

**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ IX İZOENZİMİNİN
KLONLANMASI, ÜRETİLMESİ, ANTİTÜMÖR İLAÇLARIN
VE BAZI KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Emrah YERLİKAYA

**Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU
Yrd. Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK
2012**

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ IX İZOENZİMİNİN KLONLANMASI,
ÜRETİLMESİ, ANTİTÜMÖR İLAÇLARIN VE BAZI KİMYASALLARIN
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Emrah YERLİKAYA

KİMYA ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2012**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ IX İZOENZİMİNİN KLONLANMASI,
ÜRETİLMESİ, ANTİTÜMÖR İLAÇLARIN VE BAZI KİMYASALLARIN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof.Dr.Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU danışmanlığında-Yrd.Doç.Dr.Murat ŞENTÜRK ortak danışmanlığında, Emrah YERLİKAYA tarafından hazırlanan bu çalışma 01/11/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu** (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Münir OKTAY

İmza :

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ercan BURSAL

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: BAP 2011/95

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ IX İZOENZİMİNİN KLONLANMASI, ÜRETİLMESİ, ANTİTÜMÖR İLAÇLARIN VE BAZI KİMYASALLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Emrah YERLİKAYA

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

Ortak Danışman: Yrd. Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

Bu çalışmada CA IX izoenzimi, insan pankreas dokusundan rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak *Escherichia coli* (BL21DE3) hücresinde üretildi. hCA IX izoenzimi Nikel-nitrilotriasetik asit afinite kromatografisi kullanılarak 290378 EUxmg⁻¹ spesifik aktiviteyle; %85,96 verimle; 20,4 saflaştırma katsayısıyla saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflığını kontrol etmek ve molekül kütesini tespit etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve tek bant elde edildi. hCA IX izoenziminin molekül kütlesi 50,47 kDa olarak belirlendi. Ayrıca saflaştırılan hCA IX izoenziminin karakterizasyonu yapılarak enzimin optimum iyonik şiddet, optimum pH, optimum sıcaklık, stabil pH, K_m , V_{max} ve k_{cat} değerleri belirlendi. 25 adet antitümör ilacın ve 6 adet ağır metalin enzim aktivitesi üzerine etkisi esteraz aktivitesi metodu kullanılarak *in vitro* şartlarda araştırıldı. İnhibitör etkisi gösteren ilaç ve metallerin IC₅₀ değerleri hesaplandı. Enzimi inhibe eden antitümör ilaçlar için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri ile inhibisyon tipleri belirlendi.

2012, 137 sayfa

Anahtar Kelimeler: Karbonik anhidraz IX, izoenzim, kanser, klonlama, ekspresyon

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

GENERATION, CLONING OF HUMAN CARBONIC ANHYDRASE IX ISOENZYME AND INVESTIGATION OF SOME CHEMICALS' AND DRUGS' ANTI-TUMOUR EFFECTS ON THE ENZYME ACTIVITY

Emrah YERLİKAYA

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

CoSupervisor: Asist. Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

In this study, CA IX isoenzyme was produced from human pancreatic tissue by using recombinant DNA technology in *Escherichia coli* (BL21DE3) cell. hCA IX was purified with 290378 EU x mg⁻¹ of specific activity, 85.96% of purification yield and 20.4 of purification folds by using Nickel-nitrilotriacetic acid affinity chromatography. To check the purity and determine the molecular mass of the purified enzyme SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed and a single band was observed. Molecular mass of hCA IX isoenzyme was determined as 50.47 kDa. In addition, for characterization of purified hCA IX isoenzyme optimum ionic strength, optimum pH, optimum temperature, stable pH, K_m , V_{max} and k_{cat} values were determined. Effects of 6 heavy metals and 25 antitumor drugs on the enzyme activity were investigated *in vitro* conditions using esterase activity. IC_{50} values of drugs and metals showing the inhibitory effect were calculated. Inhibition types and K_i values for antitumor drugs, which inhibit the enzyme were determined by plotting separately Lineweaver-Burk plots.

2012, 137 pages

Keywords: Carbonic anhydrase IX, isoenzyme, cancer, cloning, expression

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Genetik Araştırma Laboratuvarında ve Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarlarında Atatürk Üniversitesi Rektör Yardımcısı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU ve Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK yönetiminde gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmalarım boyunca benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, bilimsel düşüncüyü yaşam biçimi olarak algılamamı sağlayan danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU'na ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK'e ayrı ayrı teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımı gerçekleştirmemde bana her türlü imkanı sağlayan, çalışmalarım boyunca beni yönlendiren ve değerli fikirlerini esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bölüm Başkanı ve Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a ayrıca teşekkür ederim.

Biyokimya çalışma grubu hocalarım Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e; çalışma arkadaşlarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ, Sayın Arş. Gör. Hamid CEYLAN ve Sayın M. Mustafa İŞGÖR başta olmak üzere biyokimya araştırma laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma ve Atatürk Üniversitesi'nde 2006 yılından bu yana birlikte görev yaptığım tüm mesai arkadaşlarıma şükranlarımı sunarım.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve benden maddi-manevi desteklerini esirgemeyen babam başta olmak üzere aileme özellikle de teyzem Sebile TUNA'ya, kolon kanserinden hayatını kaybeden ve benim doktora tez konuma esin kaynağı olan anneme, varlığıyla hayatıma yeni tatlar katan kızıma ve çalışmalarımın her aşamasında

göstermiş olduğu sabır ve anlayıştan dolayı eşim Fatma YERLİKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi'nin BAP 2011/95 nolu “İnsan Karbonik Anhidraz IX İzoenziminin Klonlanması ve Koyun Karbonik Anhidraz IV İzoenziminin Saflaştırılması; Karakterizasyon ve İnhibisyon Çalışmaları” isimli Kapsamlı Bilimsel Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

Emrah YERLİKAYA

Ekim, 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar.....	1
1.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri.....	2
1.3. Karbonik Anhidraz IX (CA IX) İzoenzimi	7
1.4. CA IX'un Yapısı ve Katalitik Aktivitesi	7
1.5. CA IX'un Kanseri Biyolojisindeki Yeri.....	10
1.6. Kemoterapi ve Kanseri Tedavisi	15
1.7. Antitümör İlaçlar	16
1.7.1. Dosetaksel	16
1.7.2. Paklitaksel	17
1.7.3. İrinotekan HCl.....	18
1.7.4. Etoposid.....	19
1.7.5. Karboplatin.....	19
1.7.6. Sitarabin.....	20
1.7.7. Metotreksat.....	20
1.7.8. Cetuksimab	20
1.7.9. Rituksimab.....	21
1.7.10. Sisplatin	21
1.7.11. 5-Fluorourasil	21
1.7.12. Epirubisin HCl	21
1.7.13. Fludarabin Fosfat.....	22
1.7.14. Gempitabin HCl.....	22
1.7.15. Sitozin Arabinozid.....	22

1.7.16. İfosfamide.....	22
1.7.17. Vinblastin Sülfat.....	23
1.7.18. Doksorubisin HCl.....	23
1.7.19. Dakarbazin.....	23
1.7.20. Vinorelbin.....	24
1.7.21. Bortazomib	24
1.7.22. Mitoksantron	24
1.7.23. Okzaliptatin	24
1.8. Hipoksi	25
1.9. CA IX İnhibitörleri.....	29
1.10. Rekombinant DNA Teknolojisi.....	35
1.11. Prokaryotlarda Rekombinant Protein Ekspresyon Sistemleri	36
1.12. Çalışmanın Amacı	39
2. KAYNAK ÖZETLERİ	40
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	46
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	46
3.3. Mikrobiyolojik Metodlar	47
3.3.1. Primerlerin hazırlanması	47
3.3.2. cDNA sentezi (RT).....	48
3.3.3. Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR).....	49
3.3.4. DNA agaroz jel elektroforezi	50
3.3.5. Ligasyon	50
3.3.6. PCR ürününün vektöre (pGEM-T Easy) klonlanması, <i>E.coli</i> (JM109) hücrelerine aktarımı ve mavi-beyaz koloni seçimi.....	51
3.3.7. Elde edilen genlerin, gen diziliminin kontrol edilmesi	52
3.3.8. PCR ürününün ekspresyon vektörüne (petSUMO) klonlanması, <i>E.coli</i> (TOP10) hücrelerine aktarımı.....	52
3.3.9. Plasmid DNA izolasyonu (Miniprep).....	53
3.3.10. Kompetent hücre hazırlama.....	54
3.3.11. Transformasyon.....	54
3.3.12. Bakteri stoklarının korunması	55

3.3.13. Ekspresyon vektörüne klonlanmış olarak saflaştırılan petSUMO-hCA IX plasmidinin, <i>E.coli</i> (BL21DE3) hücrelerine aktarımı.....	55
3.3.14. Rekombinant protein ekspresyonu	55
3.3.14.a. IPTG kullanılarak hedef proteinin indüklenmesi	55
3.3.14.b. Bakterilerin yıkanması	56
3.3.14.c. Bakterilerin sıvı azot kullanılarak parçalanması ve homojenat hazırlanması	56
3.4. Biyokimyasal Metodlar	56
3.4.1. Afinite kromatografisi jelinin hazırlanması	56
3.4.1.a. Afinite kolonunun paketlenmesi.....	57
3.4.1.b. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	57
3.4.2. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü.....	58
3.4.3. Diyaliz	60
3.4.4. Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu	60
3.5. Klonlama Basamaklarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	61
3.5.1. LB besi ortamının hazırlanması	61
3.5.2. Ampisilin/IPTG/X-GAL'li LB tabaklarının hazırlanması	62
3.5.3. LB Besi ortamı için IPTG stok çözeltisinin (0,1 M) hazırlanması.....	62
3.5.4. Füzyon proteinin indüklenmesi için IPTG stok çözeltisinin (1,0 mM) hazırlanması	62
3.5.5. Antibiyotikli LB tabaklarının hazırlanması.....	62
3.5.6. 2 M Mg ⁺² stok çözeltisinin hazırlanması	63
3.5.7. SOC ortamının (100 ml) hazırlanması	63
3.5.8. X-GAL'in (2 ml) hazırlanması.....	63
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri ve Hazırlanmaları	63
3.6.1. 1xTBE tamponunun (Tris-Borik Asit-EDTA tamponu) hazırlanması.....	63
3.6.2. 1xTAE tamponunun (Tris-Asetat-EDTA tamponu) hazırlanması	64
3.6.3. %1'lik agaroz jelinin hazırlanması.....	64
3.7. Afinite Kolonunda, SDS-PAGE'de ve Kinetik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	64
3.7.1. 50 mM Tris-SO ₄ , pH=7,5–9,0 aralığında (Optimum pH çalışması için kullanılan tampon çözelti).....	64

3.7.2. 50 mM potasyum fosfat, pH= 5,0–7,5 aralığında (Optimum pH çalışması için kullanılan tampon çözelti).....	64
3.7.3. 100 mM Tris-SO ₄ , pH=7,5–9,0 aralığında (Stabil pH çalışması için kullanılan tampon çözelti).....	65
3.7.4. 0,05 M Tris-SO ₄ , pH=7,4 (Esteraz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözelti).....	65
3.7.5. %0,02'lik NaN ₃ çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti).....	65
3.7.6. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu	65
3.7.7. SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu	65
3.7.8. Sabitleştirme çözeltisi (elektroforez jelindeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti).....	66
3.7.9. Boyama çözeltisi (elektroforez jelinin boyanması için kullanılan çözelti)	66
3.7.10. Yıkama çözeltisi (elektroforez jelinin yıkanması için kullanılan çözelti).....	66
3.7.11. Coomassie brilliant blue G-250, reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti).....	66
3.7.12. 1 M Tris-HCl pH=8,8 tampon çözeltisi	66
3.7.13. 1 M Tris-HCl pH=6,8 tampon çözeltisi	67
3.7.14. %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi.....	67
3.7.15. %10'luk SDS çözeltisi.....	67
3.7.16. Standart serum albumin (BSA) çözeltisi (1 mg/ml; protein tayini için kullanılan çözelti).....	67
3.7.17. Diyaliz çözeltisi PBS, pH=7,4.....	67
3.7.18. Ayırma jelinin hazırlanması	67
3.7.19. Yığılma jelinin hazırlanması	68
3.8. Protein Tayini	68
3.8.1. Kalitatif protein tayini	68
3.8.2. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini	68
3.9. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini.....	69
3.10. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Optimum pH Bulunmasına Yönelik Çalışmalar	70

3.11. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	71
3.12. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	71
3.13. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Stabil pH Bulunmasına Yönelik Çalışmalar	71
3.14. p-Nitrofenilasetat Substratı İçin K_M , V_{max} ve k_{cat} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar	71
3.15. Klonlanmış hCA IX İzoenziminin Aktivitesi Üzerine Yapılan İnhibisyon Çalışmaları	72
3.16. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin İnhibitör Etkisi Gösteren Antitümör İlaçların K_i Sabitlerinin Bulunması.....	72
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	74
4.1. İnternet Ortamından hCA IX Gen Bölgesinin ve Protein Kodlama Bölgesinin Belirlenmesi.....	74
4.2. hCA IX Enziminin Translasyon Olan Aminoasitleri	75
4.3. hCA IX Genine Ait Primerlerin Belirlenmesi	75
4.4. İnsan Pankreas mRNA'sı Kullanılarak İnsan Pankreas cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması	76
4.5. cDNA Kütüphanesinden hCA IX Geninin PCR ile Çoğaltılması	76
4.6. PCR Ürününün pGEM-T Easy Vektörüne A-T Klonlanması ve <i>E.coli</i> (JM109) Hücrelerine Aktarımı	76
4.7. pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanan Genin DNA Diziliminin Kontrol Edilmesi	79
4.8. PCR Ürününün Ekspresyon Vektörüne (petSUMO) Klonlanması, <i>E.coli</i> (TOP10) Hücrelerine Aktarımı, Üretimi ve Plasmidin Saflaştırılması	81
4.9. Ekspresyon Vektörüne Klonlanmış Olarak Saflaştırılan petSUMO-hCA IX Plasmidinin, <i>E.coli</i> (BL21DE3) Hücrelerine Aktarımı	85
4.10. IPTG Kullanılarak İstenilen Genin Ekspresyonunun Sağlanması	87
4.11. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	91
4.12. SUMO/hCA IX Füzyon Proteinin SUMO Proteazla Kesimi	91

4.13. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Optimum pH Bulunmasına Yönelik	
Sonuçlar	93
4.13.1. Tris-SO ₄ tamponu için optimum pH çalışması.....	93
4.13.2. KH ₂ PO ₄ tamponu için optimum pH çalışması	95
4.14. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Optimum İyonik Şiddetin	
Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	96
4.15. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine	
Yönelik Sonuçlar	97
4.16. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Stabil pH Bulunmasına Yönelik	
Sonuçlar	98
4.17. p-Nitrofenilasetat Substratı İçin K _M , V _{max} ve k _{cat} Değerlerinin	
Bulunmasına Yönelik Çalışmalar	99
4.18. Bazı Antitümör İlaçlar ile Ağır Metallerin hCA IX İzoenziminin Aktivitesi	
Üzerine İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi	100
4.19. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin İnhibitör Etkisi Gösteren Antitümör	
İlaçların K _i Sabitlerinin Bulunması.....	108
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	113
KAYNAKLAR	129
ÖZGEÇMİŞ	138

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

aa	: Aminoasit
amp	: Ampisilin
bç	: Baz çifti
BSA	: “Bovine” (sığır) serum albumin
cDNA	: Komplamenter DNA
CA	: Karbonik anhidraz enzimi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleosid trifosfat
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DTT	: Ditiotreitol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
E	: Enzim
E.C.	: Enzim komisyon numarası
E.Ü.	: Enzim Ünitesi
hCA IX	: İnsan karbonik anhidraz IX izoenzimi
I	: İnhibitör
IPTG	: İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit
IC ₅₀	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
K _m	: Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
LB	: Luria-Bertani
mRNA	: “Messenger” (haberci) ribonükleik asit
M _K	: Molekül kütlesi
Ni-NTA	: Nikel-nitrilotriasetik asit
NCBI	: “National Center for Biotechnology Information”- Biyoteknoloji Bilgi Ulusal Merkezi

ORF	: “Open reading frame”- Translasyona uğrayan gen bölgesi
OD	: Optik dansite
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	: “Phosphate buffered saline” (fosfatla tamponlanmış tuz)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RT	: Revers transkriptaz
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SUMO	: “Small Ubiquitin-like Modifier”
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
TBE	: Tris-Borat-EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametietilendiamin
T _m	: Ayrılma sıcaklığı
Tris	: Trihidroksimetil aminometan
UV	: Ultraviyole
V _{max}	: Maksimum hız
λ	: Dalga boyu
X-GAL	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. CA izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonlarının şematik gösterimi.....	3
Şekil 1.2. hCA II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik olarak gösterilişi	4
Şekil 1.3. Karbonik anhidraz enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi	5
Şekil 1.4. CA IX izoenziminin domain organizasyonu	8
Şekil 1.5. Hücre membranı üzerinde tam boy CA IX dimer yapısını gösteren model ...	9
Şekil 1.6. Dosetaksel antitümör ilacının açık yapısı	17
Şekil 1.7. Paklitaksel antitümör ilacının açık yapısı	18
Şekil 1.8. İrinotekan HCl antitümör ilacının açık yapısı	18
Şekil 1.9. Etoposid antitümör ilacının açık yapısı	19
Şekil 1.10. Karbonik anhidraz IX'un normal ve kanserli hücrelerdeki dağılımı.....	26
Şekil 1.11. CA IX izoenziminin tümörlü hücredeki pH regülasyonu ve iyon transportuna etkisi	28
Şekil 1.12. Floresans özellik gösteren sülfonamid bileşiğinin açık yapısı	30
Şekil 1.13. Pozitif yüklü piridinyum bileşiğinin açık yapısı.....	31
Şekil 1.14. Seçici CA IX inhibitörleri olan floresans sülfonamid ve membranı geçemeyen pozitif yüklü piridinyum bileşiğinin CA II ile yaptığı kompleksin X-Ray kristal yapısı	32
Şekil 1.15. CA II'nin yapısı referans alınarak tasarlanan insan CA IX izoenziminin X-Ray kristal yapısı. Kırmızı renkli aminoasitler heliks yapıyı, yeşil renkli aminoasitler β katlanmalarını göstermektedir.....	32
Şekil 1.16. Mimic CA IX'un yapısı ve dizilimi (A) CA II ve CA IX'un 60. rezidüden 120. rezidüye kadar aminoasit diziliminin hizalanması (B) Mimic CA IX'un kristal yapısı (C) Mimic CA IX'un yakın çekim görünümü	33
Şekil 1.17. İndisulam bileşiğinin açık yapısı	33
Şekil 3.1. pGEM-T Easy klonlama vektörünün yapısı ve kesim pozisyonları	51
Şekil 3.2. petSUMO ekspresyon vektörünün yapısı	53
Şekil 3.3. Afinite kromatografisi ile proteinin saflaştırılması.....	58

Şekil 3.4. <i>p</i> -Nitrofenilasetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması	69
Şekil 4.1. Agaroj jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyu standart DNA (1500 bç). 2,3,4,5 nolu kuyular hCA IX geni.....	76
Şekil 4.2. LB-Agar fotoğrafı <i>E.coli</i> (JM 109) bakteri kolonileri. Mavi JM109 bakteri kolonileri klonlama (-), beyaz JM109 bakteri kolonileri klonlama (+)	77
Şekil 4.3. Agaroj jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyu standart DNA (1000 bç). 2,3,4,5,6,7,8 nolu kuyular PCR ürünü.	78
Şekil 4.4. Agaroj jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyu standart DNA (1000 bç). 2 ve 3 nolu kuyular hCA IX geni.	78
Şekil 4.5. Otomatik dizi analizi sonuçlarının hCA IX geni ile karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.6. Agaroj jel elektroforezi fotoğrafı 8 nolu kuyu standart DNA (1500 bç), diğer kuyular hCA IX geni.....	81
Şekil 4.7. LB-Agar fotoğrafı. <i>E.coli</i> (TOP10) bakteri kolonileri.....	82
Şekil 4.8. Agaroj jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyu standart DNA (10 kb), bant görülen kuyular çapraz primerlerle doğrulanmış hCA IX geni	83
Şekil 4.9. Agaroj jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyu standart DNA (10 kb), 2. ve 3. kuyular petSUMO-hCA IX plasmidi	84
Şekil 4.10. Agaroj jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyular standart DNA (1500 bç), diğer kuyular hCA IX geni	84
Şekil 4.11. Agaroj jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyu standart DNA (10 kb), 2,3 nolu kuyular çapraz primerlerle doğrulanmış hCA IX geni.....	85
Şekil 4.12. LB-Agar fotoğrafı. <i>E.coli</i> (BL21DE3) bakteri kolonileri.....	86
Şekil 4.13. Agaroj jel elektroforezi fotoğrafı 1,2,3 ve 4 nolu kuyular hCA IX geni, 5 nolu kuyular standart DNA (10 kb)	87
Şekil 4.14. SDS- PAGE fotoğrafı 1 nolu kuyu Standart proteinler (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa). 2,3,4,5 ve 6 nolu kuyular hücre lizatı.....	88
Şekil 4.15. SDS- PAGE fotoğrafı 1 nolu kuyular standart proteinler (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa). Diğer kuyular SUMO-hCA IX füzyon proteinini.	89

Şekil 4.16. SDS- PAGE fotoğrafı. 1 nolu kuyu standart proteinler (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa). 4,5 nolu kuyular SUMO-hCA IX füzyon proteinini.	90
Şekil 4.17. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik.....	91
Şekil 4.18. SDS- PAGE fotoğrafı 1 nolu kuyu standart proteinler (250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa). 3,4 nolu kuyular hCA IX.....	92
Şekil 4.19. Saflaştırılan SUMO-hCA IX füzyonu için log M_K/R_f grafiği	92
Şekil 4.20. Saflaştırılan hCA IX enzimi için log M_K/R_f grafiği	93
Şekil 4.21. 50 mM Tris-SO ₄ Tampon çözeltileri kullanılarak hCA IX izoenzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği.....	94
Şekil 4.22. 50 mM KH ₂ PO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak hCA IX izoenzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği.....	95
Şekil 4.23. Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak hCA IX izoenziminin optimum iyonik şiddeti için değişim grafiği.....	96
Şekil 4.24. hCA IX izoenzimi için optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği	97
Şekil 4.25. Değişik pH'lardaki 100 mM Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak hCA IX izoenzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	98
Şekil 4.26. hCA IX izoenzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	99
Şekil 4.27. hCA IX izoenziminin aktivitesi için 5 farklı Paklitaksel konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Paklitaksel] grafiği	101
Şekil 4.28. hCA IX izoenziminin aktivitesi için 5 farklı Dosetaksel konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Dosetaksel] grafiği	102
Şekil 4.29. hCA IX izoenziminin aktivitesi için 5 farklı İrinotekan HCl konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[İrinotekan HCl] grafiği	103
Şekil 4.30. hCA IX izoenziminin aktivitesi için 5 farklı Etoposid konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Etoposid] grafiği.	104
Şekil 4.31. hCA IX izoenziminin aktivitesi için 5 farklı Ni ⁺² konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Ni ⁺²] grafiği.....	105

Şekil 4.32. hCA IX izoenziminin aktivitesi için 5 farklı Al^{+3} konsantrasyonunda elde edilen % aktivite- $[Al^{+3}]$ grafiği.....	106
Şekil 4.33. hCA IX izoenziminin üzerine Paklitaksel antitümör ilacının etkisini gösteren Lineveawer-Burk grafiği	110
Şekil 4.34. hCA IX izoenziminin üzerine Dosetaksel antitümör ilacının etkisini gösteren Lineveawer-Burk grafiği	111

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar	1
Çizelge 3.1. LB besi yerlerinin hazırlanması	61
Çizelge 3.2. Karbonik anhidraz enziminin esterase aktivitesi ölçümü için kullanılan çözeltiler ve miktarları	70
Çizelge 4.1. SUMO-hCA IX füzyon proteinin ve saf hCA IX enziminin Ni reçine afinite kolonu ile saflaştırılma sonuçları	90
Çizelge 4.2. SUMO-hCA IX füzyon proteini ile hCA IX izoenzimi için SDS-PAGE ile molekül kütleleri tayini sonuçları	93
Çizelge 4.3. 50 mM Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak hCA IX izoenziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	94
Çizelge 4.4. 50 mM KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak hCA IX izoenziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	95
Çizelge 4.5. hCA IX izoenziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları ..	96
Çizelge 4.6. hCA IX izoenziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları	97
Çizelge 4.7. hCA IX izoenziminin stabil pH'sı için 100 mM Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	98
Çizelge 4.8. hCA IX izoenzimi için p-nitrofenilasetat substratı ile K _M , V _{max} ve k _{cat} çalışmaları sonuçları	100
Çizelge 4.9. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine Paklitaksel ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri	100
Çizelge 4.10. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine Dosetaksel ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri	101
Çizelge 4.11. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine İrinotekan HCl ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri	102

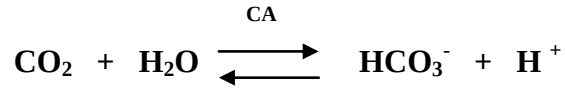
Çizelge 4.12. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine Etoposid ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	103
Çizelge 4.13. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine nikel iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	104
Çizelge 4.14. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine alüminyum iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri	105
Çizelge 4.15. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC ₅₀ değerleri	106
Çizelge 4.16. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine bazı antitümör ilaçlar ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC ₅₀ değerleri	107
Çizelge 4.17. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine Paklitaksel antitümör ilacının K _i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	109
Çizelge 4.18. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine Dosetaksel antitümör ilacının K _i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	110
Çizelge 4.19. hCA IX izoenzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K _i değerleri ve inhibisyon tipleri	112
Çizelge 5.1. hCA IX izoenzimi için yapılan tüm çalışmaların sonuçları.....	125

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün olmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

1.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz (Karbonat hidrolizaz E.C.4.2.1.1) bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimdir. İlk defa sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz (CA), canlılarda CO_2 'nin hidratasyonu ve HCO_3^- 'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir (Supuran and Scozzafava 2001).



Karbonik anhidraz CO_2 'in hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir (Supuran and Scozzafava 2001).

Çizelge 1.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar

(1)	$O=C=O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
(2)	$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
(3)	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
(4)	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
(5)	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$

Çizelge 1.1 (devam)

(6)	$\text{ArOPO}_3^{-2} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HPO}_3^{-2} + \text{ArOH}$
(7)	$\text{ArF} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HF} + \text{ArOH}$
(8)	$\text{PhCH}_2\text{OCOC}l + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{PhCH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{HCl}$
(9)	$\text{RSO}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RSO}_3\text{H} + \text{HCl}$

CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir, daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükrüğü, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002).

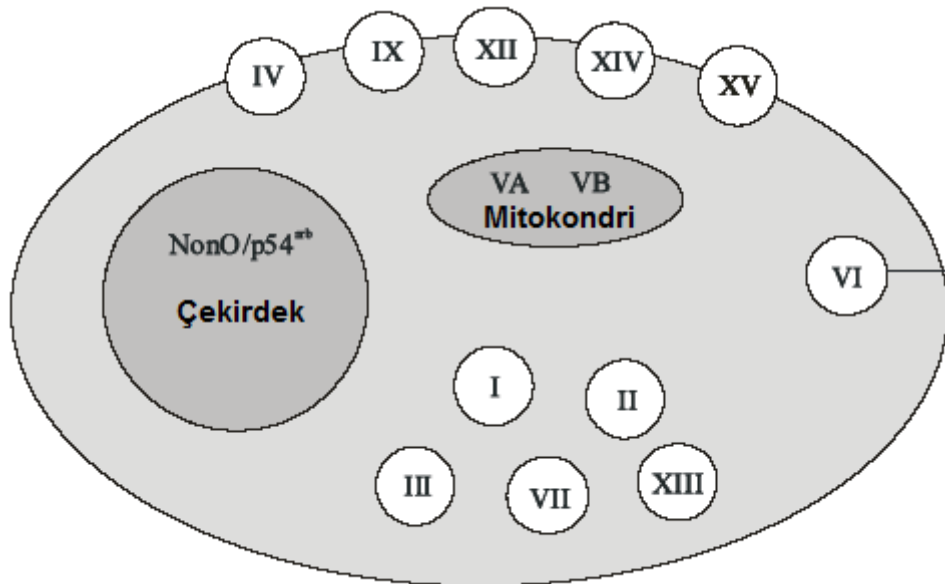
CA enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynamaktadır. Doku/organlar ile akciğer arasındaki CO_2 /bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO_2 homeostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alır (Chegwidden *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2000).

1.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

Bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ve farklı kimyasal yapıya sahip enzimlere izoenzim adı verilir. İzoenzimlerin aktiviteleri farklı; substrat, kofaktör ve inhibitörlere afiniteleri değişik olabilir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

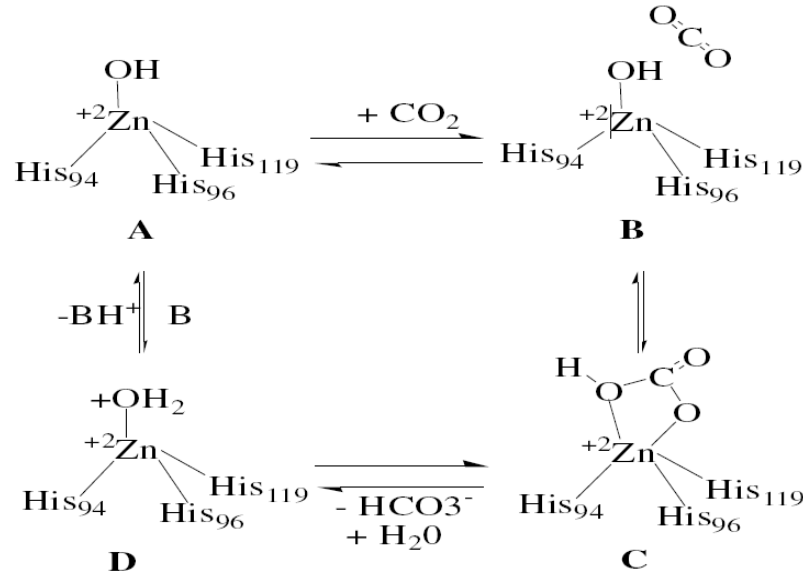
Karbonik anhidraz enziminin farklı izoenzimleri memelilerde oldukça yoğun olarak çalışılmaktadır. Fakat omurgalılarla ilgili yapılan çalışmaların çok erken aşamalarında olduğu düşünülmektedir (Tufts *et al.* 2003). İnsanda 16 tane α -CA izoenzimi olduğu tespit edilmiş, bunun 12 tanesinin katalitik olarak aktif olduğu bildirilmiştir. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin hücresel dağılımları, kinetik özellikleri ve inhibisyon profilleri açısından farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Üzerinde en fazla çalışma yapılmış olan izoenzimler sitoplazmik karbonik anhidraz I ve karbonik anhidraz II'dir. Bu iki izoenzim için en kolay elde edilebilir kaynak ise eritrositlerdir. CA III iskelet dokusunda en çok bulunan protein olarak, CA IV membrana bağlı olarak insan böbrek ve akciğerlerinde basolateral membran ve tübüler mikrozomlarda, CA V bazı dokuların mitokondrisinde, CA VI salgı sıvılarında (idrar, süt), CA VII sitozolik olarak bulunan izoenzimlerdir (Beydemir *et al.* 2000).

Sitoplazmik CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII; plazma membranına bağlı olarak CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV; mitokondride CA VA ve VB; salgıda CA VI ve tümör hücrelerinde CA IX ve CA XII bulunur.



Şekil 1.1. CA izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonlarının şematik gösterimi (Leppilampi 2006)

Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması, son altmış yıldır yapılan çalışmalar sonucu aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre CA enziminin; metabolizmada son derece önemli olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilebilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Enzim kinetiği hakkında insan hCA II izoenzimi üzerinde yapılan spesifik bölgenin mutasyonu ve X-Ray kristalografisi çalışmalarında da, katalitik mekanizma oldukça ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmıştır. Diğer izoenzimlerin mekanizmaları genellikle bu mekanizma ile aynı olmasına rağmen, bazı spesifik detaylarda farklı olabilmektedir. Bu çalışmalar sonucunda, CA'nın yapısal olarak iki önemli özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan birincisi, aktif bölgede Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmesidir. İkincisi de, aktif bölge yakınındaki aminoasitlerin, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmiş olmalarıdır.



Şekil 1.3. Karbonik anhidraz enziminin CO₂-hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi

Zn^{+2} iyonuna OH⁻ iyonunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu meydana gelir. Enzimin aktif formu güçlü nükleofilik yapısıyla CO₂ molekülüne saldırır. Bu da Zn^{+2} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar. Daha sonra bikarbonat iyonu bir su

molekölü ile yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Bunun sonucunda Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Stams *et al.* 1988). Tekrar bazik formu olan A formuna geçmek için aktif bölgeden çevresine bir proton transferi gerçekleşir. Bu reaksiyonun gerçekleşmesine His-64 gibi proton yakalayan aktif bölgeler ve ortamdaki tampon bölgeler yardımcı olurlar (Lindskog and Silverman 2000; Supuran and Scozzafava 2001).

Günümüzde bazı hastalıkların tedavisinde CA inhibitörleri etkili olarak kullanılmaktadır. Glaucoma hastalığı tedavisinde CA'nın güçlü inhibitörlerinden olan asetazolamid kullanılmaktadır. Oral yoldan verilen bu ilacın oldukça fazla yan etkileri vardır. Bu yan etkileri azaltmak ve daha etkili bir ilaç molekülü bulmak amacıyla birçok sülfonamid türevi sentezlenmiş ve göz epitelyumunda bulunan hCA II üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır (Supuran and Scozzafava 2001; Bülbül vd 2002). Günümüzde sülfonamidler glaucoma hastalığı tedavisi dışında diüretik, antibakteriyel ve antifungal ilaç olarak yaygın kullanıma sahiptirler. Bu sebepten dünyanın birçok yerinde farklı gruplar tarafından yeni sülfonamid türevleri sentezlenmektedir.

Hastalıkların teşhisinde ve tedavisinde CA inhibitörlerinin önemi, glaucoma hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmaları sonucu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış ve bunun sonucunda CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesine hız verilmiştir. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta glaucoma olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans belirlenmesinde (MRI) diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici ve antibiyotik olarak halen kliniklerde kullanılmaktadır. Bu sebeple, CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi son zamanlarda çok büyük önem kazanmıştır (Supuran and Scozzafava 2001).

1.3. Karbonik Anhidraz IX (CA IX) İzoenzimi

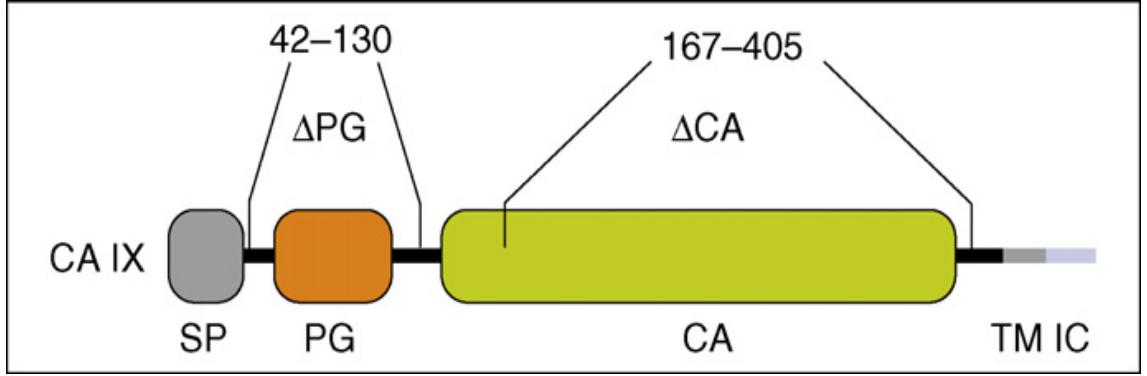
Karbonik anhidraz IX (CA IX), α -CA protein ailesine dahil olan bir membran proteindir. CA IX; pH düzenlenmesinde, hücre çoğalmasında, hücre farklılaşmasında, hücre adezyonunda, tümör hücrelerinin yayılmasında ve mide iç mukozasının korunmasında rol oynar (Pastoreková *et al.* 2004).

CA IX, normal dokularda çok az ekspresyon göstermesine rağmen (başlıca gastrointestinal dokular) böbrek, akciğer, boyun, rahim, göğüs dokularında tümör varlığında aşırı ekspresyon gösterir (Pastoreková and Zavada 2004).

1.4. CA IX'un Yapısı ve Katalitik Aktivitesi

Diğer CA izoenzimlerinden farklı olarak yalnızca katalitik bölgesi bir polipeptid zinciri içermektedir. CA IX oldukça kompleks organizasyonu ile birlikte multidomain bir transmembran proteindir (Supuran 2004).

CA IX yapı olarak, bir N-Terminal sinyal peptid bölge (1-37 aa), diğer α -CA izoenzimlerinin katalitik bölgesi ile yüksek sekans benzerliği gösteren bir ekstraselüler bölge (38-414 aa) (Pastorekova *et al.* 1992; Pastorekova and Pastorek 2004), bir transmembran helikal parça (415-434 aa) ve fonksiyonu bilinmeyen kısa bir intrastoplazmik kuyruktan (435-459 aa) oluşmaktadır. Ekstraselüler bölge, hücreler arası adezyonu sağlayan proteoglikan benzeri bölge ve CA katalitik bölgeden oluşmaktadır. Birçok deney hem CA katalitik bölge hem de proteoglikan benzeri bölgenin tümörlü hücrelerde önemli rol oynadığını göstermiştir (Pastorekova *et al.* 1992; Opavsky *et al.* 1996; Zavada *et al.* 2000; Pastorekova and Pastorek 2004).



Şekil 1.4. CA IX izoenziminin domain organizasyonu (Thiry *et al.* 2006)

*(SP: sinyal peptid bölgesi, PG: proteoglikan bölge, CA: karbonik anhidraz aktif bölgesi TM: trans membran bölge, IC: intrastoplazmik kuyruklar)

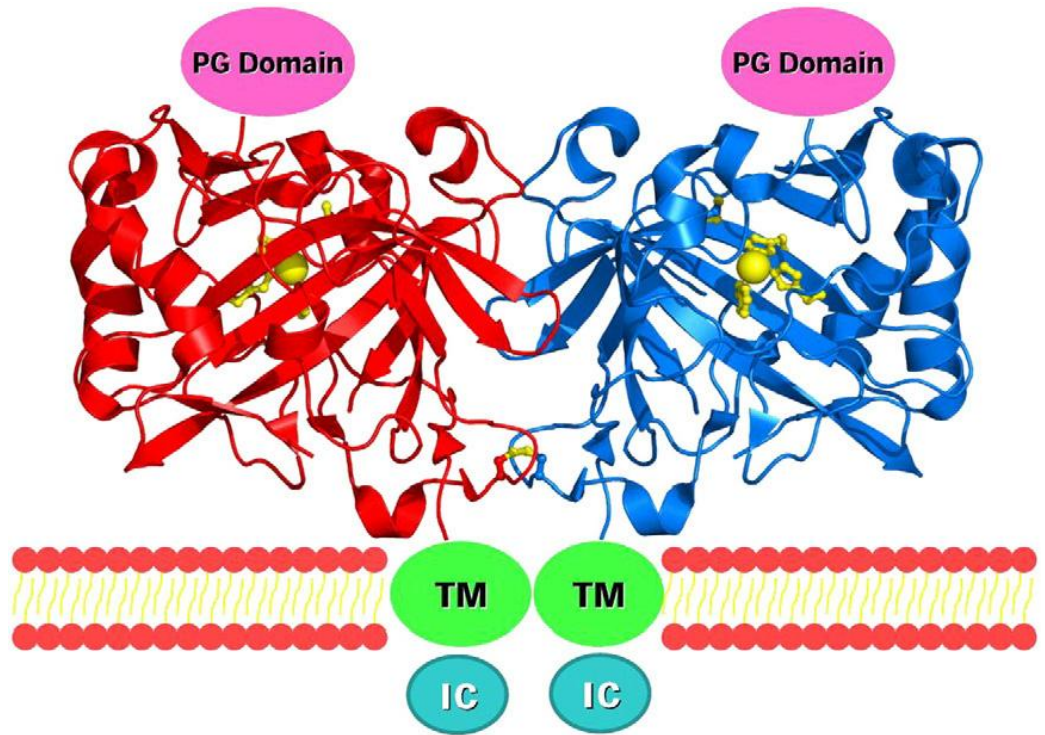
CA IX, yapı olarak bir sinyal peptit, proteoglikan bölge, karbonik anhidraz aktif bölgesi, transmembran bölge ve hücre içi kuyruğa sahiptir (Pastorekova and Pastorek 2004).

CA IX'un X-Ray kristal yapısı henüz bilinmemektedir. Fakat poliakrilamid jel elektroforezi deneylerinden CA IX'un yapısı aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Opavsky *et al.* 1996; Zavada *et al.* 2000; Giuseppina and Supuran 2010).

CA IX, 54 kDa ağırlığında bir glikoprotein olup epitel hücrelerin basolateral plazma membranında ve bazı durumlarda çekirdekte de ekspre edildiği gözlenmektedir, ayrıca bu enzimin geni kromozom 17'de haritalanmaktadır (Kyllonen *et al.* 2003).

İnsan CA IX proteinini kodlayan cDNA ilk defa Pastorek *et al.* (1994) tarafından klonlanmıştır. CA IX geni 11 ekzon ve 10 introndan oluşmaktadır (Opavský *et al.* 1996). Translasyon sonucunda oluşan protein 459 aminoasit içerir. CA IX'un aminoasit sırası dört tane sistein rezidüzü içermektedir. Bu sistein rezidülerinden üçü katalitik bölgede, dördüncüsü ise transmembran bölgeye yakın bir bölgededir. Cys 156 ve Cys 336, moleküller arası disülfid bağları ile bağlı diğer CA izoenzimlerinin sisteinleri ile benzer pozisyonadadır (Supuran 2004; Pastorekova and Pastorek 2004). Diğer iki sistein ise Cys 174 ve Cys 409, trimerdeki moleküller arası disülfid bağlarının oluşumuna katılmaktadır. Katalitik bölgede 346 pozisyonunda bir N-glikolizasyon bölge olduğu

tahmin edilmektedir. CA IX'un sitoplazmik kuyruk bölgesi üç tane fosforilasyon bölgesi (Thr 443, Ser 448, Tyr 449) içerir ve bunların olası düzenleyici rolleri araştırılmaktadır (Pastorekova and Pastorek 2004; Pastorekova *et al.* 2004). Diğer α -CA izoenzimlerinde olduğu gibi CA IX izoenziminin katalitik bölgesi üç tane histidin rezidüsünün (His 94, His 96, His 119) bağlı olduğu bir Zn^{+2} iyonu ve bir su molekülünden oluşmaktadır (Supuran 2004).



Şekil 1.5. Hücre membranı üzerinde tam boy CA IX dimer yapısını gösteren model (Giuseppina and Supuran 2010)

CA IX oldukça aktif bir α -CA izoenzimidir. CO_2 'nin hidratasyonu reaksiyonu için katalitik özellikleri CA II ile karşılaştırıldığında CA IX'un oldukça aktif bir izoenzim olduğu görülmektedir. Bu da CA IX'un $k_{cat}=3,8 \times 10^5 s^{-1}$ ve $k_{cat}/K_m=5,5 \times 10^7 M^{-1}.s^{-1}$ değerleriyle doğrulanmaktadır (Supuran *et al.* 2003; Supuran 2004).

1.5. CA IX'un Kanser Biyolojisindeki Yeri

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasdır. Günde vücudumuzda (DNA'da) yaklaşık 10.000 mutasyon olmasına rağmen immün sistemimiz her milisaniye vücudumuzu tarar ve kanserli hücreleri yok eder. Kanser, vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde üreyerek komşu dokuları işgal etmesi (invazyon) veya kaynağını aldığı organdan daha uzak bir yere, kan veya lenf yoluyla yayılması (metastaz) ile oluşan bir hastalıktır. Hücreler DNA replikasyonları esnasında meydana gelen bozulmalar nedeniyle yapı değiştirirler. Normal vücut hücre ve dokuları, orijinal büyüklük ve yapılarını korurken, kanser hücreleri saldırgan bir tablo çizerler. Kanser potansiyeli olan hücrelerin en önemli özelliği onkogen içermesi yani bulunduğu dokudan tamamen farklı yeni bir hücre olacak şekilde bozulma potansiyeli olmasıdır. Bu hücreler kanser dönüşümünü tamamladığında, alınan patoloji örneklerinde bu hücrelerin kökenini tanımlamak neredeyse imkânsızdır. Bir kanser hücresi oluştuğunda, vücudun bağışıklık sistemi bu yabancı hücreyi tanır ve parçalar. Bu sayede vücutta oluşan binlerce kanser hücresi, bağışıklık sistemi tarafından yok edilir. Her hücrede, onkogenlerin aktivasyonunu baskılayan antionkogenler (tümör baskılayıcı gen) bulunmaktadır. Antionkogenlerin kaybolması veya inaktive olması durumunda onkogen aktivitesine izin verilmiş olur. Bunu da kanserin oluşumu izler.

Vücudumuzun her organı birçok farklı hücre tiplerinden oluşmaktadır. Normal olarak bu hücreler vücut için gerekli olduğu şekilde belli bir düzen içinde büyüyerek bölünürler. Bu süreç bir düzen içinde yürür ve vücut sağlığının korunmasına yarar. Eğer, yeni hücrelere ihtiyaç olmadığı halde hücreler bölünmeye başlarsa, gereğinden fazla doku oluşmaya başlar. Bu fazlalık dokular tümör denen bir ürünün ortaya çıkmasına sebep olurlar. Böylece oluşan fazlalık doku iyi huylu veya kötü huylu olabilir. İyi huylu (benign) tümörler kanser değildir. Komşu bölgelere yayılmazlar. Sınırları belirgindir. Komşu dokuları eritmezler. Bu hücreler, onkogen yani farklılaşmışlardır (mutasyon) ancak yine de orijinlerini tahmin etmek mümkündür. Tamamen çıkartıldığı zaman genellikle tekrarlamazlar. Kötü huylu (malign) tümörler

ise kanser olarak adlandırılır. Komşu organ ve dokulara yayılırlar, kemik doku ile karşılaştıklarında onu dahi eritirler (rezorbsiyon). Sınırları belirsizdir. Malign tümörü oluşturan hücreler o kadar farklılaşmışlardır ki orjinlerinin ne olduğunu söylemek imkânsızdır. Lenf ve kan yoluyla uzak organlara da yayılırlar (Anonim 2010a).

Kanser; normal hücrelerin çoğalması, olgunlaşması ve diğer fonksiyonlarındaki bütünlüğün kaybolması ile karakterize edilir. Kanserde temel sorun hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybolmasıdır. Çoğalma ya da büyüme genlerin kontrolü altında olduğuna göre genetik faktörler tüm kanser türlerinde etkilidir (Barry *et al.* 2002).

Kanser, bazı etkilerle değişime uğramış hücrelerin, gerek yerel ve gerek uzak noktalarda kontrolsüz olarak çoğalıp büyümelerinin sonucu oluşan habis hastalıklar grubudur. Normalde hücreler belli bir kontrol altında, ihtiyaca göre bölünerek çoğalırlar. Hücreler bir taraftan programlı ölüm ya da apoptoz denen olay ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Büyüme faktörleri normalde DNA'daki çeşitli genlerin etkisiyle oluşan proteinlerdir. Bu genler mutasyona (değişime) uğrayarak hücrelerin aşırı büyümesine sebep olurlarsa, o zaman kanser oluşur ve bu genlere de onkogen denir. Kanser genleri ya da onkogenler 70'li yılların sonlarına doğru bulunmaya başlanmış ve günümüze kadar çok aktif araştırmaların konusunu oluşturarak, kanserin daha iyi anlaşılmasına, tanı ve tedavinin geliştirilmesine hizmet etmişlerdir. Onkogenleri oluşturan mutasyonlar, karsinojen maddelerin, virüslerin ve X ışınlarının etkisiyle meydana gelir. Kanser bir organda oluşuktan sonra, uzak doku ve organlara da metastaz denilen yerleşmeler yapar ve genel olarak hastalar metastazlar nedeniyle kaybedilir. Hızlı ilerleyen kanserlerde metastaz erken, daha iyi gidişli kanserlerde ise metastaz geç oluşur. Metastaz oluşumu tesadüften çok, kanser hücrelerinin bazı organlara kolay yerleşmelerini sağlayan özelliklerine bağlıdır. Örneğin, kolon kanserleri karaciğere, prostat kanserleri kemiğe metastaz yapmayı tercih etmektedir. Burada kanserli dokudaki kan akımı ve damar hücrelerinin aktivasyonu gibi faktörler rol oynamaktadır.

Onkogenlerin yanında anti-onkogenler de çok önemlidir. Onkogenler kansere sebep olurken, anti-onkogenler kanseri önleyen genlerdir. Anti-onkogenlere tümörü baskılayan genler de denir. Bunlar doğal hallerinde iken, yani mutasyona uğramamış hallerinde iken hücre bölünmesini ve çoğalmasını frenleyen, durduran genlerdir. Örnek olarak retinoblastoma geni ve p53 geni verilebilir.

Moleküler biyolojinin verdiği yeni bilgiler kanser tedavisi için umut vaad etmektedir. Onkogenleri ve onların ürünlerini baskılayan özel maddeler halen araştırılmaktadır. Anti-onkogenlerin de tedaviye katılmaları için çalışılmaktadır. Kanserde belki tedaviden daha önemli olan husus kanserin önlenmesidir. Önlemede karsinojenik (kansere yapıcı) maddelerden uzak durmak, temiz ve sağlıklı yaşamak ve uygun bir diyet uygulamak gibi hususlara uyulması kanser sıklığını rahatça yarıya indirebilir. Gelecekte kemoprevansiyon yani kimyasal maddelerle kanseri önlemek de yararlı olabilecektir (Anonim 2010b).

Renal hücreli karsinomanın dışındaki tümörlerde, CA IX nekrotik (ölü doku bölgesi) bölgenin etrafına daha yoğun olarak dağılma özelliğindedir. Bu durum hipoksiyle düzenlenen, hipoksi tarafından aktive edilen proteinin özelliğidir. Nekroz fonksiyonel kan damarlarından uzak bölgelerde gelişir ve uzun süreli hipoksi (oksijen miktarında azalma) hatta anoksi (oksijensizlik) buna yol açar. Hipoksi ve anoksi hücrenin yaşamasına olanak vermez (Pastorekova and Pastorek 2004). Bunun aksine fonksiyonel kan damarlarının yakınında yer alan (perinekrotik bölge) bölgeler ki bu bölgeler oksijensizlikten veya çok az oksijenlenmeden kaynaklanan strese daha az maruz kalan bölgelerdir. Bu bölgeler nispeten az oksijenlense de diğer hipoksik ve anoksik bölgeler gibi oksijensizlikten kaynaklanan strese maruz değildir ve nispeten düşük olan oksijen düzeylerine CA IX'u da içeren çok sayıdaki HIF-1 hedeflerinin vasıtasıyla uyum sağlamışlardır.

Farklı tümör tiplerinden çok sayıdaki örnekle yapılan çalışmalarda CA IX ve hipoksi arasındaki ilişki CA IX'un salınımına ait paranekrotik modeli doğrulamaktadır. Örneğin CA IX ekspresyonunun servikal tümörlerdeki hipoksi seviyeleriyle çok ilişkili olduğu

bulunmuştur. Bu durumu gösteren ölçümler iğne elektrotları veya pimonidazole adlı kimyasal hipoksi markırlarıyla ilişkilendirilerek yapılmıştır. Bu markır, göğüs, akciğer kanserleri, ileri seviyedeki baş ve boyun kanserlerinde de güvenle kullanılmıştır. Bu bilgiler ışığında CA IX tümöre bağlı hipoksilerde güvenli bir markır olarak sunulmuştur (Ashida *et al.* 2002; Pastorekova and Pastorek 2004). Böyle bir markır klinik uygulamalarda oldukça faydalıdır. Pastorekova ve Pastorek (2004) tarafından geliştirilen M75 monoklonal antikör tekniği iğne elektrot gibi invasive bir uygulamaya ihtiyaç duymadığı gibi biopsiden önce pimonidazole gibi metalik birleşmeye ihtiyaç duymaz ve rutin kullanım için standardize edilebilir (Pastorekova and Pastorek 2004).

Hipoksi HIF-1 döngüsü bir tümörde CA IX'un aşırı ekspresyonuna sebep olmaktadır, tüm bunların sonucu da doku pH'sındaki düşüşle ortaya çıkan dengesizliktir. Gerçekte hipoksik tümörlerin çoğu asidik özelliktedir (normal dokuda yaklaşık pH=7,4 iken hipoksik tümörlerde pH=6'dır). CA IX'un hipoksik tümörlerdeki asidifikasyon prosesindeki rolü Pastorekova'nın grubu tarafından açıklanmıştır (Svastova *et al.* 2004).

Madin-Darby köpeği böbrek epitelyum hücreleri yapısal olarak insan CA IX izoenzimi salgılar. Bu köpekleri kullanarak Svastova ve arkadaşları (2004) kültüre edilen hücrelerde CA IX'un ekstrasellüler pH'yı azaltabileceğini göstermişlerdir. CA IX'un seçici sülfonamid inhibitörleri besiyeri ortamındaki asidifikasyonu azaltır. Bunu enzimin katalitik aktivitesini inhibe ederek yaparlar. Bu inhibisyonla, H⁺ iyonlarının üretimi ve dolayısıyla da CA IX salgılayan hipoksik hücrelere bağlanması da azalır (normal şartlar altındaki CA IX salgılayan hücreler bundan etkilenmez). Buna ilaveten CA IX'un katalitik domainindeki aktif bölgenin kesilmesinin besi ortamının asidifikasyonunu azalttığı ve bu mutant proteinlerin aktif bölgelerine sülfonamid inhibitörlerinin bağlanamadığı gösterilmiştir (Svastova *et al.* 2004).

Tümör hücresi kendi pH değerini azaltır. Bunu laktik asit üretimini artırarak (yüksek glikoliz oranından dolayı) ve CO₂ hidrasyonu ile yapmaktadır. Hidrasyon reaksiyonunu tümör ilişkili CA IX izoenzimi yapmaktadır. Bu enzimin ekstrasellüler ortamda çalışan katalitik bir domaini vardır (Helmlinger *et al.* 2002). Düşük pH değerleri tümör

oluşumuna sebep olan veya bunu hızlandıran dönüşümlerle, kromozomal yeniden düzenlemelerle, hücre dışı matriks parçalanmalarıyla, ortama dışarıdan veya ortamdan dışarıya doğru kimyasal veya hücre göçüyle, hücre büyüme faktörlerinin aktifleşmeleriyle ve proteazların çalışmalarıyla ilişkilidir (Stubbs *et al.* 2000; Pastorekova and Pastorek 2004).

Sindirim sistemi epitelyum hücreleri gibi normal dokularda CA IX, hücre farklılaşması ve çoğalmasını kontrol ederek morfogenez ve homeostazı düzenler (Supuran *et al.* 2003). CA IX'un özgün proteoglikan benzeri bölgesi hücre adezyonu ve farklılaşması ile ilgilidir. CA IX hücre gelişiminde substrat olarak kullanılan pirimidin nükleotidlerin sentezinde gerekli bir yapıdır (Supuran 2003).

CA IX membrana bağlı ve hücre yüzeyinde olan katı tümörlerde görüldüğü için özellikle böbrekle ilgili hücre karsinomlarında (RCC), servik, over, kolon, baş, boyun karsinomlarında ekspres olmaktadır. Hücre yüzeyinde aktivite göstermesi CO₂'in hidratasyon ve dehidratasyonu sonucunda klorür-anyon değiştiricisi olarak hücre membranında yer alması CA IX'un HCO₃⁻ anyonlarının tekrar sitoplazmaya taşınmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Bu membrana bağlı tümör ilişkili izoenzimin ekstrasellüler asiditeyi kontrol ettiği ve böylelikle katepsin B ve matriks metaloproteaz B (MMP-9) gibi hücre yüzey proteazlarının aktivasyonuna etkimesi bu enzimin sadece hipoksi için değil ayrıca kanser terapisi için de önemli olduğunu göstermektedir (Olive *et al.* 2001).

Sonuç olarak, enzimatik aktivitesinin dışında CA katalitik bölgesi ve proteoglikan bölgesi (PG) ile birlikte CA IX hücre-hücre etkileşmelerinin düzenlenmesinde görev alır, ancak sahip olduğu sitoplazmik kuyrukların sinyal uyumunda bir etkisi bilinmemesine rağmen bu konuda çalışmalar yapılmakta ve hücre yüzeyinde bulunan kanser ilişkili karbonik anhidrazların inhibisyonu ile elde edilecek terapötik yararın ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır (Türeci vd 1998).

1.6. Kemoterapi ve Kanser Tedavisi

Kemoterapi, kanser hücrelerini yok etmek için antikanser ilaçlarının kullanılma şeklidir (Christine *et al.* 1974). Uygulanan kemoterapi; özellikle kanserin türüne, vücudun neresinden başladığına, kanser hücrelerinin tipine ve bu hücrelerin ne kadar yayıldığına bağlıdır. Kemoterapi, kanser tedavisinde tek başına veya cerrahi işlemle ve/veya radyoterapi ile birlikte uygulanabilir. Bu ilaçların değerlendirmeleri yapılmış ve yıllardır kullanılmaktadır. Kemoterapi, kanser tipine ve kullanılan ilaçlara göre çok çeşitli yollarla verilebilir. En yaygın yolları damara enjekte etmek ve ağız yoluyla vermektir. Daha ender olarak adaleye veya deri altına enjekte edilir. Özel durumlarda omuriliğe de enjekte edilebilir. Bazı hastalarda, bu yollardan bir kaçını birlikte kullanılabilir. Hangi yolla verilirse verilsin ilaçlar kana karışarak vücudun her tarafına tabii ki kanser hücrelerine de ulaşırlar ve hücrelerin kendi kendine bölünmesini ve yenilenmesini engelleyerek tesir ederler. Böylece ilaçlardan etkilenen kanser hücreleri zarar görür ve ölürler. Tümörün cinsine ve hastanın özelliklerine göre değişik nedenlerle kemoterapi uygulanabilir:

- * Tümörü tamamen yok etmek ve hastayı iyileştirmek için,
- * Tümörün yayılmasını engellemek için,
- * Tümörün büyümesini durdurmak veya yavaşlatmak için,
- * Tümörün sebep olduğu belirtileri yok etmek için kemoterapi uygulanır.

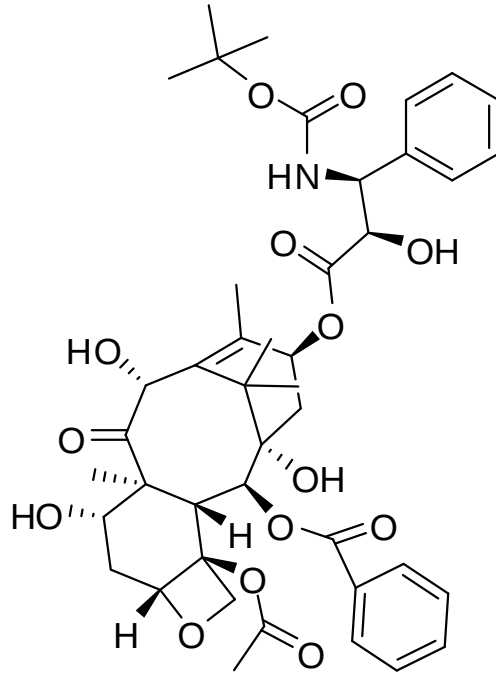
Etkili bir tedavi yöntemi olmasına rağmen bazı durumlarda tümörü tamamen yok edemeyip sadece belirtilerini düzelterek rahat yaşamayı sağlayabilir. Bazı tümörlerde tek tedavi yöntemi kemoterapidir. Diğerlerinde ise kemoterapi diğer tedavilerle (cerrahi ve radyoterapi) peşpeşe veya eş zamanlı olarak uygulanır. Örneğin ameliyat öncesinde tümörü küçültmek amacıyla, veya ameliyattan sonra yayılmasını önlemek için kemoterapi yapılabilir. Aynı uygulamalar radyoterapi öncesinde ve sonrasında yapılabildiği gibi, radyoterapi ile aynı anda çeşitli yöntemlerle de kemoterapi uygulanabilir (Anonim 2010c).

Tüm normal hücreler ve kanser hücreleri yaşamları süresince büyüme ve bölünerek çoğalma evrelerinden geçerler. Kemoterapi ilaçları bu süreci kırarak hücrenin ölümüne yol açar. Her kemoterapi ilacının etkili olduğu evre farklıdır. Cerrahi ve radyoterapi lokal tedavilerdir. Kemoterapi ise tüm vücuda yayılarak etki eden bir tedavi şeklidir. Normal hücreler kanser hücrelerinden farklı olarak süratle kendi kendilerini yenilerler ve tedavi sırasında oluşan yan etkiler tedavi bitiminde ortadan kalkar. Kemoterapi ilaçları bazı kanser tiplerinde yüksek oranlarda, bazılarında düşük oranlarda etkilidir ancak bu kanserin tipine bağlıdır.

1.7. Antitümör İlaçlar

1.7.1. Dosetaksel

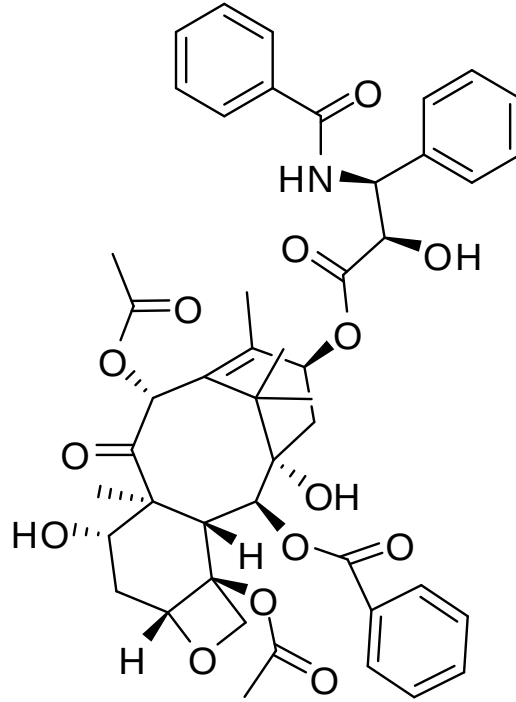
Dosetaksel ilacı; meme kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, baş boyun kanseri, prostat kanseri ve mide kanserinin önlenmesi ve tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 114977-28-5 olup, molekül ağırlığı 807,9 g/mol, formülü ise $C_{43}H_{53}NO_{14}$ dir. İlaç damara enjekte yoluyla uygulanır. Dosetaksel damar içine enjekte edilmeden önce uygun bir çözücü ile sulandırılarak ya da ön karışım çözeltisi hazırlanarak verilir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisi için dosetaksel ya tek başına ya da sisplatin kombinasyonu ile kullanılır. İlerlemiş meme kanserinin tedavisi için dosetaksel ya tek başına ya da doksorubusin ya da trastuzumab ya da kabesitabin kombinasyonu ile kullanılır. Yumurtalık kanserinin tedavisi için dosetaksel ya tek başına ya da platin grubu ile kombinasyon halinde kullanılır. Prostat kanserinin tedavisi için dosetaksel, prednison ya da prednisolonun kombinasyonu ile kullanılır. Yayılmış mide kanserinin ve baş-boyun kanserinin tedavisi için dosetaksel, sisplatin ya da 5-fluorourasil kombinasyonu ile kullanılır.



Şekil 1.6. Dosetaksel antitümör ilacının açık yapısı (Anonim 2012a)

1.7.2. Paklitaksel

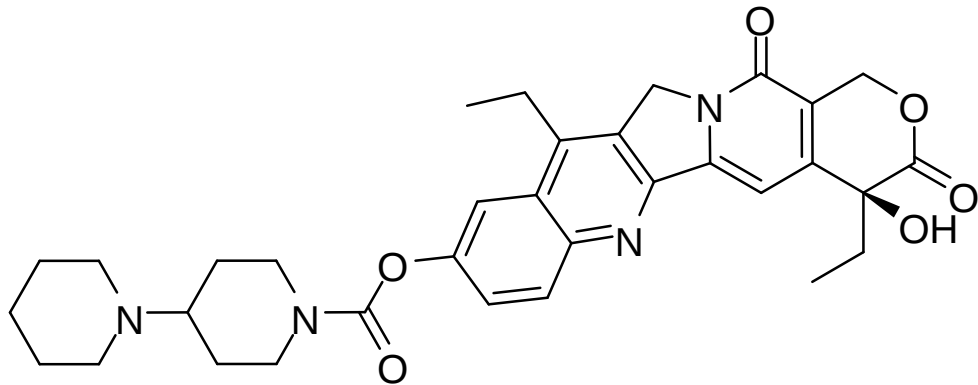
Paklitaksel ilacı; meme kanseri, ovaryum kanseri ve ilerlemiş küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde günümüzde sıklıkla kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Paklitaksel ilacının Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 33069-62-4 olup, molekül ağırlığı 853,9 g/mol, formülü ise $C_{47}H_{51}NO_{14}$ dir. İlaç damara enjekte yoluyla uygulanır. Meme kanserinde nod pozitif meme kanserinin adjuvant tedavisinde antrasiklin ve siklofosfamid tedavisini takiben kullanımı etkilidir. Paklitaksel, platin içeren bir ilaç ile kombine olarak ilerlemiş veya metastatik over kanserinin ilk ve ikinci seçenek tedavisinde etkilidir. Ayrıca küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin ilk seçenek tedavisinde küratif cerrahi müdahale veya radyasyon tedavisi almayacak hastalarda bir platin bileşiği ile kombine olarak etkilidir.



Şekil 1.7. Paklitaksel antitümör ilacının açık yapısı (Anonim 2012a)

1.7.3. İrinotekan HCl

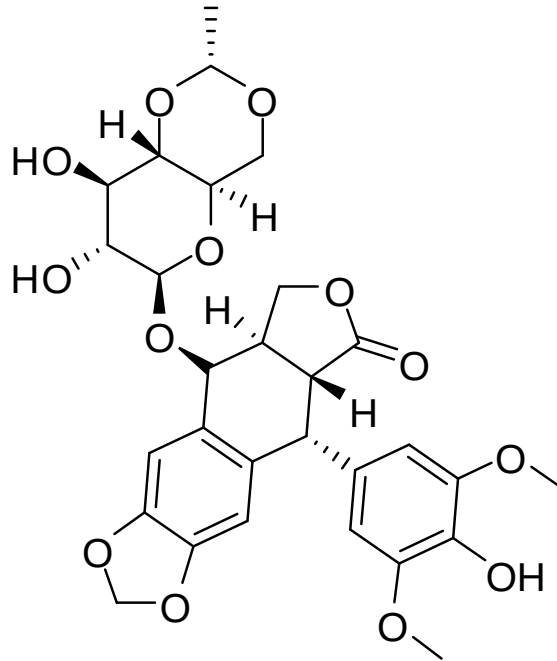
İrinotekan HCl ilacı, dayanıklı kolon kanseri ile ilerlemiş ovaryum kanseri tedavisinde günümüzde sıklıkla kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 100286-90-6 olup, molekül ağırlığı 586,7 g/mol, formülü ise $C_{33}H_{38}N_4O_6 \cdot HCl$ dir. İlaç damara enjekte yoluyla alınır.



Şekil 1.8. İrinotekan HCl antitümör ilacının açık yapısı (Anonim 2012a)

1.7.4. Etoposid

Etoposid ilacı; ileri evre küçük hücreli dışı akciğer, testis ve ovaryum kanseri tedavisinde etkin olarak kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) CAS 33419-42-0 olup, molekül ağırlığı 588,6 g/mol, formülü ise $C_{29}H_{32}O_{13}$ dir. Uygulaması damar yoluyla en az 30 dakika şeklindedir. Etoposid aynı zamanda ağız yoluyla da verilebilmektedir. İlacın damar dışına kaçmasından kaçınılmalıdır.



Şekil 1.9. Etoposid antitümör ilacının açık yapısı (Anonim 2012a)

1.7.5. Karboplatin

Karboplatin ilacı, özellikle ilerlemiş olan yumurtalık kanserinin başlangıç tedavisinde uygun olan diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte kombinasyon halinde uygulanır. Genellikle siklofosamid/karboplatin kombinasyonu kullanılır. İlerlemiş olan yumurtalık kanserinin sekonder tedavisinde de tekrarlanan yumurtalık kanseri ve daha önce kemoterapi tedavisi görmüş olan hastalarda, sisplatin tedavisi görenler de dahil

olmak üzere, yatıştırıcı tedavi olarak kullanılır. Ayrıca ovaryum, baş ve boyun, akciğer, testis kanseri tedavisinde de kullanılır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 41575-94-4 olup, molekül ağırlığı 371,2 g/mol, formülü ise $C_6H_{12}N_2O_4Pt^{-2}$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır. Daha az toksik bir bileşik olarak dünya çapında kabul görmüş ve kemoterapide sıklıkla kullanılmaktadır.

1.7.6. Sitarabin

Sitarabin ilacı, belirli lösemi (kan kanseri) türlerinin tedavisinde ve menenjit ile ilişkili olan lösemi tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 147-94-4 olup, molekül ağırlığı 279,68 g/mol, formülü ise $C_9H_{14}ClN_3O_5$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır.

1.7.7. Metotreksat

Metotreksat ilacı; meme, over ve akciğer kanseri, akut lenfoblastik çocuk lösemisi ve diğer tedavi şekillerine cevap vermeyen ağır rekalsitran psoriasis vakalarının tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 59-05-2 olup, molekül ağırlığı 454,44 g/mol, formülü ise $C_{20}H_{22}N_8O_5$ dir. Ağız yoluyla, kas içine veya damar içine uygulanabilmektedir.

1.7.8. Cetuksimab

Cetuksimab ilacı; baş, boyun ve kolon kanseri tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 205923-56-4 olup, molekül ağırlığı 145781,6 g/mol, formülü ise $C_{6484}H_{10042}N_{1732}O_{2023}S_{36}$ dir. İlaç damara enjekte yoluyla alınır.

1.7.9. Rituksimab

Rituksimab ilacı, lenf kanseri tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 174722-31-7 olup, molekül ağırlığı 143859,7 g/mol, formülü ise $C_{6416}H_{9874}N_{1688}O_{1987}S_{44}$ dir. İlaç damara enjekte yoluyla alınır.

1.7.10. Sisplatin

Sisplatin ilacı; ya tek başına ya da kombine olarak diğer ilaçlarla birlikte ovaryum, testis, mesane, serviks, yemek borusu, baş ve boyun kanserleri ile küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerini de içeren çok geniş ve değişik tümörlerin tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 15663-27-1, molekül ağırlığı 300,05 g/mol, formülü ise $C_{12}H_6N_2Pt$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır. İlaç kullanacak hastanın sıvı dengesinin iyi olması gerekmektedir. Sıvı dengesinin yetersiz kalması durumunda, yan etkilerin daha şiddetli şekilde ortaya çıktığı kanıtlanmıştır.

1.7.11. 5-Fluorourasil

5-Fluorourasil ilacı; basit tümörlerin ve özellikle rektum, kolon, meme, uterus, pankreas, karaciğer, yumurtalık ve mesane karsinomlarının tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 51-21-8 olup molekül ağırlığı 130,08 g/mol, formülü ise $C_4H_3FN_2O_2$ dir. Damar yoluyla ve bazı vücut boşluklarına uygulanabilmektedir. Bu ilacın monoterapötik bir ajan olarak kullanılmasının önemi, kolon ve rektum kanserlerinde daha geçerlidir.

1.7.12. Epirubisin HCl

Epirubisin HCl ilacı; meme karsinomu, malign lenfoma, yumuşak doku sarkomu, mide, karaciğer, pankreas ve akciğer karsinomu ve yumurtalık karsinomlarının tedavisinde

kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 56390-09-1 olup molekül ağırlığı 579,95 g/mol, formülü ise $C_{27}H_{29}NO_{11}.HCl$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır.

1.7.13. Fludarabin Fosfat

Fludarabin Fosfat ilacı, B-hücreli kronik lenfositik lösemili hastaların tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 75607-67-9 olup molekül ağırlığı 365,2 g/mol, formülü ise $C_{10}H_{13}FN_5O_7P$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır.

1.7.14. Gempitabin HCl

Gempitabin HCl ilacı; ileri seviye küçük hücreli dışı akciğer kanseri, ilerlemiş meme, kolon, mide, yumurtalık, mesane ve pankreas kanseri tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 122111-03-9 olup molekül ağırlığı 299,66 g/mol, formülü ise $C_9H_{11}F_2N_3O_4.HCl$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır.

1.7.15. Sitozin Arabinozid

Sitozin Arabinozid ilacı, özellikle kronik miyeloid lösemi tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 147-94-4 olup molekül ağırlığı 243,22 g/mol, formülü ise $C_9H_{13}N_3O_5$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır.

1.7.16. İfosfamide

İfosfamide ilacı; testis, yumurtalık, servikal, meme, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan bronş karsinomu, yumuşak doku sarkomaları ve pankreas kanseri tedavisinde

kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 3778-73-2 olup molekül ağırlığı 261,09 g/mol, formülü ise $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır.

1.7.17. Vinblastin Sülfat

Vinblastin Sülfat ilacı; ilerlemiş testis kanseri, ağız boşluğu ve dilin epidermoid karsinomları, akciğer, cilt, serviks, meme ve belirli lenf kanseri türlerinin tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 143-67-9 olup molekül ağırlığı 909,06 g/mol, formülü ise $C_{46}H_{58}N_4O_9.H_2SO_4$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır.

1.7.18. Doksorubisin HCl

Doksorubisin HCl ilacı; akut ve kronik lösemi, lenfoma, yumuşak nesiç sarkoması, nöroblastoma, akciğer, mide, değişim gösteren hücre mesane kanseri, tiroid kanseri ve meme kanseri tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 23214-92-8 olup molekül ağırlığı 543,52 g/mol, formülü ise $C_{27}H_{29}NO_{11}.HCl$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır.

1.7.19. Dakarbazin

Dakarbazin ilacı; yumuşak doku sarkomaları, cilt ve lenfoma kanseri tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 4342-03-4 olup molekül ağırlığı 182,18 g/mol, formülü ise $C_6H_{10}N_6O$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır.

1.7.20. Vinorelbin

Vinorelbin ilacı, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 71486-22-1 olup molekül ağırlığı 778,93 g/mol, formülü ise $C_{45}H_{54}N_4O_8$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır.

1.7.21. Bortazomib

Bortazomib ilacı, erişkinlerin kemik iliği kanserlerinin (multipl myelom ve mantle hücreli lenfoma) tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 179324-69-7 olup molekül ağırlığı 384,24 g/mol, formülü ise $C_{19}H_{25}BN_4O_4$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır.

1.7.22. Mitoksantron

Mitoksantron ilacı; ilerlemiş meme kanseri, lenfoma, erişkin akut non-lenfositik lösemi, karaciğer, yumurtalık kanseri tedavisinde tek başına veya diğer antineoplastik ajanlarla kombine olarak kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 65271-80-9 olup molekül ağırlığı 444,48 g/mol, formülü ise $C_{22}H_{28}N_4O_6$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır.

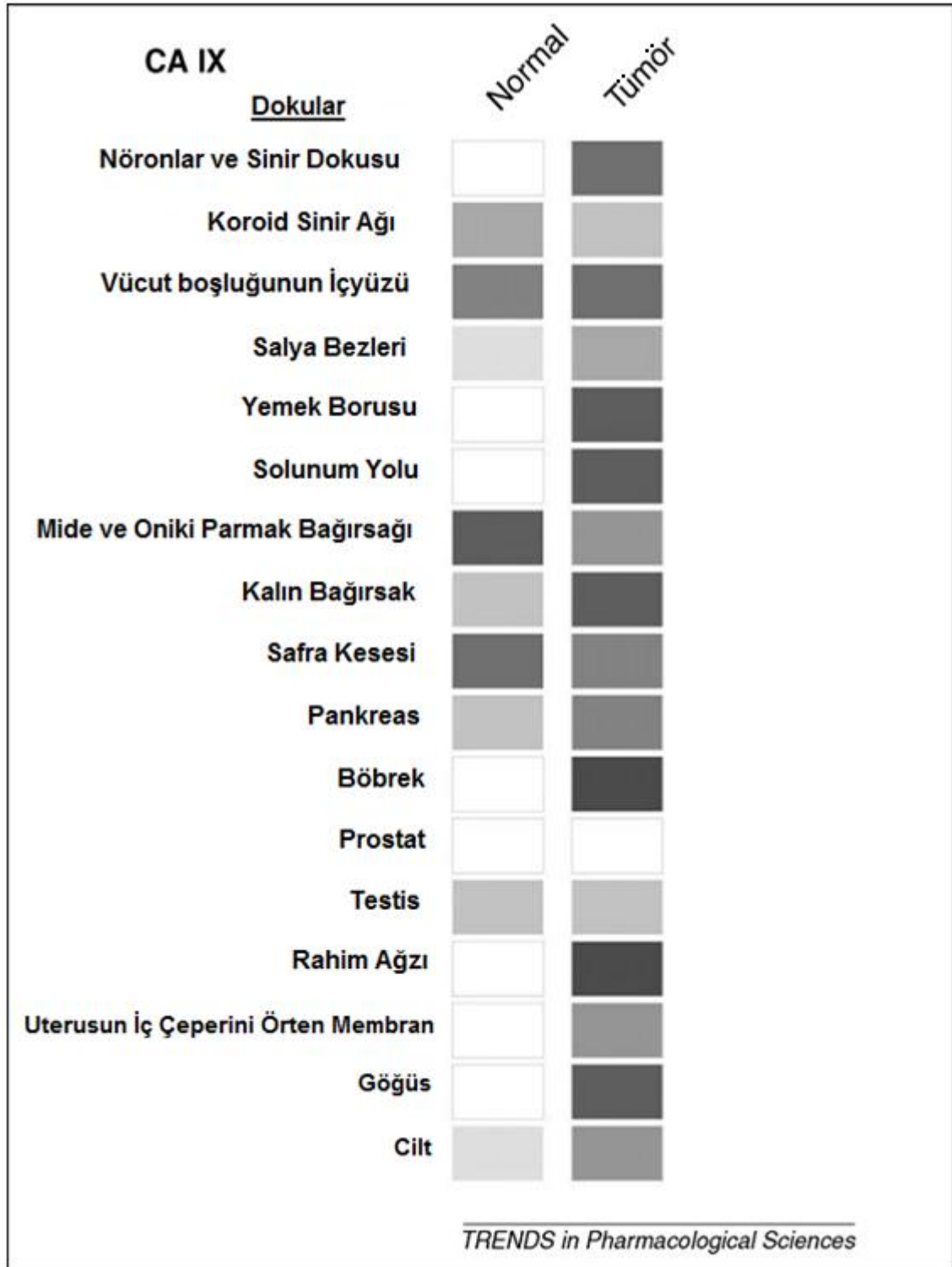
1.7.23. Okzaliptatin

Okzaliptatin ilacı; ovaryum, baş ve boyun, akciğer, testis, kalın bağırsak (birincil tümör vücuttan tamamen çıkarıldıktan sonra) veya vücudun diğer kısımlarına dağılmış kalın bağırsak ve kalın bağırsağın aşağı bölümü (rektum) kanserinin tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No) 61825-94-3 olup molekül ağırlığı 397,29 g/mol, formülü ise $C_8H_{14}N_2O_4Pt$ dir. İlaç damar içine enjekte yoluyla alınır (Özensoy 2006; Anonim 2012a; Anonim 2012b).

1.8. Hipoksi

CA IX izoenziminin, hastalık ilerlemesi ve tedavi sonucunu büyük ölçüde etkileyen klinik olarak tümör biyolojisinde önemli bir faktör olan hipoksi ile indüklenmesi ayrıca önem taşımaktadır (Puccetti *et al.* 2005). Asidik ekstrasellüler pH (pHe) tümör mikro çevresinde tipik bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. pHe angiogenik faktörler ve proteazların düzenlenmesinde, bozulan immün sistemlerinde önemli etkilere sahiptir (Vullo *et al.* 2005). Hipoksi, tümör saldırısını kolaylaştıran hücre dışı ortamın asidifikasyonu ile bağlantılıdır (Simi *et al.* 2006). Tümör çevresinde asidifikasyon genellikle glikolizde aşırı üretilen laktik asit birikimi ile ortaya çıkmaktadır. Yüksek glikoliz hızı, özellikle enerji üretiminden anaerobik metabolizmaya bağlı olan hipoksik hücreler için önemlidir. Böylelikle yapılan çalışmalarda laktik asidin üretilmesi sonucu tümör asidifikasyonuna glikoliz-eksik hücrelerinin etkinliğinin yanı sıra *in vivo* asidik tümörlerinde katkısı ortaya konmuştur (Supuran and Scozzafava 2000). Bu kanıtlarda CO₂'in dehidratasyonunu ve hidratasyonunu katalizleyen karbonik anhidrazın etkisi son derece önemlidir. CA IX integral bir plazma proteini olup CA ailesi içinde en yüksek proton transferini katalizleme hızına sahiptir. Bu enzimin tümör pH'sını kontrol etme yeteneği ve yüksek katalitik aktivitesine sahip olması tümör mikro çevresinde en iyi rolü üstlenecek izoenzim olmasını mümkün kılmaktadır (Kopacek *et al.* 2005).

CA IX'un insan ve tavşan beslenme sistemindeki dağılımı ile ilgili çalışmalar sonucunda insan beslenme sisteminde CA IX'un mide ve safra kesesinde güçlü ekspresyon sergilediği, aynı zamanda kıvrım bağırsak, karaciğer ve pankreasta pozitif ekspresyonu gözlenmiştir. Tavşan beslenme sisteminde ise mide, kolon ve on iki parmak bağırsağında pozitif ekspresyon, karaciğerde ise zayıf ekspresyon gözlenmiştir (Pastoreková *et al.* 1997).

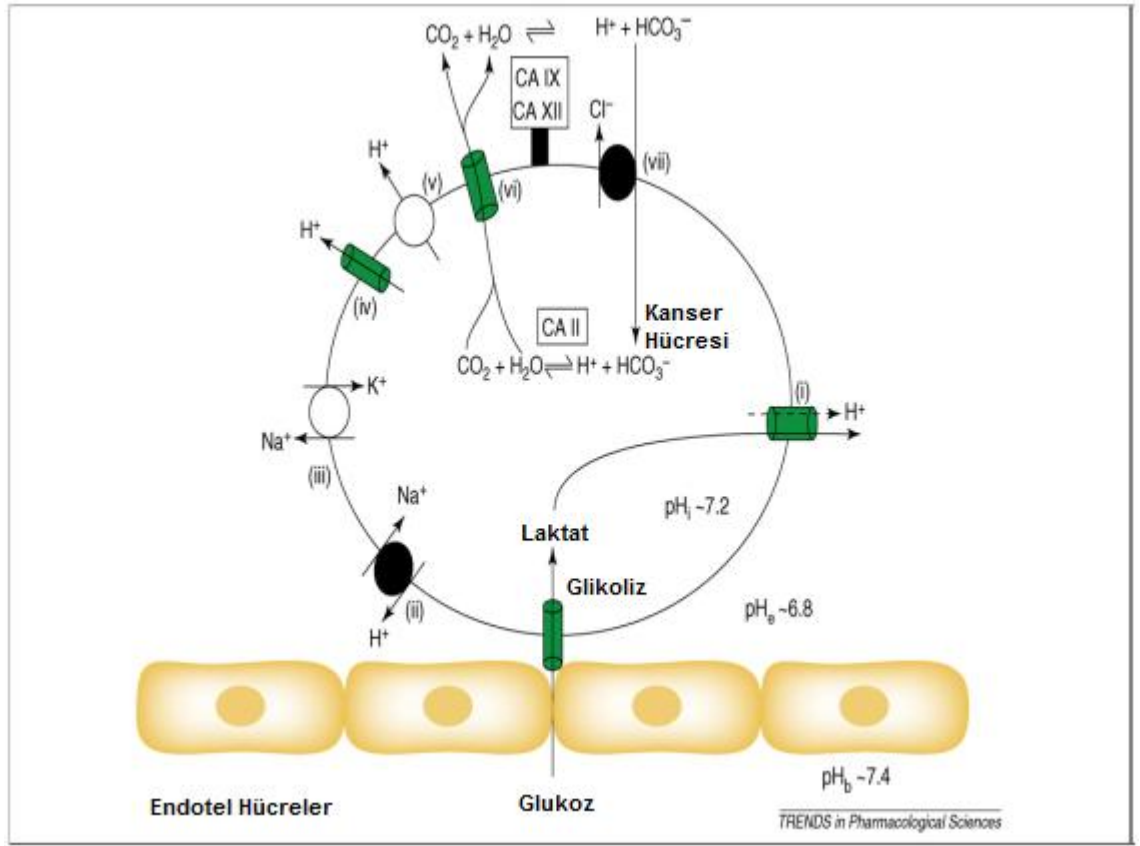


Şekil 1.10. Karbonik anhidraz IX'un normal ve kanserli hücrelerdeki dağılımı (Thiry *et al.* 2006)

*(Koyu renk daha fazla ekspresyon olduğunu ifade etmektedir.)

CA IX, hipoksi şartlar altında ve Hippel-Lindau (VHL) tümörler varlığında aşırı ekspresyon gösterir. Hipoksi, dokunun kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak oksijenin dokuya yeterince taşınamamasıdır. Bu olay doku hasarına, devam etmesi durumunda da nekroz denilen doku kaybına sebep olur. Hipoksi, bir çok kanser tipinde yaygın olan radyoterapi veya kemoterapi ile tedavi edilemeyen klinikal bir problemdir. Asidik hücre dışı pH, hipoksik tümör çevresinin tipik bir özelliğidir. Kanser ilerlemesi ile güçlü bir şekilde ortaya çıkar ve tedaviyi sonlandırır (Hockel and Vaupel 2001; Pastorekova *et al.* 2004).

Hücre içerisinde bulunan karbonik anhidraz izoenzimleri CO_2 'nin hidratasyonu ve HCO_3^- 'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizler. Bu reaksiyon sonucunda hücre içinde H^+ iyonu arttığından sitozolik pH artar. Reaksiyon sonucu oluşan H^+ iyonları hücre dışına transfer edilir ve hücre dışı asidifikasyonu artar. Asidik hücre dışı pH, proteolitik enzimlerin aktivasyonu ile tümör yayılımını kolaylaştırır (Webb *et al.* 1999). Bu hipoteze göre yapılan *in vitro* çalışmalar CA inhibisyonunun böbrek kanser hücrelerinin yayılımını azalttığını göstermiştir (Parkkila *et al.* 2000).



Şekil 1.11. CA IX izoenziminin tümörlü hücredeki pH regülasyonu ve iyon transportuna etkisi (Thiry *et al.* 2006)

Tümörlü hücrelerde CA IX'un hücre dışı bölgelerde pH kontrolü ile ilgisi araştırıldığında katalitik aktif bölgenin eliminasyonunun CA IX'un asidifikasyon kapasitesini bozduğu gözlenmiştir. Bu bulgulara göre Pastorekova ve grubu, hipoksi durumunda aşırı pH düşüşünün sadece laktik asit üretimi ile değil aynı zamanda CA IX'un katalitik aktivitesi ile de ilgili olduğunu açıklamışlardır (Kaluz *et al.* 1999).

Karbonik anhidraz IX izoenzimi hipoksida yüksek düzeyde ifade edilen genlerden birisidir. CA IX özellikle hipoksik tümör dokularında bulunup gastrointestinal yoldaki düşük düzeydeki ekspresyonu haricinde birçok normal dokuda bulunmayan yüksek aktiviteli ve tümörle ilişkili bir membran enzimidir. CA IX'un yeni antikanser tedavileri için ilaçlara hedef oluşturabileceği ve bir tümör ilerleme belirteci olduğu gösterilmiştir. CA IX yüksek aktiviteye sahip olmakla beraber sülfanamidlere karşı hassas bir izoenzimdir. Floresans ve membran geçirgenliğini etkileyen sülfanamidler gibi özgül

inhibitörler kullanılarak CA IX'un aktivitesinin engellenmesinin tümör pH'sını değiştirip asiditeyi azalttığı ve normal pH değerlerine doğru yaklaştırdığı gözlenmiştir. Bu nedenle CA IX, antikanser ilaç geliştirilmesinde; daha seçici ve etkin CA IX inhibitörlerinin kullanımıyla hipoksik kanserlerde pH dengesizliğinin kontrol edilmesinde ve genellikle klasik radyoterapiye ve kemoterapiye cevap vermeyen bu tümörlerin tanı ve tedavisinde yararlı olabilecektir. Sonuç olarak, CA IX integral bir plazma proteini olup CA ailesi içinde en yüksek protein transfer hızı, tümör pH'sını kontrol etme yeteneği ve yüksek katalitik aktiviteye sahip olması gibi özelliklerinden dolayı tümörlerin teşhisinde kullanışlı bir biyomarker olacağı düşünülmektedir (Ozensoy and Supuran 2007).

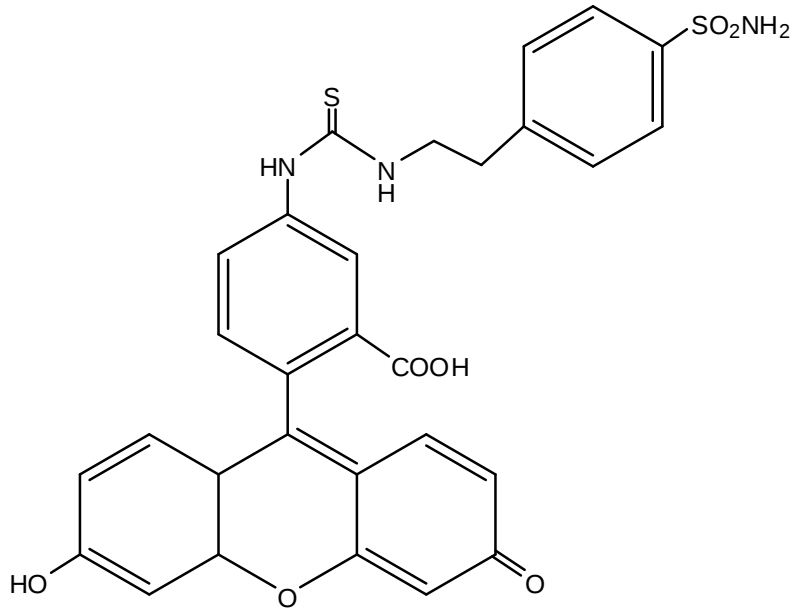
1.9. CA IX İnhibitörleri

CA IX, bütün diğer α -CA izoformlarında olduğu gibi anyonlar ve sülfonamidler tarafından inhibisyona uğrar. İnhibitörler doğrudan aktif bölgedeki çinko iyonuna bağlanır ve aktif bölgedeki aminoasit rezidüleri ile hem hidrofobik hem de hidrofilik etkileşimlere katılırlar (Thiry *et al.* 2006). CA inhibitörleri hücre içi asidifikasyonu önleyebildiği için son birkaç yılda CA IX'un sülfonamid türevi inhibitörleri keşfedilmiştir (Thiry *et al.* 2006; Nuti *et al.* 2007). Bunlar arasından bazı sülfamatlar ve sülfonamidler X-Ray kristalografi çalışmalarıyla karakterize edilmiştir. Böyle çalışmalar sonucunda bu bileşiklerin membranı geçemeyen bileşikler olduğu kanıtlanmıştır. Bundan dolayı bu bileşiklerin *in vivo* şartlarda özellikle CA IX'u inhibe ettiği anlaşılmıştır (Alterio *et al.* 2006).

Parkkila *et al.* (2000) güçlü bir CA inhibitörü olan asetazolamidin böbrek kanseri hücrelerinin yayılma kapasitesine olan etkisini analiz ederek kanserli hücrelerde CA aktivitesinin fonksiyonel rolünü araştırmışlardır. Araştırma sonucunda asetazolamidin sadece kanserli hücrelerin yayılımını azalttığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda CA IX inhibitörlerinin CA IX'un aşırı ekspresyon gösterdiği diğer tümörlerin yayılımını azaltabileceği savunulmaktadır.

Özensoy vd (2005) tarafından yapılan çalışmalarda aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerin ve üreaz/tiyüüreaz ile birleşmiş 4-aminoetil-benzensülfonamid ve metanilamid parçalarının en iyi hCA IX inhibitörleri olduğu belirlenmiştir.

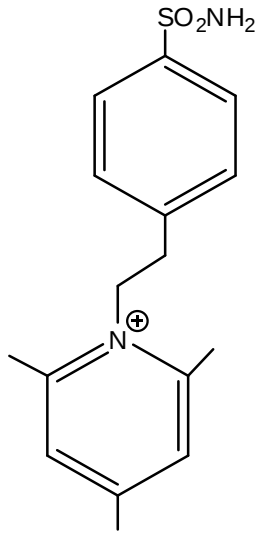
Svastova *et al.* (2004) tarafından araştırılan bileşikler CA IX'un güçlü ve en ilginç inhibitörleridir. Bu bileşiklerin ilki olan floresans sülfonamid, CA IX için yüksek afinite ile birlikte önemli ve güçlü bir inhibitördür (Winum *et al.* 2005; Menchise *et al.* 2005; Alterio *et al.* 2006).



Şekil 1.12. Floresans özellik gösteren sülfonamid bileşiğinin açık yapısı

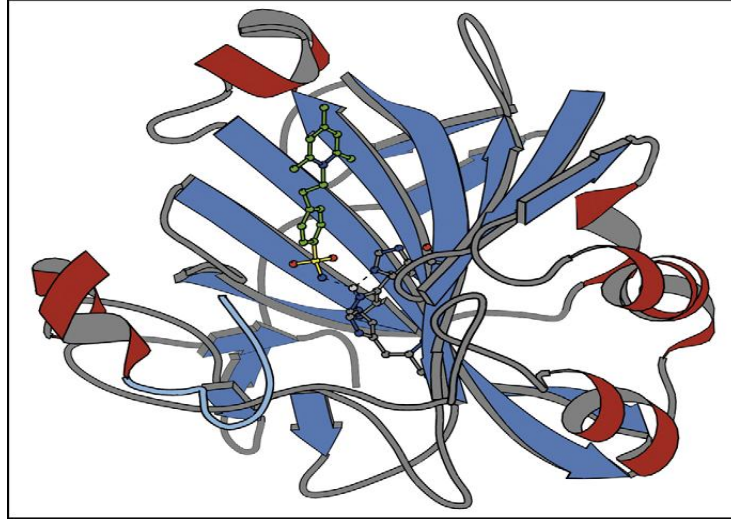
Bu bileşiğin hipoksik tümörler için floresans bir prob olarak yararlı olabileceği gösterilmiştir (Svastova *et al.* 2004). Bu inhibitör sadece *in vivo* hipoksi şartlar altında CA IX'a bağlanır. Bu durum biyokimyasal olarak henüz açıklanamamıştır. Ancak bileşiğin bu özelliklerinden dolayı hipoksik tümörlerin görüntülenmesi için tanı aletlerinin dizayn edilmesinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Svastova *et al.* 2004; Menchise *et al.* 2005; Cecchi *et al.* 2005).

Svastova *et al.* (2000) tarafından araştırılan ikinci bileşik ise daha önce Scozzafava *et al.* (2000) tarafından belirtilen membranı geçemeyen bileşiklerden olup pozitif yüklü bir sınıfa aittir. Pozitif yüklü piridinyum bileşiği güçlü bir CA IX inhibitörüdür. Membranı geçemediği için hücre içindeki CA'ları inhibe etmez. Bundan dolayı bu bileşik şu anda yaygın olarak kullanılan asetazolamid gibi bütün CA izoformlarını ayırım yapmaksızın inhibe eden bileşiklerle karşılaştırıldığında daha az yan etki gösterir (Supuran *et al.* 2003).

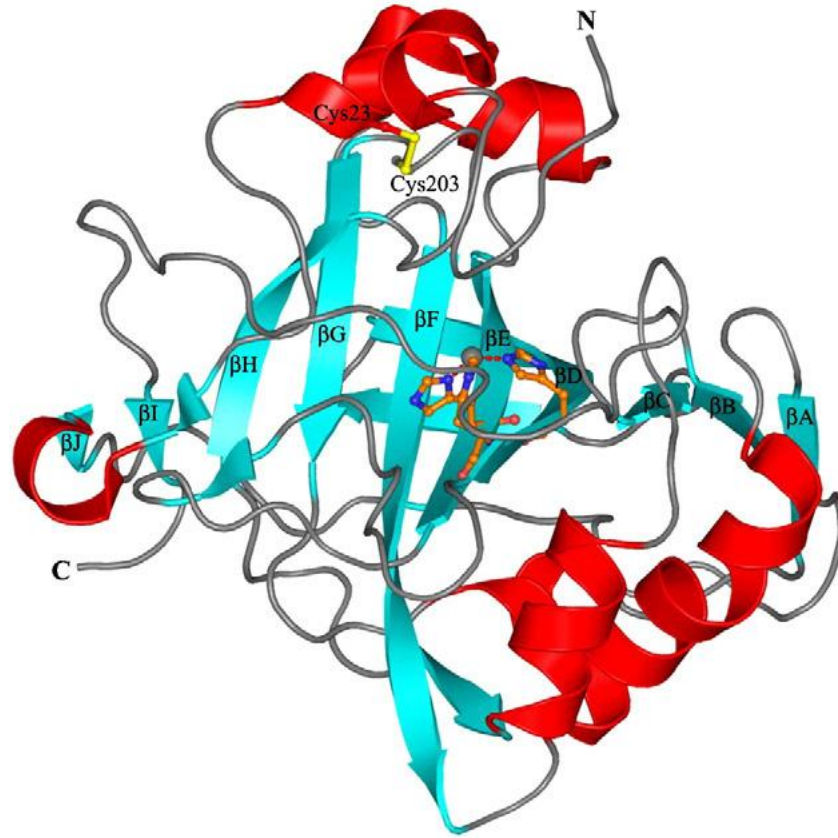


Şekil 1.13. Pozitif yüklü piridinyum bileşiğinin açık yapısı

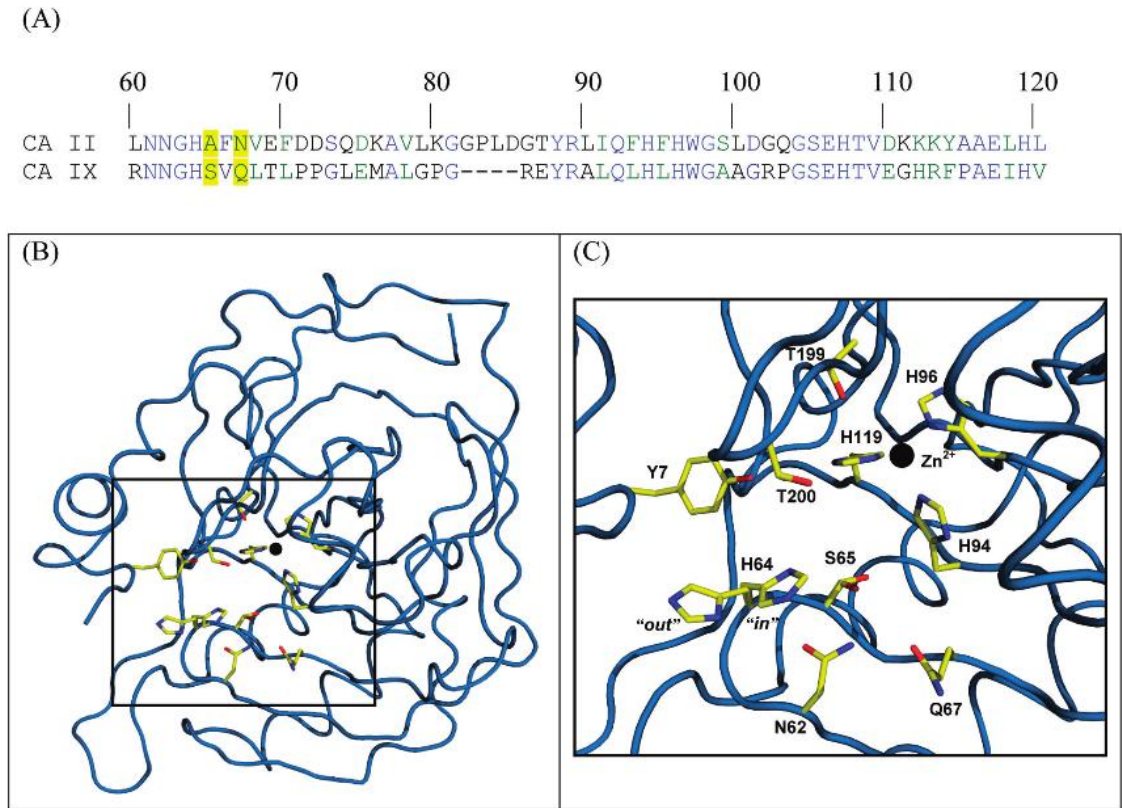
Bu bileşiğin X-Ray kristal yapısı CA II'nin yapısı kullanılarak çözülmüştür (Alterio *et al.* 2006; Thiry *et al.* 2006). Bu pozitif yüklü piridinyum bileşiği enzimin aktif bölgesindeki aminoasitlerle uygun etkileşimlere katılır (Menchise *et al.* 2005). CA IX'un X-Ray yapısı henüz tam olarak açıklanamadığından CA IX inhibitörlerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda CA II'nin yapısı referans olarak kullanılmaktadır.



Şekil 1.14. Seçici CA IX inhibitörleri olan floresans sülfonamid ve membranı geçemeyen pozitif yüklü piridinyum bileşiğinin CA II ile yaptığı kompleksin X-Ray kristal yapısı (Thiry *et al.* 2006)

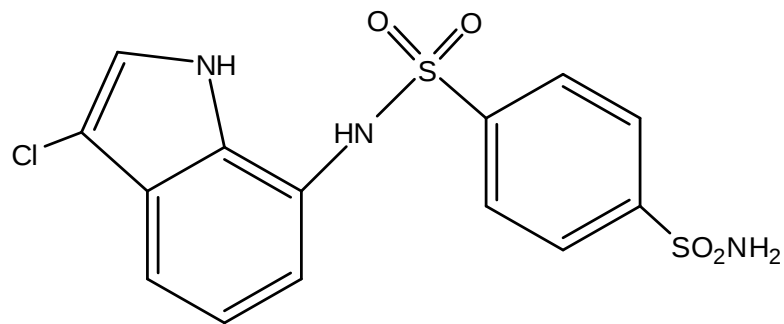


Şekil 1.15. CA II'nin yapısı referans alınarak tasarlanan insan CA IX izoenziminin X-Ray kristal yapısı. Kırmızı renkli aminoasitler heliks yapıyı, yeşil renkli aminoasitler β katlanmalarını göstermektedir (Giuseppina and Supuran 2010).



Şekil 1.16. Mimic CA IX'un yapısı ve dizilimi (A) CA II ve CA IX'un 60. rezidüden 120. rezidüye kadar aminoasit diziliminin hizalanması (B) Mimic CA IX'un kristal yapısı (C) Mimic CA IX'un yakın çekim görünümü (Genis *et al.* 2009)

İndisulam bileşiği, Owa ve grubu tarafından keşfedilen bir sülfonamid türevidir (Yokoi *et al.* 2002). Antitümör sülfonamidler grubuna dahildir ve hücre döngüsünün ilerlemesini G1 aşamasında engeller.



Şekil 1.17. İndisulam bileşiğinin açık yapısı

İndisulam bileşiği serbest bir SO_2NH_2 grubuna sahiptir ve güçlü bir CA inhibitörü olarak davranır. İndisulamın CA IX'un nanomolar bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Raghunand *et al.* 1999; Joseph *et al.* 2011).

İndisulam insan kolon kanseri gibi farklı insan tümörlerinde hem *in vivo* hem *in vitro* şartlarda önemli bir antitümör aktivitesi gösterir. İndisulam sadece tümörün yayılmasını değil aynı zamanda tümör büyüklüğünün azalmasını da sağlar. Solid tümörlerin tedavisi için indisulamın faz I ve faz II klinik çalışmaları devam etmektedir (Stubbs *et al.* 2000).

Seçici CA IX inhibitörleri özellikle hipoksik hücrelerde bulunan CA IX'a bağlanıp enzimin katalitik aktivitesini inhibe ederek ortalama aktiviteyi düşürürler. CA IX inhibitörlerinin, CA IX'un hipoksik kanserlerdeki rolünü açıklamada, tümör hücrelerindeki pH dengesizliğinin kontrolünde ve tümör tedavisi için tanı yöntemlerinin keşfedilmesinde yararlı olabileceği kanıtlanmıştır.

Aromatik ve heterosiklik sülfonamidlerle CA IX'un inhibisyon çalışmaları, CA IX'un sitozolik CA I, II izoenzimleri ve membrana bağlı olan CA IV izoenziminden çok farklı inhibisyon profili olduğunu göstermiştir. Aromatik sülfonamidler, heterosiklik türevlerle ve aromatik bileşiklerle karşılaştırıldığında CA I, II ve CA IV için zayıf inhibitör olarak davranırlar. CA IX'da ise aromatik türevler ve heterosiklik bileşikler benzer inhibisyon oranına sahiptir. Ortonilamid türevleri CA I, II ve CA IV için zayıf inhibitör özelliği gösterirken CA IX için çok güçlü inhibitörler olarak davranırlar. Metanilamid, sülfanilamid ve 4-hidrazinbenzensülfonamid CA IX ve CA II'e karşı benzer inhibisyon gösterirler. Homosülfonamid ve 4-aminoetil-benzensülfonamid CA II ile karşılaştırıldığında CA IX için daha iyi inhibitörlerdir. Halojensülfonamidler, CA II'e göre CA IX için çok daha zayıf inhibitörlerdir. Araştırılan bu bileşikler içinde 4-aminobenzolamid CA II'nin en güçlü inhibitörü iken CA IX için güçlü bir inhibitör değildir. Bu bileşikler içinde en güçlü CA IX inhibitörü etoksizolamid fenol'dür.

Asetazolamid, metazolamid, etoksizolamid, diklorofenamid 40 yıldan uzun bir süredir CA I inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Dorzolamid ve brinzolamid ise CA I inhibitörü

olup antiglokom özelliği gösterirler. Bunlar arasında en iyi CA IX inhibitörünün asetazolamid olduğu gösterilmiştir (Supuran *et al.* 2001; Supuran *et al.* 2002).

1.10. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisinin başarılı uygulamaları aracılığı ile uygun gen ekspresyon sistemleri kullanılarak arzulanan proteinin çok miktarda üretimi olanaklıdır (Lin *et al.* 2001). Rekombinant DNA teknolojilerinde son gelişmeler, proteinlerin yüksek düzeyde ekspresyonunda önemli ilerlemelere katkıda bulunmuştur. İlgilenilen rekombinant proteinlerin miktarını artırmak üzere geliştirilen fermentasyon optimizasyon stratejileri veya biyosentezi transkripsiyonel düzeyde iyileştiren genetik manipulasyonlar, bu proteinlerin üretimlerinde önemli artışlara öncülük etmektedirler. Bununla birlikte, üretimin daha yüksek seviyeleri hala istenen bir durumdur. Rekombinant protein üretiminin translasyonel ve transkripsiyonel düzeyde optimize edilmesinin dışında, pek çok post-translasyonel faktör (proteinin katlanması ve olgunlaşması ile konağın fizyolojik aktiviteleri gibi) biyosentez düzeyini etkileyebilmektedir. *E.coli*'de yabancı proteinlerin ekspresyonu, çoğunlukla konağın yıkıcı aktivitelerinin artmasına neden olan metabolik bir sıkıntıya yol açmaktadır. Hücre içi konak bağımlı proteolizisin biyoteknolojik sonuçları, çoğunlukla ürün kaybı ve proteolitik ürünlerle bulaşmış şekildedir. Rekombinant proteinlerin hücre içi proteolitik yıkımını azaltmak üzere hücrelerin büyüme hızının düşürülmesi, koruyucu füzyonlar ve kırılma bölgelerinin ortadan kaldırılması için spesifik rezidülerin yer değiştirmesi gibi çeşitli genetik stratejiler geliştirilmiştir (Ignatova *et al.* 2003). Bunun yanında hücre fizyolojisi, rekombinant proteinlerin yüksek düzeyde üretiminden ciddi şekilde etkilenme eğilimindedir ve yabancı gen ürünleri, hücre içi proteolizise eğilimlidir. Bu nedenle, rekombinant protein üretimini iyileştirmek için, hücre içi proteolizisi en aza indirmeye dayanan genetik stratejiler de (proteazdan yoksun suşların kullanımı gibi) geliştirilmiştir. Bu stratejiler kullanılarak rekombinant protein üretimi için kültürasyon çalışmalarında, hedeflenen iki önemli nokta vardır. Bunlardan ilki yüksek hücre yoğunluğuna ulaşmak, diğeri ise yüksek düzeyde gen ekspresyonudur. Rekombinant protein üretiminin kültür performansı, bu iki nokta aynı anda gerçekleştiğinde optimize

edilebilmektedir. Bu stratejiler transkripsiyonel etkinliğin yanı sıra translasyonel etkinliği de iyileştirmek yoluyla rekombinant protein üretimini arttırmak için başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ancak, yapılan çalışmalarda ürünün çözünmez inklüzyon cisimcikleri halinde birikimine neden olan dengesiz bir protein akışına sebep olduğu görülmektedir. Sitoplazmik inklüzyon cisimciklerine bağlı sorun, proteinlerin yüksek düzeyde ekspresyonu için düşük kopya sayılı plasmidlerin kullanılmasıyla aşılabilir. Periplazmik inklüzyon cisimciklerinin miktarı, periplazmik proteazlarla beraber koekspresyon yoluyla önemli ölçüde indirgenmiştir (Pan *et al.* 2003; Ignatova *et al.* 2003).

1.11. Prokaryotlarda Rekombinant Protein Ekspresyon Sistemleri

Rekombinant proteinlerin ekspresyonunda prokaryotik ve ökaryotik ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. Prokaryot ekspresyon sistemleri ekspresyonun daha ucuz ve ekonomik olmasından dolayı ilk tercih edilen sistemlerdir. Ekspre edilen proteinin kompleks post-translasyonel modifikasyonları gerekli değilse prokaryot ekspresyon sistemleri kullanılır. Prokaryotik ekspresyon sistemleri arasında en yaygın olarak *E.coli* ve *B.subtilis* tercih edilmektedir. İlk olarak Itakura ve arkadaşları tarafından bir memeli peptid hormonu olan somatostatinin *E.coli*'de ekspre edilmesiyle yabancı bir genin prokaryotik hücrelerde *in vitro* olarak üretilebileceği anlaşılmıştır. Günümüzde gram (-) bir bakteri olan *E.coli* rekombinant proteinlerin üretiminde sıklıkla tercih edilmektedir. Bunun nedeni üretiminin ekonomik olması, hızlı bir şekilde çoğalabilmesi ve genetiğinin iyi aydınlatılmış olmasıdır. *E.coli* toksik rekombinant proteinlerin ekspresyonu için de oldukça caziptir (Yin *et al.* 2007).

Gen ekspresyon seviyelerini etkileyen genetik mühendisliği metotları, rekombinant proteinlerin biyosentezini iyileştirmek için daha fazla seçenek getirmektedir. Bunların arasından, genlerin 5'- ve 3'- ne bitişik düzenleyici bölgeleri üzerinden transkripsiyonel düzenleme, mRNA kararlılığı ve kodon kullanımı gibi bazıları her bir gen için spesifiktir. Bu değişkenler bireysel olarak optimize edilmelidirler. Rekombinant ekspresyon sisteminin oluşturulmasında çok sayıda elementin merkezi önemi vardır.

Ekspresyonda ekspre edilecek geni taşıyan plasmid uygun bir sistemde teşvik edilir. Ekspresyonu etkileyen çok sayıda parametre vardır. Bunlardan bazıları;

Ekspresyon vektörünün seçimi: Çok farklı ekspresyon sistemleri olsa da ekspresyon plasmidi; replikasyon orijini (*ori*), antibiyotik direnç geni, transkripsiyon promotörleri, translasyon başlangıç bölgeleri (TIR) ve transkripsiyon-translasyon sonlanma bölgeleri gibi genetik elementleri içermelidir.

Rekombinant ekspresyon plasmidlerindeki en yaygın ilaç direnç genleri ampisilin, kanamisin, kloromfenikol ve tetrasikline karşı etkilidir. Direnç genleri plasmidler için seçici bir özellik sağlar. Plasmidin ampisiline karşı direnci bla genindeki β -laktamazın ekspresyonu ile başarılır. Bu enzim ampisilin antibiyotiğindeki β -laktam halkasının hidrolizini katalizler. Kültür ortamında bulunan ampisilin β -laktamaz enzimi ile degrades edilir, bu durum ampisilin direnç geni içeren plasmidler için seçici bir özelliktir. Kanamisin antibiyotiği periplazmaya salgılanan aminoglikozit fosfotransferaz enzimi ile inaktive edilir. Kloromfenikol antibiyotiği ise *cat* geni ürünü olan kloromfenikol asetil transferaz enzimi ile inaktive edilir. Çeşitli genler tetrasiklin antibiyotiğine direnç özelliği sağlar.

Rekombinant ekspresyon plasmidi yüksek seviyede gen ekspresyonunu kontrol eden güçlü bir transkripsiyonel promotor içermelidir. İndükleyici yokluğunda bazal transkripsiyon uygun bir represörün varlığı ile minimum seviyede tutulur. Bazal transkripsiyonun minimum seviyede tutulması özellikle, hedeflenen ekspresyon hücrel bir stres ile karşılaştığında ve plasmid kaybı gerçekleştiği durumlarında önemlidir. Promoter indüklenmesi ya termal yada kimyasal yolla olur ve en yaygın kullanılan indükleyici ajan bir şeker molekülü olan izopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit (IPTG)'tir.

***E.coli* Soyuları:** Rekombinant protein ekspresyonunda soyun genetik özellikleri oldukça önemlidir. Ekspresyon için seçilen soy doğal olarak zararlı olan proteazları içermemeli ve ekspresyon sistemine uygun elementleri içermelidir. *E.coli*'nin BL-21 soyu

rekombinant protein ekspresyonunda sahip olduğu özellikleri açısından yaygın olarak kullanılır. Genomunda T7 RNA polimeraz geni bulunur. IPTG ile teşvik edilebilir.

Füzyon protein teknolojisi: Rekombinant proteinlerin ekspresyonu ve saflaştırılmasını kolaylaştırmak için yüksek oranda füzyon protein stratejisi geliştirilmiştir. Füzyon veya şimerik proteinler, spesifik proteazlara tanıma bölgesi ile, hedef proteine bağlı olan genellikle bir kuyruk, alıcı hücrenin kararlı bir proteinini içerir. Proteinin periplazmaya veya besiyeri ortamına salgılanması istendiğinde, protein alıcı proteazları tarafından degrade olmasını engeller. Salgılama amaçlı, gerekli sinyalleri taşıyan bir protein hedef protein ile birleştirilir. Bu yolla meydana gelen füzyon protein, genellikle doğal protein gibi salgılanır. Çok sayıda füzyon çifti, spesifik afinite saflaştırma stratejileri ile saflaştırılır. Saflaştırma sonrası kimyasal degradasyon yolu veya spesifik proteaz uygulaması ile füzyon proteinler ayrılır. Füzyon proteinler *in vivo*'da hücreler arası proteolizi önlemesi, kararlılığı arttırması gibi avantajlı özelliklere sahiptir. Spesifik ekspresyon habercisi olarak kullanılabilir.

İnklüzyon Cisimciklerinin Oluşması

Rekombinant proteinin yüksek seviyede ekspresyonu *E.coli*'de bir stres cevabı oluşturabilir. Isı şoku, aminoasit tükenmesi veya açlığı gibi çevresel koşullar stres cevaplarının oluşmasına neden olur. Protein aktivitesi tam üç boyutlu yapı katlanmalarına bağlıdır. Isı şoku gibi stres koşulları *in vivo*'da protein katlanmalarını bozar ve inklüzyon cisimleri olarak adlandırılan şekilsiz protein granüllerinin oluşumuna neden olur. Inklüzyon cisimleri, rekombinant proteinin yüksek oranda ekspresyonu sırasında, stres cevabı olarak oluşur. *E.coli* sitoplâzmasındaki 200-300 mg/ml miktarındaki protein konsantrasyonu, rekombinant protein ekspresyonu sırasında protein katlanmaları için uygun olmayan bir çevre oluşturur. Rekombinant ekspresyon sisteminde inklüzyon cisimlerinin oluşumu *in vivo*'da protein kümeleşmesi ve çözülmesi arasındaki dengesizlik nedeniyle oluşur. Rekombinant sistemdeki protein kümeleşmesi, sıcaklık, ekspresyon oranı, *E.coli* metabolizması, çözünür kuyruk

teknolojisi gibi hedef protein mühendisliği ve şaperon kodlayan plasmid ile birlikte ekspresyon gibi parametrelerle azaltılabilir (Sorensen 2005; Aydoğan 2006).

1.12. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada kanser ilişkili karbonik anhidraz IX izoenziminin; insan pankreas dokusundan klonlanması, klonlanan ekspresyon vektörünün *E.coli* hücrelerine transformasyonu, *E.coli*'de ekspresyonu, ekspre edildikten sonra Ni reçine kolonu kullanılarak afinite kromatografisi tekniği ile belirli ölçüde saflaştırılması ile saf enzim üzerine bazı antitümör ilaçların ve kimyasalların inhibisyon etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Tümör mikroçevresinde asidifikasyondan sorumlu ve genellikle kanserli hücrelerde aktivite gösteren CA IX izoenziminin; kanser dokusundan izolasyonunun çok zor olması ve hatta bazı durumlarda ise imkânsız olması, enzimin saflık derecesinin inhibisyonu önemli derecede etkilemesi ve bundan dolayı daha sağlıklı sonuçların elde edilememesi gibi sorunlar enzimin yüksek oranda saflaştırılması zorunluluğunu ortaya çıkarmaktadır. Bu yüzden hCA IX izoenzimi, çalışmada kullanılmak üzere rekombinant protein olarak üretilmiştir.

Elde edilecek sonuçların hCA IX izoenziminin inhibisyon mekanizmasının daha ayrıntılı olarak aydınlatılmasına, hCA IX'a karşı daha güçlü ve etkili inhibitörlerin geliştirilmesine ve kanser tedavisinde kullanılacak yeni ilaçların dizaynı ve farmakolojik uygulamaları için altyapı oluşturmaya önemli bir katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karbonik anhidraz enzimi ilk olarak memeli eritrositlerinden saflaştırılmıştır. Daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan salviası, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve daha birçok kaynaktan da karakterize edilerek enziminin katalitik mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır (Beydemir ve Gülçin 2004). 1933 yılında Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien birbirlerinden habersiz olarak CA enzimini, ilk kez eritrositlerden akciğer kılcal damarlarına bikarbonatın hızlı transferini gerçekleştiren katalitik faktörün arandığı bir çalışma sonucunda bulmuşlardır. Meldrum ve Roughton, daha sonraki yıllarda CA enzimini diğer memelilerin eritrositlerinden saflaştırmak için yeni yöntemler geliştirmişlerdir. Keilin ve Martin ise 1944 yılında enzim aktivitesinin Zn^{+2} konsantrasyonuna bağımlı olduğunu ve aktif bölgesinde Zn^{+2} içerdiğini bulmuşlardır. Dolayısıyla CA tanımlanan ilk metaloenzim olarak tarihe geçmiştir. Lindskog, 1960 yılında sığır eritrositlerinde elektroforetik olarak ayırt edilen 2 ayrı karbonik anhidraz enzimi bulmuştur. İnsan, maymun, at, tavşan, gine domuzu (Tappan *et al.* 1964) ve sıçan eritrositlerinde (McIntosh 1969) turnover sayıları birbirinden farklı en az 2 çeşit CA enzimi olduğu saptanmıştır. Byvoet ve Gotti 1967 yılında CA enzimini köpek böbreğinden kısmen saflaştırmışlardır. McIntosh 1969 yılında sıçan dorsolateral prostat bezlerinden iki çeşit CA enzimini homojen bir saflıkta elde etmiştir. Appleton ve Sarkar 1974 yılında karbonik anhidraz aktivitesinin çinko atomu yakınlarındaki iyonlaşabilir gruplarla ilgili olduğunu belirtmişlerdir.

CA enzimi birçok araştırmacı grup tarafından farklı kaynaklardan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. CA enzimini; Demir vd 2004 yılında sığır midyesinden saflaştırarak enzimin molekül kütlesini 30 kDa olarak, Hisar vd 2005 yılında gökkuşağı alabalığı eritrositlerinden saflaştırarak enzimin molekül kütlesini 28 kDa olarak, Beydemir vd 2006 yılında gökkuşağı alabalığının lensinden saflaştırarak enzimin molekül kütlesini yaklaşık 27 kDa olarak, Söyler 2006 yılında Van kedisinin eritrositlerinden saflaştırarak enzimin molekül kütlesini 30 kDa olarak, Söyüt vd 2008 yılında gökkuşağı alabalığı beyninden saflaştırarak enzimin molekül kütlesini yaklaşık

29 kDa olarak, Söyüt ve Beydemir yine 2008 yılında gökkuşığı alabalığının karaciğerinden saflaştırarak enzimin molekül kütleini 29,4 kDa olarak, Söyüt ve Beydemir 2011 yılında gökkuşığı alabalığının böbrek dokusundan saflaştırarak enzimin molekül kütleini 28,7 kDa olarak, Bursal 2009 yılında kivi meyvesinden saflaştırarak enzimin molekül kütleini 66 kDa olarak, Yaylacı 2009 yılında mersin alabalığı eritrositlerinden saflaştırarak enzimin molekül kütleini 29 kDa olarak, Demirdağ vd 2011 yılında koyun karaciğer dokusundan saflaştırarak enzimin molekül kütleini yaklaşık 29 kDa olarak, Kılınç 2011 yılında koyun midesinden saflaştırarak enzimin molekül kütleini 26,7 kDa olarak bulmuşlardır.

Canlı dokularında çok büyük öneme sahip olan karbonik anhidraz enzimi görüldüğü gibi her canlıda farklı kısımlarda aktivite göstermektedir ve sadece o canlının metabolizmasına spesifiktir. Yani karbonik anhidraz enzimi farklı canlı metabolizmalarında farklı yapılarda ve molekül kütlelerinde fonksiyon gösteren ve canlılarda hayati önemi bulunan bir enzimdir. Dolayısıyla bu enzimin canlı metabolizmasında nerelerde ve hangi şekilde lokalize olduğu ve nasıl bir fonksiyon gösterdiğini belirleyebilmek için pekçok çalışma yapılmış ve enzim birçok canlıdan karakterize edilerek kinetik özellikleri incelenmiştir.

CA enziminin metabolizmada son derece önemli olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekleyebilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu Pocker ve Janjic'in 1989 yılında yapmış olduğu çalışma ile anlaşılmıştır.

CA enzimleri hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıklarının birçoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar karbonik anhidraz izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Bülbül vd 2003). Örneğin insanlarda glokom hastalığında CA inhibitörleri farmakolojik ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca CA aktivitesindeki değişiklikler kanser başta olmak üzere diyabet, şeker hastalığı ve

hipertansiyon gibi metabolik hastalıklarla da ilgilidir (Casini *et al.* 2002; Gülçin vd 2004).

Karbonik anhidraz IX insanlarda bulunan 16 farklı CA izoformundan biridir ve hücre dışı karbonik anhidraz domaini içeren transmembran bir proteindir (Kaluz *et al.* 2009).

Kivela *et al.* tarafından 2003 yılında yapılan bir çalışmada CA IX'un, klasik karbonik anhidraz enzim aktivitesinin yanı sıra, hücre adezyon işleminin modülasyonu ve hipoksik çevredeki tümörün ilerleyip hücredeki artışının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir.

1994 yılında Pastorek *et al.* tarafından birçok kanser türünde CA IX izoenziminin var olduğu keşfedilmiş ve bu izoenzimin interselüler iletişim ve asit-baz dengesini sağlama fonksiyonu gözlenmiştir. 1997 yılında Pastoreková ve grubu tarafından CA IX'un normal olarak ifade olduğu yerlerin sindirim sistemi epitellerinde bazolateral plazma membranları, midenin ve safra kesesinin mukozası olduğu rapor edilmiştir. 1998 yılında Saarnio *et al.* CA IX'un; duodenum ve ince bağırsağın ilk bölümlerinde ifadesi daha fazla iken rektuma doğru gittikçe azaldığını, mide epitelinin aksine bağırsak epitelinde ifadesinin daha çok olduğunu tespit etmişlerdir. Liao *et al.* 2009 yılında yapmış oldukları bir çalışmada pankreas ve safra kanallarındaki epitelde, erkek üreme organlarında ve vücut boşluklarını döşeyen mezotelde de CA IX'un bulunduğunu bildirmişlerdir.

CA IX, hipoksik ortamlarda tümör mikroçevresinde asidifikasyon aracılığı ile tümör büyümesi ve invazyonuna katkıda bulunur (Cianfrocca and Goldstein 2004). CA IX, hücre membranının her iki yönünde pH farklılığının devamlılığını sağlar. Bir çalışmada, CA IX'un hipoksik şartlarda tümör hücrelerinin pH'sını asidifiye ederek, meme tümör hücrelerinin sağkalımındaki down regülasyonu azalttığı gösterilmiştir (Potter and Harris 2003). Lancaster *et al.* 2001 yılında servikal kanser hücrelerinde, Eppendorf mikroeletrod yöntemi ile tümör hipoksisini ölçmüşler ve hipoksik durum ile CA IX ekspresyonu arasındaki direkt ilişkinin varlığını göstermişlerdir. Lancaster *et al.* 2001

yılında yapmış olduğu bir çalışmada CA IX'un, tümör dokularının immünohistokimyasal incelemesinde hipoksiyi saptamada bir markır olabileceğini savunmuşlardır.

Çeşitli tümör hücrelerinde ve bazı kanser hastalarında CA I ve CA II izoenzimlerinin ekspresyonu araştırılmış fakat normal ve kanserli hücrelerde bu izoenzimlerin ekspresyonu arasındaki ilişkiyi bulmakta zorlanılmıştır (Pastorek *et al.* 1994; Ozensoy *et al.* 2006). CA I-VII izoenzimlerinin ekspresyonu ve tümör oluşumu arasında doğrudan bir ilişki olduğuna dair kanıt bulunamamıştır. Yalnızca CA IX ve CA XII izoenzimlerinin tümörlü hücrelerde gl bir şekilde ekspresyon sergilediği kanıtlanmıştır (Pastorekova *et al.* 2007).

Tümör ilişkili CA IX, ilk olarak 1994 yılında Pastorek ve grubu tarafından serviks kanseri hücre hattı olan Hela'dan klonlanarak elde edilmiştir. 1996 yılında Opavsky ve arkadaşları tarafından biyokimyasal olarak karakterizasyonu yapılmıştır. Kanser hücre hatlarından elde edilen ve normal dokulardan elde edilen CA IX cDNA dizileri karşılaştırıldığında, tümör hücreleri ve normal hücrelerde farklı fonksiyonlara sebep olabilecek herhangi bir mutasyon bulunamamıştır (Pastorekova 1997; Barathova *et al.* 2008).

Pastorek *et al.* 1994 yılında, CA IX'un gastrointestinal sistemde ekspresyonunu ilk aıklayandır. Turner *et al.* 1997 yılında özofagus epitelyumunun bazal tabakasında zayıf immunoblotlama görüldüğünü belirttiği halde Pastorek *et al.* 1994 yılında gastrik epitelyumun plazma membranlarında şiddetli blotlamalar olduğunu immunoistokimyasal olarak göstermişlerdir. McKiernan *et al.* 1997 yılında ve Parkkila *et al.* 2000 yılında yapmış oldukları çalışmalarda tüm özofagus skuamöz hücre karsinomaları, bütün epitelyum lezyonları ve özofagus adenokarsinomalarının %80'i pozitif reaksiyon vermiştir. Normal böbrek dokusunda CA IX proteini tespit edilememiştir, fakat bazı insan böbrek kanser hücreleri ve adenokarsinomalarda CA IX'a ait mRNA veya proteini yüksek oranda ekspresyon gösterdiği belirtilmiştir.

Parkkila *et al.* 2000 yılında kanserli hücrelerde CA aktivitesinin fonksiyonel rolünü böbrek kanseri hücrelerini analiz ederek araştırmışlardır. Araştırma sonucunda bazı kimyasalların kanserli hücrelerin yayılımını azalttığını gözlemlemişlerdir.

Haapasalo *et al.* tarafından 2006 yılında çeşitli dokularda CA IX'un ektopik ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Normal insan beyin dokusu çok az ekspresyon göstermiş veya hiç göstermemiştir. 362 astrositik tümör hücresinin 284'ünde immunopozitivite görülmüştür.

Liao *et al.* 1994 yılında immunoblotlama metodlarını kullanarak uterus, serviks, yumurtalık ve endometriyum karsinomalarında CA IX proteininin ekspresyonunu tanımlamışlardır. CA IX proteinine ait ilk immunohistokimyasal çalışmada %90'dan fazla displastik ve kötü huylu servikal epitelyum örnekleri pozitif immunoreaksiyon verdiği halde normal servikal epitelyum ekspresyonu zayıf bir blotlama gösterdiği belirtilmiştir.

Birçok çalışmada CA IX, intrensik hipoksik markır olarak gösterilmiştir. CA IX proteini servikal displazili örneklerde ekspre olduğu için servikal sitolojide umut verici bir biyomarkır olarak düşünülmektedir. Bütün çalışmalar CA IX proteininin servikal neoplazi'de potansiyel bir biyomarkır olduğu ve displastik ve kötü huylu hücreleri aydınlatmada kullanılabileceği sonucuna götürmüştür (Liao *et al.* 1994; Brewer *et al.* 1996; Liao *et al.* 1996).

Wingo *et al.* 2001 yılında insan CA IX izoenziminin katalitik olarak aktivite gösteren bölgesini klonlayarak üretilen bazı kinetik özelliklerini incelemişlerdir. CA IX izoenziminin aktif bölgesini kodlayan aminoasitlerin, katalitik olarak etkili insan CA II izoenzimini kodlayan aminoasitlerle %36 benzerlik gösterdiğini fark etmişlerdir. Ayrıca CA IX izoenziminin katalitik aktivitesini diğer CA izoenzimlerinin katalitik aktiviteleri ile kıyas yaparak analiz etmişlerdir. Araştırma sonucunda CA IX izoenziminin katalitik aktivitesinin genel olarak diğer CA izoenzimlerinin katalitik aktivitelerinden daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir.

Özensoy 2006 yılında bakteriyel ekspresyon sistemini kullanarak insan CA IX izoenziminin ekspresyonunu gerçekleştirmiştir. Ekspresyon sonucu elde edilen enzimi afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırarak enzimin molekül kütleini yaklaşık 56 kDa olarak bulmuştur. Saf enzim üzerine 11 çeşit kemoterapi ilacı ve 15 çeşit antibiyotik ile *in vitro* olarak inhibiyon çalışmaları yapmıştır.

Hilvo *et al.* 2008 yılında bakülovirüs-böcek hücre ekspresyon sistemini kullanarak insan CA IX izoenziminin biyokimyasal olarak karakterizasyonunu yapmışlardır. Bakülovirüs-böcek hücre ekspresyon sisteminin bakteriyel ekspresyon sistemlerinden daha avantajlı olduğunu savunmuşlardır. Çalışmada CA IX izoenziminin hem katalitik olarak aktivite gösteren bölgesini (CA) hem de katalitik olarak aktivite gösteren bölgesi ile proteoglikan bölgesini (PG+CA) beraber klonlayarak üretip enzimin bazı kinetik özelliklerini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda en yüksek aktivite gösteren formun CA IX izoenziminin, katalitik olarak aktivite gösteren bölgesi ile proteoglikan bölgesinin (PG+CA) beraber klonlanarak üretilen formu olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yıldırım 2009 yılında insan CA IX promoter dizisi ile *Mus musculus* CA9 promoter dizisinin karşılaştırmasını yapmıştır. Buna göre iki türün promoter dizileri arasında transkripsiyonel başlangıç noktasına yakın olan 725 nükleotidlik bölgede homoloji gösterdiğini ve yaklaşık %66,1 oranında iki türün promoter dizilerinin benzerlik gösterdiğini tespit etmiştir.

Yukarıda belirtildiği gibi birçok literatürde CA IX izoenziminin yapısının ve inhibisyon mekanizmasının aydınlatılması ve kanserin yayılımına karşı koruyucu ilaç geliştirmek için daha kapsamlı inhibisyon çalışmaları yapılarak spesifik ve güçlü CA IX inhibitörlerinin belirlenmesi gerektiği ifade edilmektedir. Bu bilgiler göz önüne alındığında bu tez kapsamında yapılan çalışmaların önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda klonlama amaçlı kullanılan pGEM-T Easy vektörü ile IPTG Promega'dan; ekspresyon amaçlı kullanılan pETSUMO protein ekspresyonu kiti ve cDNA sentezi için SuperScript® III First-Strand İnvitrogen'den; gene spesifik primerler Metabion'dan; X-GAL ile T4 DNA ligaz Fermentas'tan; Plasmid DNA izolasyon kiti, lizozim, dNTP, taq DNA polimeraz, ampisilin, kanamisin, standart serum albümin (BSA), N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları, trietanolamin, benamidin Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azitür, gliserin, etanol, metanol, asetik asit, sodyum asetat, E.Merck AG'den; akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brilliant blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat, β -merkaptotanol, jel yükleme tamponu ise piyasadan temin edilmiştir.

3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Otoklav	: Hirayama HV-50L
İnkübatör	: Binder
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	: Edmund Bühler GmbH KS-15
DNA elektroforezi	: Thermo EC 135-90 (yatay)
Jel Görüntüleme	: Vilber Lourmat-ECX-20-M
Thermocycler	: Bio Rad C-1000 Thermal Cycler
Mikrodalga Fırın	: Beko MD-1500
Isı Blokları	: Lab-Line, VWR Digital Heatblock
Steril Kabin	: Telstar Bio-II-A

Mikro santrifüj	: Hettich Zentrifugen
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Beckman Coulter DU 730
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: Bio Rad (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025, Zhicheng ZHWY-200-D
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer, WiseMix VM-10
Hassas teraziler	: Gecavery (UK), Denver Instrument
Otomatik pipetler	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Chiltern Hotplate Magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/U
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Automatic ice machines)
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Arçelik, Bosch, Vestel
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Sanyo Medical Freezer, Uğur
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Low

3.3. Mikrobiyolojik Metodlar

3.3.1. Primerlerin hazırlanması

İnternet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) NCBI Reference Sequence: NM_001216.2 numaralı insan CA IX genine ait gen bölgesi kullanıldı. Elde edilen gene ait protein kodlama bölgesi tespit edilerek, primerler protein kodlama bölgesinin başından ve sonundan tüm geni amplifiye edecek şekilde seçildi. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotidlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Ayrıca tasarlanan primerler databanklarda bulunan DNA sekansları ile blast yapılarak insan CA IX geni ile en yüksek benzerliği gösterdiği tespit edildi.

3.3.2. cDNA sentezi (RT)

İnsan pankreas mRNA'sı Clontech firmasından ticari olarak temin edildi ve sonra revers transkripsiyon yöntemiyle insan pankreas cDNA kütüphanesi oluşturuldu. Sentezlenen cDNA 5 kat distile su ile dilue edilerek -20°C'de saklandı.

Revers Transcriptaz ile cDNA üretimi

1. Steril bir mikrosantrifüj tüpüne;

1. 1 µl 50 µM Oligo dT₂₀
2. 10 pg-500 ng mRNA
3. 1 µl 10 mM dNTP Mix (pH=7,0 olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin her birinden 10 mM) koyularak
4. 10 µl'ye ddH₂O ile tamamlandı.

2. Karışım 65°C'de 5 dakika ısıtıldı ve buz üzerinde 1 dakika inkübe edildi.

3. Karışım kısa süreli santrifüjlendi ve üzerine aşağıdaki kimyasallar eklendi;

- 2 µl 10X RT Tamponu
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl RNaseOUT™ (40 units/µl)
- 1 µl SuperScript™ III RT (200 units/µl)
- 4 µl 25 mM MgCl₂

4. Karışım hafif bir pipetleme ile karıştırıldı.

5. Sonra karışım 50°C'de 50 dakika inkübe edildi.

6. Daha sonra karışım 85°C'de 5 dakika ısıtılarak reaksiyon durduruldu ve buz üzerine alındı.

7. Tüpün içine 1 µl RNase H eklendi ve 20 dakika 37°C'de inkübe edildi.

8. cDNA kütüphanesi gene ait spesifik primerlerle PCR yapılmak üzere -20°C’de saklandı.

3.3.3. Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR)

İnsan karbonik anhidraz IX için PCR koşulları gradientli PCR yapılarak;

94 °C	4 dk	}	35 döngü
94 °C	1:00 dk		
63 °C	1:00 dk		
72 °C	1:30 dk		
72 °C	5 dk		
4	∞		

olarak belirlendi. PCR reaksiyonları aşağıda gösterildiği gibi 15 µl hacimde yapıldı.

PCR karışımı (15 µl için) :

Deiyonize su :	5 µl
DNA :	3 µl (uygun konsantrasyonda)
Taq Tamponu :	2 µl
dNTP :	0,5 µl (10 mM’lık çözeltiden)
Primer (F) :	1 µl (10 pmol’lük çözeltiden)
Primer (R) :	1 µl (10 pmol’lük çözeltiden)
MgCl ₂ :	1 µl (25 mM’lük çözeltiden)
DMSO :	1 µl (Toplam hacmin yaklaşık %5’i)
Taq polimeraz:	0,5 µl

PCR sonuçları %1’lik konsantrasyonda agaroz jelde görüntülendi.

3.3.4. DNA agaroz jel elektroforezi

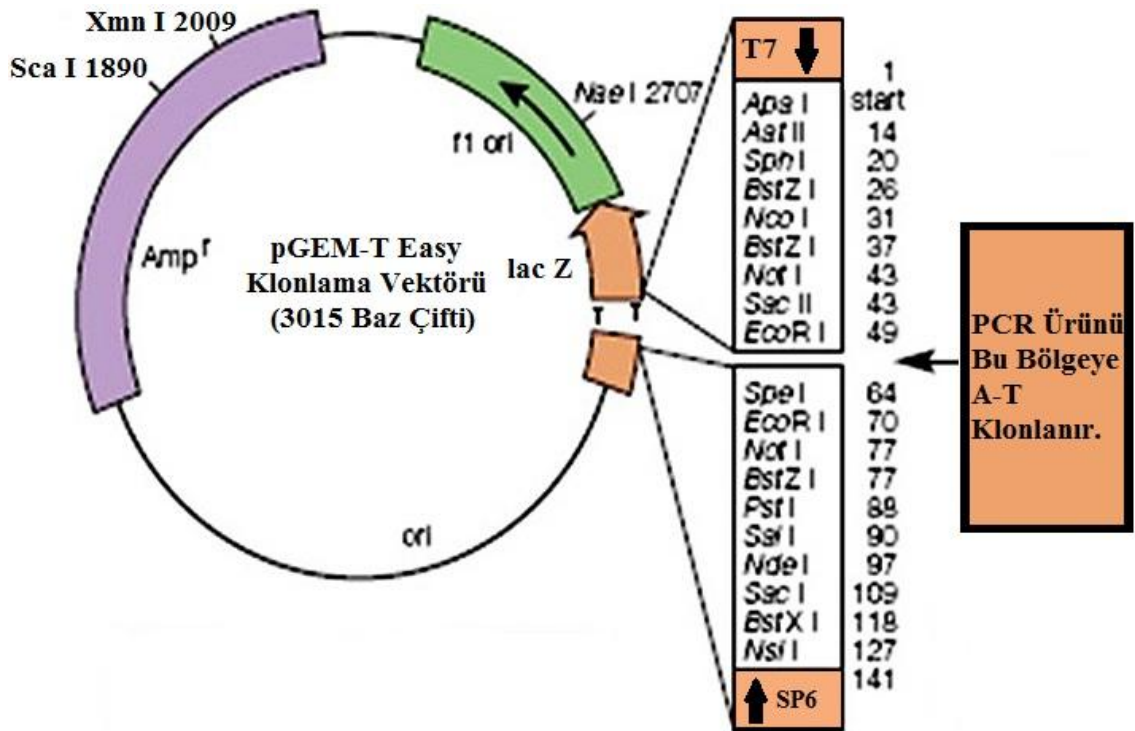
DNA elektroforezi için yatay jeller kullanıldı ve 80 volt elektrik akımında yaklaşık 1 saat örnekler yürütüldü. Elektroforez tamponu olarak 1xTAE tercih edildi. Agaroz jelle son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür (EtBr) ilave edildi. DNA'yı izleme boyası olarak bromfenol mavisi kullanıldı. Çalışmada %1'lik konsantrasyonda agaroz jel kullanıldı. Elektroforezde ayrılan DNA parçalarının büyüklüğünün belirlenmesi için farklı büyüklüklerde DNA belirleyiciler kullanıldı. Elektroforez sonuçları UV jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

3.3.5. Ligasyon

Klonlama işlemi, Tag DNA Polimeraz enzimi ile DNA molekülleri arasında fosfodiester bağı oluşturularak gerçekleştirildi. Bu tepkimenin oluşması için ortamda komplementer uçlara sahip plasmid DNA ile klonlanmak istenen genin bulunması gerekmektedir. Ligasyon, genetik mühendisliği teknikleri içinde kısıtlayıcı basamağı oluşturmakta, reaksiyon mühendisliği prensipleri ile tepkime koşullarının geliştirilmesi klonlama prosesinin düşük olan başarı olasılığını yükseltebilmektedir. Ligasyon sonunda oluşan ürünler lineer ve gevşemiş (relaxed) plasmidlerdir ve gen transfer teknikleri ile uygun konak hücrelere transfer edilirler. Ligasyon tepkimesinin gerçekleşmesi için ortamda ng mertebesinde makromolekül DNA bulunur. Makromoleküllerin klonlanması için klonlanması gereken iki makromolekülün klonlanması gereken uçlarının karşı karşıya gelmesi gerekmektedir. Bu olasılığın düşük olması klonlama tepkimelerinin gerçekleşme olasılığını da azaltmaktadır. Ligasyon tepkimesinde ortamda bulunan vektörün ve genin derişimi çok önemlidir. Vektörün ve genin derişimleri DNA parçalarının büyüklüğüne göre değiştiğinden bunların uygun derişimleri optimize edilmelidir (Bloom *et al.* 1996). Bu hususlar dikkate alınarak 5 µl DNA (Gen Bölgesi), 2 µl ligaz tamponu, 1 µl vektör, 1 µl ligaz ve 11 µl dH₂O alındı ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde hazırlandı. Karışım, ligaz enzimi tarafından vektör ile ilgili gen arasında fosfodiester bağı yapmak üzere +4°C'de bir gece bekletildi.

3.3.6. PCR ürününün vektöre (pGEM-T Easy) klonlanması, *E.coli* (JM109) hücrelerine aktarımı ve mavi-beyaz koloni seçimi

cDNA kütüphanesinden gene spesifik primerlerle PCR yapıldı. PCR ortamında amplifiye edilen gen pGEM-T Easy vektörüne T-A cloning kit'i yardımıyla sub klonlandı. Vektöre klonlanan ürün ısı şokuyla *E.coli* (JM109) hücrelerine transforme edildi ve ardından ampisilin ve X-GAL ilave edilmiş petri kutusuna ekildi. Petri üzerinde mavi-beyaz koloniler gözlemlendi. Beyaz kolonilerden koloni PCR yapıldı ve istenilen genin doğruluğu teyit edildikten sonra beyaz koloniler LB besi ortamında çoğaltıldı. Yoğun bir şekilde üretilen bakterilerden gen taşıyan vektör, vektör saflaştırma kiti yardımıyla saflaştırıldı.



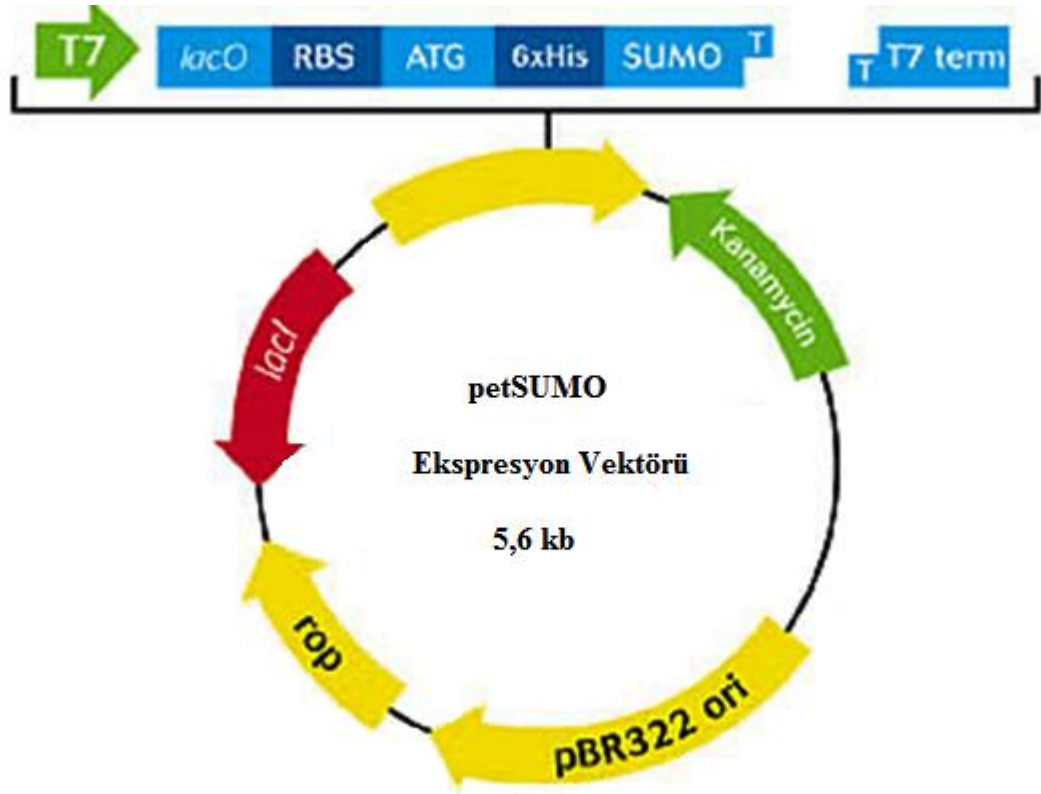
Şekil 3.1. pGEM-T Easy klonlama vektörünün yapısı ve kesim pozisyonları

3.3.7. Elde edilen genlerin, gen diziliminin kontrol edilmesi

pGEM-T Easy vektörüne klonlanan gen bölgesi, PCR ortamında hem vektörün primerleri ile hem de gene spesifik primerlerle amplifiye edildikten sonra %1'lik agaroz jelde kontrol edildi. Ayrıca *E.coli* (JM109) bakteri kolonisinden izole edilen klonlama yapılmış plasmidin (pGEM-T Easy + hCA IX) DNA dizilimi bir ticari firma tarafından (Applied Biosystems) belirlendi. Dizi analizi sonucu 1377 bp'lık PCR amplifikasyon ürününün hCA IX olduğu doğrulanıp, PCR'a dayalı olarak herhangi bir mutasyon oluşmadığı gösterildi. Bunun nedeni her ne kadar spesifik primerler kullanılsa da PCR'a dayalı amplifikasyonlarda yanlış hibridizasyonlar olabileceğidir. İkinci önemli nokta daha sonra ekspresyon çalışmalarında kullanılacak olan ORF'de taq polimeraza bağlı olarak oluşan tesadüfi mutasyonların bulunup bulunmadığının kontrol edilmesidir. Elde edilen diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information)'a ait internet adresi kullanılarak biyoinformatik olarak karşılaştırıldı.

3.3.8. PCR ürününün ekspresyon vektörüne (petSUMO) klonlanması, *E.coli* (TOP10) hücrelerine aktarımı

Klonlama yapılmış plasmid (pGEM-T Easy + hCA IX) kalıp DNA olarak kullanılarak gene ait primerlerle PCR yapıldı. PCR ortamında amplifiye edilen gen, petSUMO ekspresyon vektörüne kit yardımıyla sub klonlandı. Vektöre klonlanan ürün ısı şokuyla *E.coli* (TOP10) hücrelerine aktarıldı ve ardından kanamisin ilave edilmiş petri kutusuna ekildi. Petri üzerinde beyaz koloniler gözlemlendi. Elde edilen beyaz kolonilerden koloni PCR yapıldı ve istenilen genin doğruluğu teyit edildikten sonra beyaz koloniler LB besi ortamında çoğaltıldı. Yoğun bir şekilde üretilen bakterilerden gen taşıyan vektör, vektör saflaştırma kiti yardımıyla saflaştırıldı.



Şekil 3.2. petSUMO ekspresyon vektörünün yapısı

3.3.9. Plasmid DNA izolasyonu (Miniprep)

Küçük miktarlarda DNA izolasyonu için Genelute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) kullanıldı. Kit protokolüne göre, ampisilin/kanamisin içeren 5 ml LB besiyerine transformasyon gerçekleşmiş olan tek koloni ekim yapıldı ve bir gece 37°C’de çalkalamalı etüvde inkübe edildi. LB besi yerinde üretilen bakteriler 2 tane 1,5 ml’lik ependorf tüpü içerisine alındı. 11.000 rpm’de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Peletler üzerine 200 µl resuspend çözeltisi ilave edildi. Pipetle hafifçe pipetaj yapıldı ve vortekslendi (bakterileri öldürmek için ortam hazırlandı). Üzerlerine 200 µl bakteri çeperlerini parçalamak için lizis tamponu ilave edildi. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. 350 µl nötralize çözeltisi ilave edildi ve tüpte hafif çökelek oluşuncaya kadar tüp 5-6 defa alt üst edildi. 10 dk 11.000 rpm’de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve mavi halkalı küçük ependorf kolonuna yüklendi. Çökelek atıldı. Mavi halkalı kolon 11.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi ve alt kısmı

döküldü. 500 µl opsiyonel yıkama çözeltisi ilave edildi. Tüp 11.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve alt kısmı döküldü. Üzerine 750 µl yıkama çözeltisi katıldı. Tüp 11.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Kolonlar yeni toplama tüpüne alındı. Üzerine 100 µl elüsyon çözeltisi ilave edildi. Tüp 1 dk 11.000 rpm'de santrifüj edildi. Böylece saf plasmid elüe edilmiş oldu. Plasmid 1/100 oranında seyreltilip spesifik primerlerle PCR yapıldı. Sonra %1'lik konsantrasyonda agaroz jel kullanılarak elektroforez yapıldı. Hem PCR ürününün saflığı hem de plasmid kontrol edildi.

3.3.10. Kompetent hücre hazırlama

Kompetent hücre hazırlamak için 50 mM kalsiyum klorür kullanıldı. Öncelikle 10 ml LB besiyeri içine tek koloni *E.coli* ekim yapılarak 37°C'de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edildi. Daha sonra bir gecelik kültürden 100 ml LB içine 100 µl inoküle edilerek, OD₅₅₀ 0,4 ile 0,5 arasına gelinceye kadar çalkalamalı etüvde 37°C'de inkübe edildi. 6000 g'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve süpernatant uzaklaştırıldı. 30 ml 50 mM soğuk kalsiyum klorür ile pelet yeniden çözüldü ve buz üzerinde 15 dakika bekletildi. Daha sonra 6000 g'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek hücreler tekrar çöktürüldü ve süpernatant uzaklaştırıldı. Peletler 6 ml 50 mM soğuk kalsiyum klorür ile çözülerek üzerine 450 µl DMSO katıldı ve yavaşça pipetaj yapıldı. 150 µl'lik alikatlara ayrılarak ependorflara paylaştırıldı. Ependorflar sıvı azot havuzunda dondurularak daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de buzdolabında saklandı.

3.3.11. Transformasyon

Kompetent hücreler, -80°C'den alındı ve 30 dakika süreyle buz üzerinde bekletildi. Ependorfa 100 µL kompetent hücreden alındı ve her bir tüpe 50-100 ng plasmid DNA'sı kondu. Dikkatlice karıştırılarak 30 dakika buzda bekletildi. Isı şoku için 42°C'de 30 saniye tutuldu ve hemen buza alınarak burada da 2 dakika bekletildi. Önceden 37°C'de ısıtılmış 250 µL LB eklendi. 37°C'de çalkalayıcı etüvde 1-1,5 saat büyümeye bırakıldı. Bu kültür alınarak taze hazırlanmış, antibiyotik içeren LB-agar petrisine damlatıldı ve yayıldı. Petri 15 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra etüve

konarak 37°C’de bir gece büyüme bırakıldı. Petrideki kolonilerin durumuna bakılarak transformasyon etkinliği saptandı.

3.3.12. Bakteri stoklarının korunması

İlgili bakteri soyları ve plasmid soyları ön kültürle üretildikten sonra son konsantrasyonu %15 steril gliserol + %85 (LB+Bakteri) olacak şekilde ependorflara alındı. Ependorflar sıvı azot havuzuna atılarak donduruldu ve -80°C’de saklandı.

3.3.13. Ekspresyon vektörüne klonlanmış olarak saflaştırılan petSUMO-hCA IX plasmidinin, *E.coli* (BL21DE3) hücrelerine aktarımı

Elde edilen plasmid ısı şoku yardımıyla, *E.coli* (BL21DE3) hücrelerine aktarıldı ve ardından kanamisin ilave edilmiş petri kutusuna ekildi. Petri üzerinde beyaz koloniler gözlemlendi. Elde edilen beyaz kolonilerden koloni PCR yapıldı ve istenilen genin doğruluğu teyit edildikten sonra beyaz koloniler LB besi ortamında çoğaltıldı. Yoğun bir şekilde üretilen bakterilerden gen taşıyan vektör, vektör saflaştırma kiti yardımıyla saflaştırıldı. Vektör kalıp DNA olarak kullanılarak tekrar PCR yapıldı ve ürün bir kez daha kontrol edilmiş oldu.

3.3.14. Rekombinant protein ekspresyonu

3.3.14.a. IPTG kullanılarak hedef proteinin indüklenmesi

Ekspresyonun T7 promotor sistemi ile başlatılması için, hCA IX genini taşıyan petSUMO plasmidi ısı şoku ile *E.coli* (BL21DE3) hücrelerine transforme edildi. LB-Agar + Kanamisin içeren petriye yayıldı ve 37°C’de bir gece bekletildi. Petride oluşan kolonilerden tek bir koloni alındı, taze bakteri kültürü oluşturmak üzere kanamisin içeren 10 ml’lik LB ortamına ekilerek 37°C’de 130 rpm’de bir gece inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 500 ml’lik steril erlene 200 ml LB konuldu ve ortama 50 µg/ml

olacak şekilde kanamisin konuldu. Bir gece inkübasyona bırakılan bakteri kültüründen 2 ml alınarak 200 ml'lik LB ortamına aşılandı. Besi ortamının inkübasyonu çalkalayıcı inkübatör içerisinde 37 °C'de ve kontrollü olarak gerçekleştirildi. Bakterinin üremesine OD₆₀₀'de 0,6-0,8 arasında absorbans verinceye kadar müsaade edildi. Yeterli bakteri konsantrasyonuna ulaşıldığında, protein ekspresyonunun gerçekleşmesi için 160 µl 1 mM izopropiltiyogalaktozid (IPTG) ve 160 µl 0,4 M ZnSO₄.7.H₂O bakteri kültürüne eklendi. Kültür 30°C'de 260 rpm'de ekstra 8 saat inkübasyona bırakıldı.

3.3.14.b. Bakterilerin yıkanması

LB ortamındaki bakteriler 15 ml'lik falkonlara aktarıldı ve 6000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernetant atıldı ve bakteriyel hücre peleti 2 ml 50 mM Tris, pH=7,6 ile süspanse edildi. 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı ve süpernetant atıldı. Yıkama işlemi bir kez daha yapıldı ve pelet kurutularak -20°C'de homojenat hazırlamak üzere saklandı.

3.3.14.c. Bakterilerin sıvı azot kullanılarak parçalanması ve homojenat hazırlanması

Peletler 2 defa sıvı azottan geçirilerek macun kıvamına gelinceye kadar havan içerisinde dövüldü. Sonra havanın içerisine 8 ml lizis tamponu eklendi ve homojenat ependorf tüplerine alındı. Tüpler 17.000 rpm'de 20 dakika +4°C'de santrifüj yapıldı. Süpernatant alındı ve peletler atıldı.

3.4. Biyokimyasal Metodlar

3.4.1. Afinite kromatografisi jelinin hazırlanması

Bilindiği gibi enzim saflaştırma işlemlerinde en etkili metodlardan birisi afinite kromatografisidir. Afinite kromatografisi, bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup,

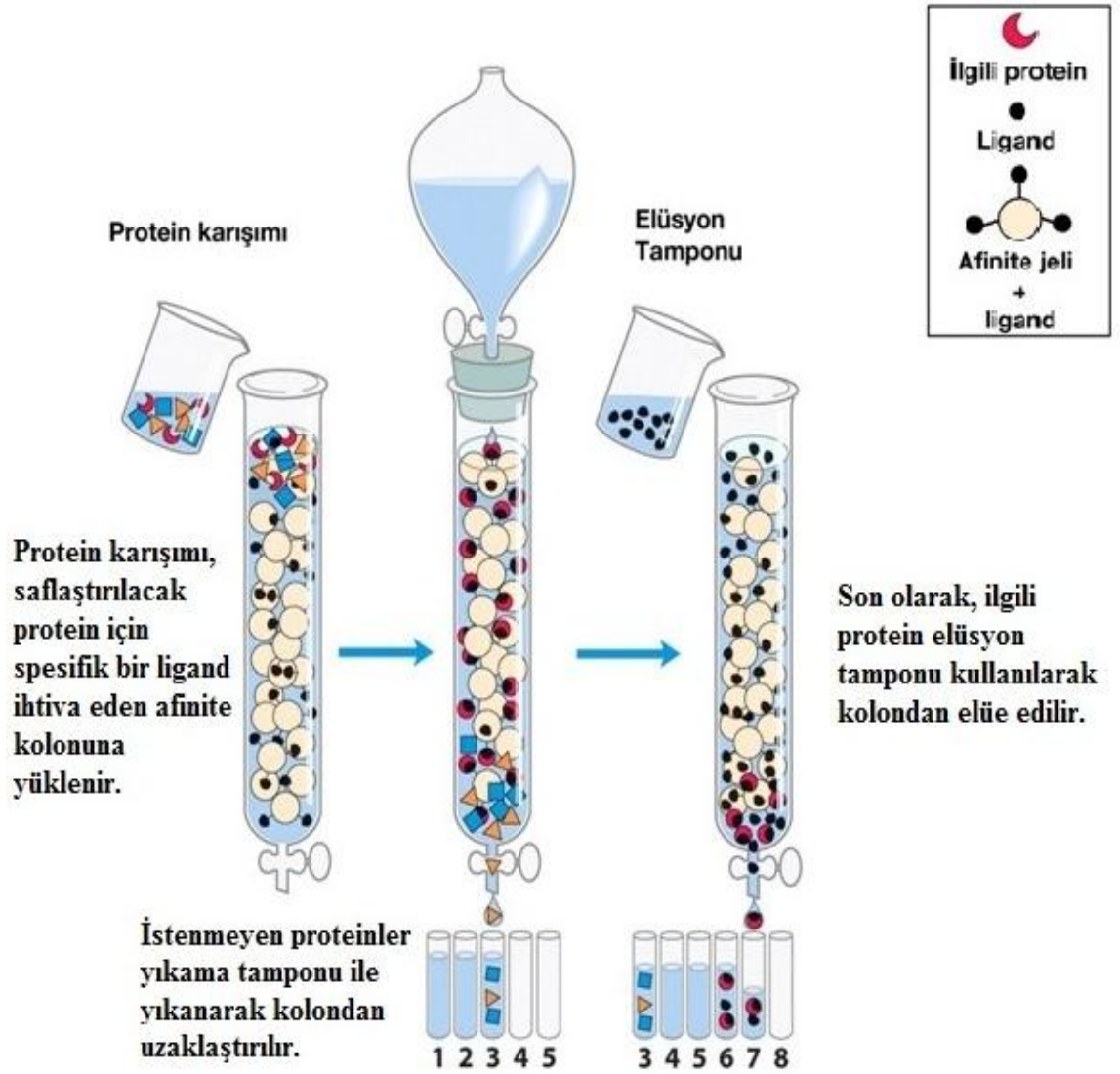
saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir koplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak Sephadex, Sepharose ve Biogel gibi farklı jeller kullanılabilir. Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

3.4.1.a. Afinite kolonunun paketlenmesi

Ni-NTA agaroz jeli etil alkol içine alınarak jel süspanse edildi ve su trompu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspanse edilen jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

3.4.1.b. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Hazırlanan homojenat bağlanma tamponu içerisinde seyreltilerek Ni reçine kolonuna tatbik edildi ve kolon 20 mM imidazol içeren 100 ml yıkama tamponu ile yıkandı. Böylece SUMO-hCA IX enzimi kolona tutundu ve diğer safsızlıklar ortamdan uzaklaştırıldı. Sonra 250 mM imidazol içeren 30 ml elüsyon tamponu kolona tatbik edildi ve SUMO-hCA IX enzimi kolondan elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 2'şer ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı.



Şekil 3.3. Afinite kromatografisi ile proteinin saflaştırılması (Lehninger 2005).

3.4.2. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

Enzimin saflaştırılmasından sonra Laemmli tarafından anlatıldığı gibi SDS-PAGE tekniği ile enzimin hem saflık derecesi hem de mol kütlesi (M_K) belirlendi (Laemmli 1970). Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına

üst kesimde 2 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Bir saat jelin donması için beklenildi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığılma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığılma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önlenildi. Yığılma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 120 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcıda yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi. Elektroforez fotoğrafı kullanılarak standart proteinlerin R_f değerleri hesaplandı ve $\log M_K - R_f$ standart grafikleri çizildi. Daha sonra füzyon proteinin ve hCA IX izoenziminin R_f değeri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak bu enzimin $\log M_K$ 'sı belirlendi. Bu değer antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi hesaplanmış oldu (Şekil 4.14, 4.15, 4.16, 4.18).

Proteinlerin R_f değerleri:

$$R_f = \frac{X_e}{X_{boya}}$$

formülü kullanılarak belirlendi.

X_e = Proteinlerin yürütme mesafesi

$X_{\text{boya}} = \text{Boyanın yürüme mesafesi}$

3.4.3. Diyaliz

Diyaliz yöntemi, iyonik olan ve olmayan, tüm küçük molekülleri yok etmek veya konsantre etmek için kullanılan basit, ucuz ve etkin bir yöntemdir. Proteinler, diyaliz yoluyla tuz veya diğer küçük moleküllerden ayrılabilirler. Diyaliz işleminde, istenen büyüklükte gözeneklere sahip selüloz membran gibi çeşitli yarı geçirgen membranlar kullanılmaktadır. Bu işlemde protein özütü yarı geçirgen membran içine alınır. Membran porlarının büyüklüğünün, protein moleküllerinin büyüklüğünden daha küçük olmasına dikkat edilir. Böylece membran, tuz ve tamponun geçişine izin verirken, protein moleküllerine geçit vermez. Küçük moleküller membrandaki ozmotik basınç dengelenene kadar serbestçe membrandan geçerler. Bu işlem tampon birkaç kez değiştirilerek tekrarlanır. Ayrıca diyaliz işlemi sırasında kullanılan tamponun hacminin büyük olmasına özen gösterilir (Berg *et al.* 2002). Kromatografik işlemler sonucu saflaştırılan füzyon protein 4°C’de, magnetik karıştırıcı üzerinde pH=7,4 olan PBS tamponuna karşı bir gece diyaliz edildi. Böylece füzyon protein ile ortamdaki diğer istenmeyen maddeler (tuz veya diğer küçük moleküller) birbirinden kısmen ayrılmış oldu.

3.4.4. Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu

Isıya dayanıklı bütün cam malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121°C’de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi. Steril kabin kullanılmadığı zamanlarda alkolle silinerek ve çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce UV lambası açılarak çalışma ortamının sterilizasyonu sağlandı.

3.5. Klonlama Basamaklarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.5.1. LB besi ortamının hazırlanması

Çizelge 3.1. LB besi yerlerinin hazırlanması

KATI BESİ YERİNİN HAZIRLANMASI			SIVI BESİ YERİNİN HAZIRLANMASI		
Saf su	400 ml	200 ml	Saf su	400 ml	200 ml
Tripton	4 g	2 g	Tripton	4 g	2 g
Maya Ekstraktı	2 g	1 g	Maya Ekstraktı	2 g	1 g
NaCl	2 g	1 g	NaCl	2 g	1 g
D (+) Glukoz	0,4 g	0,2 g	D (+) Glukoz	0,4 g	0,2 g
NaOH (5 N) Stok: 200 g/1000 ml	600 µl	300 µl	NaOH (5 N) Stok: 200 g/1000 ml	600 µl	300 µl
Agar	6 g	3 g	-	-	-
121 °C’de 20 dk otoklavlandı ve 50 °C’ye kadar soğuttuktan sonra			-	-	-
X-GAL (50 mg/ml)	200 µl	100 µl (320µl)	-	-	-
IPTG (1M) Stok: 0,178 g/0,750 ml saf su	80 µl	40 µl (0,024 g)	-	-	-
Amp Stok: 50 mg/ml katıldı.	400 µl	200 µl	-	-	-

Çizelge 3.1’de gösterildiği şekilde katı ve sıvı LB besi yerleri ayrı ayrı hazırlandı.

3.5.2. Ampisilin/IPTG/X-GAL’li LB tabaklarının hazırlanması

Yukarıda anlatıldığı gibi LB besi ortamı ampicilin, IPTG ve X-GAL katılarak hazırlandı ve petrilere boşaltıldı. Alternatif olarak 100 mM IPTG’den 100 µl ve 50 mg/ml X-GAL’den 20 µl alınarak LB tabaklarının yüzeyine yayıldı. Kullanmadan önce 37°C’de 30 dakika emmesine izin verildi.

3.5.3. LB Besi ortamı için IPTG stok çözeltisinin (0,1 M) hazırlanması

1,2 g izopropiltiyogalaktozid (IPTG; Cat.# V3951) alındı, son hacim 50 ml olacak şekilde üzerine deiyonize edilmiş su eklendi. Daha sonra süzüldü, sterilize edildi ve +4°C’de saklandı.

3.5.4. Füzyon proteinin indüklenmesi için IPTG stok çözeltisinin (1,0 mM) hazırlanması

12 mg izopropiltiyogalaktozid (IPTG; Cat.# V3951) alındı, son hacim 50 ml olacak şekilde üzerine deiyonize edilmiş su eklendi. Daha sonra süzüldü, sterilize edildi ve +4°C’de saklandı.

3.5.5. Antibiyotikli LB tabaklarının hazırlanması

1 L’lik LB ortamına 15 g agar eklendi ve otoklav edildi. Alıcı olan Flexi® Vector’e uygun olarak, son konsantrasyonu 100 µg/ml olan ampicilin veya son konsantrasyonu 50 µg/ml kanamisin eklemekten önce ortamın sıcaklığı 50°C olacak şekilde ayarlandı. 85 mm’lik petri kaplarına 30-35 ml’lik ortam eklendi. Agar sertleşinceye kadar beklendi ve daha sonra kullanılmak üzere oda sıcaklığında bir hafta veya 4°C’de bir ay saklandı.

3.5.6. 2 M Mg^{+2} stok çözeltisinin hazırlanması

20,33 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 24,65 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve destile edilmiş su 100 ml'lik kaba koyuldu. Daha sonra süzüldü, sterilize edildi ve $+4^\circ C$ 'de saklandı.

3.5.7. SOC ortamının (100 ml) hazırlanması

2 g tripton, 0,5 g maya ekstraktı, 1 ml 1 M NaCl, 0,25 ml 1 M KCl, 1 ml sterilize edilmiş 2 M Mg^{+2} stok, sterilize edilmiş 1 ml 2 M glukoz kullanıldı. Destile edilmiş suyun 97 ml'sine tripton, maya ekstraktı, NaCl ve KCl eklendi, dağılması için karıştırıldı, otoklav edildi ve oda sıcaklığında soğutuldu. Son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde 2 M Mg^{+2} stok ve 2 M glukozun her ikisi de eklendi. Sterilize ve destile edilmiş su ile son hacmi 100 ml yapıldı. Sonuçta pH=7,0 olacak şekilde hazırlandı.

3.5.8. X-GAL'in (2 ml) hazırlanması

100 mg 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid, 2 ml N,N'-dimetil-formamid içinde karıştırıldı ve çözünmesi sağlandı. Daha sonra karışım alüminyum folyo ile kaplandı ve $-20^\circ C$ 'de saklandı. Alternatif olarak 50 mg/ml X-GAL (Cat.# V3941) kullanıldı.

3.6. Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri ve Hazırlanmaları

3.6.1. 1xTBE tamponunun (Tris-Borik Asit-EDTA tamponu) hazırlanması

89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA (pH=8,0) olacak şekilde dH₂O kullanılarak 1 litre tampon hazırlandı.

3.6.2. 1xTAE tamponunun (Tris-Asetat-EDTA tamponu) hazırlanması

40 mM Tris, 5 mM sodyum asetat, 1 mM EDTA (pH=8,0) olacak şekilde dH₂O kullanılarak 1 litre tampon hazırlandı.

3.6.3. %1'lik agaroz jelinin hazırlanması

0,4 gram agaroz tartıldı üzerine 40 ml 1xTBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu/40 ml 1xTAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu ilave edildi ve böylece yaklaşık %1'lik agaroz çözeltisi elde edilmiş oldu. Daha sonra 10 dakika mikrodalga fırın içerisinde ısıtılmaya bırakıldı. Çözündükten sonra birkaç dakika oda sıcaklığında soğutuldu ve üzerine 0,73 µl etidyum bromür ilave edildi. Elektroforez tankına kabarcık oluşturmayacak şekilde boşaltıldı ve tarak dikkatlice yerleştirildi. Çeker ocakta katılaşınca kadar bırakıldı ve tarak çıkarıldı. Analiz edilecek numune, izlemeyi kolaylaştırması açısından boya ile karıştırılarak kuyulara yüklendi.

3.7. Afinite Kolonunda, SDS-PAGE'de ve Kinetik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

3.7.1. 50 mM Tris-SO₄, pH=7,5–9,0 aralığında (Optimum pH çalışması için kullanılan tampon çözelti)

0,6055 g (0,005 mol) Tris 80 ml saf su içerisinde çözülerek 1 M H₂SO₄ ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.7.2. 50 mM potasyum fosfat, pH= 5,0–7,5 aralığında (Optimum pH çalışması için kullanılan tampon çözelti)

0,68 g (0,005 mol) potasyum fosfat 80 ml saf su içerisinde çözülerek 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.7.3. 100 mM Tris-SO₄, pH=7,5–9,0 aralığında (Stabil pH çalışması için kullanılan tampon çözelti)

1,211 g (0,01 mol) Tris 80 ml saf su içerisinde çözülerek 1 M H₂SO₄ ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.7.4. 0,05 M Tris-SO₄, pH=7,4 (Esteraz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözelti)

6,055 g Tris 950 ml destile su içerisinde çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

3.7.5. %0,02'lik NaN₃ çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti)

20 mg NaN₃ alınarak hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.7.6. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu

0,65 ml 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 1 ml %10'luk SDS, 1 ml %100'lük gliserin, 1 ml %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Bu tamponu kullanmadan hemen önce, 1 ml numune tamponu için 950 µl numune tamponuna 50 µl β- merkaptotanol ilave edildi.

3.7.7. SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu

3 g Tris ve 14,2 g glisin 100 ml suda çözüldü ve daha sonra bunun üzerine 10 ml %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.7.8. Sabitleştirme çözeltisi (elektroforez jelindeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti)

%50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

3.7.9. Boyama çözeltisi (elektroforez jelinin boyanması için kullanılan çözelti)

0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

3.7.10. Yıkama çözeltisi (elektroforez jelinin yıkanması için kullanılan çözelti)

%50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

3.7.11. Coomassie brilliant blue G-250, reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti)

100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlandı.

3.7.12. 1 M Tris-HCl pH=8,8 tampon çözeltisi

12,1 g Tris 90 ml suda çözülüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.7.13. 1 M Tris-HCl pH=6,8 tampon çözeltisi

2,42 g Tris 5 ml suda çözülecek 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 20 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.7.14. %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi

6 g akrilamid, 0,16 g bisakrilamid alınıp 13,84 ml suda çözülerek hazırlandı.

3.7.15. %10'luk SDS çözeltisi

0,5 g SDS alınıp 4,5 ml suda çözülerek hazırlandı.

3.7.16. Standart serum albumin (BSA) çözeltisi (1 mg/ml; protein tayini için kullanılan çözelti)

25 mg standart serum albuminin 25 ml saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

3.7.17. Diyaliz çözeltisi PBS, pH=7,4

16,38 g (140 mM) NaCl, 0,4 g (2,7 mM) KCl, 2,84 g (10 mM) Na₂HPO₄, 0,49 g (1,8 mM) KH₂PO₄ alınarak 1,950 L saf suda çözüldü. pH=7,4'e ayarlandı ve son hacim saf su ile 2 L'ye tamamlandı.

3.7.18. Ayırma jelinin hazırlanması

5 ml 1 M Tris-HCl pH=8,8, 4,4 ml %30'luk akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %0,1'lik SDS, 0,13 ml %5'lik TEMED (N,N, N',N'-Tetrametil etilen diamin) ve 3,13 ml saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,27 ml %5'lik PER [amonyum persülfat, (NH₄)₂S₂O₈] eklendi.

3.7.19. Yığma jelinin hazırlanması

0,41 ml 1 M Tris-HCl pH=6,8, 0,44 ml %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 ml %0,1'lik SDS, 0,03 ml %5'lik TEMED ve 2, 45 ml saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,07 ml %5'lik PER eklendi.

3.8. Protein Tayini

3.8.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metod yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.8.2. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini

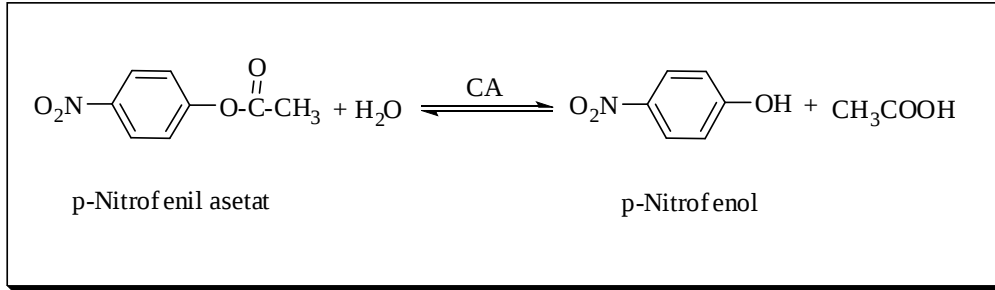
Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisinin ve homojenatın protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5

ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı ve absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılacak numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

3.9. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini

Esteraz aktivitesi tayini: Kinetik çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesi ölçümleri bu yöntemle yapıldı. Bu yöntem karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensip olarak karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte ve bu da 348 nm’de absorpsiyon vermektedir ($\epsilon_{348} = 5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Verpoorte *et al.* 1967). Reaksiyon mekanizması aşağıda verildiği gibidir.



Şekil 3.4. p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm mekanizması

1 ml’lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için kullanılan çözeltiler ve miktarları kullanım sırasına göre Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesi ölçümü için kullanılan çözeltiler ve miktarları

Çözeltiler	Kontrol Tüpü (µl)	Numune Tüpü (µl)
1 M Tris-SO ₄ tamponu (pH=9,0)	500	500
p-Nitrofenilasetat	333	333
Saf su	167	157
Enzim çözeltisi	-	10
Toplam hacim	1000	1000

Tablodaki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 1 dakikada bir absorbans miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25°C’de 348 nm’de absorbansı köre karşı okunarak absorbans farkı alındı. Yapılan deneylerde kullanılan p-nitrofenilasetat substrat çözeltisi günlük hazırlandı 27 mg p-nitrofenil asetat tartılarak 1 ml aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaş yavaş ilave edilerek hazırlandı. Bu çözelti 3 mM’lık olup, daha derişğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte and Mehta 1967). Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

3.10. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Optimum pH Bulunmasına Yönelik Çalışmalar

hCA IX izoenzimi için optimum pH’sı 7,5-9,0 aralığında 50 mM Tris-SO₄ ve pH’sı 5,0-7,5 aralığında 50 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4) (Şekil 4.21, Şekil 4.22).

3.11. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum iyonik şiddeti belirlemek amacıyla Tris-SO₄ tamponunun optimal pH'daki 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800 ve 1000 mM'lık konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Farklı Tris-SO₄ konsantrasyonlarında esterase aktivite ölçümleri yapılarak Tris-SO₄ konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi (Çizelge 4.5) (Şekil 4.23).

3.12. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip tampon çözeltisi kullanıldı. 0°C ile 50°C arasında her 5°C'lik sıcaklık farkı oluşturularak enzimin optimum pH'sında spektrofotometrik olarak esterase aktivitesi deneyleri gerçekleştirildi (Çizelge 4.6) (Şekil 4.24).

3.13. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Stabil pH Bulunmasına Yönelik Çalışmalar

Enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek için, pH'sı 7,5-9,0 aralığında 100 mM Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 ml'si ile 1 ml enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. Birer gün arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi (Çizelge 4.7) (Şekil 4.25).

3.14. p-Nitrofenilasetat Substratı İçin K_M , V_{max} ve k_{cat} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar

p-Nitrofenilasetat substratı için klonlanmış hCA IX enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonu kullanılarak optimum

şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Daha sonra, K_M ve V_{max} değerleri hesaplanması için gerçekleştirilen deneyde kullanılan enzim çözeltisinde kantitatif protein tayini yapılarak toplam enzim (E_T) miktarı bulundu. Enzimin turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri;

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

formülünden faydalanılarak hesaplandı (Çizelge 4.8) (Şekil 4.26).

3.15. Klonlanmış hCA IX İzoenziminin Aktivitesi Üzerine Yapılan İnhibisyon Çalışmaları

Enzimin aktivitesini inhibe eden Paklitaksel, Dosetaksel, İrinotekan HCl ve Etoposid antitümör ilaçları ile $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ kimyasal maddeleri için sabit substrat konsantrasyonunda inhibitörsüz ortamda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda IC_{50} değerleri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) % aktivite-[I] grafikleri çizilerek belirlendi (Çizelge 4.9-4.14) (Şekil 4.27-4.32).

3.16. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin İnhibitör Etkisi Gösteren Antitümör İlaçların K_i Sabitlerinin Bulunması

İnhibitör çalışmaları için, hCA IX izoenzimini inhibe eden Paklitaksel ile Dosetaksel antitümör ilaçları kullanıldı. Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi (Çizelge 4.17, Çizelge 4.18)

Daha sonra hCA IX izoenzimi için beş farklı substrat ve üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V-1/[S]$ değerleri belirlenerek her bir inhibitör için ayrı ayrı Lineveawer-Burk grafikleri çizildi. Çizilen bu grafiklerden K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tesbit edildi (Lineweaver and Burk 1934), (Şekil 4.33- Şekil 4.34) (Çizelge 4.19).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İnternet Ortamından hCA IX Gen Bölgesinin ve Protein Kodlama Bölgesinin Belirlenmesi

- İnternet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) insan CA IX genine ait gen bölgesi (1561 nükleotid) belirlendi.
- Elde edilen gene ait protein kodlama bölgesi (1377 nükleotid) tespit edildi.
- Primerler protein kodlama bölgesinin başından ve sonundan tüm geni amplifiye edecek şekilde seçildi.

NM_001216 *Homo sapiens carbonic anhydrase IX (CA9), mRNA*

```

1 gcccgtagac accgtgtgct gggacacccc acagtcagcc gcatggctcc cctgtgcccc
61 agccctggc tccctctgtt gatcccgcc cctgtccag gcctcactgt gcaactgctg
121 ctgtcactgc tgcctctggt gectgtccat ccccagaggt tgccccggat gcaggaggat
181 tcccccttgg gaggaggtc ttctggggaa gatgaccac tgggcgagga ggatctgccc
241 agtgaagagg attcaccag agaggaggat ccaccggag agaggatct acctggagag
301 gaggatctac ctggagagga ggatctacct gaagttaagc ctaaactcaga agaagagggc
361 tccctgaagt tagaggatct acctactgtt gaggctcctg gagatcctca agaacccag
421 aataatgcc acagggacaa agaaggggat gaccagagtc attggcgcta tggaggcgac
481 ccgccctggc ccgggtgtc ccagcctgc gcgggcctgt tccagtcccc ggtggatata
541 cgcctccagc tcgcgcctt ctgccggcc ctgcgcccc tggaaactct gggttccag
601 ctcccgccgc tcccagaact gcgcctgcgc aacaatggc acagtgtgca actgaccctg
661 cctcctgggc tagagatggc tctgggtccc gggcgggagt accgggtct gcagctgcat
721 ctgcactggg gggctgcagg tcgtccgggc tcggagcaca ctgtggaagg ccaccgttct
781 cctgccgaga tccacgtggt tcacctcagc accgcctttg ccagagttga cgaggccttg
841 gggcgccccg gaggcctggc cgtgttgccc gcctttctgg aggagggcc ggaagaaaac
901 agtgcctatg agcagttgct gtctcgttg gaagaaatcg ctgaggaagg ctcagagact
961 cagggtcccag gactggacat atctgactc ctgccctctg acttcagccg ctacttccaa
1021 tatgaggggt ctctgactac accgccctgt gccaggggtg tcactctggac tgtgtttaac
1081 cagacagtga tgctgagtgc taagcagctc cacaccctct ctgacaccct gtggggacct
1141 ggtgactctc ggctacagct gaacttccga gcgacgcagc ctttgaatgg gcgagtgatt
1201 gaggcctcct tccctgtggt agtggacagc agtcctcggg ctgctgagcc agtccagctg
1261 aattcctgcc tggtgtggtg tgacatccta gccctggttt ttggcctcct ttttctgtgc
1321 accagcgtcg cgttccttgt gcagatgaga aggcagcaca gaagggaac caaagggggt
1381 gtgagctacc gccagcaga ggtagccgag actggagcc agaggctgga tcttgagaa

```

1441 tgtgagaagc cagccagagg catctgaggg ggagccggtg actgtcctgt cctgctcatt
 1501 atgccacttc cttttaactg ccaagaaatt ttttaaaata aatatttata ataaaaaaaa
 1561 a

4.2. hCA IX Enziminin Translasyon Olan Aminoasitleri

“MAPLCPSWLPLLIPAPAGLTVQLLLSLLLLVPVHPQRLPRMQEDSPLGGGSS
 GEDDPLGEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEEDLPGEEDLPEVKPKSEEEGSLK
 LEDLPTVEAPGDPQEPQNNNAHRDKEGDDQSHWRYGGDPPWPRVSPACAGRFG
 SPVDIRPQLAAFCPALRPLELLGFQLPPLPELRLRNNGHSVQLTLPPGLEMALGP
 GREYRALQLHLHWGAAGRPGSEHTVEGHRFP AEIHVVHLSTAFARVDEALGRP
 GGLAVLAAFLEEGPEENSAYEQLLSRLEEIAEEGSETQVPGLDISALLPSDFSRYF
 QYEGSLTTPPCAQGVIVTVFNQTVMLSAKQLHTLSDTLWGP GDSRLQLNFRAT
 QPLNGRVIEASFPAGVDSSPRAAEPVQLNSCLAAGDILALVFGLLFAVTSVAFLV
 QMRRQHRRGTKGGVSYRPAEVAETGA”

4.3. hCA IX Genine Ait Primerlerin Belirlenmesi

Primerler protein kodlama bölgesinin başından ve sonundan tüm geni amplifiye edecek şekilde seçildi. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotidlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Ayrıca tasarlanan primerler databanklarda bulunan DNA sekansları ile blastlanarak insan CA IX geni ile en yüksek benzerliği gösterdiği tespit edildi.

*** İnsan CA IX geni için kullanılan 19 Bazlık Forward Primer :**

5'-ATG GCT CCC CTG TGC CCC A-3'

*** İnsan CA IX geni için kullanılan 19 Bazlık Reverse Primer :**

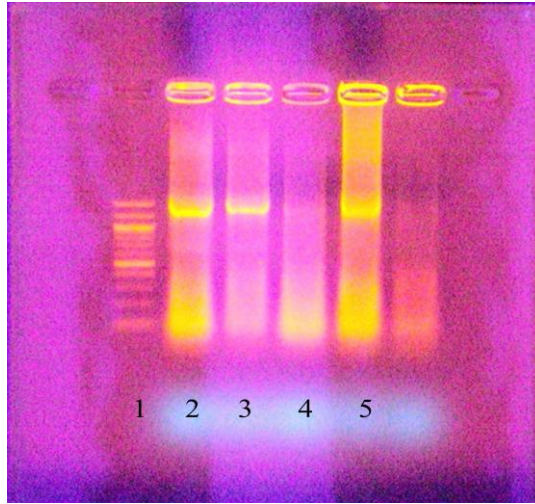
5'-GGC TCC AGT CTC GGC TAC C-3'

4.4. İnsan Pankreas mRNA'sı Kullanılarak İnsan Pankreas cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması

İnsan pankreas mRNA'sı Clontech firmasından ticari olarak temin edildi ve sonra Bölüm 3.3.2'de anlatıldığı gibi revers transkripsiyon yöntemiyle insan pankreas cDNA kütüphanesi oluşturuldu.

4.5. cDNA Kütüphanesinden hCA IX Geninin PCR ile Çoğaltılması

Gene spesifik primerlerin bağlanma sıcaklığı bilinmediği için 58°C ile 63°C arası gradientli PCR yapıldı. Primerlerin bağlanma sıcaklığı 63°C olarak belirlendi.

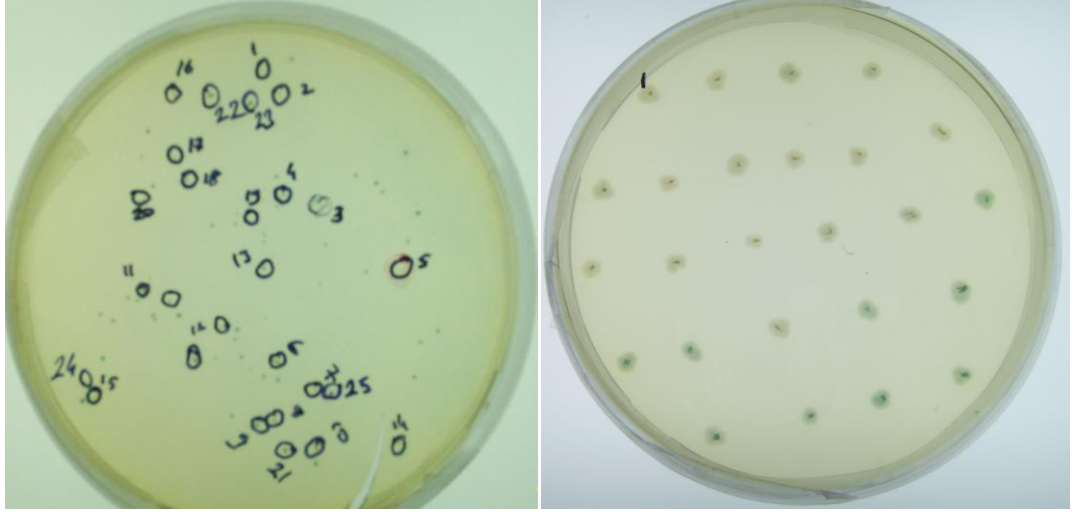


Şekil 4.1. Agaroz jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyu standart DNA (1500 bp). 2,3,4,5 nolu kuyular hCA IX geni.

4.6. PCR Ürününün pGEM-T Easy Vektörüne A-T Klonlanması ve *E.coli* (JM109) Hücrelerine Aktarımı

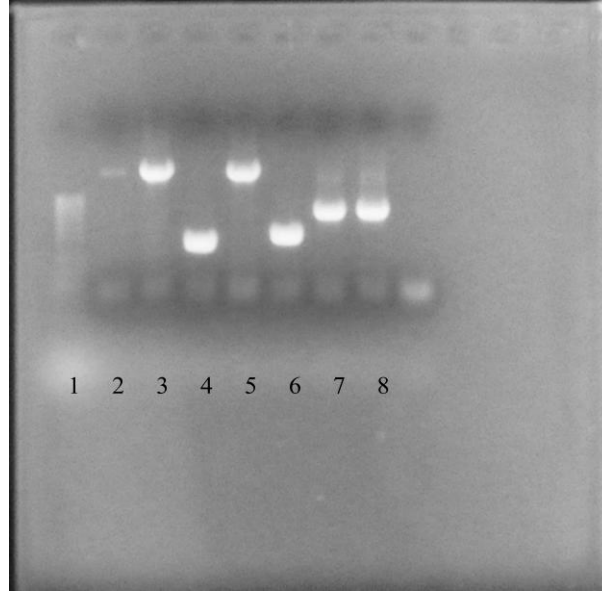
hCA IX'un PCR ürünü, pGEM-T Easy vektörüne A-T klonlama yapıldı. Isı şoku ile *E.coli* (JM109) hücrelerine aktarıldı. Bakteriler IPTG, X-GAL ve ampisilin bulunan katı besi yerine ekildi. Petri 15 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra etüve konarak

37°C’de bir gece büyümeye bırakıldı.16 saatlik inkübasyonun ardından mavi ve beyaz koloniler gözlemlendi. Rekombinant olan beyaz koloniler asetatlı kalemle işaretlenip numaralandırıldı.



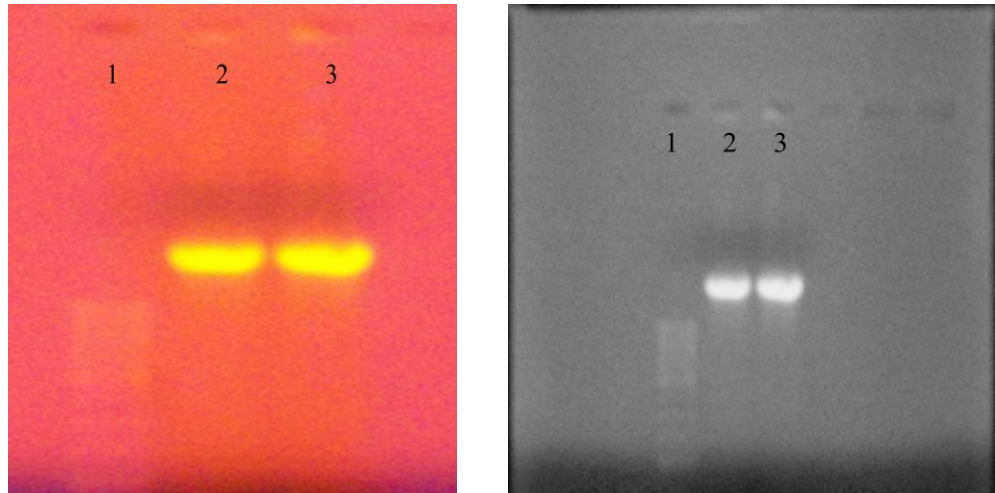
Şekil 4.2. LB-Agar fotoğrafı *E.coli* (JM 109) bakteri kolonileri. Mavi JM109 bakteri kolonileri klonlama (-), beyaz JM109 bakteri kolonileri klonlama (+)

Numaralandırılmış kolonilerden pipet ucu ile daha seyrek ve düzenli ekim yapıldı. Böylece gen taşıyan beyaz kolonileri seçmek daha kolay oldu. *E.coli* (JM 109) hücrelerindeki ürünün doğruluğunu tespit etmek amacıyla beyaz kolonilere değiştirilen pipet uçları PCR çözeltisine bırakılarak pGEM-T Easy vektörünün Sp6 ve T7 primerleri ile koloni PCR yapıldı. Değişik uzunluklarda 3 bant gözlemlendi.



Şekil 4.3. Agaroz jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyu standart DNA (1000 bç). 2,3,4,5,6,7,8 nolu kuyular PCR ürünü.

hCA IX olduğu tahmin edilen 1377 bç'lik 2 numaralı koloniden tekrar sıvı LB ortamına ekim yapıldı. İçerisinde söz konusu genin klonladığı tahmin edilen vektör bulunan ve konsantre hale getirilen sıvı besi ortamındaki bakteri hücrelerinden Plasmid Mini Prep Kiti kullanılarak plasmid izole edildi. Plasmid pGEM-T Easy vektörünün Sp6 ve T7 primerleri ile PCR yapıldı. Çok belirgin istenilen yerde 1377 bç'lik tek bant görüldü.



Şekil 4.4. Agaroz jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyu standart DNA (1000 bç). 2 ve 3 nolu kuyular hCA IX geni.

4.7. pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanan Genin DNA Diziliminin Kontrol Edilmesi

E.coli (JM 109) bakteri kolonisinden izole edilen pGEM-T Easy-hCA IX plasmidinin, DNA dizilimi bir ticari firma tarafından (Applied Biosystems) belirlendi. Alınan sekans sonuçları ile klonlanan bölgenin hCA IX olduğu doğrulandı.

Sekans	---ATGNNGGCCGCG---GGAATTCGATTGCTCGAGC-CNTGGCTCCCTGTGCCCC	51
Dizilim	GCCCGTACACACCGTGTGCTGGGACACCCACAGTCAGCCGCATGGCTCCCTGTGCCCC	60
	* * * * *	
Sekans	ANCCCTGGCTCCCTCTGTTGATCCCGGCCCTGCTCCAGGCCTCACTGTGCAACTGCTG	111
Dizilim	AGCCCTGGCTCCCTCTGTTGATCCCGGCCCTGCTCCAGGCCTCACTGTGCAACTGCTG	120
	* * * * *	
Sekans	CTGTCACTGCTGCTTCTGGTGCCTGTCCATCCCCAGAGGTTGCCCCGGATGCAGGAGGAT	171
Dizilim	CTGTCACTGCTGCTTCTGGTGCCTGTCCATCCCCAGAGGTTGCCCCGGATGCAGGAGGAT	180
	* * * * *	
Sekans	TCCCCCTTGGGAGGAGGCTCTTCTGGGGAAGATGACCCACTGGGCGAGGAGGATCTGCCC	231
Dizilim	TCCCCCTTGGGAGGAGGCTCTTCTGGGGAAGATGACCCACTGGGCGAGGAGGATCTGCCC	240
	* * * * *	
Sekans	AGTGAAGAGGATTACCCAGAGAGGAGGATCCACCCGAGAGGAGGATCTACCTGGGGAG	291
Dizilim	AGTGAAGAGGATTACCCAGAGAGGAGGATCCACCCGAGAGGAGGATCTACCTGGAGAG	300
	* * * * *	
Sekans	GAGGATCTACCTGGAGAGGAGGATCTACCTGAAGTTAAGCCTAAATCAGAAGAAGAGGGC	351
Dizilim	GAGGATCTACCTGGAGAGGAGGATCTACCTGAAGTTAAGCCTAAATCAGAAGAAGAGGGC	360
	* * * * *	
Sekans	TCCCTGAAGTTAGAGGATCTACCTACTGTTGGGGCTCCTGGAGATCCTCAAGAACCCAG	411
Dizilim	TCCCTGAAGTTAGAGGATCTACCTACTGTTGAGGCTCCTGGAGATCCTCAGAACCCAG	420
	* * * * *	
Sekans	AATAATGCCACAGGGACAAAGAAGGGGATGACCAGAGTCATTGGCGCTATGGAGGCGAC	471
Dizilim	AATAATGCCACAGGGACAAAGAAGGGGATGACCAGAGTCATTGGCGCTATGGAGGCGAC	480
	* * * * *	
Sekans	CCGCCCTGGCCCCGGGTGTCCCCAGCCTGCGCGGGCCGCTTCCAGTCCCCGGTGGATATC	531
Dizilim	CCGCCCTGGCCCCGGGTGTCCCCAGCCTGCGCGGGCCGCTTCCAGTCCCCGGTGGATATC	540
	* * * * *	
Sekans	CGCCCCAGCTCGCCGCTTCTGCCCGGCCCTGCGCCCCCTGGAACCTCTGGGCTTCCAG	591
Dizilim	CGCCCCAGCTCGCCGCTTCTGCCCGGCCCTGCGCCCCCTGGAACCTCTGGGCTTCCAG	600
	* * * * *	
Sekans	CTCCCGCCGCTCCCANAACTGCGCCTGCGCAACAATGGCCACAGTGTGCAACTGACCCTG	651
Dizilim	CTCCCGCCGCTCCCAGAACTGCGCCTGCGCAACAATGGCCACAGTGTGCAACTGACCCTG	660
	* * * * *	
Sekans	CCTCCTGGGCTAGAGATGGCTCTGGGTCCCGGGCGGGAGTACCGGGCTCTGCAGCTGCAT	711
Dizilim	CCTCCTGGGCTAGAGATGGCTCTGGGTCCCGGGCGGGAGTACCGGGCTCTGCAGCTGCAT	720
	* * * * *	
Sekans	CTGCACTGGGGGGCTGCAGGTCGTCCGGGCTCGGNNCACTGTGNNNGGCCACCGTTTC	771
Dizilim	CTGCACTGGGGGGCTGCAGGTCGTCCGGGCTCGGAGCACACTGTGGAAGGCCACCGTTTC	780
	* * * * *	

Sekans	CCTGCCGANNNCTGACCCTGCCTCCTGGGNNAGAGANGNNNTGGNNCCNGGNNGGGN	831
Dizilim	CCTGCCGAGATCCTGACCCTGCCTCCTGGGTTAGAGATGGCCTTGGTTCCCTGGTTGGGN	793

Sekans	AGNNCCGGGNTNNGCAGCTGCNNNTGCANTGGGGGGNTGCAGGTNNNCCGGGCTCGGAGC	891
Dizilim	AGTTCCGGGTTAAGCAGCTGCAATTGCACTGGGGGGATGCAGGTAATCCGGGCTCGGAGC	

Sekans	ACACTGTGGAAGGCCACCGTTTCCCTGCCGAGATCCATGTNGTTACANTCAGCACCGCNT	951
Dizilim	ACACTGTGGAAGGCCACCGTTTCCCTGCCGAGATCCACGTGGTTACCTCAGCACCGCCT	817

Sekans	TTGCCAGAANN-CGAGGCCTNNGGGCGCCCGNAGGCCTNNCCGTGTTGGCCGCCTTTC	1010
Dizilim	TTGCCAGAGTTGACGAGGCCTTGGGGCGCCCGGAGGCCTGGCCGTGTTGGCCGCCTTTC	877

Sekans	NGGAGGAGGGCCCGGAAGAAAACAGTGCCTATGAGCAGTCGCTGCTCGCTTGGAAGAAA	1070
Dizilim	TGGAGGAGGGCCCGGAAGAAAACAGTGCCTATGAGCAGTTGCTGTCTCGCTTGGAAGAAA	937

Sekans	TCGCTGAGGAAGGNTCAGAGACTCAGGTCCCAGGACTGGACATATCTGCGCTCCTGCCCT	1130
Dizilim	TCGCTGAGGAAGGCTCAGAGACTCAGGTCCCAGGACTGGACATATCTGCACTCCTGCCCT	997

Sekans	CTGACTTCAGCCGCTACTTCCAATATGAGGGGTCTCTGACTACACCGCCCTGTGCCAGG	1190
Dizilim	CTGACTTCAGCCGCTACTTCCAATATGAGGGGTCTCTGACTACACCGCCCTGTGCCAGG	1057

Sekans	GTGTCATCTGGACTGTGTTTAACCANNNCAGTGATGCTGAGTGCTAAGCAGCTCCACACC	1250
Dizilim	GTGTCATCTGGACTGTGTTTAACCAGAC-AGTGATGCTGAGTGCTAAGCAGCTCCACACC	1116

Sekans	CTCTCTGACACCCTGTGGGGACCTGGTGACTCTCGGCTACAGCTGAACCTCCGAGCGACG	1310
Dizilim	CTCTCTGACACCCTGTGGGGACCTGGTGACTCTCGGCTACAGCTGAACCTCCGAGCGACG	1176

Sekans	CAGCCTTTGAATGGGCGAGTGATTGAGGCCTCCTTCCCTGCTGGAGTGAGCAGTCCT	1370
Dizilim	CAGCCTTTGAATGGGCGAGTGATTGAGGCCTCCTTCCCTGCTGGAGTGAGCAGTCCT	1236

Sekans	CGGGCTGCTGAGCCAGTCCAGCTGAATTCCCTGCCTGGCTGCTGGNNACATCCTAGCCCTG	1430
Dizilim	CGGGCTGCTGAGCCAGTCCAGCTGAATTCCCTGCCTGGCTGCTGGTGACATCCTAGCCCTG	1296

Sekans	GTTTTTGGCCTCCTTTTTGCTGTCAACAGCGTCGCGTTCCTAGTGCAGATGAGAGGGCAG	1490
Dizilim	GTTTTTGGCCTCCTTTTTGCTGTCAACAGCGTCGCGTTCCTTGTGCAGATGAGAAGGCAG	1356

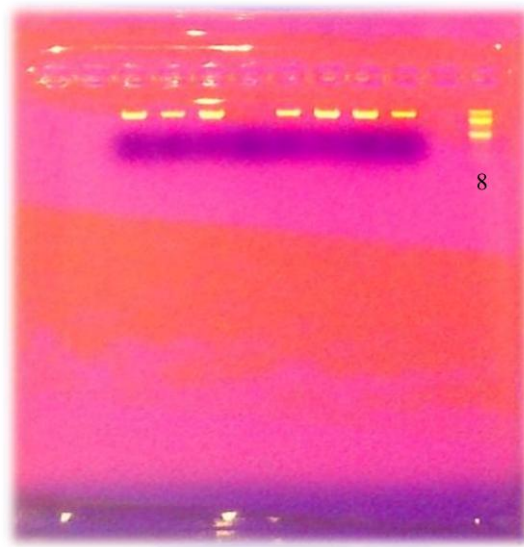
Sekans	CACAGAAGGGGAACCAAAGGGGGTGTGAGCTNCCGCCA GCAGAGGNNGCCGAGACNGGA	1550
Dizilim	CACAGAAGGGGAACCAAAGGGGGTGTGAGCTACCGCCAGCAGAGGTAGCCGAGACTTGA	1416

Sekans	GC -----	1552
Dizilim	GCCTAGAGGCTGGATCTTGGAGAATGTGAGAAGCCAGCCAGAGGCATCTGAGGGGGAGCC	1476
	**	

Şekil 4.5. Otomatik dizi analizi sonuçlarının hCA IX geni ile karşılaştırılması

4.8. PCR Ürününün Ekspresyon Vektörüne (petSUMO) Klonlanması, *E.coli* (TOP10) Hücrelerine Aktarımı, Üretimi ve Plasmidin Saflaştırılması

Klonlama yapılmış plasmid (pGEM-T Easy/hCA IX) 1/100 oranında sulandırılıp kalıp DNA olarak kullanılarak 53°C ile 63°C arası hCA IX'un spesifik primerleri ile gradientli PCR yapıldı. PCR ürünü %1'lik agaroz jelde görüntülendi.



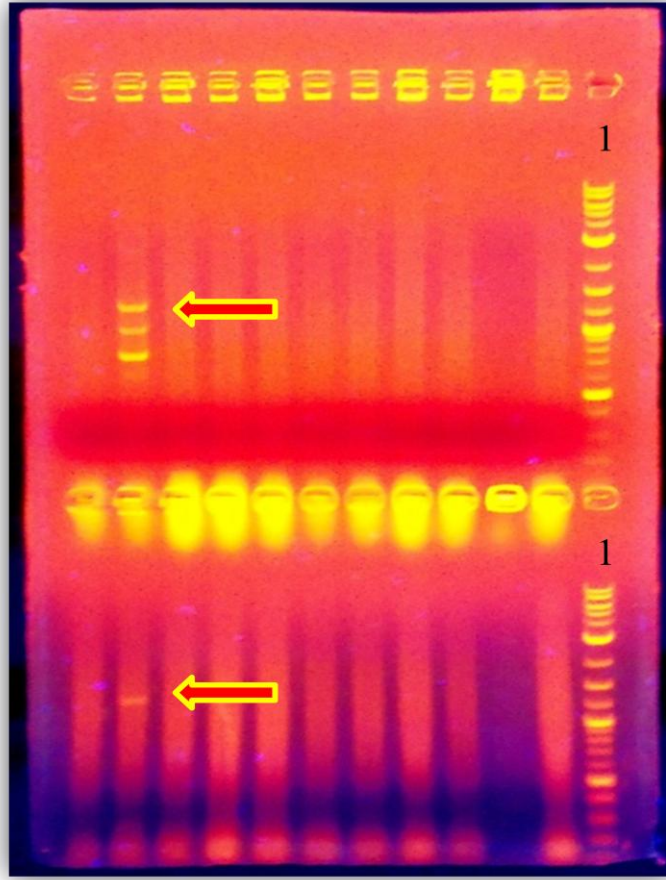
Şekil 4.6. Agaroz jel elektroforezi fotoğrafı 8 nolu kuyu standart DNA (1500 bp), diğer kuyular hCA IX geni.

3 µl PCR ürünü, 2 µl petSUMO ekspresyon vektörü, 1 µl tampon, 1 µl SUMO ligaz, 3 µl destile su = Toplam hacim 10 µl olacak şekilde +4°C'de bir gece ligasyon yapıldı. 50 µl *E.coli* (TOP10) bakteri hücrelerine 42°C'de 30 sn olacak şekilde ısı şoku uygulanarak transformasyon yapıldı. Bakteriler kanamisin bulunan katı besi yerine ekildi. Petri 15 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra etüve konarak 37°C'de bir gece büyümeye bırakıldı. 16 saatlik inkübasyonun ardından LB-Agar üzerinde beyaz koloniler gözlemlendi.



Şekil 4.7. LB-Agar fotoğrafı. *E.coli* (TOP10) bakteri kolonileri

Bu koloniler ile hem **petSUMO Forward ve hCA IX Revers** primerleri ile hem de **petSUMO Revers ve hCA IX Forward** primerleri ile 60°C’de ön denatürasyon 10 dk olacak şekilde koloni PCR yapıldı. 8. ve 11. kolonilerde iki türlü de (çapraz primerler kullanılarak) bant görüldü.



Şekil 4.8. Agaroz jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyu standart DNA (10 kb), bant görülen kuyular çapraz primerlerle doğrulanmış hCA IX geni

8. koloniden pipet ucu ile içinde kanamisin bulunan sıvı LB besiyeri yerine ekim yapıldı. 16 saat sonra plasmid saflaştırma kiti ile plasmid saflaştırıldı. Elektroforez yapıldı ve plasmidin bandı %1'lik agaroz jelde görüntülendi.

Şekil 4.9. Agaroz jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyu standart DNA (10 kb), 2. ve 3. kuyular petSUMO-hCA IX plasmidi

(1/100) Plasmid, kalıp DNA olarak kullanılarak hem petSUMO'nun hem de hCA IX'un kendi primerleri ile 53°C ile 63°C arası gradientli PCR yapıldı. Elektroforezinde her iki primer içinde bantlar görüldü.

Üst Sıra M-53°C-63°C
(petSUMO Primerleri)

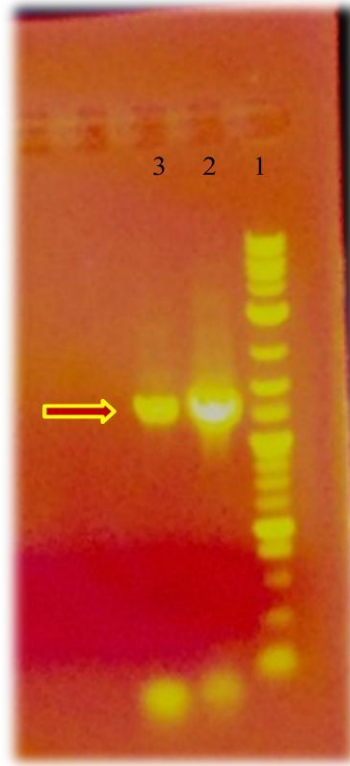
Alt Sıra M-53°C-63°C
(hCA IX Primerleri)

Şekil 4.10. Agaroz jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyular standart DNA (1500 bp), diğer kuyular hCA IX geni

Yine saflaştırılan plasmidden (petSUMO/hCA IX);

- 1) hCA IX'un Forward ve Revers primerleri ile,
- 2) petSUMO Revers ve hCA IX Forward primerleri ile,

60°C'de ön denatürasyon 10 dk olacak şekilde PCR yapıldı. PCR sonuçları %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

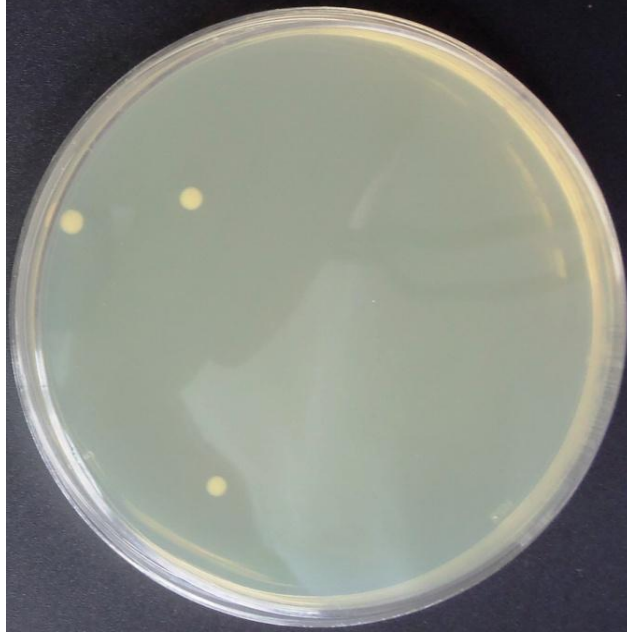


Şekil 4.11. Agaroz jel elektroforezi fotoğrafı 1 nolu kuyu standart DNA (10 kb), 2,3 nolu kuyular çapraz primerlerle doğrulanmış hCA IX geni

4.9. Ekspresyon Vektörüne Klonlanmış Olarak Saflaştırılan petSUMO-hCA IX Plasmidinin, *E.coli* (BL21DE3) Hücrelerine Aktarımı

PCR sonucu klonlamanın doğruluğundan emin olunduktan sonra saflaştırılan plasmidden 10 µl kullanılarak 50 µl *E.coli* (BL21DE3) bakterisine 42°C'de 30 sn olacak şekilde ısı şoku uygulandı, klonlanmış plasmidin *E.coli* (BL21DE3) bakterisine

transformasyonu sağlandı ve kanamisin bulunan LB-Agar petrisine yayıldı. 37°C’de 16 saatlik inkübasyonun ardından petri üstünde koloniler oluştu.



Şekil 4.12. LB-Agar fotoğrafı. *E.coli* (BL21DE3) bakteri kolonileri

Bu kolonilerin herbirinden;

- 1) hCA IX’un Forward ve Revers primerleri ile, (pozitif)
- 2) petSUMO’nun Forward ve Revers primerleri ile, (pozitif)
- 3) petSUMO Forward ve hCA IX Revers primerleri ile, (pozitif)
- 4) petSUMO Revers ve hCA IX Forward primerleri ile, (pozitif)

60°C’de ön denatürasyon 10 dk olacak şekilde PCR yapıldı. Sonuçlar %1’lik agaroz jelde doğrulandı. 3 koloninin de yukarıda gösterildiği gibi primerlerle yapılan tüm PCR işlemlerinde istenilen yerde pozitif sonuç görüldü.

- 1) CA IX'un Forward ve Revers primerleri ile, (pozitif)
- 2) Sumo'nun Forward ve Revers primerleri ile, (pozitif)
- 3) Sumo Forward ve CA IX Revers primerleri ile, (pozitif)
- 4) Sumo Revers ve CA IX Forward primerleri ile, (pozitif)

Şekil 4.13. Agaroz jel elektroforezi fotoğrafı 1,2,3 ve 4 nolu kuyular hCA IX geni, 5 nolu kuyular standart DNA (10 kb)

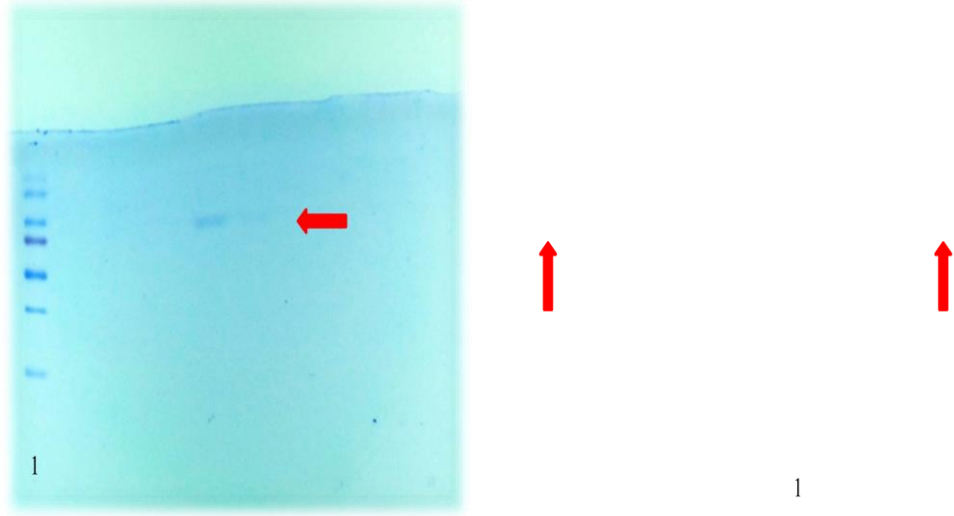
4.10. IPTG Kullanılarak İstenilen Genin Ekspresyonunun Sağlanması

İçerisinde petSUMO-hCA IX plasmidini taşıyan *E.coli* (BL21DE3) bakteri hücreleri içinde 16 µl kanamisin bulunan 16 ml'lik LB besi yerine ekildi. LB 37°C'de 130 rpm'de bir gece bekletildi, böylece taze kültür elde edildi. 1 gece sonra bu kültürden 2'şer ml alınarak içinde 200 µl kanamisin bulunan 200 ml'lik 4 ayrı sıvı besi yerine tekrar ekim yapıldı. 3,5 saat sonra OD₆₀₀ = 0,884 olarak ölçüldü. 3,5 saatten sonra 1 mM IPTG'den 160'şar µl alınarak bakterilerin bulunduğu besi yerlerinin üçüne eklendi ve 3, 5 ve 7 saat 20°C'de 270 rpm'de çalışıldı. 3, 5 ve 7 saatin sonunda bakteriler 15 ml'lik falkon tüplere alındı ve 6.000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. 50 mM Tris-HCl (pH=7,6) tamponundan 1 ml kullanılarak peletler vortekslendi, yıkandı. Tekrar 6.000 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Peletler daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Peletler 2 defa sıvı azottan geçirilerek havan yardımı ile parçalandı. Hücre homojenatları 12 ml Lizis tamponu kullanılarak ependorf tüplerine alındı. Tüpler 12.000 rpm’de 15 dakika +4°C’de santrifüj yapıldı. Süpernatant alındı ve peletler atıldı. Süpernatant SDS-PAGE’de görüntülendi (Şekil 4.14).

Şekil 4.14. SDS- PAGE fotoğrafı 1 nolu kuyu Standart proteinler (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa). 2,3,4,5 ve 6 nolu kuyular hücre lizati.

1 mM IPTG ile 5 saat indüklenen *E.coli* (BL21DE3) bakteri hücre homojenatı Ni-reçine kolonuna yüklendi. Saflaştırma işlemlerinde bağlanma tamponuna imidazol koyulmadı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat’e ayarlandı. 20 ependorf tüpü kadar elüsyon alındı. İlk 11 tüpün 280 nm’de absorbanslarına bakıldı. Elüsyon sonucu absorbansı yüksek çıkan elüatlar için SDS-PAGE yapıldı ve tek bant görüldü (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. SDS- PAGE fotoğrafı 1 nolu kuyular standart proteinler (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa). Diğer kuyular SUMO-hCA IX füzyon proteini.

1 mM IPTG ile 7 saat indüklenen *E.coli* (BL21DE3) bakteri hücre homojenatı Ni-reçine kolonuna yüklendi. Saflaştırma işlemlerinde bağlanma tamponuna yine imidazol koyulmadı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı. 15 ependorf tüpü kadar elüsyon alındı. İlk 9 tüpün 280 nm'de absorbanlarına bakıldı. Elüsyon sonucu absorbanı yüksek çıkan elüatlar için SDS-PAGE yapıldı ve tek bant görüldü (Şekil 4.16).



1 4 5

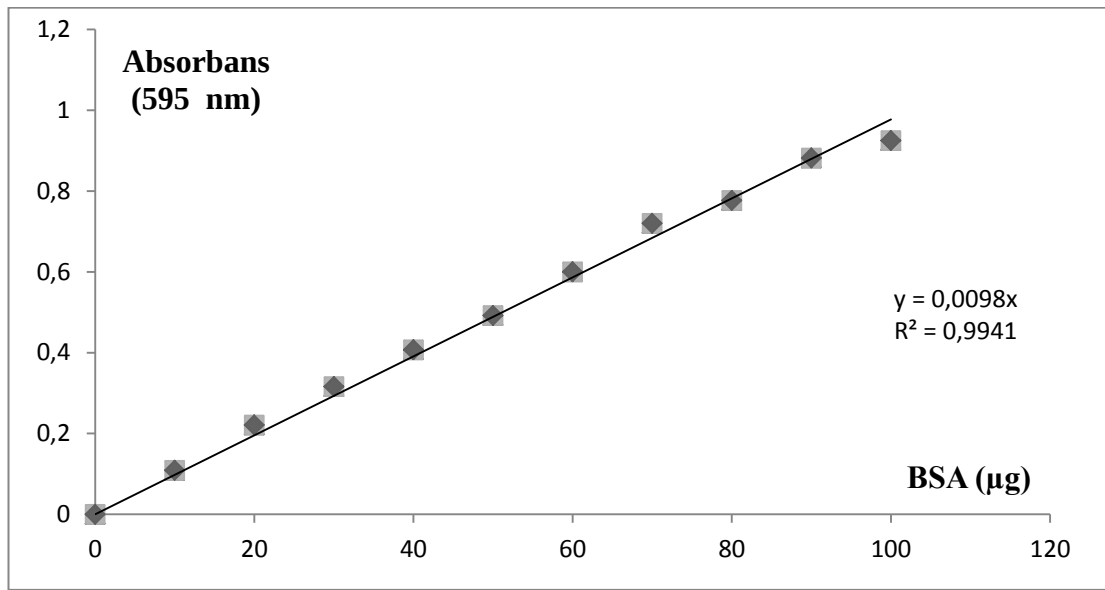
Şekil 4.16. SDS- PAGE fotoğrafı. 1 nolu kuyu standart proteinler (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa). 4,5 nolu kuyular SUMO-hCA IX füzyon proteini.

Çizelge 4.1. SUMO-hCA IX füzyon proteinin ve saf hCA IX enziminin Ni reçine afinite kolonu ile saflaştırılma sonuçları

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EU/ml)	Protein miktarı (mg/ml)	Toplam hacim (ml)	Toplam aktivite (EU)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (EU/mg)	Yüzde verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	5067	0,356	12	60804	4,272	14233	100	1
Ni-NTA afinite kromatografisi sonrası SUMO – hCA IX	8042	0,184	7	56294	1,288	43707	92,58	3,07
Ni-NTA afinite kromatografisi sonrası hCA IX	13067	0,045	4	52268	0,180	290378	85,96	20,4

4.11. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

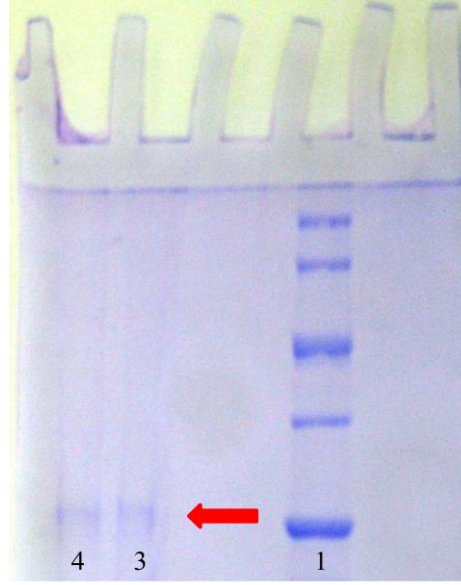
Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla önce standart grafik hazırlandı. Elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra bu standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik

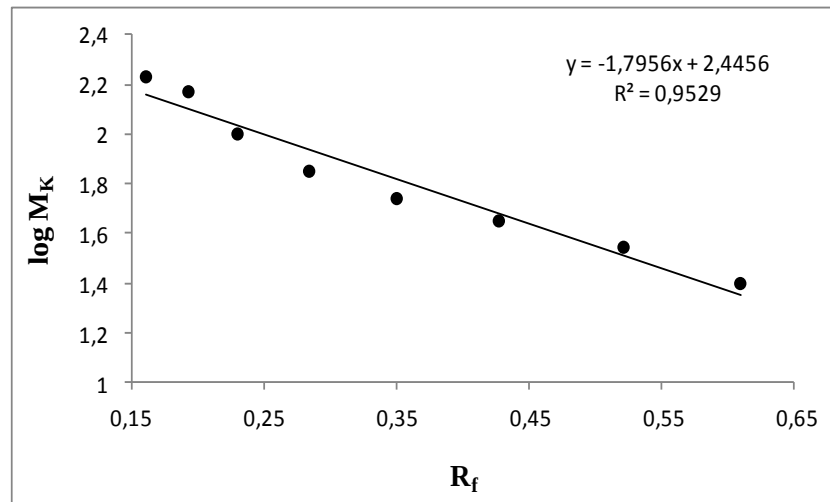
4.12. SUMO/hCA IX Füzyon Proteinin SUMO Proteazla Kesimi

Enzim havuzunun protein miktarı Bradford metoduyla hazırlanan standart grafik kullanılarak belirlendi ve kesim işlemi SUMO proteazla kendi prosedürüne göre 1, 2, 4 ve 6 saat yapıldı. Böylece SUMO-hCA IX füzyon proteinin birbirinden ayrılması sağlandı. Kesim sonrası oluşan karışım Ni reçine kolonuna yüklendi. Saflaştırma prosedürü uygulandı ve safsızlık olarak beklediğimiz hCA IX için 280 nm'de absorbanslara bakıldı. 280 nm'deki absorbansları yüksek çıkan ependorflardaki enzimlerle SDS-PAGE yapıldı (Şekil 4.18).

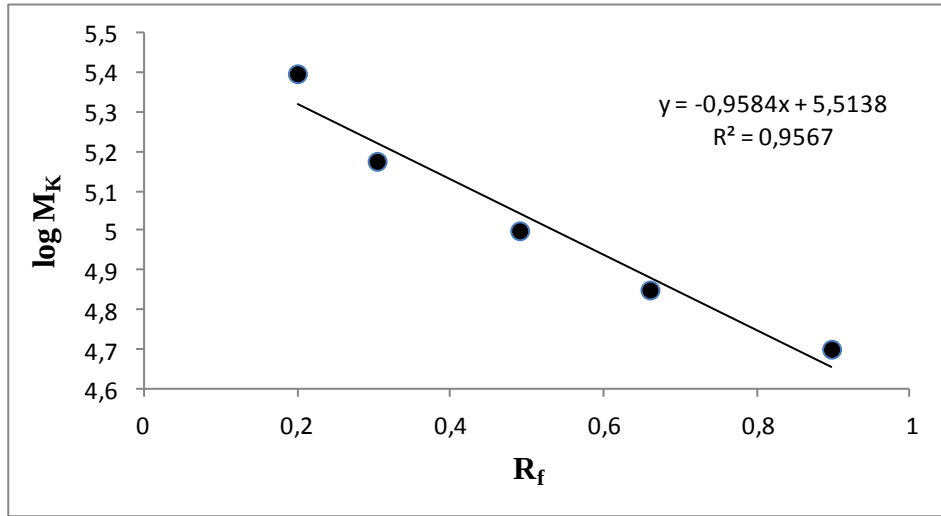


Şekil 4.18. SDS- PAGE fotoğrafı 1 nolu kuyu standart proteinler (250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa). 3,4 nolu kuyular hCA IX.

Ni reçine afinite kromatografisinden saf olarak elde edilen hCA izoenzimi ve standart proteinler için, Bölüm 3.4.2.'de anlatıldığı şekilde elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen protein bantlarının fotoğrafı çekildi ve saflaştırılan enzimlerin molekül kütleleri $\log M_K$ - R_f grafikleri çizilerek bu grafiklerden hesaplandı (Çizelge 4.2) (Şekil 4.19, Şekil 4.20).



Şekil 4.19. Saflaştırılan SUMO-hCA IX füzyonu için $\log M_K/R_f$ grafiği



Şekil 4.20. Saflaştırılan hCA IX enzimi için log M_K/R_f grafiği

Çizelge 4.2. SUMO-hCA IX füzyon proteini ile hCA IX izoenzimi için SDS-PAGE ile molekül kütleleri tayini sonuçları

Enzim	Molekül Kütleleri (kDa)
SUMO-hCA IX füzyon proteini	85,11
hCA IX izoenzimi	50,47

4.13. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Optimum pH Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

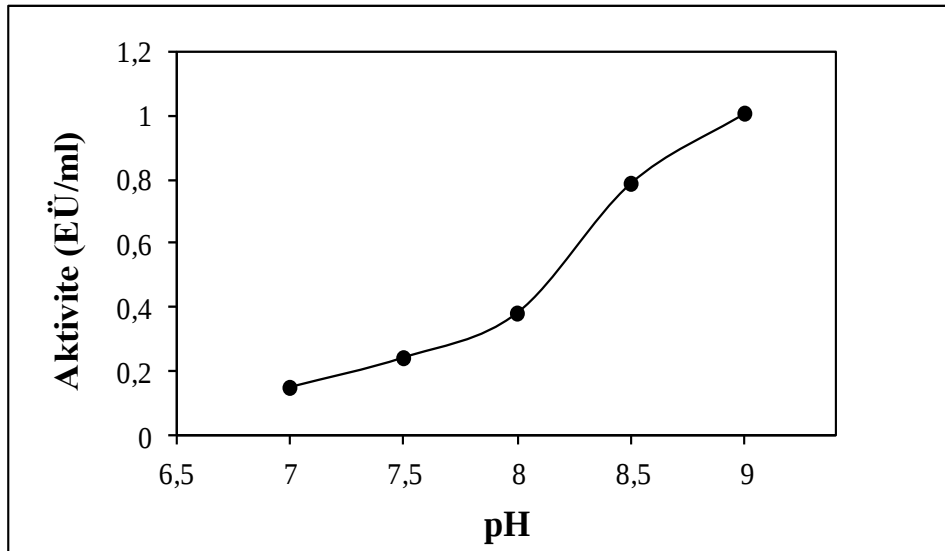
4.13.1. Tris-SO₄ tamponu için optimum pH çalışması

hCA IX izoenziminin optimum pH'sı 7,5-9,0 aralığında 50 mM Tris-SO₄ ve pH'sı 5,0-7,5 aralığında 50 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4) (Şekil 4.21, Şekil 4.22). Yapılan çalışmalar sonucu hCA IX izoenzimi için en uygun optimum pH'nın 50 mM Tris-SO₄ pH=9,0 tamponu olduğu tespit edildi. pH=9,0'un

üstünde yapılacak olan ölçümlerde elde edilen sonuçların güvenilirliği azalacağı için deney yapılmadı.

Çizelge 4.3. 50 mM Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak hCA IX izoenziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/ml)
7,0	0,147
7,5	0,240
8,0	0,380
8,5	0,787
9,0	1,007

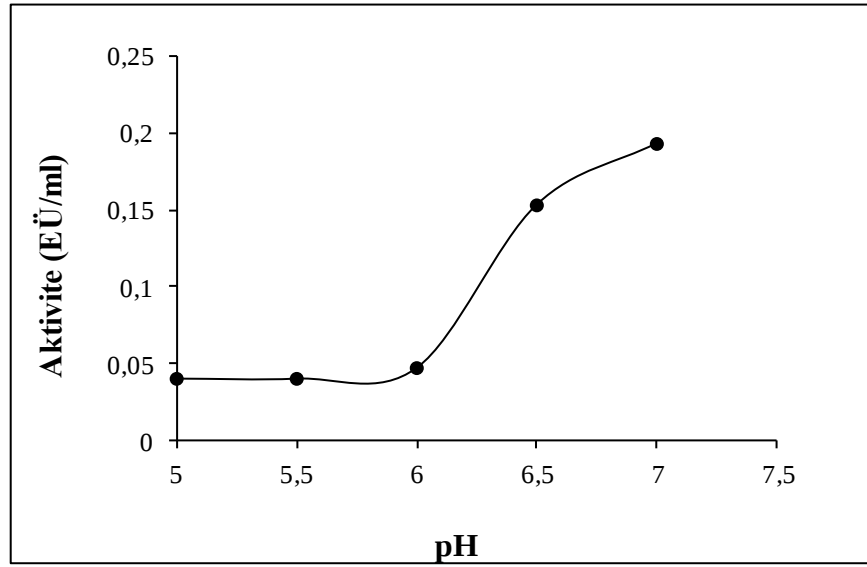


Şekil 4.21. 50 mM Tris-SO₄ Tampon çözeltileri kullanılarak hCA IX izoenzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği

4.13.2. KH_2PO_4 tamponu için optimum pH çalışması

Çizelge 4.4. 50 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak hCA IX izoenziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,040
5,5	0,040
6,0	0,047
6,5	0,153
7,0	0,193



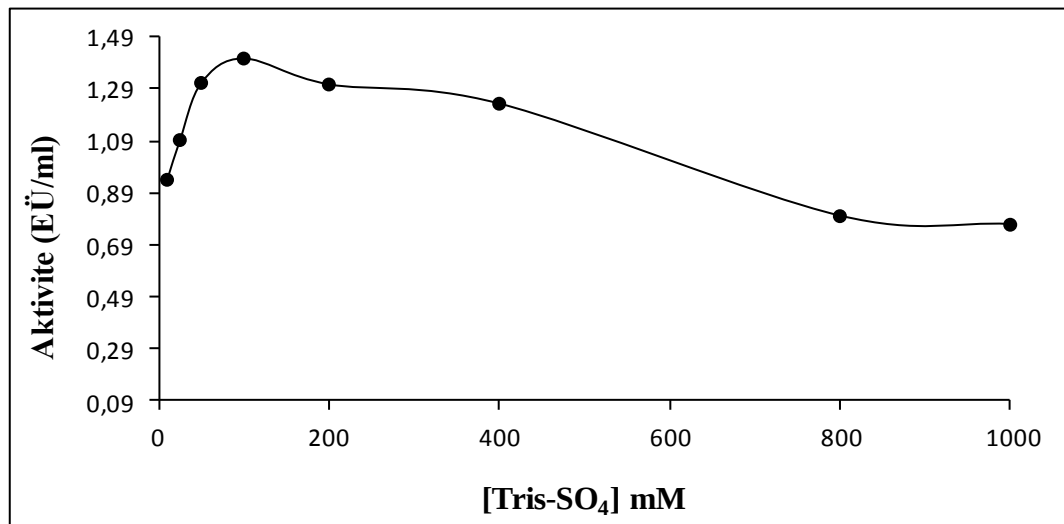
Şekil 4.22. 50 mM KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak hCA IX izoenzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği

4.14. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum iyonik şiddeti belirlemek amacıyla Tris-SO₄ tamponunun optimal pH'daki 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800 ve 1000 mM'lık konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Farklı Tris-SO₄ konsantrasyonlarında esterase aktivite ölçümleri yapılarak Tris-SO₄ konsantrasyonuna karşı aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi (Çizelge 4.5) (Şekil 4.23). Yapılan çalışmalar sonucu hCA IX izoenzimi için en uygun optimum iyonik şiddetin 100 mM Tris-SO₄ pH=9,0 tamponu olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.5. hCA IX izoenziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Tris-SO ₄ derişimi (mM)	10	25	50	100	200	400	800	1000
Aktivite (EÜ/ml)	0,940	1,093	1,313	1,407	1,307	1,233	0,800	0,767



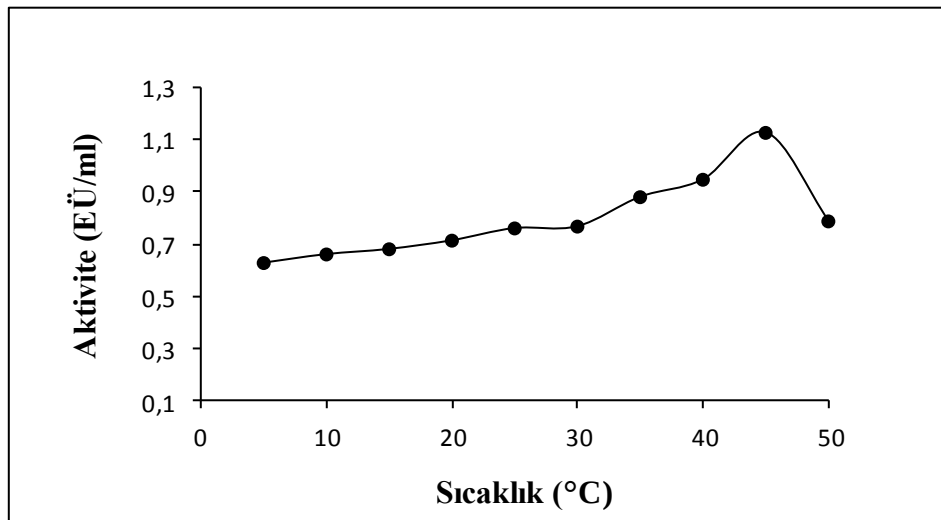
Şekil 4.23. Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak hCA IX izoenziminin optimum iyonik şiddeti için değişim grafiği

4.15. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

Enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip tampon çözeltisi kullanıldı. 0°C ile 50°C arasında her 5°C'lik sıcaklık farkı oluşturularak enzimin optimum pH'sında spektrofotometrik olarak esteraz aktivitesi deneyleri gerçekleştirildi (Çizelge 4.6) (Şekil 4.24). Yapılan çalışmalar sonucu hCA IX izoenzimi için en uygun optimum sıcaklığın 45°C olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.6. hCA IX izoenziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık(°C)	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Aktivite(EU)	0,553	0,627	0,660	0,680	0,713	0,76	0,767	0,880	0,947	1,127	0,787



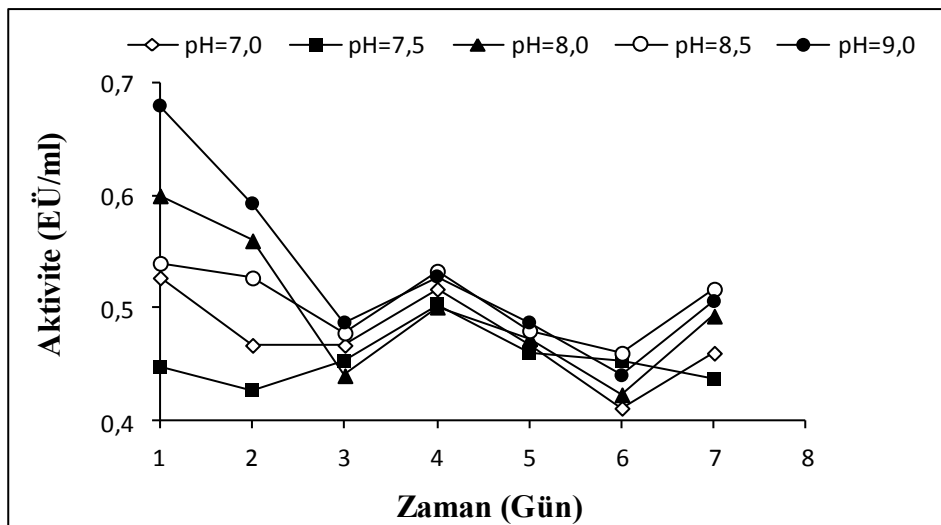
Şekil 4.24. hCA IX izoenzimi için optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği

4.16. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin Stabil pH Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

Enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek için, pH'sı 7,5-9,0 aralığında 100 mM Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 ml'si ile 1 ml enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. Birer gün arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi (Çizelge 4.7) (Şekil 4.25). Yapılan çalışmalar sonucu hCA IX izoenzimi için en uygun stabil pH'nın 100 mM Tris-SO₄ pH=8,5 tamponu olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.7. hCA IX izoenziminin stabil pH'sı için 100 mM Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Zaman		1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün
Enzim Ünitesi	pH: 7,0 için	0,527	0,467	0,467	0,517	0,467	0,411	0,46
	pH: 7,5 için	0,447	0,427	0,453	0,503	0,46	0,453	0,437
	pH: 8,0 için	0,6	0,56	0,44	0,501	0,473	0,423	0,493
	pH: 8,5 için	0,54	0,527	0,478	0,533	0,48	0,46	0,517
	pH: 9,0 için	0,68	0,593	0,487	0,528	0,487	0,44	0,506



Şekil 4.25. Değişik pH'lardaki 100 mM Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak hCA IX izoenzimi için elde edilen stabil pH grafiği

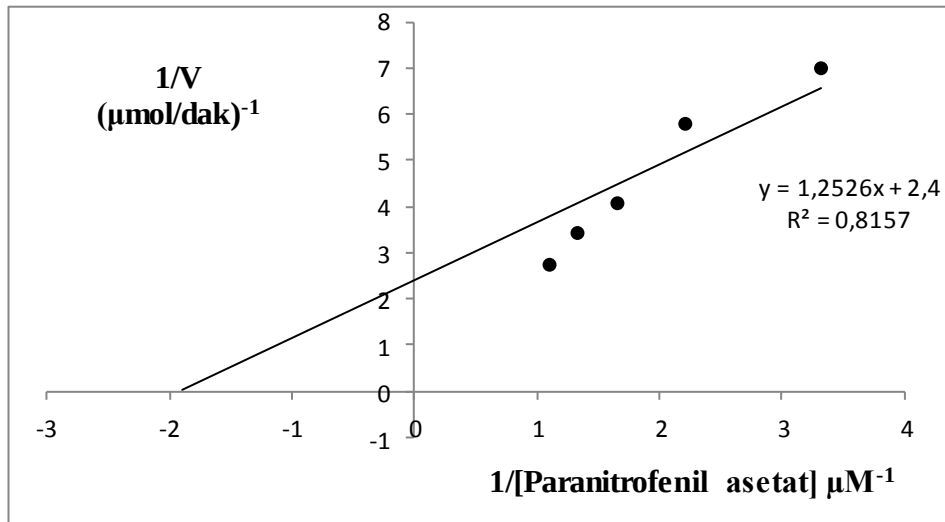
4.17. p-Nitrofenilasetat Substratı İçin K_M , V_{max} ve k_{cat} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar

p-Nitrofenilasetat substratı için klonlanmış hCA IX enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

Daha sonra, K_M ve V_{max} değerleri hesaplanması için gerçekleştirilen deneyde kullanılan enzim çözeltisinde kantitatif protein tayini yapılarak toplam enzim (E_T) miktarı bulundu. Enzimin turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri;

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

formülünden faydalanılarak hesaplandı (Çizelge 4.8) (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. hCA IX izoenzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.8. hCA IX izoenzimi için p-nitrofenilasetat substratı ile K_M , V_{max} ve k_{cat} çalışmaları sonuçları

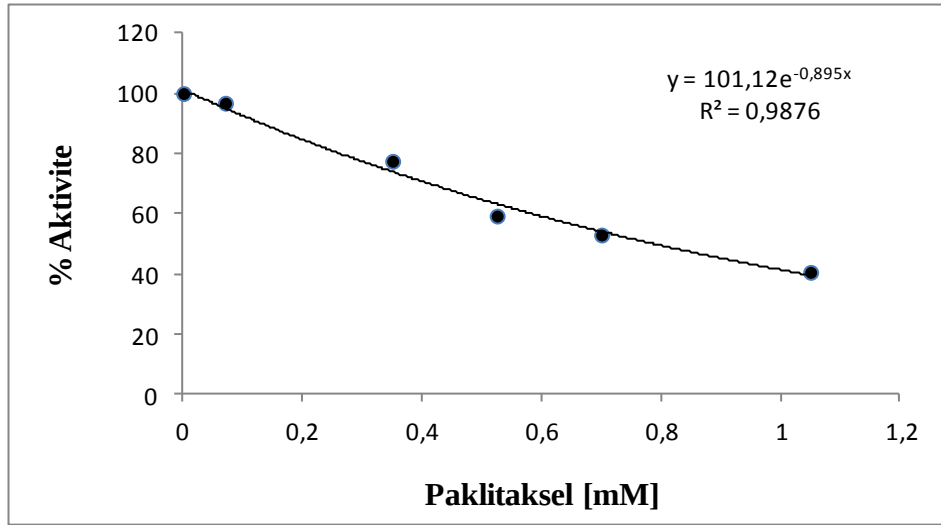
Enzim	Substrat	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)	k_{cat} (s ⁻¹)
İnsan Karbonik anhidraz IX İzoenzimi	p-nitrofenilasetat	0,33	0,417	9,27

4.18. Bazı Antitümör İlaçlar ile Ağır Metallerin hCA IX İzoenziminin Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

Enzimin aktivitesini inhibe eden Paklitaksel, Dosetaksel, İrinotekan HCl ve Etoposid antitümör ilaçları ile $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ kimyasal maddeleri için sabit substrat konsantrasyonunda inhibitörsüz ortamda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda IC_{50} değerleri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) % aktivite-[I] grafikleri çizilerek belirlendi (Çizelge 4.9-4.14) (Şekil 4.27-4.32).

Çizelge 4.9. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine Paklitaksel ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

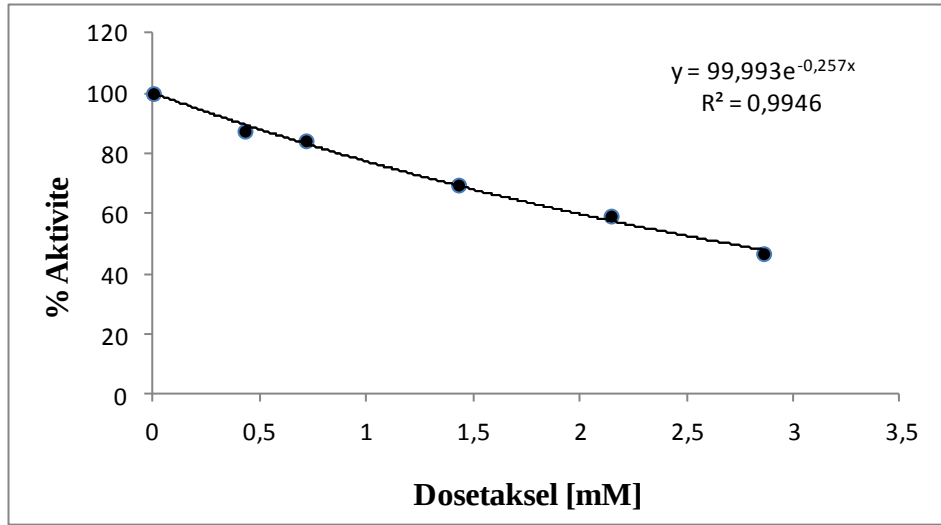
Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM)	%Aktivite (EÜ/ml)
360	400	10	230	1000	0	100
360	400	10	220	1000	0,07	96,8
360	400	10	180	1000	0,35	77,5
360	400	10	155	1000	0,525	59,3
360	400	10	130	1000	0,7	53
360	400	10	80	1000	1,05	40,6



Şekil 4.27. hCA IX izoenziminin aktivitesi için 5 farklı Paklitaksel konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Paklitaksel] grafiği

Çizelge 4.10. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine Dosetaksel ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

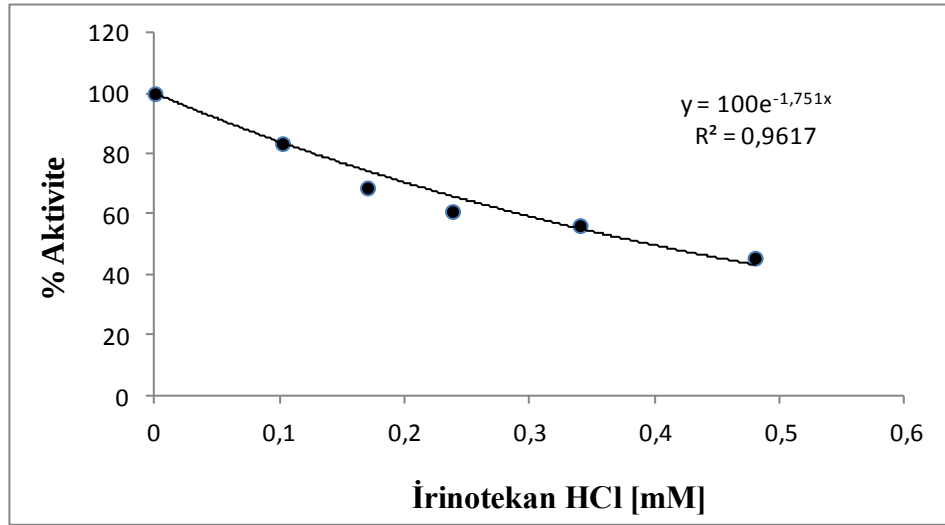
Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM)	%Aktivite (EÜ/ml)
360	400	10	230	1000	0	100
360	400	10	200	1000	0,429	87,5
360	400	10	180	1000	0,715	84,3
360	400	10	130	1000	1,43	69,6
360	400	10	80	1000	2,145	59,3
360	400	10	30	1000	2,86	46,8



Şekil 4.28. hCA IX izoenziminin aktivitesi için 5 farklı Dosetaksel konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Dosetaksel] grafiği

Çizelge 4.11. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine İrinotekan HCl ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

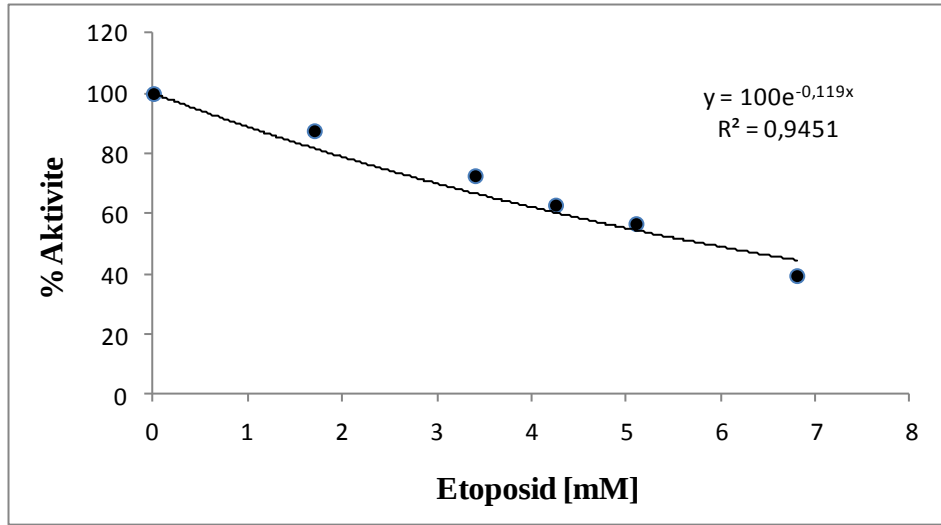
Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM)	%Aktivite (EÜ/ml)
360	400	10	230	1000	0	100
360	400	10	227	1000	0,102	83,44
360	400	10	225	1000	0,17	68,75
360	400	10	223	1000	0,238	60,93
360	400	10	220	1000	0,34	56,25
360	400	10	180	1000	0,48	45,47



Şekil 4.29. hCA IX izoenziminin aktivitesi için 5 farklı İrinotekan HCl konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[İrinotekan HCl] grafiği

Çizelge 4.12. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine Etoposid ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

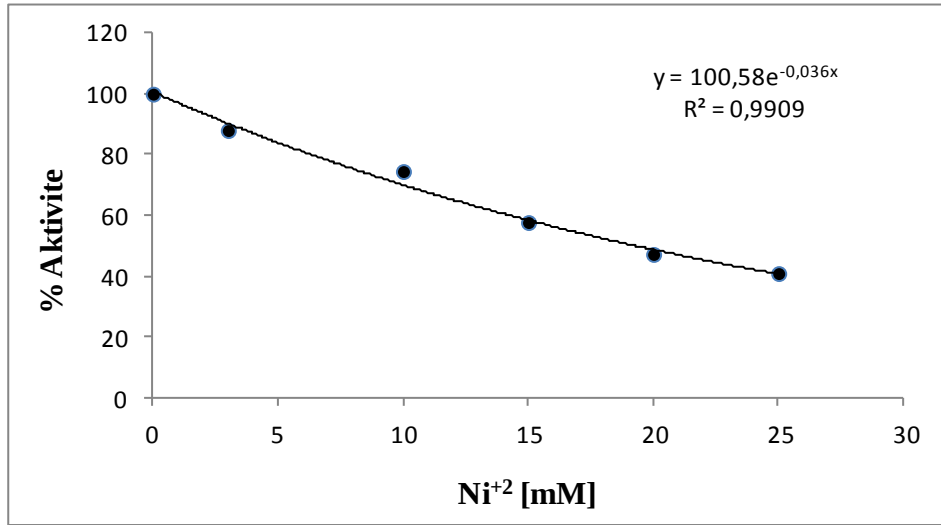
Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM)	%Aktivite (EÜ/ml)
360	400	10	230	1000	0	100
360	400	10	180	1000	1,7	87,65
360	400	10	130	1000	3,4	72,71
360	400	10	105	1000	4,25	62,96
360	400	10	80	1000	5,1	56,79
360	400	10	30	1000	6,8	39,51



Şekil 4.30. hCA IX izoenziminin aktivitesi için 5 farklı Etoposid konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Etoposid] grafiği.

Çizelge 4.13. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine nikel iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

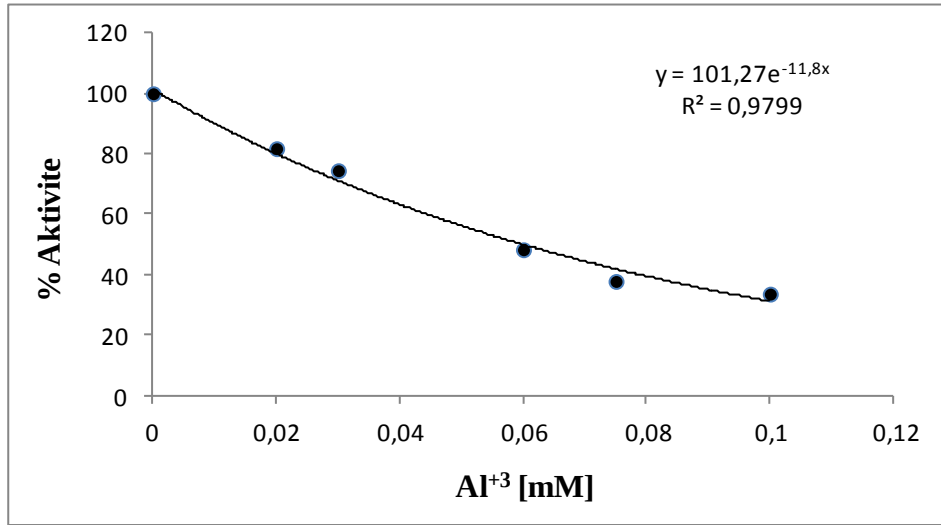
Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM)	%Aktivite (EÜ/ml)
360	400	10	230	1000	0	100
360	400	10	200	1000	3	88
360	400	10	130	1000	10	74,5
360	400	10	80	1000	15	57,7
360	400	10	30	1000	20	47,2
360	380	10	0	1000	25	40,9



Şekil 4.31. hCA IX izoenziminin aktivitesi için 5 farklı Ni²⁺ konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Ni²⁺] grafiği

Çizelge 4.14. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine alüminyum iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Konsantrasyonu [I] (mM)	%Aktivite (EÜ/ml)
360	400	10	230	1000	0	100
360	400	10	210	1000	0,02	81,8
360	400	10	200	1000	0,03	74,5
360	400	10	170	1000	0,06	48,3
360	400	10	155	1000	0,075	37,8
360	400	10	130	1000	0,1	33,6



Şekil 4.32. hCA IX izoenziminin aktivitesi için 5 farklı Al³⁺ konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Al³⁺] grafiği

Çizelge 4.15. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri

Kimyasal Maddeler	IC ₅₀ (mM)
Ni ⁺²	19,47
Al ⁺³	0,06
Cu ⁺²	Küvet içi 0-25 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Mg ⁺²	Küvet içi 0-25 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Cd ⁺²	Küvet içi 0-25 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Mn ⁺²	Küvet içi 0-25 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.

Çizelge 4.16. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine bazı antitümör ilaçlar ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri

Antitümör İlaçlar	IC ₅₀ (mM)
Paklitaksel	0,79
Dosetaksel	2,71
İrinotekan HCl	0,40
Etoposid	5,84
Karboplatin	Küvet içi 0-2670 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Sitarabin	Küvet içi 0-17,9 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Kalsiyum Folinat	Küvet içi 0-2,11 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Metotreksat	Küvet içi 0-5,5 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Cetuksimab	Aktive etti.
Rituksimab	Küvet içi 0-70 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Sisplatin	Küvet içi 0-170 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
5-Fluorourasil	Küvet içi 0-38,5 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Epirubisin HCl	Küvet içi 0-360 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Fludarabin Fosfat	Küvet içi 0-6,85 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.

Çizelge 4.16 (devam)

Gemsitabin HCl	Küvet içi 0-13,4 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Sitozin Arabinozid	Aktive etti.
İfosfamide	Küvet içi 0-38,3 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Vinblastin Sülfat	Aktive etti.
Doksorubisin HCl	Kendisi absorpsiyon gösterdiği için etkisi belirlenemedi.
Dakarbazin	Küvet içi 0-22 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Vinorelbin	Küvet içi 0-1280 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Doksitaks	Küvet içi 0-500 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Bortazomib	Küvet içi 0-455 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Mitoksantron	Kendisi absorpsiyon gösterdiği için etkisi belirlenemedi.
Okzaliplatin	Küvet içi 0-1250 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.

4.19. Klonlanmış hCA IX İzoenzimi İçin İnhibitör Etkisi Gösteren Antitümör İlaçların K_i Sabitlerinin Bulunması

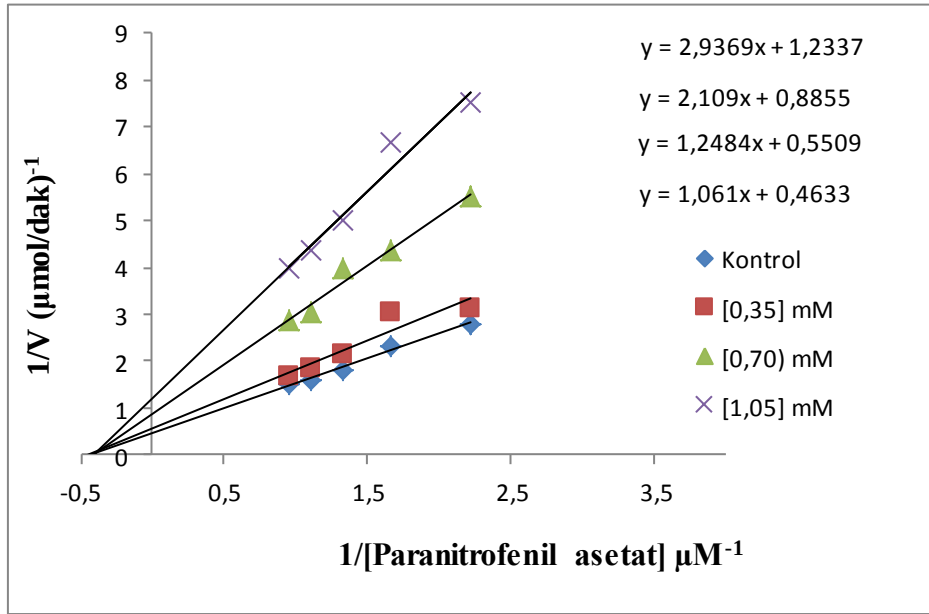
İnhibitör çalışmaları için, hCA IX izoenzimini inhibe eden Paklitaksel ile Dosetaksel antitümör ilaçları kullanıldı. Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir

substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi (Çizelge 4.17, Çizelge 4.18).

Daha sonra hCA IX izoenzimi için beş farklı substrat ve üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V-1/[S]$ değerleri belirlenerek her bir inhibitör için ayrı ayrı Lineveawer-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tespit edildi (Şekil 4.33- Şekil 4.34) (Çizelge 4.19) (Lineweaver and Burk 1934).

Çizelge 4.17. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine Paklitaksel antitümör ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris- SO ₄ (μ l)	Enzim Hacmi (μ l)	Saf su (μ l)	Substrat Hacmi (μ l)	Küvetteki substrat konsantrasyonu (mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam Hacim (μ l)
400	10	440	150	0,45	-	1000
400	10	390	150	0,45	0,35	1000
400	10	340	150	0,45	0,7	1000
400	10	290	150	0,45	1,05	1000
400	10	390	200	0,60	-	1000
400	10	340	200	0,60	0,35	1000
400	10	290	200	0,60	0,7	1000
400	10	240	200	0,60	1,05	1000
400	10	340	250	0,75	-	1000
400	10	290	250	0,75	0,35	1000
400	10	240	250	0,75	0,7	1000
400	10	190	250	0,75	1,05	1000
400	10	290	300	0,90	-	1000
400	10	240	300	0,90	0,35	1000
400	10	190	300	0,90	0,7	1000
400	10	140	300	0,90	1,05	1000
400	10	240	350	1,05	-	1000
400	10	190	350	1,05	0,35	1000
400	10	140	350	1,05	0,7	1000
400	10	90	350	1,05	1,05	1000



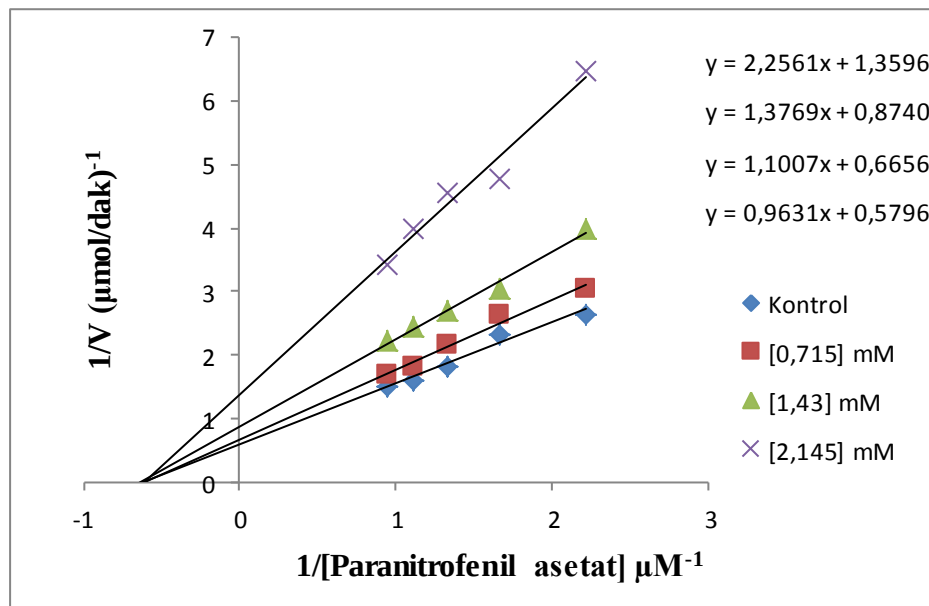
Şekil 4.33. hCA IX izoenziminin üzerine Paklitaksel antitümör ilacının etkisini gösteren Lineveawer-Burk grafiği

Çizelge 4.18. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine Dosetaksel antitümör ilacının K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris- SO ₄ (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konsantrasyonu (mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	10	440	150	0,45	-	1000
400	10	390	150	0,45	0,715	1000
400	10	340	150	0,45	1,43	1000
400	10	290	150	0,45	2,145	1000
400	10	390	200	0,60	-	1000
400	10	340	200	0,60	0,715	1000
400	10	290	200	0,60	1,43	1000
400	10	240	200	0,60	2,145	1000
400	10	340	250	0,75	-	1000
400	10	290	250	0,75	0,715	1000

Çizelge 4.18 (devam)

400	10	240	250	0,75	1,43	1000
400	10	190	250	0,75	2,145	1000
400	10	290	300	0,90	-	1000
400	10	240	300	0,90	0,715	1000
400	10	190	300	0,90	1,43	1000
400	10	140	300	0,90	2,145	1000
400	10	240	350	1,05	-	1000
400	10	190	350	1,05	0,715	1000
400	10	140	350	1,05	1,43	1000
400	10	90	350	1,05	2,145	1000



Şekil 4.34. hCA IX izoenziminin üzerine Dosetaksel antitümör ilacının etkisini gösteren Lineweaver-Burk grafiği

hCA IX izoenzimi için inhibitör olarak kullanılan antitümör ilaçların inhibisyon tipleri nonkompetitif (yarışmasız) olduğundan her bir ilaç için ayrı ayrı;

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

Formülü ile K_i değerleri hesaplanarak Çizelge 4.19’da gösterildi.

Çizelge 4.19. hCA IX izoenzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör Cinsi	[I] mM	K_i (mM)	Ortalama K_i Değerleri (mM)	İnhibisyon Tipi
Paklitaksel	0,35	3,18	1,65	Yarışmasız
	0,70	0,89		
	1,05	0,88		
Dosetaksel	0,715	1,15	1,86	Yarışmasız
	1,43	2,81		
	2,145	1,61		

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karbonik anhidraz enzimi (Karbonat hidroliyaz, karbonat dehidrataz, karbonat anhidraz, karbonik asit anhidraz E.C.4.2.1.1) prokaryot, ökaryot ve archaea'da yaygın olarak bulunan ve yapısında Zn^{+2} iyonu bulunduran bir metaloenzimidir. Karbonik anhidraz izoenzimleri α -, β -, γ -, δ - ve ϵ - CA olmak üzere evrimsel olarak bağımsız beş ayrı gen ailesi tarafından kodlanır (Leppilampi 2006; Nuti *et al.* 2007).

CA enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynamaktadır. Doku/organlar ile akciğer arasındaki CO_2 /bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO_2 hemostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev almaktadır (Chegwidden *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2000).

Karbonik anhidraz enzimi pek çok canlıda birden fazla izoenzime ve farklı kinetik özelliklere sahiptir. CA'nın bulunduğu ortamın şartlarına ve ihtiyacına göre değişik izoenzimleri mevcuttur. CA izoenzimlerinin molekül kütleleri canlıdan canlıya, dokudan dokuya farklılık göstermektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda memelilerde 16 tane CA izoenziminin bulunduğu bilinmektedir. Enzimin canlı organizmada nerelerde, hangi şekilde lokalize olduğu ve nasıl fonksiyon gösterdiğini belirlemek amacı ile pek çok canlı türünde ve dokularında karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır (Söyüt ve Beydemir 2008).

Transmembran karbonik anhidraz izoenzimlerinden olan CA IX, tümör metabolizması ile ilişkili olarak bilinen en önemli enzimlerden biridir. CA IX tümörlü hücrelerin hücre içi ve hücre dışı pH düzenlenmesini sağlayarak hipoksik ve asidik koşullara adaptasyonunu sağlar. Özellikle katı tümörlerdeki CA IX ekspresyonu, tümörün tanısı

ve prognozu hakkında bilgi vermesi nedeniyle bu enzimin biyobelirteç olarak kullanılmasına izin vermektedir. Dolayısıyla CA IX, tümör biyolojisinde önemli bir yer tutmaktadır.

Karbonik anhidraz IX izoenzimi hipoksida yüksek düzeyde ifade edilir. CA IX özellikle hipoksik tümör dokularında bulunup gastrointestinal yoldaki düşük düzeydeki ekspresyonu haricinde birçok normal dokuda bulunmayan yüksek aktiviteli ve tümörle ilişkili bir membran enzimidir. CA IX'un yeni antikanser tedavileri için ilaçlara hedef oluşturabileceği ve bir tümör ilerleme belirteci olduğu savunulmuştur (Ozensoy and Supuran 2007).

Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Örneğin nükleotid sentezinin inhibitörleri (antikanser ajanlar) ve çinko ihtiva eden anjiyotensin dönüştürücü enzimin inhibitörleri (tiyol kaptopril) kan basıncının azaltılması ve hipertansiyonun tedavisinde kullanılmaktadır (Ondenti and Cushman 1982).

Medikal ilaçlar, çeşitli metaller, anyonlar ve pestisitler gibi çoğu maddelerin CA'lar üzerinde inhibitör etkisi gösterdiği literatürde belirtilmiştir (Beydemir vd 2000; Gülçin vd 2004; Innocenti *et al.* 2005). Karbonik anhidraz inhibitörleri birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak izoenzime spesifik olmayan inhibitörlerin tedavi amaçlı kullanılmasıyla canlı sistemde varolan diğer CA izoenzimleri de inhibe olmaktadır ve tam olarak bir tedavi uygulanamamaktadır (Arslan 1994). Dolayısıyla CA IX izoenziminin inhibisyon mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik yaptığımız bu çalışmanın önemi gayet açıktır. Son yıllarda yapılan çalışmaların çoğu, CA IX izoenziminin fizyolojik öneminin ve inhibisyon mekanizmasının aydınlatılmasına ve bu doğrultuda canlı sistemde varolan diğer CA izoenzimlerini inhibe etmeyen sadece CA

IX izoenzimi için spesifik inhibitör arayışına yönelik çalışmalardır. Bu tür çalışmaların önümüzdeki yıllarda da artarak devam edeceği aşıkardır.

Bu çalışmada kanser ilişkili karbonik anhidraz IX izoenziminin; insan pankreas dokusundan klonlanması, klonlanan ekspresyon vektörünün *E.coli* hücrelerine transformasyonu, *E.coli*'de ekspresyonu ve ekspre edildikten sonra Ni reçine kolonu kullanılarak afinite kromatografi tekniği ile belirli ölçüde saflaştırılması ile saf enzim üzerine bazı antitümör ilaçların ve kimyasalların inhibisyon etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla ilk olarak insan pankreas mRNA'sı Clontech firmasından ticari olarak temin edildi ve sonra revers transkripsiyon yöntemiyle insan pankreas cDNA kütüphanesi bölüm 3.3.2.'de anlatıldığı gibi oluşturuldu. Bu kütüphaneden kanser ilişkili trans membran protein olan hCA IX izoenziminin gen bölgesi gene spesifik primerlerle PCR'da çoğaltılarak pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı. hCA-IX izoenziminin gen bölgesini taşıyan klonlama vektörü ısı şoku uygulaması ile *E.coli* (JM109) hücrelerine transforme edildi ve petri üzerinde mavi-beyaz (rekombinant) koloni gözlemlendi. Klonlanan gen bölgesinin DNA dizi analizi yapılarak klonlamanın doğru olup-olmadığı kontrol edildi. Dizi analizi sonucu 1377 bp'lık PCR amplifikasyon ürününün hCA IX olduğu doğrulanıp, PCR'a dayalı olarak herhangi bir mutasyonun oluşmadığı gösterildi. Bunun nedeni her ne kadar spesifik primerler kullanılsa da PCR'a dayalı amplifikasyonlarda yanlış hibridizasyonlar olabileceğidir. İkinci önemli nokta daha sonra ekspresyon çalışmalarında kullanılacak olan ORF'de taq polimeraza bağlı olarak oluşan tesadüfi mutasyonların bulunup bulunmadığının kontrol edilmesidir. Elde edilen diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information)'a ait internet adresi kullanılarak biyoinformatik olarak karşılaştırıldı. DNA dizi analizi ile doğruluğu kanıtlanan hCA IX izoenziminin gen bölgesi ekspre edilmek amacıyla petSUMO ekspresyon vektörüne klonlandı. hCA IX izoenziminin gen bölgesini taşıyan ekspresyon vektörü ısı şoku uygulaması ile transformasyon verimliliği daha yüksek olduğu için öncelikle *E.coli* (TOP10) hücrelerine transforme edildi. Bu yöntemle yüksek konsantrasyonda hCA IX izoenziminin gen bölgesini taşıyan plasmid elde edildi. Daha

sonra ekspresyonun T7 promoter sistemi ile başlatılması için, hCA IX genini taşıyan petSUMO plasmidi ısı şoku uygulaması ile *E.coli* (BL21DE3) hücrelerine transforme edildi. Klonlama ve ekspresyon amaçlı kullanılan plasmidlerin antibiyotik direnç geni taşımaları özelliğinden yararlanılarak antibiyotikli ortamda plasmid taşıyan bakteriler seçildi.

E.coli (BL-21) soyunun, rekombinant protein ekspresyonunda sahip olduğu özellikleri açısından literatürde yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bu hücreler T7 RNA polimeraz genini içerirler. Ayrıca IPTG ile teşvik edilebilirler. Sentezlenen proteinin degrades edebilen bazı proteazlar açısından eksiktir. Bu özellikleri dikkate alınarak çalışmamızda protein üretimi için pET ekspresyon sistemi için uygun olan bu soy tercih edildi.

Ekspresyonun kontrolü için IPTG içermeyen ve IPTG içeren besi yerlerinde deney kuruldu. Kontrol grubu ve deney grubu aynı şartlarda büyütüldü. Kültürün büyüme eğrisi belirli aralıklarla 600 nm’de optik yoğunluklarının ölçülmesiyle belirlendi ve $OD_{600}=0,6-0,8$ oluncaya kadar kültür büyümeye bırakıldı. Yeterli bakteri konsantrasyonuna ulaşıldıktan sonra protein ekspresyonunun gerçekleşmesi için 160 µl 1 mM izopropiltiyogalaktozid (IPTG) ve 160 µl 0,4 M $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ bakteri kültürüne eklendi. Kültür 30°C’de 260 rpm’de ekstra 8 saat inkübasyona bırakıldı. Böylece ekspresyon teşvik edildi.

Ekspresyon sonrası bakteri hücreleri liziz edilerek ham ekstraktlar SDS-PAGE ile kontrol edildi. Sonuçta IPTG içeren deney grubunda hCA IX izoenziminin ekspresyonu gözlemlendi. Sonuçlar Bölüm 4, Şekil 4.14’de gösterildi. Saflaştırma işlemi için protein saflaştırma tekniklerinin etkili yöntemlerinden biri olan afinite kromatografisi kullanıldı.

Afinite kromatografisi çok basamaklı saflaştırma işlemleri esnasında enzim aktivitesinde meydana gelen önemli kayıpları elimine etmek ve enzimi yüksek bir verimle elde etmek için kullanılan en önemli saflaştırma metodudur. Afinite

kromatografisi kullanılarak yapılan saflaştırma yöntemi basit, kullanışlı, yüksek verime sahip, hızlı ve net sonuçlar vermesi gibi özellikleri bakımından çok tercih edilmektedir (Hall and Schaer 1983; Bursal 2009).

Afinite kolonundan elüe edilen saf enzim çözeltileri için kalitatif ve kantitatif protein tayini yapıldı. Kalitatif protein tayininde kolondan elüe edilen enzim çözeltilerinin 280 nm’de absorbanslarına bakıldı. Bu yöntem proteinlerde bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm’de ışığı maksimum absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Kantitatif protein tayininde ise Bradford protein tayin yöntemi kullanıldı ve protein miktarları Şekil 4.17’de verilen standart grafikten yararlanılarak belirlendi. Bu yöntem az zaman alması, daha az reaktif gerektirmesi, bozucu faktörlerin olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre stabil olarak kalması, her defasında standart çalışmayı gerektirmemesi ve hassasiyetinin diğer protein tayin metotlarına nazaran daha iyi olması sebebiyle avantajlı bir yöntemdir ve geniş bir kullanım alanına sahiptir (Bradford 1976). Bu avantajları göz önünde bulundurularak çalışmamızda kantitatif protein tayini yapılırken Bradford protein tayin yöntemi kullanıldı.

E.coli (BL21DE3) hücresinde ekspresyonu gerçekleştirilen SUMO-hCA IX füzyon proteini Ni reçine afinite kromatografisi ile %92,58 verimle, 43707 EU/mg spesifik aktivite ile 3,07 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.1). Saflaştırılan füzyon proteinin gerek saflığını kontrol etmek amacıyla gerekse molekül kütlesini belirlemek amacıyla SDS-PAGE yapıldı. Şekil 4.15 ve 4.16’da gösterilen jellerde, saflaştırılan füzyon proteinin net ve tek bandının görülmesiyle füzyon proteinin saf olduğu anlaşıldı. SDS-PAGE’de füzyon protein ile birlikte molekül kütlesi bilinen standart protein numuneleri aynı zamanda yürütüldü ve Şekil 4.19’da verildiği gibi log M_K-R_f standart grafiği çizildi. Sonra protein numunelerinin R_f değerleri yardımıyla standart grafikten faydalanılarak füzyon proteinin molekül kütlesi 85,11 kDa olarak hesaplandı. Daha sonra SUMO-hCA IX füzyon proteini SUMO proteazla kesilerek SUMO ve hCA IX proteinlerinin birbirinden ayrılması sağlandı. İkinci kez Ni reçine afinite kromatografisi kullanılarak hCA IX izoenzimi tek başına %85,96 verimle, 290378 EU/mg spesifik aktivite ile 20,4

kat saflaştırıldı (Çizelge 4.1). SDS-PAGE ile enzimin saflığı kontrol edildi ve molekül kütlesi 50,47 kDa olarak hesaplandı (Şekil 4.18, Şekil 4.20).

Bütün saflaştırma işlemleri soğuk ortamda gerçekleştirildi. Böylece sıcaklığın sebep olacağı enzim aktivitesindeki kaybın önüne geçildi. Enzim aktivitesinin belirlenmesinde ve tüm kinetik çalışmalarda esteraz aktivitesi yöntemi kullanıldı. Bu yöntem karbonik anhidrazın ester bağına hidrolizlemesi esasına dayanmaktadır. Karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm’de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolat’a hidroliz etmektedir. Her ikisi de 348 nm’de aynı absorbansı gösterdiğinden fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Verpoorte and Mehta 1967).

Bilindiği gibi enzimleri saflaştırmak oldukça zor bir işlemdir. Enzimler protein yapısındaki makromoleküller olduklarından şartların değişmesine karşı oldukça hassastırlar, bu yüzden bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu oluşan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir. Enzimlerin aktivitesi üzerinde etkili olan faktörler arasında, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, allosterik etkiler, iyonik şiddet, hormonlar ve bazen aminoasitler, inhibitör veya aktivatörlerin varlığı sayılabilir (Ondenti and Cushman 1982). Bu hususlar dikkate alınarak *E.coli* (BL21DE3) hücrelerinde ekspresyonu gerçekleştirilen hCA IX izoenziminin karakterizasyonu yapıldı ve enzimin optimum iyonik şiddet, optimum pH, optimum sıcaklık, stabil pH, K_m , V_{max} ve k_{cat} değerleri belirlendi.

Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik şartlardaki substratı CO_2 ’dir. CO_2 diğer kullanılan substratlardan daha düşük K_M ve daha yüksek V_{max} ’a sahiptir. Enzimlerin doğal substratı yerine aynı deney şartlarında analogları veya enzimin *in vitro* şartlarda farklı bir reaksiyonu katalizleyebilmesi ve bu reaksiyonda ürüne dönüştürdüğü substratı kullanıldığında genellikle enzim aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir (Ulus *et al.* 1997). Çalışmamızda hCA IX izoenziminin esteraz aktivitesinde substrat olarak kullanılan para-nitrofenilasetat için K_M , V_{max} ve k_{cat} değerleri belirlendi. 5 farklı para-

nitrofenilasetat substratı konsantrasyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak 348 nm’de enzim aktiviteleri belirlendi ve hCA IX izoenzimi için Lineveawer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Çizelge 4.8) (Şekil 4.26). hCA IX izoenziminin K_M değeri 0,33 mM olarak bulundu. V_{max} değeri de 0,417 $\mu\text{mol/mg}$ protein dakika olarak grafik denklemi yardımıyla hesaplandı. Doygun durumda herhangi bir enzim için limit hızını açıklayan daha genel bir hız sabiti olan k_{cat} ’ın belirlenmesi yararlıdır. k_{cat} sabiti bir mol enzimin birim zamanda ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı olarak tanımlanmaktadır. Bunun diğer bir adı turnover sayısıdır. Eğer bir tepkimede değişik basamaklar varsa ve bir tanesi hız sınırlayıcı ise k_{cat} bu basamak için hız sabitine eşittir. Çeşitli basamaklar kısmen hız kısıtlayıcı olduğu zaman, k_{cat} her bir reaksiyon için belirlenen çeşitli hız sabitlerinin kompleks bir türevi olabilir (Lehninger 2005). Çalışmamızda hCA IX izoenziminin k_{cat} değeri $9,27 \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplandı (Çizelge 4.8).

Genelde her enzimin aktivitesinin optimum olduğu bir maksimum sıcaklık değeri vardır. Bu sıcaklığın üstünde aktivite düşmeye başlar ve enzimin üç boyutlu yapısında bozulma meydana gelir. Bizim çalışmamızda hCA IX izoenziminin optimum sıcaklığı, su banyosu kullanılarak 0°C ile 50°C arasında ve 5°C ’er $^\circ\text{C}$ arayla enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlendi. hCA IX izoenziminin optimum sıcaklık değeri 45°C olarak bulundu (Çizelge 4.6) (Şekil 4.24).

hCA IX izoenziminin optimum pH’sı, 7,5-9,0 aralığında 50 mM Tris- SO_4 ve pH’sı 5,0-7,5 aralığında 50 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Yapılan çalışmalar sonucu hCA IX izoenzimi için en uygun optimum pH’nın 50 mM Tris- SO_4 pH=9,0 tamponu olduğu tespit edildi. Literatürde CA enzimi ile yapılan birçok çalışmada genellikle optimum pH değerinin 7,5-9,5 aralığında olduğu belirtilmiştir (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4) (Şekil 4.21, Şekil 4.22).

hCA IX izoenziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum iyonik şiddeti belirlemek amacıyla Tris- SO_4 tamponunun optimal pH’daki 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800 ve 1000

mM'lık konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Farklı Tris-SO₄ konsantrasyonlarında esterase aktivite ölçümleri yapılarak Tris-SO₄ konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Yapılan çalışmalar sonucu hCA IX izoenzimi için en uygun optimum iyonik şiddetin 100 mM Tris-SO₄ pH=9,0 tamponu olduğu tespit edildi (Çizelge 4.5) (Şekil 4.23).

hCA IX izoenziminin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek için, pH'sı 7,5-9,0 aralığında 100 mM Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 ml'si ile 1 ml enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. Birer gün arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. Yapılan çalışmalar sonucu hCA IX izoenzimi için en uygun stabil pH'nın 100 mM Tris-SO₄ pH=8,5 tamponu olduğu tespit edildi (Çizelge 4.7) (Şekil 4.25).

Günümüzde enzim inhibisyonu büyük bir önem arzetmektedir. Birçok ilaç ve zehirli bileşik fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. Enzim etki mekanizmalarının incelenmesi çalışmalarında da inhibisyon olayından faydalanılır (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Birçok kimyasal madde, canlı metabolizmasında düşük dozlarda da olsa enzim aktivitesini etkileyerek veya spesifik aktivitesinde inhibisyona yol açarak enzimleri etkilerler. Laboratuvarlarda birçok farklı enzimin ilaçlarla etkileşimi ile ilgili günümüze dek pek çok çalışma yapılmıştır. Örneğin karbonik anhidraz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz gibi birçok enzim çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış, üzerinde tıbbi uygulamalarda çok yaygın kullanılan ilaçların inhibisyon ve aktivasyon etkileri incelenmiştir (Ekinci vd 2007).

İlaç ve diğer kimyasal maddelerin enzimler üzerinde olan inhibisyon etkileri IC₅₀ değerleri ve K_i sabitleri bulunarak belirlenir. Çalışmamızda K_i sabitlerinin bulunmasında Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı. Bu yöntem hemen hemen bütün enzim kinetiği çalışanları tarafından kullanılmaktadır. Sonuçların hassas bulunabilmesi için, her inhibitörlü çalışmada 3 sabit inhibitör, 5 farklı substrat konsantrasyonunda V-[S] değerleri bulundu. 1/V-1/[S] grafikleri çizilerek K_i değerleri belirlendi. Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanıldı.

Günümüzde kemoterapide sıklıkla kullanılan antitümör ilaçların ve bazı ağır metallerin hCA IX izoenziminin aktivitesini yarıya indiren konsantrasyon (IC_{50}) değerleri esteraz aktivitesi yöntemi kullanılarak belirlendi. Antitümör ilaçların IC_{50} değerleri kendi aralarında karşılaştırıldıklarında ilaçların IC_{50} değeri en küçük olan antitümör ilaçtan IC_{50} değeri en büyük olan antitümör ilaca doğru sıralanışı şu şekildedir: Irinotekan HCl < Paklitaksel < Dosetaksel < Etoposid şeklinde ve sayısal verilerle aynı sıra ile 0,40 mM < 0,79 mM < 2,71 mM < 5,84 mM olarak tespit edildi. Bu sonuçlara göre antitümör ilaçlar içerisinde en yüksek inhibisyon etkisini dayanıklı kolon kanseri ile ilerlemiş ovaryum kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan Irinotekan HCl antitümör ilacı gerçekleştirdi. Çıkan sonuçlardan da görüldüğü üzere 25 tane antitümör ilaçtan 4 tanesinin çok küçük konsantrasyonlarda bile enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi. Diğer 21 ilacın belirli bir inhibisyon etkisine rastlanmadı (Çizelge 4.16).

Çalışmamızda kullandığımız antitümör ilaçlar için belirlediğimiz IC_{50} değerleri ile bu ilaçların tıbbi uygulamada kullanılan konsantrasyonları karşılaştırıldığında, bu ilaçların tıbbi uygulamada kullanılan konsantrasyonlardan çok daha düşük konsantrasyonlarda hCA IX izoenzimi üzerinde inhibitör etkisi gösterebilme özelliğine sahip oldukları gözlemlendi. Canlı sistemde varolan diğer CA izoenzimlerinin ve hatta metabolik yollardaki önemli enzimlerin bu ilaçların kullanılması ile inhibe olacağını düşünürsek elde edilen bulguların, özellikle bu ilaçları kullanan hastalar için önemli sonuçlar doğurabileceği görülmektedir. Kanser biyolojisinde hayati önem teşkil eden hCA IX enzimine karşı inhibitör veya aktivatör özellik gösteren bu ilaçların kullanımının mutlaka kontrollü olması gerekmektedir. Sadece hCA IX izoenzimini inhibe eden, daha güçlü, etkili ve spesifik inhibitörlerin geliştirilmesine, kanser tedavisinde kullanılacak yeni ilaçların dizaynı ve farmakolojik uygulamaları için altyapı oluşturmaya önemli bir katkı sağlayacağını düşündüğümüz bu çalışmanın önemi bu sonuçlar ışığında daha iyi anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine Ni^{+2} , Al^{+3} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Cd^{+2} ve Mn^{+2} gibi bazı ağır metallerin inhibisyon etkileri de incelendi. Ni^{+2} metal iyonunun IC_{50}

değeri 19,47 mM ve Al^{+3} metal iyonunun IC_{50} değeri 0,06 mM olarak tespit edildi. Cu^{+2} , Mg^{+2} , Cd^{+2} ve Mn^{+2} metal iyonlarının da kuvvet içi 0-25 mM konsantrasyon aralığında hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine belirli bir etki göstermedikleri görüldü. Bilindiği gibi IC_{50} değeri küçük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük, inhibisyon etkisi de yüksektir. Bu sonuçlara göre çalışmamızda kullandığımız ağır metallere Al^{+3} , hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine 0,06 mM'lık en küçük IC_{50} değeri ile en yüksek inhibisyon gösteren ağır metaldir (Çizelge 4.15).

E.coli (BL21DE3) hücrelerinde ekspresyonu gerçekleştirilen hCA IX izoenzimini inhibe eden Paklitaksel ve Dosetaksel antitümör ilaçları için K_i sabitlerinin belirlenmesi üzere Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı (Segel 1975). Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi. Daha sonra hCA IX izoenzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri belirlenerek her bir inhibitör için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri ve inhibisyon tipleri tayin edildi (Lineweaver and Burk 1934).

Çalışmamız sonucunda meme kanseri, ovaryum kanseri ile ilerlemiş küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde günümüzde sıklıkla kullanılan Paklitaksel antitümör ilacının K_i değeri 1,65 mM olarak bulundu. Baş-boyun kanseri, prostat kanseri ile mide kanserinin önlenmesi ve tedavisinde kullanılan Dosetaksel antitümör ilacının K_i değeri ise 1,86 mM olarak bulundu. K_i sabiti küçük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük olduğundan dolayı enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin büyük olacağı bilinmektedir. K_i sabitlerinin bulunmasına yönelik bu çalışmamızın sonuçlarına göre 1,65 mM'lık K_i değeri ile Paklitaksel antitümör ilacının, hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine Dosetaksel antitümör ilacından daha yüksek bir inhibisyon gösterdiği belirlendi. Çizilen Lineweaver-Burk grafiklerine bakarak inhibisyon tiplerini belirlediğimizde ise her iki ilacın da yarışmasız bir inhibisyon sergilediği yani enzimin substratıyla aktif bölgeye yarış halinde olmadığı ve inhibitörün aktif bölge haricinde bir yere bağlanarak inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi.

(Çizelge 4.19) (Şekil 4.33, Şekil 4.34). Bilindiği gibi yarışmasız inhibitörler, enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanıp enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek inhibitör etkisi gösterirler.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

1. İnsan pankreas mRNA'sı ticari olarak alınarak insan pankreasına ait cDNA kütüphanesi oluşturuldu.
2. Bu kütüphaneden kanser ilişkili trans membran protein olan hCA IX izoenziminin gen bölgesi, gene spesifik primerlerle PCR'da çoğaltılarak pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı.
3. hCA IX izoenziminin gen bölgesini taşıyan klonlama vektörü *E.coli* (JM109) hücrelerine transforme edildi ve petri üzerinde mavi-beyaz (rekombinant) koloni gözlemlendi.
4. Klonlanan gen bölgesinin DNA dizi analizi yapılarak klonlamanın doğru olup-olmadığı kontrol edildi.
5. DNA dizi analizi ile doğruluğu kanıtlanan hCA IX izoenziminin gen bölgesi ekspres edilmek amacıyla petSUMO ekspresyon vektörüne klonlandı.
6. hCA IX izoenziminin gen bölgesini taşıyan ekspresyon vektörü *E.coli* (BL21DE3) hücrelerine transforme edildi ve burada IPTG ile indüklenerek ekspresyonu sağlandı.
7. *E.coli* (BL21DE3) hücrelerinde ekspresyonu gerçekleştirilen SUMO-hCA IX füzyon proteini Nikel-nitritotriasetik asit afinite kromatografisi ile %92,58 verimle, 43707 EU/mg spesifik aktivite ile 3,07 kat saflaştırıldı. SDS-PAGE ile füzyon proteinin saflığı kontrol edildi ve molekül kütlesi 85,11 kDa olarak hesaplandı.
8. SUMO-hCA IX füzyon proteini SUMO proteazla kesilerek SUMO ve hCA IX proteinlerinin birbirinden ayrılması sağlandı.
9. İkinci kez Ni reçine afinite kromatografisi kullanılarak hCA IX izoenzimi tek başına %85,96 verimle, 290378 EU/mg spesifik aktivite ile 20,4 kat saflaştırıldı. SDS-PAGE ile enzimin saflığı kontrol edildi ve molekül kütlesi 50,47 kDa olarak hesaplandı.
10. hCA IX izoenziminin karakterizasyonu yapılarak enzimin optimum iyonik şiddet, optimum pH, optimum sıcaklık, stabil pH, K_m , V_{max} ve k_{cat} değerleri belirlendi (Çizelge 5.1).
11. hCA IX izoenziminin aktivitesi üzerine bazı antitümör ilaçların ve ağır metallerin etkileri esteraz aktivitesi yöntemi ile *in vitro* olarak incelendi.
12. İnhibisyon etkisi gösteren ilaç ve metallerin IC_{50} değerleri hesaplandı (Çizelge 5.1).

13. Enzimi inhibe eden antitümör ilaçlar için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri ile inhibisyon tipleri belirlendi (Çizelge 5.1).

Yapılan çalışmaların toplu değerleri Çizelge 5.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. hCA IX izoenzimi için yapılan tüm çalışmaların sonuçları

hCA IX izoenzimi İçin Kinetik Çalışmalar	
Optimum pH	9,0
Optimum İyonik Şiddet	100 mM Tris-SO ₄
Stabil pH	8,5
Optimum Sıcaklık (°C)	45°C
K_M (p-nitrofenilasetat) (mM)	0,33
V_{max} (p-nitrofenilasetat) (EÜ/ml)	0,417
$k_{cat}(s^{-1})$	9,27
SDS-PAGE Metodu İle Molekül Kütlesi Tayini (kDa)	
SUMO-hCA IX füzyonu	85,11
hCA IX izoenzimi	50,47
Kimyasal Maddeler	IC₅₀ (mM)
Ni ⁺²	19,47
Al ⁺³	0,06
Cu ⁺²	Küvet içi 0-25 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Mg ⁺²	Küvet içi 0-25 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Cd ⁺²	Küvet içi 0-25 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Mn ⁺²	Küvet içi 0-25 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.

Çizelge 5.1 (devam)

Antitümör İlaçlar	IC ₅₀ (mM)
Paklitaksel	0,79
Dosetaksel	2,71
İrinotekan HCl	0,40
Etoposid	5,84
Karboplatin	Küvet içi 0-2670 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Sitarabin	Küvet içi 0-17,9 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Kalsiyum Folinat	Küvet içi 0-2,11 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Metotreksat	Küvet içi 0-5,5 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Cetuksimab	Aktive etti.
Rituksimab	Küvet içi 0-70 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Sisplatin	Küvet içi 0-170 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
5-Fluorouracil	Küvet içi 0-38,5 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Epirubisin HCl	Küvet içi 0-360 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Fludarabin Fosfat	Küvet içi 0-6,85 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Gemsitabin HCl	Küvet içi 0-13,4 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.
Sitozin Arabinozid	Aktive etti.
İfosfamide	Küvet içi 0-38,3 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.

Çizelge 5.1 (devam)

Vinblastin Sülfat	Aktive etti.	
Doksorubisin HCl	Kendisi absorpsiyon gösterdiği için etkisi belirlenemedi.	
Dakarbazin	Küvet içi 0-22 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.	
Vinorelbin	Küvet içi 0-1280 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.	
Doksitaks	Küvet içi 0-500 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.	
Bortazomib	Küvet içi 0-455 mM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.	
Mitoksantron	Kendisi absorpsiyon gösterdiği için etkisi belirlenemedi.	
Okzaliplatin	Küvet içi 0-1250 µM konsantrasyon aralığında belirli bir etki göstermedi.	
Antitümör İlaçlar	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Tipi
Paklitaksel	1,65	Yarışmasız
Dosetaksel	1,86	Yarışmasız

Elde edilen bu bulgulardan yaptığımız çalışmanın;

- CA IX izoenziminin inhibisyon mekanizmasının daha ayrıntılı olarak aydınlatılmasında,
- CA IX'a karşı daha güçlü, spesifik ve etkili inhibitörlerin geliştirilmesinde,
- Metabolizmada hayati önem teşkil eden CA IX izoenziminin aktivitesi ile kanserin yayılımı arasındaki bağlantının daha net bir şekilde açıklanmasında,
- Kanser tedavisinde kullanılacak yeni ilaçların dizaynı ve farmakolojik uygulamalarında,

yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağını ve bu kapsamda literatüre önemli ölçüde katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Anonim 2010a. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kanser> (01/10/2010)
- Anonim 2010b. <http://www.kanser.org/toplum/knedir.php> (01/10/2010)
- Anonim 2010c. <http://www.kanser.org/toplum/kr.php?content=3#content> (05/10/2010)
- Anonim 2012a. <http://www.ilactr.com/> (20/05/2012)
- Anonim 2012b. [http://www.ilacrehberi.com/\(20/05/2012\)](http://www.ilacrehberi.com/(20/05/2012))
- Alterio, V., Vitale, R.M., Monti, S.M., Pedone, C., Scozzafava, A., Cecchi, A., De Simone, G., Supuran, C.T., 2006. Carbonic anhydrase inhibitors: X-ray and molecular modeling study for the interaction of a fluorescent antitumor sulfonamide with isozyme II and IX. *J Am Chem Soc*, 128, 8329–8335.
- Ashida, S., Nishimori, I., Tanimura, M., Onishi, S., Shuin, T., 2002. Effects of von Hippel–Lindau gene mutation and methylation status on expression of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 128, 561–568.
- Appleton, D. and Sarkar, B., 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 1686–1690.
- Arslan, O., 1994. Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitorlerinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Aydoğan, S., 2006. Yönlendirilmiş Mutagenез İle Mutant hCA II Geninin Eldesi ve Mutant Proteinlerin İnhibitörlere Karşı İlgisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Barathova, M., Takacova, M., Holotnakova, T., Gibadulinova, A., Ohradanova, A., Zatovicova, M., Hulikova, A., Kopacek, J., Parkkila, S., Supuran, C.T., Pastorekova, S., Pastorek, J., 2008. Alternative splicing variant of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX expressed independently of hypoxia and tumour phenotype. *British J. Cancer*, 98, 129.
- Barry, B. L. and Dennis, A., 2002. *Casclato Medical Oncology & Principles of Cancer Biology*. 123-127.
- Berg, J. M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L., *Biochemistry* 5th Edition, New York: W. H. Freeman and Co., 2002.
- Beydemir, Ş., Çiftci, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2002. Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25 (8), 966-969.
- Beydemir, Ş., Çiftci, M., Özmen, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2000. Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Pharmacol. Res.*, 42, 187-191.
- Beydemir, Ş., Gülçin İ., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 193-197.

- Beydemir, Ş., Bülbül, M., Hisar, O., Söyüt, H., Yanık, T., 2006. Carbonic Anhydrase: Affinity Purification and Kinetic Properties from Rainbow Trout Lens. *International Journal of Applied Chemistry*, ISSN 0973-1792, 2 (1), 45-55.
- Bloom, V.M., Freyer, G.A. and Micklos, D.A., 1996. *Laboratory DNA Science*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Brewer, C.A., Liao, S.Y., Wilczynski, S.P., Pastorekova, S., Pastorek, J., Zavada, J., Kurosaki, T., Manetta, A., Berman, M.L., DiSaia, P.J., Stanbridge, E.J., 1996. A study of biomarkers in cervical carcinoma and clinical correlation of the novel biomarker MN, *Gynecol. Oncol.*, 63, 337–344.
- Bursal, E., 2009. Kivi meyvesinin antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Bülbül, M., Hisar, R.O., Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. The *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18, 371-375.
- Bülbül, M., Saraçoğlu, N., Küfrevioğlu, Ö.İ., Çiftçi M., 2002. Bile acid derivatives of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and investigation of inhibition effects. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10, 2561.
- Byvoet, P. and Gotti, A., 1967. *Molec. Pharmac.* 3, 142. PALMER W. TAYLOR, Curriculum Vitae University of California, San Diego, Department of Pharmacology, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093-0636 (858) 534-1366.
- Casini, A., Scozzafava, A., Mincione, F., Menabuoni, L. and Supuran, C.T., 2002. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis of Water Soluble Sulfonamides Incorporating a 4-sulfamoylphenylmethylthiourea Scaffold, with Potent Intraocular Pressure Lowering Properties *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 17, 333.
- Cecchi, A., Hulikova, A., Pastorek, J., Pastoreková, S., Scozzafava, A., Winum, J.Y., Montero, J.L., Supuran, C.T., 2005. Carbonic anhydrase inhibitors. Design of fluorescent sulfonamides as probes of tumor-associated carbonic anhydrase IX that inhibit isozyme IX-mediated acidification of hypoxic tumors. *J Med Chem.* 48, 4834-41.
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y., Carter, N., 2000. The Carbonic Anhydrases-New Horizons. *Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed., 2165–2204, McGraw-Hill, Inc., New York.
- Christine, C. C. and Eugene Sanders, W., 1974. Jr. Rosamicin: Evaluation *In Vitro* and Comparison with Erythromycin and Lincomycin *Antimicrob Agents Chemother.* 5(3), 272–275.
- Cianfrocca, M., Goldstein, L.J., 2004. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. Review. *The Oncologist*, 9, 606-616.
- Demirdağ, R., Yerlikaya, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2011. Purification of Carbonic Anhydrase-II from Sheep Liver and Inhibitory Effects of Some Heavy Metals on

- Enzyme Activity Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, DOI: 10.3109/14756366.2011.615744.
- Ekinci, D., Beydemir Ş., Alım Z., 2007. Some drugs inhibit *in vitro* hydratase and esterase activities of human carbonic anhydrase-I and II. Pharmacological Reports, 59, 580-587.
- Feldstein, J.B. and Silvarman D.N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. J. Biol. Chem. 259,9, 5447-53.
- Genis C., Sippel H.K., Case N., Cao W., Avvaru B.S., Tartaglia J.L., Govindasamy L., Tu C., Agbandje M.-McKenna, Silverman D.N., Rosser C.J. and McKenna R., 2009. Design of a Carbonic Anhydrase IX Active-Site Mimic to Screen Inhibitors for Possible Anticancer Properties. Biochemistry, 48,1322–1331.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Büyükokuroğlu ME., 2004. *In vitro* and *in vivo* effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27, 613-616.
- Haapasalo, J.A., Nordfors, K.M., Hilvo, M., Rantala, I.J., Soini, Y., Parkkila, A.K., Pastoreková, S., Pastorek, J., Parkkila, S.M., Haapasalo, H.K., 2006. Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis, Clin. Cancer Res., 12 (2), 473–477.
- Hall, G.E. and Schraer, R., 1983. Characterisation of a high activity carbonic anhydrase isozyme purified from erythrocytes of *Salmo Gairdneri*. Comp. Biochem. Phys.75B, 81-92.
- Helmlinger, G., Sckell, A., Dellian, M., Forbes, N. S., and Jain, R. K., 2002. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. Clin. Cancer Res., 8, 1284–1291.
- Hewett-Emmett, D., 2000. In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 29-78.
- Hilvo, M., Baranauskiene, L., Salzano, A.M., Scaloni, A., Matulis, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Monti, S.M., Fiore, D.A., Simone, G., Lindfors, M., Jänis, J., Valjakka, J., Pastoreková, S., Pastorek, J., Kulomaa, M., Nordlund, H.R., Supuran, C.T and Parkkila, S., 2008. Biochemical Characterization of CA IX: One of The Most Active Carbonic Anhydrase Isozymes. The Journal of Biological Chemistry, 283 (41), 27799–27809.
- Hisar, O., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T., 2005. Effect of low molecular weight plasma inhibitors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity *in vitro* and rat erythrocyte *in vivo*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 20(1), 35-39.
- Hockel, M., Vaupel, P., 2001. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. J Natl Cancer Inst, 93, 266–76.
- Ignatova, Z., Mahsunah, A., Georgieva, M., Kasche, V., 2003. Improvement of posttranslational bottlenecks in the production of penicillin amidase in recombinant *Escherichia coli* strains. Applied and Environmental Microbiology, 69, 1237-1245.
- Joseph, P., Ouahrani-Bettache, S., Montero, J., Nishimori, I., Minakuchi, T., Vullo, D., Scozzafava, A., Winum, J., Köhler, S., Supuran, C.T., 2011. A New B-Carbonic Anhydrase From *Brucella Suis*, Its Cloning, Characterization, and Inhibition

- with Sulfonamides and Sulfamates, Leading to Impaired Pathogen Growth. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, 1172–1178.
- Kaluz, S., Kaluzova, M., Opavsky, R., Pastorekova, S., Gibadulinova, A., Dequiedt, F., Kettmann, R. and Pastorek, J., 1999. Transcriptional Regulation of the MN/CA 9 Gene Coding for the Tumor-associated Carbonic Anhydrase IX Identification and Characterization of a proximal silencer element. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 46 (12), 32588–32595.
- Kaluz, S., Kaluzová, M., Liao, S.Y., Lerman, M., Stanbridge, E.J., 2009. Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show?. *Biochim Biophys Acta*, doi:10.1016.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Sirkeci/İstanbul*.
- Keilin, D., Martin, T., 1944. Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature*, 153, 107–108.
- Kopacek, J., Barathova, M., Dequiedt, F., Sepelakova J., Kettmann, R., Jaromir Pastorek, J. and Pastorekova, S., 2005. MAPK pathway contributes to density- and hypoxia-induced expression of the tumor-associated carbonic anhydrase IX” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1729(1), 41-49.
- Kılınç, N., 2011. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin koyun midelerinden saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Kyllonen, M. S., Parkkila, S., Rajaniemi, H., Waheed, A., Grubb, J. H., Shah, G. N., Sly, W. S. and Kaunisto, K., 2003. Localization of Carbonic Anhydrase XII to the Basolateral Membrane of H⁺-secreting Cells of Mouse and Rat Kidney *J. Histochem. Cytochem.*, 51(9), 1217 - 1224.
- Krungkrai, S.R., Suraveratun, N., Rochanakij, S. and Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 31, 661-668.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Leppilampi, M., 2006. Functional and Immunohistological Studies on Cancer Associated Carbonic Anhydrase IX, , Faculty of Medicine, Department of Clinical Chemistry, Department of Pathology, University of Oulu.
- Lesburg, C.A. and Christianson D.W., 1995. X-Ray crystallographic studies oengineered hydrogen-bond network in protein-zinc binding-site. *Journal of the American Chemical Society*, 117, 6838-6844.
- Liao, S. Y., Brewer, C., Zavada, J., Pastorek, J., Pastorekova, S., Manetta, A., Berman, M. L., DiSaia, P. J., Stanbridge, E., 1994. *J. Am. J. Pathol.*, 145, 598–609.
- Liao, S. Y. & Stanbridge, E. J., 1996. *Cancer Epidemiol. Biomarkers* 5, 549–557.
- Liao, S., Lerman, M., Stanbridge, E., 2009 Expression of transmembrane carbonic anhydrases, CAIX and CAXII, in human development. *BMC Dev Biol*, 9.
- Lin, W.J., Huang, S.W., Chou, C.P., 2001. High level extracellular production of penicillin acylase by genetic engineering of *Escherichia coli*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 76, 1030-1037.
- Lindskog, S., 1960. Purification and properties of bovine erythrocyte carbonic anhydrase *Biochimica et Biophysica Acta*, 39, 218.

- Lindskog, S. and Silverman, D.W., 2000. In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Basel, 175-196.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 57, 685.
- Loncaster, J.A., Harris, A.L., Davidson, S.E., Logue, J.P., Hunter, R.D., Wycoff, C.C., Pastorek, J., Ratcliffe, P.J., Stratford, I.J. & West, C.M., 2001. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Research*, 61, 6394–6399.
- Maren, T.H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 130, 26.
- McKierman, J.M., Buttyan, R., Bander, N.H., Stifelman, M.D., Katz, A.E., Chen, M.W., Olsson, C.A. and Sawczuk, I.S., 1997. Expression of the tumour-associated gene MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 57, 2362–5.
- McIntosh, J. E. A. 1969. Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and uterus of the rabbit *Biochem. J.*, 114, 463.
- Meldrum, N.U., Roughton, F.J.W., 1933. Carbonic anhydrase: its preparation and properties. *J. Physiol.* 80, 113–142.
- Menchise, V., De Simone, G., Alterio, V., Di Fiore, A., Pedone, C., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2005. Carbonic anhydrase inhibitors: stacking with Phe131 determines active site binding region of inhibitors as exemplified by the X-Ray crystal structure of a membrane-impermeant antitumor sulfonamide complexed with isozyme II. *J. Med. Chem.* 48, 5721–5727.
- Nelson, D.L. and Cox M.M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. (Çeviren: N. KILIÇ), Palme Yayıncılık, Ankara, 243-293.
- Nuti, E., Orlandini, E., Nencetti, S., Rossello, A., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2007. Carbonic anhydrase and matrix metalloproteinase inhibitors. Inhibition of human tumor-associated isozymes IX and cytosolic isozyme I and II with sulfonylated hydroxamates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.15(6), 2298-2311.
- Olive, L. P., Aquina-Parsons, A., MacPhail, H.S., Liao, S.Y, Raleigh, J.A.,Lerman, I. M and Stanbridge J. E., 2001. Carbonic Anhydrase 9 as an Endogenous Marker for Hypoxic cells in cervical cancer. *Cancer Research*, 61, 8924- 8929.
- Ondenti, M.A., Cushman D.W., 1982. Enzymes of the reninangiotensin system and their inhibitors. *Annu Rev. Biochem.*, 51, 283-308.
- Opavsky, R., Pastorekova, S., Zelnik, V., Gibadulinova, A., Stanbridge, E. J., Zavada, J., Kettmann, R. & Pastorek, J., 1996. *Genomics* 33, 480–487.
- Özensoy, Ö., Kockar, F., Arslan, O., Isik, S., Supuran, C.T. and Lyon, M., 2006. An evaluation of cytosolic erythrocyte carbonic anhydrase and catalase in carcinoma patients: An elevation of carbonic anhydrase activity *Clinical Biochemistry*. 39, 804-809
- Özensoy, Ö. ve Supuran T.C., 2007. Carbonic Anhydrase IX as Prognostic Marker for Tumor Progression and as a Target for Novel Antitumor Drugs, *Türk J. Biochem.*, 32, 3, 130–134.

- Özensoy, Ö., Puccetti, L., Fasolis, G., Arslan, O., Scozzafava, A. and Supuran, T.C., 2005. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the tumor-associated isozymes IX and XII with a library of aromatic and heteroaromatic sulfonamides. *Shortcommunication Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(21), 4862-4866.
- Özensoy, Ö., 2006. Kanser İlişkili Karbonik Anhidraz IX ve XII İzoenzimlerinin (CA-IX, CA XII) Ekspresyonu, Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklere Karşı İlginin Araştırılması. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Pan, K.L., Hsiao, H.C., Weng, C.L., Wu, M.S., Chou, C.P., 2003. Roles of DegP in prevention of protein misfolding in the periplasm upon overexpression of penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 185, 3020-3030.
- Parkkila, S., Parkkila, A.K., Saarnio, J., Kivela, J., Karttunen, T.J., Kaunisto, K., Waheed, A., Sly, W.S., Tureci, O., Virtanen, I., Rajaniemi, H., 2000. Expression of the membrane-associated carbonic anhydrase isozyme XII in the human kidney and renal tumors. *J Histochem Cytochem*, 48, 1601-1608.
- Parkkila, S., Rajaniemi, H., Parkkila, A.K., Kivela, J., Waheed, A., Pastorekova, S., Pastorek, J., and Sly, W.S., 2000. Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2220–2224.
- Pastorek, J., Pastorekova, S., Callebaut, I., Mornon, J.P., Zelnik, V., Opavsky, R. Zat'ovicová, M., Liao, S., Portetelle, D., Stanbridge, E.J. *et al.*, 1994. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix–loop–helix DNA binding segment. *Oncogene*, 9, 2877–88.
- Pastorekova, S., Zavadova, Z., Kostal, M., Babusikova, O., Zavada, J., 1992. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology*, 187, 620–6.
- Pastorekova, S., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Opavsky, R., Zelnik, V., Saarnio, J., Pastorek, J., 1997. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology*, 112, 398-408.
- Pastorekova, S. and Pastorek, J. 2004. Cancer related Carbonic anhydrase Isozymes and Their Inhibition Chapter 9, CRC Pres.
- Pastoreková, S., ve Závada, J., 2004. “Carbonic anhydrase IX (CA IX) as a potential target for cancer therapy.” *Cancer Therapy*, 2, 245.
- Pastorekova, S., Kopacek, J., Pastorek, J., 2007. Carbonic anhydrase inhibitors and the management of cancer. *Curr. Top. Med. Chem.*, 7, 865-878.
- Pocker, Y. and Sarkanen, S., 1979. Carbonic anhydrase: structure, catalytic versatility and inhibition, *advances in enzymology*. New York, p. 149-273.
- Pocker, Y., Janjic, N., 1989. Molecularity of water in enzymic catalysis. Application to carbonic anhydrase II, *Journal of the American Chemical Society*, 111, 731.
- Potter, C.P. & Harris, A.L., 2003. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *British Journal of Cancer*, 89, 2–7.
- Puccetti, L., Fasolis, G., Vullo, D., Chohan, Z.H., Scozzafava, A. and Supuran C.T., 2005. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, IX, and XII with Schiff's bases incorporating

- chromone and aromatic sulfonamide moieties, and their zinc complexes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15 (12), 3096-3101.
- Raghunand, N., He, X., van Sluis, R., Mahoney, B., Baggett, B., Taylor, C.W., Paine-Murrieta, G., Roe, D., Bhujwalla, Z.M., Gillies, R.J., 1999. Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH. *Br J Cancer*, 80, 1005–1011.
- Saarnio, J., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Waheed, A., Casey, M.C., Zhou, Z.Y., Pastoreková, S., Pastorek, J., Karttunen, T., Haukipuro, K., Kairaluoma, M.I., Sly, W.S., 1998. Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity. *J Histochem Cytochem*, 46, 497.
- Scozzafava, A.; Menabuoni, L.; Mincione, F.; Briganti, F.; Mincione, G.; Supuran, C. T., 2000. Carbonic Anhydrase Inhibitors: perfluoroalkyl/aryl-substituted derivatives of aromatic/heterocyclic sulfonamides as topical intraocular pressure lowering agents with prolonged duration of action. *J. Med. Chem.*, 43, 4542–4551.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*, Inc, New York, p: 403.
- Simi, L., Venturini, G., Malentacchi, F., Gelmini, S., Andreani, M., Janni A., Pastorekova, S., Supuran, C.T., Pazzagli, M. And Orlando, C., 2006. Quantitative analysis of carbonic anhydrase IX mRNA in human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 52 (1), 59-66.
- Simone, G.D, Supuran, C.T., 2010. Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 404–409.
- Sorensen, H.,P., 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotech.*, 115,113-128.
- Söyüt, H., Beydemir, Ş., Hisar, O., 2008. Effects of some metals on carbonic anhydrase from brains of rainbow trout. *Biol Trace Elem Res*, 123:179-190.
- Söyüt, H. and Beydemir, S., 2008. Purification and some kinetic properties of carbonic anhydrase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and metal inhibition. *Protein Peptide Lett* 15,528-535
- Söyüt, H. and Beydemir, S., 2011. The impact of heavy metals on the activity of carbonic anhydrase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kidney. *Toxicol Ind Health* DOI:10.1177/0748233711410914
- Söyler, M., 2006. Van kedisi eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin (E.C.4.2.1.1) saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors –Part 94. 1,3,4-Thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents? *European Journal of Medicinal Chemistry*, 35, 9, 867-874.
- Supuran, C. T., Briganti, F., Tilli, S., Chegwiddden, W. R., Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides as antitumor agents? *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 703.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 1, 61-97.
- Supuran, C., and Scozzafava, A., 2002. Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Expert Opin. Ther. Pat.* 12, 217–241.

- Supuran, C. T., Casini, A., and Scozzafava, A., 2003. Protease inhibitors of the sulfonamide type: anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents. *Med. Res. Rev.* 23, 535–558.
- Supuran, C. T., 2003. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 12, 283–287.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A.; Casini, A., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev.* 23, 146–189
- Supuran, C.T., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors in the treatment and prophylaxis of obesity. *Expert Opin. Ther. Pat.* 13, 1545–1550.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J., 2004. In *Carbonic Anhydrase—Its Inhibitors and Activators*; CRC Press: Boca Raton, New York, London, 1–363.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A. J., 2004. *Enzyme Inhib. Med. Chem.* 19, 269.
- Supuran, C.T., 2004. Carbonic anhydrases: catalytic and inhibition mechanisms, distribution and physiological roles. In *Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators* [Supuran, C.T. *et al.*, eds], CRC Press 1–23.
- Supuran, C. T., Casini, A., Scozzafava, A., 2004. Development of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors (CAIs). In *Carbonic Anhydrase—Its Inhibitors and Activators*; Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J., Eds.; CRC Press: Boca Raton (FL), USA, 67.
- Stams, T., Chen, Y., Boriack-Sjodin, P.A., Hurt, J.D., Liao, J., May, J.A., Dean, T., Laipis, P., Silverman, D.N. and Christianson, D.W., 1988. Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide. *Molecular basis o isozyme-drug discrimination. Protein Sience*, 7, 556-563.
- Stubbs, M., McSheehy, P.M., Griffiths, J.R., Bashford, C.L., 2000. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol Med Today*, 6, 15–9.
- Švastová, E., Hulíková, A., Rafajová, M., Zat'ovicová, M., Gibadulinová, A., Casini, A., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Pastorek, J., Pastoreková, S., 2004. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Letts.*, 577, 439-445.
- Tappan, D. V., 1964. Jacey, M. J. and Boyden, H. M. *Ann. N.Y., Acad. Sci.*, 121, 589.
- Thiry, A., Dogne, J.M., Masereel, B., Supuran, C.T., 2006. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 27, 566–73.
- Tufts, B.L., Estabough, A. ve Lung, S.G., 2003. *Comparative Physiology and Molecular Evolotion of Carbonic Anhydrase in the Erythrocytes of Early Vertebrates*, *Comp. Biochem. Physiol, Part A*, 136, 259-269.
- Turner, J. R., Odze, R. D., Crum, C. P., Resnick, M. B., 1997. *Hum. Pathol.*, 28, 740–744.
- Türeci, Ö., Şahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Göttert, E., Seitz, G., Parkkila, A., Shah, G.N., Grubb, J.H., Pfreundschuh M. And Sly W.S., 1998. Human carbonic anhydrase XII: cDNAcloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc. Natl Acad. Sci.USA*, 95, 7608–7613.
- Ulusu, N.N., Kuş, M.S., Acan, N.L., and Tezcan, E.F., 1997. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz: Moleküler ve Kinetik özellikleri, *Biyokimya Dergisi*, 22, 25-33.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., and Edsall, J.T., 1967, Esterase activities of human carbonic anhydrase. *J.Biol.Chem.*, 242, 4221.

- Vullo, D., Innocenti, A., Nishimori, I., Pastorek, J., Scozzafava, A., Pastoreková S. and Supuran, C.T., 2005. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the transmembrane isozyme XII with sulfonamides—a new target for the design of antitumor and antiglaucoma drugs? Shortcommunication *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15 (4), 963-969.
- Webb, S.D., Sherratt, J.A., and Fish, R.G., 1999. Alterations in proteolytic activity at low pH and its association with invasion: A theoretical model. *Clin. Exp. Metastasis* 17, 397–407.
- Wilbur, K.M. and Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154.
- Wingo T., Tu C., Laipis P.J., Silverman D.N., 2001. The catalytic properties of human carbonic anhydrase IX, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288, 666–669.
- Winum, J.Y., Pastorekova, S., Jakubickova, L., Montero, J.L., Scozzafava, A., Pastorek, J., Vullo, D., Innocenti, A., Supuran, C.T., 2005. Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/ tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with bis-sulfamates *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 15 (3), 579-584.
- Yaylacı Karahalil, F., 2009. Mersin alabalığı eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Yıldırım, H., 2009. Karbonik Anhidraz 9 Geninin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Yin, J., Li, G., Rena, X., Herrler, G., 2007. Select What You Need: A Comparative Evaluation of the Advantages and Limitations of Frequently Used Expression Systems for Foreign Genes. *Journal of Biotechnology*, 127, 335.
- Yokoi, A. Kuromitsu, J., Kawai, T., Nagasu, T., Sugi N.H., Yoshimatsu, K., Yoshino H. and Owa T., 2002. Profiling novel sulfonamide antitumor agents with cell-based phenotypic screens and array-based gene expression analysis. *Mol. Cancer Ther.* 1, 275–286.
- Zavada, J., Zavadová, Z., Pastorek, J., Biesová, Z., Jeek J., and Velek J., 2000. Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *Br. J. Cancer* 82, 1808–1813.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Elazığ'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Elazığ'da tamamladı. 2003 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümü'nden 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora öğrenimine başladı. 2012 yılında doktora eğitimini tamamladı. 2006 yılında Atatürk Üniversitesi'nde başladığı memuriyet hayatına halen devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.