

## Hindi Karaciğerinden NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz'ın Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkileri\*

Ebru AKKEMİK<sup>1</sup>, Mehmet ÇİFTÇİ<sup>2</sup>

**ÖZET:** NADPH-Sitokrom P450 redüktaz (CPR) enzimi, detoksifikasyon metabolizmasında elektron transferini katalizleyen anahtar bir enzimdir. Bu çalışmada, hindi karaciğer mikrozomlarından CPR enziminin saflaştırılması için iki yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntemde, CPR enzimi ~114 saflaştırma katsayısıyla ve ~%23 verimle 2', 5'-ADP Sefaroz 4B afinite kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır. İkinci yöntemde, CPR, DE-52 selüloz anyon değişim kolonu ve 2', 5'-ADP Sefaroz 4B afinite kolonu kullanılarak, ~124'lük saflaştırma katsayısı ve %8 verimle saflaştırılmıştır. Enzim saflığı her iki yöntemde de SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Saflaştırılmış enzimin karakteristik kinetik özellikleri belirlenmiştir. Bazı metal iyonlarının saflaştırılmış CPR enzim aktivitesi üzerindeki etkileri *in vitro* şartlarda araştırılmıştır. Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup> ve Cu<sup>2+</sup> metal iyonlarının CPR enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hindi karaciğeri, inhibisyon, karakterizasyon, metal iyonları, sitokrom P450 redüktaz.



## Purification, Characterization of NADPH-Cytochrome P450 Reductase from Turkey Liver and Effects of Some Metal Ions on Enzyme Activity

**ABSTRACT:** NADPH-Cytochrome P450 reductase (CPR) is a key enzyme catalyzing electron transfer in detoxification metabolism. In this study, two methods were employed to purify CPR enzyme from turkey liver microsomes. In the first method, NADPH-Cytochrome P450 reductase was purified using 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity column with ~114 purification fold and ~23% yield. In the second method, CPR was purified using DE-52 Cellulose anion exchange column and 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity column with 124 purification fold and 8% yield. Enzyme purity was checked in both methods with SDS-PAGE. Characteristics kinetic features of the purified enzyme were identified. The effects of some metal ions on purified PCR enzyme activity have been investigated *in vitro* conditions. It has been found that Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> metal ions have an inhibitory effect on CPR enzyme activity.

**Keywords:** Characterization, cytochrome P450 reductase, inhibition, metal ions, turkey liver.

<sup>1</sup> Ebru AKKEMİK (0000-0002-4177-4884), Siirt Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği, Siirt, Türkiye

<sup>2</sup> Mehmet ÇİFTÇİ (0000-0003-4971-4242), Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Bingöl, Türkiye  
Sorumlu yazar/Corresponding Author: Mehmet ÇİFTÇİ, mciftci@bingol.edu.tr

\* Bu çalışmanın karakterizasyon kısmı 27 Haziran-02 Temmuz 2011 tarihinde Erzurum-Türkiye'de düzenlenen Uluslararası Katılımlı Ulusal Kimya Kongresi'nde, Çalışmanın diğer bir bölümü olan metal inhibisyonu kısmı ise 19-22 Haziran 2013 tarihinde Bursa'da, Kromatografi 2013'te poster olarak sunulmuştur.

## GİRİŞ

Günümüzde neredeyse artık yaşamın doğal bir parçası olarak birçok yabancı kimyasalın etkisine maruz kalmaktayız. Ancak vücudumuzun kendi savunma mekanizması sayesinde bu zararlıların etkisi bertaraf edilmektedir. Vücudumuzdaki bu mekanizmaya detoksifikasyon mekanizması denilmektedir (Murray et al., 2004). Bu mekanizmanın amacı kısaca kimyasalları daha polar bir hale getirerek vücuttan uzaklaştırmaktır. İki kısımdan oluşan mekanizmanın birinci ayağını Sitokrom P450 ailesi oluşturmaktadır (Özerol, 1996; Kayaalp, 2002).

Çalışma konusu olan NADPH-sitokrom P450 redüktaz (CPR; EC 1.6.2.4) elektronların NADPH'tan sitokrom P450'ye aktarılmasını katalizleyen bir flavoproteindir (Porter and Kasper, 1986). CPR yapısında FAD ve FMN flavoproteinlerini birlikte içeren dört memeli enziminden biridir (Porter and Kasper, 1986).

Aynı zamanda CPR direk elektron transferi yaparak bazı redüksiyon reaksiyonlarını da katalizlemektedir (Aoi et al., 1981; Kappus, 1986; Sinha, 1989; Çelik, 2002). Bu yüzden CPR üzerinde ilaç dizayn çalışmaları başta olmak üzere birçok biyokimyasal çalışma yapılmıştır. Söz konusu enzim bugüne kadar birçok canlının çeşitli dokularından saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve amino asit sekans analizleri yapılmıştır (Dignam and Strobel, 1977; Klotz et al., 1983; Iscan and Arınç, 1986; Iscan and Arınç, 1988; Wang et al., 1997; Sen and Arınç, 1998; Çelik, 2002)

Biyosferde giderek artan metal kirliliği hayatı olumsuz etkileyerek canlı yapısında birikmeye başlamıştır.

Unutulmamalıdır ki metaller aynı zamanda vücudun normal fonksiyonunu sürdürebilmesi için bazı makro moleküllerin yapısına girmek zorundadır. Ancak fazlası birçok canlı için zararlı sonuçlar doğurabilir. Bazı ağır metaller belirlenen sınırların üzerinde vücuda alındığında, nörolojik bozukluklar, böbrek hasarı, kanser gibi çok ciddi hastalıklara sebep olmaktadır (Özbolet ve Tuli, 2016).

Çalışmamızda CPR'nin hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılması, karakterizasyonu ve canlı organizmayla bir şekilde etkileştikten sonra tolere edilmesi veya uzaklaştırması çok zor olan metal iyonlarının, detoksifikasyon metabolizmasının önemli bir enzimi olan CPR üzerindeki etkileri *in vitro* şartlarda araştırılmak istenmiştir.

## METARYAL VE YÖNTEM

### Kimyasallar

2', 5' ADP-sefaroze 4B'yi Pharmacia'dan, DE52'yi Whatman, Protein Marker V'i peqGOLD/peqlab, Protein Marker 0375'i BioRad'dan, Etilendiamintetraasetik asit'i (EDTA) Fluka'dan, 2'-adenosin monofosfat (2'-AMP)'ı, 6-amino kaproik asid (ε-ACA)'i, Bütil hidrositoluen (BHT), Emulgen (polyoksietilen nonylfeniler), Fenilmetilensülfonil florid (PMSF), Folin Reaktifi, Sitokrom c, nikotinamid adenin dinükleotid 2'-fosfat indirgenmiş form sodyum tuzu (NADPH) ve β-nikotinamid adenin dinükleotid fosfat sodyum tuzu (NADP<sup>+</sup>) sigma'dan temin edildi. Çalışmada kullanılan diğer bütün kimyasallar Sigma ya da Merc'ten temin edildi.

### Enzimin Saflaştırılması

Enzimin hindi karaciğerinden saflaştırılması için ilk olarak hindi karaciğer dokusundan mikrozomlar Sen and Arınç, 1998'in yöntemi kullanılarak elde edildi. Mikrozomlar yaklaşık 20 g hindi karaciğerinden hazırlandı. Karaciğer önce 1 mM EDTA içeren %1.5'lik soğuk KCl çözeltisi ile yıkandı ardından küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra 1 mM EDTA, 0.25 mM PMSF, 0.25 mM ε-ACA içeren %1.5'lik KCl çözeltisi içerisinde Ultra turrax vasıtasıyla 2 400 rpm'de homojenize edilip 10 500 rpm'de 40 dakika santrifüj edildi ve çökelek atıldı. Daha sonra süpernatant 110 000 rpm'de 60 dakika santrifüj edildi. Elde edilen mikrozomal pelet 1 mM EDTA içeren %10'luk gliserol çözeltisi içinde çözüldü. Mikrozomların çözüldürülerek CPR'ın çözelti ortamına alınmasında Sen and Arınç, 1998'in kullandığı Emulgen 913 ve Na-kolat kullanıldı. CPR'nin yüksek oranda çözünebilmesi için, 5 mg mL<sup>-1</sup> mikrozomal protein, %25 gliserol, 2 mM EDTA, 20 μM BHT, 0.1 mM DTT, 0.25 mM PMSF, 0.25 mM ε-ACA, %0.5 Emulgen 913, %0.5 Na-kolat içeren 20 mM K-fosfat tamponu pH 7.5 kullanıldı. Daha sonra deterjanla parçalanmış mikrozomları içeren süspansiyon 110 000 rpm'de 40 dakika santrifüj edilerek oluşan pelet atıldı ve süpernatant alındı. İlk yöntemde elde edilen süpernatant (Tampon A: %20 gliserol, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.25 mM PMSF, 0.25 mM ε-ACA, %0.1 Emulgen 913 içeren 50 mM K-fosfat pH 7.7) tampon A ile dengelenmiş olan 2', 5'-ADP Sefaroz 4B afinite kolonuna yüklendi. Kolon hacminin 5 katı kadar 0.2 M K-fosfat içeren tampon A ile yıkandı. Daha sonra

0.5-2.5 mM 2'-AMP ihtiva eden tampon A çözeltisi ile elüsyon işlemi gerçekleştirilerek saf NADPH-Sitokrom P450 redüktaz elde edildi. İkinci yöntemde elde edilen süpernatant Tampon B (Tampon B: %20 gliserol, 2 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.25 mM PMSF, 0.25 mM  $\epsilon$ -ACA, %0.25 Emulgen 913, %0.2 Na-Kolat içeren 20 mM K-fosfat, pH 7.5) ile dengelenmiş olan DE-52 selüloz kolonuna yüklendi. Kolon, 5 kolon hacmine eşit hacimde tampon B ile 45 ml h<sup>-1</sup> akış hızında yıkandı. 50 mM-300 mM KCl içeren Tampon B ile enzim gradientli elüsyon ile elüe edildi. 150 mM KCl içeren Tampon B ile NADPH-sitokrom P450 redüktaz elüe edildi. Daha sonra iyon değişim kolonundan elde edilen protein çözeltisi birinci yöntemde kullanılan 2',5'-ADP Sepharoze 4B afinite klonuna yüklenerek aynı şekilde elüe edildi. Tüm çalışma 4°C'de gerçekleştirildi.

### Enzim Aktivitesi ve Protein Tayinin Belirlenmesi

NADPH-sitokrom P450 redüktazın (CPR) aktivitesi Masters et al., 1967'nin uyguladığı prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Saflaştırılma sırasında kullanılan tüm basamaklarda elde edilen çözeltilerdeki protein miktarı Lowry yöntemiyle belirlendi (Nelson and Cox, 2005).

### SDS-PAGE ile Enzim Safılığının Kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra Laemmli, 1970 metoduna göre %3-10 kesikli SDS-PAGE yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi. (Sigma M.W. 30 000-200 000), (BioRad 0375).

### Karakterizasyon Çalışmaları

Enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'sı 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.7, 7.8 ve 8.0 olan 0.3 M K-fosfat tamponları hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesi bakıldı. Enzimin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla optimum pH'da 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 mM K-Fosfat tamponları kullanıldı. Her bir tampon konsantrasyonunda optimal şartlarda ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı. Enzimin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 0°C ile 70°C arasında 10°C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı. E<sub>a</sub> ve Q<sub>10</sub> değerlerinin belirlenmesi amacıyla optimum sıcaklık çalışmasında elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları (log k) alındı. Sıcaklık değerleri Kelvine çevrilerek grafikte T<sup>-1</sup>(1000K<sup>-1</sup>) olarak ifade edildi (Danişan et al., 2004). Daha sonra bu grafikten

faydalanılarak Arhenius eğrisi elde edildi ve bu eğrinin eğiminden aktivasyon enerjisi (E<sub>a</sub>) hesaplandı. (Wilson, 1971; Segel et al., 1975; Soyut, 2006). Q<sub>10</sub> değeri, aralarında 10°C fark olan iki aktivite değerinden yüksek olanın düşük olan aktivite değerine bölünmesi ile hesaplandı (Keha ve Küfrevioğlu, 2009). Enzimin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'ları 6.6, 7.0, 7.4, 7.6 ve 7.8 olan 50 mM K-fosfat tamponları ayrıca pH'sı 8.2 olan 50 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 mL'si ile 1 mL enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 5 gün boyunca 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi.

### Kinetik Çalışmalar

CPR'ın sitokrom c ve NADPH substratları için K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla belirlendi (Lineweaver and Burk, 1934).

### Enzimin İnhibiyon Çalışmaları

Enzim aktivitesi üzerine Ag<sup>+</sup> (0.227-4.54  $\mu$ M), Tl<sup>+</sup> (0.045-18.2 mM), Cu<sup>2+</sup> (0.191-0.25 mM), Zn<sup>2+</sup> (0.091-0.454 mM), Cd<sup>2+</sup>(0.045-0.363 mM), Hg<sup>2+</sup> (2.72-32.72  $\mu$ M), Co<sup>2+</sup> (0.450-36.30 mM), Pb<sup>2+</sup> (0.045-0.545 mM), Ni<sup>2+</sup> (0.450-36.40 mM), Mn<sup>2+</sup> (0.045-0.363 mM), Ca<sup>2+</sup> (0.450-36.40 mM) ve Al<sup>3+</sup> (0.23-45.45 mM) metal iyonlarının inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırıldı. Öncelikle metal iyonlarının en az 5 farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesine bakıldı. Çalışmalar hem fosfat tamponunda hem de HEPES tamponunda gerçekleştirildi. İnhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Ayrıca inhibisyon etkisi gösteren metallerin inhibisyon tipi ve K<sub>i</sub> sabiti üç farklı inhibitör ve beş farklı substrat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek belirlendi (Lineweaver and Burk, 1934).

### BULGULAR VE TARTIŞMA

CPR detoksifikasyon metabolizmasının en önemli sistemlerinden biri olan sitokrom P450 ve ökaryotik hücrelerdeki birçok enzim için, elektron transferini (Porter and Kasper, 1986) sağlamanın yanı sıra içinde antibiyotikleri de barındıran çeşitli kimyasalların indirgenme reaksiyonlarını da katalizlemektedir (Aoi et al., 1981; Kappus, 1986; Sinha, 1989; Çelik, 2002). Belirtilen fonksiyonları yüzünden çalışmamızda CPR enzimi hindi karaciğer mikrozoamlarından saflaştırıldı

ve karakterize edildi. Enziminin saflaştırılmasında iki farklı yöntem kullanıldı. İlk yöntemde hindi karaciğer mikrozomlarından elde edilen NADPH sitokrom P450 redüktaz 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisine uygulanarak tek basamakta ~%23 verimle ~114 kat saflaştırıldı. İkinci yöntemde hindi karaciğer mikrozomlarından elde edilen NADPH sitokrom P450 redüktaz DE52 anyon değişim

kromatografisi ve 2', 5'-ADP Sefaroz 4B afinite kromatografisi teknikleri kullanılarak %8 verimle 124 kat saflaştırıldı (Çizelge 1). Sonuçlar incelendiğinde her iki yöntemde de saflaştırma kat sayılarının birbirine yakın olduğunu ancak birinci yöntemde daha iyi bir verim elde edildiği tespit edildi. Bu yüzden ekibimiz tarafından elde edilen verim nedeniyle birinci yöntemin daha avantajlı olduğu düşünülmektedir.

**Çizelge 1.** Hindi karaciğer mikrozomlarından CPR'ın saflaştırılma sonuçları

|           | Saflaştırma Basamakları | Toplam Hacim (ml) | Toplam Protein (mg) | Toplam Aktivite (EU) | Spesifik Aktivite (EU mg <sup>-1</sup> ) | Verim % | Saflaştırma Katsayısı |
|-----------|-------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|--|---------|-----------------------|
| Yöntem I  | Çözündürülmüş Mikrozom  | 20                | 177.4               | 0.64                 | 0.0036                                   | 100     | 1                     |
|           | 2', 5'-ADP Sefaroz 4B   | 5                 | 0.365               | 0.15                 | 0.410                                    | 23.43   | 114.15                |
| Yöntem II | Çözündürülmüş Mikrozom  | 20                | 79.2                | 1.12                 | 0.014                                    | 100     | 1                     |
|           | DE52-Selüloz            | 10                | 1.26                | 0.28                 | 0.222                                    | 25      | 15.86                 |
|           | 2', 5'-ADP Sefaroz 4B   | 5                 | 0.049               | 0.085                | 1.73                                     | 8       | 124                   |

Enziminin saflık kontrolü SDS-PAGE ile yapıldı. Enzimin monomer molekül kütlesi SDS-PAGE ile ~81 kDa olarak belirlendi. Hindi karaciğer CPR gen sekansının yapıldığı bir çalışmada CPR enziminin 670 amino asitten oluştuğu ve enzimin alt birim molekül kütlesinin yaklaşık 76 kDa olduğu belirtilmiştir (Dalloul et al., 2010). Koala CPR amino asit sekansı sonucu hesaplanan molekül kütlesinin 77 kDa olduğu fakat SDS-PAGE'de molekül kütlesinin 82 kDa olarak bulunduğu ifade edilmiştir (Kong et al., 2009). Bu durum maş fasulyesi CPR içinde geçerlidir (Shet et al., 1993). Aradaki 4 kDa fark glikozidasyon ile açıklanmaktadır. Benzer bir durumun hindi karaciğer CPR içinde geçerli olduğunu düşünmekteyiz. Hindi karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan CPR'ın aktivitesinin en yüksek olduğu pH değeri K-fosfat tamponunda 7.6 olarak belirlendi. Benzer şekilde petunya CPR (Menting et al., 1994), sıçrayan kefal (İlanya) balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CPR (Sen and Arınc, 1998) ve sığır karaciğer CPR (Çelik, 2002), enziminin optimum pH değerleri pH 7.4-7.8 arasındadır. Sonuçlar dikkatle incelendiğinde bulduğumuz verilerin literatürle uyum içinde olduğu görülmektedir. Hindi karaciğer

mikrozomal CPR K-fosfat tamponunda pH 7.0'de beş günün sonunda aktivitesinin ~%56 oranında koruduğu belirlendi.

Literatürle benzer şekilde (Sen and Arınc, 1998, Çelik, 2002) CPR'ın aktivitesinin en yüksek olduğu iyonik şiddet değeri 400 mM (K-fosfat tamponunda) olarak tespit edildi. CPR'ın yüksek tuz konsantrasyonunda FMN'nin bir miktarını kaybedebileceği ve bunun aktivitesinin azalmasına yol açacağı (Klotz et al., 1983) farklı çalışmalarla da ortaya konulmuştur. Optimum şartlarda 0°C ile 70°C arasında aktivite ölçümleri yapılarak, enzim aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık 50°C olarak tespit edildi.

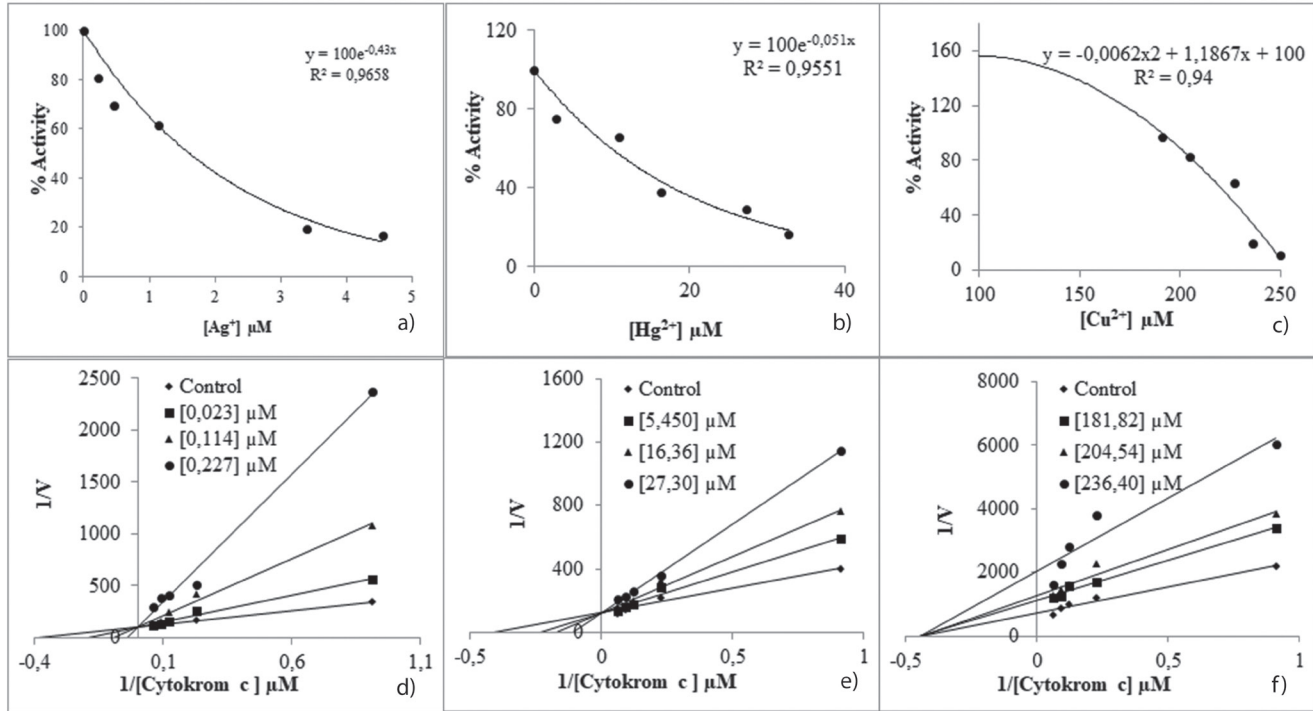
Optimum sıcaklıkta elde edilen veriler kullanılarak enzim için  $E_a$ : 3.505 cal mol<sup>-1</sup> ve  $Q_{10}$ : 1.56 olarak tespit edildi. Yapılan bir çalışmada tırtıl sürüsünün midgut membranından saflaştırılan CPR enzimin aktivasyon enerjisinin 31.65 kJ mol<sup>-1</sup> bulunduğu sıçan karaciğerinde ise bu değer 60.16 kJ mol<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Bu farklılıkların enzimlerin aktif bölgelerinin de türlere göre farklı olduğu düşüncesini desteklemektedir (Crankshaw et al., 1979). Enzimin substratlarından

NADPH için  $K_M$  değeri 3.44; sitokrom c için ise, 7.44  $\mu\text{M}$  olarak hesaplandı. Bu durum enzimin NADPH'a olan ilgisinin sitokrom c'ye göre daha büyük olduğunu göstermektedir. Domuz karaciğeri, tırtıl sürüsü midgut ve koyun akciğeri CPR enzimleri için de benzer sonuçlar elde edilmiştir (Crankshaw et al., 1979; Master, 1980; Iscan and Arınç, 1986). Enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Al}^{3+}$ ) inhibisyon etkileri *in vitro* şartlarda araştırıldı.  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$

metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri belirlendi (Çizelge 2, Şekil 1). İnhibisyon etkisi gösteren  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  metal iyonları için  $\text{IC}_{50}$  değerleri sırasıyla 1.60, 13.52 ve 227  $\mu\text{M}$ ;  $K_i$  sabitleri ve inhibisyon tipleri ise sırasıyla  $0.029 \pm 0.0067$   $\mu\text{M}$  (yarışmalı),  $10.37 \pm 2.2435$   $\mu\text{M}$  (yarışmalı) ve  $251 \pm 108.6247$   $\mu\text{M}$  (yarışmasız) olarak tespit edildi (Çizelge 2, Şekil 1). Bu sonuçlara göre iyonların inhibisyon güçlerinin büyükten küçüğe doğru sıralaması  $\text{Ag}^+ > \text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$  şeklindedir.

**Çizelge 2.** CPR enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren metal iyonlarının  $\text{IC}_{50}$  değeri,  $K_i$  sabiti ve İnhibisyon tipi

| İnhibitör        | $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) | $R^2$  | $K_i$ ( $\mu\text{M}$ ) | İnhibisyon Tipi |
|------------------|------------------------------------|--------|-------------------------|-----------------|
| $\text{Ag}^+$    | 1.60                               | 0.9658 | $0.029 \pm 0.0067$      | Yarışmalı       |
| $\text{Hg}^{2+}$ | 13.52                              | 0.9551 | $10.37 \pm 2.2435$      | Yarışmalı       |
| $\text{Cu}^{2+}$ | 227                                | 0.9400 | $251 \pm 108.6247$      | Yarışmasız      |



**Şekil 1.** CPR enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren (a)  $\text{Ag}^+$ ; (b)  $\text{Hg}^{2+}$  ve (c)  $\text{Cu}^{2+}$ , iyonlarının %Aktivite-[I] grafiği ile  $K_i$  sabitinin hesaplanması için çizilen Lineweaver and Burk grafiği [(d)  $\text{Ag}^+$ ; (e)  $\text{Hg}^{2+}$  (f)  $\text{Cu}^{2+}$ ]

$\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Ni}^{2+}$  iyonlarının *in vitro* şartlarda sığır karaciğeri CPR enzimini inhibe ettiği (Bozcaarmutlu et al., 2011),  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  iyonlarının sıçrayan

kefal balığının karaciğerinden saflaştırılan CPR enzimini inhibe ettiği,  $\text{Zn}^{2+}$ 'nin ise etki etmediği, (Bozcaarmutlu and Arınç, 2007),  $\text{Cu}^{2+}$  sıçan karaciğer

CPR enzimini inhibe ettiği,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  metal iyonlarının etki etmediği, (Kim et al., 2002) tespit edilmiştir. Bu sonuçlarla benzer şekilde  $Hg^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  hindi karaciğer CPR enziminde inhibisyon etkisi göstermiştir. Ancak  $Zn^{2+}$ ,  $Tl^{+}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  metal iyonları enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Buradan türlere özgü olarak enzimin daha dayanıklı bir profil çizebileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda günlük hayatta oldukça sıklıkla karşımıza çıkan  $Ag^{+}$  metal iyonunun hindi karaciğer CPR aktivitesi üzerinde en yüksek inhibisyona sahip olması oldukça şaşırtıcıdır. Çalışmamızda  $Co^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  ve  $Ni^{2+}$  iyonlarının enzim üzerinde aktivasyon etkisi gösterdikleri tespit edildi. Bu durum son derece tehlikelidir. Çünkü literatürde NADPH bağlı indirgenme reaksiyonlarında reaktif oksijen türleri, karbon merkezli serbest radikaller ve reaktif metabolitler oluşturulabildikleri belirtilmiştir (Kappus, 1986; Halliwell and Auroma, 1991; Lu,

1991; Çelik, 2002). Bu nedenle enzimin aktivasyonu radikal üretimine yol açabileceği ve bununda DNA, hücre bütünlüğü ve protein yapısı gibi hayati fonksiyon taşıyan kısımlarda tehlikelere yol açabileceğini düşünmekteyiz.

## SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmayla CPR'ın saflaştırılmasında iki farklı yöntem kullanıldı. Enzimin monomer molekül kütlesi SDS-PAGE ile 81 kDa olarak belirlendi. Enzimin karakterizasyon çalışmaları kapsamında optimum sıcaklık, pH, iyonik şiddet,  $E_a$  ve  $Q_{10}$  değerleri tespit edildi. Kinetik çalışmalar kapsamında ise sitokrom c ve NADPH substratları için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri tespit edildi. Son olarak  $Ag^{+}$ ,  $Hg^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ danışmanlığında Ebru AKKEMİK tarafından doktora tez çalışması olarak hazırlanmıştır.

2011/94'nolu "Hindi Karaciğerinden NADPH-Sitokrom P450 Redüktaz Enziminin Saflaştırılması,

Karakterizasyonu ve Bazı İlaç ve Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkilerinin İncelenmesi" adlı proje Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Aoi K, Fujii-Kuryama Y, Tashiro Y, 1981. Intracellular Distribution of NADPH- Cytochrome C Reductase In Rat Hepatocytes Studied By Direct Ferritin-Immunoelectro Microscopy. Journal of Cell Science, 50: 181-198.
- Bozcaarmutlu A, Arinc E, 2007. Effect of mercury, cadmium, nickel, chromium and zinc on kinetic properties of NADPH-cytochrome P450 reductase purified from leaping mullet (*Liza saliens*). Toxicology in Vitro, 21: 408–416.
- Bozcaarmutlu A, Celik H, Arinc E, 2011. Inhibition mechanisms of lead, cadmium and nickel for the purified bovine liver NADPH-cytochrome P450 reductase. Toxicology Letters, 205: 192-192.
- Crankshaw DL, Hetnarski K, Wilkinson CF, 1979. Purification and Characterization of NADPH-Cytochrome c Reductase from the Midgut of the Southern Armyworm (*Spodoptera eridania*). Biochem Journal, 181: 593-605.
- Çelik H, 2002. Biochemical and Immunological Characterization of Beef Liver NADPH-cytochrome P450 Reductase, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Degree of Master. 136s.
- Dalloul RA, Long JA., Zimin VA, Aslam L, Bea K, et al, 2010. Multi-Platform Next-Generation Sequencing of the Domestic Turkey (*Meleagris gallopavo*): Genome Assembly and Analysis. PLOS Biology, 9: e1000475.
- Danişan A, Ceyhan D, Ögüs, İH. Özer N, 2004. Purification and Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Rat Small Intestine. Protein Journal, 23: 317-324.
- Dignam JD, Strobil HW, 1977. NADPH-Cytochrome P-450 reductase from rat liver: Purification by affinity chromatography and characterization. Biochemistry, 16: 1116-1123.
- Halliwell B, Auroma OI, 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS Letters, 281: 9–19.
- Iscan MY, Arinc E, 1986. Kinetic and structural properties of biocatalytically active sheep lung microsomal NADPH-cytochrome c reductase. International Journal of Biochemistry, 18: 731-741.
- Iscan MY, Arinc E, 1988. Comparison of highly purified sheep liver and lung NADPH-cytochrome P450 reductases by the analysis of kinetic and catalytic properties. International Journal of Biochemistry, 20: 1189–1196.

- Kappus H, 1986. Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochemical Pharmacology*, 35: 1-6
- Kayaalp O, 2002. İlaçların biyotransformasyonu; Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti, Ankara, Yedinci baskı, İstanbul, Türkiye, 1: 92-129.
- Keha E, Küfrevioğlu Öİ, 2009. Biyokimya. Aktif yayınevi, Dokuzuncu baskı, Erzurum, Türkiye, 653s
- Kim JS, Ahn T, Yim SK, Yun CH, 2002. Differential Effect of Copper (II) on the Cytochrome P450 Enzymes and NADPH-Cytochrome P450 Reductase: Inhibition of Cytochrome P450-Catalyzed Reactions by Copper (II) Ion. *Biochemistry*, 41: 9438-9447.
- Klotz AV, Stegeman JJ, Walsh C, 1983. An aryl hydrocarbon hydroxylating hepatic cytochrome P450 from the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 226: 578-592.
- Kong S, Ngo SNT, McKinnon RA, Stupans I, 2009. Cloning and expression of koala (*Phascolarctos cinereus*) liver cytochrome P450 reductase. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 150: 1-9.
- Laemmli DK, 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lineweaver H, Burk D, 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 57: 658-666.
- Lu AYH, 1991. NADPH-Dependent Cytochrome P450 Reductase. In: Arinç E., Schenkman J.B., Hodgson E. (eds) *Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds*. NATO ASI Series Advanced Science Institutes Series (Series A: Life Sciences), Springer, Boston, MA, 202: 135-147p.
- Masters BSS, 1980. In *Enzymatic Basis of Detoxication* (Jakoby, W. B., Ed.), Academic Press, New York. 1: 183-200p
- Masters BSS, Williams CH, Kamin H, 1967. The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver. In *Methods in Enzymology* (Edited by Colowick S. P. And Kaplan N. O.), Academic Press, New York. 10: 565-573p.
- Menting JGT, Cornish E, Scopes RK, 1994. Purification and partial characterization of NADPH-cytochrome c reductase from *Petunia hybrida* flowers. *Plant Physiology*, 106: 643-650.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, 2004. *Harper'ın Biyokimyası*, Nobel Tıp Kitapevleri, Yirmibeşinci baskı. İstanbul, Türkiye, 816s
- Nelson DL, Cox MM, 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. (Çeviren: N. KILIÇ), Palme Yayıncılık, Ankara, Türkiye, 243-293s.
- Özbolat G, Tuli A, 2016. Ağır Metal Toksisitesinin İnsan Sağlığına Etkileri, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 25: 502-521
- Özerol E, 1996. Cytochrom P 450 containing monooxygenase enzym systems, *Journal of Tugut Özal Medical Center*, 33: 257-275.
- Porter TD, Kasper CB, 1986. NADPHcytochrome P-450 oxidoreductase: Flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry*, 25: 1682-1687.
- Segel IH, 1968. *Biochemical Calculations*, Inc., New York, 403p.
- Sen A, Arinc E, 1998. Purification Characterization of Cytochrome P450 Reductase from Liver Microsomes of Feral Leaping Mullet (*Liza saliens*), *J. Biochem Molecular Toxicology*, 12: 103-113.
- Shet, MS, Sathasiva K, Arlotto MA, Mehdy MC, Estabrook RW, 1993. Purification, characterization and cDNA cloning of an NADPH-cytochrome P450 reductase from mung bean, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 2890-2894.
- Sinha BK, 1989. Free radicals in anticancer drug pharmacology. *Chemico-Biological Interactions*, 69: 293-317.
- Soyut H, 2006. Purification And Characterization of Carbonic Anhydrase from Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Tissues And Inhibition Effects of Some Antibiotics on Enzyme Activity. Ph. D. Thesis, Graduate School of Science and Arts Faculty, Department of Chemistry, Atatürk University, Erzurum, 174p.
- Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea, TM, Masters BSS, Kim JJP, 1997. Three-Dimensional Structure of NADPH-Cytochrome P450 Reductase: Prototype For FMN-And FAD-Containing Enzymes. *Biochemistry*, 94: 8411-8416.
- Wilson TG, Hodgson E, 1971. Microsomal NADPH-cytochrome c reductase from the house fly, *Musca domestica*: properties of the purified enzyme, *Insect Biochemistry*. 1: 171-180.