hız sınırlayıcı (“rate-limiting”) enzim olduğunu gösterdi.

Sığırların çevresel olarak maruz kaldığı birtakım ağır metallerin olası toksik etkilerini göstermek amacıyla, nikel, kadmiyum ve kurşun metallerinin değişik konsantrasyonlarda saflaştırılan sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazına olan etkileri çalışıldı. Ağır metaller bozulmayan ve yok edilemeyen biyobirikme eğilimleri olan çevresel kontaminantlardır. Ağır metallerin organizmaya olan toksik etkileri bilinmekle birlikte bu toksik etkilerin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Sitokrom P450 redüktaz enziminin ağır metaller tarafından inhibisyonu beraberinde ksenobiyotik metabolizmasının etkilenmesine ve ilaçlar, organik çözücüler, boyalar, çevresel kirleticiler, alkoller gibi değişik eksojen maddelerin yetersiz detoksifikasyonuna neden olarak bu zararlı maddelerin vücutta birikmesine neden olabilir. Ayrıca, sitokrom P450'ye bağlı monooksijenaz sistemin vazgeçilmez bir üyesi olan sitokrom P450 redüktaz enziminin ağır metaller tarafından inhibisyonu, steroidler, yağ asitleri, prostaglandinler, retinoitler ve biyojenik aminler gibi endojen maddelerin yetersiz miktarda sentezlenmesine neden olarak organizmanın büyüme oranını ve üreme kapasitesini değiştirebilir (Bozcaarmutlu, 2007; Bozcaarmutlu ve Arınç, 2007).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar nikel, kadmiyum ve kurşun metallerinin sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz enzimini yarışmacı olmayan (“noncompetitive”) türde inhibe ettiğini ve test edilen metaller içerisinde en yüksek inhibisyona kurşunun sebep olduğunu gösterdi. Bozcaarmutlu ve Arınç (2007) ise  $Hg^{+2}$ ,  $Cr^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ağır metallerinin saflaştırılmış kefal karaciğer sitokrom P450 redüktazına olan etkilerini incelemiş ve test edilen metaller içerisinde en yüksek inhibisyona civanın neden olduğunu göstermiştir. Çinko ise 50  $\mu M$  konsantrasyonda kefal karaciğer sitokrom P450 redüktazın aktivitesinde herhangi bir inhibisyona neden olmamıştır. Hem Lineweaver-Burk hem de Dixon grafikleri  $Hg^{+2}$ ,  $Cr^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  metallerinin saflaştırılmış kefal karaciğer sitokrom P450 redüktazını yarışmacı olmayan (“noncompetitive”) türde inhibe ettiğini göstermiştir.  $Hg^{+2}$ ,  $Cr^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  metallerinin  $K_i$  değerleri ise Dixon grafiğinden sırası ile 0.048  $\mu M$ , 18  $\mu M$ , 73  $\mu M$  ve 329  $\mu M$  bulunmuştur. Bu çalışmada ise  $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  ve  $Pb^{+2}$  metallerinin saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz için  $K_i$  değerleri sırasıyla 2 mM, 0.04 mM ve 0.03 mM olarak bulundu. Bir karşılaştırma yapılırsa,  $Ni^{+2}$  metalinin  $K_i$  değeri kefal karaciğer P450 redüktazı için 329  $\mu M$  olarak bulunurken, bu çalışmada ise sığır karaciğer P450 redüktazı için bu değerin 2 mM olduğu görülmektedir. Ayrıca,  $Cd^{+2}$  metalinin  $K_i$  değeri kefal karaciğer P450

redüktazı için 73  $\mu\text{M}$  olarak bulunurken, sığır karaciğer P450 redüktazı için bu değer 40  $\mu\text{M}$  olarak bulundu. Bu sonuçlar, nikel metalinin kefal karaciğer P450 redüktazını daha iyi inhibe ettiğini gösterirken, kadmiyum metalinin ise sığır karaciğer P450 redüktazını daha iyi inhibe ettiğini göstermektedir. Ayrıca, saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazı ile yürütülen metal inhibisyon çalışmalarında, test edilen metaller,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  içerisinde yalnızca  $\text{Cu}^{+2}$  sitokrom P450 redüktaz aktivitesini inhibe etmiş, diğerlerinin ise sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerinde belirgin bir etkisi görülmemiştir (Kim ve ark.'ları, 2002). Bozcaarmutlu (2007), yukarıda bahsedilen metallere ek olarak aliminyum ( $\text{Al}^{+3}$ ), talyum ( $\text{Tl}^{+3}$ ), tin ve magnezyum ( $\text{Mg}^{+2}$ ) metallerinin saflaştırılmış kefal karaciğer sitokrom P450 redüktazı aktivitesi üzerine olan etkilerini incelemiştir. Aliminyum ve talyum metalleri kefal karaciğer P450 redüktazını yarışmacı olmayan ("noncompetitive") türde inhibe ederken, bu metallerin  $K_i$  değerleri sırasıyla 8.9  $\mu\text{M}$  ve 5.6  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Tin ve magnezyum metalleri ise 50  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda sitokrom P450 redüktaz aktivitesi üzerinde belirgin bir etkiye neden olmamışlardır (Bozcaarmutlu, 2007).

Bu çalışmada nikel, kadmiyum ve kurşun metallerinin saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazını yarışmacı olmayan ("noncompetitive") türde inhibe ettiği gösterildi. Yarışmacı olmayan inhibisyonun ("noncompetitive") etkileri, yarışmalı inhibisyona ("competitive") göre çok daha kötüdür. Bunun nedeni, yarışmacı olmayan inhibisyonda inhibisyonun substrat konsantrasyonu artışı ile geri döndürülemiyor olmasıdır. Sonuç olarak, bu çalışmada kurşun ve kadmiyumun nikel metaline göre saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktaz enzimi üzerinde çok ciddi toksik etkileri olduğu gösterilmiştir.

Proje kapsamında sığır karaciğer dokusundan saflaştırılan sitokrom P450 redüktaz enzimine karşı daha önce üretilmemiş olan poliklonal antikolar üretilerek sığır karaciğer P450 redüktazın koyun akciğer P450 redüktazı ile olan immünolojik benzerlikleri ortaya kondu. Böylece enzimin immünolojik karakterizasyonu yapılarak, biyokimya, farmakoloji, toksikoloji ve onkoloji alanlarında ve ilaç sanayiinde ve bir takım biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanı mevcut olan endüstriyel bir ürün elde edilmiş oldu. Bu çalışmada, sığır karaciğer ve koyun akciğer sitokrom P450 redüktazlarının immünolojik özellikleri Western-blot tekniği ile hem anti-sığır karaciğer P450 redüktaz antikoları hem de anti-koyun akciğer P450 redüktaz antikoları kullanılarak analiz edildi. Western-blot sonuçları, sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikoların saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktazı ve sığır karaciğer ve akciğer mikrozomları için oldukça spesifik olduğunu gösterdi. Bununla beraber, üretilen poliklonal antikolar, saflaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktazı ve koyun akciğer mikrozomları ile de çok güçlü

çapraz-reaktivite (“cross-reactivity”) gösterdi (Şekil 3.19 ve Tablo 3.8). Saflaştırılan koyun akciğer sitokrom P450 redüktazına karşı üretilen poliklonal antikolar kullanılarak yürütülen Western-blot deneyi ise, anti-koyun akciğer sitokrom P450 redüktaz antikolarının saflaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktaz ve koyun akciğer mikrozomları ile çok güçlü bir şekilde reaksiyona girdiğini ve koyuluğu oldukça yüksek olan bandlar ürettiğini gösterdi (Şekil 3.20 ve Tablo 3.9). Üretilen poliklonal antikolar, saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazı ve sığır karaciğer ve akciğer mikrozomları ile de spesifik bir şekilde reaksiyona girdi. Ancak, üretilen anti-koyun akciğer sitokrom P450 redüktaz antikolarının, sığır sitokrom P450 redüktazına göre koyun akciğer sitokrom P450 redüktazını çok daha iyi tanıdığı görüldü (Şekil 3.20 ve Tablo 3.9).

Proje kapsamında, antikanser ilaç idarubisinin etki mekanizması saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktaz ve saflaştırılan diğer P450 redüktazlar kullanılarak moleküler düzeyde araştırıldı. Projenin “Giriş” kısmında belirtildiği üzere, idarubisin göğüs kanserine ve akut myeloid lösemi, multipl miyeloma ve non-hodgkin lenfomayı içeren bazı hematolojik tümörlere karşı klinik olarak etkili ikinci jenerasyon antrasiklin bir ilaçtır (Goebel, 1993; Borchmann ve ark.’ları, 1997; Crivellari ve ark.’ları, 2004). Pekçok çalışma antrasiklinlerin serbest radikallere biyoredüktif aktivasyonunun ve bunu takiben aerobik şartlar altında redoks döngüsünün, bu ajanların genotoksik ve sitotoksik aktivitelerinde önemli bir rol oynadığını ileri sürmüştür (Sinha, 1989; Powis, 1989; Taatjes ve ark.’ları, 1997; Doroshov, 2006).

Çok sayıda farklı hücrel oksidoredüktazın, antrasiklinleri de içeren kinon antikanser ajanların biyoredüktif aktivasyonunu katalize ettiği gösterilmiştir (bakınız, Powis, 1987; Doroshov, 2006). Ancak, bizim bilgimize göre sentetik antrasiklin idarubisinin saflaştırılmış sitokrom P450 redüktaz tarafından biyoredüktif aktivasyonunu gösteren ve etki mekanizmasını açıklayan daha önce yayınlanmış herhangi bir makale bulunmamaktadır (bu çalışma kapsamında yayınlanan makale haricinde, bakınız Çelik ve Arınç, 2008). Böylece, bu çalışmada, ilk defa olarak, saflaştırılmış sitokrom P450 redüktazın, idarubisinin, biyoindirgenmesini katalizleyerek DNA’ya hasar veren ürünlerin oluşumuna neden olduğu gösterildi. Elde edilen sonuçlar bu çalışmada model bir bileşik olarak kullanılan mitomisin C ile mukayese edildi. Sığır karaciğer, koyun akciğer ve fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan P450 redüktazlar ile yürütülen enzim assayleri, idarubisinin saflaştırılan tüm P450 redüktazlar tarafından, 340 nm’de NADPH oksidasyonunun ölçülmesiyle gösterildiği üzere, mitomisin C’den yaklaşık iki-kat daha fazla hızda indirgenildiğini gösterdi (Tablo 3.10). İdarubisin ve mitomisin C’nin süperoksit radikal

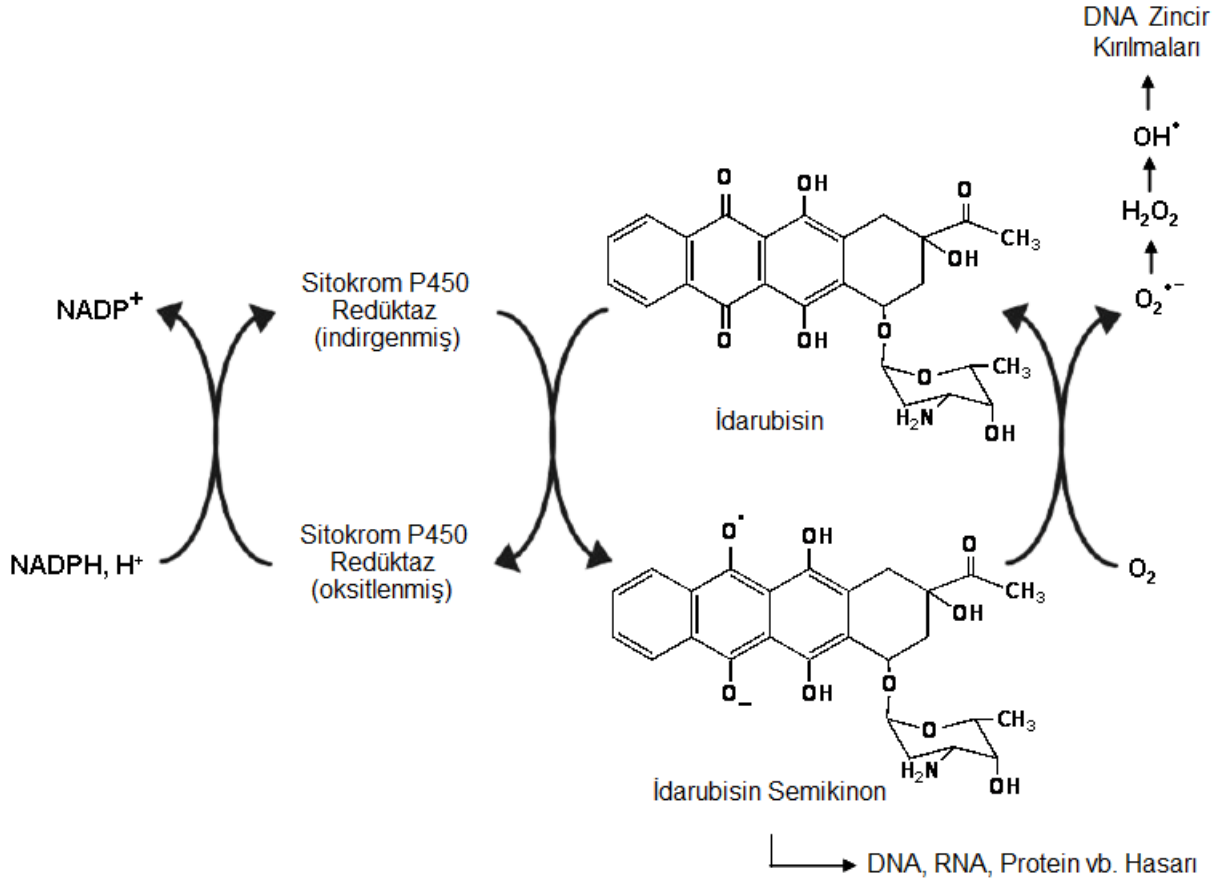
oluşturma hızının, bu ilaçların sitokrom P450 redüktaz tarafından bir-elektron indirgenmesiyle orantılı olması beklenmektedir. Bu sonuçlara dayanarak, idarubisinin, sitokrom P450 redüktaz tarafından biyoaktivasyona uğrayarak reaktif ve/veya redoks aktif metabolit oluşturma potansiyeli bakımından mitomisin C'ye göre daha etkili bir sitotoksik ilaç olduğu söylenilebilir. Diğer bir nokta, saflaştırılmış koyun akciğer sitokrom P450 redüktazın, sığır karaciğer ve fenobarbital ile muamele edilmiş tavşan karaciğer sitokrom P450 redüktazları ile kıyaslandığında, hem idarubisinin hem de mitomisin C'nin indirgenmesini katalizlemede daha az etkili olduğu idi (Tablo 3.10). Bu fonksiyonel farklılık, değişik türlerden saflaştırılan sitokrom P450 redüktazların, amino asit dizilimlerindeki farklılıklar sonucu ortaya çıkan üç-boyutlu yapılarındaki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir (bakınız, Lu, 1991; Shen ve Kasper, 1993; Gutierrez ve ark.'ları, 2003).

Sitokrom P450 redüktaz, sentetik bir antrasiklin olan idarubisinin ana ilacı ("parent drug") daunorubisinin de bir-elektron indirgenmesini katalize etmektedir. Ancak antrakonlar arasındaki yapısal farklılıkların bu ilaçların P450 redüktazı da içeren birtakım flavoenzimler tarafından biyoaktivasyona uğrayarak reaktif metabolit oluşturma yeteneklerini etkileyebileceği gözardı edilmemelidir. Dolayısıyla, bu ilaçlar için yapı-aktivite ilişkilerinin son derece önemli olduğu düşünülürse (Tarasiuk ve ark.'ları, 1992; Pawlowska ve ark.'ları, 2003), sitokrom P450 redüktazın idarubisinin biyoaktivasyonundaki rolünün belirlenmesi ayrıca gerekmektedir.

Saflaştırılmış sığır karaciğer ve koyun akciğer P450 redüktazları kullanılarak yürütülen plazmit DNA kırılması deneylerinde, bu enzimlerin idarubisin ve kofaktör NADPH varlığında DNA'ya hasar veren ürünleri oluşturduğu gösterildi. Bu çalışmada kullanılan *in vitro* plazmid DNA hasar assayı farklı hasar verici ajanlara maruz bırakılan plazmid DNA'daki zincir kırıklarının belirlenmesinde oldukça hassas ve faydalı bir metottur ve araştırmacılar tarafından değişik redüktif enzimlerin, çeşitli antikanser ilaçların ve bileşiklerin biyoredüktif aktivasyonundaki rolünü değerlendirmek için etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Fisher ve Gutierrez, 1991; Shen ve Hollenberg, 1994; Kumagai ve ark.'ları, 1997; Garner ve ark.'ları, 1999; Çelik ve Arınç, 2006a, b ve c). İdarubisinin neden olduğu DNA hasarının mekanizmasında hangi ürünlerin rol aldığı belirlenebilmesi için, öncelikli olarak plazmit DNA deneylerinin optimize edilmesi gerekiyordu. Bu nedenle, idarubisinle indüklenen DNA hasarının artan redüktaz enzimi ve antikanser ilaç miktarına ve artan inkübasyon zamanına göre nasıl değiştiği saptandı. Bir ön deneme kapsamında yapılan bu çalışmalarda koyun akciğer redüktaz enzimi kullanıldı. Ayrıca, idarubisin kullanılarak yürütülen plazmid DNA deneyleri aynı reaksiyon şartları altında mitomisin C ile tekrar edildi ve elde edilen sonuçlar

mukayese edildi. İdarubisinin DNA hasarını indüklemeye potansiyeli mitomisin C'nin ki ile kıyaslandığında, her iki ilacın da aerobik şartlar altında benzer DNA hasar verici potansiyellerinin olduğu görüldü (bakınız Tablo 3.11-3.13). Bu bulgular, yapısal olarak benzer bileşiklerin sitokrom P450 redüktaz ile redoks döngüsüne girme ve böylece DNA'da tek zincir kırıklarını indüklemeye özelliklerinin benzer olabileceğini ileri sürmektedir. Ancak, enzimatik indirgenme hızlarındaki iki kat farklılığa rağmen, plazmid DNA deneylerinde idarubisin ve mitomisin C'nin DNA'ya hasar verici potansiyellerinde belirgin bir farklılığın görülmemesinin nedeni bilinmemektedir ve bunun daha ayrıntılı araştırılması gerekmektedir. Bu durum, plazmid DNA metodunun hassaslığı ile veya assay şartlarındaki farklılıkla ilişkili olabilir. Gene de idarubisin ve mitomisin C'nin sitokrom P450 redüktaz tarafından indirgenme hızları arasındaki farklılık, plazmit DNA deneylerinde gözlenen tek belirgin farklılık olan idarubisinin daha yüksek ilaç konsantrasyonlarında (200 ve 400 µM), mitomisin C ile kıyaslandığında, DNA zincir kırıklarını daha fazla indüklemeye kapasitesinden sorumlu olabilir (Tablo 3.12).

İdarubisinin etki mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yürütülen plazmit DNA deneylerinden elde edilen sonuçlar, idarubisinin P450 redüktaz tarafından biyoaktivasyonunun, aerobik şartlar altında reaktif oksijen türleri ("ROS") üreterek DNA zincir kırıklarına neden olan redoks aktif metabolitlerin oluşumu ile sonuçlandığını gösterdi. Antioksidan enzimler SOD ve katalazın, aynı zamanda hidroksil radikal süpürücülerinden DMSO ve tiyoürenin, idarubisin, P450 redüktaz ve kofaktör NADPH varlığında oluşan DNA zincir kırıklarına karşı gösterdiği etkin korumalar, idarubisinle-indüklenen DNA hasarı için Şekil 4.1'de gösterilen mekanizmayı önermemize neden oldu (bakınız Çelik ve Arınç, 2008). Bu mekanizmada, idarubisin, sitokrom P450 redüktaz tarafından aerobik şartlar altında bir-elektron indirgenmesini takiben moleküler oksijenle redoks döngüsüne girerek süperoksit radikali oluşturan semikinon radikale dönüşmektedir. Bu işlemle oluşan süperoksit radikali kendiliğinden veya enzimatik dismutasyonla hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüşür. Hidrojen peroksit ise iz miktarlarda ki ferrik iyonları varlığında Fenton reaksiyonu ile oldukça reaktif hidroksil radikallerine hızlı bir şekilde parçalanır. Oldukça etkili olan hidroksil radikalleri ise daha sonra DNA zincir kırıklarının oluşumuna neden olur (Brawn ve Fridovich, 1981; Kappus, 1986; Kovacic ve Osuna, 2000). Sitokrom P450 redüktaz ile redoks döngüsüne girdiği bilinen mitomisin C kullanılarak yürütülen plazmid DNA deneyleri de yukarıda öngördüğümüz ve "Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences" (Çelik ve Arınç, 2008: 11, 4, 68-82) dergisinde yayınlanmış olan mekanizmayı desteklemiştir.



**Şekil 4.1** NADPH-sitokrom P450 ve kofaktör NADPH varlığında idarubisinle indüklenen DNA hasarının mekanizması (bakınız Çelik ve Arınç, 2008).

Böylece, bu çalışmada elde edilen sonuçlara dayanarak, idarubisinin sitokrom P450 redüktazla katalizlenen redüktif aktivasyonu sırasında oluşan "ROS" ların, bu ilacın hem tümör hücrelerinin tedavisinde gösterdiği kemoterapatik etkiye hem de normal sağlıklı hücrelerde gösterdiği toksik yan etkilere katkıda bulunduğu öne sürülmüş ve sitokrom P450 redüktaz varlığında oluşan "ROS" ların aynı zamanda idarubisinin ikincil tümörlerin oluşumunu indükleyen genotoksik etkilerinden de sorumlu olabileceği öngörülmüştür (Çelik ve Arınç, 2008).

Bu çalışmanın sonuçları, sitokrom P450 redüktazın, kanser tedavi stratejilerinde terapatik ajan olarak mitomisin C veya idarubisin gibi biyoredüktif ilaçlarla birlikte gen-güdümlü enzim önilaç terapi ("gene-directed enzyme prodrug therapy") stratejilerinde kullanılabileceğini desteklemektedir (Cowen ve ark.'ları, 2008; Altaner, 2008).



## 5. SONUÇ

Laboratuvarımızda, NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi sığır karaciğer dokusundan, dünyada ilk kez biyokatalitik olarak aktif amfipatik yapıda saflaştırılmış ve bazı biyokatalitik ve spektral özellikleri bir ön çalışma niteliğinde aydınlatılmıştı (Arınç ve Çelik, 2002). Bu çalışmada ise sitokrom P450 redüktaz sığır karaciğer dokusundan büyük ölçekte (preparatif düzeyde) ve daha yüksek bir özgül aktivite ile saflaştırıldı, saflaştırılan enzime karşı biyoteknolojik ve farmasötik uygulamaları olan poliklonal antikorlar üretilerek enzimin immünolojik karakterizasyonu yapıldı ve enzimin birtakım fonksiyonel ve biyokimyasal özellikleri belirlenerek enzim daha ileri seviye de karakterize edildi.

Sitokrom P450 redüktaz enzimi sığır karaciğer dokusundan metod üzerinde yapılan birtakım değişiklikler sonucu daha önce elde edilenden (Arınç ve Çelik, 2002), çok daha fazla miktarda ve daha yüksek bir özgül aktivite ile preparatif ölçekte elde edildi. Metod üzerinde yapılan iyileştirmeler ve değişiklikler tartışma kısmında ayrıntılı olarak anlatılmıştır (bakınız kısım 4). Enzim sığır karaciğer mikrozomlarından yüksek bir verimle (yaklaşık %11) ve yüksek bir saflaştırma katsayısı (yaklaşık 262 kez) ile elde edildi ve saflaştırılmış enzimin özgül aktivitesi oldukça yüksek bulundu (yaklaşık 31.000 nmol/dak/mg protein). Saflaştırılan enzimin karakterizasyon çalışmaları yapılarak enzimin moleküler ağırlığının daha önce elde edilenle benzer olarak 76.000-78.000 dalton arasında olduğu gösterildi. Ayrıca saflaştırılan enzimin spektral özelliklerinin gösterilmesi amacı ile absorpsiyon spektrumu belirlendi. Saf enzim flavoproteinlerin karakteristik özelliği olan 378 nm ve 455 nm bölgelerinde iki tepelik ve 478 nm civarında ise bir çıkıntı verdi. Sitokrom P450 redüktazın sığır karaciğer dokusundan saflaştırılmasında enzimin mikrozomlardan deterjanlar kullanılarak çözünürleştirilmesi gerektiğinden, Emulgen 913 ve kolat karışımlarının sığır karaciğer P450 redüktaz aktivitesine olan etkileri detaylı olarak incelendi. Böylece, P450 redüktazın sığır karaciğer mikrozomlarından çözünürleştirilmesi safhasında hangi konsantrasyonlarda Emulgen 913 ve kolat deterjan karışımı kullanılmasının daha uygun olacağına karar verildi. Bu deterjanlara ek olarak Triton X-100 deterjanının da sığır karaciğer P450 redüktaz aktivitesine olan etkileri çalışıldı. Elde edilen sonuçlar, saf enzim veya mikrozomlar kullanıldığında, bu deterjanların test edilen konsantrasyon değerlerinde ve deterjan karışımlarında sitokrom P450 redüktaz aktivitesini %17 ile %40 arasında arttırdığını gösterdi. Saflaştırılan sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazın biyokatalitik olarak aktif olduğu, enzimin saflaştırılmış tavşan karaciğer sitokrom P450B4'ü ile sentetik lipid içeren bir reaksiyon ortamında biraraya gelip benzfetamin N-demetilasyon reaksiyonunu katalize etmesi ile gösterildi. Her iki enzimin artan konsantrasyonlarının yeniden oluşturulmuş

sistemlerde benzfetamin N-demetilaz aktivitesine olan etkileri çalışılarak P450 redüktazın bu reaksiyonda hız sınırlayıcı enzim olduğu gösterildi. Saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktazın 37°C'de %20 gliserol varlığında ve yokluğunda saflaştırılmış koyun akciğer P450 redüktazına göre daha stabil bir enzim olduğu, enzimlerin sitokrom c indirgeyici aktivitelerinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlendi.

Ni, Cd ve Pb metallerinin değişik konsantrasyonlarda saflaştırılan sığır karaciğer P450 redüktazına olan etkileri çalışılarak bu ağır metallerin inhibisyon mekanizmaları ortaya kondu. Elde edilen sonuçlar Ni, Cd ve Pb metallerinin redüktaz enzimini yarışmacı olmayan ("noncompetitive") türde inhibe ettiğini ve test edilen metaller içerisinde en yüksek inhibisyona kurşunun ( $K_i$  değeri 0.03 mM) bunu takiben kadmiyumun ( $K_i$  değeri 0.04 mM) sebep olduğunu gösterdi. Bu netice de, Pb ve Cd gibi ağır metallerin redüktaz enzimini inhibe ederek monooksijenazların detoksifikasyon işlevini engellediğini ve sonucu kimyasal karsinogenesis kadar giden toksik etkide önemli bir rol oynadığını işaret etmektedir.

Proje kapsamında sığır karaciğer dokusundan saflaştırılan sitokrom P450 redüktaz enzimine karşı daha önce hiç üretilmemiş olan poliklonal antikolar üretilerek enzimin koyun akciğer sitokrom P450 redüktazı ile olan immünolojik benzerlikleri ortaya kondu. Anti-koyun akciğer P450 redüktaz antikoları ve anti-sığır karaciğer P450 redüktaz antikoları kullanılarak mikrozomlar ve saf enzimlerle yürütülen Western-blot deneyleri sığır ve koyun akciğer sitokrom P450 redüktazlarının ortak epitoplara veya antijenik belirleyiciler içerdiğini gösterdi. Aynı zamanda, saflaştırılmış sığır karaciğer sitokrom P450 redüktazına karşı poliklonal antikolar elde edilmesi ile biyokimya, farmakoloji, toksikoloji ve onkoloji alanlarında ve ilaç sanayiinde ve bir takım biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanı mevcut olan endüstriyel bir ürün elde edilmiş oldu.

Proje kapsamında, antikanser ilaç idarubisinin etki mekanizması saflaştırılmış P450 redüktazlar kullanılarak moleküler düzeyde araştırıldı. Enzim aktivitesi ölçümleri saflaştırılmış sığır karaciğer P450 redüktazın ve saflaştırılan diğer P450 redüktazların (koyun akciğer ve tavşan karaciğer P450 redüktazları) biyoredüktif antikanser ilaç idarubisinin biyoindirgenmesini etkin bir şekilde katalize ettiğini gösterdi. İdarubisinle yürütülen enzim assayleri mitomisin C kullanılarak tekrar edildi ve elde edilen sonuçlar mukayese edildi. Daha önce de belirtildiği gibi mitomisin C bu çalışmada model bir bileşik olarak kullanıldı. Saflaştırılan tavşan karaciğer P450 redüktaz, her iki ilaç için de sığır karaciğer P450 redüktaz ile benzer indirgeyici aktivite gösterirken, koyun akciğer P450 redüktazın diğerlerinden daha düşük indirgeyici aktiviteye sahip olduğu bulundu. Saflaştırılan enzimlerin yapısal farklılıkların

bu fonksiyonel farklılıklardan sorumlu olabileceği öngörüldü. Ayrıca, plazmit DNA deneyleri yürütülerek sığır karaciğer ve koyun akciğer P450 redüktazlarının idarubisinin biyoaktivasyonunu etkin bir şekilde katalize ettiği, bu ilacın 1-elektron indirgenmesine uğrayarak DNA'da oluşturduğu hasarın tespit edilmesi ile gösterildi. İdarubisinin neden olduğu DNA hasarında hangi ürünlerin rol aldığını belirleyebilmek amacıyla öncelikli olarak plazmit DNA deneyleri optimize edilmeye çalışıldı. Bu amaçla DNA hasarının artan enzim ve ilaç miktarına ve artan inkübasyon zamanına göre nasıl değiştiği saptandı. Ayrıca, idarubisin kullanılarak yürütülen plazmit DNA deneyleri aynı reaksiyon şartları altında mitomisin C ile tekrar edildi ve elde edilen sonuçlar mukayese edildi. Her iki ilacın aerobik şartlar altında benzer DNA hasar verici potansiyellerine sahip olduğu gösterildi.

İdarubisinin etki mekanizması aydınlatılarak, NADPH-sitokrom P450 redüktazın idarubisin varlığında aerobik şartlar altında DNA zincir kırıklarına neden olan reaktif oksijen türleri oluşturduğu tespit edildi. Böylece, sitokrom P450 redüktaz biyoindirgenmesiyle olan bu yolun, idarubisinin antitümör etkisine potansiyel olarak katkıda bulunan bir mekanizma olabileceği hususu öngörüldü (Çelik ve Arınç, 2008). Bu çalışmanın sonuçları, sitokrom P450 redüktazın, kanser tedavi stratejilerinde terapötik ajan olarak mitomisin C veya idarubisin gibi biyoredüktif ilaçlarla birlikte gen-güdümlü enzim ön ilaç terapi ("gene-directed enzyme prodrug therapy") stratejilerinde kullanılabileceğini desteklemektedir (Cowen ve ark.'ları, 2008; Altaner, 2008).

## Referanslar

- ADALI O., Arinç E., Electrophoretic, Spectral, Catalytic and Immunochemical Properties of Highly Purified Cytochrome P450 From Sheep Lung, *Int. J. Biochem.*, 22, 1433-44, (1990).
- ADALI O., Abu-Baker T., Arinç E., Immunochemical and Sub-structural Characterization of Sheep Lung Cytochrome P450LgM2, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 28, 363-72, (1996).
- ANDERSON D., Yu T.W., Phillips B.J., Schmezer P., The Effect of Various Antioxidants and Other Modifying Agents on Oxygen-Radical-Generated DNA Damage in Human Lymphocytes in the COMET Assay, *Mutat. Res.*, 307, 261-71, (1994).
- ANZENBACHER P., Anzenbacherova E., Cytochrome P450 and Metabolism of Xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 737-47, (2001).
- ARINÇ E., Philpot R. M., Preparation and Properties of Partially Purified Pulmonary Cytochrome P450 From Rabbits, *J. Biol. Chem.*, 251, 3213-20, (1976).
- ARINÇ E., Aydoğmuş A., Lung Microsomal p-Nitrophenol Hydroxylase Characterization and Reconstitution of its Activity, *Comp. Biochem. Physiol.*, 97, 455-60, (1990).
- ARINÇ E., *Essential Features of NADH Dependent Cytochrome b5 Reductase and Cytochrome b5 of Liver and Lung Microsomes*, Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds, ed: Arinç E., Schenkman J. B., Hodgson E., Plenum Press, New York, (1991). Pp: 149.
- ARINÇ E., *Extrahepatic Microsomal Forms : Lung Microsomal Cytochrome P450 Isozymes*, Handbook of Experimental Pharmacology, ed: Schenkman J. B., Greim H., Springer-Verlag Press, New York, (1993). Pp: 373.
- ARINÇ E., Pasha R.P., Adalı O., Başaran N., Stimulatory Effects of Lung Cytochrome b5 on Benzphetamine N-Demethylation in a Reconstituted System Containing Lung Cytochrome P450LgM2, *Int. J. Biochem.*, 26, 1033-42, (1994).
- ARINÇ E., *General Aspects of NADPH Cytochrome P450 Reductase and Cytochrome b5*, Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes: Their Significance in Environmental Toxicology, Chemical Carcinogenesis and Health, ed: Arinç E., Schenkman J. B., Hodgson E., Springer-Verlag Press, Heidelberg, (1995a). Pp: 21.
- ARINÇ E., Adalı O., Pasha R.P., Başaran N., Different Influences of Two Fractions of Lung Cytochrome b5 on Reconstituted Lung Benzphetamine N-Demethylase System, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27, 1095-105, (1995b).
- ARINÇ E., Çakır D., Simultaneous Purification and Characterization of Cytochrome b5 Reductase and Cytochrome b5 From Sheep Liver, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 31, 2, 345-62, (1999).
- ARINÇ E., Adalı O., Gençler-Özkan A.M., Stimulation of Aniline, p-Nitrophenol and N-Nitrosodimethylamine Metabolism in Kidney by Pyridine Pretreatment of Rabbits, *Arch. Toxicol.*, 74, 527-32, (2000).
- ARINÇ E., Çelik H., Biochemical Characteristics of Purified Beef Liver NADPH-Cytochrome P450 Reductase, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 16, 286-97, (2002).
- ARINÇ E., Bozcaarmutlu A., Catalyzation of Cocaine N-Demethylation by Cytochromes P4502B, P4503A, and P4502D in Fish Liver, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 17, 169-76, (2003).
- ASHIKAGA T., Wada M., Kobayashi H., Mori M., Katsumura Y., Fukui H., Kato S., Yamaguchi M., Takamatsu T., Effect of the Photocatalytic Activity of TiO<sub>2</sub> on Plasmid DNA, *Mutat. Res.*, 466, 1-7, (2000).
- BEALL H.D., Winski S.L., Mechanism of Action of Quinone-Containing Alkylating Agents I: NQO1-Directed Drug Development, *Front. Biosci.*, 5, D639-48, (2000).
- BEGLEITER A., Clinical Applications of Quinone-Containing Alkylating Agents, *Front. Biosci.*, 5, E153-71, (2000).

- BENVENISTE I., Lesot A., Hasenfratz M-P., Durst F., Immunochemical Characterization of NADPH-Cytochrome P450 Reductase from *Jerusalem artichoke* and Other Higher Plants, *Biochem. J.*, 259, 847-53, (1989).
- BAILEY S. M., Lewis A. D., Patterson L. H., Fisher G. R., Knox R. J., Workman P., Involvement of NADPH:Cytochrome P450 Reductase in the Activation of Indoloquinone E09 to Free Radical and DNA Damaging Species, *Biochem. Pharmacol.*, 62, 461-8, (2001).
- BLACK S. D., Coon M. J., Structural Features of Liver Microsomal NADPH-Cytochrome P450 Reductase, *J. Biol. Chem.*, 257, 5929-38, (1982).
- BORCHMANN P., Hübel K., Schnell R., Engert A., Idarubicin: A Brief Overview on Pharmacology and Clinical Use, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 35, 80-3, (1997).
- BOXALL A.B.A., Fogg L.A., Kay P., Blackwell P.A., Pemberton E.J., Croxford A., Prioritisation of Veterinary Medicines in the UK Environment, *Toxicol. Lett.*, 142, 207-18, (2003).
- BOZCAARMUTLU A., Mechanism of Inhibition of Purified Leaping Mullet (*Liza saliens*) NADPH-Cytochrome P450 Reductase by Toxic Metals: Aluminum and Thallium, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 21,6, 340-7, (2007).
- BOZCAARMUTLU A., Arınç E., Effect of Mercury, Cadmium, Nickel, Chromium and Zinc on Kinetic Properties of NADPH-Cytochrome P450 Reductase Purified From Leaping Mullet (*Liza saliens*), *Toxicol. In Vitro*, 21, 408-16, (2007).
- BRADNER W.T., Mitomycin C: A Clinical Update, *Cancer Treat. Rev.*, 27, 35-50, (2001).
- BRAWN K., Fridovich I., DNA Strand Scission by Enzymatically Generated Oxygen Radicals, *Arch. Biochem. Biophys.*, 206, 414-9, (1981).
- CERLETTI P., Siliprandi N., Pure Crystalline Flavine Adenine Dinucleotide, *Arch. Biochem. Biophys.*, 76, 214-24, (1958).
- CHIANG J.Y., Interaction of Purified Microsomal Cytochrome P-450 with Cytochrome b5, *Arch. Biochem. Biophys.*, 211, 662-73, (1981).
- COCHIN J., Axelrod J., Biochemical and Pharmacological Changes in the Rat Following Chronic Administration of Morphine, Nalorphine, and Normorphine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 125, 105-10, (1959).
- COHEN B. S., Estabrook R. W., Microsomal Electron Transport Reactions. 3. Cooperative Interactions Between Reduced Diphosphopyridine Nucleotide and Reduced Triphosphopyridine Nucleotide Linked Reactions, *Arch. Biochem. Biophys.*, 143, 54-65, (1971).
- COURTHEYN D., Le Bizec B., Brambilla G., De Brabander H.F., Cobbaert E., Van de Wiele M., Vercammen J., De Wasch K., Recent Developments in the Use and Abuse of Growth Promoters, *Anal. Chim. Acta.*, 473, 71-82, (2002).
- CRIVELLARI D., Lombardi D., Spazzapan S., Veronesi A., Toffoli G., New Oral Drugs in Older Patients: A Review of Idarubicin in Elderly Patients, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 49, 153-63, (2004).
- CUMMINGS J., Spanwick V.J., Tomasz M., Smyth J.F., Enzymology of Mitomycin C Metabolic Activation in Tumour Tissue. *Biochem. Pharmacol.*, 56, 405-14, (1998).
- ÇELİK, H., *Biochemical and Immunological Characterization of NADPH-Cytochrome P450 Reductase*, (Yüksek Lisans Tezi), Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2002).
- ÇELİK H., Arınç E., Bioactivation of Mitomycin C Responsible for Formation of "ROS" and DNA Scission by Lung Cytochrome P450 Reductase., *FEBS J.*, 273, Suppl. 1, 160, (2006a).
- ÇELİK H., Arınç E., A Comparison of the *in vitro* DNA-Damaging Potential of the Two Anticancer Drugs Idarubicin and Mitomycin C in the Presence of NADPH-Cytochrome P450 Reductase, *Drug Metab. Rev.*, 38, Suppl. 1, 185-6, (2006b).
- ÇELİK H., Arınç E., Mechanisms and Involvements of NADPH-Cytochrome P450 Reductase and NADH-Cytochrome b5 Reductase in Mitomycin C and Idarubicin Promoted DNA

- Damage and "ROS" Formation: A Study With Rabbit Liver Microsomes and Purified Enzymes, *Drug Metabol. Rev.*, 38, Suppl. 2, 91-2, (2006c).
- ÇELİK H., Arınc E., 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. Sci.*, 11, 4, 68-82, (2008).
- DIGNAM J. D., Strobel H. W., NADPH-Cytochrome P450 Reductase from Rat Liver: Purification by Affinity Chromatography and Characterization, *Biochemistry*, 16, 1116-23, (1977).
- DOROSHOW, J.H., *Anthracyclines and Anthracenediones*, Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practices, ed: Chabner B.A., Longo D.L., 4<sup>th</sup> edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, (2006). Pp: 415.
- EY P. L., Ashman L. K., The Use of Alkaline Phosphatase-Conjugated Anti-Immunoglobulin With Immunoblots for Determining the Specificity of Monoclonal Antibodies to Protein Mixtures, *Methods Enzymol.*, 121, 497-509, (1986).
- FISHER G.R., Gutierrez P.L., Free Radical Formation and DNA Strand Breakage During Metabolism of Diaziquone by NAD(P)H Quinone-Acceptor Oxidoreductase (DT-Diaphorase) and NADPH Cytochrome c Reductase, *Free Radic. Biol. Med.*, 11, 597-607, (1991).
- GARNER A.P., Paine M.J.I., Rodriguez-Crespo I., Chinje E.C., Ortiz De Montellano P., Stratford I.J., Tew D.G., Wolf C.R., Nitric Oxide Synthases Catalyze the Activation of Redox Cycling and Bioreductive Anticancer Agents, *Cancer Res.*, 59, 1929-34, (1999).
- GEWIRTZ D.A., A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin, *Biochem. Pharmacol.*, 57, 727-41, (1999).
- GOEBEL M., Oral Idarubicin – An Anthracycline Derivative With Unique Properties, *Ann. Hematol.*, 66, 33-43, (1993).
- GOEPTAR A.R., Te Koppele J.M., Lamme E.K., Pique J.M., Vermeulen N.P.E., Cytochrome P4502B1-Mediated One-Electron Reduction of Adriamycin: A Study With Rat Liver Microsomes and Purified Enzymes, *Mol. Pharmacol.*, 44, 1267-77, (1993).
- GUENGERICH F. P., Wang P., Mason P. S., Immunological Comparison of Rat, Rabbit, and Human Liver NADPH-Cytochrome P450 Reductase, *Biochemistry*, 20, 9, 2379-85, (1981).
- GUTIERREZ P.L., The Metabolism of Quinone-Containing Alkylating Agents: Free Radical Production and Measurement., *Front. Biosci.*, 5, D629-38, (2000).
- GUTIERREZ A., Grunau A., Paine M., Munro A.W., Wolf C.R., Roberts G.C., Scrutton N.S., Electron Transfer in Human Cytochrome P450 Reductase, *Biochem. Soc. Trans.*, 31, 497-501, (2003).
- HALLIWELL B., Auroma O.I., DNA Damage by Oxygen-Derived Species. Its Mechanism and Measurement in Mammalian Systems, *FEBS Lett.*, 281, 9-19, (1991).
- HANIU M., Iyanagi T., Miller P., Lee T. D., Shievely J. E., Complete Amino Acid Sequence of NADPH-Cytochrome P450 Reductase From Porcine Hepatic Microsomes, *Biochemistry* 25, 7906-11, (1986).
- HAUGEN D.A., Coon M.J., Properties of Electrophoretically Homogeneous Phenobarbital-Inducible and Beta-Naphthoflavone-Inducible Forms of Liver Microsomal Cytochrome P-450, *J. Biol. Chem.*, 251, 7929-39, (1976).
- HORECKER B. L., Triphosphopyridine Nucleotide-Cytochrome c Reductase in Liver, *J. Biol. Chem.*, 183, 593-605, (1950).
- IYANAGI T., Mason H. S., Some Properties of Hepatic Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Cytochrome c Reductase, *Biochemistry*, 12, 2297-308, (1973).
- IYER V.N., Szybalski W., Mitomycins and Porfiromycin: Chemical Mechanism of Activation and Cross-Linking of DNA, *Science*, 145, 55-8, (1964).

- İŞCAN M. Y., Arınç E., Kinetic and Structural Properties of Biocatalytically Active Sheep Lung Microsomal NADPH-Cytochrome c Reductase, *Int. J. Biochem.*, 18, 731-41, (1986).
- İŞCAN M.Y., Arınç E., Comparison of Highly Purified Sheep Liver and Lung NADPH-Cytochrome P450 Reductases by the Analysis of Kinetic and Catalytic Properties, *Int. J. Biochem.*, 20, 1189-96, (1988).
- KAMATAKI T., Sugiura M., Yamozoe Y., Kato R., Purification and Properties of Cytochrome P450 and NADPH-Cytochrome c (P450) Reductase from Human Liver Microsomes, *Biochem. Pharmacol.* 28, 1993-2000, (1979).
- KAPPUS H., Overview of Enzyme Systems Involved in Bio-Reduction of Drugs and in Redox Cycling, *Biochem. Pharmacol.*, 35, 1-6, (1986).
- KATAGIRI M., Murakami H., Yabusaki Y., Sugiyama T., Molecular Cloning and Sequence Analysis of Full-Length cDNA for Rabbit Liver NADPH-Cytochrome P450 Reductase Mrna, *J. Biochem. (Tokyo)*, 100, 945-54, (1986).
- KENNEDY D.G., Cannavan A., McCracken R.J., Regulatory Problems Caused by Contamination, a Frequently Overlooked Cause of Veterinary Drug Residues, *J. Chromatogr.*, 882, 37-52, (2000).
- KIM J.S., Ahn T., Yim S.K., Yun C.H., 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, 9438-47, (2002).
- KLOTZ A. V., Stegeman J. J., Walsh C., An Aryl Hydrocarbon Hydroxylating Hepatic Cytochrome P450 From the Marine Fish *Stenotomus chrysops*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 226, 578-92, (1983).
- KLOTZ A. V., Stageman J. J., Woodin B. R., Snowberger E. A., Thomas P.E., Walsh C., Cytochrome P450 Isozymes From the Marine Teleost *Stenotomus chrysops* : Their Role in Steroid Hydroxylation and Influence of Cytochrome b5, *Arch. Biochem. Biophys.*, 249, 326-38, (1986).
- KOBAYASHI S., Rikans L.E., Kinetic Properties of Guinea Pig Liver NADPH-Cytochrome P450 Reductase, *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B, 313-8, (1984).
- KOVACIC P., Osuna JA. Jr., Mechanisms of Anti-Cancer Agents: Emphasis on Oxidative Stress and Electron Transfer, *Curr. Pharm. Des.*, 6, 277-309, (2000).
- KUKIELKA E., Cederbaum A.I., DNA Strand Cleavage as a Sensitive Assay for the Production of Hydroxyl Radicals by Microsomes: Role of Cytochrome P4502E1 in the Increased Activity After Ethanol Treatment, *Biochem. J.*, 302, 773-9, (1994).
- KUMAGAI Y., Tsurutani Y., Shinyashiki M., Homma-Takeda S., Nakai Y., Yoshikawa T., Shimojo N., Bioactivation of Lapachol Responsible for DNA Scission by NADPH-Cytochrome P450 Reductase, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 3, 245-50, (1997).
- KURZBAN G. P., Strobel H. W., Preparation and Characterization of FAD-Dependent NADPH-Cytochrome P450 Reductase, *J. Biol. Chem.*, 261, 7824-30, (1986).
- LAEMMLI U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophages T4, *Nature*, 227, 680-4, (1970).
- LEHNINGER, L. A., *Biochemistry*, Second Edition, Worth Publishers, Inc., New York, (1975).
- LOWRY O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-75, (1951).
- LOWN J.W., The Mechanism of Action of Quinone Antibiotics, *Mol. Cell Biochem.*, 55, 17-40, (1983).
- LU A. Y. H., Coon M. J., Role of Hemoprotein P450 in Fatty Acid  $\omega$ -Hydroxylation in a Soluble Enzyme System From Liver Microsomes, *J. Biol. Chem.*, 243, 1331-2, (1968).
- LU A.Y.H., Junk K.W., Coon M.J., Resolution of the Cytochrome P450 Containing Omega-Hydroxylation System of Liver Microsomes Into Three Components, *J. Biol. Chem.*, 244, 3714-21, (1969).
- Lu A. Y. H., Kuntzman R., West S., Jacobson M., Conney A. H., Reconstituted Liver Microsomal Enzyme System that Hydroxylates Drugs, Other Foreign Compounds and

- Endogenous Substrates. II. Role of the Cytochrome P450 and P448 Fractions in Drug and Steroid Hydroxylations, *J. Biol. Chem.*, 247, 1727-34, (1972).
- LU A. Y. H., Levin W., The Resolution and Reconstitution of the Liver Microsomal Hydroxylation System, *Biochem. Biophys. Acta.*, 344, 205-40, (1974).
- LU, A.Y.H., *NADPH-Dependent Cytochrome P450 Reductase*, Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds, ed: Arınç E., Schenkman J.B., Hodgson E., Plenum Press, New York, (1991). Pp: 135.
- MASTERS B.S.S., Williams C.H., Kamin H., The Preparation and Properties of Microsomal TPNH-Cytochrome c Reductase from Pig Liver, *Methods Enzymol.*, 10, 565-73, (1967).
- MAYER R. T., Durrant J. L., Preparation of Homogenous NADPH Cytochrome c (P450) Reductase from House Flies Using Affinity Chromatography Techniques, *J. Biol. Chem.*, 254, 756-61, (1979).
- MINOTTI G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L., Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev.*, 56, 185-229, (2004).
- MUNRO A., Noble M., Robledo L., Daff S., Chapman S., Determination of the Redox Properties of Human NADPH-Cytochrome P450 Reductase, *Biochemistry*, 40, 1956-63, (2001).
- NASH T., The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reaction, *Biochem. J.*, 55, 416-21, (1953).
- NATSUHORI M., van Raak M., Ligtenberg M., Kleij L., Berge D., Zweers-Zeilmaker W.M., de Groone E.M., van Miert A.S.J.P.A.M., Witkamp R.F., Horbach G.J., Isolation of a Bovine Full Length Cytochrome P450 (CYP3A) cDNA Sequence and Its Functional Expression in V79 Cells, *Environ. Toxicol. Phar.*, 3, 17-24, (1997).
- NEBERT D.W., Russell D.W., Clinical Importance of the Cytochromes P450, *Lancet*, 360, 1155-62, (2002).
- NISHIBAYASHI H., Sato R., Preparation of Hepatic Microsomal Particles Containing P-450 as Sole Heme Constituent and Absolute Spectra of P-450, *Biochem. J.*, 63, 766-79, (1968).
- OMURA T., Sato R., The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Solubilization, Purification and Properties, *J. Biol. Chem.*, 239, 2379-85, (1964).
- PAWLOWSKA J., Tarasiuk J., Wolf C.R., Paine M.J.I., Borowski E., Differential Ability of Cytostatics from Anthraquinone Group to Generate Free Radicals in Three Enzymatic Systems: NADH Dehydrogenase, NADPH Cytochrome P450 Reductase and Xanthine Oxidase, *Oncol. Res.*, 13, 245-52, (2003).
- PHILLIPS A. H., Langdon R. G., Hepatic Triphosphopyridine Nucleotide-Cytochrome c Reductase: Isolation, Characterization, and Kinetic Studies, *J. Biol. Chem.*, 237, 2652-60, (1962).
- PORTER T. D., Kasper C. B., Coding Nucleotide Sequence of Rat NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase cDNA and Identification of Flavin-Binding Domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 973-7, (1985).
- POWIS G., Metabolism and Reactions of Quinoid Anticancer Agents, *Pharmacol. Ther.*, 35, 57-162, (1987).
- POWIS G., Free Radical Formation by Antitumor Quinones, *Free Radic. Biol. Med.*, 6, 63-101, (1989).
- ROOSEBOOM M., Commandeur J.N., Vermeulen N.P., Enzyme-Catalyzed Activation of Anticancer prodrugs, *Pharmacol. Rev.*, 56, 53-102, (2004).
- SEOW H.A., Penketh P.G., Baumann R.P., Sartorelli A.C., Bioactivation and Resistance to Mitomycin C, *Methods. Enzymol.*, 382, 221-33, (2004).
- SHEN, A., Kasper, C.B., *Protein and Gene Structure and Regulation of NADPH-Cytochrome P450 Reductase*, Handbook of Experimental Pharmacology, ed: Schenkman J.B., Greim H., Springer-Verlag Press, New York, (1993). Pp: 35.



- SHEN T., Hollenberg P.F., The Mechanism of Stimulation of NADPH Oxidation During the Mechanism-Based Inactivation of Cytochrome P450 2B1 by N-Methylcarbazole: Redox Cycling and DNA Scission, *Chem. Res. Toxicol.*, 7, 231-8, (1994).
- SINHA B.K., Free Radicals in Anticancer Drug Pharmacology, *Chem-Biol Interactions*, 69, 293-317, (1989).
- SIVAPATHASUNDARAM S., Magnisali P., Coldham N.G., Howells L.C., Sauser M.J., Ionnides C., A Study of the Expression of the Xenobiotic-Metabolising Cytochrome P450 Proteins and of Testosterone Metabolism in Bovine Liver, *Biochem. Pharmacol.*, 62, 635-45, (2001).
- SPANSWICK V.J., Cummings J., Smyth J.F., Current Issues in the Enzymology of Mitomycin C Metabolic Activation, *Gen. Pharmacol.*, 31, 539-44, (1998).
- STRITTMATTER P., Velick S.F., The Purification and Properties of Microsomal Cytochrome Reductase, *J. Biol. Chem.*, 228, 785-99, (1957).
- ŞEN A, Arınç E., Purification and Characterization of NADPH-Cytochrome P450 Reductase from Liver Microsomes of Feral Leaping Mullet (*Liza Saliens*), *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 12, 103-13, (1998).
- TAATJES D.J., Gaudiano G., Resing K., Koch T.H., Redox Pathway Leading to the Alkylation of DNA by the Anthracycline, Antitumor Drugs Adriamycin and Daunomycin, *J. Med. Chem.*, 40, 1276-86, (1997).
- TARASIUK J., Garnier-Suillerot A., Stefanska B., Borowski E., The Essential Role of Anthraquinones as Substrates for NADH Dehydrogenases in their Redox Cycling Activity, *Anticancer Drug Des.*, 7, 329-40, (1992).
- TOWBIN H., Staehelin T., Gordon J., Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4, (1979).
- VERMILLION J. L., Coon M. J., Identification of the High and Low Potential Flavins of Liver Microsomal NADPH-Cytochrome P450 Reductase, *J. Biol. Chem.*, 253, 8812-19, (1978).
- WALTON M.I., Smith P.J., Workman P., The Role of NAD(P)H:Quinone Reductase (EC 1.6.99.2, DT-Diaphorase) in the Reductive Bioactivation of the Novel Indoloquinone Antitumor Agent EO9, *Cancer Commun.*, 3, 199-206, (1991).
- WERCK-REICHHART D., Feyereisen R., Cytochrome P450: a success story, *Genome Biol.*, 1, 1-9, (2000).
- WILLIAMS C. H. Jr., Kamin H., Microsomal Triphosphopyridine Nucleotide Cytochrome c Reductase of Liver, *J. Biol. Chem.*, 237, 587-95, (1962).
- WOLF C.R., Slaughter S.R., Marciniszyn J.P., Philpot R.M., Purification and Structural Comparison of Pulmonary and Hepatic Cytochrome P-450 From Rabbits, *Biochim. Biophys. Acta.*, 624, 408-19, (1980).
- YASUKOCHI Y., Masters B. S. S., Some Properties of a Detergent Solubilized NADPH-Cytochrome c (Cytochrome-P450) Reductase Purified by Biospecific Affinity Chromatography, *J. Biol. Chem.*, 251, 5337-44, (1976).
- YASUKOCHI Y., Okita R. T., Masters B. S. S., Comparison of Properties of Detergent Solubilized NADPH-Cytochrome P450 Reductases from Pig Liver and Kidney: Immunological, Kinetic and Reconstitutive Properties, *Arch. Biochem. Biophys.*, 202, 491-8, (1980).
- YONETANI T., Studies on Cytochrome c Peroxidase. II. Stoichiometry Between Enzyme, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Ferrocycytochrome c and Enzymic Determination of Extinction Coefficients of Cytochrome c. *J. Biol. Chem.*, 240, 4509-14, (1965).

**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> 106T139
<b>Proje Başlığı:</b> NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enziminin Sığır Karaciğer Mikrozomlarından Preparatif Ölçekte Saflaştırılması, Antikor Elde Edilmesi ve Enzimin İmmünolojik, Kinetik, Biyokatalitik ve Diğer Fonksiyonel Özelliklerinin Karakterizasyonu
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Prof. Dr. Emel ARINÇ, Dr. Haydar ÇELİK
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> Orta Doğu Teknik Üniversitesi, İnönü Bulvarı, 06531, Ankara/TÜRKİYE
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> Yok
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01/07/2006-01/07/2009
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Proje kapsamında sitokrom P450 redüktaz sığır karaciğer dokusundan çeşitli kromatografik yöntemlerle ve iyonik olmayan deterjan Emulgen 913 ve iyonik deterjan kolat kullanılarak preparatif ölçekte ve biyokatalitik olarak aktif formda saflaştırıldı. Saflaştırılan sığır P450 redüktazın koyun akciğer P450 redüktazına göre daha stabil bir enzim olduğu bulundu. Saflaştırılmış NADPH-sitokrom P450 redüktazın nikel, kadmiyum ve kurşun ağır metal tuzları ile olan etkileşimine bakıldı ve bu metallerin inhibisyon mekanizmaları ortaya kondu. Elde edilen sonuçlar, Pb ve Cd gibi ağır metallerin redüktaz enzimini inhibe ederek monooksijenazların detoksifikasyon işlevini engellediğini ve sonucu kimyasal karsinogenesis kadar giden toksik etkide önemli bir rol oynadığını işaret etti. Saflaştırılan sığır karaciğer P450 redüktazına karşı ilk defa poliklonal antikorlar üretilerek sığır karaciğer P450 redüktazın koyun akciğer P450 redüktazı ile olan immünolojik benzerlikleri ortaya kondu. Bu amaçla, proje kapsamında ayrıca koyun akciğer sitokrom P450 redüktazına karşı da poliklonal antikorlar üretildi. Böylece, biyoteknolojik ve farmasötik uygulamaları olan endüstriyel bir ürün elde edilmiş oldu. Saflaştırılan sığır karaciğer P450 redüktaz ile birlikte proje kapsamında saflaştırılan diğer P450 redüktazlar kullanılarak (koyun akciğer ve tavşan karaciğer P450 redüktazları) antikanser ilaç idarubisinin etki mekanizması moleküler düzeyde araştırıldı. Bu amaçla yürütülen deneyler model bir bileşik olarak kullanılan mitomisin C ile tekrar edildi ve elde edilen sonuçlar mukayese edildi. P450 redüktazın idarubisinin redüktif biyoaktivasyonunu katalize ederek DNA'da tek zincir kırıkları oluşturması, bu yolun idarubisinin antitümör etkisine potansiyel olarak katkıda bulunan bir mekanizma olabileceği hususunu öngördü.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Sığır karaciğer NADPH-sitokrom P450 redüktazı; Preparatif saflaştırma; Enzim Karakterizasyonu; Poliklonal antikor üretimi; Metal inhibisyonu; Toksik etki; Antikanser ilaçlar; İdarubisin; Mitomisin C; Redüktif biyoaktivasyon; ROS; DNA hasarı.
<b>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> <small>Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.</small>
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> <b>Yurt Dışı Makaleler ("Science Citation Index" taranan)</b> <i>Çelik H. ve 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. Pharm. Sci. 11(4): 68-82.</i> <b>Uluslararası Toplantılarda Sunulan Bildiriler</b> <i>Çelik H. Arınç, E. Mechanisms and Involvements of NADPH-Cytochrome P450 Reductase and NADH-Cytochrome b5 Reductase in Mitomycin C and Idarubicin</i>

Promoted DNA Damage and "ROS" Formation: A Study with Rabbit Liver Microsomes and Purified Enzymes. 14<sup>th</sup> North American ISSX Meeting, October 22-26, 2006, Rio Grande, Puerto Rico. ***Drug Metabolism Reviews***, Volume 38, supplement 2, pp. 91-92.

Çelik H. Arinç, E. Bioactivation of Mitomycin C Responsible for Formation of "ROS" and DNA Scission by Lung Cytochrome P450 Reductase. 31<sup>st</sup> FEBS Congress, Molecules in Health and Disease, June 24-29, 2006, İstanbul, Turkey. ***The FEBS Journal***, Volume 273, supplement 1, pp. 160.

Çelik H. Arinç, E. A Comparison of the in vitro DNA-Damaging Potential of the Two Anticancer Drugs Idarubicin and Mitomycin C in the Presence of NADPH-Cytochrome P450 Reductase. 9<sup>th</sup> European ISSX Meeting, June 4-7, 2006, Manchester, UK. ***Drug Metabolism Reviews***, Volume 38, supplement 1, pp. 185-186.

Çelik H. Arinç, E. Involvement of NADPH-cytochrome P450 Reductase and NADH Cytochrome b5 Reductase on the Activation of Idarubicin to Generate Single-Strand Breaks in DNA and "ROS" Formation. 9<sup>th</sup> International Workshop on Radiation Damage to DNA, May 13-17, 2006, Tekirova, Antalya, Turkey. Abstract Book, pp. 32-33.