

577.152.162.083
A 711 k

1996-1965

TÜRKİYE BİLİMSEL ve TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

TIP ARAŞTIRMA GRUBU

PROJE NO: TAG-519

KİMYASAL KANSEROJENESİSDE ROL OYNAYAN
ENZİMLERİN KARAKTERİZE EDİLMESİ.
KOYUN KARACİĞER VE AKCİĞER MİKROZOMLARINDAN
NADPH'YE BAĞIMLI SİTOKROM c REDÜKTAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZE EDİLMESİ

EMEL ARINÇ

MESUDE İŞCAN

ORTA DOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

BIYOLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ

ANKARA

1985

577,152,162,083
A 711 k

TÜRKİYE BİLİMSEL ve TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

TIP ARAŞTIRMA GRUBU

PROJE NO: TAG-519

KİMYASAL KANSEROJENESİSDE ROL OYNAYAN
ENZİMLERİN KARAKTERİZE EDİLMESİ.
KOYUN KARACİĞER VE AKCİĞER MİKROZOMLARINDAN
NADPH'YE BAĞIMLI SİTOKROM c REDÜKTAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZE EDİLMESİ

EMEL ARINÇ

MESUDE İŞCAN

ORTA DOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

BİYOLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ

ANKARA

1985

15277

Ö Z E T

NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enzimi (E.C. 1.6.2.4), koyun karaciğer ve akciğer mikrozoamlarından, proteaz inhibitörleri ve deterjanlar (kolat ve Emulgen 913) varlığında, DEAE-cellülose, 2', 5'-ADP Sepharose 4B ve hidroksilapatit kolon kromatografileri ile elektroforetik saflıkta ve mikrozoamlara oranla %50-58 verimle elde edildi. Saflaştırılan enzimlerin poliakrilamit jel elektroforezinde, NADPH'ye bağımlı nitro blue tetrazolium ve sitokrom c redüktaz aktivitelerine sahip, tek protein bandı verdiği gözlemlendi. Akciğer redüktaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-poliakrilamit jel elektroforezinde 78 000 olarak bulundu. Yeni hazırlanmış karaciğer enzimi ise moleküler ağırlıkları 78 000 ve 68 000 olan iki protein bandı gösterdi. Moleküler ağırlıkları farklı olan bu iki redüktaz enzimi birbirlerinden Sephadex G-200 kolon kromatografisi ile ayrıldılar. Redüktaz enzimleri proteaz inhibitörleri yokluğunda saflaştırıldıklarında ve saflaştırılmış enzimlerin saklanması esnasında düşük moleküler ağırlıklı (68 000) redüktaz enziminin oluştuğu gözlemlendi. Enzimin bu formunun proteolitik kırılma sonucunda oluştuğu saptandı. Koyun karaciğer ve akciğer redüktaz enzimlerinin maksimum aktiviteleri için optimum koşullar incelendi. Kullanılan proteaz inhibitörleri, fenilmetilsülfonil flörür ve ϵ -amino-n-kaproik asit'in redüktaz aktivitesine etkisi olmadığı saptandı. Akciğer redüktazın

absorpsiyon spektrumu 374 ve 455 nm'de flavoproteinlere özgü olan iki tepecik gösterdi. Karaciğer redüktazı da akciğer redüktazındakine benzer bir absorpsiyon spektrumu verdi. Karaciğer ve akciğer redüktazlarının 1 mol enzim başına 1 er mol FMN ve FAD içerdikleri saptandı. Karaciğer redüktazının K_m değerleri sitokrom c ve NADPH için $22.2 \pm 2.78 \mu M$ ve $14.3 \pm 1.23 \mu M$ olarak bulundu. Akciğer enziminin K_m değerleri ise sitokrom c için $20.0 \pm 2.15 \mu M$ ve NADPH için $11.1 \pm 0.70 \mu M$ olarak saptandı. Ayrıca, saflaştırılan karaciğer ve akciğer redüktazlarının sitokrom P-450 ve lipit ile tüpte birleştirildiklerinde anilin 4-hidroksilasyon, etilmorfin N-demetilasyon ve benzo(a) piren hidroksilasyon reaksiyonlarını gerçekleştirdikleri gösterildi.

Anahtar kelimeler : Sitokrom (P-450)c redüktaz, koyun karaciğer ve akciğer, kinetik çalışmalar, saflaştırma, anilin 4-hidroksilasyon, etilmorfin N-demetilasyon, benzo(a) piren hidroksilasyon, karışık fonksiyonlu oksidazlar, kimyasal kanserojenesis enzimleri.

ABSTRACT

NADPH dependent cytochrome c reductase (E.C. 1.6.2.4) was purified to electrophoretic homogeneity from sheep liver and lung microsomes by column chromatography on DEAE-cellulose, 2', 5'-ADP Sepharose 4B and hydroxylapatite in the presence of protease inhibitors and detergents, cholate and Emulgen 913. The specific activity of both enzymes ranged from 55 to 66 μmol cytochrome c reduced/minmg protein and the yield was 50-58% of the initial activity in microsomes. The polyacrylamide gel electrophoresis of the purified liver and lung reductase showed a single major protein band, exhibiting NADPH dependent nitro blue tetrazolium and cytochrome c reductase activities. The monomer molecular weight of lung reductase was found to be 78 000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. However, the newly prepared liver reductase showed one major (m.w. 78 000) and one minor (m.w. 68 000) protein bands, which were separated from each other upon chromatography on Sephadex G-200. The purification of the liver and lung reductases in the absence of protease inhibitors, and storage of the enzymes caused the formation of 68 000 molecular weight form of reductase which was shown to be a proteolytically cleaved form of the enzyme. The optimum conditions for NADPH dependent cytochrome c reduction were examined. The protease

inhibitors, phenylmethylsulfonyl fluoride and ϵ -amino-n-caproic acid had no effect on reductase activity. The absorption spectrum of lung reductase showed two peaks at 374 nm and 455 nm which were typical for flavoproteins, and a shoulder at 475 nm. Liver reductase also exhibited an absorption spectrum similar to that of lung reductase. It was found that liver and lung reductases contained 1 mol of each FMN and FAD per mol of enzyme. The K_m values obtained for sheep liver reductase in 0.3 M phosphate buffer, pH 7.8, at 37°C were K_m (NADPH) = $14.3 \pm 1.23 \mu\text{M}$, K_m (cytochrome c) = $22.2 \pm 2.78 \mu\text{M}$, which were similar to K_m values for the lung reductase; K_m (NADPH) $11.1 \pm 0.70 \mu\text{M}$ and K_m (cytochrome c) $20.0 \pm 2.15 \mu\text{M}$. A kinetic analysis of the purified sheep liver and lung reductases revealed that they operated through a ping-pong mechanism. Liver and lung reductases were shown to be biocatalytically active in supporting the aniline 4-hydroxylation, ethylmorphine N-demethylation and benzo(a)pyrene hydroxylation reactions when coupled with cytochrome p-450 and lipid.

Key words: cytochrome c (P-450) reductase, sheep liver and lung, purification, kinetic studies, aniline 4-hydroxylation, ethylmorphine N-demethylation, benzo(a)pyrene hydroxylation, mixed-function oxidases, enzymes in chemical carcinogenesis.

TAG-519 SAYILI PROJE
İLE İLGİLİ YAYINLAR

1. İşcan, M.Y., ve Arınç, E.; "Studies on microsomal drug metabolizing enzymes of sheep liver and lung: II. Purification of NADPH dependent cytochrome c reductase from sheep lung. Balkan Pharmacological days. (Abstract) 14-17 Ekim, 1982, Varna Bulgaristan. Sayfa 34.
2. İşcan M.Y., ve Arınç, E.: "Afinite kolon kromatografisi ile koyun karaciğer mikrozomlarından NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin saflaştırılması", V. Ulusal Biyokimya Kongresi Bildiri özetleri, sayfa , 1983, (20-22 Ekim 1983, Ankara)
3. İşcan, M.Y., ve Arınç, E.: "Purification and characterization of microsomal NADPH dependent cytochrome c reductase from sheep liver", 16. FEBS Toplantısı (Abstract) sayfa 309, 1984 (25-30 Haziran, 1984, Moskova, Rusya).
4. İşcan M.Y., ve Arınç, E.: "NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin koyun karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması ve bazı özellikleri", Doğa Bilim Dergisi seri C'de basılacak.
5. İşcan, M.Y., ve Arınç, E.: "Purification and properties of NADPH dependent cytochrome c reductase from sheep lung microsomes", (makale hazırlanmakta).
6. İşcan, M.Y., ve Arınç, E.: "Comparative studies of sheep liver and lung NADPH dependent cytochrome c reductase", (makale hazırlanmakta).

Bu Makale

Doğa Bilim Dergisi Seri C'de
basılacaktır.

NADPH'YE BAĞIMLI SİTOKROM C REDÜKTAZ ENZİMİNİN KOYUN
KARACİĞER MİKROZOMLARINDAN SAFLAŞTIRILMASI VE
BAZI ÖZELLİKLERİ (*)

Mesude Y. İŞCAN(**) ve Emel ARINÇ(***)

**Dr., Araştırma Görevlisi, O.D.T.Ü., Biyolojik Bilimler
Bölümü, Ankara.

***Doç. Dr., O.D.T.Ü., Biyolojik Bilimler Bölümü, Ankara.

Türü: ARAŞTIRMA

SERİ C

*Bu çalışma, TÜBİTAK (Ankara) tarafından desteklenmiştir
(TAG-519).

NADPH'YE BAĞIMLI SİTOKROM C REDÜKTAZ ENZİMİNİN KOYUN
KARACİĞER MİKROZOMLARINDAN SAFLAŞTIRILMASI VE
BAZI ÖZELLİKLERİ (*)

Mesude Y. İŞCAN^(**) ve Emel ARINÇ^(***)

^{**}Dr., Araştırma Görevlisi, O.D.T.Ü., Biyolojik Bilimler
Bölümü, Ankara.

^{***}Doç. Dr., O.D.T.Ü., Biyolojik Bilimler Bölümü, Ankara.

Türü: ARAŞTIRMA

SERİ C

*Bu çalışma, TÜBİTAK (Ankara) tarafından desteklenmiştir
(TAG-519).

ÖZET

NADPH'YE BAĞIMLI SİTOKROM c REDÜKTAZ ENZİMİNİN KOYUN KARACİĞER MİKROZOMLARINDAN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI ÖZELLİKLERİ (*)

Koyun karaciğer mikrozomlarında zara bağlı olarak bulunan NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enzimi, mikrozomlardan %1,0 Emulgen 913 ve %0,4 kolat kullanılarak optimum bir verimle, proteaz inhibitörleri varlığında çözünürleştirildi. DEAE-Selüloz ve 2',5'-ADP Sepharose 4B kolon kromatografileri ile saflaştırılan redüktaz enzimi 2'-AMP ve fazla Emulgen 913'ten arıtılmak amacıyla Sephadex G-25 ve Porapak Q kolonlarına uygulandı. Hidroksilapatit kolonunda konsantre edilerek, elektroforetik saflıkta ve mikrozomlara oranla %58 verimle elde edildi. Saflaştırılan redüktaz enzimi, poliakrilamit jel elektroforezinde, NADPH'ye bağımlı Nitro Blue Tetrazolium ve sitokrom c redüktaz aktivitelerini içeren tek bir ana protein bandı verdi. Koyun karaciğer redüktaz enziminin maksimum aktivitesi için pH ve iyonik kuvvet optimumları incelendi. Kullanılan proteaz inhibitörleri, fenilmetilsulfonil flörür ve ϵ -amino kaproik asitin redüktaz aktivitesine etkileri olmadığı gösterildi. Enzimin absorpsiyon spektrumu 376 ve 454 nm'de flavoproteinlere özgü iki tepecik gösterdi ve saflaştırılmış koyun karaciğer redüktazının 1 mol enzim başına 1'er mol FMN ve PAD içerdikleri saptandı.

(*)Bu çalışma, TÜBİTAK (Ankara) tarafından desteklenmiştir
(TAG-519)

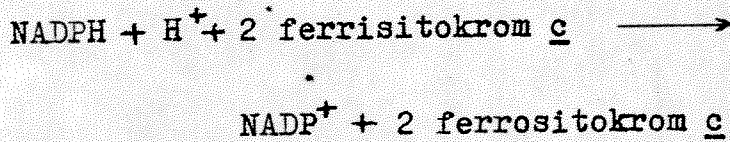
SUMMARY

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF NADPH DEPENDENT CYTOCHROME c REDUCTASE FROM SHEEP LIVER MICROSOMES

NADPH dependent cytochrome c reductase was solubilized from sheep liver microsomes using 1.0% Emulgen 913 and 0.4% cholate in the presence of protease inhibitors. The solubilized enzyme was purified by DEAE-Cellulose and 2',5'-ADP Sepharose 4B column chromatographic methods and then applied to Sephadex G-25 and Porapak Q columns to remove 2'-AMP and excess Emulgen 913, respectively. Finally, reductase was concentrated on hydroxylapatite column and obtained in the electrophoretically homogeneous form with the yield of 58% with respect to microsomes. The polyacrylamide gel electrophoresis of the purified liver reductase showed a single major band, exhibiting NADPH dependent Nitro Blue Tetrazolium and cytochrome c reductase activities. The ionic strength and the pH optima for maximum NADPH dependent cytochrome c reduction were examined. The protease inhibitors, phenylmethylsulfonyl-fluoride and ϵ -amino caproic acid had no effect on reductase activity. The absorption spectrum of the liver reductase showed two peaks at 376 and 454 nm which were typical for flavoproteins, and it was found that the liver reductase contained 1 mol of each FMN and FAD per mol of enzyme.

GİRİŞ

NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz (NADPH:ferrisitokrom oksidoredüktaz, E. C. 1.6.2.4), aşağıda gösterilen reaksiyonu katalize eden, mikrozomal zara bağlı bir enzimdir.



Redüktaz enzimi, ilk kez 1950 yılında Horecker (1) tarafından domuz karaciğerinin aseton tozundan tripsin muamelesi ile saflaştırıldı ve bir flavoprotein olduğu gösterildi.

Daha sonraki yıllarda, Williams ve Kamin (2) ve Phillips ve Langdon (3), redüktaz enzimini sığır ve domuz karaciğer mikrozomlarından, sırasıyla, lipaz (kısmen saflaştırılmış steapsin) ve tripsinle çözünürleştirerek saflaştırdılar. Bu grupların çalışmaları NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin mikrozomlarda bulunduğunu gösterdi. Ayrıca, redüktaz enziminin sitokrom c'den başka neotetrazolyum, ferrisiyanit, diklorofenolindofenol gibi yapay elektron alıcılarına da elektron transferini sağladığı kanıtlandı.

1950-1968 yılları arasında yapılan çalışmalarda, proteolitik yöntemlerle çözünürleştirilerek saflaştırılan redüktaz enziminin fizyolojik fonksiyonunun ne olduğu bulunamadı. Ancak daha sonraki yıllarda çeşitli alanlarda yapılan araştırmalar sonucunda, NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin vücuttaki rolünün, NADPH'den sitokrom P-450'ye elektron transfer etmek olduğu (4-6) ve bu enzimin sitokrom P-450'ye bağımlı olarak çalışan, kolesterol, hemoglobin, yağ asitleri, safra tuzları, steroid hormonları gibi endojen maddeleri olduğu kadar ilaçlar, insektisitler, kimyasal karsinojenler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar

ve gıda katkı maddelerini de metabolize eden, karışık fonksiyonlu oksidazların (KFO) bir üyesi olduğu gösterildi (7-10). Ayrıca, lipaz ve proteazlar ile mikrozomlardan çözünürleştirilerek elde edilen redüktaz enziminin sitokrom P-450'yi indirgemediği (5, 11, 12), deterjanlar kullanılarak çözünürleştirilen NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin ise sitokrom P-450'ye elektron transfer etme özelliğini koruduğu saptandı (4,6,11-14).

Daha sonraki yoğun çalışmalarda, redüktaz enzimi domuz, tavşan ve sıçan karaciğer mikrozomlarından deterjanlar yardımıyla çözünürleştirildikten sonra, iyon değiştirici kolonlarda veya jel filtrasyon kolon kromatografisi ile saflaştırıldıysa da, mikrozomlara oranla oldukça düşük saflaştırma verimi elde edildi (15-20).

Deterjanla çözünürleştirilen redüktaz enziminin saflaştırılmasında kaydedilen en önemli aşama afinite kolon kromatografisinin saflaştırma yöntemlerine katılmasıdır. İlk kez, 1976'da Yasukochi ve Masters (21) 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolon maddesini saflaştırmalarında kullandılar. 1977'de, Dignam ve Strobel (22) ise ligand olarak NADP⁺ bağlanmış afinite kolonunu geliştirdiler.

NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enzimi sıçan (21,23,24), tavşan (25,26), fare (27), kobay (28) ve insan (26) karaciğer mikrozomlarından Yasukochi ve Masters'ın (21) afinite kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırıldı. Ayrıca, bu yöntemle elde edilen redüktaz enzimlerinin biyokatalitik aktivitelerini korudukları da gösterildi (6,14,21,22,25,29-32).

Şimdiye kadar yapılan çalışmaların neticesinde, insanlarda oluşan kanserlerin yaklaşık %80'ine çevresel kimyasal maddelerin neden olduğu ve bu kimyasal maddelerin çoğunun vücutta, NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz ve sitokrom P-450'ye bağımlı KFO sistemi tarafından kanserojenik maddelere çevrildiği gösterilmiştir (33,34). KFO tarafından aktive edilen bu maddelerin arasında 2-asetilamino floren (35), vinilklörür ve benzpiren ve benzantrasen gibi polisiklik aromatik hidrokarbonlar (33,36-39) bulunur. Epoksitler veya diol epoksitleri gibi aktif ve potansiyel olarak tehlikeli metabolitler, bu kimyasalların vücutta

oluşan ürünleridir. Bu ürünlerin DNA ile bağlanmalarının kanser oluşumuyla ilgisi gösterilmiştir (33,39).

Yukarıda belirtildiği gibi, bu güne kadar yapılan çalışmalarda redüktaz enzimi insan ve birçok hayvan türünün karaciğer mikrozomlarından saflaştırılmıştır. Ancak, literatürde koyun karaciğer redüktaz enzimi ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamaktadır. Koyun karaciğerinin özellikle besin maddesi olarak kullanılması nedeniyle ekonomi ve sağlıkla ilgili öneminden dolayı, koyun karaciğer KFO sisteminin bir bileşeni olan NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin özelliklerinin karakterize edilmesi önem kazanmaktadır. Bu nedenle, öncelikle enzimin homojen bir saflıkta elde edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı, NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin koyun karaciğer mikrozomlarından maksimum bir verimle çözünürleştirilmesi ve saflaştırılması ve bazı özelliklerinin saptanmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Kimyasal Maddeler

Emulgen 913, Kao-Atlas Co. Ltd., Tokyo (Japonya)dan DEAE-Selüloz (DE-52), Whatman Biochemicals Ltd. Kent (İngiltere)den, hidroksilapatit, Bio-Rad Laboratories, Richmond, California (A.B.D.)den, Porapak Q, Waters Associates, Milford, Mass. (A.B.D.)den, 2',5'-ADP Sepharose 4B ve Sephadex G-25, Pharmacia Fine Chemicals Inc., Uppsala (İsveç)den, sodyum kolat, bisakrilamit, akrilamit, at kalbi sitokrom c (tip VI), NADPH, Coomassie Blue, 2'-AMP, PMSF, ϵ -ACA, NBT, Sigma Chemical Company (ABD)den, karbon monoksit, Fisher Scientific Company (ABD)den satın alındı.

1. Koyun Karaciğer Mikrozomlarının Hazırlanması

Koyun karaciğer mikrozomları genel olarak, Arınc ve İşcan (40) tarafından tarif edilen yöntemle hazırlandı.

Et ve Balık Kurumu'nda (Ankara) 6-12 aylık koyunlardan alınan hastaliksız karaciğerler, safra keselerinden ayrıldıktan sonra, buz içindeki plastik torbalarda labora-

tuvara getirildi. Bundan sonraki bütün işlemler soğuk odada 0-4°C'de yapıldı. Karaciğerler önce soğuk distile su, sonra da 0,15 M KCl solüsyonu ile yıkanarak, kanından arıtıldı. Yağ ve bağ dokuları temizlendi. Makasla ufak parçalara ayrılarak, et kıyma makinasından geçirildi. Kıyılmış karaciğerler, 1 g karaciğer için 4 ml olacak şekilde hacmi hesaplanan, 1 mM EDTA, 0,25 mM fenilmetilsülfonilflörür (PMSF) ve 0,25 mM ϵ -amino-n-kaproik asit (ϵ -ACA) içeren 0,15 M KCl çözeltisi içinde, teflon-cam homojenize aygıtı ile homojenize edildiler. Homojen haldeki karaciğerler Sorvall RC-2B soğutmalı santrifüjünde 12 000xg'de 25 dakika çevrildi. Mitokondri ve hücre çekirdeğini içeren çökelti atıldı. Süpernatant çözeltilerden mikrozomlar, çözeltinin Beckman L2 65B Ultrasantrifüjünde 133 573xg'de 50 dakika çevrilmesiyle çöktürüldü. Çöken mikrozomların üstündeki çözelti atıldı ve mikrozomlar yıkanmak üzere 1 mM EDTA, 0,25 mM PMSF ve 0,25 mM ϵ -ACA içeren 0,15 M KCl çözeltisinde süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyondan, mikrozomlar, süspansiyonun ultrasantrifüjde 133 573xg'de 40 dakika döndürülmesiyle çöktürüldü. Elde edilen mikrozom çökeleğinin üstündeki çözelti atıldı. Mikrozomlar, 1 g karaciğere 0,5 ml çözelti eşdeğer olacak şekilde 1 mM EDTA, 0,25 mM ϵ -ACA ve 0,25 mM PMSF içeren % 25'lik gliserin çözeltisi içinde süspansiyon edilerek, teflon-cam homojenizasyon aygıtında homojenize edildi. Bu şekilde elde edilen homojen karaciğer mikrozom süspansiyonunun daha önceki çalışmalarda olduğu gibi (40,41), genellikle 1 ml'de 30-35 mg protein içerdiği saptandı. Süspansiyon plastik şişelere konuldu. Şişeler azot gazı ile doldurularak, -20°C de, NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enzimi saflaştırmasında kullanılmak üzere saklandı.

2. NADPH'ye Bağımlı Sitokrom c Redüktazın Saflaştırılması

Basamak 1. Emulgen 913 ve Sodyum Kolat ile Çözünürleştirme:

NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin koyun karaciğer mikrozomlarından çözünürleştirilmesi için bir noniyonik deterjan olan Emulgen 913 ve bir iyonik deterjan

olan sodyum kolat kullanıldı (13,14). En yüksek çözünürleştirme verimi elde edilen ortam koşulları aşağıda verilmiştir.

Tipik bir çalışma esnasında, takriben 2 600 mg protein içeren 87 ml hacmindeki koyun karaciğer mikrozomlarına 3,2 ml 1 M potasyum fosfat tamponu, pH 7,6, 0,32 ml 0,1 M EDTA, 5 mg ditiyotreytol (DTT), 36 ml gliserin, 0,58 ml ϵ -ACA ve 1,1 ml 0,1 M PMSF ilave edilerek süspansiyonun hacmi su ile 275 ml'ye getirildi. Bu şekilde %20 gliserin, 0,1 mM EDTA, 0,25 mM ϵ -ACA, 0,4 mM PMSF ve 0,1 mM DTT içeren (8 mg protein/ml) süspansiyona damla damla 32 ml %20 gliserin içinde %10 Emulgen 913 ve bunu takiben 13 ml %10 kolat ilave edildi. Süspansiyonun karıştırılmasına buz banyosu üzerinde 30 dakika daha devam edildi. Bu esnada mikrozomal süspansiyonun berraklaştığı gözlemlendi. Daha sonra deterjanlarla muamele edilmiş mikrozomlar 87 000xg'de 150 dakika çevrilerek çözünürleşmemiş kısımdan ayrıldılar.

Basamak 2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi:

Çözünürleşmiş mikrozomal proteinleri içeren berrak çözelti (2 000 mg protein), DEAE-Selüloz kolonuna (2,5x 35 cm) uygulandı. Bu kolon daha önceden 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, %20 gliserin, %0,5 Emulgen 913, %0,2 kolat, 0,25 mM ϵ -ACA ve 0,25 mM PMSF içeren 25 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7,6, (Tampon A) ile dengelenmişti. Numune ilave edildikten sonra, kolon takriben 2 700 ml (15,7 x kolon hacmi) Tampon A ile akış hızı saatte 60 ml olacak şekilde yıkandı. NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enzimi ve sitokrom b₅ kolondan Tampon A içinde lineer adımla ilerleyen 0-0,4 M KCl çözeltisi (toplam 900 ml) uygulanarak alındı.

Basamak 3. Ultrafiltrasyon:

DEAE-Selüloz kolonundan elde edilen redüktaz fraksiyonu (390 ml), 4°C'de azot gazı altında (3-3,5 atm) Amicon PM-30 filtresinden geçirilerek, 88 ml'ye kadar konsantre edildi.

Basamak 4. 2',5'-ADP Sepharose 4B Afinité Kolon Kromatografisi:

DEAE-Selüloz kolonundan alınıp konsantre edilen, kısmen saflaştırılmış redüktaz enziminin daha ileri düzeydeki saflaştırılması, ilk kez 1976 yılında Yasukochi ve Masters

(21) tarafından önerilen 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolon kromatografisi ile yapıldı. Bu çalışma esnasında öncelikle, koyun karaciğer redüktazının reçineye en yüksek verimle bağlanabilmesi için optimum koşullar saptandı. Bu kolon (1,4x10 cm) daha önceden 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, %20 gliserin, %0,1 Emulgen 913, 0,25 mM ϵ -ACA ve 0,25 mM PMSF içeren 10 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7,6, (Tampon B) ile dengelenmişti. Numune kolona optimum bir akış hızı (saatte 5 ml) ile uygulandı. Daha sonra kolon, kolon hacminin 5 katı miktarında (75 ml), 200 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7,6, içeren Tampon B ile yıkandı. Kolon tekrar bir kolon hacmi miktarındaki Tampon B ile dengelendikten sonra, redüktaz enzimi kolondan Tampon B içinde lineer adımla ilerleyen 0-4 mM 2'-AMP çözeltisi (80 ml) ile alındı.

Basamak 5. Redüktaz Enziminin 2'-AMP'den Arıtılması:
2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonundan 2'-AMP yardımıyla alınmış olan redüktaz enzimi, 2'-AMP'den temizlenmek amacıyla Sephadex G-25 kolon kromatografisine tabi tutuldu. Numune, daha önceden Tampon B ile dengelenmiş olan Sephadex G-25 kolonuna (1,7x 110 cm) uygulandı ve redüktaz enzimi yine aynı tampon ile kolonun boş hacminde (void volume) kolondan alındı.

Basamak 6. Fazla Emulgen 913'ün Uzaklaştırılması:
Redüktaz enzimi mikrozomlardan Emulgen 913 kullanılarak çözünürleştirildiğinden ve saflaştırmanın daha sonraki basamaklarında kullanılan tamponlar da bu deterjanı içerdiğinden, Sephadex G-25 kolonundan alınan redüktaz fraksiyonları birleştirilerek, Emulgen 913'ün fazlasından arıtmak amacıyla Porapak Q kolon kromatografisine uygulandı. Porapak Q kolonu (0,9x10 cm) Niederwieser (42) tarafından tarif edilen yöntemle hazırlandı. Daha sonra kolon, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, %20 gliserin, %0,5 kolat, 0,25 mM ϵ -ACA ve 0,25 mM PMSF içeren 10 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7,6, (Tampon C) ile dengelendi. Redüktaz fraksiyonu kolona uygulandı ve kolonun boş hacminde alındı.

Basamak 7. Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi:

Hidroksilapatit içeren kolonlar Levin(43) tarafından tarif edilen yöntem ile hazırlandı. Porapak Q kolonundan alınan redüktaz enzimi daha fazla saflaştırılmak ve konsantre edilmek amacıyla, daha önceden Tampon C ile dengelenmiş olan hidroksilapatit kolonuna uygulandı. Kolon, bir kolon hacmi miktarında Tampon C ile yıkandıktan sonra, redüktaz enzimi, Tampon C'deki rosfat konsantrasyonunun 300 mM'a çıkarılmasıyla hidroksilapatit kolonundan alındı.

NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz aktivitesi içeren fraksiyonlar birleştirilerek (5-7 ml) ufak hacimlerde ampullere yerleştirildi. Ampuller azot gazı ile doldurularak, -5°C'de muhafaza edildiler.

3. Analitik Yöntemler

Protein miktarı Lowry ve arkadaşlarının (44) yöntemi ile sığır serum albumini standart olarak kullanılarak tayin edildi.

NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz aktivitesi Masters ve arkadaşlarının (45) tarif ettikleri yöntemle göre tayin edildi. Farklı olarak, reaksiyon 0,3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7,8, içinde ve 37°C'de yapıldı. Aktivite tayinleri, NADPH bulunan bir ortamda, sitokrom c'nin indirgenme hızınının 550 nm'de ölçülmesine dayanır. Reaksiyon ortamındaki koşullar koyun karaciğer redüktazı için bu çalışma esnasında optimize edildiler. 1 ml'lik reaksiyon ortamı 0,3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7,8, içinde, 85 nmol sitokrom c, 130 nmol NADPH ve uygun ölçüde seyreltilmiş redüktaz enzimi içerdi. Reaksiyon NADPH ilavesiyle başlatıldı ve 550 nm'de, ısıtmalı su banyosuyla donatılmış Cary 17 Spektrofotometresinde, 37°C'de takip edildi. Enzim aktivitesi ekstinksiyon katsayısı $19,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (46) alınarak hesaplandı. 1 ünite redüktaz, 37°C'de, 1 dakikada, 1 μmol sitokrom c'yi indirgeyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

Sitokrom P-450 konsantrasyonu, Omura ve Sato (47,48) yöntemi ile Cary 17 Spektrofotometresinde, ışık yolu 1 cm olan kuvetlerde tayin edildi. %30 gliserin, 0.1 mM EDTA içeren pH'sı 7,6, 0,1 M potasyum fosfat tamponu içinde seyreltilen numuneler, sodyum ditiyonit ile indirgenerek karbon monoksit fark spektrumları alındı. Sitokrom P-450 miktarı, 400 nm ile 600 nm arasında çizilen spektrumda, 490 nm'de okunan absor-

bansın (OD), 450 nm'de okunan absorbanstan (OD) çıkarılması ile elde edilen ΔOD 'den ve ekstinksiyon katsayısı olarak $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ alınarak hesaplandı (47,48)

Sitokrom b_5 miktarı Nishibayashi ve Sato'nun (49) yöntemine göre saptandı. Numune ditiyonit ile indirgenerek, referans küvette bulunan indirgenmemiş numuneye karşı fark spektrumu alındı. Sitokrom b_5 konsantrasyonu, fark spektrumunda 424 nm ve 410 nm arasındaki absorban farkları ve ekstinksiyon katsayısı olarak $185 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ alınarak hesaplandı (47,49,50).

FMN ve FAD değerleri ise Faeder ve Siegel'in (51) yöntemlerine göre Aminco Bowman spektrofloretrisinde tayin edildi. Metodun esası, FMN ve FAD'nin pH 7,7 ve pH 2,6'da değişik ekstinksiyon katsayılarına sahip olmalarından faydalanarak, iki değişik pH değerinde yapılan floresans ölçümlerine dayanır (eksitasyon dalga boyu: 450 nm emisyon dalga boyu: 535 nm). Uygun bir oranda seyreltilen redüktaz enzimi kaynatılarak denatüre edildi ve 20 000xg'de 15 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Enzimin FMN ve FAD gruplarını içeren süpernatant çözelti ve standartlar aynı şartlar altında iki pH değerinde spektrofloretride ölçüldü. Deney şartlarına göre hesaplanan ekstinksiyon katsayıları kullanılarak redüktaz enziminin içerdiği FMN ve FAD miktarları hesaplandı (51).

4. Poliakrilamit Jel Elektrofrez:

Poliakrilamit jel elektrofrez $\%7,2$ 'lik jellerde Davis (52) ve Ornstein (53) tarafından tarif edilen yöntem uygulanarak yapıldı. Farklı olarak jeller, numune ve tampon çözelti $\%0,2$ kolat içerdi. Elektrofrez 4°C 'de, jel başına 2,5 mA akım ile başlatıldı. Protein numuneleri jele girdikten sonra bu miktar 4 mA'e yükseltildi.

Elektrofrezden sonra jeller, $\%0,25$ Coomassie Blue $\%50$ metanol ve $\%7$ asetik asit içeren çözeltide protein bantlarını saptamak için boyandılar ve bağlanmamış boyanın jellerden ayrılması için $\%30$ 'luk metanol ile 30 saatte bir kaç kez yıkandılar. Ayrıca, NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz fraksiyonlarının Nitro Blue Tetrazolium (NBT) redüktaz aktivitesi, Guengerich (54) tarafından tarif edilen yöntemle NADPH ve NBT kullanılarak jeller üzerinde tesbit edildi.

BULGULAR

Koyun Karaciğer Mikrozoamlarından NADPH'ye Bağımlı Sitokrom c Redüktaz'ın Saflaştırılması

Tablo 1'de NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktazın koyun karaciğer mikrozoamlarından saflaştırılması esnasında elde edilen fraksiyonlardaki toplam redüktaz miktarı, enzimin özgül aktivitesi, mikrozoamlardan başlayarak elde edilen saflaştırma sayısı ve verimi özetlenmektedir.

Zara bağılı bir protein olan redüktaz enzimi karaciğer mikrozoamlarından Emulgen 913 ve sodyum kolat kullanılarak çözünürleştirildi. En iyi çözünürleştirme verimini elde edebilmek için yapılan çalışmalar Tablo 2'de özetlenmektedir. Tablodaki görüldüğü gibi, 1 ml'lik çözünürleştirme ortamındaki 6,4 ile 10,0 mg arasında değişen protein miktarının verim üzerinde etkisi olmadığı saptandı. Ortamdaki kolat miktarı %0,4 iken ve %1,0'e yükseltildiğinde gözlenen %112-120'lik çözünürleştirme verimi, kolatın redüktaz aktivitesi üzerindeki aktivasyon etkisinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda redüktaz enzimi koyun karaciğer mikrozoamlarından "YÖNTEMLER" de anlatıldığı gibi çözünürleştirildi.

Karaciğer mikrozoamlarından çözünürleştirilmiş redüktaz enzimi ultrasantrifüjde çözünürleşmemiş mikrozomal fraksiyonlardan ayrıldıktan sonra, "YÖNTEMLER" de anlatıldığı gibi DEAE-Selüloz kolonuna uygulandı. Şekil 1'de DEAE-Selüloz kolon kromatografisi profili görülmektedir. Numune kolona uygulanırken, kolonun boş hacminde ve yıkama işleminin başlarında, kolondan gelen büyük miktarlardaki protein tepesiği sitokrom P-450 ve hemoglobin içermektedir. Numunenin kolona uygulanmasından sonra, kolon yaklaşık 2 700 ml Tampon A ile yıkandı. Redüktaz enzimi kolondan, Tampon A içinde lineer

olarak ilerleyen (0-0,4 M) KCl çözeltisi ile (toplam 900 ml) alındı. Şekilde görüldüğü gibi, kolondan alınan redüktaz enzimi bir miktar sitokrom b_5 içerdi. Sitokrom b_5 ile redüktaz enzimini birbirinden ayırmak için yapılan denemeler (toplam KCl gradient hacmini 1 800 ml'ye artırmak gibi) fayda vermedi.

DEAE -Selüloz kolonundan alınan fraksiyonların mg protein başına 0,99 ünite redüktaz enzimi içerdiği ve enzimin mikrozoamlara göre 7,76 kez saflaştırıldığı saptandı.

DEAE-Selüloz kolonundan alınan redüktaz enzimi, Amicon PM-30 filtresinde, ultrafiltrasyon yöntemi ile konsantre edildi. Bu yöntemle konsantrasyon esnasında, umulanın aksine, moleküler ağırlığı 12 000 olan sitokrom b_5 'in redüktazdan ayrılmadığı ve birlikte konsantre olduğu gözlemlendi. Redüktazın özgül aktivitesinde belirgin bir artış olmadı.

Amicon PM-30 filtresiyle 4,6 kez konsantre edilen redüktaz fraksiyonu, 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. Yapılan ön çalışmalarda, redüktaz fraksiyonu afinite kolona konsantre edilmeden (300 ml), saatte 12 ml akış hızıyla uygulandığında, enzimin %50'sinin kolonda tutulmadan geçtiği görüldü. Akış hızı saatte 7,5 ml'ye düşürüldüğünde bile hatırı sayılır bir kayıp gözlemlendi. Bunun üzerine DEAE-Selülozdan alınan redüktaz fraksiyonları PM-30 filtresinde konsantre edildikten sonra, saatte 5 ml akış hızıyla afinite kolona uygulandı. Kolon daha sonra "YÖNTEMLER"de anlatıldığı gibi yıkandı ve tekrar dengelendi.

NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enzimi afinite kolondan Tampon B içinde lineer olarak artan 2'-AMP (0-4 mM) gradienti (80 ml) ile tek bir tepelik olarak alındı (Şekil 2).

Bilindiği gibi sitokrom b_5 NADH'ye bağımlı elektron akış yolağının bir üyesidir (55). Bu nedenle DEAE-Selüloz kolonundan redüktaz enzimi ile birlikte alınan sitokrom b_5 'in 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna bağlanmaması beklenir. Halbuki, Şekil 2'de görüldüğü gibi, bir miktar sitokrom b_5 yıkama işleminden sonra bile afinite kolona bağlı kaldı ve 2'-AMP gradienti uygulaması sırasında kolondan redüktaz enzimi ile birlikte alındı.

Afinite kolondan gelen, yüksek redüktaz aktivitesi içeren fraksiyonlar birleştirildi. Afinite kolon kromatografisi yukarıda belirtilen optimize edilmiş şartlarda yapıldığında, kolona uygulanan redüktaz enziminin %86'sı kolondan alındı. Tablo 1'de görüldüğü gibi redüktaz enzimi, mikrozomlara oranla takriben 324 kez saflaşmış olarak elde edildi.

Redüktaz enzimini afinite kolondan almak için kullanılan 2'-AMP redüktaz enziminin kompetitif inhibitörü olarak bilinir (3). Bu nedenle afinite kolondan toplanan redüktaz fraksiyonları 2'-AMP'den arındırılmak için Sephadex G-25 kolonuna uygulandılar. Redüktaz enzimi kolonun boş hacminde kolondan alındı (Şekil 3).

Sephadex G-25 kolonundan alınan redüktaz fraksiyonu içerdiği fazla Emulgen 913 deterjanından temizlenmek amacıyla Porapak Q kolonuna uygulandı (13,56). Noniyonik bir deterjan olan Emulgen 913 kolon maddesi tarafından adsorplanarak tutuldu ve redüktaz enzimi kolonun boş hacminde kolondan alındı. Bu şekilde elde edilen redüktazın özgül aktivitesi 57,7 ünite/mg protein olarak saptandı.

Fazla Emulgen 913'ün Porapak Q kolonunda uzaklaştırılmasından sonra, redüktaz enzimini içeren fraksiyon, konsantre edilmek üzere ve biraz daha saflaştırılmak amacıyla, "YÖNTEMLER"de anlatıldığı gibi hidrosilapatit kolon kromatografisine tabi tutuldu. Redüktaz enzimi kolon maddesi üzerinde adsorplanırken, sitokrom b₅ kolonda tutulmayıp, boş hacimde kolondan geldi.

NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enzimi ise kolondan 0,3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7,6, içeren Tampon C ile konsantre edilerek alındı.

Bu işlemler sonucunda, redüktaz enzimi mikrozomlara oranla 511 kez saflaştırılmış olarak %57,8 verimle elde edildi. Saflaştırılan redüktaz enzimi 0,1-0,25 ml'lik fraksiyonlar halinde, azot atmosferi altında, -5°C'de buzlukta saklandı ve enzimin özelliklerini belirlemek için yapılan deneylerde kullanıldı.

Koyun karaciğer mikrozomlarından saflaştırılmış NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin elektroforetik olarak homojen olduğu saptandı. Saflaştırılmış enzim, %0,2 kolat içeren poliakrilamit jellerinde Davis (52) ve Ornstein 'ın (53) yöntemlerine göre elektroforeze tabi tutuldu.

Şekil 4'de gösterildiği gibi jellere 5 µg ve 20 µg protein uygulandığında, jellerde saflaştırılan redüktaz enziminin sadece bir protein içerdiğini kanıtlayan tek bir protein bandı gözlemlendi. Halbuki, jellere uygulanan enzim miktarı 50 µg'a yükseltildiğinde, kalın ana protein bandının yanısıra, jelin üst kısmında tali protein bantları da oluştu. Bu bantların içeriğini incelemek amacıyla jeller, elektroforezden sonra NADPH'ye bağımlı NBT redüktaz aktivitesi için boyandılar. Aktivite boyamasına tabi tutulmuş jellerde redüktaz enziminin bulunduğu kısımlarda, Coomassie Blue ile protein için boyanmış jellerdeki profilin aynısını veren pembe-mor halkalar oluştu. Aktivite boyamasından elde edilen bu profiller, protein için boyanmış jellerde görülen ana ve tali bantların redüktaz enzimini içerdiğini belirledi.

Ayrıca, Şekil 5'de gösterildiği gibi, ana ve tali protein bantlarının NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz aktivitesi de içerdikleri saptandı. Bunun için jeller elektroforezden sonra 0,2 mm kalınlığında ufak parçalara ayrıldı. Her bir jel parçacığı ayrı ayrı tüplere alınarak içerdikleri protein uygun bir tampon çözeltiye ekstre edildi ve ekstrelerdeki NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz aktivitesi ölçüldü (Şekil 5).

Elde edilen bu bulgulara rağmen, poliakrilamid jel elektroforezinde jellere fazla miktarda protein uygulandığında oluşan tali bantların, başka bir yabancı protein içerip içermediği sorusunun akla gelebileceği düşünülerek, bu olasılığı incelemek amacıyla, fazla miktarda protein (50 µg) uygulanarak yapılan elektroforezden sonra, boyanmamış iki ayrı jelden ana protein bandına karşı gelen kısımlar kesildi. Jeller 0,1 M potasyum fosfat tamponu ,pH 7,6, içinde cam baget ile ezilerek, içlerindeki protein ekstre edildi. Jel parçaları santrifüjde çözeltiden ayrıldı. Redüktaz enzimi içeren süpernatant (yaklaşık 100 µg protein) çözelti, içine birkaç mg Sephadex G-25 konularak konsantre edildi. Son hacimde konsantrasyonu %0,2 olacak şekilde kolat ilave edildikten sonra, poliakrilamid jellerinde, aynı şartlarda tekrar elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforezden sonra protein için Coomassie Blue ile boyanmış jellerde bir ana bant ve birkaç tali bant gözlemlendi. Ayrıca bu protein

bantlarının NBT redüktaz aktivitesi içerdikleri de saptandı.

Bu bulgular sonucunda, yukarıda anlatılan şekilde saflaştırılan redüktaz enziminin homojen olduğu, yabancı bir protein içermediği ve elektroforezde oluşan tali bantların gerçekte redüktaz enziminin agregasyonundan kaynaklanabileceği saptandı.

Redüktaz Enziminin Spektral Özellikleri

Saflaştırılmış koyun karaciğer NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin absolut absorpsiyon spektrumu Şekil 6'da gösterilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi, redüktaz enzimi 376 nm ve 454 nm'de oluşan iki tepecik ile flavoproteinlere özgü bir spektrum verdi. 420 nm'de hiçbir tepecik görülmemesi saflaştırılan enzimin sitokrom b₅ ve sitokrom P-450'den tamamen arındırıldığını gösterdi.

Redüktaz enzimi 3,75 nmol ve 7,55 nmol K₃Fe(CN)₆ ilavesiyle yükselttiğinde absorpsiyon spektrumunun değişmediği, yani saflaştırılan enzimin yükseltgenmiş halde olduğu gözlemlendi.

Redüktaz enzimi spektrofotometre kuvetinde aerobik şartlarda önce 1,82 nmol ve sonra 3,64 nmol NADPH ilavesiyle indirgendi ve spektrumu alındı. Şekil 6'da görüldüğü gibi, NADPH varlığında 454 nm'deki tepeciğin azaldığı belirlendi. Ayrıca, indirgenmiş redüktaz enziminin uzun dalga boylarında (520-640 nm) flavoproteinlere özgü olan bir absorpsiyon tepeciği oluşturduğu gözlemlendi.

İnkübasyon Ortamı pH'sının Redüktaz Enzim Aktivitesine Etkileri

Şekil 7'de değişen inkübasyon ortamı pH'sının redüktaz enzimi aktivitesi üzerindeki etkileri görülmektedir. Ortam pH'sı, potasyum fosfat tamponunun pH'sı 25°C'de 6,8 ile 8,6 arasında değiştirilerek belirlendi. Maksimum enzim aktivitesi pH 7,8 ile 8,4 arasında bulundu. Enzim aktivitesinin tayini esnasında tampon çözeltinin pH'sı 7,8 olarak seçildi.

İyonik Kuvvetin Redüktaz Enzim Aktivitesine Etkileri

İnkübasyon ortamındaki iyonik kuvvetin (μ) redüktaz enzim aktivitesine etkileri Şekil 8'de gösterilmiştir. Ortamın iyonik kuvveti, pH'sı 7,8 olan potasyum fosfat tamponu konsantrasyonunu artırarak ayarlandı. Tampon konsantrasyonu 0,8 M'a kadar artarken, sitokrom c'nin indirgenme hızının 0,3 M'a kadar daha süratli, 0,3 M'dan sonra daha yavaş arttığı gözlemlendi. Bu nedenle, 0,3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7,8, konsantrasyonu optimum olarak seçildi.

Proteaz İnhibitörleri, PMSF ve ϵ -ACA'in Redüktaz Enzim Aktivitesine Etkileri

Koyun karaciğer redüktaz enzimi proteolitik kırılmaya karşı çok hassas olduğundan, gerek karaciğer mikrozomlarının hazırlanması, gerekse saflaştırma basamakları sırasında kullanılan çözeltilere proteaz enzim inhibitörleri olan PMSF ve ϵ -ACA ilave edilmişti. PMSF stok çözeltisi %95'lik alkol içinde 0,1 M ve ϵ -ACA distile su içinde 0,1 M olarak hazırlandı. Çözünürleştirme ortamında son hacimde PMSF 0,4 mM, ϵ -ACA 0,25 mM ve diğer çözeltilerde her iki inhibitör de son hacimde 0,25'er mM olacak şekilde ilave edildi. Saflaştırılmış redüktaz enzimi saklanması esnasında 0,25 mM PMSF ve 0,25 mM ϵ -ACA içerdi.

Kullanılan bu inhibitörlerin redüktaz enzim aktivitesi üzerinde bir etkisinin olup olmadığını araştırmak için, saflaştırılmış redüktaz enzimi 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, %20 gliserin, %0,25 kolat içeren 0,3 M potasyum fosfat tamponuna, pH 7,6, karşı dializ edildi ve kontrol olarak kullanıldı. Dializ edilen numuneden alınan küçük miktarlardaki redüktaz enzimi, kullanılan son konsantrasyonlardaki PMSF, ϵ -ACA ve alkol ile inkübe edildikten sonra aktivite tayini yapıldı. Alkolün ve proteaz inhibitörlerinin tek başlarına veya birlikte, kullanılan konsantrasyonlarda, enzim aktivitesi üzerinde hiçbir etkisi olmadığı gözlemlendi.

Magnezyum İyonlarının Redüktaz Enzim Aktivitesine Etkileri

Magnezyum iyonlarının saflaştırılmış koyun karaciğer redüktaz enzim aktivitesi üzerindeki etkileri 0,1 M ve 0,3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7,8, içinde incelenmiştir. Her iki tampon konsantrasyonunda da ortama ilave edilen magnezyum iyonlarının aktivite üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Bu nedenle, redüktaz aktivitesi ölçümlerinde, reaksiyon ortamına magnezyum iyonları ilave edilmemiştir.

Saflaştırılmış Koyun Karaciğer Redüktazının FAD ve FMN Miktarları

Bir flavoprotein olan redüktaz enziminin FMN ve FAD miktarları, "YÖNTEMLER"de belirtildiği gibi Faeder ve Siegel'in (51) spektroflorimetrik yöntemlerine göre saptandı.

Koyun karaciğer mikrozomlarından saflaştırılmış redüktaz enziminin mol başına, 1,08 mol FAD ve 1,09 mol FMN içerdiği bulundu.

TARTIŞMA

Bu çalışmada KFO sisteminin bir bileşeni olan NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enzimi koyun karaciğer mikrozomlarından ortalama 500 kez saflaştırılarak, mikrozomlara göre takriben %58 verimle elde edilmiştir. Tablo 1'den de anlaşılacağı gibi, uyguladığımız yöntemde yüksek bir verim elde edilmesinde en büyük faktör 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolon kromatografisinin saflaştırma yönteminde kullanılması olmuştur. Diğer araştırmacılar aynı afinite kolon maddesini kullanarak kobay (28), tavşan (25) ve sıçan (6,21) karaciğer mikrozomları ile yaptıkları saflaştırmalarda %25 ile %45 arasında değişen bir verimle redüktazı elde etmişlerdi. Bu çalışmada ise, afinite kolon kromatografisinde uygulanan şartların optimize edilmesi, bu basamaktaki verimin ve dolayısıyla tüm saflaştırma veriminin daha da artmasını sağlamıştır.

Koyun karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan redüktaz enziminin saflığı poliakrilamit jel elektroforezi ve

spektrofotometrik yöntemlerle incelenmiştir. Saflaştırılmış redüktaz enzimi, poliakrilamit jel elektroforezinde (5 µg ve 20 µg protein miktarlarında uygulandığında) NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz ve NBT redüktaz aktiviteleri içeren tek bir bant olarak gözlenmiştir. (Şekil 4 ve Şekil 5). Saflaştırma sonucunda elde edilen redüktaz fraksiyonunun içinde başka bir yabancı protein içerip içermediğini kontrol etmek amacıyla, poliakrilamit jel elektroforezinde, jellere fazla miktarda protein uygulandığında ise jellerin üst kısmında tali protein bantları oluşmuştur. Yapılan deneylerde, bu bantların da sitokrom c redüktaz ve NBT redüktaz aktiviteleri içerdiğinin gösterilmesi, tali bantların gerçekte redüktaz enzimi olduklarını ve redüktaz enziminin agregasyonu sonucunda oluştuklarını göstermiştir. Bu bulgular, anlatılan yöntemle saflaştırılan redüktaz enziminin elektroforetik olarak saflığını kanıtlamıştır. Ayrıca, saflaştırılan redüktaz enziminin absolut absorpsiyon spektrumunda, 420 nm'de hiçbir tepeliğin gözlenmemesi de, enzimin hiç bir şekilde, mikrozomlardan birlikte çözünürleştirildiği sitokrom P-450 ve sitokrom b₅ gibi hemokromojenleri içermediğini kanıtlamıştır.

Saflaştırılan NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin, sitokrom c'yi indirgeme aktivitesini -5°C'de en az bir yıl süre ile aynen muhafaza ettiği saptanmıştır.

Koyun karaciğer mikrozomal NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin, substrat, sitokrom c'yi indirgeme reaksiyonu için pH optimumu, potasyum fosfat tamponu kullanıldığında, diğer türlerin karaciğer mikrozomal redüktaz enzimine benzer olarak, pH 7,8-8,6 arasında bulunmuştur.

Bu çalışmada ayrıca, karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan redüktaz enziminin aktivitesinin, reaksiyon ortamının iyonik kuvveti ile ilişkisi incelendi ve karaciğer redüktaz enziminin sitokrom c'yi indirgeme hızının ortamın iyonik kuvvetine paralel olarak arttığı saptandı (Şekil 8). Phillips ve Langdon (3) da , tripsin ile çözünürleştirilmiş sıçan karaciğeri mikrozomal redüktaz enzimi aktivitesinin reaksiyon ortamının iyonik kuvvetine bağlı olarak arttığını göstermişti. Daha sonra, Vermilion ve Coon (6) sıçan

karaciğerinden deterjanla çözünürleştirerek saflaştırdıkları redüktaz enzim aktivitesinin de ortamdaki iyonik kuvvetin artmasına paralel olarak arttığını saptadılar. Kobayashi ve Rikans (28) ise saflaştırılmış kobaykaraciğeri redüktaz enziminin aktivitesinin ortamın iyonik kuvvetine bağlı olarak 0,4 M'a kadar arttığını, daha sonra düştüğünü saptadılar.

Ayrıca, koyun karaciğer redüktaz enzimini, proteazlardan korumak için mikrozoamlara, çözünürleştirme ortamına ve saflaştırmada kullanılan diğer çözeltilere ilave edilen proteaz inhibitörlerinin, PMSF ve ϵ -ACA'in, redüktaz aktivitesi üzerinde etkisi olmadığı da saptanmıştır.

Redüktaz enziminin bir flavoprotein olduğu ve FAD içerdiği ilk kez Horecker (1) tarafından gösterilmişti. Daha sonraki yıllarda, tripsin (17) ve steapsin (57) ile çözünürleştirilen redüktaz enzimlerinin mol başına 1'er mol FMN ve FAD içerdikleri saptandı. Çeşitli türlerin mikrozoamlarından deterjanlar ile çözünürleştirilip saflaştırılan redüktaz enziminin de aynı miktarlarda flavin içerdiği gösterildi (6,16,21,22,25,28,58). Bu çalışmada ise redüktaz enziminin, diğer türlerin enzimlerine benzer olarak, mol başına yaklaşık 1'er mol FMN ve FAD içerdiği saptandı.

Yukarıda anlatıldığı gibi, bu çalışmada saflaştırılmış olan redüktaz enziminin spektral, moleküler ve kinetik bazı özellikleri incelenmiştir. İncelenen özellikleri açısından koyun karaciğer redüktaz enziminin diğer türlerin karaciğer redüktaz (3,6,21,25,28) enzimlerinden farklı olmadığı açıktır.

Ayrıca, bu çalışmanın neticesinde, prekanserojen kimyasal maddeleri, ilaçları ve bazı endojen maddeleri metabolize eden KFO'ların bir üyesi olan redüktaz enziminin, koyun karaciğer mikrozoamlarından homojen olarak saflaştırılmış olması, koyun karaciğer redüktaz enziminin KFO'ların diğer üyesi olan sitokrom P-450 ile birlikte test tüpünde birleştirilerek, KFO'lar aktivitesinin yeniden oluşmasını temin edecek, bu da redüktaz enziminin, benzpiren gibi prekanserojen maddelerin metabolizmasında oynadığı rolün araştırılmasına olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Horecker, B.L., Triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase in liver, J. Biol. Chem., 183, 593-605, 1950.
2. Williams, C.H., Kamin, H., Microsomal triphosphopyridine nucleotide cytochrome c reductase of liver, J. Biol. Chem., 237, 587-595, 1962.
3. Phillips, A.H., Langdon, R.G., Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: Isolation, characterization and kinetic studies, J. Biol. Chem., 237, 2652-2660, 1962.
4. Lu, A.Y.H., Coon, M.J., Role of hemoprotein P-450 in fatty acid ω -hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes, J. Biol. Chem., 243, 1331-1332, 1968.
5. Coon, M.J., Lu, A.Y.H., "Fatty acid ω -oxidation in a soluble microsomal enzyme system containing P-450", Microsomes and Drug Oxidations, (J.R. Gillette, A.H. Conney, G.J. Cosmides, R.W. Estabrook, J.R. Fouts, ve G.J. Mannering, derleyenler), 151-166, 1969, Academic Press, New York.
6. Vermilion, J.L., Coon, M.J., Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Spectral characterization of oxidation reduction states, J. Biol. Chem., 253, 2694-2704, 1978.
7. Conney, A.H., Pharmacological implications of microsomal induction, Pharmacol. Rev., 19, 317-366, 1967.
8. Mannering, G.J., Properties of cytochrome P-450 as affected by environmental factors: Qualitative changes due to administration of polycyclic hydrocarbons, Metabolism, 20, 228-245, 1971.
9. Conney, A.H., Burns, J.J., Metabolic interactions among environmental chemicals and drugs, Science, 178, 576-586, 1972.
10. Lu, A.Y.H., Levin, W., The resolution and reconstitution of the liver microsomal hydroxylation system, Biochim. Biophys. Acta., 344, 205-240, 1974.

11. Lu, A.Y.H., Junk, K.W., Coon, M.J., Resolution of the cytochrome P-450 containing ω -hydroxylation system of liver microsomes into three components, J. Biol. Chem., 244, 3714-3721, 1969.
12. Lu, A.Y.H., Strobel, H.W., Coon, M.J., Hydroxylation of benzphetamine and other drugs by a solubilized form of cytochrome P-450 from liver microsomes: Lipid requirement for drug demethylation, Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 545-551, 1969.
13. Arınç, E., Philpot, R.M., Preparation and properties of partially purified pulmonary cytochrome P-450 from rabbits, J. Biol. Chem., 251, 3213-3220, 1976.
14. Yasukochi, Y., Peterson, J.A., Masters, B.S.S., NADPH-cytochrome c(P-450) reductase. Spectrophotometric, stopped-flow kinetic studies on the formation of reduced flavoprotein intermediates, J. Biol. Chem., 254, 7097-7104, 1979.
15. Vermilion, J.L., Coon, M.J., Highly purified detergent solubilized NADPH-cytochrome P-450 reductase from phenobarbital treated rat liver microsomes, Biochem. Biophys. Res. Commun., 60, 1315-1322, 1974.
16. Dignam, J.D., Strobel, H.W., Preparation of homogeneous cytochrome P-450 reductase from rat liver, Biochem. Biophys. Res. Commun., 63, 845-852, 1975.
17. Iyanagi, T., Mason, H.S., Some properties of hepatic reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome c reductase. Biochemistry, 12, 2297-2308, 1973.
18. Levin, W., Ryan, D., West, S., et al., Preparation of partially purified, lipid depleted cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase from rat liver microsomes, J. Biol. Chem., 249, 1747-1754, 1974.
19. Van der Hoeven, T.A., Coon, M.J., Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes, J. Biol. Chem., 249, 6302-6310, 1974.
20. Wolf, C.R., Szutowski, M.M., Ball, N.M., et al., The rabbit pulmonary monooxygenase system: Characteristics,

and activities of two forms of pulmonary cytochrome P-450, Chem.-Biol. Interact., 21, 29-43, 1978.

21. Yasukochi, Y., Masters, B.S.S., Some properties of a detergent solubilized NADPH-cytochrome c (cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography, J. Biol. Chem., 251, 5337-5344, 1976.

22. Dignam, D.J., Strobel, H.W., NADPH-cytochrome P-450 reductase from rat liver: Purification by affinity chromatography and characterization, Biochemistry, 16, 1116-1123, 1977.

23. Kitada, M., Kitagawa, H., Kamataki, T., The effects of incorporation into microsomes purified NADPH-cytochrome (P-450)c reductase on drug oxidations, Biochem. Pharmacol, 28, 2670-2673, 1979.

24. Shephard, E.A., Phillips, I.R., Bayney, R.M., et al., Quantification of NADPH-cytochrome P-450 reductase in liver microsomes by a specific radioimmunoassay technique, Biochem. J., 211, 333-340, 1983.

25. French, J.S., Coon, M.J., Properties of NADPH-cytochrome P-450 reductase purified from rabbit liver microsomes, Arch. Biochem. Biophys., 195, 565-577, 1979.

26. Guengerich, F.P., Wang, P., Mason, P.S., Immunological comparison of rat, rabbit and human liver NADPH-cytochrome P-450 reductases, Biochemistry, 20, 2379-2385, 1981.

27. Tynes, R.E., Hodgson, E., Oxidation of thiobenzamide by the FAD containing and cytochrome P-450 dependent monooxygenases of rat liver and lung microsomes, Biochem. Pharmacol., 32, 3419-3428, 1983.

28. Kobayashi, S., Rikans, L.E., Kinetic properties of Guinea-pig liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase, Comp. Biochem. Biophys., 77B, 313-318, 1984.

29. Serabjit-Singh, C.J., Wolf, R.J., Philpot, R.M., The rabbit pulmonary monooxygenase system. Immunochemical and biochemical characterization of enzyme components, J. Biol. Chem., 254, 9901-9907, 1979.

30. Yasukochi, Y., Okita, R.T., Masters, B.S.S., Comparison of the properties of detergent solubilized NADPH-cytochrome P-450 reductases from pig liver and kidney, immunochemical, kinetic and reconstitutive properties, Arch. Biochem. Biophys., 202, 491-498, 1980.

31. Wolf, C.R., Smith, B.R., Ball, N.M., et al., The rabbit pulmonary monooxygenase system. Catalytic differences between two purified forms of cytochrome P-450 in metabolism of benzo(a)pyrene, J. Biol. Chem., 254, 3658-3663, 1979.
32. Okita, R.T., Parkhill, L.K., Yasukochi, Y., et al., The ω - and (ω -1)-hydroxylase activities of prostaglandins A1 and E1 and lauric acid by pig kidney microsomes and a purified kidney cytochrome P-450, J. Biol. Chem., 256, 5961-5964, 1981.
33. Heidelberger, C., Current trends in chemical carcinogenesis, Fedn. Am. Soc. exp. Biol., 32, 2154-2161, 1973.
34. Levin, W., "Purification of liver microsomal cytochrome P-450: Hopes and promises", Microsomes and Drug Oxidations, (V. Ullrich, I. Roots, A. Hildebrandt, R.W. Estabrook, A.H. Conney, derleyenler), 735-747, 1977, Pergamon Press, Oxford.
35. Kawajiri, K., Yonekawa, H., Hara, E., et al., Biochemical bases for the resistance of guinea-pigs to carcinogenesis by 2-acetylaminofluorene, Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 959-965, 1978.
36. Gelboin, H.V., A microsome dependent binding of benzo(a)pyrene to DNA, Cancer Res., 29, 1272-1276, 1969.
37. Grover, P.L., K-Region epoxides of polycyclic hydrocarbons: Formation and further metabolism by rat lung preparations, Biochem. Pharmacol., 23, 333-343, 1974.
38. Pelkonen, O., Nebert, D.W., Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Etiologic role in carcinogenesis, Pharmacol. Rev., 34, 189-222, 1982.
39. Levine, A.S., McKinney, C.E., Echelberger, C.K., et al., Arylhydrocarbon hydroxylase inducibility among primary relatives of children with leukemia on solid tumors, Cancer Res., 44, 358-362, 1984.
40. Arınç, J., İşcan, M.Y., Comparative studies of sheep liver and lung microsomal aniline 4-hydroxylase, Comp. Biochem. Physiol., 74C, 151-158, 1983.
41. İşcan, M.Y., Arınç, E., Koyun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin bazı özellikleri, TBTAK VII. Bilim Kongresi, Tıp Araştırma Grubu Tebliği, 465-480, 1983.

31. Wolf, C.R., Smith, B.R., Ball, N.M., et al., The rabbit pulmonary monooxygenase system. Catalytic differences between two purified forms of cytochrome P-450 in metabolism of benzo(a)pyrene, J. Biol. Chem., 254, 3658-3663, 1979.
32. Okita, R.T., Parkhill, L.K., Yasukochi, Y., et al., The ω - and (ω -1)-hydroxylase activities of prostaglandins A₁ and E₁ and lauric acid by pig kidney microsomes and a purified kidney cytochrome P-450, J. Biol. Chem., 256, 5961-5964, 1981.
33. Heidelberger, C., Current trends in chemical carcinogenesis, Fedn. Am. Soc. exp. Biol., 32, 2154-2161, 1973.
34. Levin, W., "Purification of liver microsomal cytochrome P-450: Hopes and promises", Microsomes and Drug Oxidations, (V. Ullrich, I. Roots, A. Hildebrandt, R.W. Estabrook, A.H. Conney, derleyenler), 735-747, 1977, Pergamon Press, Oxford.
35. Kawajiri, K., Yonekawa, H., Hara, E., et al., Biochemical bases for the resistance of guinea-pigs to carcinogenesis by 2-acetylaminofluorene, Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 959-965, 1978.
36. Gelboin, H.V., A microsome dependent binding of benzo(a)pyrene to DNA, Cancer Res., 29, 1272-1276, 1969.
37. Grover, P.L., K-Region epoxides of polycyclic hydrocarbons: Formation and further metabolism by rat lung preparations, Biochem. Pharmacol., 23, 333-343, 1974.
38. Pelkonen, O., Nebert, D.W., Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Etiologic role in carcinogenesis, Pharmacol. Rev., 34, 189-222, 1982.
39. Levine, A.S., McKinney, C.E., Echelberger, C.K., et al., Arylhydrocarbon hydroxylase inducibility among primary relatives of children with leukemia on solid tumors, Cancer Res., 44, 358-362, 1984.
40. Arınç, E., Işcan, M.Y., Comparative studies of sheep liver and lung microsomal aniline 4-hydroxylase, Comp. Biochem. Physiol., 74C, 151-158, 1983.
41. Işcan, M.Y., Arınç, E., Koyun karaciğer mikrozomal anilin 4-hidroksilaz enziminin bazı özellikleri, TBTAK VII. Bilim Kongresi, Tıp Araştırma Grubu Tebliği, 465-480, 1983.

42. Niederwieser, A., "Extraction by adsorption", Clinical Biochemistry, (H.Ch. Curtius, M. Roth, derleyenler), Cilt I., 209-218, 1974, Walter deGruyter, New York.
43. Levin, O., "Column chromatography of proteins: Calcium phosphate", Methods in Enzymology, (S.P. Colowick, N.O. Kaplan, derleyenler), Cilt V., 27-32, 1962, Academic Press, New York.
44. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., et al., Protein measurement with the folin-phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
45. Masters, B.S.S., Kamin, H., Williams, C.H., "The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver", Methods in Enzymology, (R.W. Estabrook, M.E. Pullman, derleyenler), Cilt X., 565-573, 1967, Academic Press, New York.
46. Yonetani, T., Studies on cytochrome c peroxidase. II. Stoichiometry between enzyme H_2O_2 and ferrocycytochrome c and enzymic determination of extinction coefficients of cytochrome c, J. Biol. Chem., 210, 4509-4514, 1965.
47. Omura, T., Sato, R., The carbonmonoxide binding pigment of liver microsomes: I. Evidence of its hemoprotein nature, J. Biol. Chem., 239, 2370-2378, 1964.
48. Omura, T., Sato, R., The carbonmonoxide binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties, J. Biol. Chem., 239, 2379-2385, 1964.
49. 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, 766-779, 1968.
50. Philpot, R.M., Spectral analysis of solubilized hepatic cytochrome P-450 preparation for determination of contamination by cytochrome b_5 and unreactive cytochrome P-450, Chem.-Biol. Interact., 9, 169-180, 1974.
51. Faeder, E.J., Siegel, L.M., A rapid micromethod for determination of FMN and FAD in mixtures, Anal. Biochem., 53, 332-336, 1973.
52. Davis, B.J., "Disc Electrophoresis-II. Method and application to Human serum proteins", Annals of the New York Academy of Sciences, Cilt. 121, Kısım II, 404-427, 1964.

53. Ornstein, L., "Disc Electrophoresis-I. Background and theory", Annals of the New York Academy of Sciences, Cilt 121, 321-349, 1964.

54. Guengerich, F.P., Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P-450. Activities and different forms of cytochrome P-450 towards several compounds of environmental interest, J. Biol. Chem., 252, 3970-3979, 1977.

55. Rogers J. M. , Strittmatter, P., Lipid protein interactions in the reconstitution of the microsomal reduced nicotinamide dinucleotide-cytochrome b_5 reductase system, J. Biol. Chem., 248, 800-806, 1973.

56. Philpot, R.M., Arınç, E., Separation and purification of two forms of hepatic cytochrome P-450 from untreated rabbits, Molec. Pharmacol., 12, 483-493, 1976.

57. Masters, B.S.S., Prough, R.A., Kamin, H., Properties of the stable aerobic and anaerobic half reduced states of NADPH-cytochrome c reductase, Biochemistry, 14, 607-613, 1975.

58. Vermilion, J.L., Coon, M.J., Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase, J. Biol. Chem., 253, 8812-8819, 1978.

Tablo 1. NADPH'ye bağımlı sitokrom c Redüktaz enziminin koyun karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması

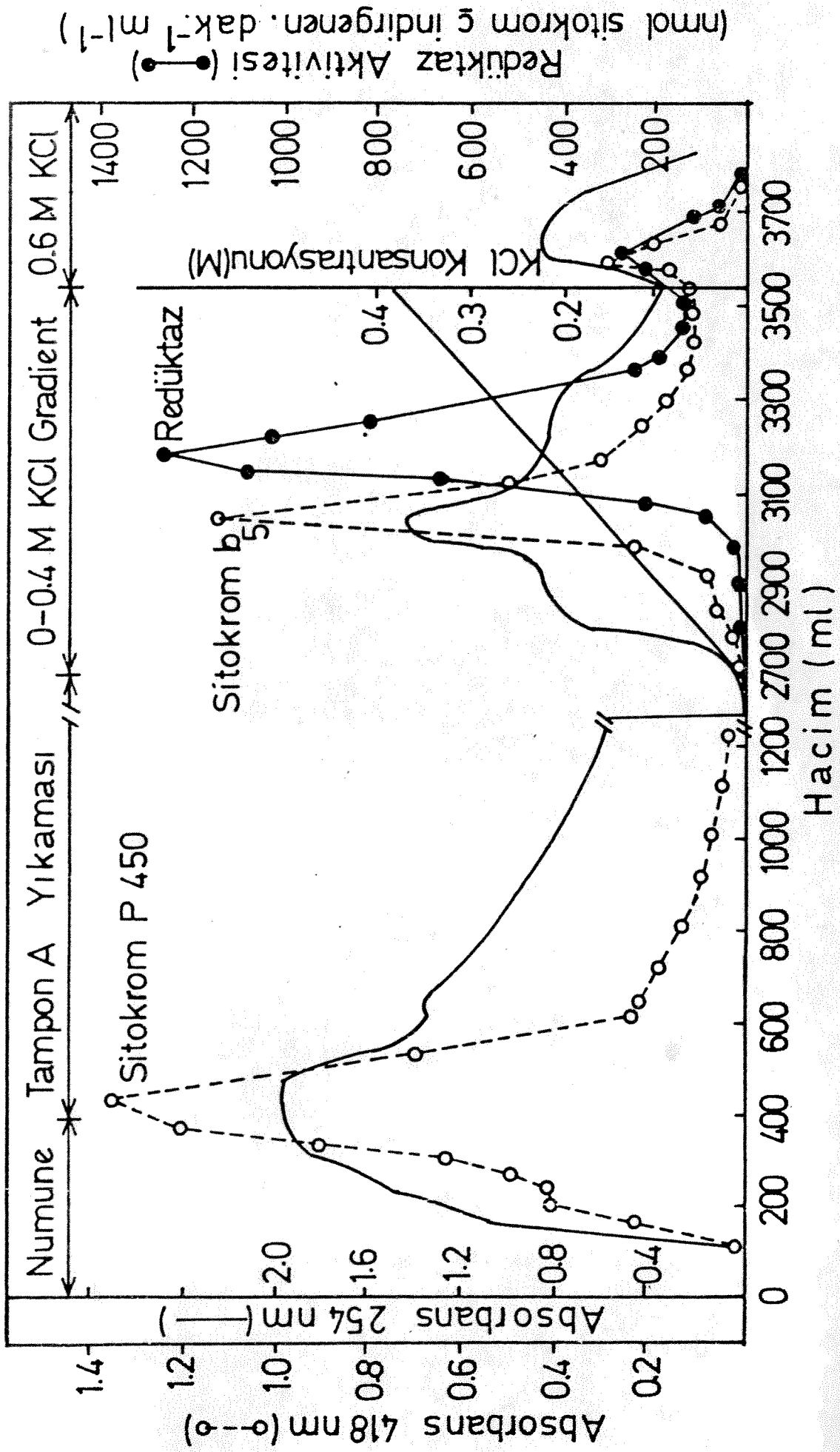
Kademeler	Hacim (ml)	Toplam protein (mg)	Toplam Aktivite ^a (μ mol/dak)	Özgül Aktivite ^a (μ mol/dak/mg)	Verim (%)	Saflaştırma
Mikrozomlar	87	2688	343,8	0,13	100	1
Çözünürleştirilmiş Mikrozomlar	312	2034	392,6	0,19	114	1,51
DEAE-Selüloz kolon kromatografisi	395	324	321,4	0,99	93,5	7,76
PM-30 filtresinde Ultrafiltrasyon	88	281	307,3	1,09	89,4	8,56
2',5'-ADP Sepharose 4B kolon kromatografisi	31	6,14	264,1	41,40	73,9	324
Sephatex G-25 kolon kromatografisi	62	4,96	230,5	46,47	67,0	363
Porapak Q Kolon Kromatografisi	66	3,70	213,2	57,70	62,0	451
Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi	7,6	3,04	198,7	65,37	57,8	511

^aNADPH'ye bağımlı sitokrom c Redüktaz aktivitesi 37°C'de, 0,3M potasyum fosfat tamponu, pH 7.8; içinde yapılmıştır.

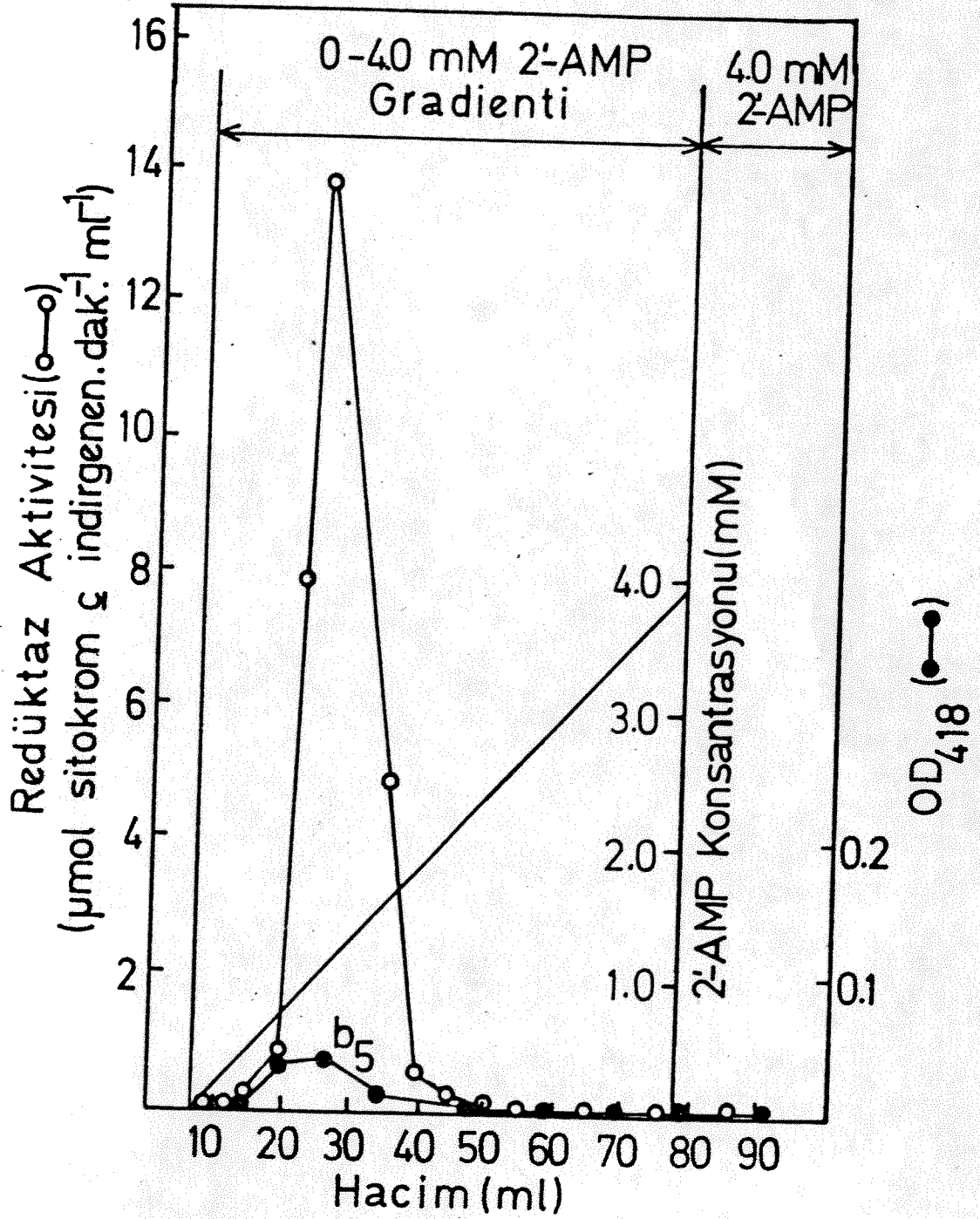
Tablo 2. NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin koyun karaciğer mikrozoamlarından çözünürleştirilmesi

Muamele	Çözünürleştirme esnasındaki protein miktarı (mg protein/ml)	Verim ^a (%)
%1,0 Emulgen 913 ve %0,4 Kolat	6,4	114
	7,8	112
	8,4	114
	8,6	113
	9,4	112
	10,0	116
%1,0 Emulgen 913 ve %1,0 Kolat	8,5	120

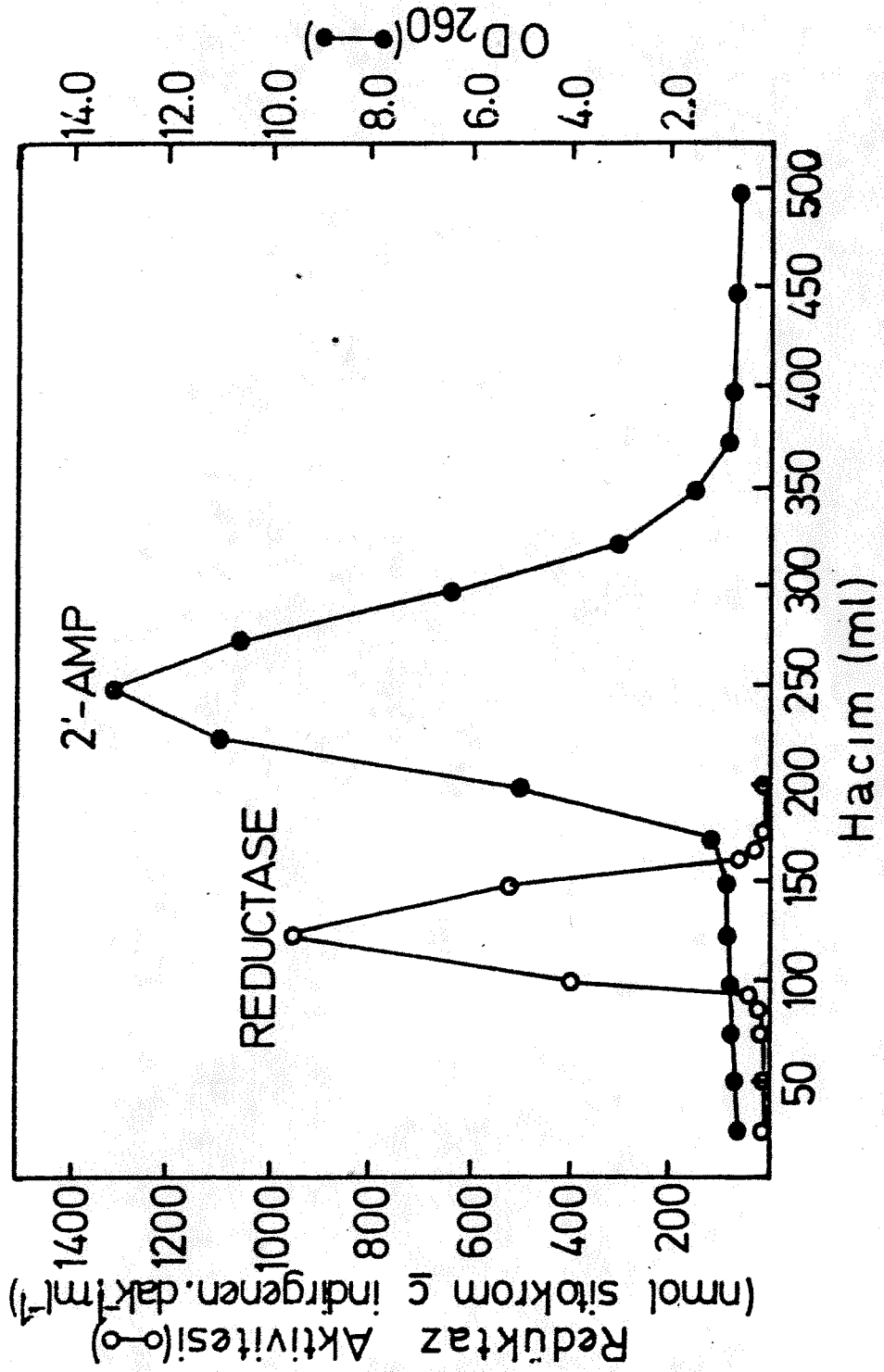
^aÇözünürleştirme verimi, deterjanla muamele edilen mikrozoamların ultrasantrifüjünden sonra süpernatantta gözlenen redüktaz aktivitesinin, mikrozoamlardaki toplam redüktaz aktivitesine yüzde oranı olarak tanımlandı.



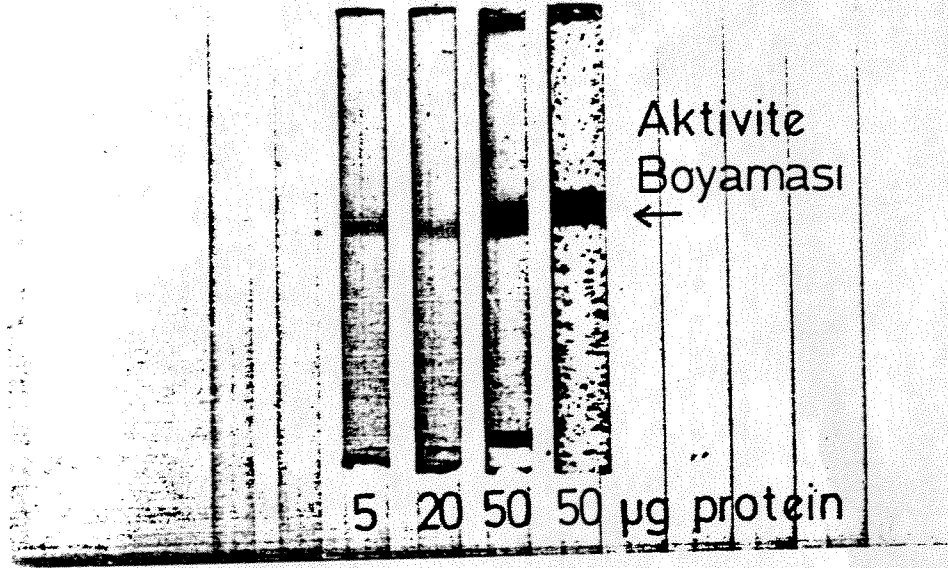
Şekil 1. Koyun karaciğer mikrosomal NADPH'ye bağımlı sitokrom c₅ redüktaz enziminin DEAE-Selüloz kolon kromatografisi (2,5x35 cm).



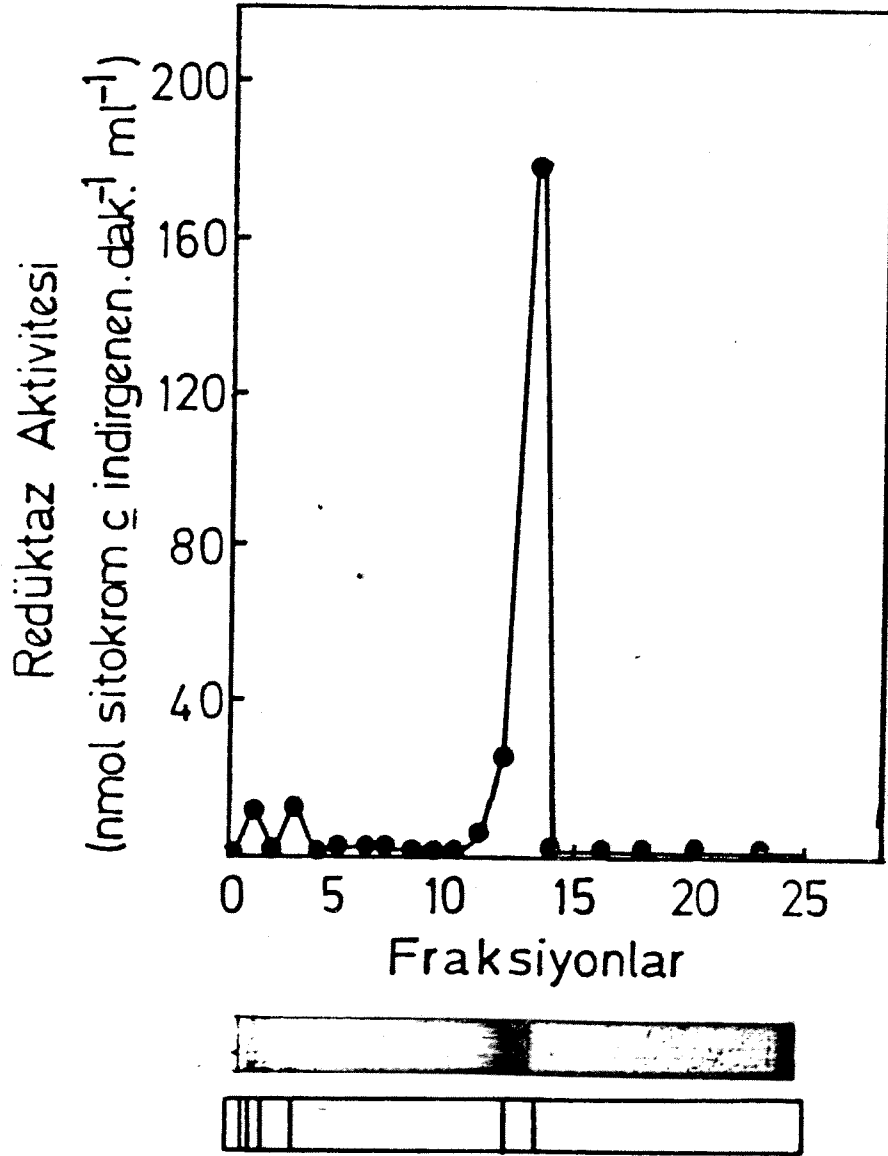
Şekil 2. Koyun karaciğer mikrozomal NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin 2'-5'-ADP Sepharose 4B afinite kolon kromatografisi (1,4x10 cm).



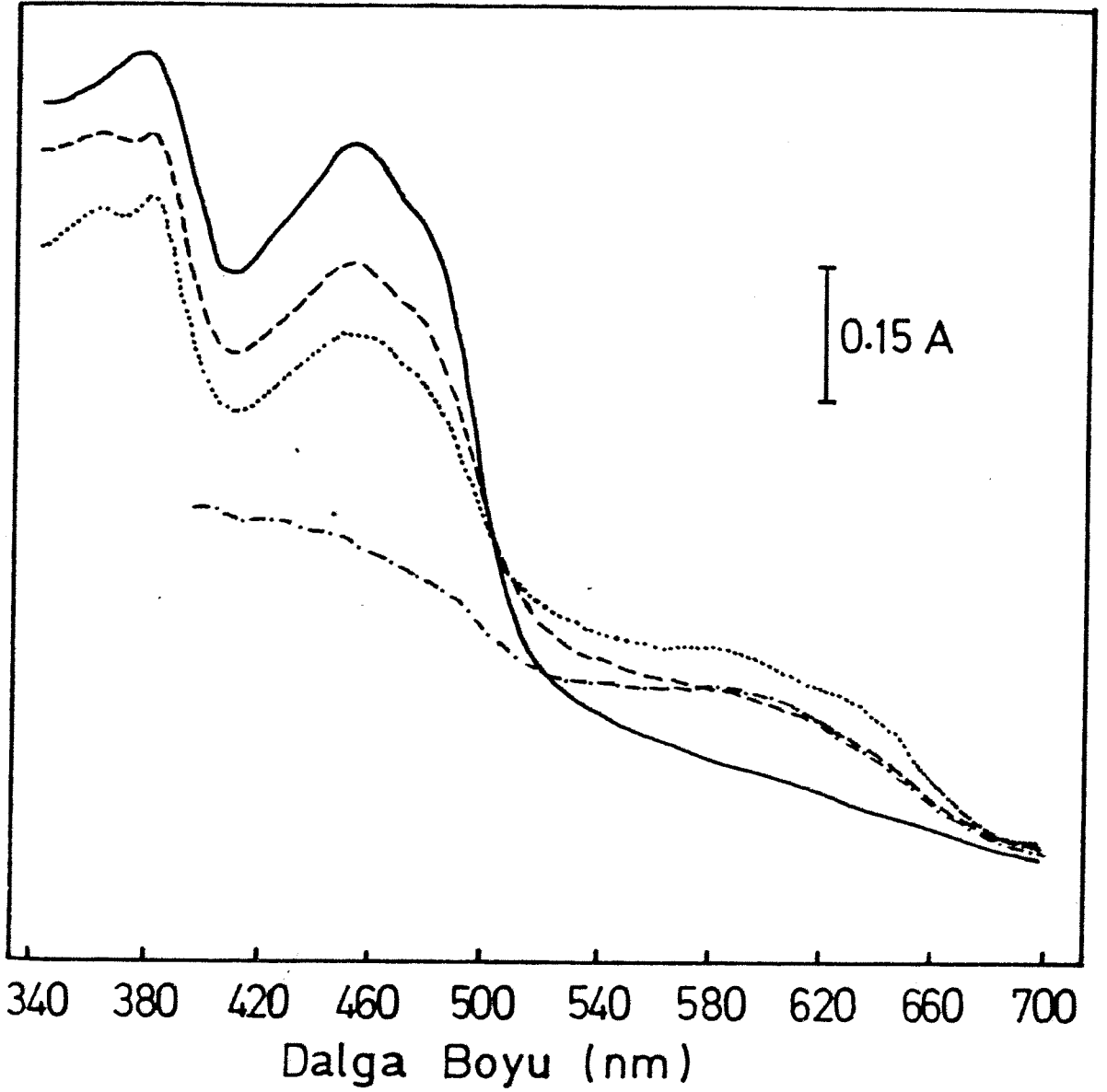
Şekil 3. 2'-AMP'nin Sephadex G-25 kolonunda (1,7x110 cm) redüktaz enziminden ayrılması



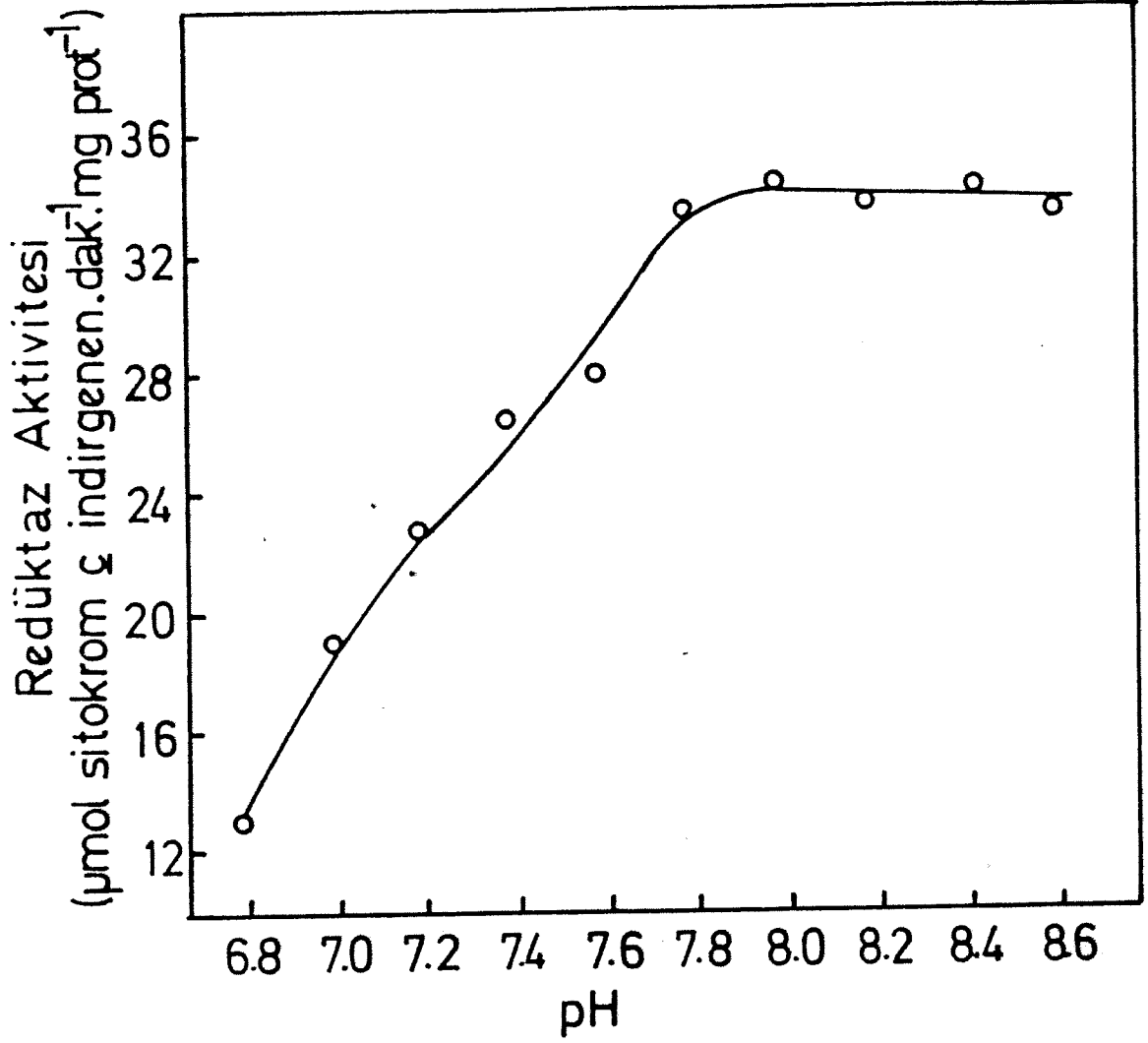
Şekil 4. Saflaştırılmış koyun karaciğer NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin poliakrilamit jel elektroforezi.



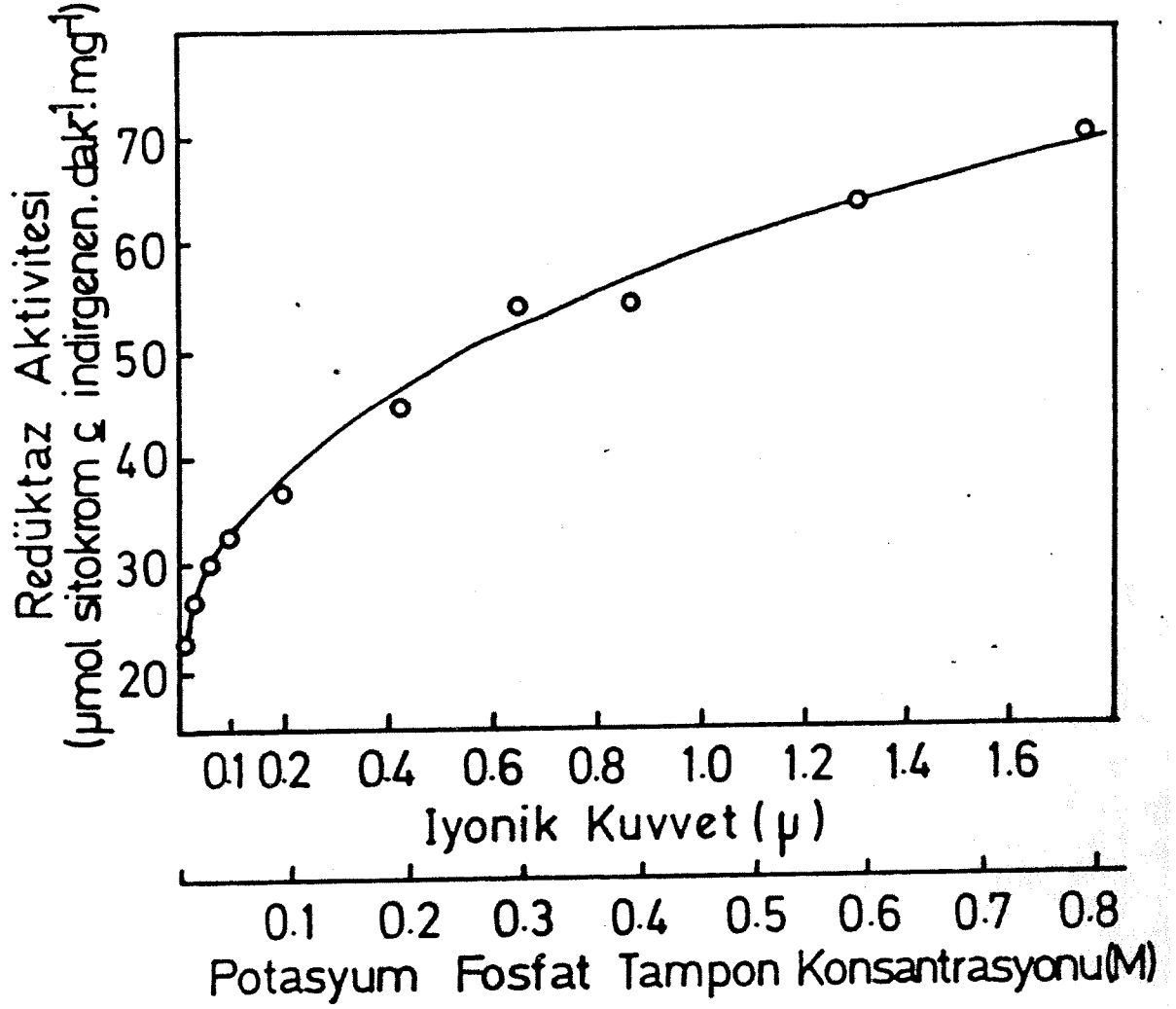
Şekil 5. Saflaştırılmış koyun karaciğer redüktaz enziminin elektroforez sonrası poliakrilamid jellerdeki NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz aktivite profili. Elektroforezden sonra jeller cam tüplerden çıkartıldı ve birisi Coomassie Blue ile protein için boyanırken, diğeri derin soğutucuda dondurularak 0,2 mm kalınlığında ufak parçalara ayrıldı. Her bir parça içinde 0,25 ml 0,3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7,8, ve %0,2 kolat içeren tüplere alındı. Jel parçalarındaki proteini ekstre etmek için tüpler iki saat süreyle soğuk odada, 4°C'de inkübe edildiler. Sonra tampon çözelti içindeki NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz aktivitesi "YÖNTEMLER"de anlatıldığı gibi tayin edildi.



Şekil 6. Saflaştırılmış koyun karaciğer mikrozomal NADPH'ye bağımlı sitokrom c redüktaz enziminin absolut absorpsiyon spektrumu (—). Küvetteki 1 ml çözelti 0,3 M potasyum fosfat tamponu, pH 7,8 içinde 0,1 mM EDTA, %10 gliserin ve 2,30 nmol (0,18 mg protein) redüktaz enzimi içerdi. Enzim 1,82 nmol (---), 3,84 nmol (.....) ve 200 nmol (-.-.-) NADPH ilavesiyle indirgendi. Spectra, Hitachi Double-Beam spektrofotometresinde kaydedildi.



Şekil 7. pH'nın saflaştırılmış koyun karaciğer redüktaz enzimine etkileri. Reaksiyon ortamı belirtilen pH değerlerinde 0,1 M potasyum fosfat tamponu içinde 85 nmol sitokrom c 0,1 µg redüktaz enzimi ve 130 nmol NADPH içerdi. Reaksiyon 37°C'de "YÖNTEMLER"de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 8. Ortamın iyonik kuvvetinin saflaştırılmış koyun karaciğer redüktaz enzim aktivitesine etkileri. Ortamın iyonik kuvveti potasyum fosfat tamponu, pH 7,8, konsantrasyonu değiştirilerek ayarlandı. Reaksiyon 37°C'de "YÖNTEMLER"de anlatıldığı gibi yapıldı.

İLAVE NOT

Safılaştırılan sitokrom c-redüktaz enziminin sitokrom c(Fe^{3+})'ü iki değerlikli sitokrom c(Fe^{2+})'ye indirgeme aktivitesini -20°C 'de en az bir yıl süre ile muhafaza etmekle beraber, sitokrom P-450(Fe^{3+})'ü, iki değerlikli sitokrom P-450(Fe^{2+})'ye indirgeme dolayısıyla anilin, benzpiren ve etilmorfin gibi kimyasal maddeleri oksitleyerek metabolize etme aktivitesini en fazla 30 gün muhafaza ettiği saptanmıştır.

řu anda laboratuvarımızda sürdürölmekte olan deneylerde, safılaştırılan enzim, sıvı azot içinde -196°C 'de saklanarak, kanserojen maddeleri metabolize etme aktivitesini, daha fazla sürede muhafaza edip etmiyeceği araştırılmaktadır.