

## Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri

Dr. Elif Özerol<sup>1</sup>

*Sitokrom P450 (CYP450) monooksijenaz enzim sistemleri, matür eritrosit ve iskelet kası hücreleri dışında tüm memeli hücre tiplerinde ve prokaryotlarda bulunan hem-protein ailesidir. Bu enzimler, yapısal olarak farklı çeşitli bileşiklerin oksidasyonunu katalize ederler. Endojen sentezlenen bir çok bileşik, CYP450 enzimlerinin substratı olarak görev yapar. Bu bileşikler: prostaglandin ve lökotrienler dahil yağ asitleri, steroidler, yiyecek katkı maddeleri ve ilaçlar yanında besinlerle, enjeksiyonla, havadan inhalasyonla ya da deriden absorpsiyonla vücuda giren endüstriyel maddelerdir. Sitokrom P450 enzimleri, ilaç biyotransformasyonu ve metabolizması için en önemli sistemlerden biridir. Bu sistem induksiyon veya inhibisyon gibi sayısız mekanizmalarla değişime uğrayabilir ve bireyler arasında oldukça farklı formları ortaya çıkabilir. CYP450 enzimleri, 400-530 amino asitten yapılmış proteinlerdir. Bazı dizilimi benzerliklerine göre, P450 sistemi 40 farklı aile içinde sınıflandırılır. CYP450 sisteminin tıpta çok önemli etkileri vardır: Bunlar; a) terapötik maddeleri inaktive veya aktive etme, b) kimyasal maddeleri oldukça yüksek derecede reaktif moleküllere dönüştürme ve istenmeyen hücre hasarı, hücre ölümü veya mutasyon gibi olaylara neden olma, c) steroid hormon sentezindeki bazı adımlara katılma ve d) yağ asidi ve bunların derivelerinin metabolizması gibi olaylardır. [Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 1996;3(3):257-275]*

**Anahtar Kelimeler:** Sitokrom P-450, enzim, demir-sülfür proteinleri, biyotransformasyon, detoksifikasyon

### Cytochrome P450-containing monooxygenase enzyme systems

*The term cytochrome P450-containing monooxygenase enzyme systems refers to a family of heme proteins present in all mammalian cell types, except mature red blood cells and skeletal muscle cells, which catalyze the oxidation of a wide variety of structurally diverse compounds. Cytochrome P450 also occurs in prokaryotes. Substrates for these enzyme systems include endogenously synthesized compounds such as steroids, fatty acids (including prostaglandins and leukotrienes), and compounds such as drugs, food additives, or industrial byproducts that enter the body through food sources, injection, inhalation from the air, or absorption through the skin. Drug biotransformation by cytochrome P-450 enzymes is one of the most important systems for drug metabolism. This system can be altered by a number of mechanisms, such as induction and inhibition, and can vary significantly among individuals. P450's are proteins of 400 to 530 aminoacids. Based on sequence similarities, P450's have been classified into about forty different families. The cytochrome P450 system has far reaching effects in medicine. It is involved in: (a) inactivation or activation of therapeutic agents, (b) conversion of chemicals to highly reactive molecules, which may produce unwanted cellular damage, cell death, or mutations, (c) participation in several steps in steroid hormone biosynthesis, and (d) metabolism of fatty acids and their derivatives. [Journal of Turgut Özal Medical Center 1996;3(3):257-275]*

**Key Words:** Cytochrome P-450, enzyme, iron-sulphur proteins, biotransformation, detoxification

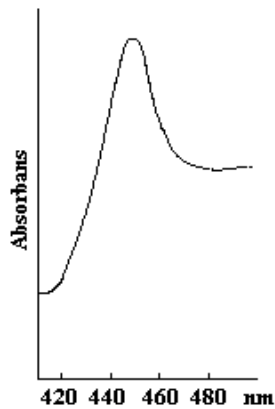
---

<sup>1</sup> İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Malatya

## SİTOKROM P450: NOMENKLATÜR, SINIFLANDIRMA VE KATILDIĞI REAKSİYONLAR

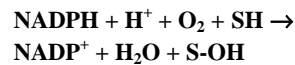
CYP450 monooksijenaz enzim sistemi; steroidler, yağ asitleri, prostaglandinler, lökotrienler ve diğer bir çok doğal bileşiklerin olduğu kadar karsinojenlerin, mutajenlerin ve ilaçların oksidatif metabolizmasına katılan "heme-thiolate" yapısında protein enzimlerden oluşur (1). Genellikle, multikomponentli elektron transport zincirlerinde terminal oksidaz olarak etki eder ve P450 içeren monooksijenaz sistemleri olarak adlandırılırlar (1,2).

CYP450 sistemi, katalitik fonksiyonları bilinmeden önce spektral özellikleri ile tanımlanan proteinlerden oluşmuştur. Bu gruptaki proteinlerin benzersiz bir absorbans spektrumu vardır. Genellikle mikrozom olarak adlandırılan endoplazmik retikulum veziküllerinden hazırlanan süspansiyondan karbon dioksit gazı geçirildikten sonra sodyum dithionate gibi indirgeyici bir ajan eklenince spesifik bir absorbans spektrumu elde edilir. Bu işlem sırasında indirgenmiş hem proteinine CO<sub>2</sub> bağlanır ve 450 nm'de pik yapan absorbans spektrumu elde edilir (Şekil 1). Bu pigmentlere P450 adı, 450 nm'de absorbans gösterdiği için verilmiştir. Spesifik CYP450 formları, 446 ile 452 nm arasında maksimum absorbans veren dalga boylarına sahiptir. Karaciğerde bir çok CYP450 enzimleri bulunmakta ve CYP450 enzimleri baz dizilimi benzerlikleri, kontrol eden gen ailelerine veya substrat spesifikliğine göre sınıflandırılmaktadırlar (Tablo 1 ve 2). Bu nomenklatür evrensel olarak kabul edilmiştir.



Şekil 1. Karbon monoksit bağlı sitokrom P450'nin absorbans spektrumu

CYP450 enzimleri ile katalizlenen genel reaksiyon aşağıdaki şekilde gösterilir;



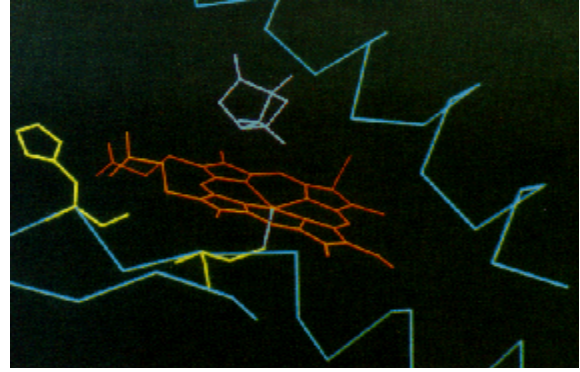
Buradaki substrat (S), bir steroid, yağ asidi, ilaç veya oksijen bağlanma yeri olarak görev yapan alkan, alken, aromatik halka veya heterosiklik halka ekleri olan diğer kimyasal maddeler olabilir. Substrata, iki oksijen atomundan sadece

biri katıldığı için bu reaksiyona monooksijenasyon reaksiyonu ve bu enzimlere de sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri adı verilmektedir.

Bu enzimler iki grupta sınıflandırılmaktadır: bakteriyel veya mitokondriyal enzimler tip I, mikrozomal olanlar ise tip II olarak sınıflandırılır. Diğer yandan, P450 içeren monooksijenaz sistemlerindeki temel proteinler kullanılarak ta sınıflandırma yapılmaktadır (3). Sitokrom b5'in elektron vericisi veya efektör olarak P450 enzimlerine yardım edebileceği bilinmesine rağmen, P450 enzimlerini sınıflandırmak için ileri sürülen şemalarda sitokrom b5'in katıldığı redoks yolları kapsama alınmamaktadır (4). Memeli hücrelerinde ya endoplazmik retikulumda ya da iç mitokondri membranında bulunan CYP450 enzimleri, terminal elektron alıcısı ve monooksijenazlar olarak fonksiyon görür. Mitokondriyal ve bir çok bakteriyel P450 sistemlerinde 3 komponent vardır: flavin adenin dinükleotid (FAD) kapsayan bir flavoprotein (nikotinamid-adenin dinükleotid'in mikrozomal indirgenmiş formu [NADPH]'na veya nikotinamid-adenin dinükleotid [NADH]'a bağımlı redüktaz), demir-sülfürlü bir protein ve P450. Ökaryotik P450 sistemlerinde ise 2 komponent bulunmaktadır: hem FAD hem de flavin mononükleotid (FMN) içeren bir flavoprotein olan NADPH : P450 redüktaz (CPR) ve P450. CPR bir füzyon proteindir (5) ve ferrodoksin : NADP<sup>+</sup> redüktaz (FAD) ve flavodoksin (FMN) homolog olan kangallara sahiptir. *Streptomyces carbophilus*'da iki komponentten oluşan P450 monooksijenaz sistemi tanımlanmıştır (6). Bu sistemde P450sea hemoprotein ve hem FAD hem de FMN'den oluşan NADH'a bağımlı P450 redüktaz enzimi bulunmaktadır. *Bacillus megaterium*'dan elde edilen solubl monooksijenaz olan P450BM-3 (CYP102) ise heme ve flavin kangalları olmak üzere iki fonksiyonel kısmı olan bir tek polipeptid zincirinden oluşmaktadır (7). *Bacillus megaterium*'daki P450BM-3, bir komponentli bakteriyel P450 sistemi için öne sürülen tek örneği oluşturmasına rağmen bu kangalların baz dizilimleri ve fonksiyonel özellikleri kıyaslanırsa üç komponentli sistemlerdeki proteinlerden ziyade iki komponentli P450 monooksijenaz sistemlerinde bulunan P450 ve flavoproteinlerle benzerliği daha fazladır (8). Memelilerde bulunan nitrik oksit sentetaz (NOS); FAD, FMN ve hem'den oluşur. NOS, ökaryotik hücrelerde tanımlanan, katalitik olarak tek başına yeterli P450 benzeri bir sistemdir (9). NOS'ın C-terminal kangalı CPR'ye homolog iken N-terminal

kangalı P450 sistemine daha az benzerlik göstermektedir. Son yıllarda *Nocardia* türlerinde keşfedilen bakteriyel NOS sistemi ile ökaryotik NOS sistemleri fonksiyonel benzerlik göstermektedir (10). *Fusarium oxysporum* cinsi bakterilerde son zamanlarda tanımlanan yağ asidi hidrolazın P450'nin bir füzyon proteinine analog olduğu ve redüktaz kangallarının da P450BM-3'e benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır (11). İleri sürülen sınıflandırma bakımından, memelilerdeki NOS ve *F. oxysporum* monooksijenaza ökaryotik tek komponentli P450 sistemi olarak bakılabilir. Diğer yandan, günümüze kadar tanımlanan tüm P450 ihtiva eden flavin adenin dinükleotid (FAD), ferredoksin : NADP<sup>+</sup> redüktaz (FNR), flavin mononükleotid (FMN), adrenodoksin, glutatyon redüktaz (GR), NADPH : P450 redüktaz, flavodoksin, Fe-S proteinleri, sitokrom *b5* ve diğer monooksijenaz sistemleri ortak yapı ve fonksiyonel kanga dizaynı göstermektedir (12,13).

CYP450 proteinlerinde bir tek demir protoporfirin IX prostetik grubu bulunur ve oluşan hem proteininde hem bir oksijen molekülünün hem de substratların bağlanabileceği yerler vardır. Bilinen tüm CYP450'lerdeki hem demiri, porfirin halkasındaki 4 pirol nitrojen atomuna ve 2 aksiyal liganda bağlıdır. Aksiyal ligandların birinde molekülün karboksil ucuna yakın yerleşmiş bir sistein kalıntısında bir sülfhidril grubu bulunur (2) (Şekil 2). Hem demiri iki farklı spin durumunda bulunabilir: 1) hekza yerleşimde düşük spinli demir ve 2) penta yerleşimde yüksek spinli durumdadır. Düşük ve yüksek spinli durumlar demir atomunu çeviren elektronik kalkanlar olarak tanımlanır ve hemdeki demir atomunu hekza yerleşimli durumdan penta yerleşimli duruma değiştirir. CYP450 molekülü bir substrata bağlanınca, bu elektronik kalkanda irritasyon meydana gelir ve hemdeki demir atomu hekza yerleşimden penta yerleşime geçer. Substrata bağlı, penta koordine durum (-170 mV), substrata bağlanamayan hekza koordine duruma (-270 mV) göre daha fazla pozitif indirgenme potansiyeline sahip olduğu için CYP450, NADPH'dan elde edilen elektronlarla indirgenbilir (Şekil 3). Hidroksilasyon (monooksijenasyon) reaksiyonunun meydana gelmesi sırasında, oksijenin hem demirine bağlanabilmesi için hemdeki demir ferrik (Fe<sup>3+</sup>) durumundan ferro (Fe<sup>2+</sup>) durumuna indirgenmelidir. Monooksijenasyon reaksiyonunda toplam 2 elektron (e<sup>-</sup>) gerekir. Elektronlar CYP450 molekülüne tek tek transfer edilir. İlk önce oksijen bağlanır ve daha sonra substratın reaksiyona



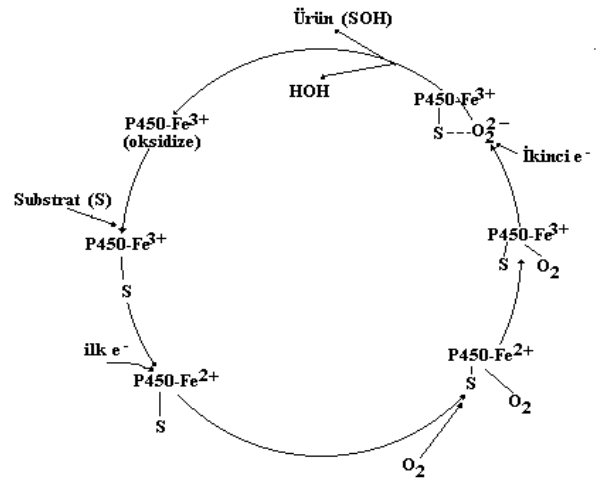
Şekil 2. Bakteriyel sitokrom P450'deki penta yerleşimli hem prostetik grup. Demir, 4 pirollü nitrojen atomu tarafından tutulur ve aksiyal tiolate ligandı, demir atomunun altındaki sistein 357 tarafından sağlanır. Histidin 355 kalıntısı, demir atomunun solundadır. Demir atomunun üstünde substrat kafuru vardır. (Referans 2'den alınmıştır)

katılabilmesi için aktif oksijen türleri oluşturarak ayrılır (3).

## P450 İÇEREN MONOOKSİJENAZ SİSTEMLERİ

### FAD flavoproteinleri

Bazı dizilimi esasına göre, FAD flavoproteinleri üç büyük ailede sınıflandırılabilir: Birinci aile; FAD flavoprotein ferredoksin : NADP<sup>+</sup> redüktaz (FNR)



Şekil 3. Sitokrom P450'deki reaksiyon basamakları. Bu şekilde substratın bağlanması, ilk ve ikinci elektronların transfer edilmesi ve moleküler oksijenin bağlanması

ailesine flavoprotein pridin nükleotid sitokrom redüktaz (FPNCR) ailesi adı da verilir (14). Bu aile; ferrodoksin : NADP<sup>+</sup> redüktaz, NADH : sitokrom b5 redüktaz, NADPH:P450 redüktaz, NADPH : sulfid redüktaz (15), NADH ve NADPH : nitrat redüktaz (16), maya flavohemoglobin (17), fagosit flavositokrom b'sinin beta alt birimi (sitokrom b-245) (18) ve fitalat dioksijenaz redüktazdan oluşur (19). Bu ailedeki tüm üyeler ortak strüktürel çerçeveye (FNR'ye benzeyen modül) sahiptirler: N-terminal alt kangal flavine ve C-terminal alt kangal pridin nükleotide bağlanır (20). Günümüzde bu üç ailenin üç boyutlu yapısı çözümlenmiştir. Strüktürel özelliklerine göre, aile üyeleri arasında amino asit benzerlik oranı anlamlılık sınırında veya düşük önemdedir. Nitrat redüktazın FNR'ye benzerlik oranı %15'dir. FNR'deki FAD ve NADPH bağlama kangalları arasında gelişen ara yüzeyler ile bunların fonksiyonel olarak ayırıldıkları mümkün değildir (21). Gerçekten, FAD bağlama alt kangallarının ekspresyonu üzerinde yapılan çalışmalarda, NADPH alt kangalları olmadan doğru bir şekilde bağlanmanın gerçekleşmediği gösterilmiştir (5). İkinci aile; çeşitli hidrokarbonların oksidatif metabolizmasına katılan demir-sülfür redüktazlar (putidaredoksin redüktaz, terpredoksin redüktaz, rubredoksin redüktaz, benzen 1,2-dioksijenazın ferredoksin : NAD<sup>+</sup> redüktaz bileşikleri, toluen 1,2-dioksijenaz, klorobenzen dioksijenaz, bifenil dioksijenaz), diğer bir çok flavoprotein oksidoredüktazlar ile, özellikle de pridin nükleotid disülfid oksidoredüktaz (glutasyon redüktaz, tripanotion redüktaz, lipoamid dehidrogenaz, merkürük redüktaz, tioredoksin redüktaz, alkil hidroperoksid redüktaz), NADH oksidaz, NADH peroksidaz ve flavositokrom c sülfid dehidrojenazın flavoprotein alt birimi ile baz dizilim benzerliğine sahiptir (14). İnsan glutasyon redüktazı ile *Escherichia coli* tioredoksin redüktazının kristal yapısı karşılaştırılınca, aktif bölge lokalizasyonlarının farklı olduğu görülmektedir. Buna göre FAD/NAD(P)H redüktaz grubundaki enzimlerin disülfid redüktaz aktiviteleri bağımsız olarak ortaya çıkmaktadır (22). Glutasyon redüktaz (GR) ailenin strüktürel prototipini oluşturur. Bu ailedeki üyelerin günümüze kadar çözümlenen kristal yapıları benzer topoloji gösterir. Fakat FAD ve NAD(P)H bağlama alt kangalları anlamlı oranda değişiklik göstermektedir. FNR ailesinin aksine, GR ailesindeki FAD ve NAD(P)H bağlayan alt kangalları hem baz dizilimi hem de üç boyutlu yapı bakımından (beta-

alfa-beta katmanı) benzer özelliktedir. Bu proteinlerin gen duplikasyonu ile ortaya çıktığı sanılmaktadır (23). Üçüncü aile ise; NADPH : adrenodoksin redüktaz, diğer ferrodoksin redüktazlarla baz dizilimi benzerliği göstermez (24). Buna karşılık, FAD ve NAD(P) bağlama yerleri hem putidaredoksin redüktaz hem de adrenodoksin redüktazda hemen hemen identik pozisyonlardadır (3). Bundan da öte, adrenodoksin redüktaz glutamin sentetaz ve NADH peroksidaz ile lokal benzerliklere sahiptir.

### Ferridoksinler

FNR (FAD kangalı)'den P450'ye elektron transferini sağlayan demir-sülfürlü proteinler iki aile içinde sınıflandırılabilir: adrenodoksin benzeri Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> proteinler (adrenodoksin, putidaredoksin, terpredoksin) ve Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub> ferridoksinler (*Streptomyces griseolus* Fd-1 ve Fd-2, *Streptomyces griseus* ferridoksin soy, *Rhodococcus fascians* ve *Bradyrhizobium japonicum* ferridoksinler). Karşılaştırmalı analizlere göre *Streptomyces*'in Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub> ferridoksinler, Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> ferridoksinlere yüksek derecede homolog olmasına rağmen Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> proteinlerde dördüncü sistein eksiktir (25). Adrenodoksin ailesindeki Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> proteinleri, evrimsel yönden kloroplast tipindeki Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> ferrodoksinlere akraba değildir (26).

### Flavodoksinler

Flavodoksinler, fonksiyonel ferridoksin analogu olarak çeşitli elektron transport sistemlerinde rol alır (27). Flavoproteinler sadece bazı bakteri ve alglerde bulunmasına rağmen bu proteinler hem prokaryotik hem de ökaryotik protein kangalları ile benzerlik gösterirler. CPR ve NOS'larda bulunan FMN bağlama kangalları dışında, flavodoksin benzeri kangallar *Penicillium vitale* katalazında (28) insan eritrositlerindeki NADPH : flavin redüktazlarda (29) ve *Desulfovibrio gigas* nikel-demir hidrogenazında (30) bulunur. Çeşitli flavodoksinlerin üç boyutlu (3-D) yapıları tayin edilmiştir (31). Flavodoksinlerin 3-D yapısında bulunan asidik ve bazik kalıntıların lokalizasyonlarında asimetri vardır. Bu asimetri, protein-protein etkileşiminde rol alan dipollerin ortaya çıkmasına neden olur (32).

**Tablo 1.** Major insan karaciğer sitokrom P450 enzimlerinin özellikleri

Enzim	Substratları	İndükleyicileri	İnhibitörleri
CYP1A2	Asetaminofen, teofilin, kafein, fenasetin, trikarboksilik asidin demetilasyon yolu	Sigara içme, kızartma yiyecekler, omeprazol	Siprofloksasin, enoksasin, norfloksasin, fluvoksamin
CYP2C	Dapson, diazepam, warfarin, tolbutamid, fenitoin	Deksametason, fenobarbital	Amiodaron, simetidin, sertralin
CYP2D6	Beta blokerler, debrisoquine, omeprazol, dekstrometorfan, trisiklik antidepressanlar	Bilinmiyor	Klomipramin, desipramin, fluoksetin, paroksetin, kinidin, sertralin, tiordazin
CYP2E1	Asetaminofen, etanol	Etanol, isoniazid	Disulfiram
CYP3A4	Sisaprid, kortikosteroidler, siklosporin, dapson, dekstrometorfan, diazepam, diltiazem, enalapril, itrakonazol, ketokonazol, lovastatin, makrolidler, midazolam, nifedipine, kinidin, gonadal hormonlar, takrolimus (FK506), terfenadine, teofilin, triazolam, verapamil, warfarin	Karbamazepin, glukokortikoidler, fenobarbital, fenitoin, rifampin	Simetidin, itrakonazol, ketokonazol, makrolidler, nifedipin, verapamil, sertralin, fluoksetin

## Sitokrom b5

Sitokrom b5; hayvanlar, bitkiler ve mayalarda bulunan özel bir elektron transport proteinidir. Mikrozoal ve mitokondriyal (33) membrana bağlı sitokrom b5 proteinlerinin aksine, eritrositlerdeki sitokrom b5 suda çözünen sitozolik proteinlerdir (34). Son yıllarda, sitokrom b5'in solubl formuna uyan mRNA'nın hayvan dokularında dağılmış olduğu gösterilmiştir (35). Sitokrom b5, bitki ve mantarlardaki nitrat redüktazlar, civcivlerdeki sülfid oksidaz ve mayalardaki flavositokrom b2 (L-laktat dehidrogenaz) gibi çeşitli oksidoredüktazların hem içeren kangallarına homologdur. Baz dizilimi karşılaştırılarak, globin ailesinin sitokrom b5'e benzeyen bir aileden geldiği ileri sürülmektedir (36). Şimdiye kadar tanımlanan tüm sitokrom b5 ve homologları sadece ökaryotlarda bulunmuştur.

## P450 ailesi

P450 ailesi, çeşitli sistemlerdeki en değişken aileyi oluşturmaktadır. P450 ailesinin evrimi sonunda bir

çok tipi ortaya çıkmıştır (37). Bununla birlikte, P450 ailesinin filogenetik olarak akraba olmadığı ve *CYP1A1*, *1A2*, *2E1*, *7*, *11A1*, *11B1*, *17*, *19*, *21A1*, *27* ve *51* gibi çeşitli gen gruplarından oluştuğu anlaşılmıştır. Memelilerdeki *CYP1A1* ve *CYP1A2*, ratlardaki *CYP2D* demeti (37), ev sineklerindeki *CYP6A* ve *CYP6C* (38) gen demetleri gibi bazı P450 gen demetlerinin gen duplikasyonu ile ortaya çıktığı anlaşılmıştır. *CYP2A*, *2B*, *2C*, *2D*, *3A*, *4A*, ve *52A* gibi P450 gen ailelerinde sayısız türe spesifik gen duplikasyonları ve konversiyon olayları ortaya çıkmaktadır. Bu şekildeki evrim türler arasında farklılaşma ile ilgili olabilir. Gen füzyon olayları bir komponentli P450 sisteminin ortaya çıkmasına neden olabilir. Çok daha eski horizontal gen transferi olayının diğer bir örneği, nükleer genom içine mitokondriyal (*CYP11* ve *CYP27* ailesine ait) genlerin integre olmasıdır (39).

Günümüzde, CYP450 içeren bu proteinlerin üç boyutlu yapıda olduğu anlaşılmış (19,21,39-43), bitkilerdeki analoglarının ( $Fe_2S_2$ ) yapısı röntgen ve NMR ile çözümlenmiş ve  $Fe_2S_2$  ile FNR kangalları arasındaki etkileşim sonucu PDR polipeptidinin oluştuğu anlaşılmıştır. Bu iki kangal arasındaki temas 8 hidrojen bağı ve 6 çözücü köprüden oluşur (20). Buna göre diğer elektron vericileri ile FNR'nin kompleks yapısını anlamak için PDR örnek verilebilir.

## Nitrik oksid redüktaz

Nitrik oksid redüktaz P450 (*CYP55*, P450nor), *Fusarium oxysporum* mantarı tarafından denitrifikasyona katılan solubl bir hemproteindir (39). Diğer P450 enzimlerinin aksine, bu enzimin monooksijenaz aktivitesi yoktur fakat NADH varlığında nitroz oksid ( $N_2O$ ) oluşturmak üzere nitrik oksid (NO)'i indirgeyebilmektedir. Bununla birlikte P450nor tarafından NO'nin indirgenebilmesi için diğer protein komponentleri gerekmemektedir (44). Buna göre P450, elektronları direkt olarak NADH'dan almaktadır. P450nor tarafından katalizlenen NO redüksiyonunun mekanizması, diğer NO redüktazlardan farklıdır (45). P450nor'un amino asid dizisi, bakteriyel P450'lere, ökaryotik P450'lerden daha fazla, özellikle *CYP105* ailesine (%40'ın üzerinde identik) benzerlik göstermektedir. Röntgen difraksiyonu ve kristalizasyon çalışmaları ile de

P450nor'un yapısı tespit edilmiş ve sitokrom oksidazın NO redüktazdan geliştiği ileri sürülmüştür (46). P450 ve sitokrom oksidaz homolog değildir, her ikisi de aerob ve anaerob reaksiyonları katalize edebilen redoks reaksiyon zincirlerine katılabilmektedir. P450'nin çok eski solunum enzimlerinden biri olduğu ileri sürülmüş (47) ve P450nor'un, nitrat solunum fonksiyonu olması nedeniyle, P450 evriminin erken dönemlerine dair bir delil olabileceği düşünülmüştür. Mantar genomuna bakterilerden (örn *Streptomyces*) horizontal gen transferi ile *CYP55* geni katılabilir ve böylece P450'nin günümüzde bilinen monooksijenazlardan farklı fonksiyonları ortaya çıkabilir (39).

### Nitrik oksit sentetaz

Son 5 yıldır, nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentetaz (NOS)'ın biyolojik fonksiyonlarına dair çok fazla yayın yapılmıştır. NOS ailesi ile P450 enzim ailesinin evrimsel ilişkisi vardır. NOS ile CPR'nin baz dizilimi benzerliği ve P450 hemoproteinlerin tipik spektral özelliklerine göre NOS, ökaryotik tek komponentli bir P450 sistemidir. NOS'ın hem fonksiyonel grupları ile redüktaz kangalları, sırasıyla, P450 ve CPR'ye fonksiyonel benzerlik gösterir (48).

### SİTOKROM P450 FORMLARI

1950 yılından beri, moleküler O<sub>2</sub> atomlarından birinin metabolize olan substrata katılabildiği bilinmektedir. Bu monooksijenasyon işlemi flavoprotein monooksijenaz (hidroksilazlar) gibi diğer spesifik proteinler tarafından da oluşturulabilir. Oksijenaz olarak sınıflandırılan diğer proteinlerden hiçbiri, CYP450 ailesinin üyelerindeki kadar esneklik göstermez. Son on yılda, CYP450'nin baz dizilimi ve yapısı tespit edilmiş, CYP450 regülasyon ve evrimini anlamamızı sağlayan bilgiler çığ gibi artmıştır.

### Çeşitli genlerle üretilen sitokrom P450 formları

Son 5-50 milyon yıl içinde meydana gelen gen duplikasyonlarına bağlı olarak birçok CYP450 formları ortaya çıkmış ve çeşitli türlere dağılmıştır. Günümüzde çeşitli hayvanlarda tanımlanan farklı CYP450 formları; diyet alışkanlıkları veya çevresel etkenlere maruz kalma gibi çevresel etkenlerin

selektif baskısı sonucu ortaya çıkmaktadır. Primordiyal genlerin endojen substratları metabolize eden CYP450 enzimlerini üretmesi mümkündür (49).

Filogenetik incelemeler, oluşan amino asit dizileri ve evrimsel değişim oranlarının sabit olduğu farzedilerek ilk CYP450'nin ortaya çıkması ile ilgili bir tahmin yapılırsa karşımıza metabolize kolesterol ve yağ asitleri çıkmaktadır. Bu nedenle, CYP450'nin ilk ökaryotlarda membran bütünlüğünde rol oynadığı söylenebilir.

### Substrat spesifikliğı

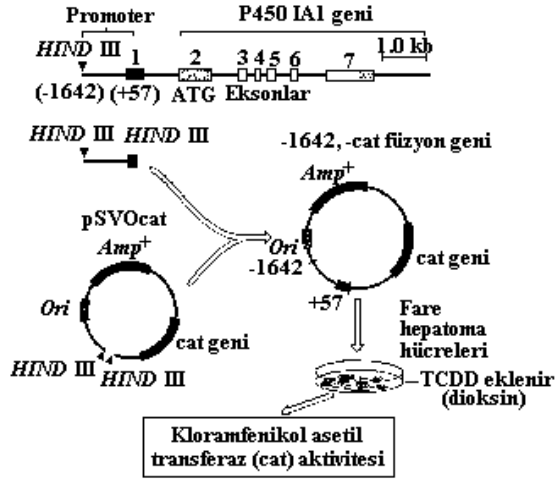
Günümüzde 400'ün üzerinde CYP450 geni tespit edilmiş ve bunların çeşitli endojen ve ekzojen substratlarda oksijenasyonu katalizlediği anlaşılmıştır (50). Bu gen super ailesinde birçok üye bulunur ve bunların sınıflandırılması mümkün değildir. Her proteine dair baz dizilimi bilgisi açıklığa kavuşuncaya kadar belirli bir CYP450'yi yeni olarak tanımlamak doğru değildir. Bu enzimleri tanımlamanın tek yolu, substrat spesifikliğinin tayin edilmesidir. Bu ailede bir çok üye bulunmasına rağmen, moleküler ağırlık ve diğer moleküler özelliklerdeki benzerliklerden yararlanarak aynı organ veya hatta hücre içi organellerde tek tek CYP450'nin saflaştırılması mümkündür (51). CYP450'nin substrat spesifikliğini tayin etmenin tek yolu ise uygun bir sellüler ekspresyon sisteminde bir ekspresyon vektörü aracılığıyla özel bir protein için cDNA eksprese ettirmektir. Günümüze kadar, bu işlem; bakteri, insekt, maya ve memeli hücre sistemlerinde başarılı ve farklı substrat spesifikliğı belirlenmiştir. Nükleotid sırası, klonlanan genlerden elde edilebilirse, kültürdeki hücrelerde transfeksiyon meydana getirilebilir ve bu hücrelerde eksprese olan enzim aktivitesinin kaynağına dair şüpheler ortadan kaldırılabılır. Bu metod kullanışlı olmasına rağmen dezavantajı, bir tek CYP450 proteini ile yapısal benzerliğı olmayan farklı substratları metabolize edebilmesidir (50,52).

### CYP450 SİSTEMİNİN İNDÜKSİYONU

İndüksiyon, çeşitli droglar veya endüstri atıklarında bulunan polisiklik aromatik hidrokarbon gibi çevresel atıklar ve sigara içme ile ilişkili olarak enzim sentezinin artmasıdır (53). Birlikte kullanılan ilaçlar ya aynı enzim yolu veya alternatif bir yoldan

**Tablo 2.** Sitokrom P450 sisteminin temel özellikleri

Aile	Alt grup	Adlandırma	Gen lokalizasyonu	İnsandaki fonksiyonu	Faredeki fonksiyonu	Klinik
1	Alt aile 1A	CYP1A1 CYP1A2	15q22-q24 Bilinmiyor	Dioksin induksiyonu	Aromatik bileşiklerin induksiyonu Aromatik bileşiklerin induksiyonu	Fenasetin metabolizması defekti
2	Alt aile 1B Alt aile 2A Alt aile 2A3	CYP1B1 CYP2A1 CYP2A3	2 19q13.2 Bilinmiyor	Fenobarbitol induksiyonu		
		CYP2A5 CYP2A6	Bilinmiyor		15-alfa-hidroksilaz	Kumarin direnci
	Alt aile 2B	CYP2B CYP2B9 CYP2B10 CYP2B13	19q13.2	Fenobarbitol induksiyonu	Fenobarbitol induksiyonu, tip a Fenobarbitol induksiyonu, tip b Fenobarbitol induksiyonu, tip c	
	Alt aile 2C	CYP2C CYP2C8 CYP2C9 CYP2C10 CYP2C18 CYP2C19	10q24.1-q24.3 10q24.1 10q24.1 10q24.1 Bilinmiyor Bilinmiyor		Fenobarbitol induksiyonu	Hidantoin toksisitesi
	Alt aile 2D	CYP2D9			Testosterone 16-alfa-hidroksilaz	Hidantoin toksisitesi Debrisoquine hidroksilasyonu, sparteine ve nortriptilin oksidasyonu
	Alt aile 2E	CYP2E	10q24.3-qter	Etanol induksiyonu	Etanol induksiyonu	
	Alt aile 2F	CYP2F1 CYP2F2	19q13.2	Etoksikumarin metabolizasyonu		
3	Alt aile 3A Alt aile 3A Alt aile 3A	CYP3A4 CYP3A11 CYP3A13	7q22-qter	Glukortikoid induksiyonu	Naftalene hidroksilasyonu steroid inducible steroid inducible	
4	Alt aile 4A Alt aile 4A Alt aile 4B Alt aile 4D	CYP4A10 CYP4A11 CYP4B1 CYP4D- PEN	1 1p34-p12 Bilinmiyor		lauric acid-omega-hydroxylase	
5	Alt aile 5	CYP5				Tromboksan sentetaz eksikliği
11	Alt aile 11A Alt aile 11B Alt aile 11B	CYP11A CYP11B1 CYP11B2	15q23-q24 8q21-q22 8q21-q22	Kolesterolde yan zincir kırılması	Kolesterol yan zincir klevaj enzimi Steroid-11-beta-hidroksilaz Steroid-11-beta-hidroksilaz	Adrenal hiperplasi IV Hipoaldosteronizm
17	Alt aile 17	CYP17	10q24.3		Testosteron biyosentezi	Adrenal hiperplasi V
19	Alt aile 19	CYP19	15q21		Aromataz	Familyal jinekomasti
21	Alt aile 21	CYP21A1			Steroid-21-hidroksilaz	Adrenal hiperplasi III
51	Alt aile 51	CYP51		Kolesterol biyosentezi		



Şekil 4. P450 geninin regülâtör baz dizilerinin ortaya çıkması. HIND III restriksiyon enzimi yerinden, P450 geninin -1642 ile +57 nükleotidleri ayrılır ve bu nükleotidler kloramfenikol asetiltransferaz (CAT) geni kapsayan P450cat vektörüne integre edilir. Daha sonra, bu vektörlerle fare hepatoma hücreleri transfekte edilir. Kültür ortamına TCDD eklenir. TCDD-reseptör kompleksi CAT geninde transkripsiyonu başlatabilir ve CAT proteinini sentezletebilirse genin bu bölgesinde indükleyici ajan için regülâtör yerler bulunduğu anlaşılır. Amp<sup>+</sup> = ampisilin direnç geni. (Referans 60'dan adapte edilmiştir)

çeşitli kimyasalların biyotransformasyonunu stimüle ederek indüksiyona neden olurlar. İndükleyici ajanlar genellikle belirli sitokrom P450 ailesine spesifiktir (Tablo 1) (53).

Hem endojen hem de ekzojen bileşikler tarafından çeşitli CYP450'lerin indüklendiği 1960 yıllarından beri bilinmektedir. CYP450 indüksiyon mekanizması, hem transkripsiyonel hem de posttranskripsiyonel seviyede belirlenmiştir. Etanol ve asetonun her ikisi de farklı mekanizmalarla, iki farklı CYP450 alt gen ailesini indükleyebilir. Etanolla indüksiyon transkripsiyon seviyesinde ortaya çıkarken aseton posttranskripsiyon olaylarına katılır ve mRNA stabilizasyonu yapar. Kompleks bir indüksiyon; ratlarda etanol, aseton veya pirol ön tedavisi ya da açlık ve diabet gibi durumlarda sitokrom P450IIE1 ile ortaya çıkar. Küçük organik bileşiklerin verilmesi, mRNA seviyesini etkilemeden sitokrom P450IIE1 protein miktarında büyük artışlara neden olur. Mekanizması tamamen anlaşılmamış olmasına rağmen, proteolitik parçalanmadan ileri gelen bu spesifik sitokrom, pirazol ile stabilize edilebilir. Diğer yandan, diyabetik ratlarda sitokrom P450IIE1 6 kat artarken,

gen transkripsiyonunda bir artma olmadan mRNA'da 10 katlık bir artma ortaya çıkmaktadır. Bu olay mRNA stabilizasyonunu düşündürmesine rağmen kesin mekanizmayı tespit etmek zordur (54).

İndükleyici ajanların bilindiği bazı durumlarda spesifik protein reseptörlerin rolü gösterilmiştir. Üzerinde en çok çalışılan protein reseptörlerden biri, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo p-dioxin (TCDD)'dir. TCDD, aril hidrokarbon olarak tanımlanan sitozoldeki reseptörünü (Ah reseptörü) indükler (55). Polisiklik hidrokarbonlar reseptöre bağlanarak bir kompleks oluşturur. Bu kompleksler spesifik CYP450 genlerindeki regülâtör yerlere bağlanabilmektedir. CYP450 gen transfeksiyon ve ekspresyon vektör teknolojisi Şekil 4'de gösterilmiştir. RNA polimeraz promoter II bölgesine uyan CYP450 genomik DNA kısımlarını eksprese ettirilebilir ve bu DNA kısımları ile ökaryotlarda eksprese olmayan bir enzimi kodlayan diğer bir gen birleştirilebilir. Ekspresyon sistemlerindeki prokaryotik enzim aktivitesi (chloramphenicol acetyl transferase, CAT)'nin tayin edilmesi, DNA üzerindeki bu genleri (kimyasal karsinojenleri düzenleyici elementler, xenobiotic regulatory elements veya XREs) düzenleyen baz dizileri ile mümkündür. Buna rağmen, TCDD'nin DNA bağlanması veya sitoplazma ve nükleus arasında reseptör paylaşımı için gerekli olup olmadığı bilinmemektedir. Fenobarbital gibi diğer indükleyicilerin reseptör aracılığıyla etki ettiklerine dair yeterli delil olmadığı gibi regülâtör DNA elementleri de tespit edilememiştir. Bazı ilaç metabolize eden enzimler de CYP450 enzimlerini indüklemektedir (56-60).

## İlaç metabolize eden enzimlerin indüksiyonu ve klinik gözlemler

CYP450 sisteminin indüklenmesi, terapötik ilaçların etkinliğini değiştirebilir. Bu enzimler, hepatositlerde yüksek konsantrasyonda bulunur ve lipofilik ilaçları böbrekler tarafından atılabilen daha polar bileşikler haline dönüştürürler (61). Hidroksilasyon oranı hızlanırsa, ilaçların inaktive edilme ve/veya vücuttan atılma oranı artar. Ayrıca, CYP450 sisteminin indüklenmesi ile terapötik ajanların toksik metabolitleri oluşur ve konsantrasyonları yüksek orana ulaşırsa hücre hasarı gibi beklenmeyen ve istenmeyen yan etkilere neden



olabilir. Ortaya çıkan metabolitler genellikle esas komponentten daha az aktif olmasına rağmen bazı ilaçlar biyotransformasyona uğradıktan sonra daha aktif ajanlara da dönebilmektedir. Bazı durumlarda metabolitler toksik, karsinojenik veya teratojenik özellik kazanabilmektedir (62). İlaçlar aracılığıyla CYP450'nin indüklenmesi, ilacın metabolizmasını veya indüklenmiş CYP450 için substrat fonksiyonu yapan diğer ilaçları stimüle edebilir. Genellikle ilacın metabolizması hızlanır, vücuttan daha hızlı atılır ve metabolik olarak daha aktif formları oluşur. Bununla birlikte, CYP450 indüklenmesi sırasında klinik problemler de ortaya çıkabilir. Antitüberküloz ajan ve CYP450 indükleyicisi olan rifampisin ile oral kontraseptiflerin vücuttan atılması hızlandığı için kontraseptif ajanın etkinliğinde azalma ve her iki ilacı birlikte alan kadında gebelik oranı artmaktadır (63). Pıhtılaşma problemleri olan bir hastada, uzun etkili bir sedatif ve güçlü bir CYP450 indükleyicisi olan fenobarbital ile bir antikoagulan olarak warfarin birlikte kullanılırsa ölüm oranları artmaktadır. Warfarin, fenobarbital tarafından indüklenen CYP450 için substrat görevi yaptığı için koagülasyon problemleri olan hastada pıhtılaşmayı önlemek için daha yüksek warfarin dozlarına ihtiyaç duyulmaktadır. İlaç daha hızlı metabolize edilip vücuttan atıldığı için tedavi etkinliği azalmaktadır. Tedavi sırasında warfarin dozunda azalma yapılmadan fenobarbital kesilirse klinik problemler ortaya çıkmaktadır. Zamanla, CYP450 seviyesi indüklenmemiş seviyelere azalır fakat yüksek warfarin konsantrasyonları halen yüksek olsa bile, uygun şartlar altında metabolizmanın hızlanması ve klirensinin artması sonucu aşırı veya istenmeyen hemorajilere ve bazen hastanın ölmesine neden olabilir. Bu örnek, bilinçsizce yazılan antagonistik ilaçların istenmeyen ve açıklanamayan ilaç etkileşimlerinin klasik örneğini oluşturur (64).

## SİTOKROM P450 İNHİBİTÖRLERİ

Birçok CYP450 formu olduğu için bu enzimlerin fonksiyon yaptıkları organlardaki metabolik rollerinin bilinmesi gerekir. Böbrek üstü bezinde ve üreme organlarında CYP450'nin bazı metabolik yollara katıldığını göstermek için inhibitör

ajanlardan yararlanır. Daha önceden bahsedildiği gibi, birçok dokuda CYP450, indirgenmiş karbon dioksit spektrumu ile tespit edilmektedir. Karbon monoksit, oksijen yerine, daha yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği hem demirine bağlanır ve böylece hem demirinin fonksiyonunu güçlü bir şekilde inhibe eder. Metabolik yollarda bir substratın katalizinde terminal oksijenaz olarak CYP450'nin tanımlanması, indirgenmiş CO'in maksimum absorpsiyon verdiği 450 nm'de CO inhibisyonunu geriye döndürür. Bu olay ilk kez böbrek üstü mitokondrilerindeki CYP450 enzimlerinin substratı olarak steroidlerde gösterilmiş ve daha sonra karaciğer mikrozomlarında metabolize edilen ilaçlarla da meydana geldiği anlaşılmıştır. Bununla birlikte, bu birçok CYP450'nin nonspesifik bir inhibisyonudur ve çeşitli formlar arasında ayırım sağlamaz (65).

Bu nedenle, belirli bir metabolik olayda spesifik bir CYP450'nin rolünü tespit etmek için daha spesifik inhibitörlerin dizayn edilmesi gereklidir. Sayısız CYP450 için monospesifik poliklonal ve monoklonal antikorlar geliştirilmiş olmasına rağmen belirli bir reaksiyonu inhibe eden bir tek CYP450 formunun tayin edilmesi imkansızdır. Çeşitli formlar arasında kuvvetli yapısal homoloji nedeniyle CYP450 arasında kros-reaktivite ortaya çıkmaktadır. Bu olay özellikle immün kros-reaktivite gösteren aynı gen ailesinde sık görülmektedir (65).

Son yıllarda, çalışmalar, spesifik P450'lerin substrat veya substratlarına güçlü yapısal benzerliği olan inhibitörlerin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak katalitik turnover sırasında enzimin prostetik grubu veya proteinleri ile irreversibl inhibisyon ürünleri oluşmaktadır. Bu inhibitörler, enzimler için substratlarına yapısal benzerlikleri nedeniyle belirli P450 formları için oldukça spesifiktir. Bu inhibitörlerde enzimlere kovalan olarak bağlanabilen fonksiyonel gruplar vardır ve bu nedenle irreversibl olarak bağlanırlar (65).

## SİTOKROM P450 ELEKTRON TRANSPORT SİSTEMLERİ

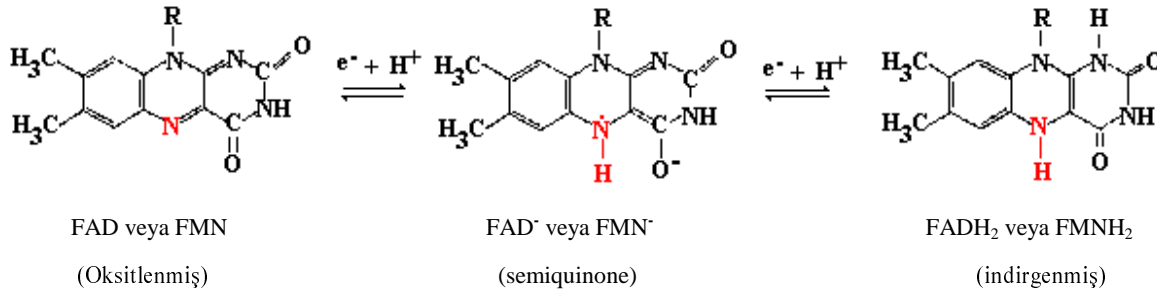
CYP450 ile katalizlenen reaksiyonlarda, hemdeki demirin indirgenmesi, oksijenin bağlanması ve ayrılması için 2 elektron gerekmesine rağmen, mekanizma ile ilgili basit bir problem ortaya çıkar. NADPH'dan da CYP450'ye elektronlar transfer edilmektedir. Piridin nükleotidler 2 elektron vermesine rağmen bir tek hem prostetik grubu olan CYP450, aynı anda sadece bir elektron kabul edebilir. Bu nedenle, NADPH'dan CYP450 molekülüne elektron transferi yapan bir protein 2 elektron kabul edebilmeli ancak tek elektron vericisi olarak görev yapmalıdır. Bu problem, NADPH'dan aynı anda 2 elektron alan fakat aracı demir-sülfür proteinine veya direkt olarak CYP450'ye elektronları tek tek transfer eden NADPH'a bağımlı flavoprotein redüktazlarla çözülebilmektedir. Flavin molekülünün aktif redoks grubu izoalloksazin halkasıdır. İzoalloksazin nükleusu bu kimyasal görevi üstlenecek benzersiz bir yapıya sahip olup oksidize formda yani, 1 veya 2 elektronla indirgenmiş durumdadır (Şekil 5). NADPH'dan CYP450'ye elektronların transferi, genellikle ya mitokondri veya endoplazmik retikulum (ER)'da bulunan iki farklı elektron transport sistemi ile sağlanır (66).

### ER'da bulunan elektron vericileri: NADPH-CYP450 redüktazlar

ER'da bulunan NADPH, elektronları NADPH-CYP450 redüktaz adı verilen bir flavoproteine taşır. Bu enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 78.000'dir ve prostetik gruplar olarak, hem flavin

adenin dinükleotid (FAD) hem de flavin mononükleotid (FMN) kapsar. Bu protein, günümüzde FAD ve FMN'den ikisine birden sahip olan iki memeli flavoproteininden biridir. NADPH molekülünün amino ucu hidrofobik özelliktedir ve molekülün ER'a yerleşmesini sağlar (Şekil 6). FAD, NADPH'dan alınan elektronların giriş noktası olarak ve FMN, her bir elektronun CYP450'ye transfer edilebileceği çıkış noktası olarak görev yapar. Flavin moleküllerinin bir veya iki indirgenmiş formda bulunması ve her redüktaz molekülüne iki flavin molekülünün bağlanabilmesi nedeniyle, enzimler NADPH'dan elektronları alabilmekte ve oksijen molekülünün bağlanması (ilk elektron) veya oksijenin ayrılması (ikinci elektron) sırasında, bu elektronları hem demirine tek tek transfer etmeden önce iki flavin molekülü arasında saklayabilmektedir (67) (Şekil 7).

Mikrozomal P450 ile katalize edilen bazı reaksiyonlarda ikinci elektronun transferi, direkt olarak NADPH-CYP450 redüktazdan olmayabilir. Bu durumda endoplazmik retikulumda bulunan ve sitokrom *b5* adı verilen başka bir enzim devreye girer. Bu enzim, küçük bir hem proteindir ve moleküler ağırlığı 16.000'dir (Şekil 7). Sitokrom *b5*, ya NADPH-CYP450 redüktazlarla ya da mikrozomlara bağlı diğer flavoproteinlerle indirgenir. NADPH-sitokrom *b5* redüktaz, NADH için spesifiktir. Spesifik CYP450'ler tarafından katalizlenen bazı reaksiyonlarda, maksimal enzimatik aktivite göstermek için CYP450'ye ikinci elektronu transfer eden sitokrom *b5*'e ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan başka, yağ asitlerinde çift bağ oluşumunu katalize eden desaturaz enzimine elektron transferi için sitokrom *b5* ve NADH-sitokrom *b5* redüktaz gerekmektedir (67).

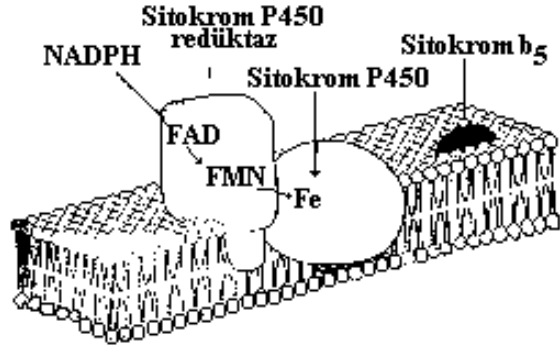


Şekil 5. Oksitlenmiş, semikinon (1 elektronla indirgenmiş form) ve tamamen indirgenmiş (2 elektronla indirgenmiş form) durumdaki FMN veya FAD'nin izoalloksazin halkası

### Mitokondrilerde bulunan elektron vericileri: NADPH-Adrenodoksin redüktazlar

Mitokondrilerde bulunan bir flavin redüktaz, NADPH'dan elektronları alır. Bu protein NADPH-adrenodoksin redüktaz olarak adlandırılır. Bu protein ilk kez böbrek üstü bezlerinde bulunmuş ve flavoprotein özellikleri gösterdiği belirlenmiştir. NADPH-adrenodoksin redüktaz sadece FAD içerir. Moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 51,000'dir. Endoplazmik retikulum membranında veya sitokrom P450 moleküllerinde bulunan flavoproteinlere göre adrenodoksin redüktazın membranla ilişkisi zayıftır. Bu redüktaz, ilk ve ikinci elektronları sitokrom P450'deki hem demirine direkt olarak transfer edemez (Şekil 8). Adrenodoksin denen küçük moleküler ağırlıklı (12.500 Da) bir proteinin, adrenodoksin redüktaz ve sitokrom P450 arasında aracılık yapması gerekir. Adrenodoksin redüktazda olduğu gibi adrenodoksin molekülü de içteki mitokondriyal membranla zayıf ilişkidir. Adrenodoksinin iki demir-sülfür demeti vardır. Bu molekülün redoks merkezi olarak görev yapar ve adrenodoksin redüktaz ve mitokondriyal CYP450 arasında elektron transportunda görev alırlar. Adrenodoksin, flavoprotein redüktazdan bir elektron alır ve daha sonra bu elektronu hemdeki demire transfer etmek için iç mitokondri membranına gömülmüş olan CYP450 ile reaksiyona girer (Şekil 9). Flavoprotein ve demir-sülfür proteinleri dahil mitokondriyal CYP450 sisteminin komponentleri, daha büyük moleküler ağırlıklı prokürsörler olarak sentezlenir ve mitokondrilere taşınırlar. Mitokondri içinde proteazlarla işlenerek daha küçük moleküler ağırlıklı matür proteinler

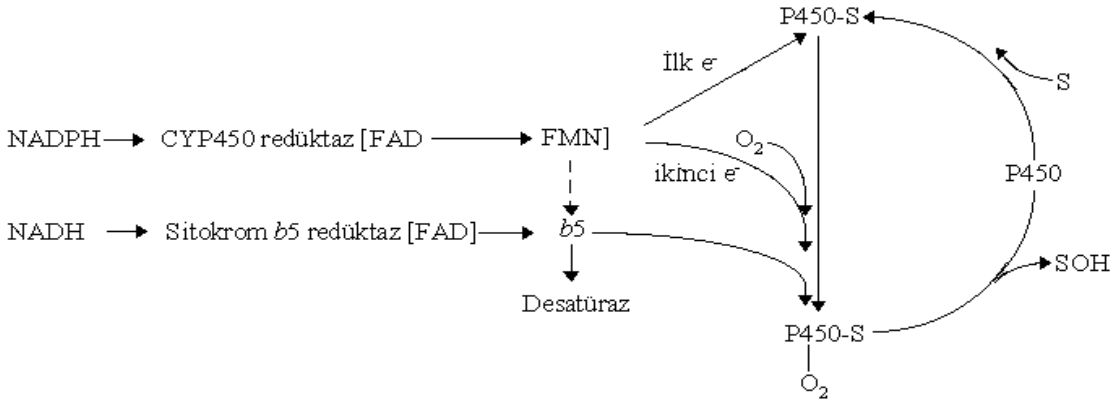
oluşur (68).



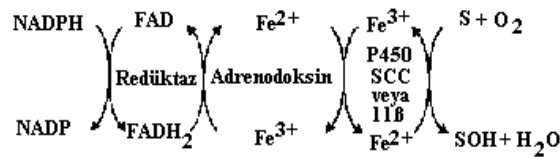
Şekil 6. Endoplazmik retikulum (mikrozomal) sitokrom P450 sistem komponentleri. NADPH-CYP450 redüktaz, membrana hidrofob ucu ile bağlanırken sitokrom P450 membranda daha derine dalmıştır. CYP450'nin aracılık ettiği reaksiyonlara sitokrom b5'in de katılabildiği görülmektedir.

### SİTOKROM P450 SİSTEMİNİN FİZYOLOJİK FONKSİYONLARI

CYP450 sistemi, endojen veya ekzojen orijinli çeşitli lipofilik bileşikleri metabolize eden enzim ailesinden oluşur. Bu enzimlerden katalize ettiği bazı reaksiyonlar Şekil 10'da gösterilmiştir. CYP450 sistemi, metil grubundaki karbon atomunun basit hidroksilasyonlarını katalize edebilir, bir alkandaki metillenmiş karbon içine OH grubunu yerleştirebilir, bir fenol oluşturmak üzere aromatik halkaları hidroksile edebilir veya bir epoksid oluşturmak üzere karbon-karbon çift bağı arasına oksijen atomunu ekleyebilir. Epoksid,



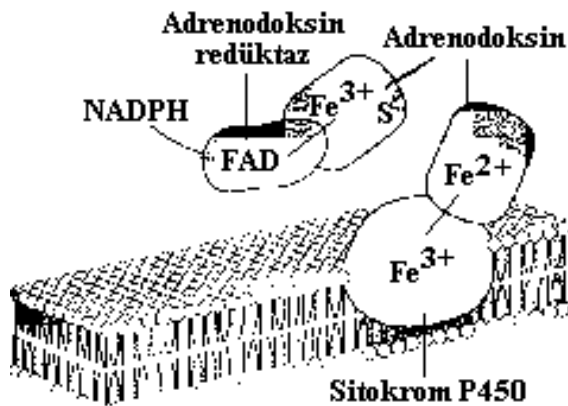
Şekil 7. Endoplazmik retikuluma elektron transport yolları. İlk elektron, NADPH-CYP450 redüktaz tarafından verilmelidir fakat ikinci elektron CYP450 redüktaz ile veya bazı CYP450 ya da sitokrom b5 tarafından verilebilir. S = substrat.



Şekil 8. NADPH'dan CYP450'ye elektron taşınması. Elektronlar, NADPH'dan adrenodoksin redüktaza verilerek adrenodoksin indirgenir. Adrenodoksin CYP450'nin indirgeyicisi olarak hizmet etmektedir.

nonenzimatik olarak bir alkol grubuna parçalanabilir veya epoksid hidroksilaz adı verilen bir enzim aracılığıyla epoksid grubuna su eklenir ve benzer alkol formları oluşabilir. Dealkilasyon reaksiyonlarında, oksijen karbon-hidrojen bağı arasına girerek dayanıksız bir ürün oluşturur. Bu nedenle tekrar primer alkol, amin veya sulfhidril bileşikleri oluşmaktadır. Şekil 10 ve 11'de gösterilen azot, sülfür ve fosfor atomlarının oksitlenmesi ve dehalojenasyon reaksiyonları da CYP450 enzimleri tarafından katalize edilir. CYP450 ile katalize edilen reaksiyonlar bazen çok kompleks olabilir. Bu enzimler karbon-karbon bağlarını parçalar veya alkolleri aldehidlere oksitleyebilir (69).

### Sitokrom P450 sistemi: steroid hormonların sentezi ve eikosanoidlerin oksijenasyonu

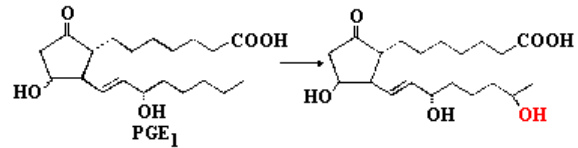


Şekil 9. Mitokondriyal CYP450 sisteminin bileşenleri. CYP450, iç mitokondri membranına entegre bir proteindir. NADPH-adrenodoksin redüktaz ve adrenodoksin (ADR) ise periferik yerleşmiş proteinlerdir ve membrana gömülü değildirler.

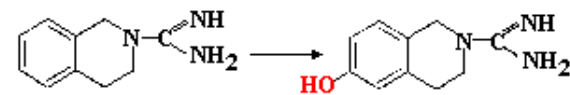
Sitokrom P450, böbrek üstü bezlerinde ve gonadlarda kolesterolden steroid hormonların sentezini katalize eder. Kolesterolden steroid hormonların sentezlenebilmesi için hem mikrozomal hem de mitokondriyal sitokrom P450 enzimleri gerekir (70). CYP450 sistemi enzimleri ile böbrek üstü bezlerinde kolesterolden aldosteron ve kortizol, testislerde testosteron, overlerde estradiol sentezlenmektedir. CYP450 enzimleri, böbrek üstü bezlerinden aldosteron ve kortizol sentezine katılır. Bunlardan başka CYP450 aracılığıyla küçük miktarda androjen ve androstenedion da sentezletilmektedir. Androstenedion, östrojen ve testosteron prekürsörüdür ve sekonder seks özelliklerini düzenlemektedir. Şekil 12'de bu yollar özetlenmektedir.

Böbrek üstü mitokondrilerinde, bir yan zincir ayıran CYP450 (P450<sub>scc</sub>)'nin katıldığı kompleks bir reaksiyon sonunda kolesterol pregnenolon'a çevirmektedir. CYP450 ile katalizlenen reaksiyonlar sonucu izokaproik aldehidin ayrılması sırasında C-22 ve C-20 atomlarında ardışık hidroksilasyonlarla 22-hidroksikolesterol ve daha

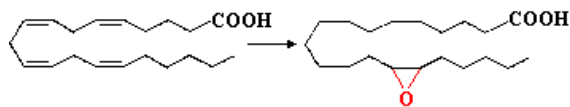
#### Alifatik hidroksilasyon



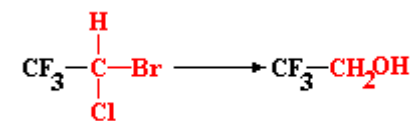
#### Aromatik hidroksilasyon



#### Epoksidasyon



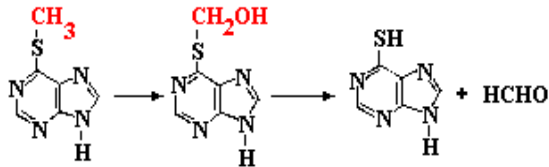
#### Dehalojenasyon



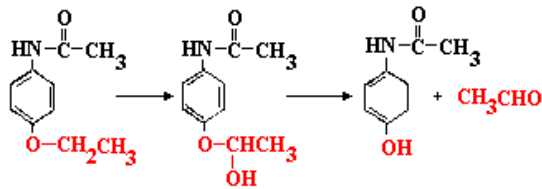
Şekil 10. Sitokrom P450 enzimleri tarafından karbon atomlarının oksitlenmesi

sonra 20,22-dihidroksikolesterol meydana gelmektedir (Şekil 13). P450 enzimlerinin katalizlediği başka bir reaksiyonda 20 ve 22 nolu karbonlar arasındaki bağ parçalanarak pregnenolon sentezlenmektedir. Bu reaksiyon bir tek CYP450

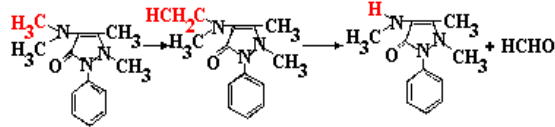
#### Sülfür atomunda dealkilasyon



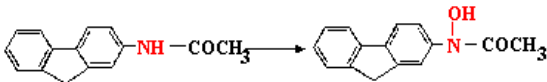
#### Oksijen atomunda dealkilasyon



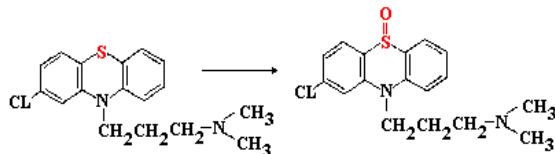
#### Azot atomunda dealkilasyon



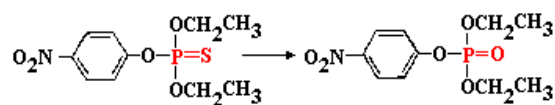
#### Hidrojen atomunda dealkilasyon



#### Sülfür atomunda oksidasyon



#### Fosfor atomunda oksidasyon



Şekil 11. Sitokrom P450 enzimleri tarafından katalizlenen diğer reaksiyonlar

enzimi ile katalizlenir. Bu sırada 3NADPH ve 3O<sub>2</sub>

molekülleri gerekir ve sonuçta karbon-karbon bağı parçalanır. Pregnenolon, mitokondrilerde üretildikten sonra sitoplazmaya geçer ve burada 3β-hidroksisteroid dehidrojenaz/ $\Delta^{4-5}$ -izomeraz tarafından okside edilerek progesterona dönüşmektedir. Progesterondaki 21 nolu karbon atomu, endoplazmik retikulum CYP450 enzimleri (21-hidroksilaz) tarafından hidroksillenerek 11-deoksikortikosteron (DOC) oluşmaktadır. DOC, tekrar mitokondriye geçer. Burada 11β-hidroksilaz ve 18-hidroksilaz aktivitesi olan başka bir mitokondriyal CYP450 enzimi ile hidroksillenir ve mineralokortikoidler, bu şekilde böbrek üstü bezi *zona glomerulosa*'da oluşur (70,71).

Kortizol sentezi ya pregnenolon veya progesteron üzerinden gerçekleşir ve bu reaksiyonlar, endoplazmik retikulum sitokrom P450 enzimlerinden sitokrom P450 17α-hidroksilaz (P450<sub>17α</sub>) tarafından katalize edilir. Sitokrom P450 21-hidroksilaz (P450<sub>21</sub>) tarafından 17α-hidroksiprogesterona hidroksil grubu eklenerek 11-deoksikortizol üretilir, mitokondri içine taşınır ve burada 11β-hidroksilaz ile hidroksillenerek kortizol oluşur. Bu reaksiyon primer olarak *zona fasciculata*'da meydana gelir. Sitokrom P450<sub>21</sub> eksikliğinde konjenital adrenal hiperplazi adı altında toplanan bazı klinik hastalıklar ortaya çıkar (70,71).

C-17'deki asetil gruplarının ayrılması ile 17α-hidroksiprogesteronun sentezlenmesi veya 17α-hidroksiprogesterondan C19 steroidlerinin sentezlenmesi sırasında P450 17,20 lyase enzimi



Şekil 12. Böbrek üstü bezinde steroid hormon sentezi. Sitokrom P450 tarafından katalizlenen reaksiyonlar gösterilmiştir.

kullanılır. Bu enzim ile C17 atomunu hidroksilleyen sitokrom P450'nin aynı enzim olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle, C17 ve C20 arasındaki karbon-karbon bağının parçalanması ile asetil grubunun kaybedilmesi de CYP450 molekülleri tarafından katalizlenir. Bu sitokrom P450'lerin, 17-OH ürünleri oluşturmak için sadece bir tek hidroksilasyon etabını uygulayıp uygulamadıkları veya 17,20 karbon-karbon bağının parçalanmasını sağlayıp sağlamadıkları bilinmemektedir. Reaksiyon sonunda 17 $\alpha$ -hidroksipregnenolondan dehidroepiandrosteron (DHEA) veya 17 $\alpha$ -hidroksiprogesterondan androstenedion oluşur. DHEA, testosteron prokürsörü ve güçlü androjen özellikleri olan bir steroiddir. DHEA, 3-OH grubunun dehidrojenasyonu ile metabolize edilebilir (70,71).

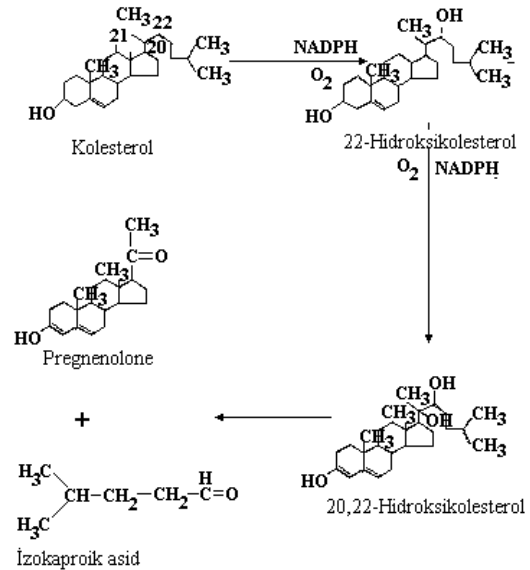
Fizyolojik bakımdan önemli ve sitokrom P450 ile katalizlenen diğer bir reaksiyon androjenlerden östrojenlerin sentezlenmesidir. Bu reaksiyonlara topluca aromatzasyon adı verilir. Çünkü ürüne aromatik halka katılmaktadır (70-72).

Aromatzasyon kompleks bir olaydır. Çünkü aromatik halkanın oluşabilmesi ve C19'dan metil grubunun ayrılabilmesi için 3 NADPH molekülü ve 3 oksijen molekülü gerekir. Şekil 14'de aromatzasyon reaksiyonlarının ana hatları gösterilmiştir. İki sitokrom P450 enzimi ile gerçekleşen hidroksilasyon reaksiyonunda, C19 metil grubu aldehid grubuna eklenmektedir. Bu sitokrom P450 enzimi tarafından katalizlenen son enzimatik reaksiyon, sikloheksanon halkasındaki C2 atomunun hidroksillenmesidir. Oluşan yapı dayanıksızdır. Bu nedenle nonenzimatik olarak C19 karbon atomunun kaybedilmesi ile östrojen molekülünün aromatik halkasına dönüşür. Bu sırada ortaya çıkan her üç reaksiyon basamağında da aynı sitokrom P450 ile katalizlenir ve bunlara aromatz adı verilmektedir (73).

Diğer sitokrom P450'ler vitamin D<sub>3</sub>'ü metabolize ederek aktif vitamin formu olan 1,25-dihidroksi vitamin D<sub>3</sub> haline çevirirler, kemotaktik ajanlardan leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)'ü metabolize ederek 20-OH-LTB<sub>4</sub> oluşturular, araşidonik asiti metabolize ederek önemli regülatör fonksiyonları olan epoksidleri, hidroksi ve dihidroksi araşidonik asit formlarını oluştururlar (73-75).

## KLİNİKTE SİTOKROM P450 21-HİDROKSİLİZ EKSİKLİĞİ

Fetal ve adult hayat sırasında steroid hormonların üretildiği major yer böbrek üstü bezinin korteksidir. Böbrek üstü korteks bölgesi fetal hayatta erişkin hayata göre daha aktif biyosentez yeridir. Fetal hayatta günde 100-200 mg steroid üretilirken stressiz bir erişkin böbrek üstünde günde ancak 20-30 mg steroid üretilmektedir. Steroid hormonların sentezlenebilmesi için sayısız enzim gerekir. Kortizol üretimi sırasında meydana gelen hemen hemen her basamakla ilgili bir enzim eksikliği bildirilmektedir. Yetersiz kortizol üretimi ile ilgili hastalıklara konjenital adrenal hiperplazi (KAH) adı verilir. KAH'in, klasik ve non-klasik olmak üzere iki tipi vardır. 21-hidroksilaz eksikliği klinik belirtileri, özellikle kız çocuklarında doğumda tanınabilir. Aşırı üretilen C19 androjenik steroidler nedeniyle genital organların belirgin, düzensiz ve erken gelişmesine neden olur. Erkek yenidoğanlarda, 21-hidroksilaz eksikliği farkedilemeyebilir. Erkek genital organları normal görünümündedir ancak erken maskulinizasyon ve fizik gelişme olur. Dolaşımında 17 $\alpha$ -hidroksiprogesteron yüksek seviyededir. Klasik KAH Alaskalı Eskimolarda çok yüksek (her 490 doğumda 1),



Şekil 13. Kolesterolde yan zincir kırma reaksiyonu. Sitokrom P450 tarafından üç ardışık reaksiyon katalize edilerek pregnenolon ve izokaproik aldehid üretilir.

Amerikadaki heterojen popülasyonda daha düşük (67.000 doğumda 1)'tür. Non-klasik KAH vakalarında, bu hastaların prenatal dönemde aşırı androjene maruz kaldıklarına dair bir bulgu bulunmaz. Klinik semptomlar: pubik kılların erken çıkması, epifizdeki büyüme bölgelerinin erken füzyonu sonucu büyümenin erken durması, ve kadınlarda erkek tipi saç kaybı görülür. Dolaşımdaki  $17\alpha$ -hidroksiprogesteron seviyesi yüksektir, fakat klasik KAH'dekinden daha düşüktür. Non-klasik KAH daha sık görülür ve farklı etnik gruplarda insidansı farklılık gösterir (76,77).

Kolesterolden kortizolün oluşabilmesi için Şekil 12'de gösterilen 5 enzimatik basamak gerekir. Her basamakla ilgili enzim eksikliklerine rastlanmakta ve otozomal resesif olarak kalıtımla geçmektedir. C21 hidroksilasyonuna katılan enzim eksikliklerine daha sık rastlanır. KAH'li vakaların yaklaşık %90'ı defektif 21-hidroksilaz geni ile ilgilidir.  $17\alpha$ -hidroksiprogesteron 11-deoksikortizole metabolize edilememesi ve kortizol sentezinin kesintiye uğraması, hipofiz tarafından salgılanan ve böbrek üstü bezlerinde kortizol üretimini kontrol eden ACTH hormon salgılanmasında artmaya neden olur. ACTH hormonu yüksek seviyede uzun süre dolaşımda bulunursa adrenal hiperplaziye neden olur ve sentezlenmesi için 21 hidroksilaz aktivitesi gerekmeyen androjenik steroidlerin sentezi artar. 21-hidroksilaz enzimi eksikliğinde hastaların idrarında; 17-ketosteroidler, DHEA, androstenedione ve  $17\alpha$ -hidroksiprogesteronun temel metabolik ürünü olan pregnanetriol seviyeleri artmaktadır. Aşırı üretilen androjenik C19 steroidlerine bağlı olarak kadınlarda virilizasyon ve erkeklerde, puberteden önce, erken gonadal gelişme veya aldosteron sentezi azalmasına bağlı olarak tuz dengesinde bozulmalar meydana gelir (76,77).

## GEBELİK SIRASINDA STEROİD HORMON ÜRETİMİ

Gebelik sırasında steroid hormon sentezi dramatik olarak armakta ve termdeki bir gebe kadın, günde, 15-20 mg estradiol, 50-100 mg estriol ve yaklaşık 250 mg progesteron üretmektedir. Gebelik sırasında sentezlenen östrojen miktarı gebe olmayan kadınlara göre çok fazladır. Gebeliğin son dönemindeki bir kadın, premenapoz dönemindeki bir kadına göre günde 1000 kat daha fazla östrojen üretmektedir.

Gebe kadınlarda progesteron ve östrojen üretimi gebe olmayanlardan kesin olarak farklıdır. Gebeliğin ilk birkaç haftasında, östrojen üreten en önemli yer overdeki korpus luteum'dur, ancak gebeliğin dördüncü haftasından sonra plasenta da progesteron ve östrojen sentezleyip sekresyona başlamaktadır. Gebeliğin 8.nci haftasından sonra; plasenta, progesteron, C<sub>21</sub>-steroidleri ve bazı C<sub>18</sub>-östrojen steroidlerinin üretildiği major yer olarak yerini almaktadır. Plasenta ve overlerdeki steroidleri hidroksile eden sistemler arasındaki ilginç bir fark, insan plasentasında  $17\alpha$ -hidroksilasyon reaksiyonunu katalize eden ve 17,20 karbon-karbon bağına parçalayan sitokrom P450 enzimlerinin olmamasıdır. Bu nedenle, kolesterolden östrojen sentezi tek başına plasenta tarafından yapılamamaktadır. Plasenta, kolesterolden pregnenolone oluşturmak için yan zincir kırma reaksiyonunu katalize edebilmekte ve pregnenolonu progesterona oksitleyebilmekte ve bu hormonu maternal dolaşıma vermektedir. Plasenta, progesterondan DHEA veya androstenedione sentezleyemiyorsa östrojenleri nasıl üretmektedir?. Östrojen sentezinin fetal adrenal bezde gerçekleştirildiği, total fetal ağırlığının erişkin hayattaki ağırlığına göre önemli bir artış göstermesi ile anlaşılmıştır. Fetal adrenal bez kolesterolden DHEA sentezlenmesini katalize eder ve fetal dolaşıma bu hormonu salgılar. Üretilen büyük miktardaki fetal DHEA, fetal karaciğer tarafından metabolize edilerek  $16\alpha$ -OH-DHEA sentezlenir ve bu ürün plasentada östrojen ve estriole aromatize edilmektedir. Fetal adrenaller tarafından üretilen ve karaciğerde  $16\alpha$ -OH-DHEA'a hidroksillenemeyen DHEA da plasentada aromatize edilerek estradiol- $17\beta$  oluşmaktadır. Fetal ve maternal organ sistemlerinde sitokrom P450 enzimleri aracılığıyla hidroksile eden sistemlerin işbirliği içinde çalışmasının mükemmel bir örneğidir. Bu kooperatif iş birliği neticesinde fetusun uterus içinde geliştiği sürelerde sürekli olarak östrojenler üretilebilmektedir (78).

## Sitokrom P450 ile ekzojen lipofilik substratların oksitlenmesi

Ekzojen substratlar terimi, genellikle yaşamı tehdit eden ksenobiyotik veya kimyasal karsinojen adı verilen maddeler için kullanılmaktadır. Bu terim içinde terapötik ve nonterapötik amaçla kullanılan

ilaçlar, iş yerinde kullanılan kimyasal maddeler, çevre kirlenmesine neden olan sanayi artıkları ve besin katkı maddeleri bulunur. Sitokrom P450 enzimleri, özellikle lipofilik siklik bileşikler olmak üzere çeşitli kimyasal karsinojenleri okside edebilmektedir. Bu bileşiklere bir OH grubunun eklenmesi ile daha polar özellik kazanmakta ve hücre içi sıvıda daha kolay çözünebilen maddeler oluşmaktadır. Bir çok ekzojen bileşik, oldukça lipofilik özellikte olup hücre içinde birikerek zamanla hücre fonksiyonlarını olumsuz olarak etkilemektedir. CYP450 enzimleri tarafından oksitlenen ksenobiotikler Tablo 3’de özetlenmiş ve Şekil 10 ve 11’de gösterilmiştir. Birçok durumda kimyasal maddeler, CYP450 enzimleri ile oksitlenince idrar veya safra yoluyla daha kolay atılabilmekte ve bu nedenle farmakolojik aktivitesi veya toksik özellikleri azalmaktadır. Çeşitli konjugasyon yapan enzim sistemlerinin etkisi ile modifiye edilen veya modifiye edilemeyen kimyasal maddeler ya daha az toksik bileşiklere çevrilmekte veya daha kolay vücuttan atılabilir hale dönüştürülmektedir (53). Metabolize edilen kimyasal maddelerden bazıları Tablo 4’de gösterilmiştir. Bu reaksiyonların çoğu primer olarak karaciğerde meydana gelmektedir (53).

Son yıllarda ilgi duyulan bir ksenobiotik, benzo [ $\alpha$ ] pirendir. Bu kimyasal madde; yanmış kömürde, tütünde bulunan bitkisel maddelerin yanması (veya oksidlenmesi) sonucu oluşan ürünlerde, kömürde barbekü şeklinde pişirilmiş yiyeceklerde ve sanayi atıklarında bulunmaktadır. Benzo[ $\alpha$ ]piren, aril hidrokarbon reseptörlerine bağlanmakta ve sitokrom P450 sistemini indüklemektedir. Bu nedenle kendi metabolizmasını hızlandırmaktadır. Molekülde bulunan bazı yerler, farklı sitokrom P450 formları ile hidrosillenebilmektedir. Hayvanlar ve mutajen bakterilerde, benzo[ $\alpha$ ]pirenin karsinojen bir ürüne metabolize olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu

**Tablo 3.** Sitokrom P450 enzimlerinin metabolize ettiği kimyasal karsinojenler

Reaksiyon	Örnekler
Alifatik hidroksilasyon	Valproik asid, pentobarbital
Aromatik hidroksilasyon	Debrisoquine, asetanilide
Epoksidasyon	Benzen, benzo [ $\alpha$ ] piren
Dealkilasyon	Aminopirin, fenasetin, 6-metiltiopurin
Oksidatif deaminasyon	Amfetamin
N veya S oksidasyonu	2-asetilaminofloren, klorpromazin
Dehalojenasyon	Halothan
Alkol oksidasyonu	Etanol

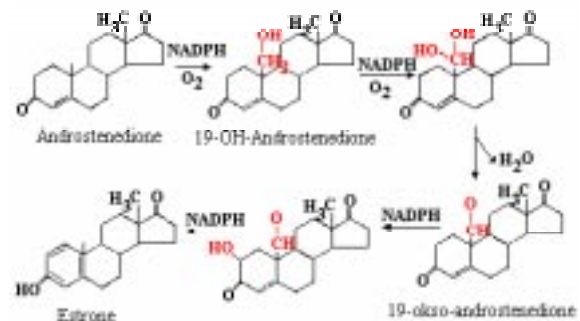
reaksiyonlara katılan enzimlerin tespit edilmesi gereklidir. Karsinojen özellikleri olan ürün, benzo[ $\alpha$ ]piren-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksittir. Bu karsinojenin oluşumu Şekil 15’de gösterilmiştir. İlk reaksiyon, sitokrom P450 sistemi aracılığıyla gelişen 7,8 pozisyonu epoksidasyonudur. Epoksid hidrolaz enzimi benzo[ $\alpha$ ]piren-7,8-dihidrodiol bileşiğini hidrolize eder. Hidrosillenen bileşik daha sonra başka bir epoksidasyon reaksiyonuna uğrar ve benzo[ $\alpha$ ]piren-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksid meydana gelir. Benzo[ $\alpha$ ]piren, zayıf bir karsinojendir. Karsinojen özellik kazanabilmesi için, diğer birçok karsinojen maddede olduğu gibi, metabolik aktivasyon gerekir (60,79).

**Tablo 4.** Ksenobiyotikleri metabolize eden enzimler

Reaksiyon tipi	Enzimler	Substratları
Oksidasyon	Sitokrom P450	Toluen
	Alkol dehidrojenaz	Etil alkol
	Flavinli monooksijenaz	Dimetilanid
Redüksiyon	Keton redüktaz	Metirapon
	Epoksid hidrolaz	Benzo[ $\alpha$ ]piren-7,8-epoksid
Hidrolyz		Prokain
	Konjugasyon	Esteraz
	UDP GT*	$\beta$ -naftol
	Sulfotransferaz	Sulfanilamid
	N-asetiltransferaz	Tiourasil
	Metiltransferaz	Asetaminofen
	Glutasyon transferaz	

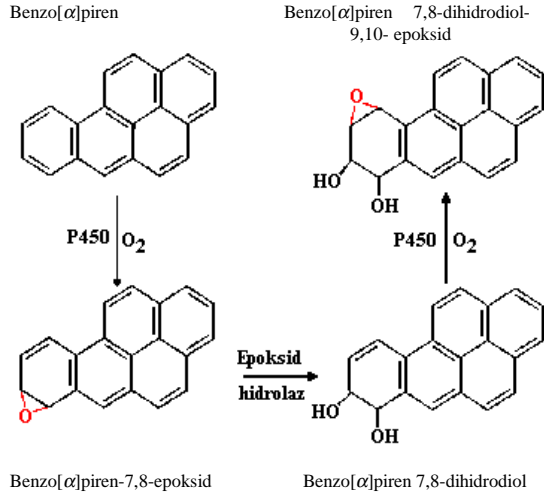
\* : Uridil difosfat glukuronil transferaz

Sitokrom P450 sistemi sayısız durumlarda karsinojen maddelerin oluşumuna neden olur. SP450 sistemi tarafından toksik bileşikler üretilebilir, ancak bu olay hücre hasarına veya kansere neden olmayabilir. Çünkü bu toksik maddelerin hücre hasarı veya kansere neden olup olmayacağını tayin eden birçok faktör vardır. Bu



**Şekil 14.** Androjenlerin östrojenlere aromatize edilmesini sağlayan reaksiyonlar.





Şekil 15. Benzo[α]piren metabolizmasına katılan sitokrom P450 ve epoksid hidrolaz tarafından benzo[α]piren 7,8-dihidrodiol-9,10-epoksid oluşması.

faktörler; detoksifikasyon yapan enzim sistemleri, immün sistemin durumu, nütrisyonel durum, genetik predispozisyon ve çevresel faktörlerdir. Vücutta yüksek aktiviteli toksik bileşikler üreten bir enzim sisteminin neden mevcut olduğu sorulabilir. Yukarıda açıklandığı gibi, sitokrom P450 sisteminin temel amacı, toksik moleküllere fonksiyonel gruplar ekleyerek molekülü daha polar ve/veya diğer detoksifikasyon yapan sistemlerin etkisine daha duyarlı olmasını sağlamaktır.

Sonuç olarak CYP450 sistemi, insanlarda, hem hastalık hem de sağlık durumunda önemli roller oynamaktadır. Farklı CYP450 enzimleri, esansiyel steroid hormonların oluşumundan, terapötik ilaçların kan seviyesinin düzenlenmesinden, lipofilik özellikleri nedeniyle vücutta birikmeye meyilli istenmeyen kimyasal maddelerin vücuttan atılmasından başka hücre veya genetik materyalde hasarlara neden olan potansiyel toksik özelliği olan metabolitler oluşturarak tümör oluşumundan sorumludur.

## REFERANSLAR

1. NC-IUB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (1991) Nomenclature of electron-transfer proteins. Recommendations. Eur J Biochem. 1989;200:599-611.
2. Ortiz de Monteliano PR. (ed.). Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry. New York: Plenum, 505-23.
3. Hanukoglu I. Electron transfer proteins of cytochrome P450 systems. Adv Mol Cell Biol 1995; in press.
4. Truan G, Cullin C, Reisdorf P, et al. Enhanced *in vivo* monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b5. Gene 1993;125: 49-55.
5. Smith GC, Tew DG, Wolf CR. Dissection of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase into distinct functional domains. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91: 8710-4.
6. Serizawa N, Matsuoka T. A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyzes hydroxylation of ML-236B to pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Biochim Biophys Acta 1991;1084, 35-40.
7. Narhi LO, Fulco AJ. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. J Biol Chem 1986;261:7160-9.
8. Ruettinger RT, Wen LP, Fulco AJ. Coding nucleotide, 5' regulatory, and deduced amino acid sequences of P-450BM-3, a single peptide cytochrome P-450:NADPH-P-450 reductase from *Bacillus megaterium*. J Biol Chem 1989;264, 10987-95.
9. White KA, Marletta MA. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. Biochemistry 1992;31: 6627-31.
10. Chen Y, Rosazza JPN. A bacterial nitric oxide synthase from a *Nocardia* species. Biochem Biophys Res Commun 1994; 203: 1251-8.
11. Nakayama N, Shoun H. Fatty acid hydroxylase of the fungus *Fusarium oxysporum* is possibly a fused protein of cytochrome P-450 and its reductase. Biochem Biophys Res Commun 1994; 202: 586-90.
12. Degtyarenko KN. Structural domains of P450-containing monooxygenase systems Protein Engineering. 1995; 8(8): 737-47.
13. Djordjevic S, Roberts DL, Wang M. Crystallization and preliminary x-ray studies of NADPH-cytochrome P450 reductase. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(8): 3214-8.
14. Mason JR, Cammack R. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. Annu Rev Microbiol 1992;46: 277-305.
15. Ostrowski J, Barber MJ, Rueger DC, et al. Characterization of the flavoprotein moieties of NADPH-sulfite reductase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Physicochemical and catalytic properties, amino acid sequence deduced from DNA sequence of *cysJ*, and comparison with NADPH-cytochrome P-450 reductase. J Biol Chem 1989;264: 15796-808.
16. Campbell WH, Kinghorn JR. Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. Trends Biochem Sci 1990;15:315-9.
17. Zhu H, Riggs AF. Yeast flavohemoglobin is an ancient protein related to globins and a reductase family. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89: 5015-9.

18. Segal AW, West I, Wientjes F, et al. Cytochrome *b*-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J* 1992;284: 781-8.
19. Correll CC, Batie CJ, Ballou DP, et al. Phthalate dioxygenase reductase: a modular structure for electron transfer from pyridine nucleotides to [2Fe-2S]. *Science* 1992;258: 1604-10.
20. Correll CC, Ludwig ML, Bruns CM, et al. Structural prototypes for an extended family of flavoprotein reductases: comparison of phthalate dioxygenase reductase with ferredoxin reductase and ferredoxin. *Protein Science* 1993;2: 2112-33.
21. Karplus PA, Daniels MJ, Herriott JR. Atomic structure of ferredoxin-NADP+ reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science* 1991;251: 60-6.
22. Kuriyan J, Krishna TSR, Wong L, et al. Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. *Nature* 1991;352: 172-4.
23. Schulz GE. Gene duplication in glutathione reductase. *J Mol Biol* 1980;138: 335-47.
24. Hanukoglu I, Gutfinger T. cDNA sequence of adrenodoxin reductase. Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases. *Eur J Biochem* 1989;180: 479-84.
25. O'Keefe DP, Gibson KJ, Emptage MH, et al. Ferredoxins from two sulfonyleurea herbicide monooxygenase systems in *Streptomyces griseolus*. *Biochemistry* 1991;30: 447-55.
26. Harayama S, Polissi A, Rekić M. Divergent evolution of chloroplast-type ferredoxins. *FEBS Lett* 1991;285: 85-8.
27. Wakabayashi S, Kimura T, Fukuyama K, et al. The amino acid sequence of a flavodoxin from the eukaryotic red alga *Chondrus crispus*. *Biochem J* 1989;263: 981-4.
28. Melik-Adamyanyan WR, Barynin VV, Vagin AA, et al. Comparison of beef liver and *Penicillium vitale* catalases. *J Mol Biol* 1986;188: 63-72.
29. Chikuba K, Yubisui T, Shirabe K, et al. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA of the human erythrocyte NADPH-flavin reductase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:1170-6.
30. Volbeda A, Charon MH, Piras C, et al. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 1995;373: 580-7.
31. Rao ST, Shaffie F, Yu C, et al. Structure of the oxidized long-chain flavodoxin from *Anabaena* 7120 at 2 Å resolution. *Protein Science* 1992;1: 1413-27.
32. Fukuyama K, Wakabayashi S, Matsubara H, et al. Tertiary structure of oxidized flavodoxin from an eukaryotic red alga *Chondrus crispus* at 2.35-Å resolution. Localization of charged residues and implication for interaction with electron transfer partners. *J Biol Chem* 1990; 265:15804-12.
33. Lederer F, Ghirir R, Guiard B, et al. Two homologous cytochromes *b5* in a single cell. *Eur J Biochem* 1983;132: 95-102.
34. Abe K, Kimura S, Kizawa R, et al. Amino acid sequences of cytochrome *b5* from human, porcine, and bovine erythrocytes and comparison with liver microsomal cytochrome *b5*. *J Biochem* 1985;97: 1659-68.
35. Giordano SJ, Steggle AW. Differential expression of the mRNAs for the soluble and membrane-bound forms of rabbit cytochrome *b5*. *Biochim Biophys Acta* 1993;1172: 95-100.
36. Runnegar B. Derivation of the globins from type *b* cytochromes. *J Mol Evol* 1984;21: 33-41.
37. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 1993;12: 1-51.
38. Cohen MB, Feyereisen R. A cluster of cytochrome P450 genes of the *CYP6* family in the house fly. *DNA Cell Biol* 1995;14: 73-82.
39. Nebert DW, Jones JE, Owens J, et al. Evolution of the P450 superfamily. In: King TE, Mason HS, Morrison M. (eds.). *Oxidases and related redox systems*. Liss, New York, 1988: 557-76.
40. Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ. High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J Mol Biol* 1987;195: 687-700.
41. Bailey S, Smith K, Fairlamb AH, et al. Substrate interactions between trypanothione reductase and N1-glutathionylspermidine disulphide at 0.28-nm resolution. *Eur J Biochem* 1993;213: 67-75.
42. Pochapsky TC, Ye XM, Ratnaswamy G, et al. An NMR-derived model for the solution structure of oxidized putidaredoxin, a 2-Fe, 2-S ferredoxin from *Pseudomonas*. *Biochemistry* 1994;33: 6424-32.
43. Stout CD. Iron-sulfur protein crystallography. In: Spiro TG. (ed.), *Iron-sulfur proteins*. John Wiley & Sons, New York 1982:97-146.
44. Nakahara K, Tanimoto T, Hatano KI, et al. Cytochrome P-450 55A1 (P-450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor. *J Biol Chem* 1993;268: 8350-5.
45. Shiro Y, Fujii M, Iizuka T, et al. Spectroscopic and kinetic studies on reaction of cytochrome P450nor with nitric oxide. Implication for its nitric oxide reduction mechanism. *J Biol Chem* 1995;270: 1617-23.
46. Saraste M, Castresana J. Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes. *FEBS Lett* 1994;341:1-4.
47. Degtyarenko KN, Archakov AI. Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS Lett* 1993: 332; 1-8.
48. Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994;31:131-43.
49. Frey M, Kliem R, Saedler H, et al. Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. *Mol Gen Genet* 1995;246(1):100-9.
50. Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF. The placental hormones. *Williams Obstetrics*. Connecticut: Appleton and Lange, 18th ed, 1989; 67.
51. Yamamoto Y, Masuda M, Kazusaka A, et al. Purification and characterization of a form of cytochrome P450 from bear liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 1995; 49(7): 965-70.

52. Stromstedt M, Waterman MR. A full-length cDNA encoding mouse adrenodoxin. *Biochim Biophys Acta* 1995;1261(Supl 1):126-8.
53. Benet LZ, Kroetz DL, Sheiner LB: Biotransformation of drugs, in Hardman JG, Limbird LL, Molinoff PB, et al (eds): Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9<sup>th</sup> ed. New York, McGraw-Hill, 1996: 3-28.
54. Zima T. Ethanol metabolism and pathobiochemistry of organ damage--1992. I. Metabolism of ethanol by alcohol dehydrogenase, cytochrome P450IIE1 and catalase *Sb Lek* 1993; 94(4): 281-7.
55. Ayalogu EO, Snelling J, Lewis DF, et al. Induction of hepatic CYP1A2 by the oral administration of caffeine to rats: lack of association with the Ah locus. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1272(2): 89-94.
56. Spatzenegger M, Jaeger W. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metab Rev* 1995;27:397-417.
57. Watkins PB. Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:511-26.
58. DeVane CL. Antidepressants and Cytochrome P450 Enzyme Involvement. *J Clin Psychiatry* 1994;55[12 Suppl]:38-45.
59. Ma T, Chambers JE. A kinetic analysis of hepatic microsomal activation of parathion and chlorpyrifos in control and phenobarbital-treated rats. *J Biochem Toxicol* 1995; 10(2): 63-8.
60. Gonzalez FJ. The molecular biology of cytochrome P450s, *Pharmacological Rev* 1989; 40: 243-8.
61. Spatzenegger M, Jaeger W: Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metab Rev* 1995;27:397-417.
62. Renton KW: Factors affecting drug biotransformation. *Clin Biochem* 1986;19:72-5.
63. Grange JM, Winstanley PA, Davies PD. Clinically significant drug interactions with antituberculosis agents. *Drug Saf* 1994; 11(4): 242-51.
64. Muck W, Ahr G, Kuhlmann J. Nimodipine. Potential for drug-drug interactions in the elderly. *Drugs Aging*. 1995; 6(3): 229-42.
65. Eisen HJ. Induction of hepatic P-450 isozymes. In: Ortiz de Montellano PR (ed.). *Cytochrome P-450. Structure, Mechanism, and Biochemistry*. New York: Plenum, 1986: 315.
66. Peterson JA, Prough RA. Cytochrome P-450 reductase and cytochrome *b5* in cytochrome P-450 catalysis. In: Ortiz de Montellano PR. (ed.). *Cytochrome P-450 Structure, Mechanism, and Biochemistry*. New York: Plenum, 1986: 89.
67. Narayanasami R, Horowitz PM, Masters BS. Flavin-binding and protein structural integrity studies on NADPH-cytochrome P450 reductase are consistent with the presence of distinct domains. *Arch Biochem Biophys*. 1995;316(1): 267-74.
68. Lehnerer M, Schulze J, Petzold A, et al. Rabbit liver cytochrome P-450 2B5: high-level expression of the full-length protein in *Escherichia coli*, purification, and catalytic activity. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1245(1): 107-15.
69. Lindros KO, Badger T, Ronis M, et al. Phenethyl isothiocyanate, a new dietary liver aldehyde dehydrogenase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275(1): 79-83.
70. Papadopoulos V, Brown AS. Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;53(1-6):103-10.
71. Omura T, Morohashi KTL. Gene regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53(1-6): 19-25.
72. Takemori S, Kominami S. The role of cytochromes P-450 in adrenal steroidogenesis. *Trends Biochem Sci* 1984;9:393.
73. Toda K, Akira S, Kishimoto T, et al. Identification of a transcriptional regulatory factor for human aromatase cytochrome P450 gene expression as nuclear factor interleukin-6 (NF-IL6), a member of the CCAAT/enhancer-binding protein family. *Eur J Biochem* 1995; 231(2): 292-9.
74. Dilworth FJ, Scott I, Green A, et al. Different mechanisms of hydroxylation site selection by liver and kidney cytochrome P450 species (CYP27 and CYP24) involved in vitamin D metabolism. *J Biol Chem* 1995; 270(28):16766-74.
75. Akeno N, Saikatsu S, Kimura S, et al. Induction of vitamin D 24-hydroxylase messenger RNA and activity by 22-oxacalcitriol in mouse kidney and duodenum. Possible role in decrease of plasma 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochem Pharmacol* 1994; 48(11): 2081-90.
76. New MI. Steroid 21-hydroxylase deficiency (congenital adrenal hyperplasia). *Am J Med* 1995; 98(1A): 2S-8S.
77. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 1989:1881.
78. Simpson ER, MacDonald PC. Endocrine physiology of the placenta. *Ann Rev. Physiol* 1981; 43:163.
79. Quan T, Reiners JJ-Jr, Culp SJ, et al. Differential mutagenicity and cytotoxicity of (+/-)-benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol and (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide in genetically engineered human fibroblasts. *Mol Carcinog* 1995; 12(2): 91-102.

**Yazışma adresi:** Dr. Elif ÖZEROL  
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya ABD  
44100 MALATYA