

**İNSAN ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ I VE II
İZOENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ
BİR AFİNİTE JELİNİN HAZIRLANMASI VE BAZI
FENOLİK ASİTLERİN BU İZOENZİMLER
ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON KİNETİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Deryanur ERDEM

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

2011

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ I VE II
İZOENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ BİR
AFİNİTE JELİNİN HAZIRLANMASI VE BAZI FENOLİK
ASİTLERİN BU İZOENZİMLER ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON
KİNETİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Deryanur ERDEM

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM

2011

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Saflaştırılması İçin
Yeni Bir Afinite Jelinin Hazırlanması ve Bazı Fenolik Asitlerin Bu İzoenzimler
Üzerindeki İnhibisyon Kinetiklerinin İncelenmesi**

Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU danışmanlığında, Deryanur ERDEM tarafından hazırlanan bu çalışma 25/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

İmza :

(imza)

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNSAN ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİNİN
SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ BİR AFİNİTE JELİNİN HAZIRLANMASI VE
BAZI FENOLİK ASİTLERİN BU İZOENZİMLER ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON
KİNETİKLERİNİN İNCELENMESİ

Deryanur ERDEM

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREYİOĞLU
Ortak Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

Karbonik anhidraz (CA) (E.C. 4.2.1.1) enzimi, hemen hemen tüm canlılarda CO₂'in hidratlanarak HCO₃⁻ ve H⁺'ya dönüşümünü tersinir olarak katalizleyen çok önemli bir enzimdir. Bu çalışmada, karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması için daha önceki araştırmacıların sentezlediklerinden farklı bir afinite jeli hazırlanması amaçlanmıştır. Matriks olarak CNBr ile aktive edilmiş Sepharose 4B, ligand olarak 4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid kullanıldı. Hazırlanan afinite jelinin izoenzimleri saflaştırabilme kapasiteleri; farklı sıcaklık, pH ve iyonik şiddette belirlendi. Çalışmanın ikinci kısmında bazı fenolik asitlerin hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren bu maddeler için IC₅₀ değerleri ve K_i sabitleri bulunarak inhibisyon tipleri tespit edilmiştir.

2011, 69 sayfa

Anahtar Kelimeler: Karbonik andidraz, izoenzim, afinite jeli, sülfanilamid

ABSTRACT

Master Thesis

PREPARATION OF A NEW AFFINITY GEL FROM PURIFICATION OF CARBONIC ANHYDRASE I AND II ISOENZYMES FROM HUMAN ERYTHROCYTES AND INVESTIGATION OF THE INHIBITORY KINETICS OF PHENOLIC ACIDS ON THE ISOENZYMES

Deryanur ERDEM

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

Supervisor: Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

Co-supervisor: Asst. Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

Carbonic anhydrase (CA) (E.C. 4.2.1.1) hydrates CO_2 and converts it into HCO_3^- and H^+ reversibly in almost all living organisms. It is aimed in this study to design new affinity gel different from which has been used so far. CNBr activated Sepharose 4B was used as matrix and 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonamide as ligand. Purification capacities of the affinity gel was determined under different temperatures, pHs and ionic strengths. In the second part of the study, inhibitory effects of phenolic acids on hCA I and hCA II, which have been purified by new gels, were investigated. To this end, IC_{50} and K_i constants and inhibition types were determined for these substances.

2011, 69 pages

Keywords: Carbonic anhydrase, isoenzyme, affinity gel, sulfanilamide

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarımın her aşamasında anlayış ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen ortak danışmanım Sayın Yrd. Doç. Murat ŞENTÜRK'e, biyokimya çalışma grubu hocalarım Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e, Sayın Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, değerli arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Zuhale ALİM ve Sayın Ebru AKKEMİK'e teşekkür ederim. Çalışmalarımın tüm aşamalarını yürüttüğüm Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde çalışan tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş olduğu sabır ve anlayıştan dolayı aileme ve nişanlım Sayın Arş. Gör. Haydar KILIÇ'a sonsuz teşekkürlerimi ve şükran duygularımı sunarım.

Deryanur ERDEM

Temmuz 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Enzim aktivitesinin inhibisyonu.	1
1.2.1. Yarışmalı inhibisyon	2
1.2.2. Yarışmasız inhibisyon	2
1.2.3. Yarı yarışmalı inhibisyon	3
1.3. Karbonik Anhidraz Enzimi	3
1.3.1. Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik fonksiyonları ve dağılımı	3
1.3.2. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar.....	6
1.3.3. Karbonik anhidraz enziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri.....	7
1.3.4. Karbonik anhidraz enzimlerinin üç boyutlu yapıları.....	7
1.3.5. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması.....	9
1.3.6. Karbonik anhidraz inhibitörleri	10
1.4. Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma.....	13
1.5. Fenolik Bileşikler	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	25
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	25
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	26
3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. Protein tayini	30

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	30
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini	30
3.2.2. Karbonik anhidraz aktivite tayini	31
3.2.2.a. CO ₂ -Hidrataz tayini	31
3.2.2.b. Esteraz aktivitesi	32
3.2.3. Afinite jellerinin hazırlanması	32
3.2.4. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması	33
3.2.4.a. Kan temini ve hemolizat hazırlanması	33
3.2.4.b. Afinite kolonunun paketlenmesi	33
3.2.4.c. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	33
3.2.4.d. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü	34
3.2.5. Afinite kolonunun CA tutma kapasitesinin bulunması	35
3.2.5.a. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi	36
3.2.5.b. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	36
3.2.5.c. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi	36
3.2.6. İnhibitörler için IC ₅₀ ve K _i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	38
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik	38
4.2. Saflaştırılması Sonuçları	38
4.3. Afinite Kolonunun Farklı Sıcaklık, pH ve İyonik Şiddette CA Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi Çalışmaları Sonuçları	40
4.4. İnhibitörler İçin IC ₅₀ ve K _i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları	44
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	51
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	Bovin serum albumin
CA I	Karbonik anhidraz I
CA II	Karbonik anhidraz II
CNBr	Siyanojen bromür
DNA	Deoksiribonükleik asit
E	Enzim
EC	Enzim komisyonu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ES	Enzim-substrat kompleksi
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
P	Ürün
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
RNA	Ribonükleik asit
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil aminometan
V _{max}	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri.....	6
Şekil 1.2.	CA'larda metal iyon koordinasyonu	8
Şekil 1.3.	Karbonik anhidraz enziminin X-Ray kristalografisi	9
Şekil 1.4.	Karbonik anhidrazın katalizlediği CO ₂ -hidrataz reaksiyon mekanizmasının gösterilişi	10
Şekil 1.5.	İnhibitör bağlanma modelleri	12
Şekil 1.6.	Afinite kromatografi basamaklarının şematik gösterilişi	14
Şekil 1.7.	Fenolik asitlerin genel yapısı	15
Şekil 1.8.	2,5-dihidroksibenzoik asit	16
Şekil 1.9.	2,3-dihidroksibenzoik asit	16
Şekil 1.10.	2,4,6-trihidroksibenzoik asit	17
Şekil 4.1.	Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik	38
Şekil 4.2.	Sepharose-4B polimerlerinin genel kimyasal yapısı	39
Şekil 4.3.	Sepharose 4B-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırma sonucu SDS-PAGE fotoğrafı	40
Şekil 4.4.	Sepharose-4B-4,2 aminoetilbenzen sülfanilamid jeli kullanılarak hCA-I ve hCA-II'nin elüsyon grafiği	41
Şekil 4.5.	Sepharose-4B-sülfanilamid sıcaklık-kapasite grafiği	41
Şekil 4.6.	Sepharose-4B 4,2 aminoetilbenzen sülfanilamid pH-kapasite grafiği	42
Şekil 4.7.	Sepharose-4B-4,2 aminoetilbenzen sülfanilamid iyonik şiddet-kapasite grafiği	42
Şekil 4.8.	Fenolik asit türevleri	44
Şekil 4.9.	İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,3-dihidroksibenzoik asitin etkisi	45
Şekil 4.10.	İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,3-dihidroksibenzoik asitin etkisi	45
Şekil 4.11.	İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,5-dihidroksibenzoik asitin etkisi	46

Şekil 4.12. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,5-dihidroksibenzoik asitin etkisi.....	46
Şekil 4.13. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,4,6-trihidroksibenzoik asitin etkisi.....	47
Şekil 4.14. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,4,6-trihidroksibenzoik asitin etkisi.....	47
Şekil 4.15. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,3-dihidroksibenzoik asit etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	48
Şekil 4.16. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,3-dihidroksibenzoik asit etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	48
Şekil 4.17. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,5-dihidroksibenzoik asit etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	49
Şekil 4.18. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,5-dihidroksibenzoik asit etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	49
Şekil 4.19. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,4,6-trihidroksibenzoik asit etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	50
Şekil 4.20. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,4,6-trihidroksibenzoik asit etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	50
Şekil 5.1. Sepharose 4B-4,2 aminoetilbenzen sülfanilamit afinite jeli	56
Şekil 5.2. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} iyonuna inhibitörlerin bağlanma modeli.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Memeli karbonik anhidraz II izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi	19
Çizelge 2.2.	Karbonik anhidrazın saflaştırılmasında kullanılan bazı önemli afinite jelleri.....	21
Çizelge 4.1.	İnsan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Sepharose 4B-4,2 aminoetilbenzen sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.....	39
Çizelge 4.2.	Karbonik anhidrazın afinite jellerinin optimum pH, sıcaklık ve iyonik şiddet değerleri	43
Çizelge 4.3.	Karbonik anhidrazın afinite kromatografisi jelinin optimum şartlarda CA-I ve CA-II izoenzimlerini tutma kapasiteleri	43
Çizelge 5.1.	2,3-Dihidroksibenzoik asit, 2,5-Dihidroksibenzoik asit ve 2,4,6-Trihidroksibenzoik asitin insan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için bulunan IC_{50} değerleri.....	60
Çizelge 5.2.	2,3-Dihidroksibenzoik asit, 2,5-Dihidroksibenzoik asit ve 2,4,6-Trihidroksibenzoik asitin insan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için bulunan K_i değerleri	60

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler düzenli tepkime dizilerindeki aktiviteleriyle besinsel moleküllerin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalizler, böylece kimyasal enerji korunur, dönüştürülür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküller üretilir. Düzenleyici enzimlerin aktivitesi altında yaşamı sürdürmek için gerekli metabolik yollar enzimlerle kontrol altına alınmıştır yani enzimler hemen hemen her biyokimyasal süreçte merkez durumundadır.

Enzimlerle ilgili çalışmalar oldukça büyük öneme sahiptir. Bazı hastalıklarda, özellikle kalıtsal genetik bozukluklarda bir ya da daha fazla enzimin eksikliği veya tamamen yokluğu söz konusu olabilirken, bazı hastalıklara da enzimin aşırı aktivitesi neden olabilir. Enzimlerin aktivitelerinin kan plazmasında, eritrositlerde veya doku örneklerinde ölçümü belli hastalıkların tanısında önemlidir. Birçok ilaç, biyolojik etkilerini enzimlerle etkileşerek ortaya çıkarır (Lehninger 2005).

1.2. Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu

Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hızını azaltan herhangi bir maddeye inhibitör denir. Enzimatik inhibisyon, dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılır.

Dönüşümsüz inhibisyonda enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir. İnhibitör, enzime ya kovalent olarak bağlanır veya kompleks oluşturur. V_{max} azalırken, K_M değişmeden kalır (Keha ve Küfrevioğlu 2008).

Geri dönüşümlü inhibitörler enzimlerle kovalent olmayan bağlarla bağlanırlar. Enzim-inhibitör kompleksinin seyreltilmesi geri dönüşümlü bağlanan inhibitörün çözülmesiyle ve enzim aktivitesini yeniden kazanmasıyla sonuçlanır. En sık karşılaşılan dönüşümlü iki inhibisyon tipi yarışmalı ve yarışmasız inhibisyonudur.

1.2.1. Yarışmalı inhibisyon

Bu inhibisyon tipinde inhibitör substratın normalde bağlanması gereken aynı yere geri dönüşümlü olarak bağlanır ve böylece substratla o bölge için yarışır.

$V_{\max}$ üzerine etkisi: Yarışmalı inhibitörün etkisi $[S]$ artırılarak ortadan kaldırılabilir. Yeterli derecede yüksek bir substrat konsantrasyonunda reaksiyon hızı inhibitör olmadan gözlenen $V_{\max}$ değerine ulaşır.

K_M üzerine etkisi: Yarışmalı bir inhibitör belli bir substrat için belirlenmiş K_M 'i yükseltir. Bu, yarışmalı bir inhibitör varlığında $\frac{1}{2} V_{\max}$ 'a erişmek için daha fazla substrat gerekeceği anlamına gelir.

Linewear-Burke grafiği üzerine etkisi: Yarışmalı inhibisyon inhibe olan ve olmayan reaksiyon grafiklerinin y ekseninde $1/V_{\max}$ da kesiştiği tipik bir Linewear-Burke grafiği gösterir ($V_{\max}$ değişmez). İnhibe olan ve olmayan reaksiyonlar farklı x-ekseni kesişmeleri göstererek yarışmalı inhibitör varlığında K_M 'in yükseldiğine işaret ederler.

1.2.2. Yarışmasız inhibisyon

Bu inhibisyon tipi $V_{\max}$ üzerindeki tipik etkisiyle dikkat çeker. İnhibitör ve substrat enzimin farklı bölgelerine bağlanınca yarışmasız inhibisyon meydana gelir.

$V_{\max}$ üzerine etkisi: Yarışmasız inhibisyon substrat konsantrasyonu artırılarak engellemez. Bu yüzden, yarışmasız inhibitörler reaksiyonun $V_{\max}$ 'ını azaltırlar.

K_M üzerine etkisi: Yarışmasız inhibitörler substratın enzime bağlanmasını etkilemez. Bu yüzden, enzim yarışmasız inhibitör varlığında veya yokluğunda aynı K_M 'i gösterir.

Linewear-Burke grafiği üzerine etkisi: $1/[S]$ 'ye karşı $1/V_0$ grafiği çizilerek $V_{\max}$ 'ın yarışmasız inhibitör varlığında azaldığı, buna karşılık K_M 'in sabit kaldığı Linewear-Burke grafiğine sahiptir (Lippincott 2007).

1.2.3. Yarı yarışmalı inhibisyon

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi, yarı yarışmalı inhibisyonudur. Bu inhibisyon çeşitinde; inhibitör serbest enzime bağlanamaz, sadece ES kompleksine bağlanır. Bunun için tek substratlı sistemlerde, yarı yarışmalı inhibisyona seyrek rastlanırken birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipi daha sık gözlenir.

ESI kompleksi ortamda sürekli olarak var olacağından, yarı yarışmalı inhibitör varlığında $V_{\max}$ azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla; ES kompleksi ortamdan sürekli çekildiğinden, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve K_M değeri küçülür (Segel 1975; Telefoncu 1986).

1.3. Karbonik Anhidraz Enzimi

1.3.1. Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik fonksiyonları ve dağılımı

İlk olarak, 1933 yılında sığır eritrositlerinde tanımlanan karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz E.C.4.2.1.1), bu tarihten sonra tüm memeli dokularında, prokaryot,

ökaryot ve arkeada yaygın olarak bulunan ve yapısında Zn^{+2} iyonu bulunduran bir metaloenzimdir (Supuran *et al.* 2001; Nuti *et al.* 2007).

Basit fakat temel reaksiyon olan CO_2 hidratasyonu ile HCO_3^- ve H^+ oluşumu; detaylı şekilde araştırılmış olan karbonik anhidraz enzimi tarafından kataliz edilir. CA tarafından katalizlenen reaksiyon aynı zamanda katalizör olmaksızın da oluşmaktadır. Fakat bu durumda yüksek miktarda CO_2 üretilen veya ihtiyaç duyulan çoğu organizmanın fizyolojik gereksinimlerini karşılaması çok yavaş gerçekleşmektedir (Supuran 2010).

CA'nın katalizlediği proseslere dahil olan kimyasallar CO_2 , HCO_3^- ve H^+ 'lardır. Filogenetik ağacın tamamındaki organizmaların çoğu fizyolojik proseslerinde, bu molekül ve iyonlar temel teşkil etmektedirler. Sonuç olarak bu proteinler çeşitli hücre ve doku bölmelerinde yüksek miktarda mevcuttur (Supuran 2010).

α -CA'lar bu proteinleri kodlayan genetik ailenin ilkidir. Omurgalılarda, tek hücreli hayvanlarda, alglerde ve yeşil bitkilerin sitoplazmasında bulunmaktadır. β -CA'lar bakteride, alglerde, tek çenekli ve çift çeneklilerin kloroplastlarında baskın olarak bulunurken aynı zamanda çoğu mantar ve bazı arkebakterilerde bulunmaktadır. γ -CA'lar arkebakteri ve bazı bakterilerde mevcut iken; δ -CA ve ζ -CA'lar yalnız denizdeki tek hücreli deniz otunda görülmektedir (Supuran 2010).

Karbonik anhidraz enzimi metabolik CO_2 transportunu sağlar ayrıca birçok dokuda H^+ ve HCO_3^- birikiminde rol alır (Supuran and Scozzafava 2001; Chegwiddden *et al.* 2000). Bu dokular arasında böbrek, gastrit mukoza ve göz lensini sayabiliriz. Bunlardan başka histokimyasal metodlarla, tükürük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında CA'ya rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak, biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde kabuklu hayvanların kabuk yapısında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik hücre kloroplastlarında bu enzimin değişik rolleri olduğu da ispatlanmıştır.

CA, sözü geçen canlı hücrelerin çoğunda; sitoplazmada çözünmüş, bazende hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak bulunmaktadır (Maren 1967; Pocker and Sarkanen 1979; Pocker and Joan 1974).

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimlere izoenzim veya izozim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında amino asit sayı ve sırasının farklı olması, izoelektrik pH değerinin farklı olması, her bir alt ünitenin ayrı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin subsellüler fraksiyonlarına da yerleşebilirler (Devlin 2002).

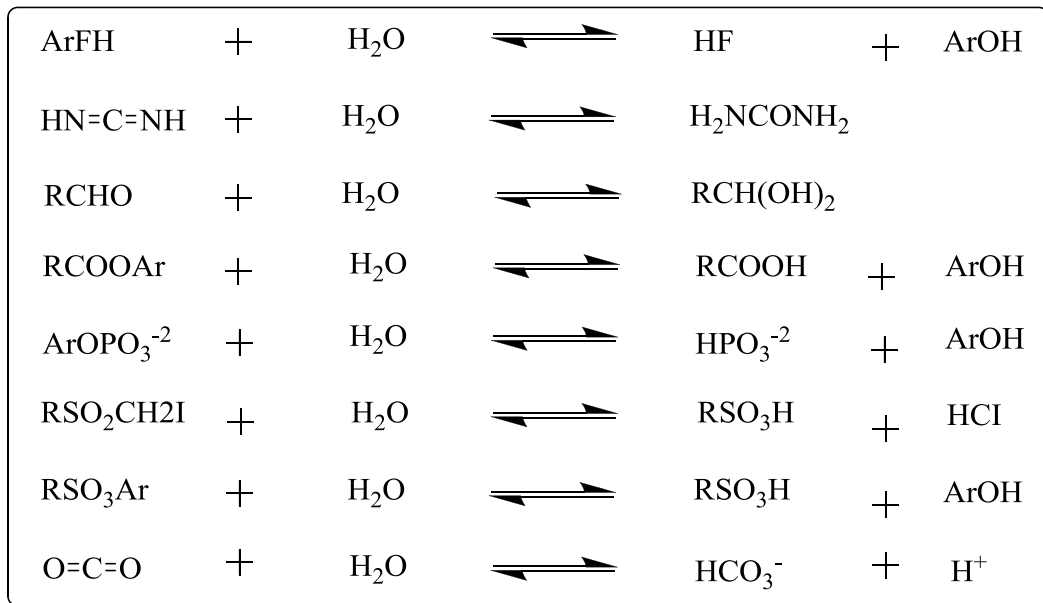
İnsanları da içine alan yüksek yapılı omurgalıların çok farklı doku ve hücrelerine yerleşmiş, 16 farklı CA izoenzimi tespit edilmiş ve bağlı olduğu proteinlere göre belirlenmişlerdir. Bu izoenzimlerin, katalitik etkinlik ve inhibitör bağlama özelliklerinde bazı önemli farklar bulunmaktadır. İzoenzimlerden CA-I, II, III, VII ve XIII olmak üzere beş tanesi sitozoliktir. CA-IV, IX, XII ve XIV ise membrana bağlıdır. CA-VA ve VB mitokondriyal, CA-VI tükürükte salgılanır ve üç tanesi nonkatalitiktir (VIII, X, XI) (Ekinci *et al.* 2011).

hCA-II, 29,3 kDa büyüklüğünde olan bir proteindir. hCA-II diğer izoenzimlere göre katalitik aktivitesi oldukça yüksektir, insan doku ve organlarında yaygın olarak rastlanmaktadır (Hilvo 2005; Leppilampi 2006). hCA-I, 30 kDa büyüklüğünde bir proteindir. Eritrositlerde, kolon epitelinde, göz lensi ve korneal epitelyumda bulunur. Hücre içinde sitozolde yer alan hCA-I çözünebilir karakterdedir ve eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan proteindir. Eritrositlerde hCA-II'ye göre beş kat daha fazla bulunmasına rağmen katalitik aktivitesi hCA-II'nin sadece %15 'i kadardır (Lowe *et al.* 1991; Sowden *et al.* 1992).

HCA-II izoenzimi karbonik anhidrazın en çok çalışılan formudur. Bu izoenzimin turnover sayısı 25°C de 10^6 s^{-1} olarak bulunmuştur. CA-II'nin doku dağılımı geniştir ve pek çok farklı organ ve hücre tipinde bulunur. Osteoporoz, renal tübüler asidoz ve serebral kalsifikasyonla ilişkili olması bu izoenzimin kemikte, böbrekte ve beyindeki önemini gösterir (Lindskog 1997).

1.3.2. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar

Karbonik anhidraz CO_2 'in hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik aside, ürenin siyanamide ve aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Ayrıca karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir (Şekil 1.1). (Supuran and Scozzafava 2001).



Şekil 1.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri

Son on yıldan beri karbonik anhidraz, enzimatik katalizin prensiplerinin aydınlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır. CA, metabolizmada son derece önemli rol oynamasının yanı sıra, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında

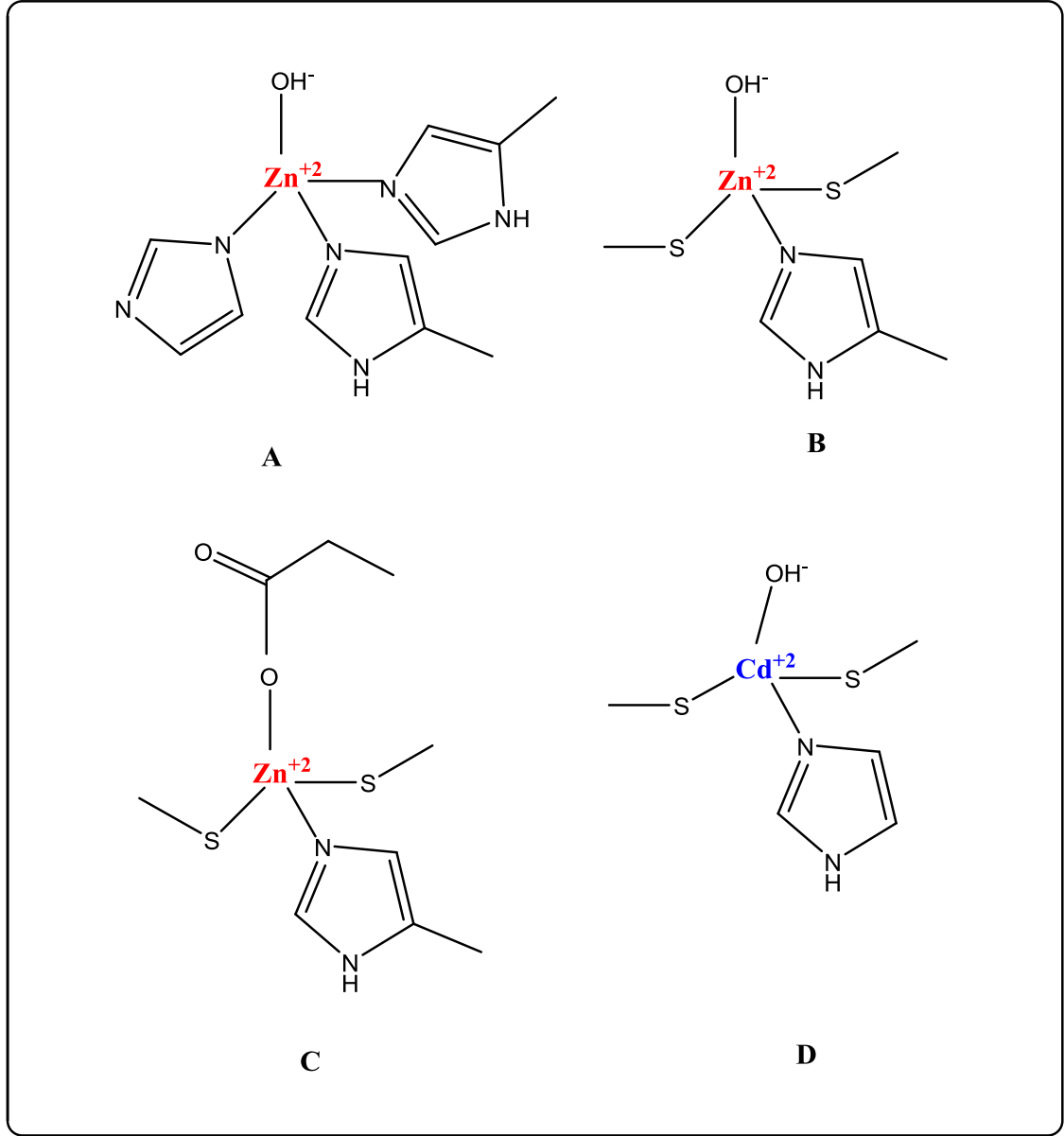
aktivitesini kaybetmeden uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir (Pocker and Janjic 1989).

Karbonik anhidraz, CO_2 ve H_2CO_3 veya ortamın pH'sına göre HCO_3^- ve CO_3^{2-} iyonları arasında dönüşümleri katalizleyen bir enzimdir. Düzlemsel bir molekül olan CO_2 'in farklı açılara sahip piramidal yapıda H_2CO_3 'e kendiliğinden dönüşümü oldukça yavaştır. Karbonik anhidrazın bilinen on altı izoenziminden üçü olan CA-I, CA-II ve CA-III kristallendirilmiş ve yapıları hakkında detaylı bilgiler elde edilmiştir. Üç izoenzim de sitoplazmada çözünmüş halde bulunur. Molekül ağırlıkları 28 kDa olup, 259 veya 260 amino asitten ibaret tek bir polipeptid zinciri halindedirler. Her bir enzim molekülünün aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip ayrıca üç histidin imidazol iyonunun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA'lar tam manasıyla aktiviteden yoksundurlar (Armstrong *et al.* 1966; Scher and Dietsch 1984).

1.3.4. Karbonik anhidraz enzimlerinin üç boyutlu yapıları

Şimdiye kadar keşfedilen bütün CA'lar metaloenzimdir ve bunlar kendi arasında beş enzim sınıfına ayrılır. Bu enzim sınıflandırması şu şekil de yapılmaktadır; α -CA, β -CA, γ -CA, δ -CA ve ζ -CA'dır.

α -, β -, δ -CA'ların aktif bölgesinde Zn^{+2} bulunmaktadır. γ -CA'ların aktif bölgesinde ise muhtemelen Fe^{+2} iyonu vardır fakat Zn^{+2} ve Co^{+2} iyonları bağlıyken de aktiflik göstermektedirler. ζ -CA'lar ise fizyolojik reaksiyonların katalizini yapmak için Cd^{+2} ve Zn^{+2} kullanmaktadırlar. CA'ların beş ailesinin aktif bölgeleri (Şekil 1.2)'de gösterilmektedir.



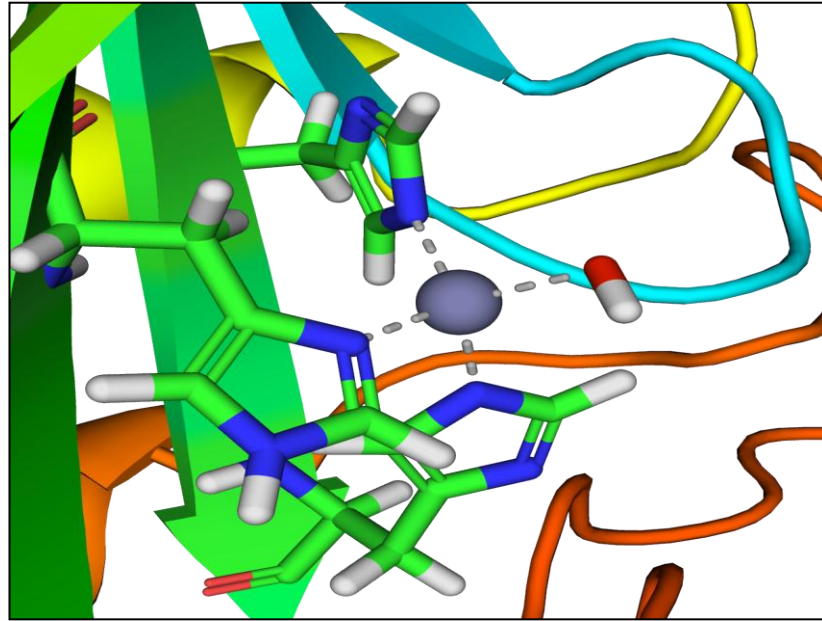
Şekil 1.2. CA’larda metal iyon koordinasyonu

*(A: α -, γ -, ve δ - CA’lar (γ -CA’lar için metal iyon Co^{+2} ve Fe^{+2} de olabilir); B: β -CA’lar açık aktif bölge; C: β -CA’lar kapalı aktif bölge; D: ζ -CA’lar (aktivitesini kaybetmeden Cd^{+2} ile Zn^{+2} yer değiştirebilir)

Aynı zamanda beş enzim sınıfının üç boyutlu katlanmaları da birbirinden farklıdır. α -CA’lar normalde monomer nadiren dimer. Örneğin CA-IX ve CA-XII. β -CA lar dimer, tetramer veya oktamerdir. γ -CA’lar trimer iken δ -CA ve ζ -CA’lar muhtemelen monomerdir (Supuran 2010).

1.3.5. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması

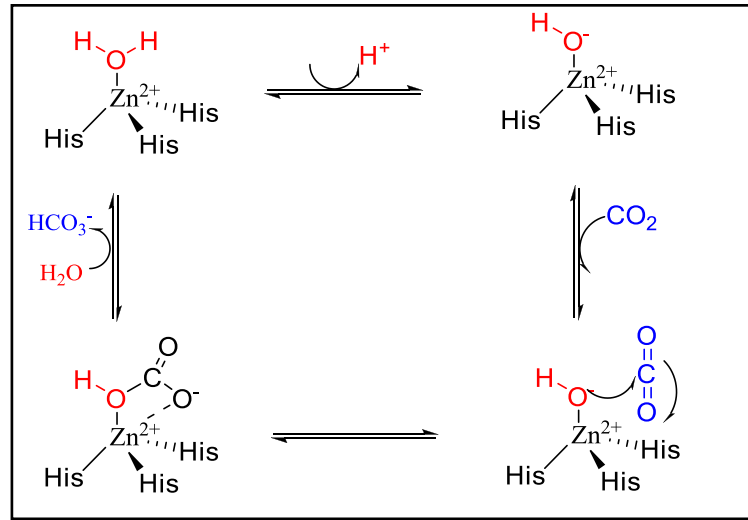
Karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesindeki Zn^{+2} iyonunun reaksiyonların katalizi için büyük önemi vardır. X-ray kristalografisi çalışmaları metal iyonunun aktif bölümün 15 Å^0 derinliğindeki tabanında yerleştiğini göstermiştir. 3 histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119) ve su molekülü/hidroksit iyonu tarafından koordine edilmektedir. Çinko bağlı H_2O , Thr-199'un hidroksil grubuyla hidrojen bağıyla bağlıyken Glu-106'nın karboksilat grubu ile köprü halindedir. Bu bağlantılar çinko bağlı molekülün nükleofilisini artırır ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki CO_2 'e doğru hareket etmektedir (Supuran and Scozzafava 2001).



Şekil 1.3. Karbonik anhidraz enziminin X-Ray kristalografisi (www.wikipedia.com.tr)

Enzimin aktif formu; hidroksil grubunun çinkoya bağlı olduğu temel formdur. Bu güçlü nükleofil, CO_2 molekülü ile etkileşir. Bu da bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar. Bu bikarbonat iyonu daha sonra su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Böylece Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır. Bu da enzimin asit formuna yol açar. Katalitik olarak bu form inaktiftir. Tekrar temel formunu oluşturmak için aktif bölgeden çevresine proton transferi olur (Stams *et al.* 1998). CA-II, CA-IV, CA-V, CA-VII ve

CA-IX gibi katalitik olarak çok aktif olan izoenzimlerde, aktif bölgeye yerleşmiş histidin (His-64) rezidüsü yardımıyla çok etkili bir proton transfer işlemi gerçekleştirilir (Briganti *et al.* 1996).



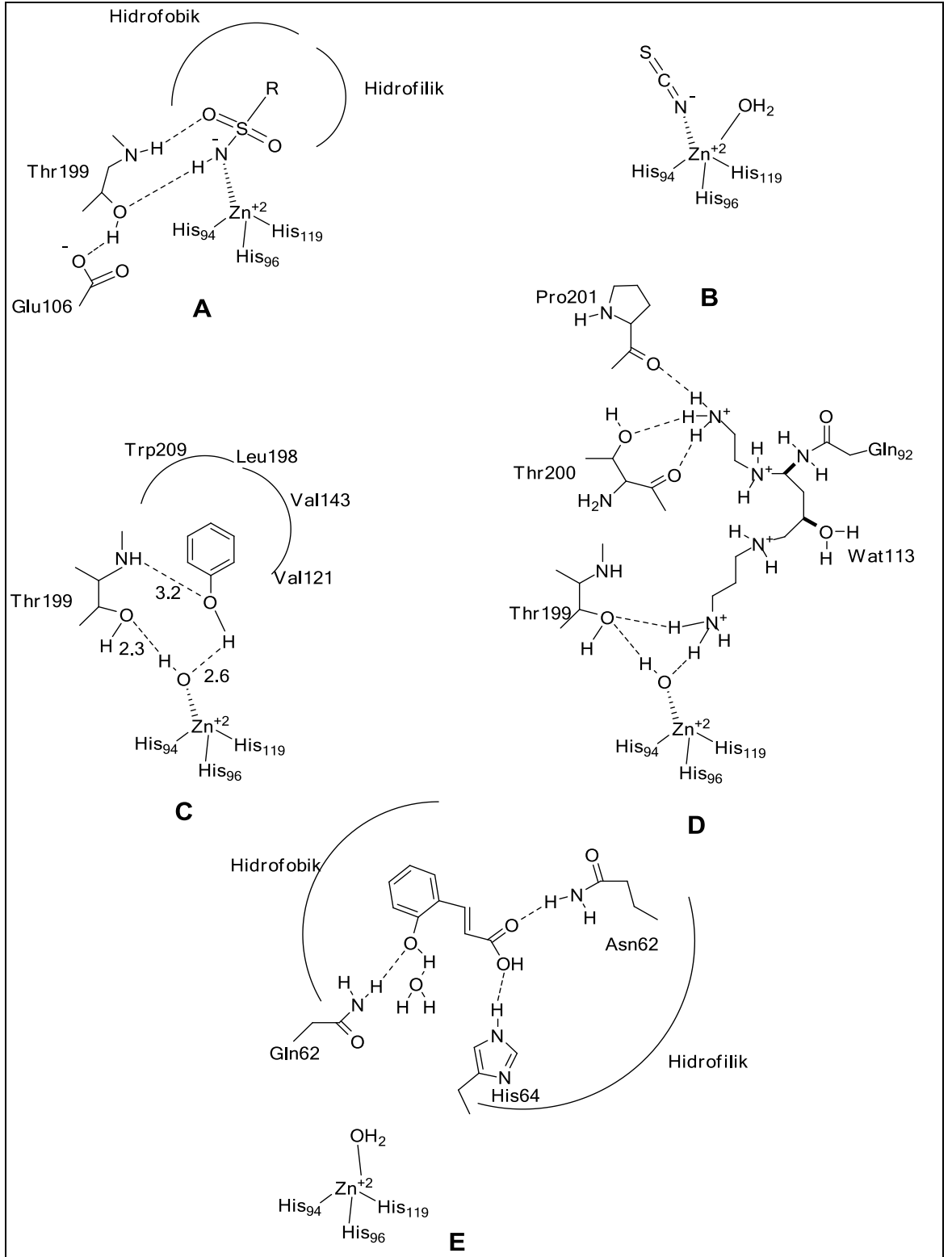
Şekil 1.4. Karbonik anhidrazın katalizlediği CO₂-hidrataz reaksiyon mekanizmasının gösterilişi (Lindskog and Silverman 2000)

1.3.6. Karbonik anhidraz inhibitörleri

Hastalıkların tedavi ve teşhisinde karbonik anhidraz inhibitörlerinin önemi, glokom hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonların anlaşılmasında etkili olmuştur. Bunun sonucunda ise CA enziminin inhibitör ve aktivatör sentezlerine hız verilmiştir. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta Glokom tedavisinde ilaç, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans (MRI) belirlenmesinde diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların geliştirilmesinde yol gösterici olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple, farklı CA izoenzimlerinin aktivitelerinin temel işlevleri, yeni ilaçların ve tedavi araçlarının geliştirilmesine fırsat vermektedir (Winum *et al.* 2004; Franchi *et al.* 2003).

Karbonik anhidraz enzimi dört farklı mekanizmayla inhibe edilmektedir:

1. Zn^{+2} iyonuna bağlı su/hidroksit iyonunun inhibitörle yer değiştirmesiyle Zn^{+2} 'yi tetrahedral geometrisine yönlendirmektedir. Bu duruma örnek olarak sülfanilamidlerin bağlanması verilebilir (Şekil 1.5.A).
2. Metal koordinasyon küresine inhibitörün eklenmesiyle Zn^{+2} iyonu trigonal-bipiramidal geometrisi oluşturmaktadır. Bu geometri oluşumu tiyosiyanatın bağlanmasıyla gözlenmektedir (Şekil 1.5.B).
3. Zn^{+2} iyonuna su veya hidroksit iyonu bağlıyken inhibitörün Zn^{+2} ye tutunmasıyla inhibisyon gözlenmektedir. Bu şekil inhibisyon mekanizması en iyi fenollerde oluşmaktadır (Şekil 1.5.C).
4. Aktivitör bağlanan bölgeye inhibitör bağlanmasıyla aktif bölge oyuğu tıkanır, kumarin ve lakosamid bağlama mekanizması bu şekilde oluşmaktadır (Şekil 1.5.E) (Supuran 2010).



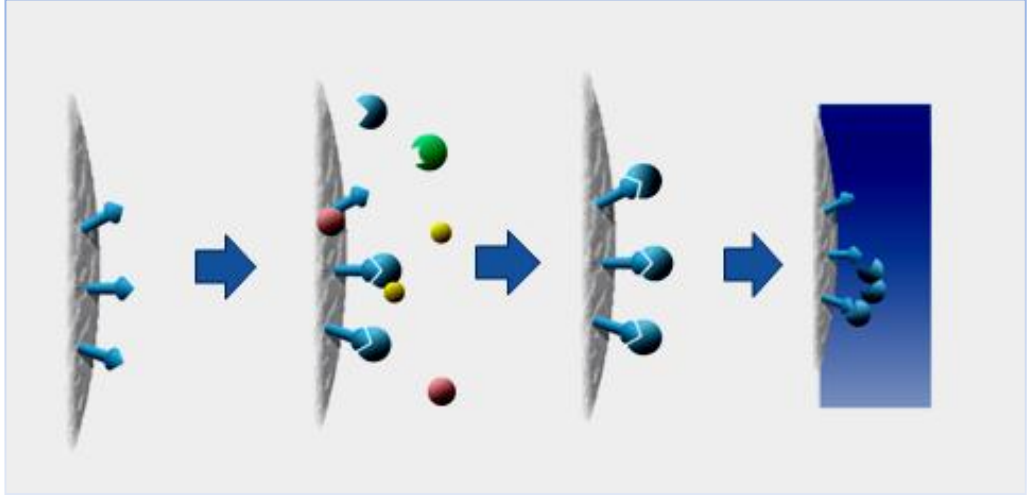
Şekil 1.5. İnhibitör bağlanma modelleri

***(A:** Sülfanilamidlerin bağlanması; **B:** İnorganik anyonların bağlanması; **C:** Fenolün bağlanması; **D:** Sperminin bağlanması; **E:** Kumarin ve trans-2-hidroksisinamik asit bağlanması (Durdağı 2011))

1.4. Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma

Proteinlerin ayrılması için kullanılan yöntemlerden biri spesifik ligand esasına dayanan afinite kromatografisidir. Bazı proteinler afinite kromatografisiyle çok kere bir basamakta çok kompleks karışımlardan izole edilebilirler. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı jeller kullanılabilir. Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Küçük ligandları (enzim inhibitörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar (Keha ve Küfrevioğlu 2008).

Sephadex veya Sepharose gibi katı destek materyallerinden birine, uygun yöntemlerle ligandın bağlanarak hazırlanması sonucu oluşturulan bir afinite kolonundan saflaştırılması düşünülen bir molekül karışımı geçirildiğinde, sadece saflaştırılması istenilen molekül ligandla etkileşerek kolonda tutulur. İstenmeyen bütün safsızlıklar kolondan uygun bir tampon (yıkama tamponu) geçirilerek uzaklaştırılır. Kolonda tutulan ilgili molekül spesifik elüsyon tamponuyla kolondan alınır. Spesifik elüsyon, ilgili moleküle liganddan daha fazla afiniteye sahip madde içeren bu tampon çözelti ile gerçekleştirilir. Bu yöntemle tek basamakta yüzlerce kat saflaştırma yapılabilir (Arslan 2003).



Şekil 1.6. Afinite kromatografi basamaklarının şematik gösterilişi

Bu bilgilere göre, bir afinite kromatografi işlemi şu alt basamakları içermektedir:

1. Uygun bir ligandin seçimi
2. Ligandin taşıyıcı matriks üzerine immobilizasyonu
3. Protein karışımının matriks ile temas ettirilmesi
4. İstenmeyen proteinlerin uzaklaştırılması
5. İlgilenilen proteinin saf olarak elüsyonu

Sonuç olarak, proteinlerin aktive edilmiş matrikslere bağlanmasındaki koşullar proteinin denatürasyonuna ya da inaktivasyonuna neden olmamalıdır. Genelde bağlanma protein molekülünün dış yüzeyindeki lizin rezidüleri, ya da başka bir amin grubu ile olur. Bu grup nükleofilik yani protonlanmamış halde bulunacağı yüksek bir değerde olmalı fakat inaktivasyona neden olacak kadar da yüksek olmamalıdır. Tüm bu özellikler göz önüne alınırsa, bir afinite kolonunun verimli olabilmesi için matriksin iyi akış özelliklerine sahip, ligandı bağlama ve elüsyon işlemlerine dayanıklı ve akan bileşiklerle etkileşme yapmayan bir yapıda olması, ligandin ise adsorbe edeceği bileşiklerin 10^{-4} – 10^{-8} M arasında değişen bir afinitesi olmalıdır. Bu sağlandığı zaman kolonun kapasitesi artar ve istenilen protein yüksek derecede saflaştırılmış olarak elde edilir (Keha 1981).

1.5. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar. Hidroksibenzoik asitler C6-C1 fenilmetan yapısında olup, bitkisel gıdalarda genelde iz miktarda bulunurlar. Bunlar salisilik asit, *m*-hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asitler gibi asitlerdir. Hidroksisinamik asitler ise C6-C3 fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Çok yaygın bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitlerdir. Bitkilerde büyük bir kısmı organik asitler ve şekerlerle esterleşmiş halde bulunan fenolik asitlerin kimyasal yapıları (Şekil 1.7)'da görülmektedir.

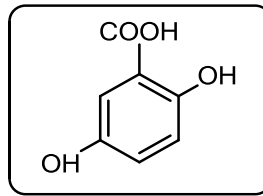


Asit	R1	R2	R3	Asit	R1	R2	R3
<i>p</i> -Hidroksibenzoik	H	OH	H	<i>p</i> -Kumarik	H	OH	H
Pirokate şük	H	OH	OH	Kafeik	H	OH	OH
Vanilik	CH ₃ O	OH	H	Ferulik	CH ₃ O	OH	H
Siringik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O	Sinapik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallik	OH	OH	OH				

Şekil 1.7. Fenolik asitlerin genel yapısı: **a)** Benzoik asit türevleri **b)** Sinamik asit türevleri

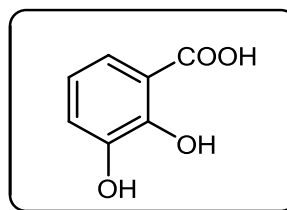
Benzoik asit, birçok bitkinin yaprak, kabuk ve meyvelerinde bulunur. En önemli benzoik asit kaynağı balzamlar ve ağaç reçineleridir. Doğada ise siyah vişne ağacı, kızıl yaban mersini, kuru erik, anason tohumunda bulunur. Çileklerde ve meyvelerde az miktarda doğal olarak bulunurlar, ancak madde sentetik olarak üretilir. Özellikle mantarlara karşı koruyucu bir rol oynayan doğal bir bileşendir. Anti-mikrobiyal davranışı sayesinde, gıdalarda koruyucu olarak geniş alanda kullanılmaktadır. (www.wikipedia.com.tr).

2,5-dihidroksibenzoik asit benzoik asit türevidir. Özel adı ise gentisik asittir. Böbreklerle atılan aspirinin metabolik yıkımının %1 lik ürünüdür. Hidrokinonun karboksilasyonu ile üretilir, bir hidrokinon gibi gentisik asit hızlıca okside olur ve farmakolojik hazırlıkların bazılarında antioksidan olarak kullanılır (www.wikipedia.com.tr).



Şekil 1.8. 2,5-dihidroksibenzoik asit

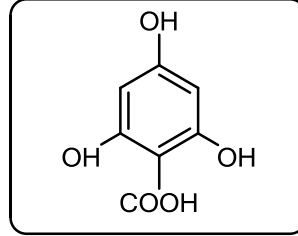
2,3-dihidroksibenzoik asit sağlıklı bir insanın aspirin alımından sonra kan plazmasında ve üresinde mevcuttur. Onunla ilgili bilgiler kütle spektroskopisi ve elektrokimyasal analizlerle doğrulanmıştır. Ayrıca 2,3-dihidroksibenzoik asitin konsantrasyonu 2,5-dihidroksibenzoik asit ve salisilik asit konsantrasyonundan düşüktür (www.wikipedia.com.tr).



Şekil 1.9. 2,3-dihidroksibenzoik asit

2,4,6-trihidroksibenzoik asit ise floroglusinolün (1,3,5-trihidroksibenzen) karboksilik asitidir. Trihidroksi bileşikler bitkilerde yaygındır. İlginç antioksidan aktivite gösterirler. 2,4,6-trihidroksibenzoik asit askorbik asitle kıyaslanabilir antioksidan aktiviteye sahiptir fakat diğer trihidroksibenzoikasitlere göre en düşüktür. Bakteri yok

edici aktiviteye sahip değil iken kabuklulara karşı en yüksek toksitliğe sahiptir. Romatizma önleyici aktivitesi ise çelişkilidir (Mammıno and Kabanda 2008).



Şekil 1.10. 2,4,6-trihidroksibenzoik asit

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında Meldrum and Roughton ile Stadie and O'Brien tarafından ve birbirlerinden habersiz olarak keşfedilmiştir. Keilin ve Martin (1944), CA aktivitesinin çinko içeriği ile orantılı olduğunu bularak çinkonun katalizlemede spesifik rolü olduğunu bildirmişlerdir. Böylece CA enzimi tanımlanan ilk metaloenzim olarak tarihe geçmiştir.

CA enziminin , suda yaşayan canlılar da içinde olmak üzere bitki, mantar, böcek, sıçan ve memeli dokuları gibi geniş bir canlı topluluğunda bulunduğu belirtilmiştir. (Burt *et al.* 1992; Bottcher *et al.* 1994; Demir *et al.* 1997; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2005; Yu *et al.* 2006). CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükrüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmıştır. (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Demir *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004).

Birçok dokuda bulunduğu belirtilen CA enziminin insanları da içine alan yüksek yapılı omurgalıların, çok farklı doku ve hücrelerine yerleşmiş 16 farklı izoenzimi tespit edilmiştir. Bu izoenzimlerin, katalitik etkinlik ve inhibitör bağlama özelliklerinde bazı önemli farklar bulunmaktadır. İzoenzimlerden CA-I, II, III, VII ve XIII olmak üzere beş tanesi sitozoliktir. CA-IV, IX, XII ve XIV ise membrana bağlıdır. CA-VA ve VB mitokondriyal, CA-VI tükürükte salgılanır ve üç tanesi nonkatalitiktir (VIII, X, XI) (Ekinci *et al.* 2011).

hCA-I, insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir izoenzimdir ve insan kanından saflaştırıldığında, miktarı 12 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır. Eritrositlerde hCA-I izoenzimi yanında hCA-II izoenzimi de bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonları ise, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan CO₂'i, HCO₃⁻'a, akciğer pulmoner kapilerde ise HCO₃⁻'in CO₂ 'e dönüşmesi reaksiyonunu

katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır. hCA-I izoenziminin turnover sayısı $2,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Bu izoenzimin fizyolojik fonksiyonu hCA-II kadar açık değildir. hCA-I eksikliği sendromu belirlenmiş fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır (Ren and Lindskog 1992; Sly and Hu 1995; Supuran and Scozzafava 2001).

hCA-II kemikte osteoklastlarda, beyinde, oligodendrositler ve beyin epitelyumunda, gözde lensler ve retina müller hücrelerinde, karaciğerde, böbrekte, salgı bezlerindeki asiner hücrelerde, pankreatik kanal hücrelerinde, gastrik parietal hücrelerde, uterusun endometriumunda, endotel hücrelerde, spermatozoada, eritrositlerde, trombositlerde bulunur. Bu hücre tiplerinde CA-II'nin fiziksel rolü dönüşümlüdür. Bazı hücrelerde CA-II asit-baz homeostazı için temel rol oynar. Üriner asidifikasyon üretimi için H^+ salgılayan renal tubüler, gastrik parietal hücreler tarafından H^+ salgısına katkıda bulunur (Sly and Hu 1995). CA-II pankreas sıvısı için HCO_3^- katkısı yapan pankreatik kanal hücrelerine HCO_3^- temin eder. Aköz hümorun salgılanmasında da CA-II enziminin uyarıcı etkisi vardır (Maren *et al.* 1983). CA-II aynı zamanda böbrekte, eritrositlerde ve karaciğerde proksimal tubüllerde CO_2 değişimine katkıda bulunur (Epstein and Grant 1977). Memeli karbonik anhidraz II (CA-II) izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Memeli karbonik anhidraz II izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi (Pastarekova *et al.* 2004)

Doku dağılımı	İşlevsel rolleri
Yemek borusu	Yemek borusu ve daha yukarı bölgelere bağlı asiditeyi engeller
Kemik osteoklast hücreleri	Kemik resorpsiyonu
Göz	Aköz hümorün üretimi
Testis	Sperm hareketliliği
Böbrek	İdrar asidifikasyonu
Beyin	BOS salgısı
Akciğer	Gaz değişimi
Eritrositler	H^+ salgısı, HCO_3^- salgısı

Karbonik anhidrazın memeli türlerinden izolasyonunda kaynak ve izoenzimlerine göre farklı yöntemler uygulanmaktadır. Üzerinde en fazla durulan izoenzimler sitoplazmik CA-I ve CA-II dir. Bu iki izoenzimin en kolay elde edilebilir kaynağı eritrositlerdir. Yapılan çalışmalarda eritrositlerde fazla miktarda bulunan hemoglobin, kloroform-etanol çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi ya da ısı ile denatürasyon yöntemleriyle uzaklaştırılabilmektedir. Bunların yanında üç-faz ayırma yöntemi de bir alternatif olmuştur (Arslan *et al.* 1996).

Bu izoenzimlerin izolasyonunda birçok farklı yöntem de uygulanmıştır. Bunlar arasında Sephadex G-75 ile jel-permeasyon kromatografisi, CM-selüloz katyon değişimi kromatografisi, DEAE Sephadex A-50 anyon değişimi kromatografisi, DEAE-selüloz kromatografisi, DEAE-hidroksilapatit kromatografisi sayılabilir. Bu yöntemler tek başlarına değil genellikle birkaç tanesi ardışık olarak uygulanmıştır. Uygulandığı çalışmalarda ise istenmeyen proteinlerden kurtulmak için birinci basamakta etanol-kloroform çöktürmesi sıklıkla uygulanmaktadır (Vince and Reithmeier 2000).

Hall and Schraer (1983) gökkuşağı alabalık (*Salmo gairdneri*) eritrositlerinden CA enzimini kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Bio-jel iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırmışlardır. (Bülbül *et al.* 2003)

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için en çok uygulanan metod afinite kromatografisidir. Bu enzim ilk kez afinite jeli kullanılarak (Falkbring *et al.* 1972) saflaştırılmıştır. Daha sonra (Whitney *et al.* 1975), (Chanpagnol *et al.* 1976), (Wistrand *et al.* 1980) ve (Arslan *et al.* 1996), (Ozensoy *et al.* 2004) yaptıkları çalışmalarda CA enzimini saflaştırmak için farklı afinite jelleri sentezlenmiştir.

Çizelge 2.2. Karbonik anhidrazın saflaştırılmasında kullanılan bazı önemli afinite jelleri

Matriks	Ligand	Uzantı Kolu	CA Kapasitesi	Uygulandığı Canlı ve Dokular
Sephadex G-150 Sepharose 2B, 4B, 6B	p-Aminobenzen sülfonamide	Yok	3-4 mg/ml jel	İnsan eritrositleri, Bakteri
Sepharose-4B	p-Aminobenzen sülfonamide	Yok	5 mg/ml jel	İnsan eritrosit izoenzimleri
Sepharose-6B	p-Aminobenzen sülfonamide	$\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{O}-(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CHO}$	Belirtilmemiş	İnsan böbreği, sığır göz lensi
CM-Sephadex G-150	p-Aminobenzen sülfonamide	$\text{NH}_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{NHCOCH}_2-$	17-23 mg/ml jel	İnsan, kedi ve maymun eritrositleri
Sepharose-4B	2-Amino- 1,3,4-tiyadizol-5 sülfonamid	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$ $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Belirtilmemiş	Bitki fotosentetik hücreleri
CM-Bio-jel A	p-Aminobenzen sülfonamide	$-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2-$	15-20 mg/ml jel	İnsan eritrositleri
CM-Sephadex	p-Aminobenzen sülfonamide	L-Tirozin	503 mg/ml jel	İnsan ve sığır eritrositleri
Sepharose-4B	p-Aminobenzen sülfonamide	L-Tirozin	301-317 mg/g jel	İnsan ve sığır eritrositleri

Şahin (2008) ligand olarak CA inhibitörü olan 4-izosiyonatbenzensülfonamit, matriks olarak kullanılan Eupergit C-250L'ye etilendiamin uzantı kolunu bağlayarak yeni bir afinite jeli sentezlemiştir. Bu reaksiyonda, matriks ile ligand arasındaki reaksiyon mekanizması için gerekli olan ve sterik etkileşmenin kontrolü amacıyla etilendiamin kullanılmıştır. Eupergit C-250L'nin taşıdığı reaktif oksiran grupları, ligandın matrikse bağlanması için uyumlu şartları sağladığı belirtilmektedir. Eupergit C-250L-etilendiamin-4-izosiyonatbenzensülfonamit kimyasal yapısına sahip afinite jelinin kullanımıyla BCA ve hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin her ikisinde eritrositlerden saflaştırılmıştır.

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 inhibitörleridir (Bülbül *et al.* 2003). Örneğin insanlarda glokom hastalığında CA inhibitörleri farmakolojik ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Casini *et al.* 2002; Casini *et al.* 2002; Gülçin *et al.* 2004). Bununla birlikte birçok kimyasal madde ve atıkların da bu enzimin aktivitesini önemli ölçüde azalttığı ve hatta tamamen durdurabildiği belirtilmektedir. Ayrıca karbonik anhidraz inhibitörleri bir ilaç sınıfıdır. Bu ilaç sınıfı antiglokoma, diüretik, antiepileptik, dağ hastalığı kontrolü, gastrit, on iki parmak bağırsak ülseri, nörolojik hastalıklar ve osteoporoz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Ekinci *et al.* 2010). Bu yüzden insan karbonik anhidraz enzim inhibitörleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Sitozolik karbonik anhidraz izoenzimleri olan CA-I ve CA-II Sepharose 4B-L-tirozin afinite kolonuyla saflaştırılıp farklı bileşiklerin inhibisyon etkileri incelenip IC₅₀ değerleri belirlenmiştir (Gülçin *et al.* 2004; Çoban *et al.* 2008; Ekinci *et al.* 2010).

Çoban *et al.* (2008) de dünyada sedative-hipnotik ilaç olarak kullanılan etanolün insan karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerine etkisini *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırmışlardır. *In vivo* çalışmalarda farklı dozajlardaki etanolün rat eritrositlerindeki CA aktivitesini önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. *In vitro* çalışmalarda ise enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibisyon konsantrasyonları (IC₅₀) belirlenmiştir.

Özellikle anestesi özelliğiyle bilinen ayrıca sinir sistemi üzerinde çok farklı işlevler gösteren morfin için hem *in vivo* hemde *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar neticesinde morfinin insan sitozolik karbonik anhidraz izoenzimlerini inhibe ettiği sonucuna varılmıştır (Çoban *et al.* 2007).

Başaran *et al.* (2007) tarafından bazı dihidroksikumarin bileşikleri sentezlenmiş ve bu bileşiklerin Sepharose 4B-L-tirozin afinite kolonuyla saflaştırılan insan CA-I, CA-II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir.

Karbonik anhidrazın esteraz aktivite yöntemi kullanılarak insan sitozolik izoenzimleri üzerine salisilik asit türevlerinin inhibisyon etkisi incelenmiştir. Bu türevler ise sülfazalazine, diflunisal, 5-klorosalisilik asit, dinitrosalisilik asit, 4-aminosalisilik asit, 4-sülfosalisilik asit, 5-sülfosalisilik asit, salisilik asit, asetilsalisilik asit (aspirin) ve 3-metilsalisilik asittir. İnhibisyon mekanizmalarını belirlemek için Lineweaver-Burk grafikleri kullanılmış ve çoğunlukla yarışmasız inhibisyon tipi gözlenmiştir (Bayram *et al.* 2008).

Ekinci *et al.* (2007) ise cefriaxone sodyum, imipenem ve ornidazole ilaçlarının insan CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerine etkisini hem esteraz hemde hidrataz aktivitelerine bakarak belirlemiş, sonuç olarak *in vitro* şartlarda CA-I ve CA-II izoenzimlerini inhibe etkileri gözlemlenmiştir.

Bülbül *et al.* (2008)'de 5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-sülfanilamid pirazol karboksilik asitin amitlerini sentezlemiştir. Daha sonra afinite kromatografisiyle saflaştırılan insan CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisini incelemiş ve asetazolamitle karşılaştırmıştır. Sonuç olarak 5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-sülfanilamid pirazol karboksilik asitin güçlü inhibisyon etkileri olduğu kanısına varılmıştır.

Sitozolik insan karbonik anhidraz izoenzimlerinin üzerine bazı fenolik asitlerin inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Elajik asit, galik asit, ferulik asit, kafeik asit, kuersetin, p-kumarik asit, p-hidroksibenzoik asit ve sirinjik asitin K_i değer aralığı CA-I için 99-1061 μ M, CAII için 105-758 μ M olarak belirlenmiştir. Kuersetin (CA-I), p-kumarik asit (CA-II) ve galik asit (CA-II) yarışmalı inhibisyon, diğer fenolik asitler ise her iki izoenzimde yarışmasız inhibisyona sebep olmuştur (Sarıkaya *et al.* 2010). Ayrıca Şentürk *et al.* (2009) da yine fenol türevlerinin CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkilerini incelemiştir. İncelenen fenol türevleri ise; 2,6-dimetilfenol, 2,6-diizopropilfenol, 2,6-di-t-butilfenol, butillendirilmiş hidroksianizol, butillendirilmiş toluen, vanilya, di-(2,6-dimetilfenol), di-(2,6 diizopropilfenol) ve di-(2,6-di-t-butilfenol)'dır. İnsan CA-I ve CA-II için K_i değer aralıkları belirlenmiş ve bu inhibitörlerin tamamında yarışmasız inhibisyon gözlenmiştir.

Metaloenzim olan karbonik anhidrazın 12 memeli izoformlarının fenol serisiyle inhibisyonu araştırılmıştır. Bu CA'ların fenol serisiyle inhibisyonunun sülfanilamidlerden farklı olduğu bildirilmiştir. Fenolün 2-,3- ve 4- konumlarına hidroksi, siyan, flor, amino, karboksil ve asetoamit gruplarının bağlamasıyla oluşan seri, CA enzim aktiviteleri üzerine düşük konsantrasyonlarda bile inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir (İnnocenti *et al.* 2008).

2,4,6-trihidroksibenzoik asitin romatizmik ateşli on iki hastada farklı dozajlarda verilerek etkisi incelenmiştir (Hamilton *et al.* 1960).

Yukarıda belirtilen çalışmalara bakıldığında insanların maruz kaldığı birçok hastalığa etkisinden dolayı, fenolik bileşiklerin insan eritrositlerinde bulunan CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi oldukça fazla çalışılmıştır. Son yıllarda ise genellikle antioksidan özelliğe sahip olan fenolik bileşiklerin enzim kinetiği çalışmalarında belirgin bir artış gözlenmektedir.

Çalışmamızda; Sepharose 4B-4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid afinite kolonunun hazırlanması ve bu hazırlanan kolondan insan eritrosit CA-I ve CA-II izoenzimlerinin saflaştırılması; saflaştırılan izoenzimlerin aktiviteleri üzerine literatürde çalışılmamış olan fenolik asitlerden 2,3-dihidroksibenzoikasit, 2,5-dihidroksibenzoikasit, 2,4,6-trihidroksibenzoikasitin etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları, CNBr aktive Sepharose 4B Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, potasyum klorür, etanol, metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol E.Merck AG'den; akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brilliant blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), agar, 1-naftilamin, amonyum persülfat, β -merkaptotanol ise piyasadan temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Masa santrifüj	: MSE Mistral 2000
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: CHEBİOS s.r.l. (Optimum-one/UV-VIS)
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whırlı-mixer
Hassas terazi	: Gecavery (UK)
Otomatik pipet	: Eppendorf

Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Chiltern Hotplate Magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Clifton
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Automatic ice machines)
Liyofilizatör	: Sniijders
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Arçelik
Derin dondurucu (-20°C)	: Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85°C)	: Sanyo Ultra Low

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf ve deiyonize sudur. Ayrıca bazı çözeltilerde kullanılan su sterilize edilmiştir.

Enzimin hidrataz aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan çözeltiler

1. 0,025 M veronal tamponu; 0,025 mol sodyum barbitalin 900 ml suda çözülüp pH 8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı.
2. CO₂ çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0°C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.
3. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde indikatör olarak kullanılan çözelti): 0,1 g indikatörün 16 ml 0,01 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra hacminin saf suyla 250 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

Enzimin esteraz aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan çözeltiler

1. 0,05 M Tris-SO₄, pH 7,4 (Esteraz aktivitesi ve diyalizde 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.

2. *p*-nitrofenilasetat çözeltisi: 27,2 mg *p*-nitrofenilasetat alınarak 1 ml aseton içerisinde çözüldükten sonra 49 ml saf suya azar azar katılarak hazırlandı.

Afinite jelinin hazırlanması ve enzimin saflaştırılması sırasında kullanılan çözeltiler

1. 25 mM Tris-HCl/0,1M Na₂SO₄, pH 8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na₂SO₄, 950 ml destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH 8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

2. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄, pH 8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon) 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na₂SO₄, 950 ml destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH 8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

3. 25 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl çözeltisi pH:6,3 (kolona tutunmuş hCA-I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,2 g Na₂HPO₄ ve 14,625 g NaCl alınıp, pH 6,3'e titre edildikten sonra toplam hacim 250 ml'ye destile su ile tamamlandı.

4. 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄, pH 5,6 (kolona tutunmuş hCA-II enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,04 g NaCH₃COO.3H₂O ve 9,187 g NaClO₄ 120 ml destile su ile çözülerek, 1 N HCl ile pH 5,6'ya getirildikten sonra destile su ile hacim 150 ml'ye tamamlandı.

5. %0,02'lik NaN_3 çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti): 20 mg NaN_3 alınarak hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

6. 0,154 M NaCl (Hemolizatin yıkanması için kullanılan çözelti): 0,9 g NaCl alınıp hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Afinite jelinin kolon kapasitesinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M Tris- SO_4 (pH 9,0) çözeltisi: 1,21 g Tris 80 ml destile suda çözülerek 1 M H_2SO_4 ile pH 9'a getirildikten sonra destile su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

2. 0,05 M Tris- SO_4 (pH 7,4) çözeltisi (Jelin saklanması ve jel sentezi sırasındaki yıkamada kullanılan çözelti): 0,6055 g Tris 80 ml destile suda çözülerek 1 M H_2SO_4 ile pH 7,4'e getirildikten sonra destile su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

SDS-Poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler

1. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0,65 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8) 1 ml %10'luk SDS ve 1 ml %100'lük gliserin, 1 ml %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlanması ile hazırlandı ve bu tamponu kullanmadan hemen önce, 950 μl numune tamponundan 50 μl olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi.

2. SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 ml suda çözüldü, daha sonra bunun üzerine 5 ml %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

3. 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.
4. Yıkama çözeltisi (elektroforez jelinin yıkanması için kullanılan çözelti): %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
5. Sabitleştirme çözeltisi (elektroforez jelindeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
6. 1 M Tris-HCl pH 8,8: 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 tamamlandı.
7. 1 M Tris-HCl pH 6,8: 2,42 g Tris 5 ml suda çözülüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 20 ml'ye tamamlandı.
8. %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi: 6 g akrilamid, 0,16 g bisakrilamid alınıp 13,84 ml suda çözüldü.
9. %10'luk SDS çözeltisi: 0,5 g SDS alınıp 4,5 ml suda çözüldü.

Kantitatif protein tayininde kullanılan çözelti

1. 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 tamamlandı.

2. Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/ml; protein tayini için kullanılan çözelti): 25 mg standart serum albuminin 25 ml saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. 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, 280 nm’de absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki 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 çözeltielerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 ml’inde 1 mg protein ihtiva eden standart sıgır 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 yapılan numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

3.2.2. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini

3.2.2.a. CO₂-hidrataz aktivitesi tayini

Saflaştırma çizelgesinin oluşturulmasında hemolizat ve saf enzim çözeltilerinin karbonik anhidraz aktivite tayinleri bu yöntemle yapıldı. Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemidir. CO₂'nin hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır (Wilbur and Anderson 1948).

Bunun için kör olarak hazırlanan tüpe 1 ml 0,025 M veronal tamponu (pH 8,2), 0,1 ml %0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 ml saf su ve 2,5 ml CO₂ çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 ml oldu. Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH 6,3) için geçen süre belirlendi (t_0). Numune tüpüne ise sudan 0,05 ml azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH 6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi (t_c). Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EÜ) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Yani; $EÜ = (t_0 - t_c) / t_c$ formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplandı (Maren 1967).

3.2.2.b. 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 absorbsiyon vermektedir ($\epsilon_{348}=5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Verpoorte *et al.* 1967).

Tayin işlemlerinde şu prosedür uygulandı: Kuvartz küvetlere tamponlanmış enzim çözeltisi (0,05 M Tris-SO₄ pH 7,4 içinde) ve 1,5 ml substrat (+inhibitör) konulmasından 3 dakika sonra 25°C’da 348 nm’de absorbans değeri köre karşı okundu. Bu deneyde kullanılan p-nitrofenil asetat günlük hazırlandı. 27 mg p-nitrofenil asetat tartılarak 1 ml aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaş yavaş ilave edildi.

3.2.3. Afinite jellerinin hazırlanması

CNBr aktive Sepharose 4B matriksi 3 g tartıldı, önce 200 ml saf su ile daha sonra da 50 ml dengeleme tamponu ile yıkandı. Aynı tampon içerisine alınarak içerisinde 50 mg 4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid çözüldü. Burada sülfanilamid, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını (ligand) oluşturmaktadır. Sülfanilamid, karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı (Pocker and Sarkanen 1979). Jel sentezlendikten sonra 200 ml saf su ve 200 ml 0,05 M Tris-SO₄ (pH 7,4) tamponuyla yıkandı. Yıkandıktan sonra üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı.

3.2.4. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması

3.2.4.a. Kan temini ve hemolizat hazırlanması

İnsan kanı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezinden taze olarak temin edildi. Alınan taze kan santrifüj tüplerine doldurularak ve 15 dakika 2500 xg’de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıkla dikkatli bir şekilde alındı ve tüplerin altında kalan eritrosit peleti 0,154 M (izotonik) NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Her defasında 2500 xg’de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin 5 katı kadar buzlu saf su ile hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4°C’de 20.000 xg’de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere damlalıkla dikkatli bir şekilde alındıktan sonra çökelek (hücre zarları) kısmı atıldı ve böylece hemolizat elde edilmiş oldu (Hunaiti and Soud 2000).

3.2.4.b. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu içine alınarak jel süspanse edildi ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm’lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olup olmadığı eluat ile tamponun 280 nm’de absorbanlarının ve pH’larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

3.2.4.c. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Katı Tris ile pH’sı 8,7’ye ayarlanmış olan hemolizat kolona tatbik edildi ve kolon 400 ml 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH 8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece karbonik anhidraz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH 6,3) tamponu tatbik edilerek hCA-I enzimi; daha sonra 0,1

M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH 5,6) çözeltisi kolona tatbik edilip hCA-II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 35 ml/saat'e ayarlandı.

3.2.4.d. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflığı kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturunca 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 5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kurumaması önendi. Yığma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve 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 100 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 (Şekil 4.3-4.5).

Ayrırma jeli şöyle hazırlandı: 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, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$] eklendi.

Yığılma jeli şöyle hazırlandı: 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.

3.2.5. Afinite kolonunun CA tutma kapasitesinin bulunması

CA enziminin benzen sülfanilamidlere bağlanması ortamın pH, sıcaklık ve iyonik şiddetine bağlıdır (Pocker and Sarkanen 1979). Bundan dolayı hazırlanan jellerin kapasiteleri bulunurken bu faktörlerin etkileri incelendi. Kapasite tayin işlemi her bir jel için şu prosedüre göre gerçekleştirildi: Hazırlanan jelden 1 ml alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona alındı. Önceden saflaştırılan insan CA izoenzimleri ile ayrı ayrı doyuruldu. Enzimlerin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan CA enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi. Aynı zamanda jel kurutularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden hCA-I ve hCA-II izoenzimleri tutma kapasiteleri optimum şartlarda belirlendi (Çizelge 4.6).

3.2.5.a. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi

Bu deneyler hCA-I ve hCA-II izoenzimleri ile yapıldı ve tampon olarak pH 8,5 olan 0,1 M Tris-SO₄ çözeltisi kullanılarak 2°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C ve 25°C sıcaklıklarda belirlenen değerler grafiklerde gösterildi (Şekil 4.5).

3.2.5.b. pH'nın kolon kapasitesine etkisi

Bu bölümdeki deneyler pH'sı 7,0 ile 9,5 arasında değişen 0,1 M Tris-SO₄ tamponu kullanılarak yapıldı. Bu tamponun değişik pH'lardaki iyonik şiddeti farkı uygun miktarda Na₂SO₄ eklenerek giderildi (Şekil 4.6).

3.2.5.c. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için pH=8,5 de ve 25°C'de yapılan bu deneylerde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 arasında değiştirildi (Şekil 4.7).

3.2.6. İnhibitörler için IC₅₀ ve K_i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar

2,3-dihidroksibenzoik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit ve 2,4,6-trihidroksibenzoik asit için farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak %aktivite-[I] olarak grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı.

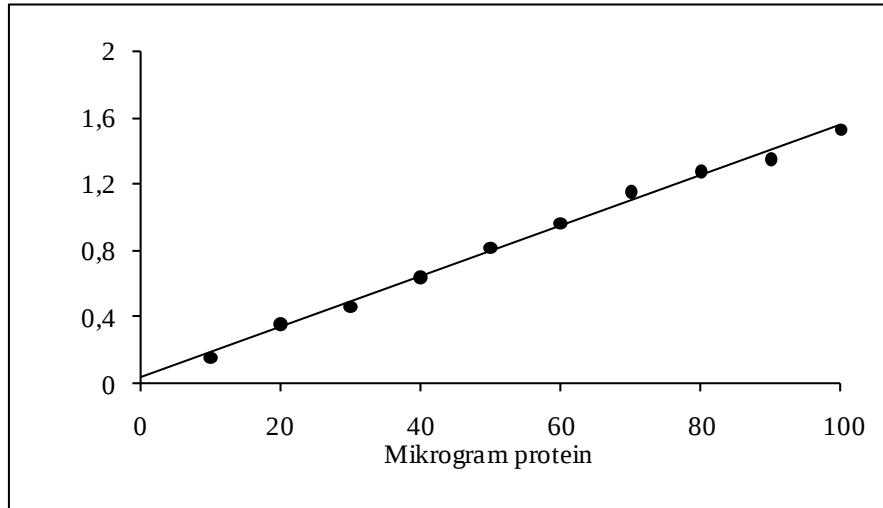
Bu inhibitörlerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla insan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu ile bu değer altıda ve üstünde iki sabit inhibitör konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun 5 farklı substrat konsantrasyonu, stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk

grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı $K_M^I = K_M(1 + [I]/K_i)$, yarışmasız inhibisyon için $V_{\max} = V_{\max}^I(1 + [I]/K_i)$ denklemleri kullanıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

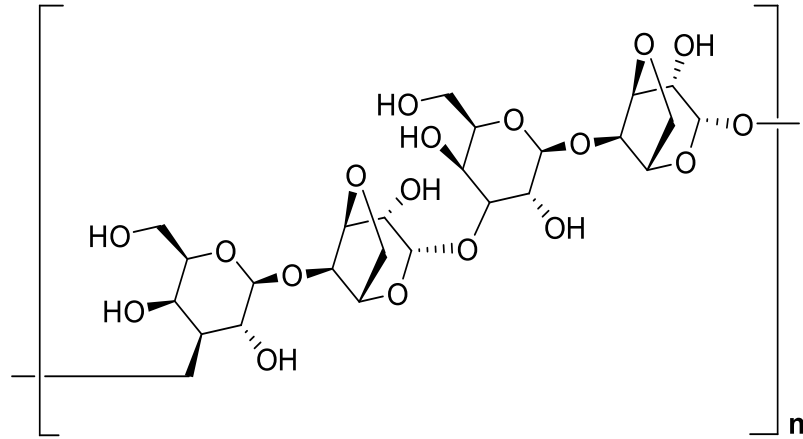
Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla önce standart grafik hazırlandı. Elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra bu standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik

4.2. Saflaştırma Sonuçları

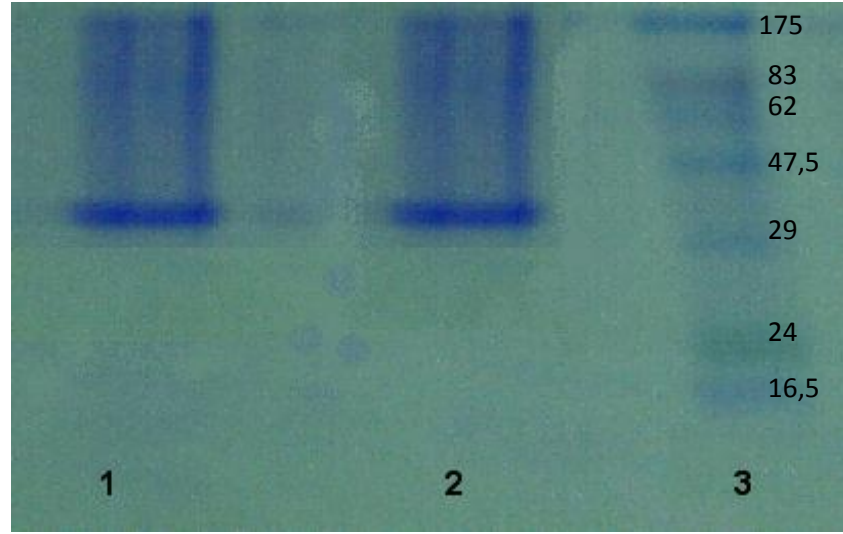
(Şekil 4.2)'de Sepharose 4B polimerinin genel kimyasal yapısı verilmektedir. Çizelge 4.1'de, insan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Sepharose 4B-4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamaklarının sonuçlarını vermektedir. (Şekil 4.3)'de ise afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırma sonucu yapılan SDS-PAGE sonucu verilmektedir.



Şekil 4.2. Sepharose-4B polimerlerinin genel kimyasal yapısı (www.sigmaaldrich.com).

Çizelge 4.1. İnsan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Sepharose 4B-4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

Numune türü	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	148	30	17,62	528,6	4440	8,4	100,0	1,0
hCA-I	389	6	0,44	2,64	2334	884,09	52,57	105,25
hCA-II	643	4	0,17	0,68	2572	3782,35	57,93	450,3



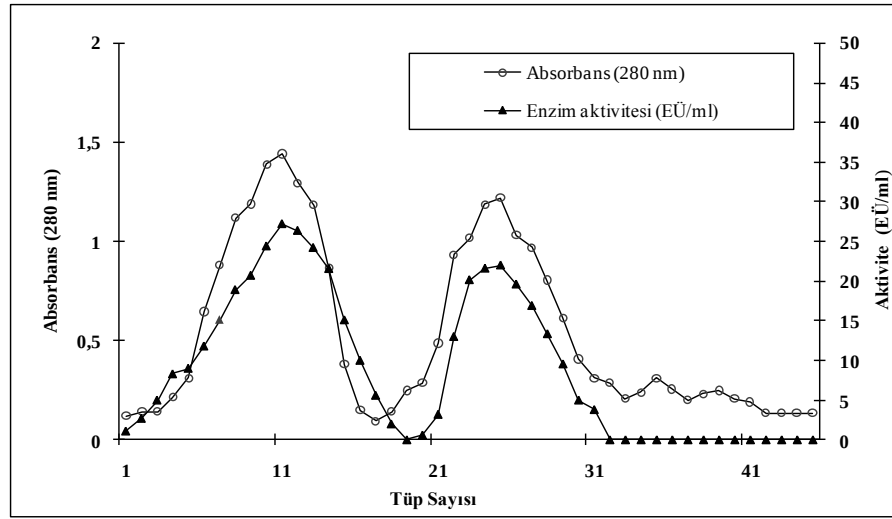
Şekil 4.3. Sepharose 4B-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırma sonucu SDS-PAGE fotoğrafı

***Kanal 1:** hCA-I, **Kanal 2;** hCA-II. **Kanal 3;** Standart proteinler; E.coli β -galaktozidaz 175 kDa, E.coli kırılmış β -galaktozidaz 83 kDa, E.coli CBD protein 62 kDa, tavşan kas aldolaz 47,5 kDa, Sığır karbonik anhidraz 29 kDa, soya tripsin inhibitörü 24 kDa, yumurta akı lizozimi 16,5 kDa

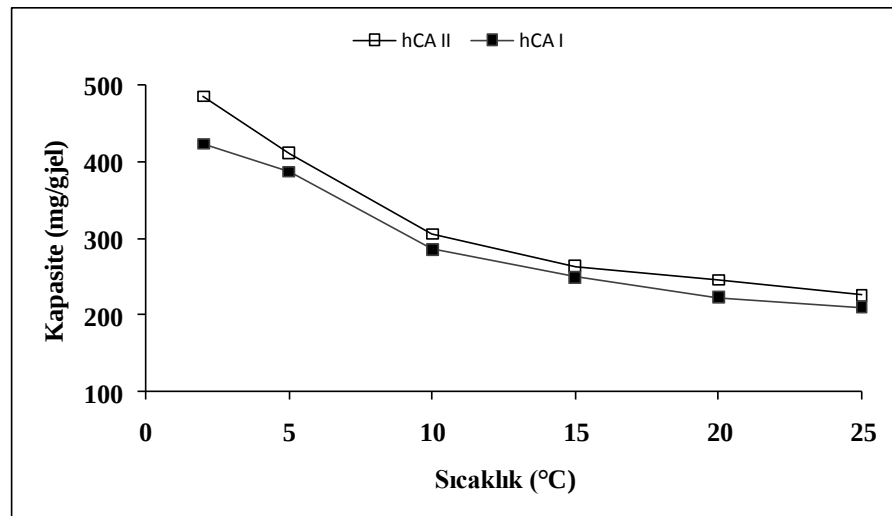
4.3. Afinite Kolonunun Farklı Sıcaklık, pH ve İyonik Şiddette CA Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi Çalışmaları Sonuçları

Sentezlenen her bir jel için ayrı ayrı hCA-I ve hCA-II'nin elüsyon grafikleri, sıcaklık-kapasite grafiği, pH-kapasite grafiği ve iyonik şiddet-kapasite grafiği (Şekil 4.4-Şekil 4.7)'de verilmiştir ve optimum değerler Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

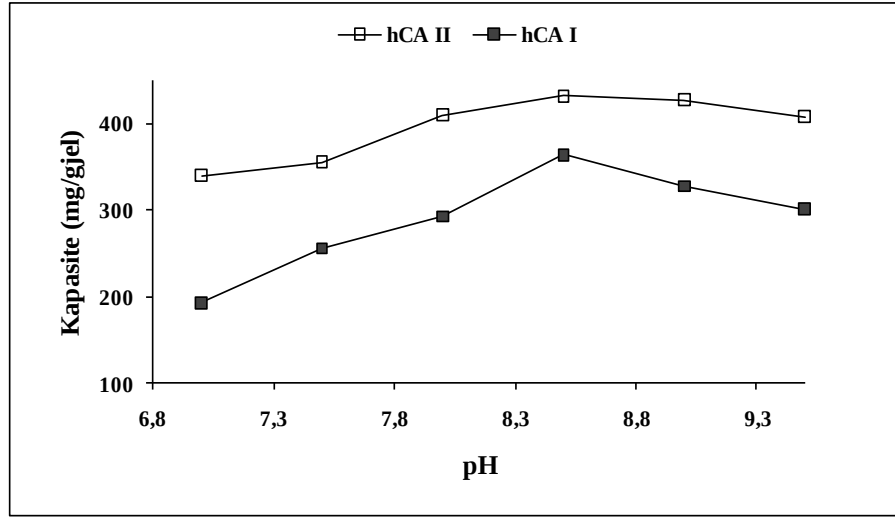
hCA-I ve hCA-II izoenzimleri tutma kapasiteleri, optimum pH, iyonik şiddet ve sıcaklıkta mg protein/ gram-jel cinsinden hesaplanarak Çizelge 4.3'de verilmiştir.



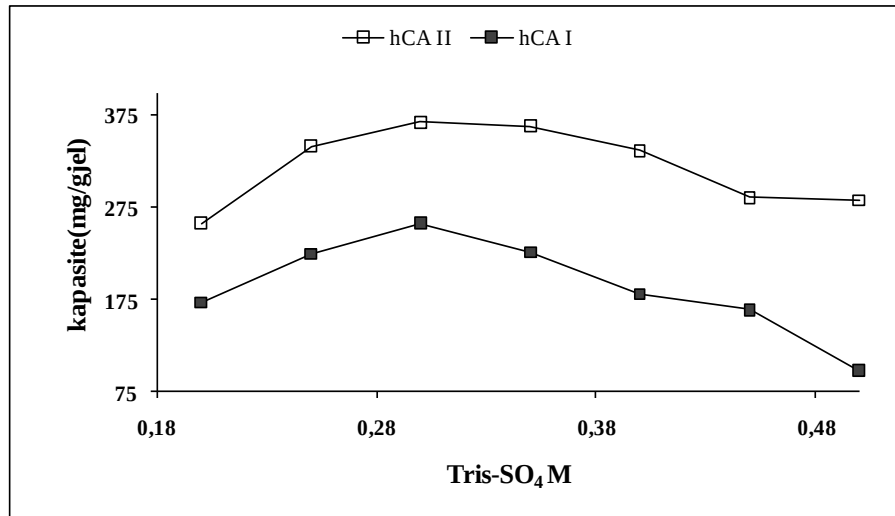
Şekil 4.4. Sepharose-4B-4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid jeli kullanılarak hCA-I ve hCA-II'nin elüsyon grafiği
 *(1.pik : hCA-I, 1 M Cl^- ve 25 mM H_2PO_4^- ile elüsyon; 2.pik : hCA-II, 0,5 M ClO_4^- ve 0,1 M CH_3COO^- ile elüsyon).



Şekil 4.5. Sepharose-4B-sülfanilamid sıcaklık-kapasite grafiği



Şekil 4.6. Sepharose-4B 4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid pH-kapasite grafiği



Şekil 4.7. Sepharose-4B-4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid iyonik şiddet-kapasite grafiği

Çizelge 4.2. Karbonik anhidrazın afinite jellerinin optimum pH, sıcaklık ve iyonik şiddet değerleri

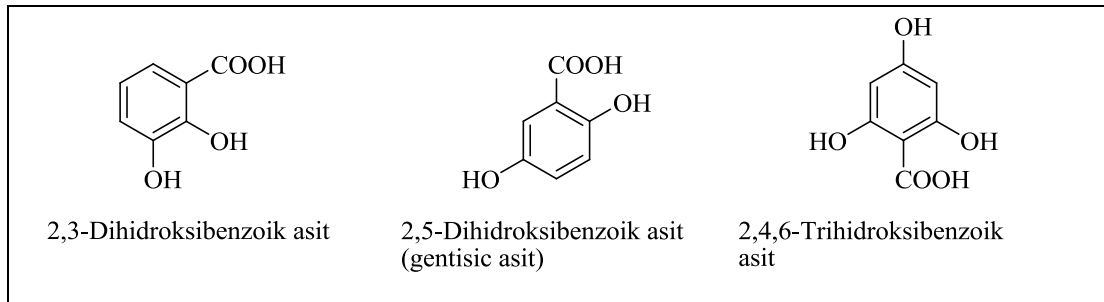
Afinite jeli	Optimum Sıcaklık		Optimum pH		Optimum İyonik Şiddet	
	hCA-I	hCA-II	hCA-I	hCA-II	hCA-I	hCA-II
Sepharose 4B-4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid	2°C	2°C	8,5	8,5	0,3M	0,3 M

Çizelge 4.3. Karbonik anhidrazın afinite kromatografisi jelinin optimum şartlarda CA-I ve CA-II izoenzimlerini tutma kapasiteleri

Matriks	Ligand	Uzantı Kolu	hCA-I Kapasitesi (mg/gjel)	hCA-II Kapasitesi (mg/gjel)
Sepharose 4B	4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid	-	424	486

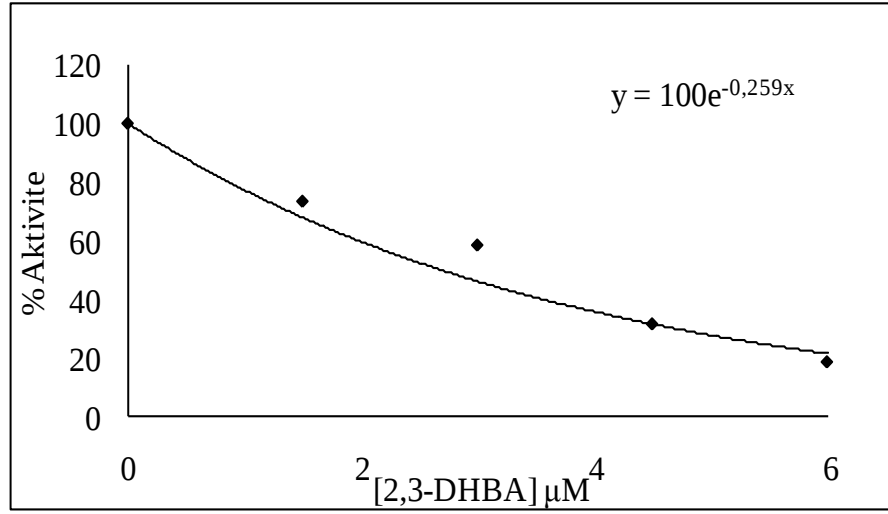
4.4. İnhibitörler İçin IC₅₀ ve K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

İnsan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzim aktivitesi üzerine 2,3-dihidroksibenzoik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit ve 2,4,6-trihidroksibenzoik asitin inhibisyon etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak insan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz I ve II izoenzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırıldı. Konsantrasyona karşı % aktivite (%Aktivite-[I]) olarak oluşturulan grafikler (Şekil 4.9-4.14)'de gösterildi. Eğrilerin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı.

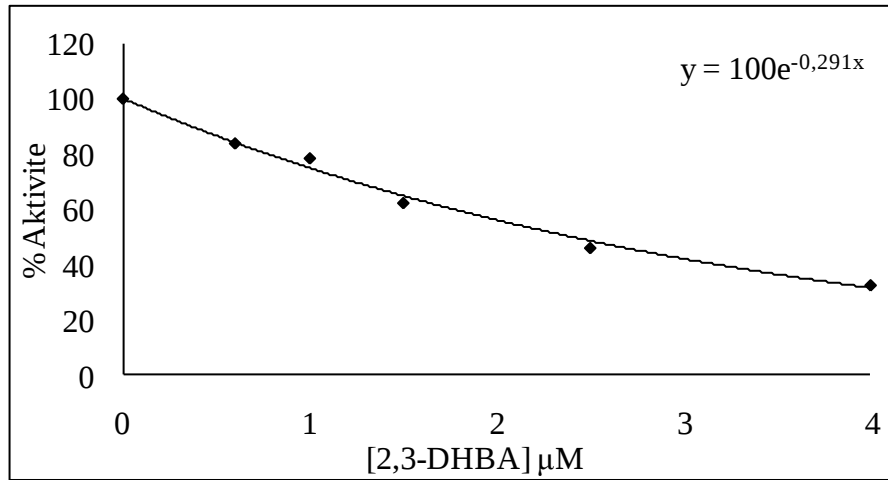


Şekil 4.8. Fenolik asit türevleri

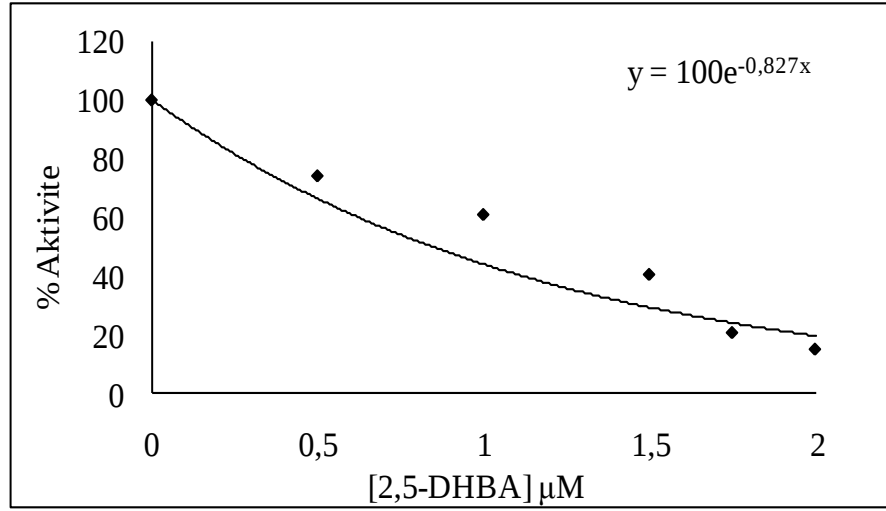
Bu inhibitörlerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla, üç sabit inhibitör konsantrasyonunda uygun 5 farklı substrat konsantrasyonu için elde edilen aktivite değerleri ile her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri (Şekil 4.15-4.20) çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı $K_M^I = K_M(1 + [I]/K_i)$, yarışmasız inhibisyon için $V_{max} = V_{max}^I(1 + [I]/K_i)$ denklemleri kullanıldı.



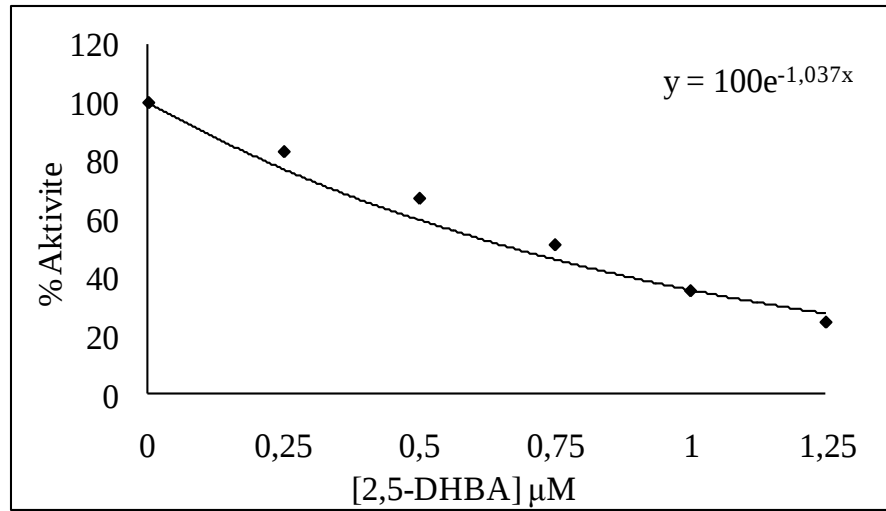
Şekil 4.9. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,3-dihidroksibenzoik asitin etkisi



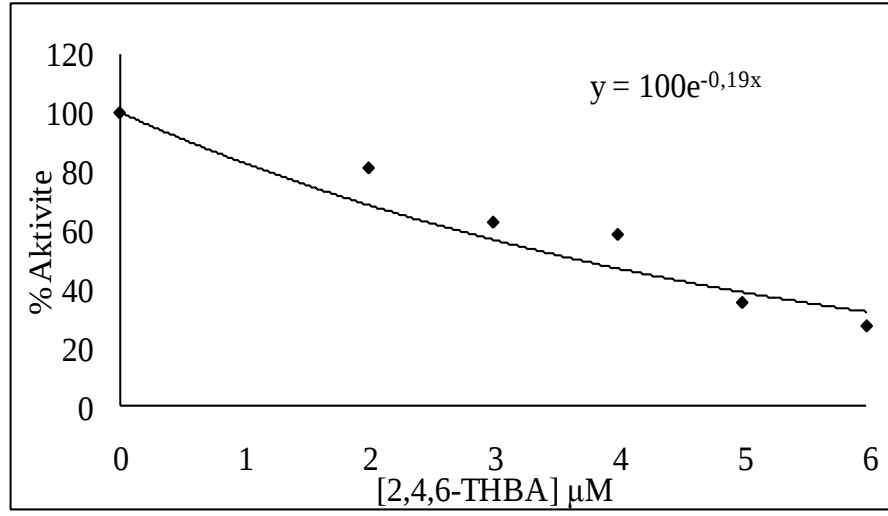
Şekil 4.10. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,3-dihidroksibenzoik asitin etkisi



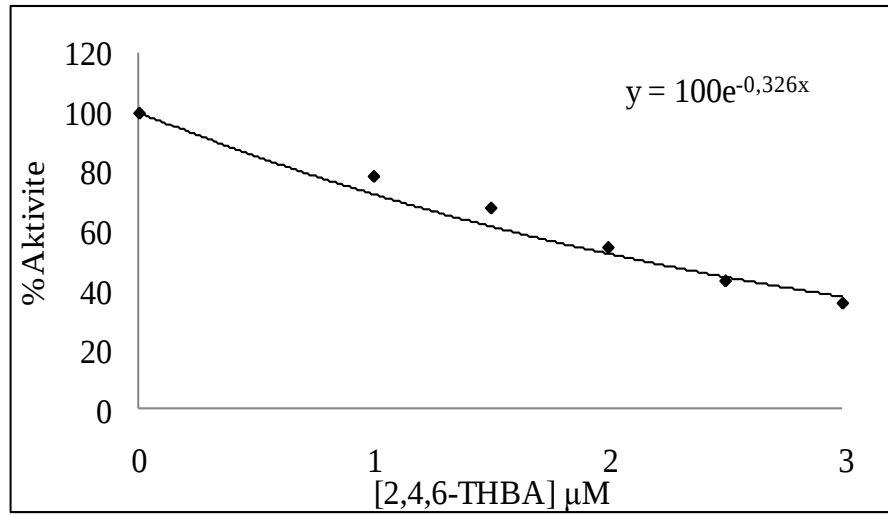
Şekil 4.11. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,5-dihidroksibenzoik asitin etkisi



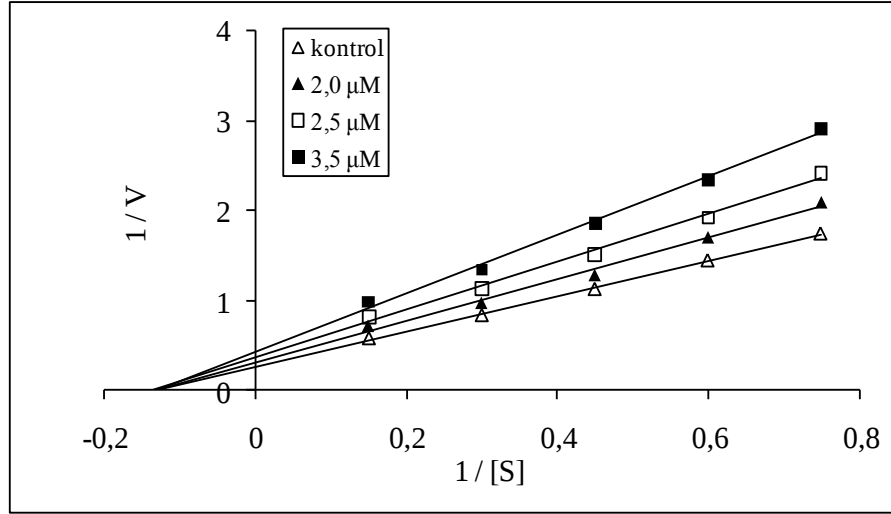
Şekil 4.12. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,5-dihidroksibenzoik asitin etkisi



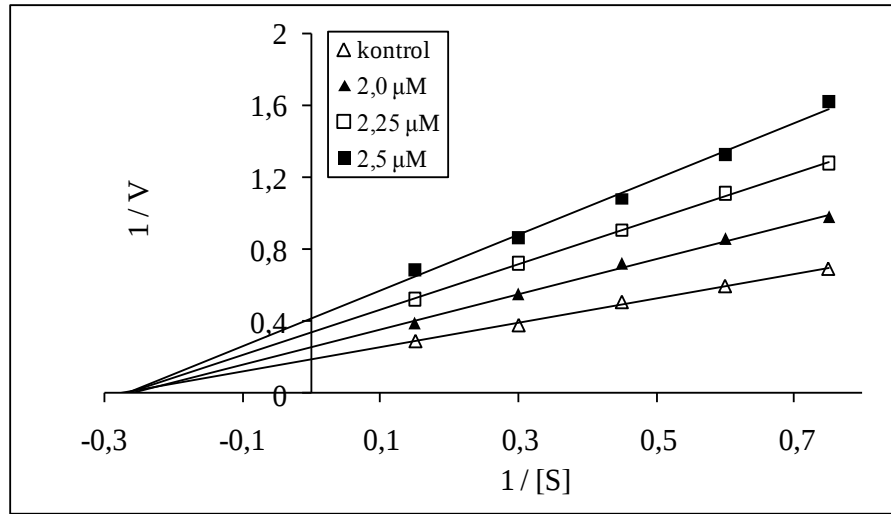
Şekil 4.13. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,4,6-trihidroksibenzoik asitin etkisi



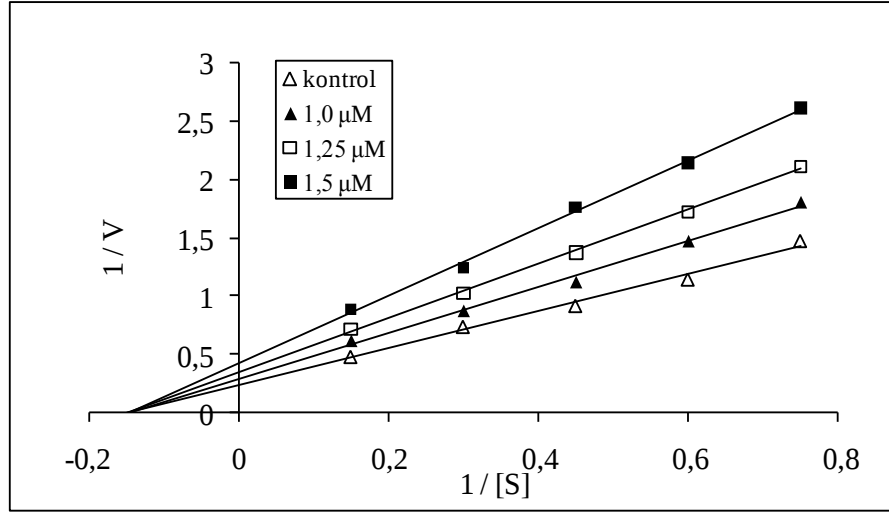
Şekil 4.14. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,4,6-trihidroksibenzoik asitin etkisi



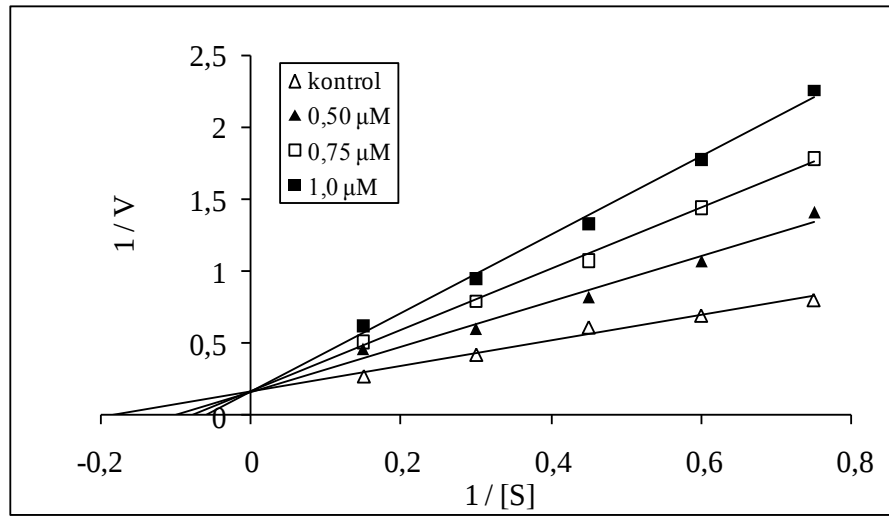
Şekil 4.15. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,3-dihidroksibenzoik asit etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



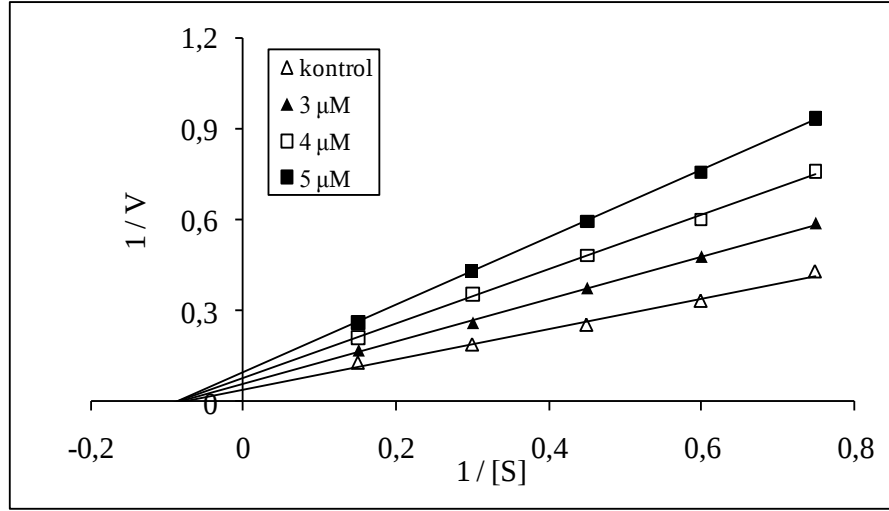
Şekil 4.16. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,3-dihidroksibenzoik asit etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



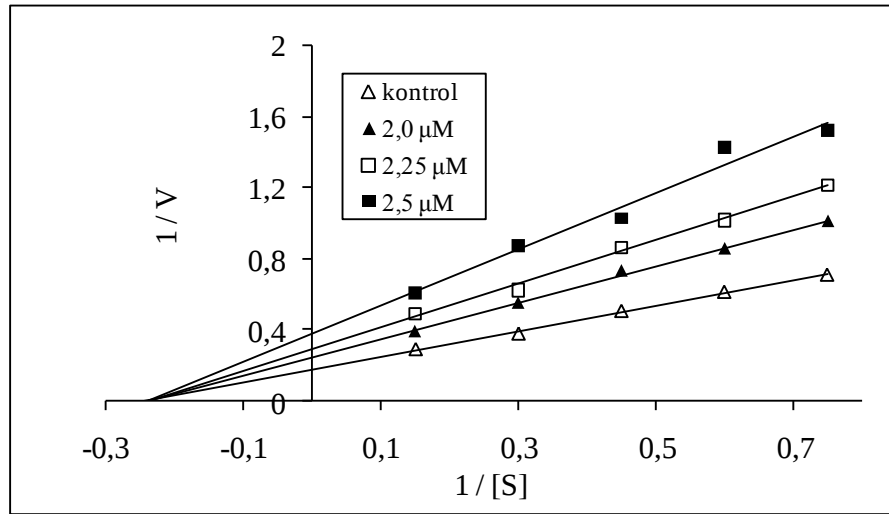
Şekil 4.17. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,5-dihidroksibenzoik asit etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.18. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,5-dihidroksibenzoik asit etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.19. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,4,6-dihidroksibenzoik asit etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.20. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,4,6-dihidroksibenzoik asit etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidroliyz, E.C.4.2.1.1) canlı organizmalarda pH düzenleyici, iyon transportu, su ve elektrolit dengesi gibi önemli fonksiyonları olan ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu bulunduran yaygın bir metaloenzim ailesidir. Bu enzim fizyolojik şartlarda karbondioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizlemektedir (Maren 1967; Tashian 1992; Sly and Hu 1995; Smith and Ferry 2000). CA, hemen hemen bütün hayvan dokularında, bakterilerde ve fotosentetik hücrelerde fonksiyon gören önemli bir enzimdir (Beydemir *et al.* 2004; Demir *et al.* 1999; Krungkrai 2001).

Metabolik olarak aktif dokuların kapillerinde hem CO_2 hem H^+ 'in konsantrasyonları, CO_2 'in ekspirasyon havasıyla dışarı verildiğinde akciğer alveol kapillerinde gözlenenden daha fazladır. Dokularda CO_2 karbonik anhidraz tarafından karbonik aside çevrilir.



Karbonik asitte bir proton kaybederek bikarbonat (kanın ana tamponu) haline gelir.



Bu iki reaksiyon sonucunda meydana gelen proton pH'ın düşmesine neden olur. Bu pH gradient farklılığı, periferik dokularda oksijenin salıverilmesine ve akciğerlerde oksijenin bağlanmasını sağlar. Böylece hemoglobin molekülünün oksijene ilgisi akciğer ve oksijen kullanan dokular arasındaki küçük pH kaymalarına cevap vererek hemoglobinin daha da etkili bir şekilde oksijen taşıyıcısı olmasını sağlar (Lippincott 2007).

Birçok dokuda bulunduğu belirtilen CA enziminin insanları da içine alan yüksek yapılı omurgalıların, çok farklı doku ve hücrelerine yerleşmiş 16 farklı izoenzimi tespit edilmiştir. Bu izoenzimlerin, katalitik etkinlik ve inhibitör bağlama özelliklerinde bazı önemli farklar bulunmaktadır. İzoenzimlerden CA-I, II, III, VII ve XIII olmak üzere beş tanesi sitozoliktir. CA-IV, IX, XII ve XIV ise membrana bağlıdır. CA-VA ve VB mitokondriyal, CA-VI tükürükte salgılanır ve üç tanesi nonkatalitiktir (VIII, X, XI) (Ekinci *et al.* 2011).

hCA-I, insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir izoenzimdir ve insan kanından saflaştırıldığında, miktarı 12 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır. Eritrositlerde hCA-I izoenzimi yanında hCA-II izoenzimi de bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonları ise, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan CO_2 'i, HCO_3^- 'a, akciğer pulmoner kapilerde ise HCO_3^- 'ın CO_2 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almalarıdır. hCA-I izoenziminin turnover sayısı $2,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Bu izoenzimin fizyolojik fonksiyonu hCA-II kadar açık değildir. hCA-I eksikliği sendromu belirlenmiş fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır (Ren and Lindskog 1992; Sly and Hu 1995; Supuran and Scozzafava 2001).

hCA-II kemikte osteoklastlarda, beyinde oligodendrositler ve beyin epitelyumunda, gözde lensler ve retina müller hücrelerinde, karaciğerde, böbrekte, salgı bezlerindeki asiner hücrelerde, pankreatik kanal hücrelerinde, gastrik parietal hücrelerde, uterusun endometriumunda, endotel hücrelerde, spermatozoada, eritrositlerde, trombositlerde bulunmaktadır. Bu hücre tiplerinde CA-II'nin fiziksel rolü dönüşümlüdür. Bazı hücrelerde CA-II asit-baz homeostazı için temel rol oynamaktadır. Üriner asidifikasyon üretimi için H^+ salgılayan renal tubüler, gastrik parietal hücreler tarafından H^+ salgısına katkıda bulunmaktadır (Sly and Hu 1995). Ayrıca CA-II pankreas sıvısı için HCO_3^- katkısı yapan pankreatik kanal hücrelerine HCO_3^- temin eder, aköz hümanın salgılanmasında ise uyarıcı etki oluşturmaktadır (Maren *et al.* 1983). CA-II aynı zamanda böbrekte, eritrositlerde ve karaciğerde proksimal tubüllerde CO_2 değişimine

katkıda bulunmaktadır (Epstein and Grant 1977). Memeli karbonik anhidraz II izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

hCA-II’nin diğer izoenzimlere göre katalitik aktivitesi oldukça yüksektir ayrıca bu izoenzime insan doku ve organlarında yaygın olarak rastlanmaktadır (Hilvo 2005; Leppilampi 2006). hCA-I, eritrositlerde, iki kolon epitelinde, göz lensi ve korneal epitelyumda bulunur. Hücre içinde sitozolde yer alan hCA-I çözünabilir karakterdedir ve eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan proteindir. hCA-I eritrositlerde hCA-II’ye göre beş kat daha fazla bulunmasına rağmen katalitik aktivitesi hCA-II ’nin sadece %15’i kadardır (Lowe *et al.* 1991; Sowden *et al.*1992). Bu nedenle çalışmamızda eritrositlerde oldukça fazla bulunan hCA-I ile katalitik aktivitesi oldukça yüksek olan hCA-II saflaştırılmıştır.

Araştırmamız boyunca, orijinal afinite jeli için denenen tüm koşulların kolon elüatları eşit hacimde alınıp bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metot, proteinlerin ihtiva ettikleri tirozin ile triptofan moleküllerinin 280 nm dalga boyundaki spesifik bir absorpsiyon göstermeleri prensibine dayanmaktadır (Warburg and Christian 1941). Dolayısıyla her bir proteinin, tirozin ve triptofan içeriklerinin farklı olması, onların spesifik bir absorpsiyon katsayısına sahip olmalarını gerekli kılar, dolayısıyla bir protein zincirindeki tirozin ve triptofan amino asitlerinin sayısı biliniyorsa, o proteinin 280 nm dalga boyundaki absorpsiyonundan, protein miktarı da bulunabilir. Metodun oldukça pratik oluşu ve numunenin tekrar geri kazanımına olanak sağlaması dolayısıyla kolon elüatlarının protein tayini için denemelerimizde bu metot kullanılmıştır.

Kantitatif olarak, protein miktarlarının belirlenmesi için, Folin-Lowry, Biüret, BCA, Bradford ve Kjeldal gibi yöntemler kullanılmaktadır (John *et al.* 1987). Bu yöntemler arasında Kjeldal yöntemi fazla miktarda numune kullanımı gerektirdiği için araştırmacılar tarafından çok fazla tercih edilmesede protein içeriğinde azot miktarını belirleme esasına dayanır. Kantitatif protein tayini için kullanılan diğer bir yöntem Biüret yöntemidir. Bu yöntemde proteinlerin bazik ortamda Cu^{+2} iyonu ile mor-mavi kompleks oluşturmaları prensibine dayanmaktadır. Oluşan kompleks reaksiyonu, iki

peptid zincirindeki dört azot atomunun ortaklaşmamış elektronları ile Cu^{+2} iyonu arasında gerçekleşmektedir. Reaksiyon esnasında oluşan renk şiddetinden, protein miktarı belirlenebilir. Ayrıca nükleik asitlerin varlığı da bu ölçümü etkilemez. Ancak bu metot sonucunda, protein başka bir moleküle dönüşmemektedir, dolayısıyla protein molekülünün yeniden kazanılmasının mümkün olmayışı metodun bir dezavantajıdır.

Söz konusu çalışmamızda, kantitatif protein tayini için, Bradford yöntemi kullanılmıştır. Protein miktarının belirlenmesinde bu yöntemin seçilmesinin sebebi, çalışma grubumuzda rutin olarak yapılan ve uygulanabilirliğinin daha kolay oluşundan kaynaklanmaktadır. Bu metodun esası, proteinlerin fosforik asitli ortamda, Coomassie brilliant blue G-250 boyası ile kompleks yapma prensibine dayanmaktadır. Kullanılan boya, negatif yüklüdür ve pozitif yüklü proteinleri bağlayarak boya kırmızı renkli formdan ($A_{\text{max}}=465 \text{ nm}$), mavi renkli forma ($A_{\text{max}}=595 \text{ nm}$) dönüşür. Çözelti içerisindeki boya, daha çok kırmızı renge hakimdir, fakat boyanın negatif uçları proteinin pozitif gruplarına bağlandıkça bu renk maviye döner ve reaksiyon hızlı bir şekilde gerçekleşir. Reaksiyon boyunca, söz konusu olan renk 1 saat kadar kararlı haldedir ve oluşan renk şiddeti ise pH'ya bağlı olarak değişmektedir.

Kullanılan bu metodun diğer metotlara üstün tarafı ise, az reaktif gerektirmesi ve her çalışmada ayrı bir standart hazırlamaya ihtiyaç duyulmamasıdır. Ancak bu yöntemde, standart eğriyi elde etmek biraz zordur, bunun da sebebi geniş bir konsantrasyon aralığında lineer olmasından kaynaklanmaktadır (Bradford 1976). Ancak Folin Lowry metodu da literatürde araştırmacılar tarafından UV ve Biüret metodlarına göre daha hassas olması ve deterjanlardan etkilenmemesi açısından tercih edilmektedir. Ancak triptofan, tirozin, sistein, hidrojen peroksit gibi birçok bileşik için problem teşkil etmektedir.

Bilindiği gibi enzimleri saflaştırmak oldukça zor bir işlemdir. Karbonik anhidraz izoenzimlerin izolasyonunda birçok farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlar arasında Sephadex G-75 ile jel-filtrasyon kromatografisi, CM-selüloz katyon değişimi kromatografisi, DEAE Sephadex A-50 anyon değişimi kromatografisi, DEAE-selüloz

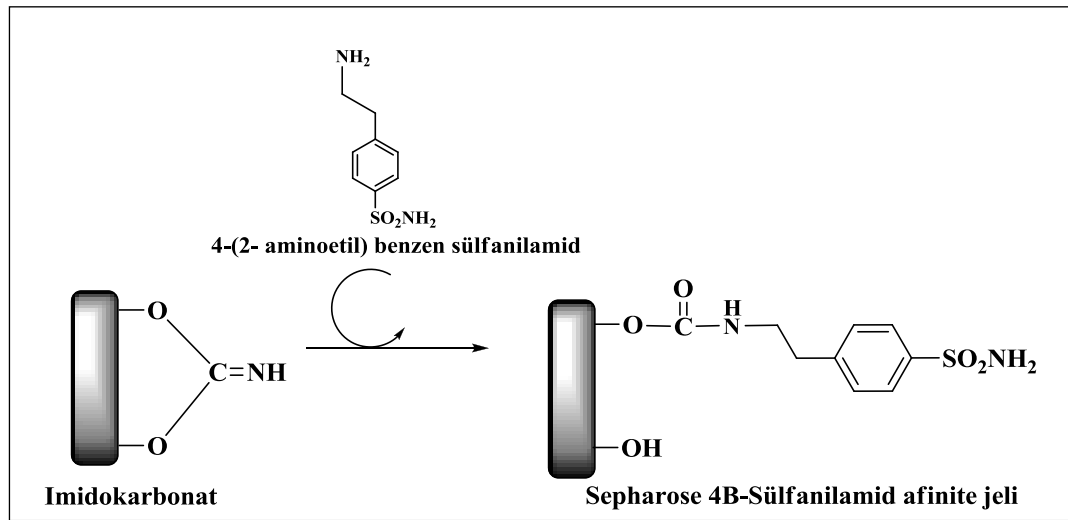
kromatografisi, DEAE-hidroksilapatit kromatografisi sayılabilir. Bu yöntemler tek başlarına değil genellikle birkaç tanesi ardışık olarak uygulanmıştır. Uygulandığı çalışmalarda ise istenmeyen proteinlerden kurtulmak için birinci basamakta etanol-kloroform çöktürmesi sıklıkla uygulanmaktadır (Vince and Reithmeier 2000).

Proteinlerin ayrılması için kullanılan yöntemlerden biri spesifik ligand esasına dayanan afinite kromatografisidir. Bazı proteinler afinite kromatografisiyle çok kere bir basamakta çok kompleks karışımlardan izole edilebilirler. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı jeller kullanılabilir. Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Küçük ligandları (enzim inhibitörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar (Keha ve Küfrevioğlu 2008). Bu yöntemle tek basamakta yüzlerce kat saflaştırma yapılabilir (Arslan 2003).

Literatürde, iyi akış özelliğinden dolayı Sepharose-4B, matriks olarak çok fazla tercih edilmektedir (Falkbring *et al.* 1972; Arslan *et al.* 1996). Sepharose-4B'nin aktifleştirilmesinde değişik metodlar kullanılmaktadır. Dekstran ve agaroz yapısında bulunan, Sephadex, Sepharose veya Biogel gibi matrikslerin aktifleştirilmesi, siyanojen bromür, karbodiimid ve epoksi bileşikler kullanılarak yapılmıştır. Bu matrikslerin içerdikleri –OH grupları siyanojen bromür (CNBr) ile aktifleştirilmekte ve bunlar primer amino grubuna sahip olan bileşiklerle reaksiyona girerek, bir ester bağı oluşturmaktadırlar (Keha 1981)

Çalışmamızda karbonik anhidraz CA-I ve CA-II izoenzimlerinin insan eritrositlerinden saflaştırılması için yeni bir afinite jeli sentezlendi. Sentezlenen afinite jelinde matriks

olarak aktifleştirilmiş Sepharose 4B, ligand olarak 4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid kullanıldı. 4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörüdür. Afinite jelinin yapısına girerek CA enziminin yüksek oranda saflaştırılmasına olanak sağladı. Afinite kromatografisi çalışmalarında literatürde değişik uzantı kolları farklı reaksiyonlarla matrikse bağlanmıştır (Keha 1981; Wistrand 1981; Cho *et al.* 2005). Bizim çalışmamızda ise herhangi bir uzantı kolu takılmadı. Bu da çalışmalarımız sırasında bize oldukça fazla kolaylık sağladı. Hazırladığımız afinite jeli (Şekil 5.1)'de şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 5.1. Sepharose 4B-4,2 aminoetilbenzen sülfanilamid afinite jeli

hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin saflaştırılmasında ligand olarak en çok sülfanilamid türevleri kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin hCA-I ve hCA-II ye karşı belirli ölçüde ilgisinin olması ve reaksiyon kabiliyetinin düşük olması büyük bir dezavantajdır. Bu nedenle sülfonamidi aktifleştirmek için genel olarak diazolama işlemi yapılmaktadır (Arslan 1994). Ancak bu işlem matriksi olumsuz yönde etkileyeceği gibi ligandın kendi arasında dimerleşmesine de neden olmaktadır. Bizde bu dezavantajları elimine etmek için çalışmamızda diazolama işlemine yer vermeyerek direkt olarak sülfanilamid ile enzimin etkileşmesini sağladık.

Şahin (2008)'de bizim çalışmamıza benzer bir çalışma yapmıştır. Ligand olarak CA inhibitörü olan 4-izosiyonatbenzensülfonamit, matriks olarak kullanılan Eupergit C-250 L'ye etilendiamin uzantı koluyla bağlanarak yeni bir afinite jeli sentezlemiştir. Bu reaksiyonda, matriks ile ligand arasındaki reaksiyon mekanizması için gerekli olan ve sterik etkileşmenin kontrolü amacıyla etilendiamin kullanılmıştır. Eupergit C-250 L' nin taşıdığı reaktif oksiran grupları, ligandın matrikse bağlanması için uyumlu şartları sağladığı belirtilmektedir. Eupergit C-250 L-etilendiamin-4-izosiyonatbenzensülfonamit kimyasal yapısına sahip afinite jelinin kullanımıyla BCA 181 kat saflaştırılırken, hCA (I-II) % 9,49 kolon verimi ile 184 kat saflaştırdığı belirtilmiştir. Sepharose 4B 4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid afinite jeli ile hCA-I %52,57 verimle 105,2 kat, hCA-II %57,93 verimle 450,3 kat saflaştırıldı. Hazırlamış olduğumuz afinite jeli ile hCA-I ve hCA-II izoenzimleri daha yüksek bir verimle, daha kısa sürede ve yüksek saflaştırma katsayısı ile elde edilmiştir.

Şentürk (2009)'da Sepharose-2B, 4B, 6B, polimer materyalleri üzerine anilin uzantı kolu aracılığı ile sülfanilamid ligandı bağlanmıştır. Hazırlanan Sepharose-4B-anilin-sülfanilamid afinite jeli ile hCA-I 106,3 kat, %54,4 verimle hCA-II ise 808,0 kat, %64,6 verimle saflaştırılmıştır. Çalışmamızda ise Sepharose 4B 4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid afinite jeli ile hCA-I %52,57 verimle 105,2 kat, hCA-II %57,93 verimle 450,3 kat saflaştırıldı. Hazırlamış olduğumuz afinite jeli ile hCA-I ve hCA-II izoenzimleri daha kısa sürede uzantı kolu kullanmadan Şentürk'ün sonuçlarına paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Özensoy (2004) tarafından yapılan çalışmada, Eupergit C-250 L polimer materyalinin aktif oksiran gruplarına karbonik anhidrazın güçlü inhibitörü olan p-aminobenzen-sülfonamid bağlanarak yeni bir afinite jeli sentezlenmiştir. Yapılan çalışmada bir uzantı koluna ihtiyaç duyulmamıştır. Bunun sebebi ise matriksin içerdiği oksiran gruplarının bir uzantı kolu görevi üstleneceği düşüncesidir. Özensoy ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi araştırmamızda da herhangi bir uzantı koluna gerek duyulmamıştır. Çünkü liganntaki 2-aminoetil gruplarının varlığı ile oldukça uygun bir mesafe sağlanmaktadır.

Whitney (1974) Sepharose-4B matriksi üzerine, CNBr aktifleştirilmesi sonucu p-aminometilbenzen-sülfonamid ligandını kullanarak afinite jeli hazırlanmıştır. Bizde CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksine benzen sülfanilamid türevi olan 4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamidi bağlayarak afinite jelimizi sentezledik.

Sepharose 4B 4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid afinite jeli yapısına sahip afinite jeli ile izole edilen enzimlerin saflık kontrolü, SDS-PAGE ile gerçekleştirildi. Yaklaşık molekül kütleleri 30 kDa olarak tespit edildi. Bu değerler literatürle uyum içindedir.

Yukarıdaki bilgilerin ışığı altında, hazırlanan afinite jelinin enzimi bağlayabilmesinde, enzim çeşidinin, pH'nın, ortamın iyonik şiddetinin ve sıcaklığın etkili olabileceği görülmektedir. Çalışmamızda, söz konusu 4 faktör değişken olarak alınmıştır ve bunlara bağlı olarak da kapasite tayinleri yapılmıştır.

Hazırlanan afinite jelinin farklı pH'larda enzim tutma kapasitesini belirlemek için, her bir izoenzim için 6 farklı pH'da (pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5) denemeler yapılmıştır. Her iki izoenzim (hCA-I ve hCA-II) için maksimum bağlanmanın pH 8,5'de gerçekleştiği tespit edilmiştir. pH 7,0'da bağlanmanın son derece düşük olduğu (Şekil 4.6)'da görülmektedir. Bu durum, sülfonamidlerdeki $-SO_2NH_2$ grubunun anyonik bir formda enzimi kolonda tutması ile açıklanabilir.

Kolonun kapasitesine etki eden bir diğer önemli parametre de sıcaklıktır. Bu amaçla her bir izoenzim için, 6 farklı sıcaklıkta (2, 5, 10, 15, 20, 25) kromatografik işlemler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, (Şekil 4.5)'de grafik edilmiştir. Her iki izoenzimde de, sıcaklık yükseldikçe kolona bağlanma derecelerinde paralel bir azalma görülmektedir. Bu durumun sebebi, birinci derecede enzimin artan sıcaklıkla konformasyonunda meydana gelen değişimleri ve daha sonra da bağlanmayı gerçekleştiren grupların iyonlaşmalarının sıcaklıktan etkilenmesi olarak gösterilebilir. Bu durumun, yüksek sıcaklıklarda enzimlerin kolona bağlanma derecesinin düşmesine neden olduğu söylenebilir. Benzer sonuçlar, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması

için hazırlanan afinite jellerinde de görülmektedir (Falkbring *et al.* 1972; Whitney 1974; Osborne 1975; Johansen 1976; Keha 1981; Wistrand 1981; Arslan *et al.* 1996; Cho *et al.* 2005).

Afinite jelinin enzim tutma kapasitelerinin iyonik şiddetle değişimi (Şekil 4.7)'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, iyonik şiddetteki artış, enzimin kolona adsorpsiyonunu bir dereceye kadar artırdığını göstermektedir. Bu durum, iyonik şiddetteki yükselmenin sülfonamid ile enzim arasındaki hidrofobik etkileşmeyi arttırmasıyla açıklanabilir. Ancak iyonik şiddetteki daha fazla artışın kolon verimini düşürdüğü (Şekil 4.7)'de görülmektedir. Çünkü, ortamda iyon konsantrasyonu arttıkça, bağlanmada rol alan, iyon halindeki gruplar, zıt yüklü gruplar tarafından sarılmakta ve adsorpsiyon engellenmektedir. Her iki izoenzim de, 0,3 M iyonik şiddette kolona maksimum derecede bağlanmaktadır. Çünkü bu değer üzerindeki iyon konsantrasyonları bağlanmayı azaltmaktadır. Şahin (2008) yapmış olduğu afinite kromatografisi çalışmalarında optimum çalışmaları bizimle benzer sonuçlar göstermiştir.

Birçok kimyasal madde, canlı metabolizmasında düşük dozajlarda bile enzim aktivitesini etkileyerek inhibisyona yol açarlar. Günümüze dek laboratuvarlarda birçok farklı enzimin ilaçlarla etkileşimi ile ilgili 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 (Beydemir *et al.* 2002; Çiftçi *et al.* 2002; Ekinçi *et al.* 2007).

Fenolik bileşikler hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar, çalışmamızda kullanılan 2,5-dihidroksibenzoik, 2,3-dihidroksibenzoik ve 2,4,6-trihidroksibenzoik asitler ise hidroksibenzoik asit sınıfında yer almaktadırlar. Hidroksibenzoik asitler yaygın bir şekilde gıda katkı maddesi olarak görev yapan antioksidanlardır. Antikanser, antitumör, antibakteriyel, antiviral ve antiinflamator aktivitelerine sahiptirler. Bu nedenle son yıllarda fenolik bileşikler ile ilgili çalışmalar

hız kazanmaktadır. Bizde bu yüzden çalışmamızda bazı fenolik asitlerin CA izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine etkilerini inceledik. Çizelge 5.1’de hCA-I ve hCA-II için elde edilen IC_{50} değerleri verilmiştir. Lineweaver-Burk grafikleri sonucu her iki izoenzim içinde elde edilen K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri Çizelge 5.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. 2,3-dihidroksibenzoik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit ve 2,4,6-trihidroksibenzoik asitin insan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için bulunan IC_{50} değerleri

İnhibitör	hCA-I IC_{50} değeri	hCA-II IC_{50} değeri
2,3-dihidroksibenzoik asit	2,676 μ M	2,381 μ M
2,5-dihidroksibenzoik asit (gentisic asit)	0,838 μ M	0,668 μ M
2,4,6-trihidroksibenzoik asit	3,648 μ M	2,126 μ M

Çizelge 5.2. 2,3-dihidroksibenzoik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit ve 2,4,6-trihidroksibenzoik asitin insan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için bulunan K_i değerleri

İnhibitör	hCA-I K_i değeri	İnhibisyon türü	hCA-II K_i değeri	İnhibisyon türü
2,3-dihidroksibenzoik asit	8,01 μ M	yarişmasız	3,27 μ M	yarişmasız
2,5-dihidroksibenzoik asit (gentisik asit)	3,04 μ M	yarişmasız	0,55 μ M	yarişmalı
2,4,6-trihidroksibenzoik asit	4,71 μ M	yarişmasız	3,13 μ M	yarişmasız

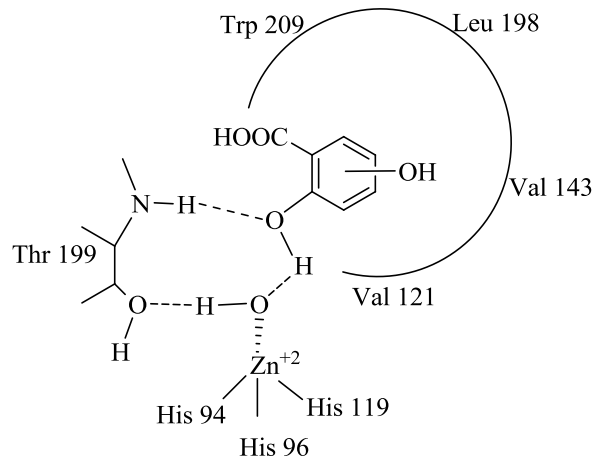
Metaloenzim olan karbonik anhidrazın 12 memeli izoformlarının fenol serisiyle inhibisyonu araştırılmıştır. Bu CA'ların fenol serisiyle inhibisyonunun sülfanilamidlerden farklı olduğu bildirilmiştir. Fenolün 2-,3- ve 4- konumlarına hidroksi, siyan, flor, amino, karboksil ve asetoamit gruplarının bağlamasıyla oluşan seri, enzim aktiveteleri üzerine düşük konsantrasyonlarda bile inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir. Özellikle p-hidroksibenzoik asit ve salisilik asit hidroksibenzoik asit sınıfına girmektedir. p-hidroksibenzoik asit ve salisilik asit için K_i sabitleri sırasıyla hCA-I, 9,9 μ M, 9,8 μ M; hCA-II, 7,1 μ M, 10,6 μ M olarak tespit edilmiştir (Innocenti *et al.* 2008). Bizde çalışmamızda hidroksibenzoik asit türevleri ile çalıştık. 2,3-dihidroksibenzoik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asitin ve 2,4,6-trihidroksibenzoik asit sırasıyla hCA-I için K_i sabitleri 8,01 μ M, 3,04 μ M, 4,71 μ M; hCA-II için 3,27 μ M, 0,55 μ M, 3,13 μ M olarak tespit edilmiştir. Sonuçlardan da anlaşıldığı gibi hidroksi gruplarının artmasıyla inhibisyon etkisi artmaktadır. Ancak hidroksi grubunun artışı ile lineer bir inhibisyon etkisi gözlenmemektedir.

Sitozolik insan karbonik anhidraz izoenzimlerinin üzerine bazı fenolik asitlerin inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Elajik asit, galik asit, ferulik asit, kafeik asit, kuersetin, p-kumarik asit, p-hidroksibenzoik asit ve sirinjik asitin K_i değer aralığı CA-I için 99-1061 μ M, CAII için 105-758 μ M olarak belirlenmiştir. Kuersetin (CA-I), p-kumarik asit (CA-II) ve galik asit (CA-II) yarışmalı inhibisyon, diğer fenolik asitler ise her iki izoenzimde yarışmasız inhibisyona sebep olmuştur. Kullandığımız fenolik asitlere benzeyen 3,4-dihidroksibenzoik asit ve 3,5-dihidroksibenzoik asitin sırasıyla hCA-I için K_i sabitleri 1,08 μ M, 0,55 μ M; hCA-II için 0,55 μ M, 0,51 μ M olarak belirlenmiştir (Sarıkaya *et al.* 2010). Çalıştığımız 2,3-dihidroksibenzoik asit ve 2,5-dihidroksibenzoik asitin sırasıyla hCA-I için K_i sabitleri 8,01 μ M, 3,04 μ M; hCA-II için 3,27 μ M, 0,55 μ M olarak tespit edilmiştir. 3,5-dihidroksibenzoik asitin hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisinin daha güçlü olduğu kanısına varılmıştır.

Sarıkaya *et al.* (2010)'nın çalışmış olduğu bir diğer fenolik asit türevi gallik asittir. Gallik asitin hCA-I için K_i sabitleri 3,2 μ M, hCA-II için 2,25 μ M, olarak bulunmuştur. Gallik asitin yapısı çalıştığımız 2,4,6-trihidroksibenzoik asit ile benzer yapıdadır. 2,4,6-

trihidroksibenzoik asit hCA-I için K_i sabitleri 4,71 μM , hCA-II için 3,13 μM , olarak belirlenmiştir. Gallik asitin inhibisyon etkisinin her iki izoenzim için 2,4,6-trihidroksibenzoik asitten daha fazla olduğunu görmekteyiz.

Bu çalışmada enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} ile fenollerin fonksiyonel $-\text{OH}$ grubunun bağlandığını göstermişlerdir. Katalitik bölge için oldukça önemli bir aminoasit olan Thr 199'un NH amidinin bir hidrojen bağının yanı sıra ikinci bir hidrojen bağı vasıtasıyla $-\text{OH}$ 'ını enzim aktif bölgesinin çinko bağlı su/hidroksit iyonuna bağlayarak bu fenol bileşiklerinin CA'ya bağlandığını ispatladılar (Senturk *et al.* 2009).



Şekil 5.2. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} iyonuna inhibitörlerin bağlanma modeli (Bayram *et al.* 2008)

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

- ✓ Karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması için daha önceki araştırmacıların sentezlediklerinden farklı afinite jellerinin hazırlanması amaçlanmıştır. Matriks olarak Sepharose 4B ve ligand olarak 4-(2-aminoetil) benzen sülfanilamid kullanılmıştır.
- ✓ Sentezlenen jel için ayrı ayrı hCA-I ve hCA-II'nin elüsyon grafikleri, sıcaklık-kapasite grafiği, pH-kapasite grafiği ve iyonik şiddet-kapasite grafikleri çizildi ve bu grafiklerden optimum değerler belirlendi.
- ✓ İnsan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin, tarafımızdan sentezlenen afinite jeline maksimum adsorpsiyonu 8,5 pH, 2°C sıcaklık ve 0,3 M iyonik şiddette gerçekleştiği sonucu ortaya konulmuştur.
- ✓ Bazı fenolik asitlerin, afinite jeliyle saflaştırılmış olan hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren maddeler için IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri bulunarak inhibisyon tipleri tespit edilmiştir.
- ✓ 2,5-dihidroksibenzoik asit, 2,3-dihidroksibenzoik asit, ve 2,4,6-trihidroksibenzoik asitin hCA-I için IC_{50} değerleri sırasıyla , 0,838 μ M, 2,676 μ M, 3,648 μ M iken; hCA-II için 2,5-dihidroksibenzoik asit, 2,4,6-trihidroksibenzoik asit ve 2,3-dihidroksibenzoik asitin IC_{50} değerleri sırasıyla 0,668 μ M, 2,126 μ M, 2,381 μ M, olarak belirlenmiştir.
- ✓ 2,5-dihidroksibenzoik asit ve 2,4,6-trihidroksibenzoik asit ve 2,3-dihidroksibenzoik asitin hCA-I için K_i değerleri sırasıyla 3,04 μ M, 4,71 μ M, 8,01 μ M iken; hCA-II için 0,55 μ M, 3,13 μ M, 3,27 μ M, olarak belirlenmiştir. İnhibisyon tipleri ise 2,5-dihidroksibenzoik asitte hCA-II için yarışmalıyken diğerlerinde yarışmasız inhibisyon tipi gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Armstrong, J., Mc, D., Myers, D. V., Verpoorte, J. A., and Edsall, J. T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem*, 214, 5137 p.
- Arslan, O., 1994. Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö. İ. 1996. A new Method for the purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26:163-166.
- Arslan, O., 2003. Biyomolükeller Teori ve Uygulamaları ile. Balıkesir.
- Aydogan, S., 2006. Yönlendirilmiş Mutagenез ile Mutant hCAII Geninin Eldesi ve Mutant Proteinlerin İnhibitörlere Karşı İlginin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
- Başaran, İ., Sinan, S., Çakır, U., Bulut, M., Arslan, O., Özensoy, O., In vitro inhibition of cytosolic carbonic anhydrases I and II by some new dihydroxycoumarin compounds. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 23, 32-36.
- Bayram, E., Şentürk, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T., 2008. In vitro inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isoenzymes I and II. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16, 9101-9105.
- Beydemir, Ş., Hisar, O., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ. and Supuran, C.T., 2005. "Effects of low molecular weight plasma inhibitors rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity in vitro and rat erythrocytes in vivo". *J. Enzym. Inhib. Med. Ch*, 20, 35-39.
- Bottcher, K., Waheed, A. and Sly, W. S., 1994. Membrane-Associated Carbonic Anhydrase from the Crab Gill: Purification, Characterization, and Comparison with Mammalian CAs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 429-435.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72, 248.
- Briganti, F., Pierattelli, A., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 1996. Carbonic anhydrase activators. Part 17. Synthesis and activation study of a series of 1-(1,2,4-triazole-(1H)-3-yl)-2,4,6-trisubstituted-pyridinium salts against isozymes I, II and IV. *Eur. J. Med. Chem*, 31, 1001 p.
- Bulbul, M., Hisar, O., Beydemir, S., Ciftci, M., Küfrevioğlu, O. I., 2003. The in vitro and in vivo inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 18, 1-5.
- Bulbul, M., Kasimogulları, R., Küfrevioğlu, O. I., 2008. Amide derivatives with pyrazole carboxylic acids of 5-amino-1,3,4-thiadiazole 2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and investigation of inhibitory effects. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 6, 895-900.

- Burt, E., Darlington, M.V., Graf, G. and Meyer, H. J., 1992. Isolation, purification and characterization of an insect carbonic anhydrase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 285-291.
- Casini, A., Mincione, F., Vullo, D., Menabuoni, L., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2002. Carbonic anhydrase inhibitors with strong topical antiglaucoma properties incorporating a 4-(2-aminopyrimidin-4-yl-amino)-benzenesulfonamide scaffold. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch*, 17, 9–18.
- 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. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch*, 17, 333–343.
- Chegwidden, W.R., Dodgson, S.J. and Spencer, I.M., 2000. In *The Carbonic Anhydrase-New Horizons*. Birkhauser Verlag, 343-363.
- Cho, YOUN-JEUNG & Park, OH-JIN & Shin, HYUN-JAE. 2005. Immobilization of thermostable trehalose synthase for the production of trhalose” *Yusong Daejon* 305-333, Korea.
- Christie, K.N., Thomson, C., Xue, L.Z., Lucocq, J.M. and Hopwood, D., 1997. Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III and IV are present in human esophageal epithelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45, 35-40.
- Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçini İ., Ekinci, D., 2007. Morphine inhibits erythrocyte carbonic anhydrase in vitro and in vivo. *Biol. Pharm. Bull*, 12, 2257-2261.
- Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçini İ., Ekinci, D., 2008. The effect of ethanol on erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes activity: An in vitro and in vivo study. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2, 266-270.
- Demir, N., Demir, Y. and Yıldırım, Ali., 1997. Carbonic anhydrases from leaves and roots of *Daucus carota*. *Phytochemistry*, 44, 1247-1250.
- Devlin T. M., 2002. *Biochemistry with Clinical Correlations*, Canada.
- Durdağı, S., Şentürk, M., Ekinci, D., Balaydın, H.T., Göksu, S., Küfrevioğlu, Ö.İ., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2011. Kinetic and docking studies of phenol-based inhibitors of carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII evidence a new binding mode within the enzyme active site. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 19, 1382.
- Ekinci, D., Beydemir, Ş., Alım, Z., 2007. Some drugs inhibit in vitro hydratase and esterase activities of human carbonic anhydrase-I and II. *Pharmacol Rep*, 5, 580-587.
- Ekinci, D., Ceyhun, S.B., Şentürk, M., Erdem D., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T., 2011. Characterization and anion studies of an α -carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19, 744p.
- Ekinci, D., Çavdar, H., Talaz, O., Şentürk, M., Supuran, C.T., 2010. NO-releasing esters show carbonic anhydrase inhibitory action against human isoforms I and I. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18, 3559-3563.
- Epstein, D.L., Grant, W.M., 1977. Carbonic Anhydrase Inhibitors Side Effects; Serum Chemical Analysis, *Archives of Ophthalmology*; 85:1387.
- Falkbring, S. O., Göthe, P. O., Nyman, L., and Parath, J. 1972. Affinity Chromatography of carbonic anhydrase. *FEBBS. Letter*, 24, 229.

- Franchi, M., Vullo, D., Lallori, E., Pastorek, J., Russo, A., Scozzafava, A., Pastorekova, S., Supuran C.T., 2003. Carbonic Anhydrase Inhibitors, Inhibition of Cytosolic Isozymes I and II and Transmembrane Cancer-associated Isozyme IX with Lipophilic Sulfonamides. *J Enzyme Inhib. And Med. Chem*, 184, 333p.
- Gülçin, I., Beydemir, S. and Büyükokuroglu, M. E., 2004. *In vitro* and *in vivo* effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities. *Biol. Pharm. Bull*, 27, 613-616.
- Hamilton, E.B.D., Bywaters, E.G.L., 1960. 2,4,6-Trihydroxybenzoic acid in the treatment of rheumatic fever. *Ann. rheum. Dis*, 19, 52-54.
- Harvey, R.A., Champe, P.C., Ferrier, D.R., 2007. *Biyokimya. Nobel tıp kitapçevleri*, 60, 61 s, İstanbul.
- Hewett-Emmett, D., 2000. In *The Carbonic Anhydrase-New Horizons*. Birkhauser Verlag, 29-78.
- Hilvo, M., 2005. Expression studies on carbonic anhydrase IX. Master's thesis, Institute of Medical Technology, University of Tampere.
- Hunaiti, A.A., Soud, M., 2000. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood. *Science Total Environ.*, 248, 45-50.
- Innocent, A., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of mammalian isoforms I-XIV with a series of substituted phenols including paracetamol and salicylic acid. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16, 7424-7428.
- Johansen, J. T. 1976. Isolation of Human Carbonic anhydrase Band C and apocarbonic anhydrase by Affinity Chromatography. *Carlsberg Res. Commun.*, 41, 73.
- John F. Robyt, Bernard J. White. 1987. *Biochemical Techniques Theory and Practic*. Waveland Press, Inc.
- Keha, E. E., 1981. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu. *Doçentlik Tezi*, Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Erzurum.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2008. *Biyokimya. Aktif Yayınevi*, 91-95, 118 s, İstanbul.
- Keilin, D. and Mann, T., 1944. Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature* 153, 107-108.
- Krungkrai, S. R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. and Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* 31, 661-668.
- Krungkrai, S. R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. and Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* 31, 661-668.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C. Development and pharmacological characterization of a modified procedure for the measurement of carbonic anhydrase activity. *J. Pharm. And. Toxicol. Meth.*, 38, 169-172p.
- Leppilampi, M., 2006. Functional and immunohistological studies on cancer-associated carbonic anhydrase IX. Master's thesis, Faculty of Medicine, University of Oulu.

- Lindskog S. 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther.*, 74, 1–20 p.
- Lindskog, S. and Silverman, D.W., 2000. In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Basel, 175-196.
- Lindskog, S., Coleman, J.E., 1973. The Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2505.
- Lonnerholm, G., Selking, O. and Wistrand, P.J., 1985. Amount and distribution of carbonic-anhydrases CA-I and CA-II in the gastrointestinal-tract. *Gastroenterology*, 88, 1151-1161.
- Lowe, N., Edwards, Y.H., Edwards, M., Butterworth, P.H., 1991. Physical Mapping of the Human Carbonic Anhydrase Gene Cluster on Chromosome 8. *Genomics*, 10, 4, 882.
- Mammino, L., Kabanda, M.M., 2010. A Computational Study of the Carboxylic Acid of Phloroglucinol in Vacuo and in Water Solution. *International Journal of Quantum Chemistry*, 110, 595–623
- Maren, T. H. and Conroy, C. W., 1993. A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 268, 26233-26239 p.
- Maren, T. H., 1967. Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47, 595 p.
- Maren, T.H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., Godman, D.F., 1967. Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor. *J Pharmacol Experimental Therapeutics*. 280, 98-104.
- Maren, T.H., Jankowska, I., Sanyal, G., Edelhauser, H.F., 1983. The Transcorneal Permeability of Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Effect on Aqueous Humor Secretion, *Experimental Eye Research*; 33: 457.
- Meldrum, N.N. and Roughton, F.J.W., 1933. Carbonic anhydrase: its preparation and properties. *Nature* 80, 113-142.
- Mohanty, A. K., Kannan, K. K., Mahajan S. K., 1998. Human Carbonic Anhydrase I: Effect of Specific Site Mutations on Its Function. *J. Biosci*, 23, 3, 235p.
- 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, 2298.
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusomoto, W., Zhu, X.L. and Sly, W.S., 1995. Carbonic anhydrase IV role of removal of c-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320, 315-312.
- Ozensoy, O., Arslan, O. and Oznur Sinan S., 2004, A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Biochemistry(Moscow)*. 69, 216-219.
- Pastarekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran T.C., 2004. Carbonic Anhydrases: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19:199-229.
- Pocker, Y. and Joan, S. Y., 1974. Plant carbonic anhydrase. Hydrase activity and its reversible inhibition. *Biochemistry*, 13, 5116.

- Pocker, Y. and Sarkanen, S., 1979. Carbonic anhydrase; Structure, catalytic versatility and inhibition. *Advances in Enzymology*, 49, 149.
- Pocker, Y., Sarkanen, S., 1979. Carbonic anhydrase: structure, catalytic versatility and inhibition, advances in enzymology. New York, 149-273p.
- Raisanen, S.R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rahkila, P., Harkonen, P.L. and Vaananen, H.K., 1999. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Faseb Journal*, 13, (3) p: 513-522.
- Sarikaya, B.Ö., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2010. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of human erythrocyte isoenzymes I and II with a series of phenolic acids. *Chem Biol Drug Des*, 75, 515-520.
- Scher, A. and Dietsch, P., 1984. A 54 000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes. *New York Acad. Sci.*, 429, 241.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*, Inc, New York, p: 403.
- Segel, I.H., C. John Wiley and Sons, 1975. *Enzyme Kinetics*. New York.
- Sly, S.W., Hu, Y.P., 1995, Human Carbonic Anhydrase and Carbonic Anhydrase Deficiencies, *Annual Review of Biochemistry*; 64: 375-401.
- Sowden, J., Edwards, M., Morrison, K., Butterworth, P.H.W., Edwards, Y.H., 1992. Erythroid Expression and DNAase-Hypersensitive Sites of the Carbonic Anhydrase 1 Gene. *Biochem J.*, 288, 2, 545.
- Stams, T., Chen, Y., Boriack-Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis, P. and Christianson, D. W. 1998. Structural analysis of inhibitor binding to human carbonic anhydrase II. *Protein Sci.*, 7, 556 p.
- Sugrue, M.F., 2000. *Progr. Ret. Eye Res*, 19, 87.
- Supuran, C.T., 2010. Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms. *Springer*, 305, 308p.
- Supuran, C.T., and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Curr.Med.Chem.*, 1, 61-97.
- Supuran, C.T., Carbonic Anhydrase Inhibitors, Inhibition of Cytosolic Isozymes I and II and Transmembrane Cancer-associated Isozyme IX with Lipophilic Sulfonamides. *J.Enzyme Inhib. And. Med.Chem.*, 184, 333.
- Şahin, A., 2008. bazı karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması için yeni bir afinite jelinin sentezi ve uygulanması yüksek lisans tezi
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Daştan, A., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibitor of human erythrocyte I and II isoenzymes with antioxidant phenolic compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17: 8; 3207-3211.
- Telefoncu, A., 1986. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi yayını (Der) 59, İzmir.
- Verpoorte, J. A., Mehta, S. And Edsall, J. T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 242, 4221 p.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., 1967, Esterase activities of human carbonic anhydrase. *J Biol Chem.*, 242, 4221-4229.
- Vince, J.W. and Reithmeier, R. A. F. 2000. Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger AE1. *Biochemistry*, 39: 5527-5533.
- Warburg, O., and Christian, W. 1941. Isolierung und Kristallization des Gärungsferments Enolase. *Biochem*, 310, 384.

- Whitney, P. I. 1974. Affinity Chromatography of Carbonic anhydrase. *Anal.Biochem.*, 64, 267. of Carbonic anhydrase Isoenzymes by Affinity Chromatography. *Anal. Biochem.*, 64, 297.
- Whitney, P.I.,1974, Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Anal Biochem.*, 64, 267-276. Wistrand, P.J., Lindahl, S. and Wahlstrand, T., 1975, Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.*, 57, 189.
- Wilbur, K.M., Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J Biol Chemistry.*, 176, 147-154.
- Winum, J.,Y., Scozzafava, A., Montero, J.L., Supuran, C.T.,“Sulfamates and Their Therapeutic Potential. *Med.Research Reviews.*
- Wistrand, P.J., 1981. The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO₂ by the human erythrocyte. *Acta Phisiol. Scand.*, 343.
- Wistrand, P.J., Lindahl, S. and Wahlstrand, T., 1975, Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.*, 57, 189.
- www.sigmaaldrich.com.
- www.wikipedia.org.
- Yu, Z., Xie, L., Lee, S. and Zhang, R., 2006. A novel carbonic anhydrase from the mantle of the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 190-194.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Erzurum’da doğdu. İlk öğrenimini İstanbul ve Yalova’da, lise öğrenimini ise Erzurum’da tamamladı. 2005 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2009 yılında mezun oldu. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı ve daha sonra 2010 Aralık ayında ÖYP Araştırma Görevlisi olarak Aksaray Üniversitesine atandı.