

**İNSAN ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ I VE II
İZOENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ
AFİNİTE JELLERİNİN HAZIRLANMASI VE YENİ
SENTEZLENEN BAZI SÜLFONAMİD TÜREVLERİNİN BU
İZOENZİMLER ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON
KİNETİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Murat ŞENTÜRK

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

2009

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**İNSAN ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ I VE II
İZOENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ AFİNİTE
JELLERİNİN HAZIRLANMASI VE YENİ SENTEZLENEN BAZI
SÜLFONAMİD TÜREVLERİNİN BU İZOENZİMLER
ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON KİNETİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Murat ŞENTÜRK

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM

2009

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU danışmanlığında, Murat ŞENTÜRK tarafından hazırlanan bu çalışma 07/05/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Nurullah SARAÇOĞLU

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Ahmet ÇAKIR

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Taha Abdulkadir ÇOBAN

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

İNSAN ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİNİN
SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ AFİNİTE JELLERİNİN HAZIRLANMASI VE
YENİ SENTEZLENEN BAZI SÜLFONAMİD TÜREVLERİNİN BU İZOENZİMLER
ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON KİNETİKLERİNİN İNCELENMESİ

Murat ŞENTÜRK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

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 afinite jelleri hazırlanmıştır. Matriks olarak Sepharose 2B, 4B ve 6B; uzantı kolu olarak anilin ve ligand olarak sülfanilamid kullanılmıştır. Hazırlanan afinite jellerinin izoenzimleri saflaştırabilme kapasiteleri; farklı sıcaklık, pH ve iyonik şiddette belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında bazı salisilik asit türevlerinin sülfamat türevleri ile siklohekzen epoksitin sülfamat türevi sentezlenmiştir. Son olarak, sentezlenen yeni sülfamat türevlerinin, hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren bu maddeler için I₅₀ değerleri ve K_i sabitleri bulunarak inhibisyon tipleri tespit edilmiştir.

2009, 79 sayfa

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

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PREPARATION OF NEW AFFINITY GELS FROM PURIFICATION OF
CARBONIC ANHYDRASE I AND II ISOENZYMES FROM HUMAN
ERYTHROCYTES AND INVESTIGATION OF THE INHIBITORY KINETICS OF
NEWLY SYTHETIZED SULFONAMIDE DERIVATIVES ON THE ISOENZYMES

Murat ŞENTÜRK

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

Supervisor: Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

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 gels different from which have been used so far. Sepharose 2B, 4B and 6B have been used as matrix, aniline as spacer arm and sulfonamide as ligand. Purification capacities of the affinity gels have been determined under different temperatures, pHs and ionic strengths.

In the second part of the study, sulfamate derivatives of some salicylic acids and cycloheptene epoxide have been synthesized. Finally, inhibitory effects of new-synthesized sulfamate derivatives on hCA I and hCAII, which have been purified by new gels, have been investigated. To this end, I_{50} and K_i constants and inhibition types have been determined for these substances.

2009, 79 pages

Keywords: Carbonic anhydrase, isoenzyme, affinity gel, sulfonamide

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya ve Organik Kimya Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarımın her aşamasında anlayış ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU'na ve özellikle organik sentez konusunda yardımlarını ve desteklerini gördüğüm değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nurullah SARAÇOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında arkadaşlığını ve yardımlarını esirgemeyen değerli dostum Sayın Dr. Deniz EKİNCİ'ye, Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki hocalarım Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR, Sayın Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN, Sayın Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e, organik sentez konusunda değerli yardımlarını aldığım Oktay TALAZ, Hüseyin ÇAVDAR ve Cemalettin ALP'e minnet duygularımı ifade etmek isterim. Bana sağladığı çalışma olanaklarından dolayı Kimya Bölümü Başkanlığı'na ve laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş olduğu sabır ve anlayıştan dolayı aileme sonsuz teşekkürlerimi ve şükran duygularımı sunarım.

Murat ŞENTÜRK

Mayıs 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler ve Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılmaları	1
1.2. Enzim İnhibisyonu.....	6
1.3. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve Fizyolojik Fonksiyonları.....	8
1.4. Karbonik Anhidrazın Önemli İnhibitörleri.....	11
1.4.1. Sülfonamidler.....	11
1.4.2. Sülfamatlar.....	12
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	19
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	19
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	20
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Protein Tayini.....	22
3.2.1.a. Kantitatif protein tayini.....	22
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini	22
3.2.2. Karbonik anhidraz aktivite tayini	23
3.2.2.a. CO ₂ -Hidrataz tayini	23
3.2.2.b. Esteraz aktivitesi.....	24
3.2.3. Afinite jellerinin hazırlanması.....	24
3.2.4. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması	25
3.2.4.a. Kan temini ve hemolizat hazırlanması.....	25

3.2.4.b. Afinite kolonunun paketlenmesi	26
3.2.4.c. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu.....	26
3.2.4.d. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü.....	26
3.2.5. Afinite kolonunun CA tutma kapasitesinin bulunması.....	28
3.2.5.a. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi.....	28
3.2.5.b. pH'nın kolon kapasitesine etkisi	28
3.2.5.c. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi	28
3.2.6. Siklohekzen epoksit ile sülfamik asitten (1 <i>R</i> (<i>S</i>),2 <i>R</i> (<i>S</i>))-2-hidroksisiklohekzil sülfamat'ın sentezi.....	29
3.2.7. Salisilik asitin sülfamat esterinin sentezi.....	29
3.2.8. 5-Sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin sentezi	30
3.2.9. 4-Sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin sentezi	30
3.2.10. <i>trans</i> -Stilben epoksit ile sülfamik asitten 2,2-difenilasetaldehit sentezi.....	31
3.2.11. Stiren oksit ile sülfamik asitten <i>trans</i> -(2 <i>S</i> (<i>R</i>),4 <i>S</i> (<i>R</i>))-2-benzil-4-fenil-1,3- dioksolan türevinin sentezi	31
3.2.12. İnhibitörler için IC ₅₀ ve K _i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	33
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik	33
4.2. Saflaştırılması Sonuçları.....	34
4.3. Afinite Kolonunun Farklı Sıcaklık, pH ve İyonik Şiddette CA Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi Çalışmaları Sonuçları.....	37
4.4. Siklohekzen Epoksit ve Sülfamik Asitin Reaksiyonun İncelenmesi.....	45
4.5. 2,2-Difenilasetaldehit (4)'in Sentezinin İncelenmesi.....	47
4.6. <i>trans</i> -(2 <i>S</i> (<i>R</i>),4 <i>S</i> (<i>R</i>))-2-Benzil-4-fenil-1,3-dioksolan Türevinin Sentezinin İncelenmesi	48
4.7. Bazı Salisilik asit Türevlerinin Klorosülfonil İzosiyanat (CSI) ile Reaksiyonlarının İncelenmesi.....	50
4.8. İnhibitörler İçin IC ₅₀ ve K _i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları.....	58
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	69
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	79

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. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi	3
Şekil 1.2. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi. Bu kotransport sistemi, transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan HCO_3^- 'ın giriş ve çıkışını sağlar. Görevi kanın CO_2 taşıma kapasitesini artırmaktır	9
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik.....	28
Şekil 4.2. Sepharose 2B, Sepharose 4B ve Sepharose 6B polimerlerinin genel şekli ..	30
Şekil 4.3. Sepharose 2B-anilin-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırma sonucu SDS-PAGE fotoğrafı	32
Şekil 4.4. Sepharose 4B-anilin-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırma sonucu SDS-PAGE fotoğrafı	32
Şekil 4.5. Sepharose 6B-anilin-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırma sonucu SDS-PAGE fotoğrafı	33
Şekil 4.6. Sepharose 2B, 4B, 6B –anilin- sülfanilamid afinite kolonunun en son hali...	34
Şekil 4.7. Sepharose-2B-anilin-sülfanilamid jeli kullanılarak hCA-I ve hCA-II'nin elüsyon grafiği	34
Şekil 4.8. Sepharose-2B-anilin-sülfanilamid sıcaklık-kapasite grafiği	35
Şekil 4.9. Sepharose-2B-anilin-sülfanilamid pH-kapasite grafiği.....	35
Şekil 4.10. Sepharose-2B-anilin-sülfanilamid iyonik şiddet (M)-kapasite grafiği	36
Şekil 4.11. Sepharose-4B-anilin-sülfanilamid jeli kullanılarak hCA-I ve hCA-II'nin elüsyon grafiği	36
Şekil 4.12. Sepharose-4B-anilin-sülfanilamid sıcaklık-kapasite grafiği	37
Şekil 4.13 Sepharose-4B-anilin-sülfanilamid pH-kapasite grafiği.....	37
Şekil 4.14. Sepharose-4B-anilin-sülfanilamid iyonik şiddet (M)-kapasite grafiği	38
Şekil 4.15. Sepharose-6B-anilin-sülfanilamid jeli kullanılarak hCA-I ve hCA-II'nin elüsyon grafiği.....	38
Şekil 4.16. Sepharose-6B-anilin-sülfanilamid sıcaklık-kapasite grafiği	39
Şekil 4.17. Sepharose-6B-anilin-sülfanilamid pH-kapasite grafiği.....	39

Şekil 4.18. Sepharose-6B-anilin-sülfanilamid iyonik şiddet (M) -kapasite grafiği	40
Şekil 4.19. 1 <i>R(S)</i> ,2 <i>R(S)</i> -2-Hidroksisikloheksil sülfamat'ın 200 MHz ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)	42
Şekil 4.20. 1 <i>R(S)</i> ,2 <i>R(S)</i> -2-Hidroksisikloheksil sülfamat'ın 50 MHz ¹³ C-NMR spektrumu (CDCl ₃)	42
Şekil 4.21. Salisilik asit ve 2-(sulfamoyiloksi)benzoik asit'in 400 MHz ¹ H-NMR spektrumları (DMSO-d ₆)	45
Şekil 4.22. Salisilik asit ve 2-(Sulfamoyiloksi)benzoik asit'in 100 MHz ¹³ C-NMR spektrumu (DMSO-d ₆)	46
Şekil 4.23. 5-Sülfosalisilik asit ve 2-sülfamoiloksi-5-sülfo benzoik asit'in 400 MHz ¹ H-NMR spektrumu (DMSO-d ₆)	47
Şekil 4.24. 5-Sülfosalisilik asit ve 2-sülfamoiloksi-5-sülfo benzoik asit'in 100 MHz ¹³ C-NMR spektrumu (DMSO-d)	48
Şekil 4.25. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 1 <i>R(S)</i> , 2 <i>R(S)</i> -2-hidroksisikloheksil sülfamat'ın etkisi	49
Şekil 4.26. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 1 <i>R(S)</i> , 2 <i>R(S)</i> -2-hidroksisikloheksil sülfamat'ın etkisi	50
Şekil 4.27. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine salisilik asitin sülfamat esterinin etkisi.....	50
Şekil 4.28. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine salisilik asitin sülfamat esterinin etkisi.....	51
Şekil 4.29. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 5-sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin etkisi	51
Şekil 4.30. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 5-sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin etkisi	52
Şekil 4.31. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 1 <i>R(S)</i> , 2 <i>R(S)</i> -2-hidroksisikloheksil sülfamat'ın etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	52
Şekil 4.32. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 1 <i>R(S)</i> , 2 <i>R(S)</i> -2-hidroksisikloheksil sülfamat'ın etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	53
Şekil 4.33. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine salisilik asitin sülfamat esterinin etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	53

Şekil 4.34. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine salisilik asitin sülfamat esterinin etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	54
Şekil 4.35. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 5-sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	54
Şekil 4.36. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 5-sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. CA'nın saflaştırılmasında kullanılan bazı önemli afinite jelleri.....	11
Çizelge 4.1. İnsan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Sepharose 2B-anilin-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları	29
Çizelge 4.2. İnsan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Sepharose 4B-anilin-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları	30
Çizelge 4. 3. İnsan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Sepharose 6B-anilin-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları	30
Çizelge 4.4. Afinite jellerinin kıyaslama tablosu	30
Çizelge 4.5. Karbonik anhidrazın afinite jellerinin optimum pH, sıcaklık ve iyonik şiddet değerleri	39
Çizelge 4.6. Karbonik anhidrazın afinite kromatografisi için matriksler, ligand, uzantı kolu ve jellerinin optimum şartlarda CA-I ve CA-II izoenzimlerini tutma kapasiteleri	40
Çizelge 5.1. Salisilik asit ve 5-sülfosalisilik asidin insan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için bulunan IC_{50} değerleri.....	56
Çizelge 5.2. Siklohekzen epoksid, salisilik asit ve 5-sülfosalisilik asidin sülfamat türevlerinin İnsan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için bulunan IC_{50} değerleri.....	56
Çizelge 5.3. Salisilik asit ve 5-sülfosalisilik asidin insan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için bulunan K_i değerleri	57
Çizelge 5.4. İnsan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için bulunan K_i değerleri	57

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler ve Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılmaları

Enzimler, büyük bir bölümü protein yapısında olan ve canlı bünyesindeki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen biyomakromoleküllerdir. Enzimler diğer proteinler gibi, yaklaşık olarak 12.000'den 1 milyona kadar değişen molekül kütlesine sahiptirler. Bazı enzimler amino asit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara ihtiyaç duymazlar. Diğerleri kofaktör olarak adlandırılan Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} veya Se gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya koenzim olarak adlandırılan kompleks organik veya metaloorganik moleküllere gereksinim duyarlar. Bazı enzimlerin ise aktivite gösterebilmeleri için hem koenzime hem de bir veya daha fazla metal iyonuna ihtiyacı vardır. Protein yapısına çok sıkı olarak hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu prostetik grup olarak adlandırılır. Metal iyonları ile veya koenzimiyle birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim holoenzim olarak adlandırılırken bu gibi enzimlerin sadece protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılmaktadır. Koenzimler, tiamin pirofosfat; aldehytler, koenzim A; açıl grupları gibi özgül işlevsel grupların geçici taşıyıcısı olarak görev yaparlar. Koenzimler çoğunlukla diyet ile düşük miktarlarda alınan organik besinler olan vitaminlerden temin edilirler (Nelson and Cox 2005).

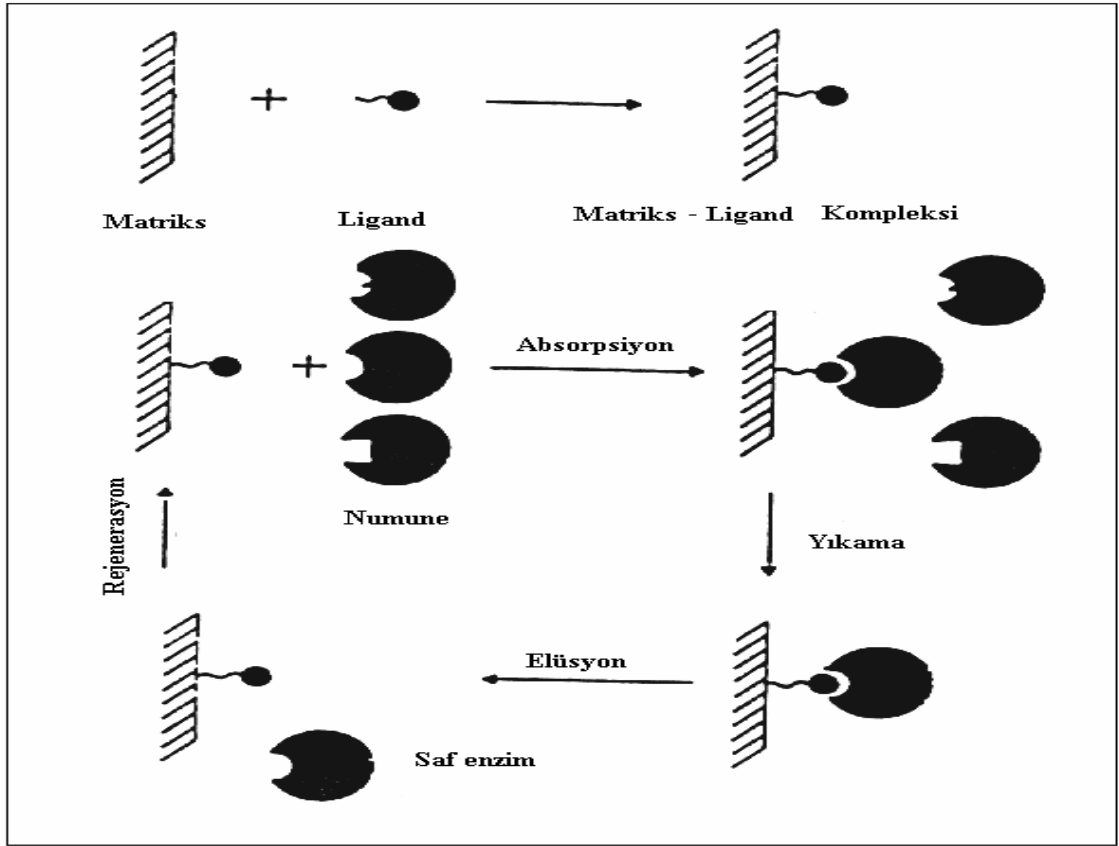
Çeşitli organizmalar kendilerine has proteinlere sahip oldukları gibi, her hücre tipi de binlerce değişik protein ihtiva etmektedir. Bunun yanında proteinler, biyolojik aktivitelerini ancak belirli pH ve sıcaklık sınırlarında gösterebilirler. Bu sebeplerden dolayı bir proteinin saf halde bir hücre veya bir dokudan izolasyonu güç bir iştir. Bu güçlüklerle rağmen şimdiye kadar birçok protein saf olarak elde edilmiştir. Binin üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve iki yüzden fazlası saf kristal halde elde edilmiştir. Ayrıca hiçbir enzimatik aktivite göstermeyen yüzlerce protein çeşitli kaynaklardan yüksek saflık derecesinde izole edilmiştir. Proteinler üç boyutlu yapıları, sıcaklık, pH, yüzey gerilimi gibi birçok faktörden hızlı bir şekilde etkilenerek kısa

sürede enzim aktivitelerini kaybedebilmektedirler. Bu nedenle enzim izolasyonu deneyleri oldukça dikkat gerektiren çalışmalardır.

Saflaştırma işlemleri genelde enzimlerin;

1. Molekül büyüklükleri,
2. Çözünürlük farklılıkları,
3. Elektriksel yükleri,
4. Adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıkları esasına göre gerçekleştirilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2008).

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).



Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bütün enzimler proteindir. Katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonunun sağlamlılığına bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa veya alt birimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur. Ya da enzim, bileşeni olan amino asitlerine dönüştürülürse, katalitik aktivitesi kaybolur. Bu yüzden protein enzimlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı katalitik aktivite için esastır.

Enzimlerin etki ettiği maddeler substrat olarak adlandırılır. Substratlar ürüne dönüştükten sonra ürün ve enzim ayrılır. Enzimler reaksiyon boyunca değişime uğrayabilir fakat reaksiyon sonunda başlangıç formuna dönerler. Enzimler reaksiyonların hızlarını artırmalarına ilaveten hücrede metabolik yollar için önemli birçok reaksiyonun hızını düzenlerler (Dawn *et al.* 1996). Bazı enzimler substrat adının sonuna “-az” son eki getirilerek adlandırılırken, bazıları da ilk bulucularının ortaya

attıkları isimlerle tanınır. Örneğin; fosfataz, üreaz, tripsin ve pepsin gibi. Ancak bu isimlerin çoğu enzimlerin fonksiyonları hakkında eksik bilgi verdiğiinden Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır. Ayrıca her enzim için 4 rakamlı enzim kod numarası öngörülmüştür (Lehninger 2000; Keha ve Küfrevioğlu 2008).

Bugün yaklaşık 2000 kadar farklı enzim bilinmektedir. Enzimlerin hem reaksiyon özgüllüklerini hem de substrat özgüllüklerini dikkate alan bir sınıflandırma geliştirilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre tüm enzimler enzim kataloğuna, dört basamaklı bir sayı olan EC numarası altında girerler. İlk basamak 6 temel sınıftan birine üyeliği belirtirken sonraki ikisi alt sınıfları ve alt-alt sınıfları belirtir. Son basamak ise enzimin alt sınıftaki sırasını gösterir.

Altı temel sınıfın her biri, aynı reaksiyon özgüllüğüne sahip enzimleri içerir. Oksidoredüktazlar (sınıf 1), bir redoks sisteminden diğerine indirgeyici ekivalentleri katalizlerler. Transferazlar (sınıf 2) bir substrattan diğerine hidrojen dışındaki diğer fonksiyonel grupların transferini katalizlerler. Çoğu oksidoredüktazların ve transferazların koenzimlere gereksinimi vardır. Hidrolazlarda (sınıf 3) grup transferinde rol alırlar ancak alıcı her zaman bir su molekülüdür. Liyazlar (sınıf 4) bir çift bağın uzaklaştırılması veya oluşumu ile ilgili reaksiyonları katalizlerler. İzomerazlar (sınıf 5) geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Ligazlar (sınıf 6, sentetazlar) tarafından katalizlenen reaksiyonlar, enerji bağımlıdır. Bu nedenle, her zaman nükleosit trifosfatların hidrolizi ile birlikte gerçekleşir (Koolman *et al.* 2003; Keha ve Küfrevioğlu 2008).

Biyokimya alanında günümüze kadar en çok araştırma yapılan konu enzimlerdir. Enzimler sağlıktan endüstriyel konulara kadar uygulama alanı bulmuştur. Kataliz olayı ile ilgili ilk denemeler 1760-1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerine yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışma 1860 yılında Pasteur tarafından yapılmış ve fermantasyon olayının enzimlerce yürütüldüğünü ispat etmiştir. Bu yüzden enzimler için “Ferment” terimi kullanılmıştır. Buchner kardeşler 1897’li yıllarda maya

hücrelerinde alkolik fermantasyonu katalize eden enzimleri elde etmeyi başarmışlardır. Bu buluş enzimlerin aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmalarının şart olmadığını ortaya koymuştur.

Enzimoloji alanında en önemli gelişme 1926 yılında Summer'ın üreaz enzimini “Jack Bean” bitkisinden elde edip kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymasdır (Lehninger 2000; Keha ve Küfrevioğlu 2008). Northrop 1930 yılında pepsin'i saf ve karakterize halde elde etmeyi başarmıştır. Bu araştırma sonucunda enzimlerin protein yapısında olduğu herkes tarafından kabul edilmeye başlanmıştır (Gözükara 1989).

Günümüzde birçok enzim saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristalleştirilmiştir. Yapılan genetik çalışmalar ve hücre içindeki kimyasal reaksiyonların çeşitliliği daha birçok enzimin keşfedilmediğini göstermektedir. Bütün canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonlar enzimlerle ilgilidir. Enzimler canlı hücrelerde sentezlenir ve hücre canlılığını yitirdikten sonra uzun süre etkili kalırlar. Katalitik etkileri hücreye bağlı değildir. Enzimler, protein yapısında olduklarından protein özelliklerine sahiptirler.

Enzimlerin katalizleme güçleri “turnover sayısı” adı verilen bir değerle ifade edilir ve birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı demektir. Enzim aktivitesine yani enzimli reaksiyon hızlarına etki eden faktörleri şöyle sıralayabiliriz:

- a. Substrat konsantrasyonu
- b. Enzim konsantrasyonu
- c. pH
- d. İyonik şiddet
- e. İnhibitor ve aktivatörlerin varlığı
- f. Sıcaklık

1.2. Enzim İnhibisyonu

Enzimlerin hem “*in vivo*” hem de “*in vitro*” aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması hatta yok edilmesi olayına “inhibisyon” adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere “inhibitör” denilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşikler veya iyonlardır. 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.

Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi, bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir. Bunlar: yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon ve yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmezken, K_m değeri artar.

Yine dönüşümlü tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör, etkisini; bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_m sabit kalır. Substrat ve inhibitör, farklı bölgelere bağlanabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir.

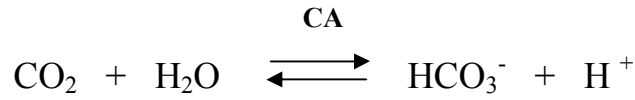
Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi de yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime bağlanamaz. Sadece enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır. Tek substratlı sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyona nadir rastlanır. Daha çok birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir. Enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi ortamda bulunacağından yarı yarışmalı inhibitörün varlığında V_{max} azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla S kompleksi ortamdan sürekli çekileceğinden enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşumu dengesini daha fazla sağa kaydırır ve K_m değeri küçülür.

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonunun özel bir çeşidi olan lineer karışık tip inhibisyon dönüşümlü inhibisyon çeşitleri arasındadır. Bu tür inhibisyonda enzim, substrat ve inhibitörün bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır. Birçok multienzim sistemi net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona eriştiğinde sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere “allosterik enzimler” denir ve bu olaya da “feed-back” inhibisyonu adı verilir. Birden fazla polipeptit zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşimlerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere “modülatör” denir.

İnhibisyon çeşidinin ve K_i sabitinin belirlenmesi için en çok kullanılan yöntem, Lineweaver–Burk grafikleridir. Bu yöntemde $1/V-1/S$ grafikleri sabit inhibitör ve beş farklı substrat konsantrasyonunda çizilerek K_i sabitleri hesaplanır. K_i sabitlerinin bulunmasında ikinci yol Dixon grafikleri yoludur. Bu yöntemde en az iki basit substrat konsantrasyonunda $1/V-[I]$ grafiği çizilerek kesim noktalarından K_i sabitleri hesaplanır (Lehninger 2000; Keha ve Küfrevioğlu 2008).

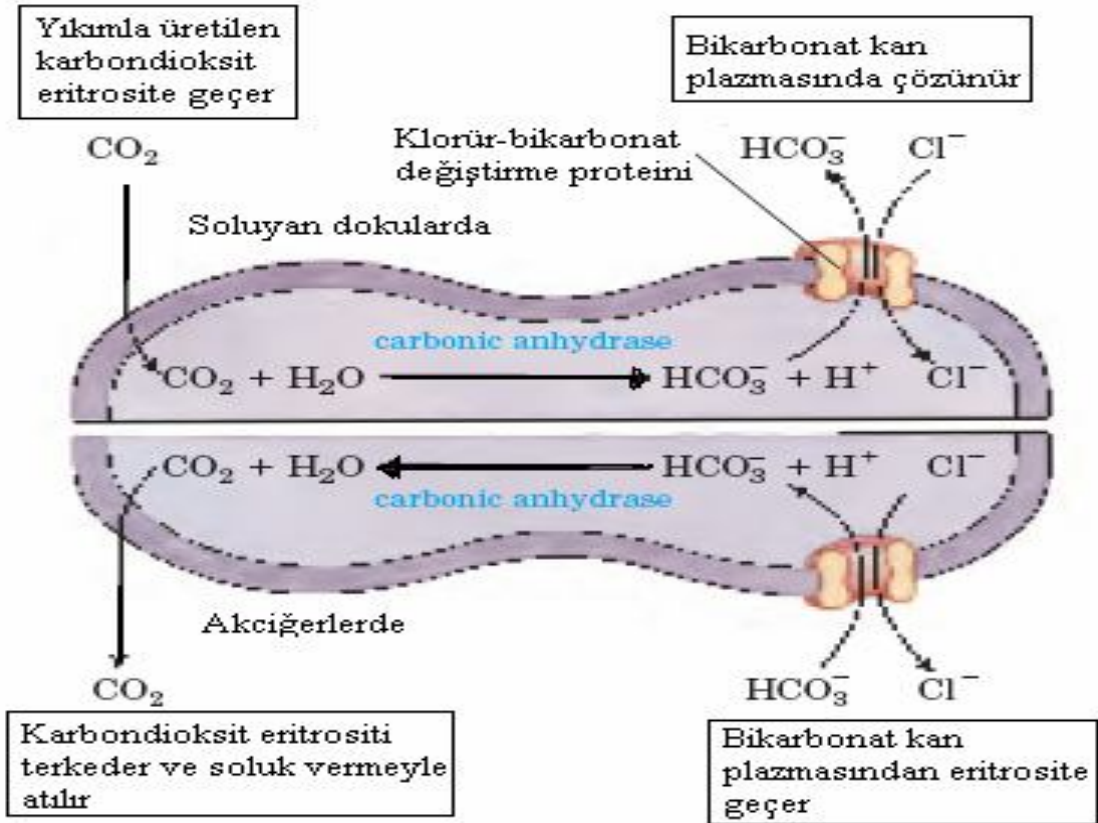
1.3. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve Fizyolojik Fonksiyonları

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



CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir, daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krunkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002).

CA enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynamaktadır. Doku / organlar ile akciğer arasındaki CO_2 / bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda (Şekil 1.2), pH ve CO_2 homeostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alır (Chegwidden *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2000).



Şekil 1.2. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değişiricisi. Bu kotransport sistemi, transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan HCO₃⁻'ın giriş ve çıkışını sağlar. Görevi kanın CO₂ taşıma kapasitesini artırmaktır (Lehninger 2000).

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 sayısı 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 fraksiyonlarında da yerleşebilirler (Devlin 2002).

Hayvanlar aleminde karbonik anhidraz'ın 16 izoenzimi vardır. Bunların beş tanesi sitoplazmik (CA I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), üç tanesi nonkatalitiktir (VIII, X, XI) (Supuran *et al.* 2003; Supuran *et al.* 2004). CA-XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu

belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izozimlerinin tümörojen olduğu belirlenmiştir (Nishimori 2004; Hilvo *et al.* 2005).

İnsanda farklı izoenzimlerin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu dokular arasında; akciğer, böbrek, gastrik mukoza, göz lensi, tükürük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokular başta gelmektedir ve bunların çoğundan CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır (Hewett-Emmett 2000; Sugrue 2000).

Genelde insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucu izoenzimler ortaya çıkarılmıştır. 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 almasıdır (Şekil 1.2). 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 izoenzimi karbonik anhidrazın en çok çalışılan formudur. Bu izoenzimin turnover sayısı 25°C 'de 10^6 s^{-1} olarak bulunmuştur. İnsan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan HCA-II izoenzimi miktarı 2 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır ve bu değer HCA-I'e kıyasla daha azdır.

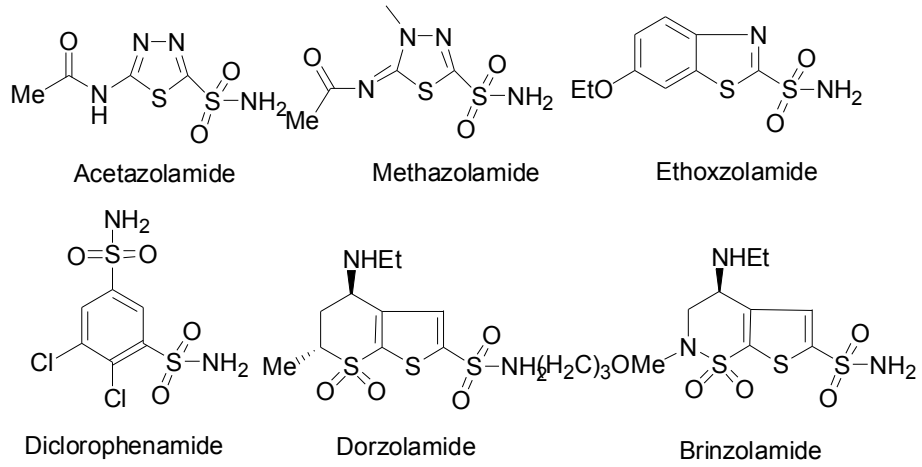
Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda ise, HCA-II ve HCA-IV izoenzimleri bol miktarda bulunmaktadır. Bu dokuda bulunan HCA-II izoenziminin önemi, glaucoma hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır (Renzi *et al.* 2000). Böbrek korteksinde ise membrana yapışık halde olan HCA-II izoenzimi ile Na^+

ve H₂O'nun geri emilimi sağlanmaktadır. HCA-II izoenzimi ile ilgili olarak CA-II eksikliği sendromu belirlenmiştir. Bunun da; kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu da HCA-II izoenziminin kemik, böbrek ve beyin dokuları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Maren *et al.* 1997).

1.4. Karbonik Anhidrazın Önemli İnhibitörleri

1.4.1. Sülfonamidler

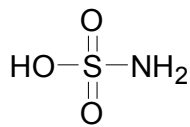
CA'nın en güçlü organik inhibitörleri aromatik veya hetero aromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler $-SO_2NH_2$ fonksiyonel grubuna sahip bileşiklerdir. Sülfon amidlerin genelde CA-II için K_i değerleri 10^{-5} ile 10^{-10} M arasında değişir. Glokom hastalığı tedavisinde CA'nın güçlü inhibitörlerinden olan asetazolamid kullanılmaktadır. Oral yoldan verilen bu ilacın oldukça fazla yan etkileri vardır. Bu yan etkileri azaltmak ve daha etkili bir ilaç molekülü bulmak amacıyla bir çok sülfonamid türevi sentezlenmiş ve göz epitelyumunda bulunan hCA-II üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır (Supuran and Scozzafava 2001; Bulbul *et al.* 2002). Günümüzde sülfonamidler glokom hastalığı tedavisi dışında diüretik, antibakteriyel ve antifungal ilaç olarak yaygın kullanıma sahiptirler. Bu sebepten dünyanın bir çok yerinde farklı gruplar tarafından yeni sülfonamid türevleri sentezlenmektedir. Asetazolamid, metazolamid, etazolamid, diklofenamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi bazı önemli sülfonamid türevleri aşağıda verilmiştir. Sülfonamidler antiglokom ilacı kullanımının yanı sıra CA-IX ile kanser dokularının direk ilişkisi olması sebebiyle kanser teşhisinde kullanılabilmektedir. Ayrıca CA enzimi inhibitörü olan bu moleküllerin yapılan birçok çalışma sonucunda antiobezite, antifungal, antibakteriyel, diüretik ilaç olarakta kullanılabileceği belirtilmiştir (Supuran 2008).



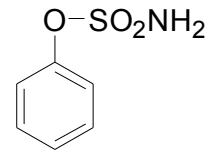
1.4.2. Sülfamatlar

Sülfamatlar $-\text{OSO}_2\text{NH}_2$ fonksiyonel grubuna sahip bileşiklerdir. Önceleri sülfonamidler sınıfına dahil edilen bu bileşikler daha sonra ayrı bir alt grup olarak adlandırılmıştır. Sülfamatlar günümüzde karbonik anhidraz inhibitörü olmalarının yanı sıra antibiyotik, antiviral, antikanser, antikonvulsant, antiobezite, anti-artrit ajanı, anti-osteoporoz ajanıdır. Sülfamatlar hiperlipidemi ve ateroskleroz tedavisinde de kullanılmaktadır.

Karbonik anhidraz izoenzimleri üzerinde en basit yapılı sülfamat olan sülfamik asittir. Briganti ve arkadaşları tarafından incelenmiştir. Sonraki çalışmalarda çeşitli aromatik sülfamat türevleri sentezlenerek karbonik anhidraz izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir (Abbate *et al.* 2002; Ahmed *et al.* 2001).



Sülfamik asit



Aromatik sülfamat

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından ve birbirlerinden habersiz olarak keşfedilmiştir. Meldrum ve Roughton (1933) insan eritrosit karbonik anhidraz enzimini yüksek oranda saflaştırmalarına rağmen sığır eritrositlerinden saflaştırmayı 1930'lu yılların sonlarında gerçekleştirebilmiştir. Keilin ve Martin (1944), CA aktivitesinin çinko içeriği ile orantılı olduğunu bularak çinkonun katalizlemede spesifik rolü olduğunu bildirmişlerdir. Böylece CA enzimi tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçmiştir.

Memeli dokularında şimdiye kadar 16 adet CA izoenzimi belirlenmiş ve bu izoenzimlerin farklı canlıların hangi dokularında eksprese oldukları araştırılmış ve hala bu konuda çalışmalar sürdürülmektedir (Lönnerholm *et al.* 1985; Okuyama *et al.* 1995; Christie *et al.* 1997; Raisanen *et al.* 1999).

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için en çok uygulanan metod afinite kromatografisidir. Karbonik anhidraz enzimi ilk kez 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından bir afinite jeli kullanılarak saflaştırılmış, daha sonra 1975 yılında Whitney'in, 1976'da Chanpagnol'un, 1980 yılında Wistrand ve arkadaşlarının ve 1996'da Arslan ve arkadaşlarının, 2004'te Ozensoy ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda farklı afinite jelleri sentezlenmiştir.

Çizelge 2.1. 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	CH ₂ CHOHCH ₂ O-(CH ₂) ₄ O(CH ₂) ₂ CHO	Belirtilmemiş	İnsan böbreği, sığır göz lensi
CM-Sephadex G-150	p-Aminobenzen sülfonamide	NH ₂ (C ₆ H ₄)NHCOCH ₂ -	17-23 mg/ml jel	İnsan, kedi ve maymun eritrositleri
Sepharose-4B	2-Amino- 1,3,4-tiyadizol-5 sülfonamid	NH ₂ (CH ₂) ₅ COOH NH ₂ (CH ₂) ₁₀ COOH	Belirtilmemiş	Bitki fotosentetik hücreleri
CM-Bio-jel A	p-Aminobenzen sülfonamide	-CH ₂ 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

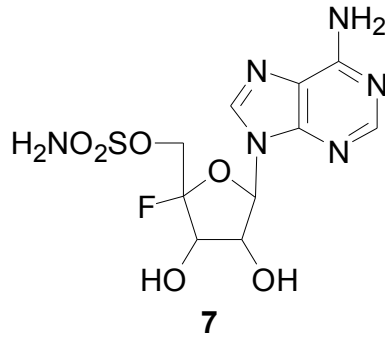
Karbonik anhidraz enzimleri pek çok dokudan saflaştırılmış ve molekül kütleleri belirlenmiştir. Burt ve arkadaşlarının 1992’de yaptıkları bir çalışmada literatürde yüz sineği olarak ifade edilen *Musca autumnalis* larvalarından CA saflaştırılmış SDS-PAGE yapılarak enzimin saflığı kontrol edilmiş ve molekül kütlesi 32.000 Da olarak belirlenmiştir. Daha sonra enzimin doğal molekül kütlelerini belirlemek amacıyla jel filtrasyon kromatografisi yapılmış ve 31.000 Da olarak tespit edilmiştir. Böylece enzimin aktif formunun monomerik yapıda olduğu gösterilmiştir. Krungkrai ve arkadaşlarının (2001), yaptıkları bir araştırmada, *Plasmodium falciparum*’dan saflaştırılan CA’nın molekül kütlesi 32.000 Da olarak belirlenmiştir.

CA enzimleri hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıklarının bir çoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar karbonik anhidraz izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Bulbul *et al.* 2003). Örneğin insanlarda glokom hastalığında CA

inhibitörleri farmakolojik ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Casini *et al.* 2002).

Sülfamatlar, günümüzde carbonik anhidraz inhibitörü olmalarının yanı sıra antibiyotik, antiviral, antikanser, anticonvulsant, antiobezite, anti-artrit ajanı, anti-osteoporoz ajanı, hiperlipidemi ve aterosklerosis tedavisinde kullanılmaktadır (Winum *et al.* 2005).

Aminoasıl tRNA sentaz inhibitörü antibiyotik sülfamatlar: 1957 yılında *Streptomyces calvus*'dan izole edilen doğal bir nükleotid sülfamat olan nucleocidin(7)'in hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerde çok etkili olduğu belirlenmiştir. Fakat çok toksik olması nedeniyle klinikte kullanılamamıştır. Etki mekanizmasının aminoasıl tRNA sentaz inhibitörü olduğu belirlenmiş ve birçok sentetik analogu sentezlenerek klinikte kullanılmıştır.

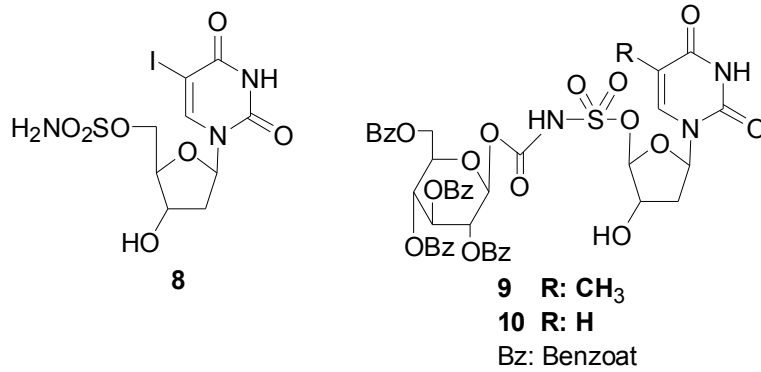


Anti-viral sülfamatlar: Virüslerin sebep olduğu hastalıklar dünya çapında büyük bir problemdir. Dünyada en büyük problem olan HIV virüsünün sebep olduğu AIDS hastalığının tedavisi için geliştirilen anti-viral ilaçlar genelde HIV virüsünün reverse transkriptaz enzimini, proteaz enzimini yada ikisini birden inhibe eden nükleotid türevi inhibitörlerdir. Anti-viral ilaçlar AIDS'in yanı sıra hepatit B, hepatit C, herpes simplex, varisella zoster, grip v.b viral hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

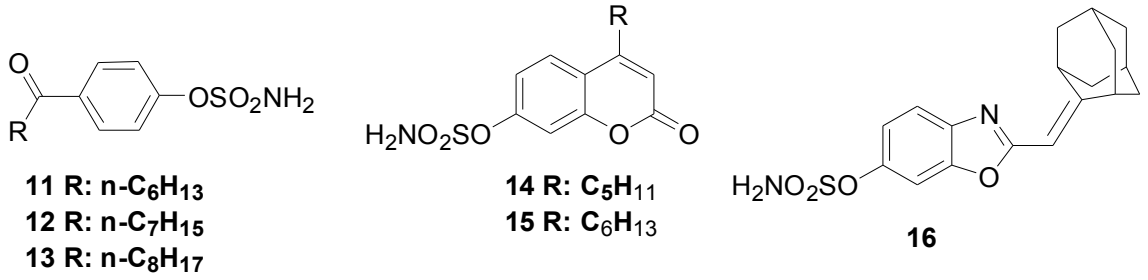
Günümüzde yeni anti-viral ilaç sentezi üzerine çalışan birçok grup vardır. Bunlardan biri olan Jennings ve arkadaşlarının (1992) yaptığı çalışmada yeni deoksiuridin analoglarının anti-viral etkisi incelenmiş sentezlenen bileşikler içerisinde yer alan 5-iodo-2'-deoksiuridin-5'-difosfat'ın sülfamat türevinin(8) herpes simplex tip 1 virüsüne karşı çok etkili olduğu görülmüştür.

Sonrasında Camarasa ve arkadaşlarının (1985) sentezlediği yeni nükleosid antagonistlerinin(9, 10) düşük dozlarda bile MT-4 hücrelerinde anti-HIV aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.

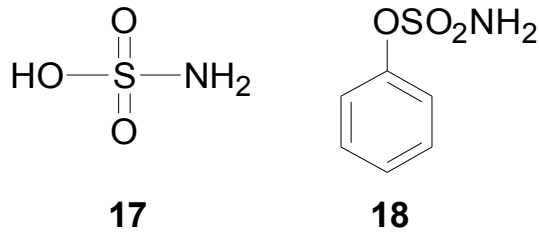
Bu ve benzeri çalışmalar sebebiyle yeni sentezlenen sülfamatların anti-viral potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.



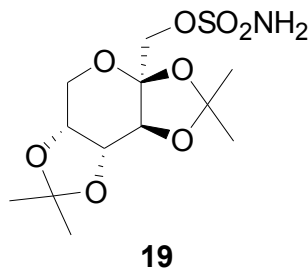
Anti-kanser sülfamatlar: Bu amaçla kullanılan maddeler steroid sülfataz inhibitörleridir. Steroid sülfataz inhibitörleri hormon kaynaklı kanserlerin yanı sıra androjen kaynaklı deri hastalıklarında da tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Ahmed ve arkadaşları (2002) tarafından sentezlenen bazı aromatik sülfamatların (11, 12, 13) kuvvetli steroid sülfaz inhibitörleri olduğu belirlenmiştir. Malini ve arkadaşları (2000) tarafından sentezlenen bazı hetero halkalı sülfamatların (14, 15) ve Schreiner ve arkadaşlarının (2003) sentezlediği (16) steroid sülfataz inhibitörlerinin çok düşük konsantrasyonlarda etkili inhibitörler olduğu belirlenmiştir.



Karbonik anhidraz inhibitörü sülfamatlar: Karbonik anhidraz izoenzimleri üzerinde en basit yapılı sülfamat olan sülfamik asittir (17) Briganti ve arkadaşları (1996) tarafından incelenmiştir. Sonraki çalışmalarda çeşitli aromatik sülfamat türevleri (18) sentezlenerek karbonik anhidraz izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir.



Anti-konvulsant sülfamatlar: Bir sülfamat türevi olan ve klinikte yaygın kullanımı olan topiramat (19) çeşitli epilepsi hastalıklarında kullanılmaktadır. Bu ilacın etki mekanizması henüz çözülememiştir fakat nöronlardaki Na⁺ kanal aktivasyonunu inhibe ederek etki gösterdiği düşünülmektedir. Karbonik anhidrazlarında aynı bölgedeki Na⁺ iyonu akışında görev almasından dolayı son yıllarda karbonik anhidraz inhibitörlerinin anti-konvulsant etkiye sahip olduğuna dair çalışmalar yapılmaktadır.



Anti-obezite sülfamatlar: Obezite gelişen dünyanın en büyük problemlerinden biridir. Bu yüzden de ilaç sanayisi anti-obezite ajanları sentezi üzerinde çalışmaktadırlar. Gordon ve arkadaşlarının (1999) yaptığı çalışma sonucunda obez epilepsi hastalarında topiramat ilacı kullanıldığında ilacın yan etkisi olarak hastaların vücut ağırlıklarının %20'sini kaybettiği belirlenmiştir. Antel ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmada ise bunun mitekondrial bir enzim olan karbonik anhidraz V izoenziminin inhibisyonu sonucu olduğu düşünülmektedir. Çünkü karbonik anhidraz V izoenzimi memelilerde üroenez, glukoneogenez ve lipogenez gibi birçok metabolik yolda görev almaktadır. Karbonik anhidraz V izoenzimine bu metabolik fonksiyonlarını yerine getirirken sitozolik bir enzim olan karbonik anhidraz II izoenzimininde yardım ettiği düşünülmektedir.

Hiperlipidemi ve aterosiklerosis tedavisinde sülfamatlar: Son yıllarda yapılan çalışmalar bir açıl sülfamat olan avasimib maddesinin açıl koenzim A: kolesterol açıltransferaz (ACAT; EC 2.3.1.26) enzimini inhibe ederek plazma lipid seviyesini azalttığı belirlenmiş, hiperlipidemi ve aterosiklerosis tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

3. MATERİYAL 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, Sepharose 2B, 4B ve 6B 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 -merkaptotetanol; çalışmada kullanılan antibiyotikler ise piyasadan temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Masa santrifüjü	: MSE Mistral 2000
Soğutmalı santrifüj	: Heraeus Sepatech (Suprafuge 22)
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: CHEBIOS 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	: Chiltan Hotplate Magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Clifton
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Automatic ice machines)
Liyofilizatör	: Snijders
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Arçelik
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar):	Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar):	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.

1. 0,2 M NaHCO_3 , pH=8,8 (Sephacrose matrisleri üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g NaHCO_3 , 950 ml destile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH=8,8'e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.
2. 25 mM Tris-HCl/0,1M Na_2SO_4 , pH=8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na_2SO_4 , 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 Tris-HCl/22 mM Na_2SO_4 , pH=8,7 (hemolizatin tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon) 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na_2SO_4 , 950 ml destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.
4. 0,1 M NaCH_3COO / 0,5 M NaClO_4 , pH=5,6 (kolona tutunmuş hCA-II enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,04 g $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve 9,187 g NaClO_4 120 ml destile su ile çözülerek, 1 N HCl ile pH = 5,6'ya getirildikten sonra destile su ile hacim 150 ml'ye tamamlandı.

5. %0,9'luk NaCl (Homojenatın yıkanması için kullanılan çözelti): 4,5 g NaCl alınıp hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.
6. 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.
7. %0,02'lik NaN₃ çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti): 20 mg NaN₃ alınarak hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Yıkama çözeltisi (elektroforez jelinin yıkanması için kullanılan çözelti): %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
12. Sabitleştirme çözeltisi (elektroforez jelindeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
13. 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.
14. 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.
15. CO₂ çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0°C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.

16. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi (CO_2 -hidrataz aktivitesinde indikatör olarak kullanılan çözelti): 0,1 g indikatörün 16 ml 0,01 N NaOH içerisinde çözöldükten sonra hacminin saf suyla 250 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
17. 1 M Tris-HCl pH=8,8 : 12,1 g Tris 90 ml suda çözölüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
18. 1 M Tris-HCl pH=6,8 : 2,42 g Tris 5 ml suda çözölüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 20 ml'ye tamamlandı.
19. %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi: 6 g akrilamid, 0,16 g bisakrilamid alınıp 13,84 ml suda çözöldü.
20. %10'luk SDS çözeltisi: 0,5 g SDS alınıp 4,5 ml suda çözöldü.
21. Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/ml; protein tayini için kullanılan çözelti): 25 mg standart serum albuminin 25 ml saf suda çözölmesiyle 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, 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

çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı ve absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini 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 hidrasyonu 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 (t₀). 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 (EU) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Yani; $EU = (t_0 - t_c) / t_c$ 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 absorpsiyon vermektedir ($\epsilon_{348} = 5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Verpoorte *et al.* 1967).

Tayin işlemlerinde su 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. p-nitrofenil asetat 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

Sepharose 2B, 4B ve 6B matriksleri önce KMnO₄ ile reaksiyona sokularak serbest -CH₂OH grubu COOH'a dönüştürüldü, daha sonra bu grup SOCl₂ ile açıl klorürüne çevrilerek daha reaktif hale getirildi. Bu işlemde sonra matriks kurutuldu ve uzantı kolu (anilin) eklendi. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak aniline kenetlendirildi. Burada anilin, afinite jelinin uzantı kolunu; sülfanilamid ise 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).

a. Reaktif Sepharose 4B'ye anilin takılması: 40 ml Sepharose matriksleri alınarak önce saf su ile yıkandı. 0,1 gram KMnO_4 ilave edilerek yarım saat karıştırıldı. Saf su ile yıkandı ve etil alkol içine alındı. Daha sonra etil alkol evaporatörde uzaklaştırıldı. Daha sonra jeller yaklaşık 30 ml metilen klorür içine alındı, içine 100 μl SOCl_2 katıldı. 2 dakika karıştırıldıktan sonra aktif Sepharose matriksleri elde edilmiş oldu. Aktif Sepharose matriksleri 25ml CH_2Cl_2 içerisine alınıp üzerine 200 mg anilin ilave edildi. Bu işlem sonrası anilin fazlasını uzaklaştırmak için önce 50 ml etanol ile daha sonra da saf su ile jel yıkandı. Son olarak, 100 ml 0,2 M NaHCO_3 tamponu ile (pH=8.8) tekrar yıkandı ve anilin takılı jel aynı tamponun 40 ml'si içine alındı.

b. Sülfanilamid kenetlendirilmesi: 50 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 ml 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 150 mg NaNO_2 bulunan 0°C 'deki 5 ml çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 ml Sepharose-4B-anilin süspansiyonuna ilave edildi. pH, 1 M NaOH ile 9.5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 litre saf su ve 200 ml 0.05 M Tris-SO_4 (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 $+4^\circ\text{C}$ '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 olundu (Hunaiti and Soud 2000).

3.2.4.b. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH=7,8) 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 1M NaCl/25mM Na₂HPO₄ (pH=6,3) tamponu tatbik edilerek hCAI enzimi; daha sonra 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH=5.6) çözeltisi kolona tatbik edilip hCAII 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 20 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 saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısaçarla

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 kuruması önlendi. 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).

Ayırma 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, (NH₄)₂S₂O₈] eklendi.

Yığma 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 benzensülfonamidlere bağlanması ortamın izoenzim çeşidi, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetine bağlıdır (Pocker and Sarkanen 1979). Bundan dolayı hazırlanan jellerinin 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 enzimleri ile yapıldı ve tampon olarak pH=9 olan 0,1 M Tris-SO₄ çözeltisi kullanılarak 2, 5, 10, 15, 20 ve 25°C sıcaklıklarda belirlenen değerler grafiklerde gösterildi (Şekil 4.7, Şekil 4.11, Şekil 4.15).

3.2.5.b. pH'nın kolon kapasitesine etkisi

Bu bölümdeki deneyler pH'sı 7,5 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 4.8, Şekil 4.12, Şekil 4.16).

3.2.5.c. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisi

hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için pH=9'de ve 25°C'de yapılan bu deneylerde iyonik şiddet 0,2 ile 0,5 arasında değiştirildi (Şekil 4.9, Şekil 4.13, Şekil 4.17).

3.2.6. Siklohekzen epoksit ile sülfamik asitten (1*R*(*S*),2*R*(*S*))-2-hidroksisiklohekzil sülfamat'ın sentezi

700 mg (7.1 mmol) siklohekzen epoksit ve 1377 mg (14.2 mmol) sülfamik asit alınarak termoliz tüpüne kondu. Tüpe 5 ml asetonitril ilave edildikten sonra tüpün kapağı kapatılarak 110°C'daki yağ banyosunda 14 saat bekletildi. Soğutulan karışımın çözücüsü vakumda uzaklaştırıldıktan sonra kalıntı %15'lik etilasetat/hekzan çözeltisiyle silikajel ince tabakada yürütüldü. İnce tabakadan sarı yağimsı halde (1*R*(*S*),2*R*(*S*))-2-hidroksisiklohekzil sulfamat 1153 mg (%83) elde edildi.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5.78 (bs, 1H), 4.36-4.24 (m, CHOSO₂NH₂, 1H), 3.84-3.52 (m, CHOH, 1H), 2.27-1.11 (m, CH₂, 8H); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 88.0, 74.7, 35.1, 33.0, 26.0, 25.6; IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹) 3340, 3311, 2939, 2864, 1649, 1560, 1453, 1366, 1247, 1180, 1076, 1043, 991, 929, 875, 814 (Şekil 4.19, Şekil 4.20).

3.2.7. Salisilik asitin sülfamat esterinin sentezi

500 mg (3.62 mmol) salisilik asit, 0.25 ml (7.24 mmol) %96'lık formik asit ve 0.64 ml (7.24 mmol) klorosülfonil izosiyanat (CSI) alınarak 50 ml'lik bir balona kondu. Karışıma 10 ml asetonitril ilave edildikten sonra geri soğutucu altında (kurutucu başlık takılmış) oda sıcaklığında 4 saat karıştırıldı. Karışımın çözücüsü vakumda uzaklaştırıldıktan sonra kalıntıya 15 ml etilasetat ilave edildi. Organik faza 30 ml su ilave edildi ve karışıma gaz çıkışı olmayıncaya kadar NaHCO₃ ilave edildi. Daha sonra ayrılan organik faz su (3x10 ml) ile yıkandı. Organik faz MgSO₄ üzerinden kurutuldu. Çözücü vakumda uzaklaştırıldı. Elde edilen beyaz renkli katı 2-sülfamoiloksi-benzoik asidin erime noktası 143°C olarak bulundu.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.17 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, =CH, 1H), 7.74 (td, *J* = 7.9, 1.5, Hz, =CH, 1H), 7.49 (td, *J* = 7.9, 1.5, Hz, =CH, 1H), 7.37 (d, *J* = 7.9 Hz, =CH, 1H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 163.0; 150.9; 136.0; 132.9; 127.5; 125.2; 122.7 (Şekil 4.24-4.25)

3.2.8. 5-Sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin sentezi

1000 mg (4.59 mmol) 5-sülfosalisilik asit, 0.25 ml (7.18 mmol) %96'lık formik asit ve 0.64 ml (7.18 mmol) klorosülfonil izosiyanat alınarak 50 ml'lik bir balona kondu. Karışıma 10 ml asetonitril ilave edildikten sonra geri soğutucu altında (kurutucu başlık takılmış) oda sıcaklığında 16 saat karıştırıldı. Karışımın çözücüsü vakumda uzaklaştırıldıktan sonra kalıntıya 15 ml etilasetat ve 30 ml su ilave edildikten sonra karışıma gaz çıkışı olmayıncaya kadar NaHCO_3 ilave edildi. Oluşan ürünün etil asetat fazına geçmediği görüldü. Bu yüzden su fazı alınıp çözücü vakumda uzaklaştırıldı. Elde edilen kalıntının metanolde çözünen kısmı alınıp vakumda metanol uzaklaştırıldı. Elde edilen beyaz renkli katı 2-sulfamoyiloksi-5-sulfo-benzoik asitin erime noktası 129°C olarak bulundu.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 15.91 (m, OH, 1H), 8.42 (m, HO, 1H), 8.02 (d, $J = 2.2$, H_2 , =CH, 1H), 7.43 (dd, $J = 8.4, 2.2$, H_2 , =CH, 1H), 6.57 (d, $J = 8.42$, H_2 , =CH, 1H), 5.63 (m, NH_2 , 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ 1727; 163.6; 136.8; 130.1; 128.7; 119.2; 115.5 (Şekil 4.26-Şekil 4.27).

3.2.9. 4-Sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin sentezi

1000 mg (4.59 mmol) 4-sülfosalisilik asit, 0.25 ml (7.18 mmol) %96'lık formik asit ve 0.64 ml (7.18 mmol) klorosülfonil izosiyanat alınarak 50 ml'lik bir balona kondu. Karışıma 10 ml asetonitril ilave edildikten sonra geri soğutucu altında (kurutucu başlık takılmış) oda sıcaklığında 16 saat karıştırıldı. Karışımın çözücüsü vakumda uzaklaştırıldıktan sonra kalıntıya 15 ml etilasetat ve 30 ml su ilave edildikten sonra karışıma gaz çıkışı olmayıncaya kadar NaHCO_3 ilave edildi. Oluşan ürünün etil asetat fazına geçmediği görüldü. Bu yüzden su fazı alınıp çözücü vakumda uzaklaştırıldı. Elde edilen kalıntının metanolde çözünen kısmı alınıp vakumda metanol uzaklaştırıldı.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 16.91 (m, OH, 1H), 8.51 (m, HO, 1H), 8.09 (d, $J = 2.2$, H_2 , =CH, 1H), 7.43 (dd, $J = 8.7, 2.2$, H_2 , =CH, 1H), 6.77 (d, $J = 8.42$, H_2 , =CH,

¹H), 5.63 (m, NH₂, 2H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 1727; 183.6; 139.6; 130.1; 129.3; 121.2; 115.5 (Şekil 4.28-Şekil 4.29).

3.2.10. *trans*-Stilben epoksit ile sülfamik asitten 2,2-difenilasetaldehit sentezi

300 mg (1,53 mmol) *trans*-Stilben epoksit ve 150 mg (3,06 mmol) sülfamik asit alınarak termoliz tüpüne kondu. Tüpe 5 ml asetonitril ilave edildikten sonra tüpün kapağı kapatılarak 85°C'daki yağ banyosunda 14 saat bekletildi. Soğutulan karışımın çözücüsü vakumda uzaklaştırıldıktan sonra kalıntı %2'lik etilasetat/hekzan çözeltisiyle silikajel kolonundan yürütüldü. Kolondan 240 mg (%80) renksiz sıvı olarak 2,2-difenilasetaldehit (**4**) elde edildi.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 9.87 (d, *J* = 2.5 Hz, CHO, 1H), 7.43-7.22 (m, C₆H₅, 10H), 4.91 (d, *J* = 2.5 Hz, CH, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 200.4, 138.4, 131.1, 131.0, 129.6, 66.1; IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹) 3061, 3029, 2896, 2721, 1954, 1885, 1809, 1724, 1657, 1599, 1494, 1451, 1389, 1279, 1177, 1079, 950 (Şekil 4.21, Şekil 4.22).

3.2.11. Stiren oksit ile sülfamik asitten *trans*-(2S(R),4S(R))-2-benzil-4-fenil-1,3-dioksolan türevinin sentezi

150 mg (1,25 mmol) stiren epoksit ve 300 mg (2,50 mmol) sülfamik asit alınarak termoliz tüpüne konulur. Tüpe 5 ml asetonitril ilave edildikten sonra tüpün kapağı kapatılarak 85°C'daki yağ banyosunda 2 saat bekletildi. Soğutulan karışımın çözücüsü vakumda uzaklaştırıldıktan sonra kalıntı %2'lik etilasetat/hekzan çözeltisiyle silikajel kolonundan yürütüldü. Kolondan 140 mg (%80) renksiz sıvı olarak *trans*-(2S(R),4S(R))-2-benzil-4-fenil-1,3-dioksolan elde edildi.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) d 7.36–7.25 (m, C₆H₅, 10H), 5.30 (t, *J*=4.6 Hz, OCH, 1H), 5.01 (t, *J*=6.8 Hz, OCH, 1H), 4.17 (dd, *J*=7.7, 6.8 Hz, AX sisteminin A kısmı, CH₂, 1H), 3.69 (dd, *J*=7.7, 6.8 Hz, AX sisteminin X kısmı, CH₂, 1H), 3.15 (dd, *J*=13.9, 4.6 Hz, AB

sisteminin A kısmı, CH₂, 1H), 3.11 (dd, J=13.9, 4.6 Hz, AB sisteminin B kısmı, CH₂, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) d 139.6, 136.2, 130.2, 128.7, 128.6, 128.4, 126.6, 126.6, 105.6, 78.7, 72.2, 41.0 (Şekil 4.23).

3.2.12. İnhibitörler için IC₅₀ ve K_i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar

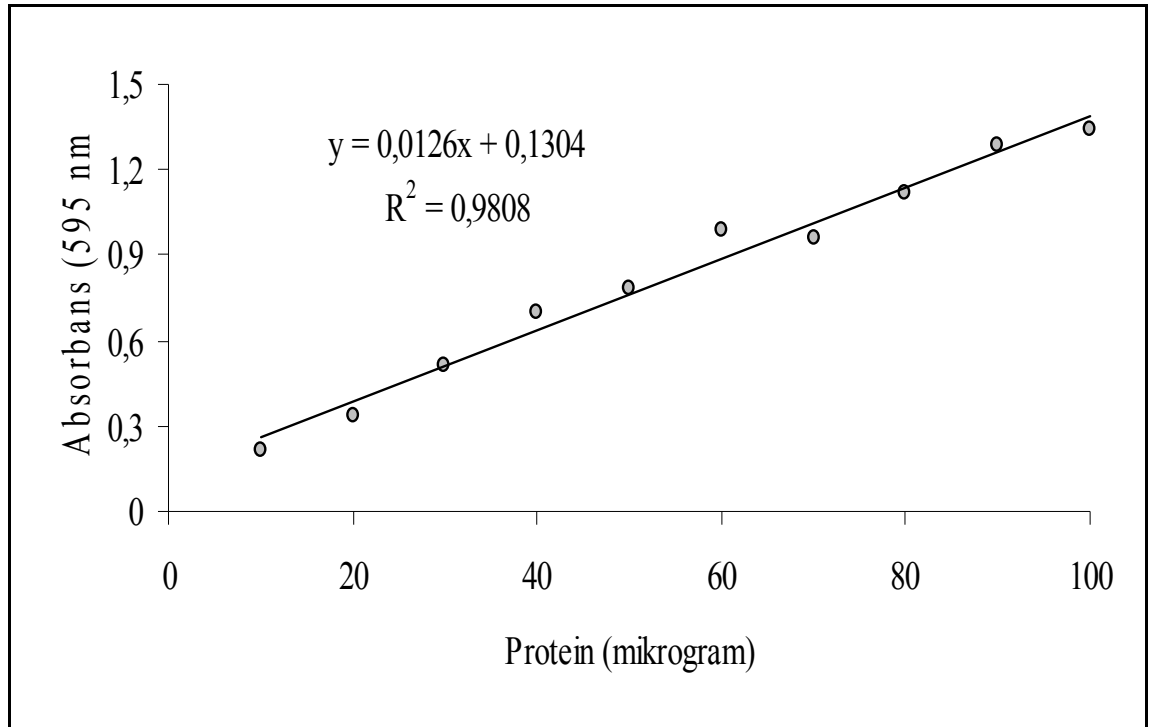
Salisilik asit, 5-sülfo salisilik asit, 4-sülfo salisilik asit, sikloheksan epoksidin sülfamat türevleri ve 2,2-difenilasetaldehit için farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak %aktivite-[I] olarak grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde I₅₀ değerleri hesaplandı.

Bu inhibitörlerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla insan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz I ve II izoenzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu ile bu değerin altında 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 yarı yarışmalı ve yarışmasız inhibisyon için $V_{\max} = V_{\max}^I (1 + [I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

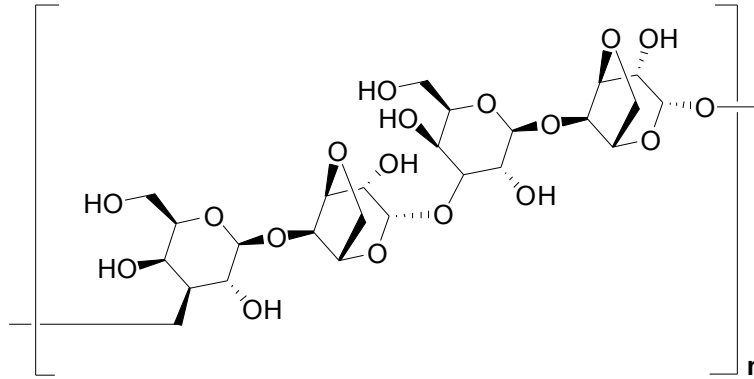
Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla önce standart grafik hazırlandı. Elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra bu standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı (Şekil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



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

4.2. Saflaştırma Sonuçları

Proje kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, bu bölümde çizelge ve şekiller ile gösterildi. Şekil 4.2’de Sepharose 2B, Sepharose 4B ve Sepharose 6B polimerlerinin genel kimyasal yapısı verilmektedir. Çizelge 4.1-4.3’de, insan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Sepharose 2B-anilin-sülfanilamid, Sepharose 4B-anilin-sülfanilamid ve Sepharose 6B-anilin-sülfanilamid afinite kolon materyalleri ile saflaştırılma basamaklarının sonuçlarını vermektedir. Çizelge 4.4’de ise kıyaslama çizelgesi olarak sunulmuştur. Şekil 4.3-4.5’de ise her üç farklı jel için afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırma sonucu yapılan SDS-PAGE sonuçları verilmektedir.



Şekil 4.2. Sepharose 2B, Sepharose 4B ve Sepharose 6B polimerlerinin genel kimyasal yapısı (www.sigmaaldrich.com).

Çizelge 4.1. İnsan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Sepharose 2B-anilin-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	163	40	18,11	724,40	6520	9,00	100,0	1,0
hCA-I	402	7	0,44	3,08	2814	913,6	43,2	101,5
hCA-II	851	4	0,11	0,44	3404	7736,4	52,2	859,6

Çizelge 4.2. İnsan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Sepharose 4B-anilin-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

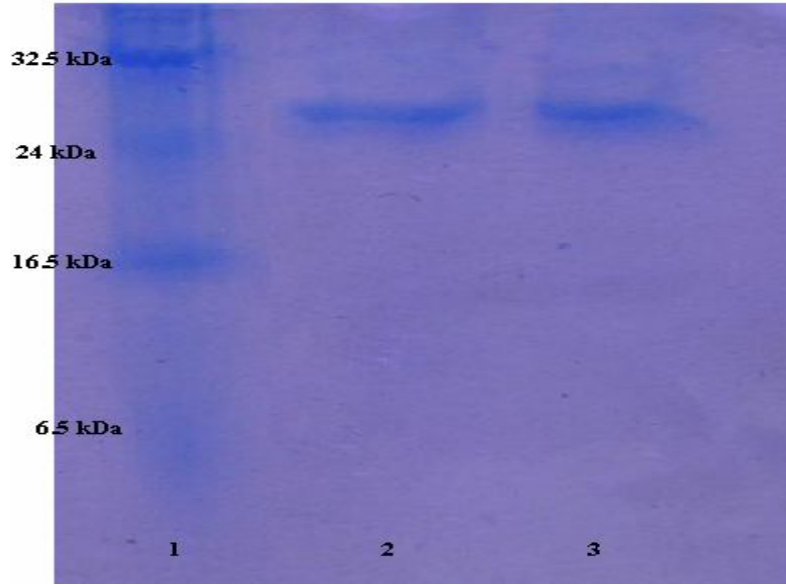
Numune türü	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	167	40	18,76	750,4	6680	8,9	100,0	1,0
hCA-I	454	8	0,48	3,8	3632	945,8	54,4	106,3
hCA-II	863	5	0,12	0,6	4315	7191,7	64,6	808,0

Çizelge 4. 3. İnsan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Sepharose 6B-anilin-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	158	40	17,9	716	6320	8,8	100	1
hCA-I	469	8	0,51	4,08	3752	919,6	59,4	104,5
hCA-II	841	4	0,13	0,52	3364	6469,2	53,2	735,1

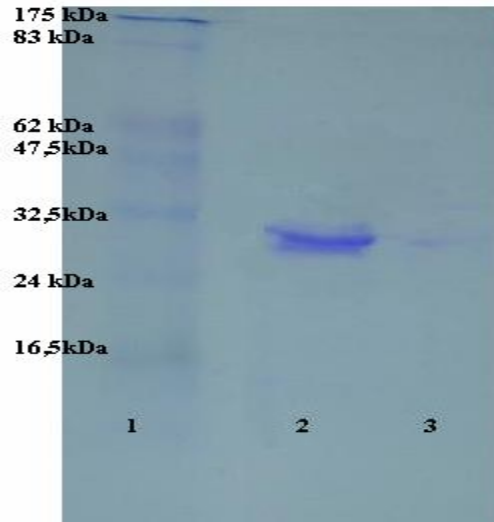
Çizelge 4.4. Afinite jellerinin kıyaslama tablosu.

Matriks türü	% verim		Saflaştırma katsayısı	
	hCA-I	hCA-II	hCA-I	hCA-II
Sepharose 2B	43,2	52,2	101,5	859,6
Sepharose 4B	54,4	64,6	106,3	808,0
Sepharose 6B	59,4	53,2	104,5	735,1



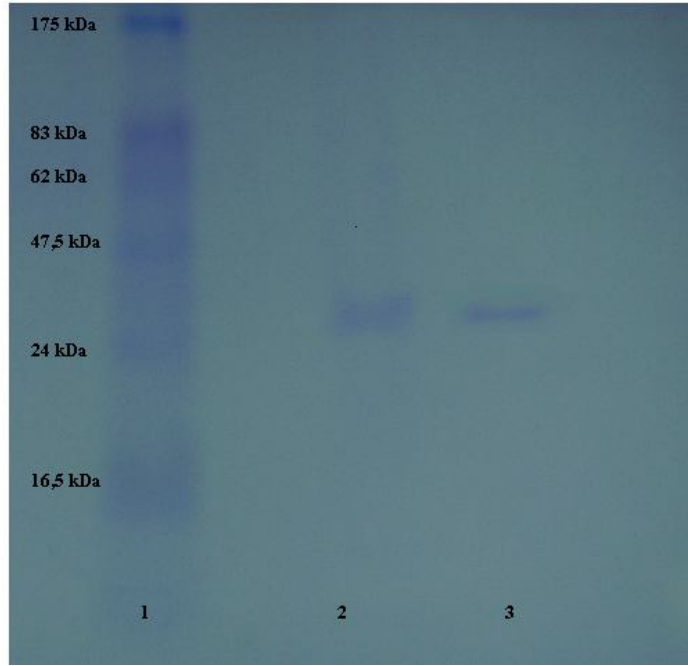
Şekil 4.3. Sepharose 2B-anilin-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırma sonucu SDS-PAGE fotoğrafı

***Kanal 1:** Standart proteinler; E.coli triozfosfat izomeras 32,5 kDa, soya tripsin inhibitörü 24 kDa, yumurta akı lizozimi 16,5 kDa, sığır akciğer aprotinin 6,5 kDa, **Kanal 2;**hCA-I, **Kanal 3;**hCA-II.



Şekil 4.4. Sepharose 4B-anilin-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırma sonucu SDS-PAGE fotoğrafı

***Kanal 1:** 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, E.coli triozfosfat izomeras 32,5 kDa, soya tripsin inhibitörü 24 kDa, yumurta akı lizozimi 16,5 kDa, **Kanal 2;**hCA-I, **Kanal 3;**hCA-II.



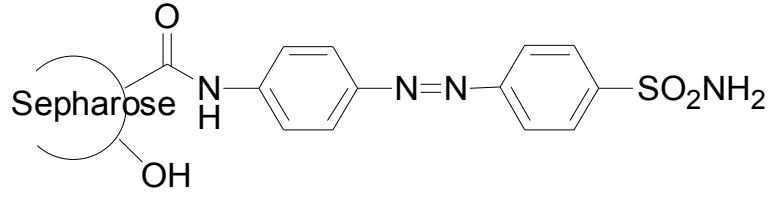
Şekil 4.5. Sepharose 6B-anilin-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırma sonucu SDS-PAGE fotoğrafı

***Kanal 1:** 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, soya tripsin inhibitörü 24 kDa, yumurta akı lizozimi 16.5 kDa, **Kanal 2;** hCA-I, **Kanal 3;** hCA-II.

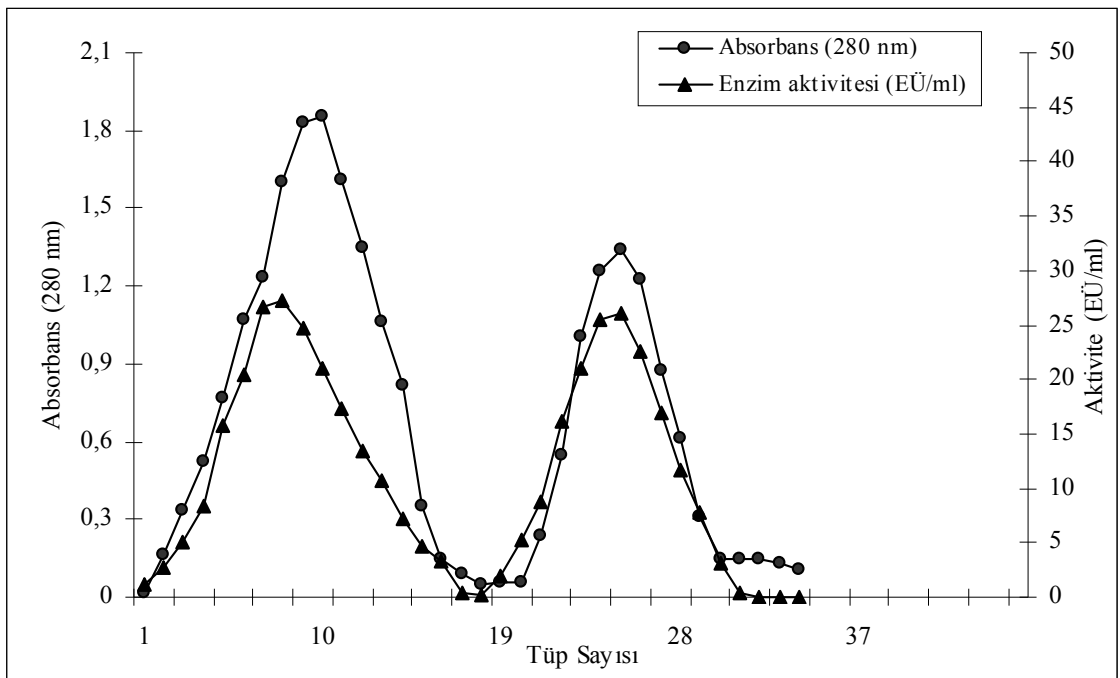
4.3.Afinite Kolonunun Farklı Sıcaklık, pH ve İyonik Şiddette CA Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi Çalışmaları Sonuçları

hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin saflaştırılması sırasında tarafımızdan sentezlenen ve sentez prosedürü bir önceki bölümde verilen jelin açık formülü Şekil 4.6'de verilmiştir. Sentezlenen her bir jel için ayrı ayrı hCA-I ve hCA-II'nin elüsyon grafikleri, sıcaklık-kapasite grafikleri, pH-kapasite grafikleri ve iyonik şiddet-kapasite grafikleri Şekil 4.7-Şekil 4.18'de verilmiştir ve optimum değerler Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.

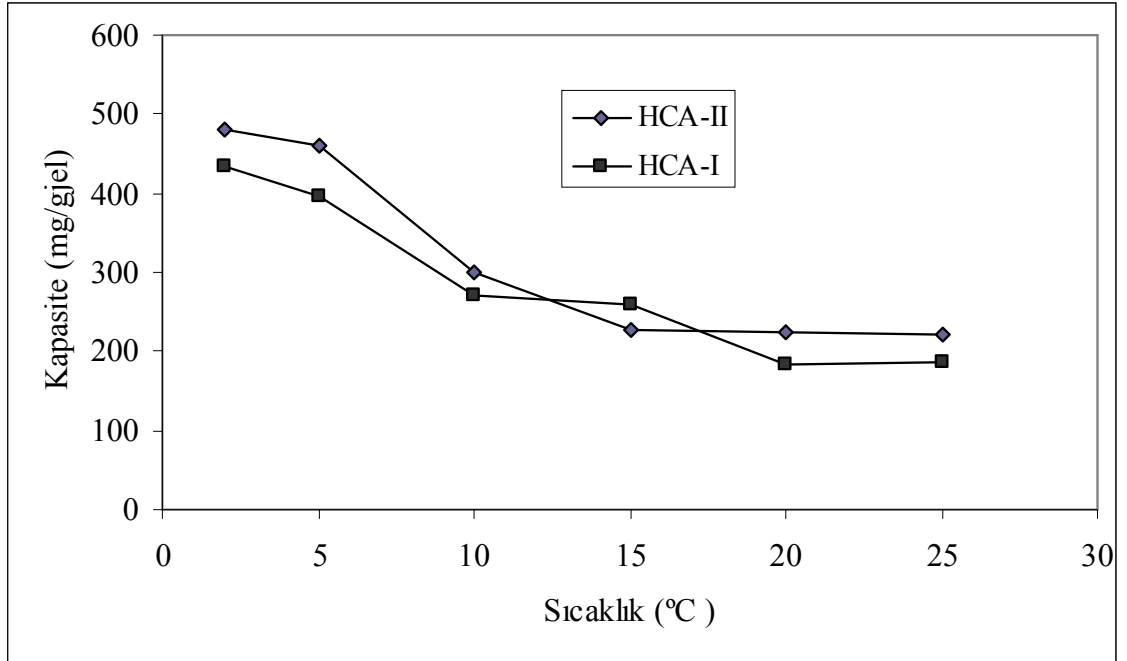
hCA-I ve hCA-II izoenzimleri tutma kapasiteleri, optimum pH, iyonik şiddet ve sıcaklıkta mg protein/ gram-jel cinsinden hesaplanarak Çizelge 4.6'de verilmiştir.



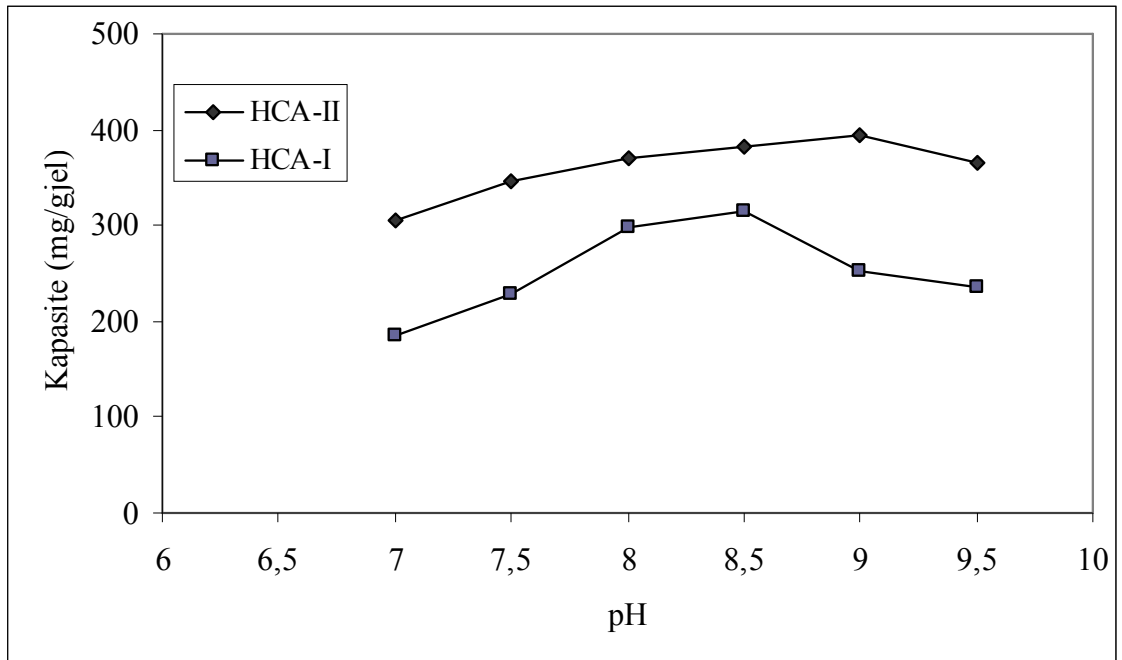
Şekil 4.6. Sepharose 2B, 4B, 6B –anilin- sülfanilamid afinite kolonunun en son hali



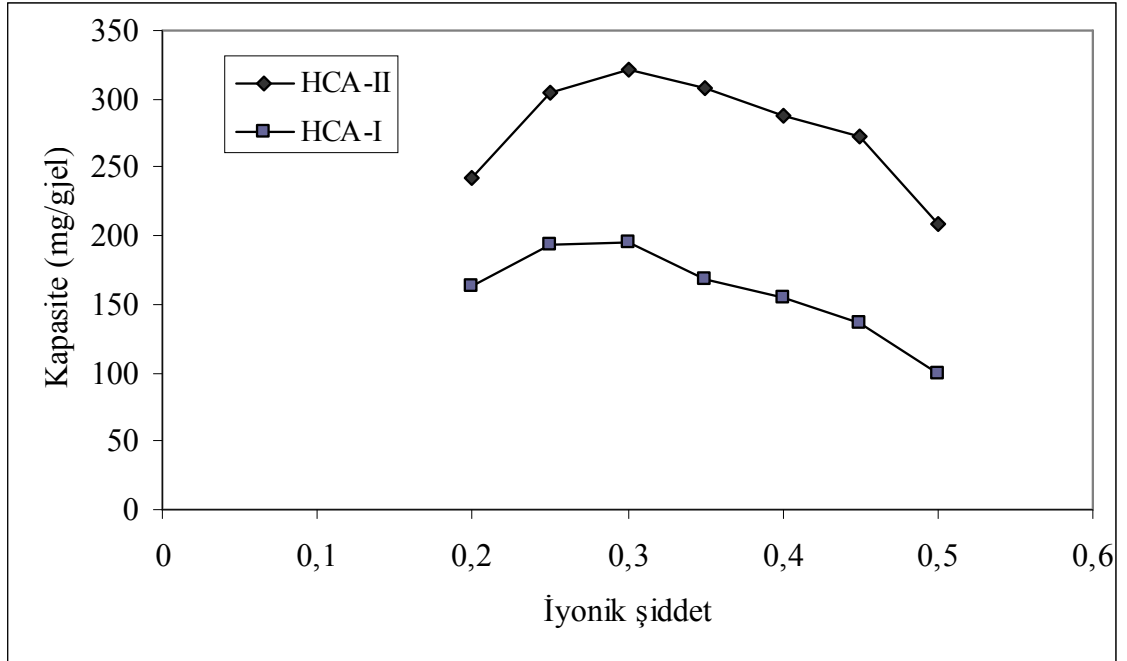
Şekil 4.7. Sepharose-2B-anilin-sülfanilamid jeli kullanılarak hCA-I ve hCA-II'nin elüsyon grafiği (1.pik : hCA-I, 1 M Cl⁻ ve 25 mM H₂PO₄⁻ ile elüsyon; 2.pik : hCA-II, 0,5 M ClO₄⁻ ve 0,1 M CH₃COO⁻ ile elüsyon).



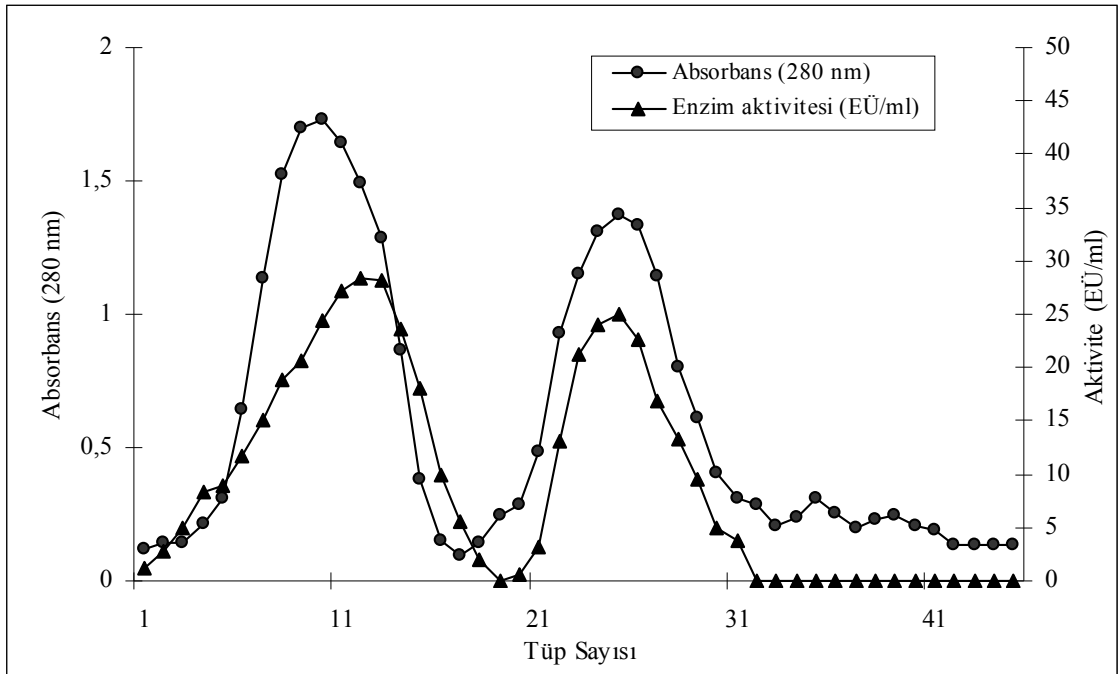
Şekil 4.8. Sepharose-2B-anilin-sülfanilamid sıcaklık-kapasite grafiği



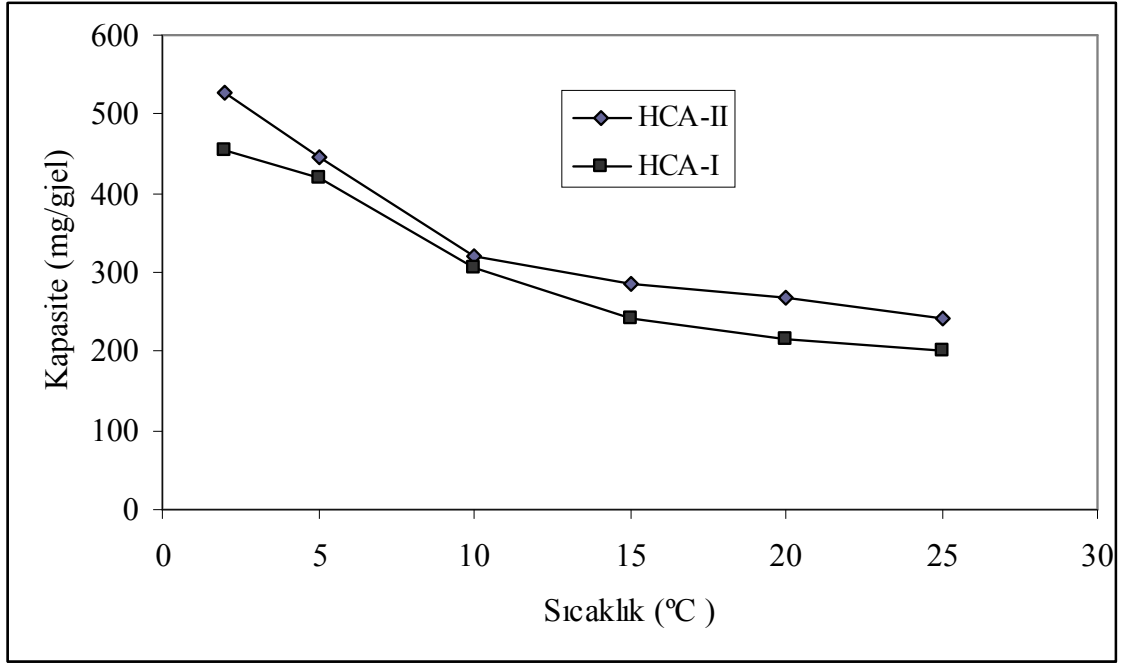
Şekil 4.9. Sepharose-2B-anilin-sülfanilamid pH-kapasite grafiği



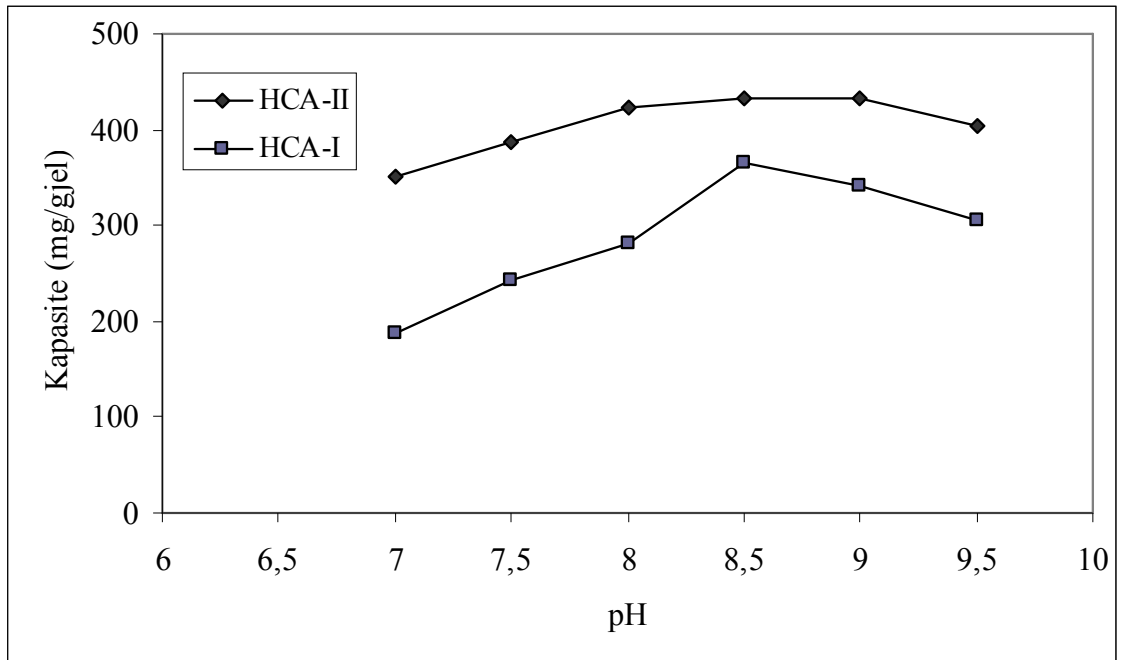
Şekil 4.10. Sepharose-2B-anilin-sülfanilamid iyonik şiddet (M)-kapasite grafiği



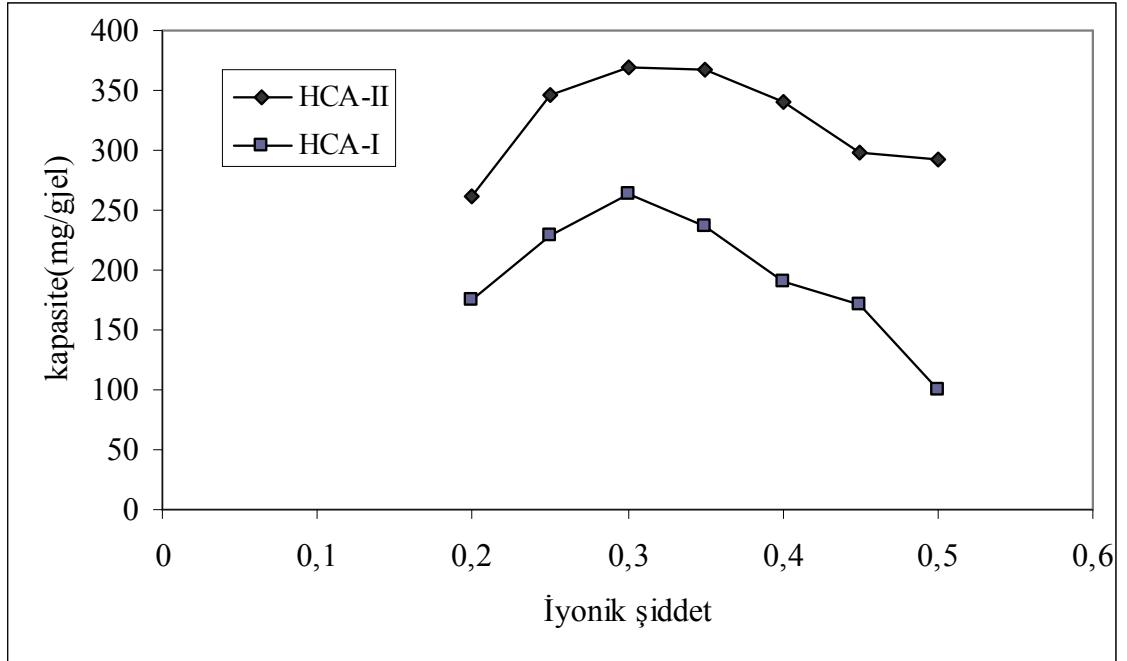
Şekil 4.11. Sepharose-4B-anilin-sülfanilamid jeli kullanılarak hCA-I ve hCA-II'nin elüsyon grafiği (1.pik : hCA-I, 1 M Cl^- ve 25 mM H_2PO_4^- ile elüsyon; 2.pik : hCA-II, 0,5 M ClO_4^- ve 0,1 M CH_3COO^- ile elüsyon).



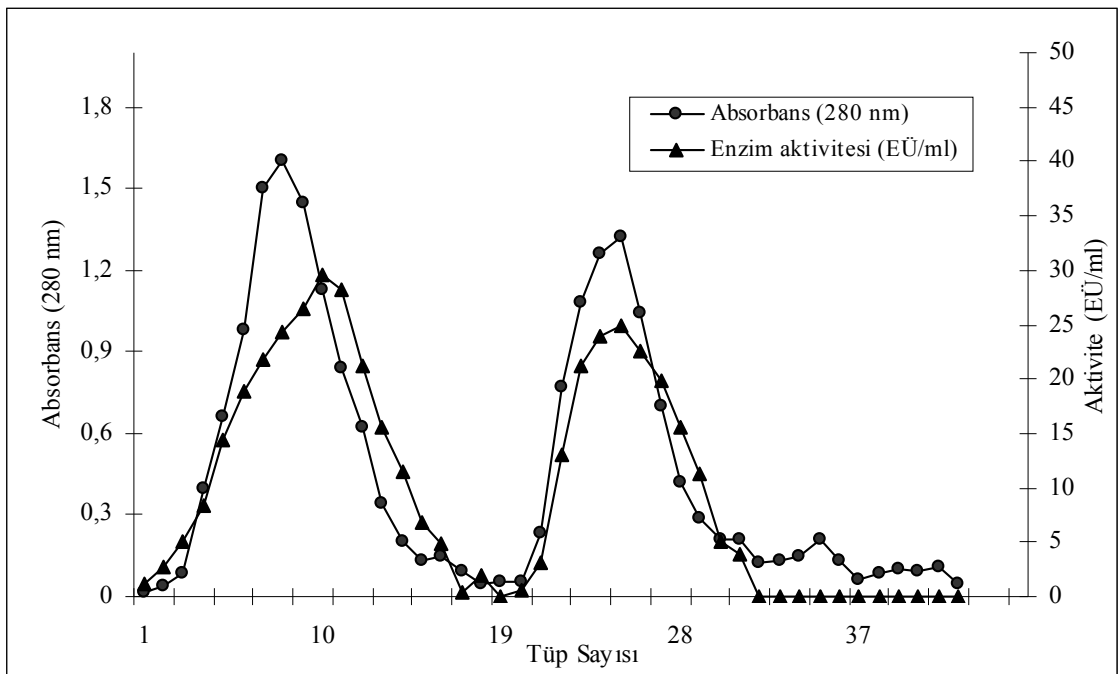
Şekil 4.12. Sepharose-4B-anilin-sülfanilamid sıcaklık-kapasite grafiği



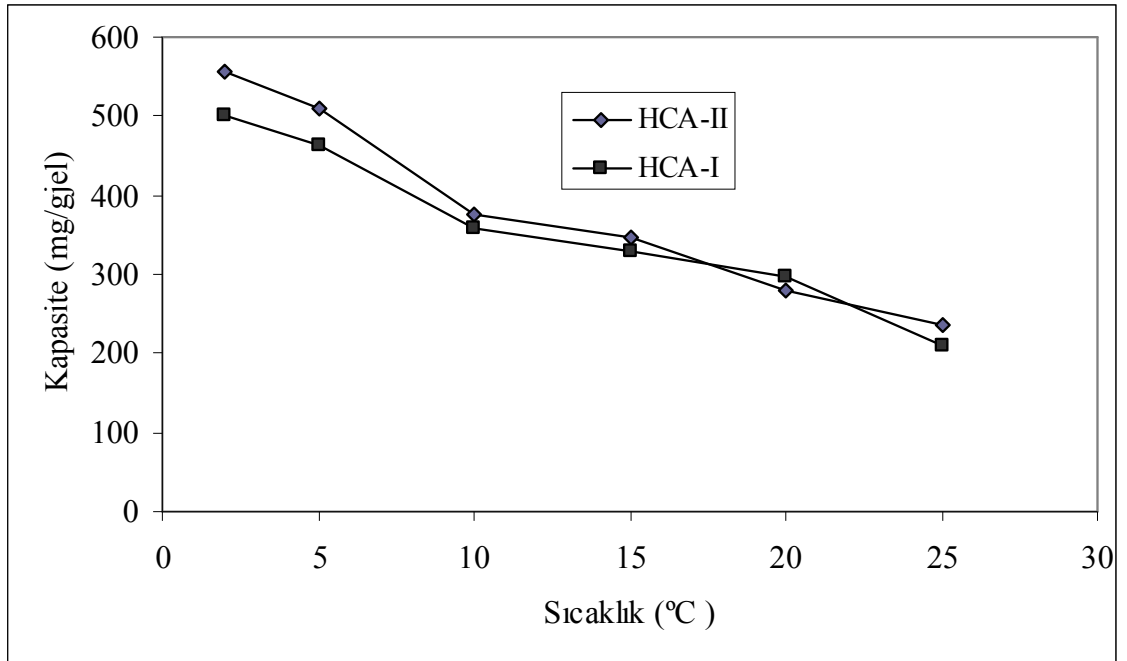
Şekil 4.13 Sepharose-4B-anilin-sülfanilamid pH-kapasite grafiği



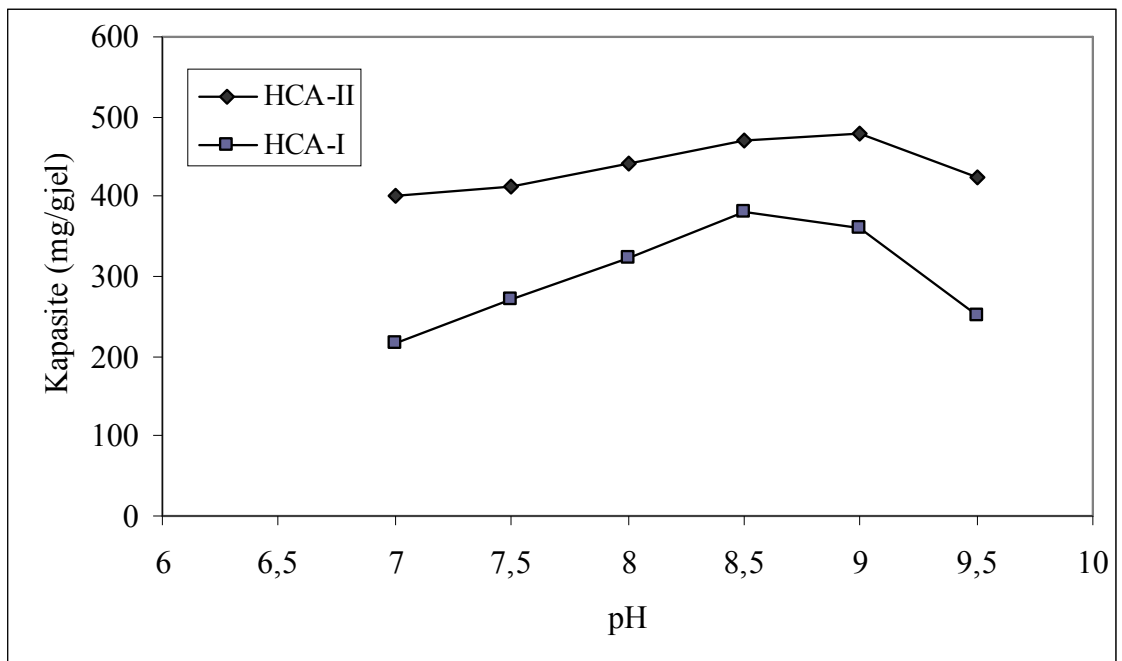
Şekil 4.14. Sepharose-4B-anilin-sülfanilamid iyonik şiddet (M)-kapasite grafiği



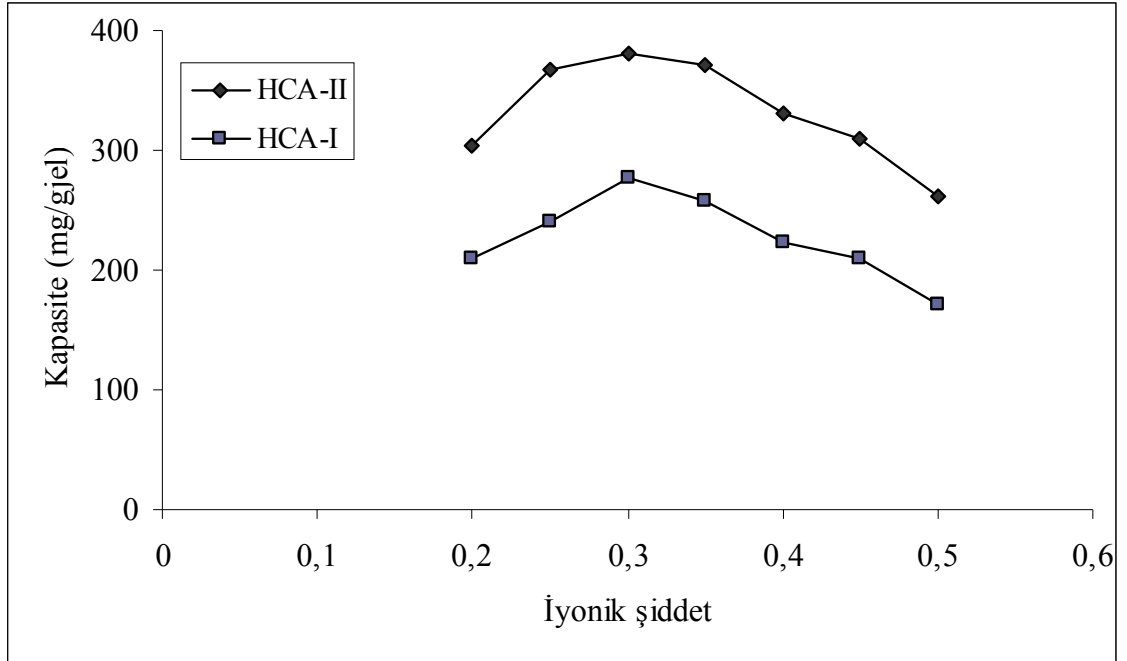
Şekil 4.15. Sepharose-6B-anilin-sülfanilamid jeli kullanılarak hCA-I ve hCA-II'nin elüsyon grafiği (1.pik : hCA-I, 1 M Cl^- ve 25 mM H_2PO_4^- ile elüsyon; 2.pik : hCA-II, 0,5 M ClO_4^- ve 0,1 M CH_3COO^- ile elüsyon).



Şekil 4.16. Sepharose-6B-anilin-sülfanilamid sıcaklık-kapasite grafiği



Şekil 4.17. Sepharose-6B-anilin-sülfanilamid pH-kapasite grafiği



Şekil 4.18. Sepharose-6B-anilin-sülfanilamid iyonik şiddet (M) -kapasite grafiği

Çizelge 4.5. Karbonik anhidrazın afinite jellerinin optimum pH, sıcaklık ve iyonik şiddet değerleri.

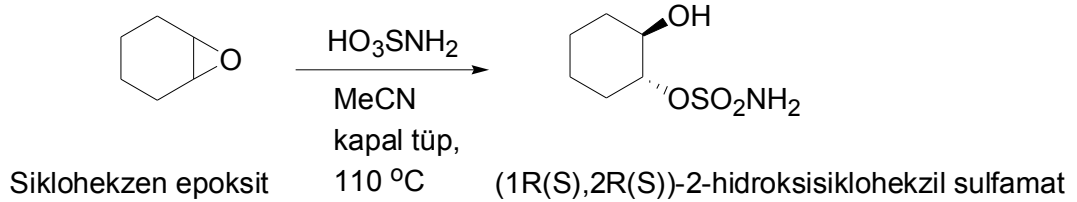
Afinite jeli	Optimum Sıcaklık		Optimum pH		Optimum İyonik Şiddet	
	hCA-I	hCA-II	hCA-I	hCA-II	hCA-I	hCA-II
Sepharose 2B-anilin-sülfanilamid	2°C	2°C	8,5	9,0	0,3 M	0,3 M
Sepharose 4B-anilin-sülfanilamid	2°C	2°C	8,5	8,5	0,3 M	0,3 M
Sepharose 6B-anilin-sülfanilamid	2°C	2°C	8,5	9,0	0,3 M	0,3 M

Çizelge 4.6. Karbonik anhidrazın afinite kromatografisi için matriksler, ligand, uzantı kolu ve jellerinin optimum şartlarda CA-I ve CA-II izoenzimlerini tutma kapasiteleri

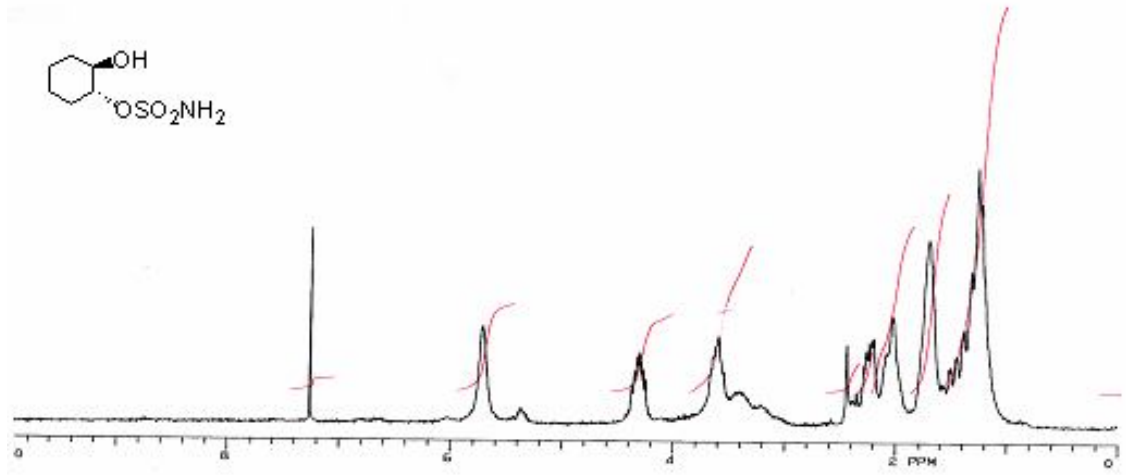
Matriks	Ligand	Uzantı Kolu	hCA-I Kapasitesi (mg/gjel)	hCA-II Kapasitesi (mg/gjel)
Sepharose 2B	Sülfanilamid	Anilin	434	480
Sepharose 4B	Sülfanilamid	Anilin	453	526
Sepharose 6B	Sülfanilamid	Anilin	500	556

4.4.Siklohekzen Epoksit ve Sülfamik Asitin Reaksiyonun İncelenmesi

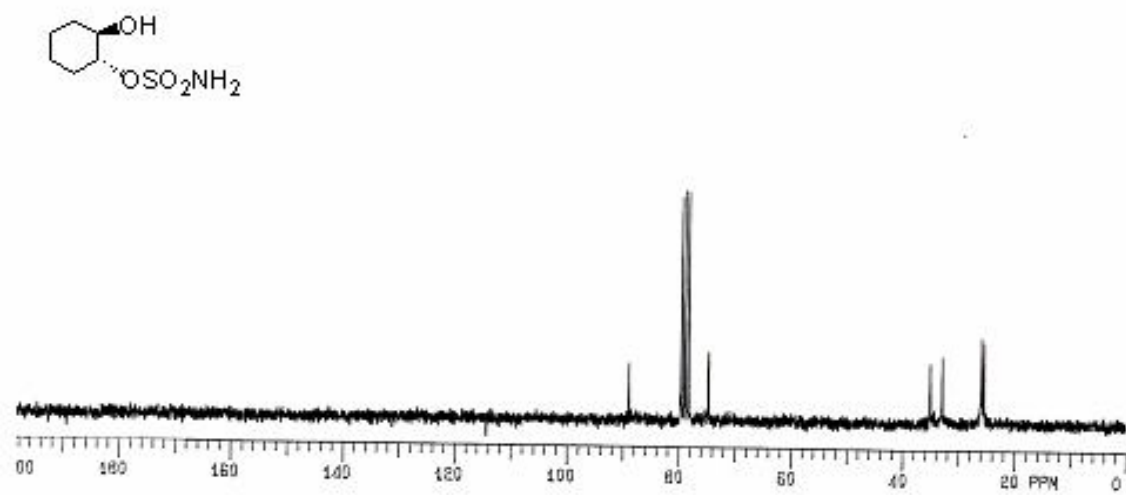
Siklohekzen epoksit sülfamik asit ile asetonitril içerisinde tepkimeye sokuldu. Reaksiyon kapalı tüpte 110°C’de 14 saatte gerçekleştirildi. Tek ürün olarak sülfamat türevi elde edildi. Molekülün yapısı spektroskopik olarak ortaya kondu (Şekil 4.19-4.20).



Sülfamat grubunun bağlı olduğu karbondaki proton 4.36-4.24 ppm aralığında hidroksilin bağlı olduğu karbondaki proton ise 3.84-3.54 ppm’de multipleret olarak rezonans olmuşlardır. Molekülün ¹³C-NMR spektrumunda da beklenildiği gibi altı karbon rezonans sinyali bulunmaktadır. Sülfamatın bağlı olduğu karbon 88.0 ppm’de rezonans olurken, hidroksilin bağlı olduğu karbon 74.7 ppm’de rezonans olmaktadır.



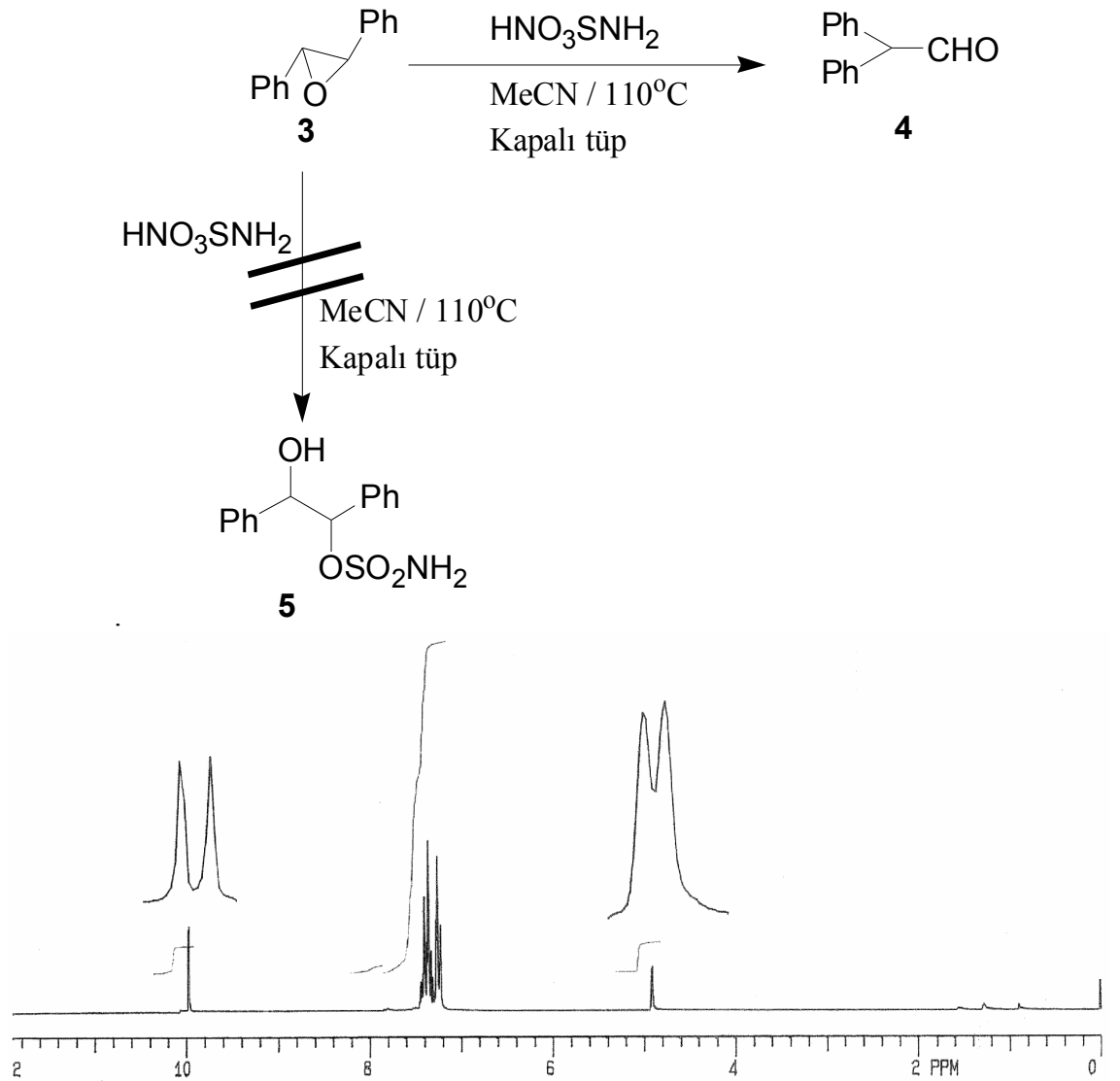
Şekil 4.19. 1*R(S)*,2*R(S)*-2-Hidroksisikloheksil sülfamat'ın 200 MHz ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3).



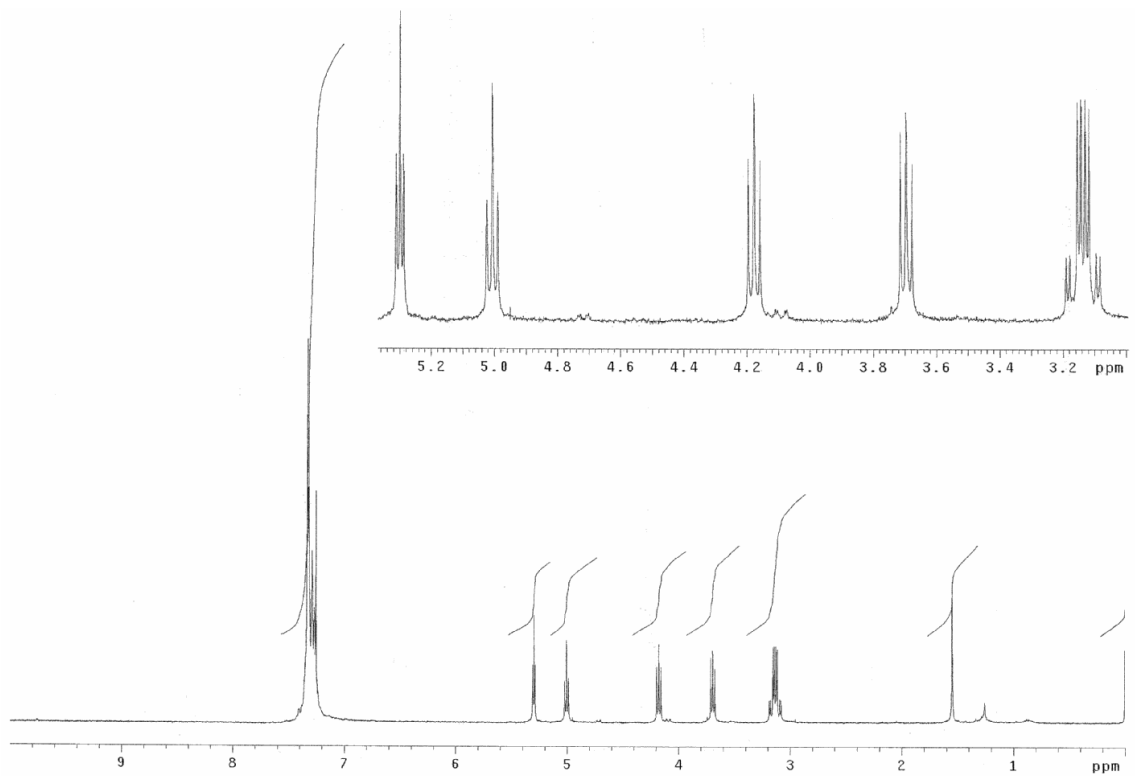
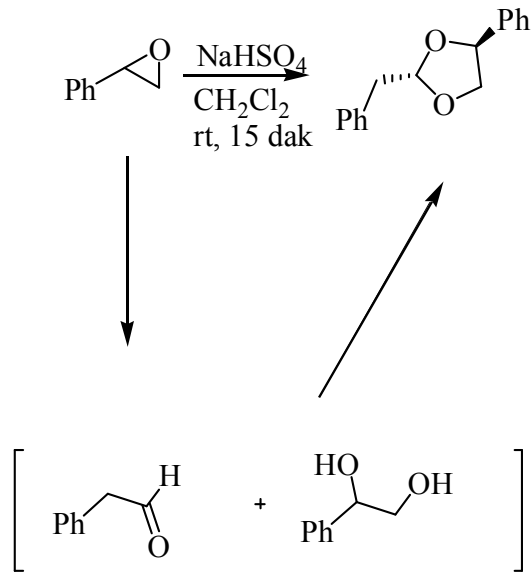
Şekil 4.20. 1*R(S)*,2*R(S)*-2-Hidroksisikloheksil sülfamat'ın 50 MHz ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3).

4.5. 2,2-Difenilasetaldehit (4)'in Sentezinin İncelenmesi

trans-Stilbenepoksit (3)'teki epoksit halkasının sülfamik asit ile açılma ürünü 5'in sentezi de hedeflenmiştir. Epoksit 3 ile sülfamik asitin asetonitrildeki reaksiyonundan elde edilen ham ürün silikajel kolondan saflaştırıldı. Kolondan tek ürün olarak açılma ürünü 5'in yerine pinakol-pinakolon düzenlenme ürünü 4 elde edildi. Molekülün yapısı spektroskopik olarak ortaya kondu (Şekil 4.21-4.22).



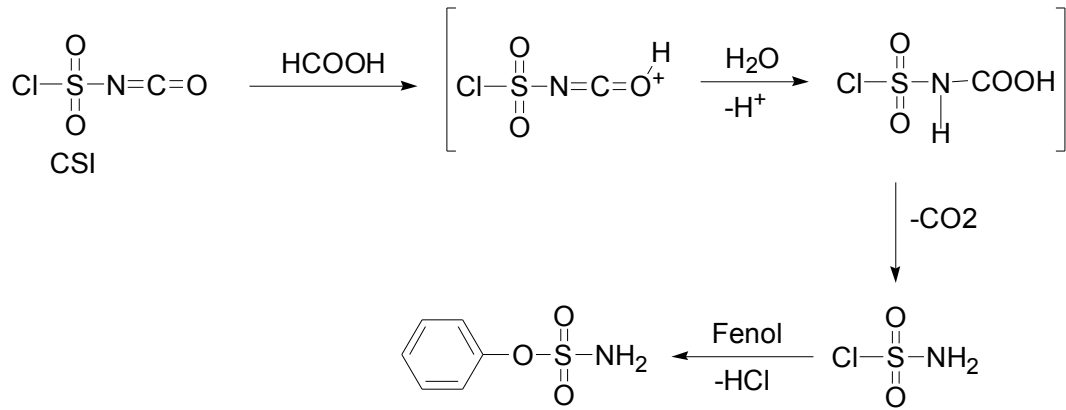
Şekil 4.21. 2,2-Difenilasetaldehit'in 200 MHz ¹H-NMR spektrumu (CDCl_3).



Şekil 4.23. *trans*-(2*S*(*R*),4*S*(*R*))-2-benzil-4-fenil-1,3-dioksolan'ın 200 MHz ^1H -NMR ve 50 MHz ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3).

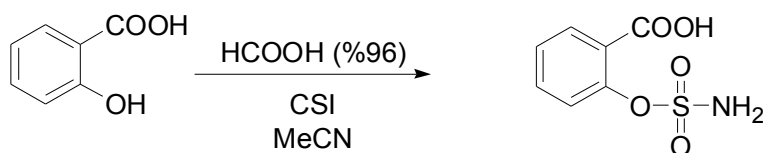
4.7. Bazı Salisilik asit Türevlerinin Klorosülfonil İzosiyanat (CSI) ile Reaksiyonlarının İncelenmesi

Çalışmamızda salisilik asitin sülfamat türevlerinin sentezi hedeflenmiştir. Sülfamat oluşturmak için klorosülfonil izosiyanat kullanıldı. Bu reaktif ile sülfamat oluşumu için mekanizma aşağıda verilmiştir. İlk önce asidik ortamda klorosülfonil izosiyanat su ile tepkime vererek klorosulfonilkarbamik asit üzerinden sülfamoil klorürü oluşturmaktadır. Oluşan sülfamoil klorürün ilgili fenol bileşiğiyle tepkimesinden hidrojen klorür çıkışıyla hedeflenen sülfamatlar elde edilmektedir.

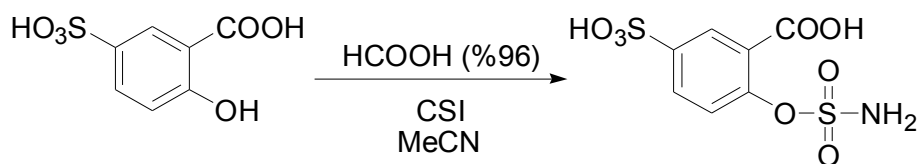


İlk önce literatürde farklı ve daha uzun bir yoldan sentezlenmiş olan salisilik asitin sülfamat türevinin sentezini amaçlandı. Bunun için salisilik asit'in CSI ile reaksiyonu incelendi. Reaksiyondan sonra yüksek verimle hedeflenen 2-(sulfamoyiloksi)benzoik asit elde edildi. Elde edilen molekülün yapısı spektroskopik olarak aydınlatıldı. Molekülün ^1H NMR spektrumunda aromatik bölgede dört farklı sinyal grubu görülmektedir. 8.17 ppm'de dubletin dubleti olarak rezonans olan sinyal ve 7.37 ppm'deki dublet karboksilik asit ve sülfamat gruplarına orto konumdaki komşu aromatik protonlara aittir. 7.74 ve 7.49 ppm'deki tripletin dubletleri ise diğer aromatik iki protona ait rezonans sinyalleridir. Molekülün ^{13}C NMR spektrumunda da beklenildiği gibi yedi olefinik karbon sinyal vardır. Sentezlenen molekül ve çıkış reaktifi olan salisilik asitin NMR'ları birbirine çok benzeyeceği için spektrumlar kısmında aynı çözücünde alınmış salisilik asitin NMR spektrumları da verilmiştir.

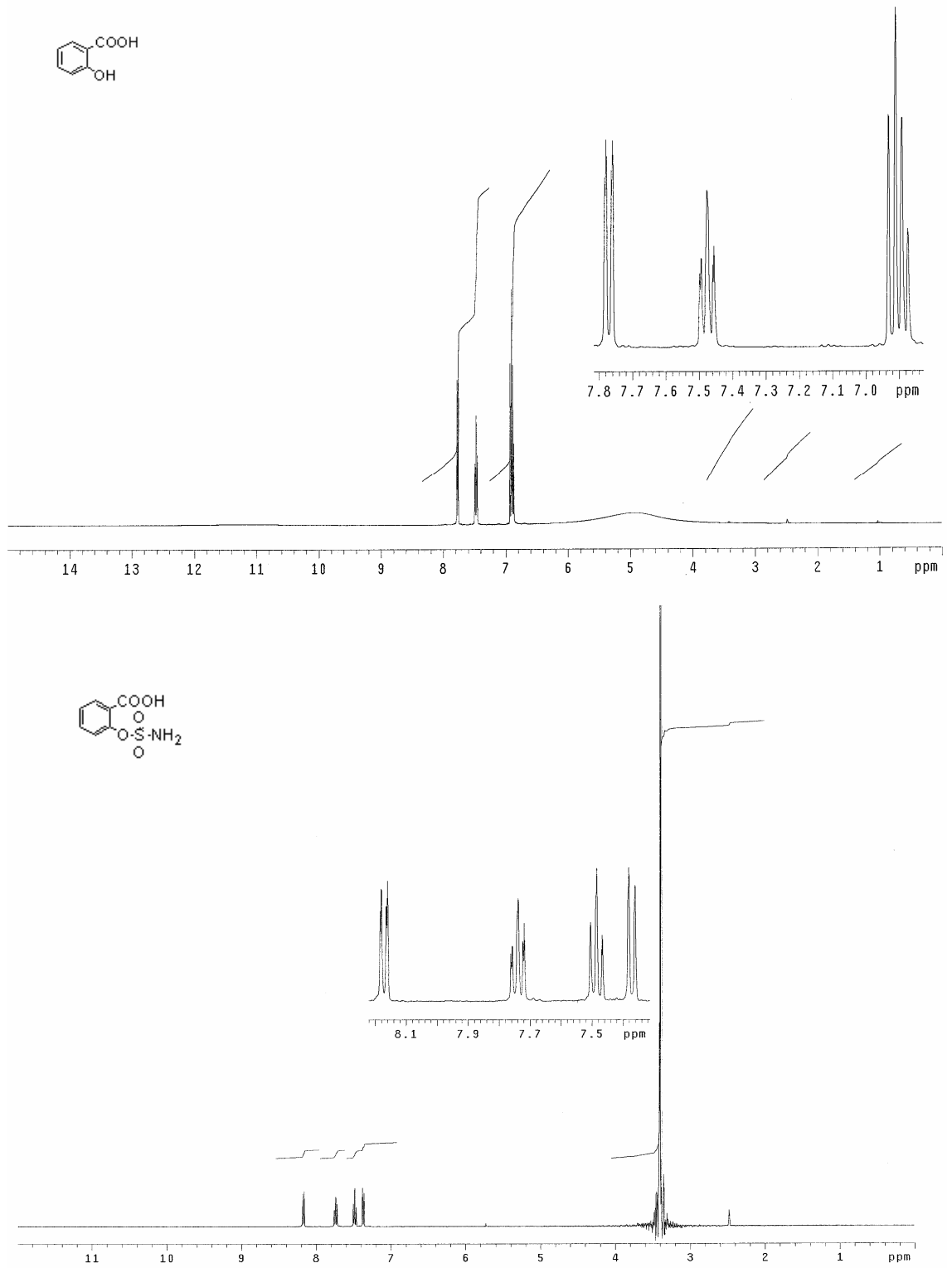
Salisilik asit ve 2-(sulfamoyiloksi)benzoik asit'in NMR spektrumlarında bariz bir şekilde kimyasal kayma değerleri arasında kaymaların olduğu görülmektedir (Şekil 4.24, Şekil 4.25).



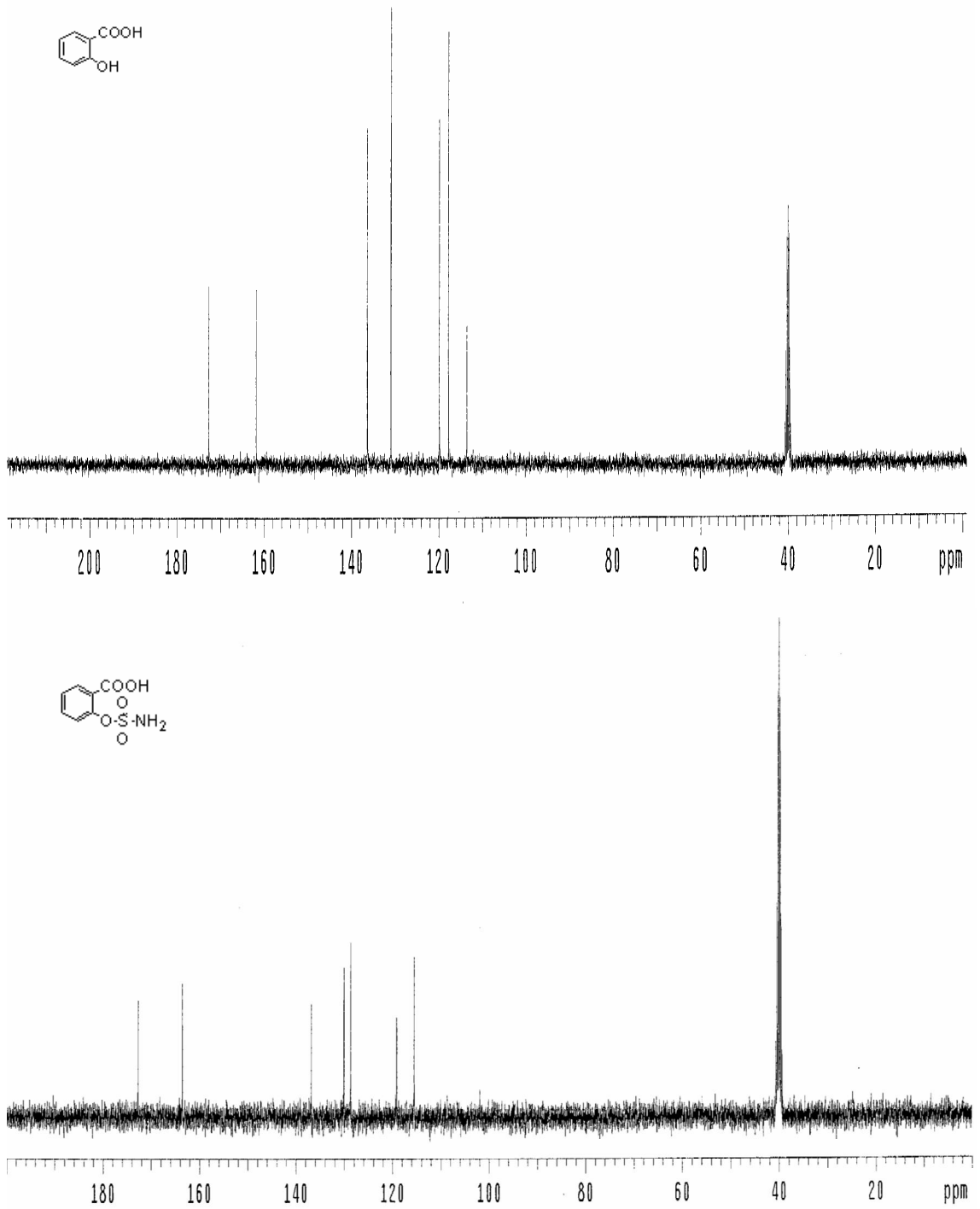
Benzer bir yolla da 5-sülfosalisilik asitin sülfamat türevi 2-sülfamoiloksi-5-sülfo benzoik asit, yine yüksek bir verimle sentezi gerçekleştirildi ve yapısı spektroskopik olarak ortaya kondu (Şekil 4.26., Şekil 4.27). Bu molekülün sentezi literatürde bilinmemektedir.



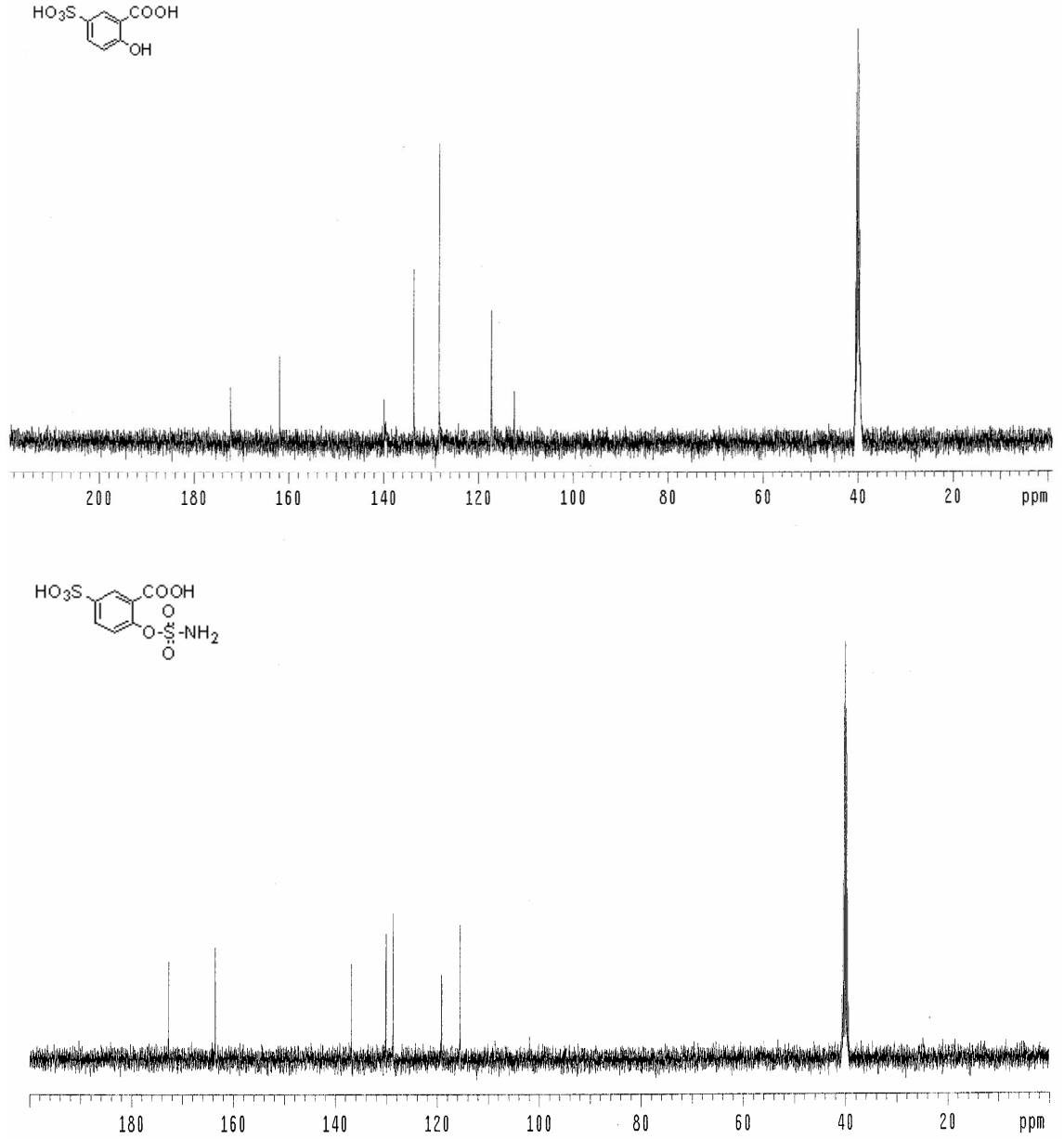
Benzer bir yolla da 4-sülfosalisilik asitin sülfamat türevi 2-sülfamoiloksi-4-sülfo benzoik asit, yine yüksek bir verimle sentezi gerçekleştirildi ve yapısı spektroskopik olarak ortaya kondu (Şekil 4.28., Şekil 4.29). Bu molekülün sentezi literatürde bilinmemektedir.



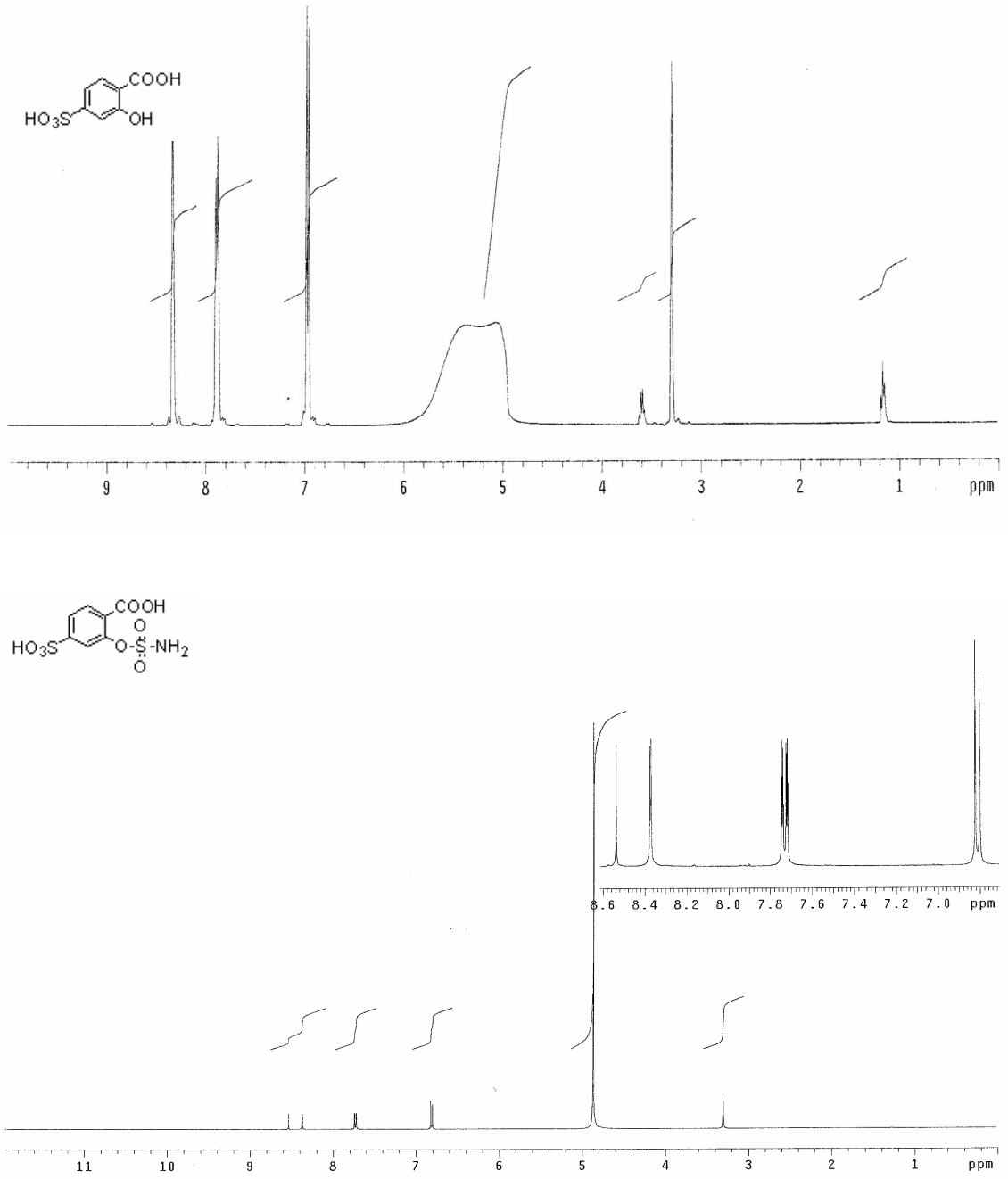
Şekil 4.24. Salisilik asit ve 2-(sulfamoyiloksi)benzoik asit'in 400 MHz ^1H -NMR spektrumları (DMSO- d_6).



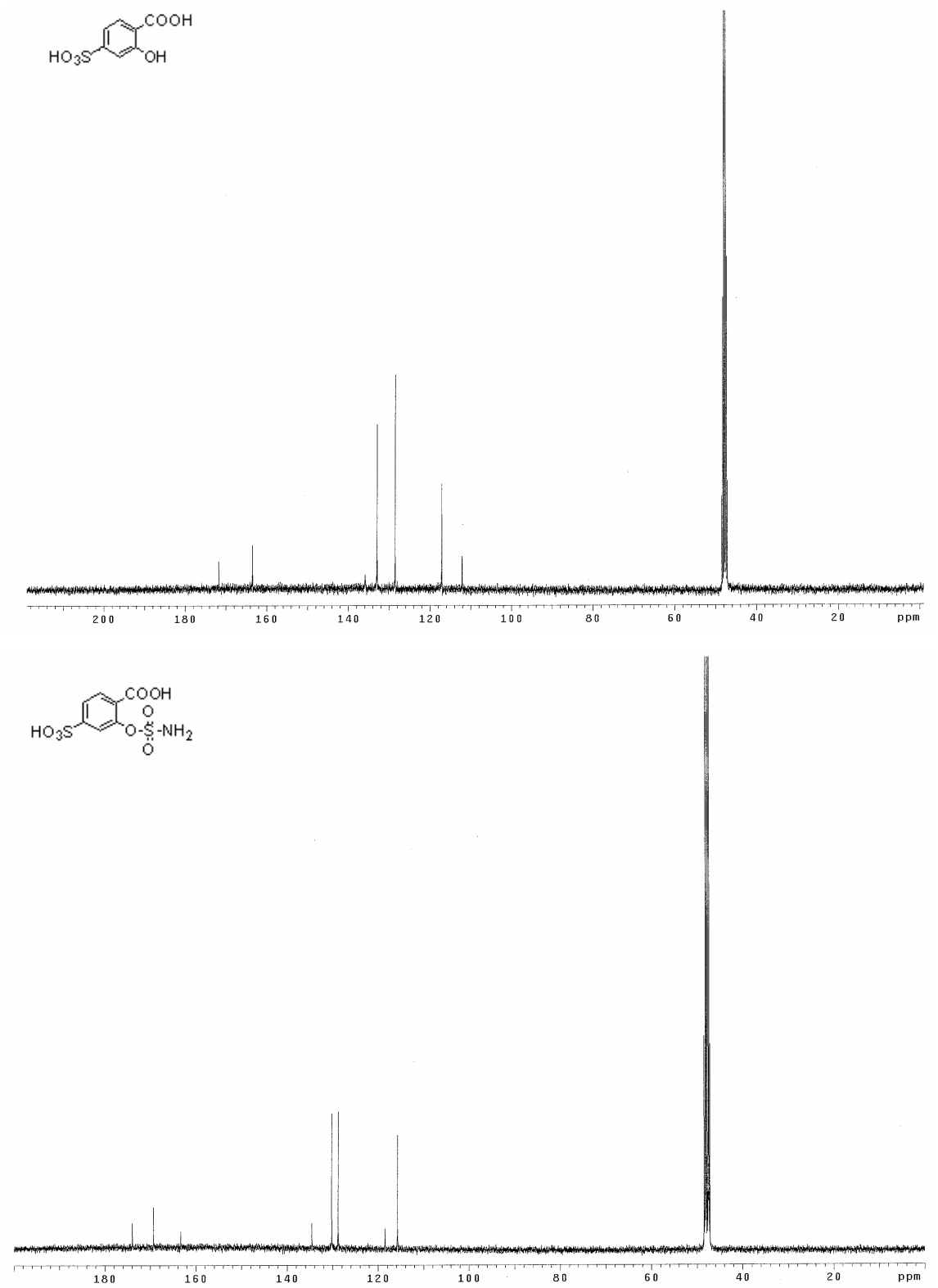
Şekil 4.25. Salisilik asit ve 2-(Sulfamoyiloksi)benzoik asit'in 100 MHz ^{13}C -NMR spektrumu (DMSO-d_6).



Şekil 4.27. 5-Sülfosalisilik asit ve 2-sülfamoiloksi-5-sülfo benzoik asit'in 100 MHz ¹³C-NMR spektrumu (DMSO-d₆).



Şekil 4.28. 4-Sülfosalisilik asit ve 2-sülfamoiloksi-4-sülfo benzoik asit'in 400 MHz ¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆).

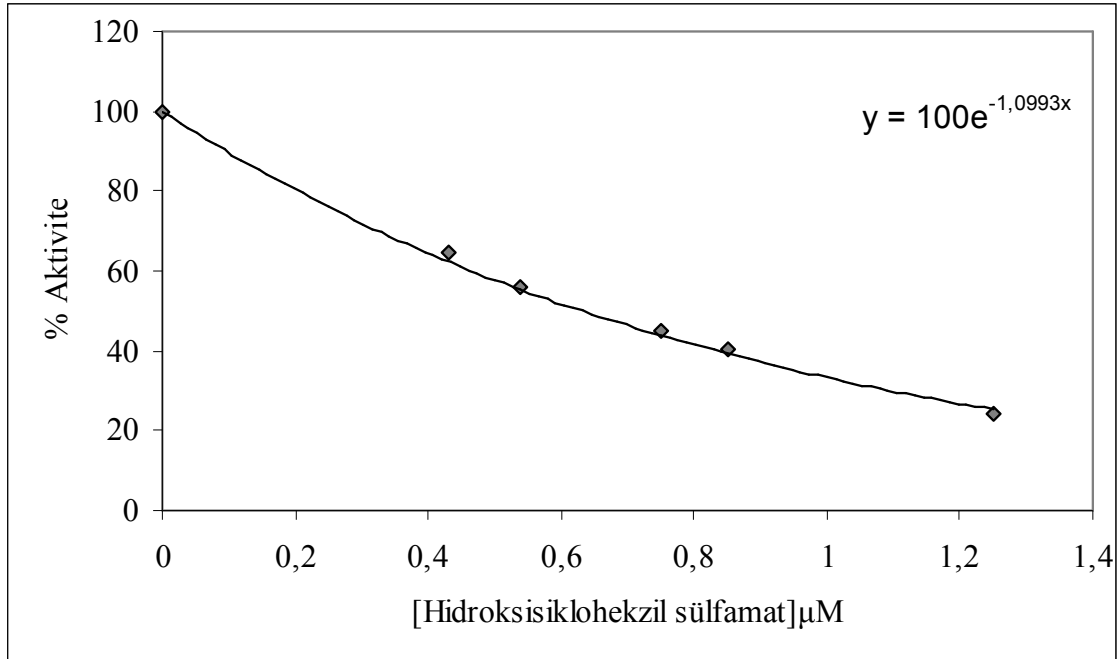


Şekil 4.29. 4-Sülfosalisilik asit ve 2-sülfamoiloksi-4-sülfo benzoik asit'in 100 MHz ¹³C-NMR spektrumu (DMSO-d₆).

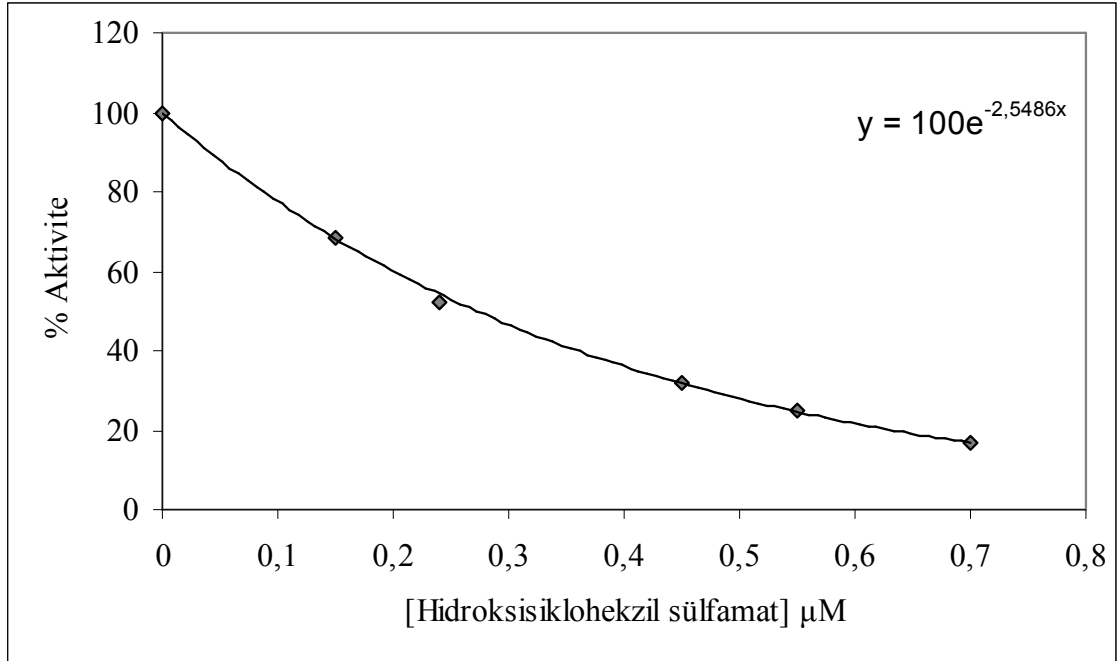
4.8. İnhibitörler İçin IC₅₀ ve K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

İnsan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzim aktivitesi üzerine salisilik asit, 5-sülfosalisilik asit, 4-sülfosalisilik asit, sikloheksan epoksidin sülfamat türevlerinin ve 2,2-difenilasetaldehitin 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 4.30-4.39'de gösterildi. Eğrilerin denkleminde I₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 5.2)

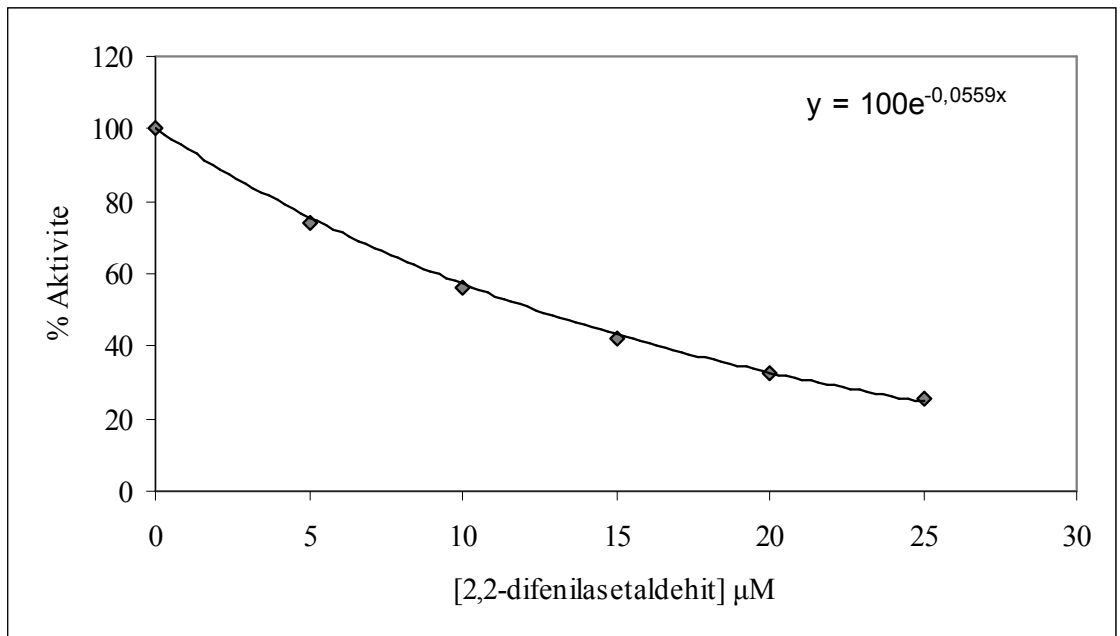
Bu inhibitörlerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla, üç sabit inhibitör konsantrasyonunda uygun 5 farklı substrat konsantrasyonu için elde edilen aktivite değerleri ile her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarı yarışmalı ve yarışmasız inhibisyon için $V_{\max} = V_{\max}^I (1 + [I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi (Şekil 4.40-4.49, Çizelge 5.4)



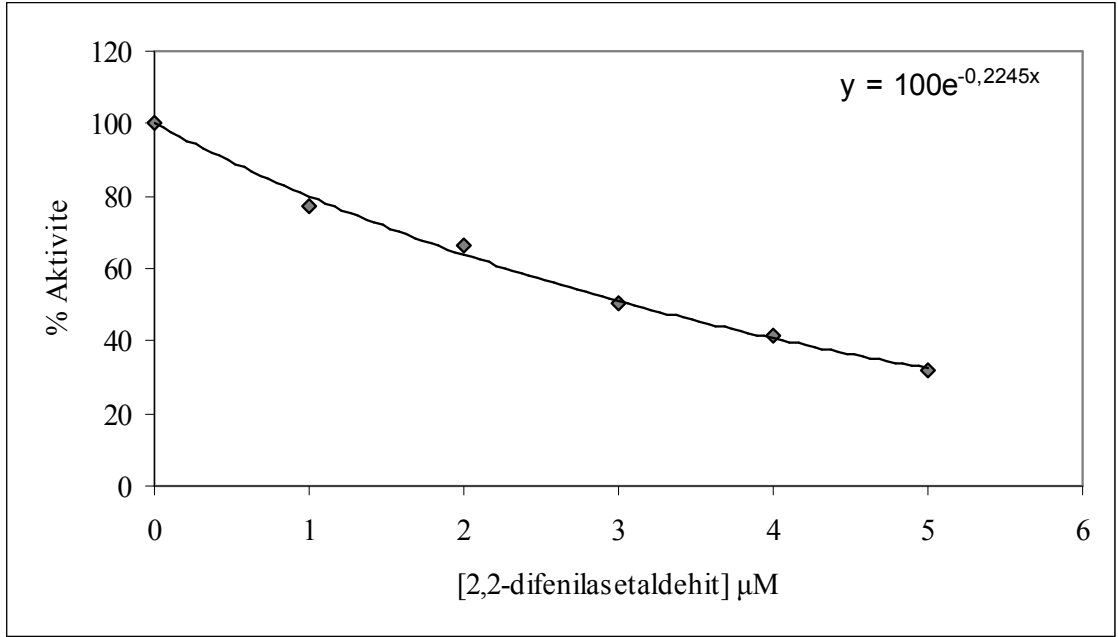
Şekil 4.30. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 1R(S), 2R(S)-2-hidroksisikloheksil sülfamat'ın etkisi.



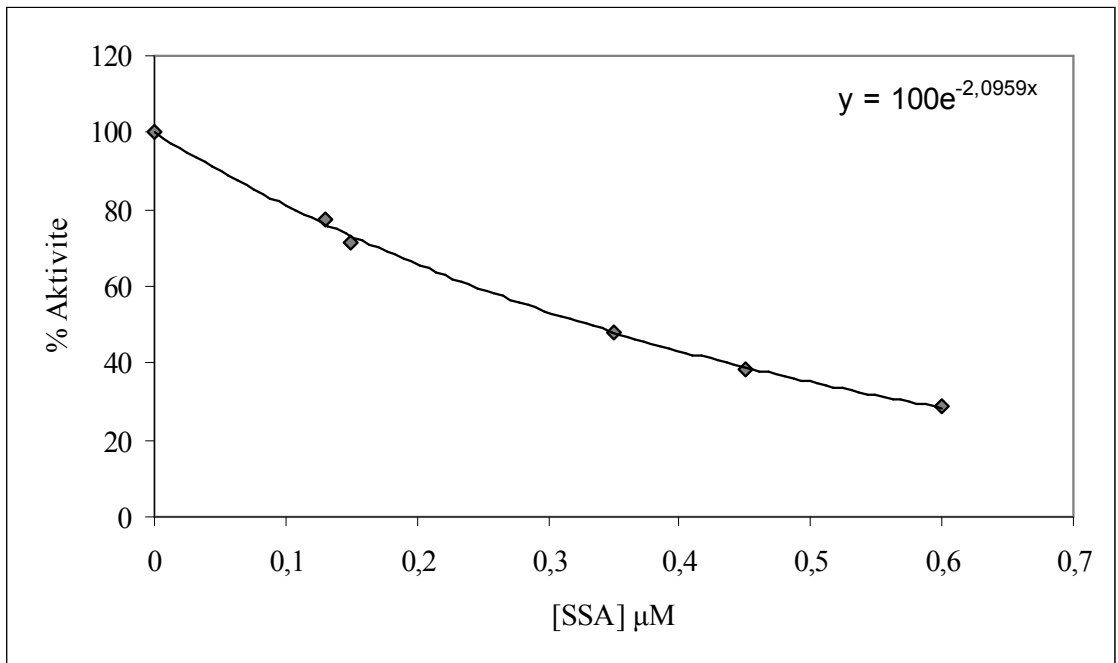
Şekil 4.31. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 1R(S), 2R(S)-2-hidroksisiklohekzil sülfamat'ın etkisi.



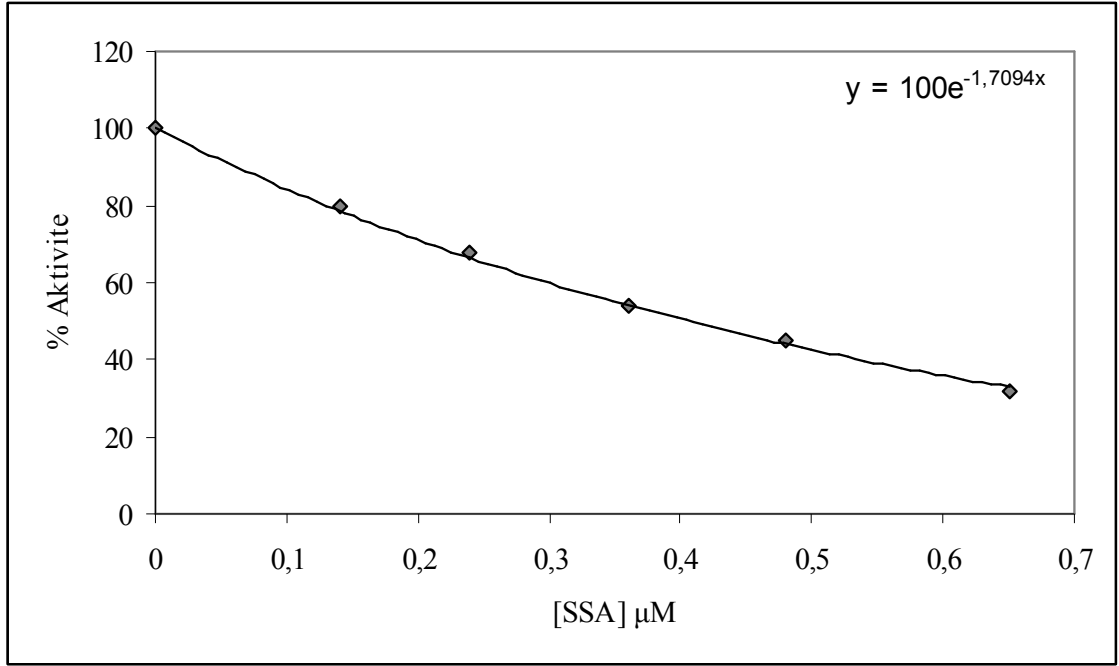
Şekil 4.32. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,2-difenilasetaldehitin etkisi.



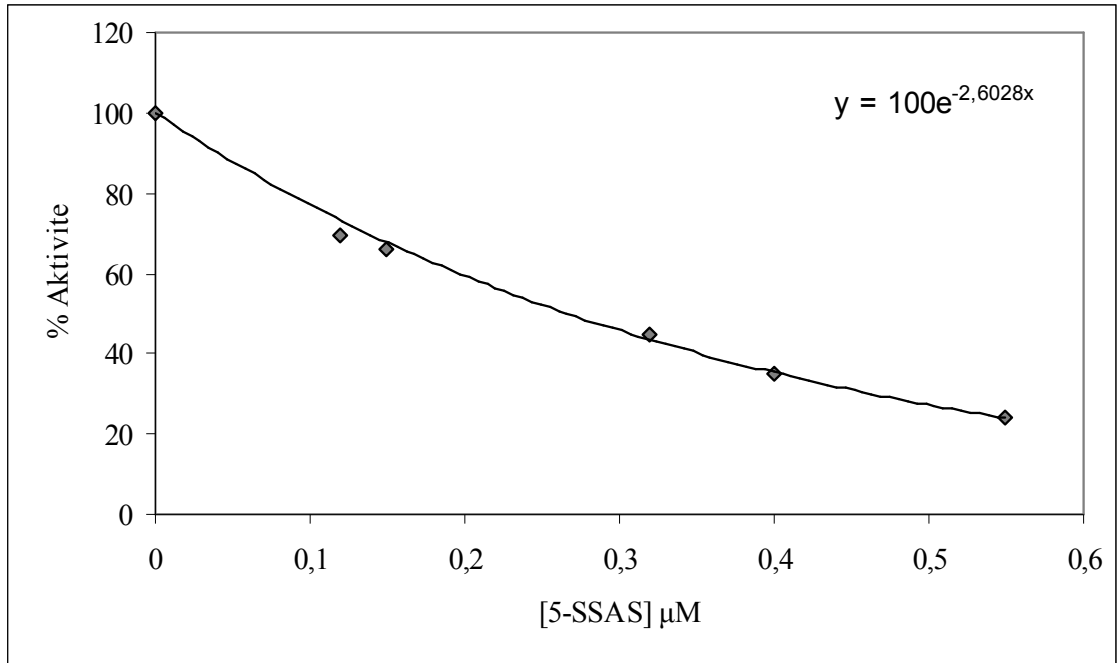
Şekil 4.33. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,2-difenilasetaldehitin etkisi.



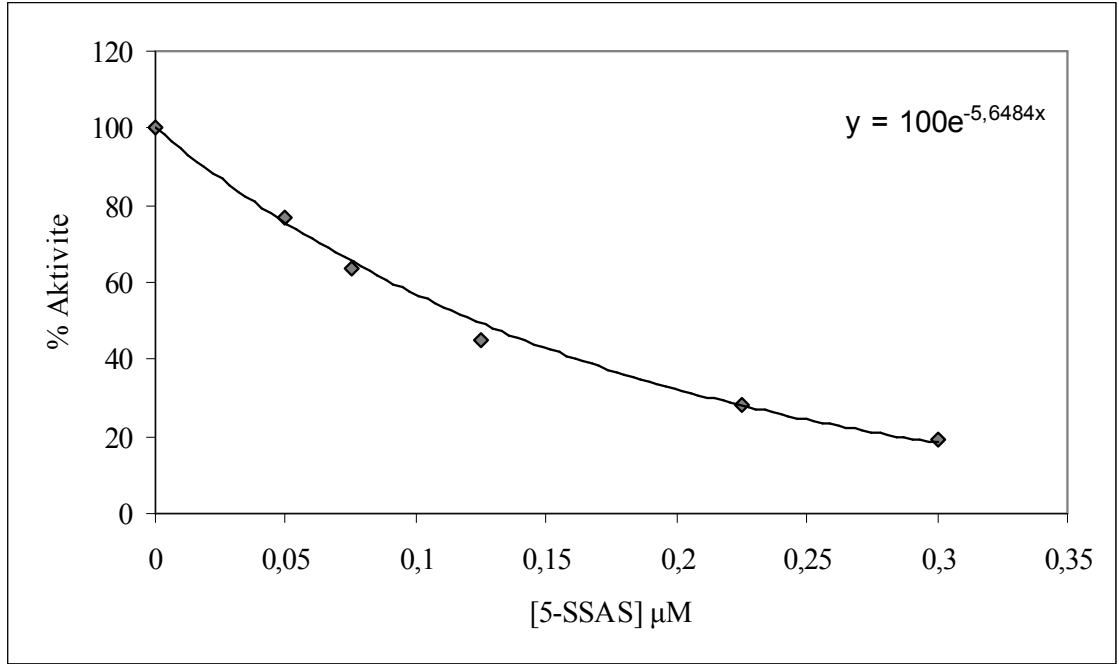
Şekil 4.34. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine salisilik asitin sülfamat esterinin etkisi.



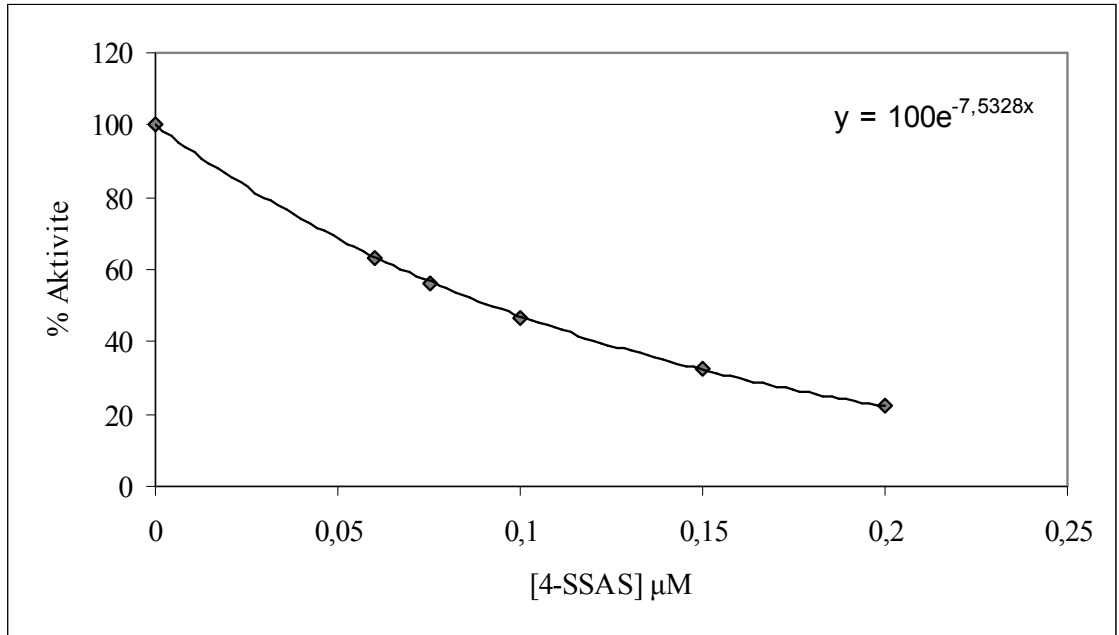
Şekil 4.35. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine salisilik asitin sülfamat esterinin etkisi.



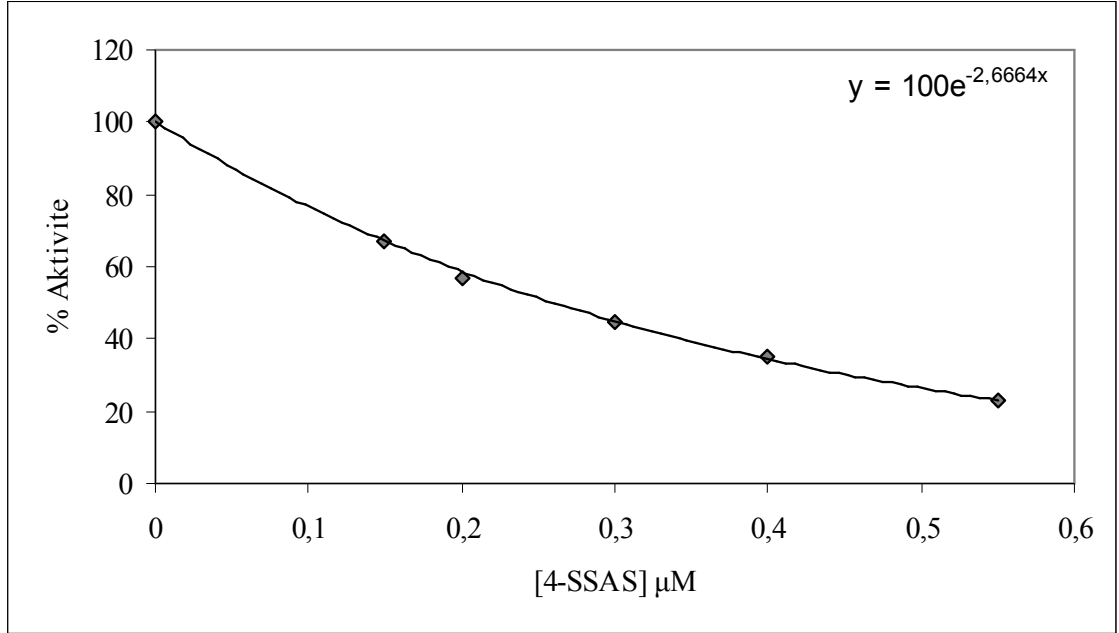
Şekil 4.36. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 5-sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin etkisi.



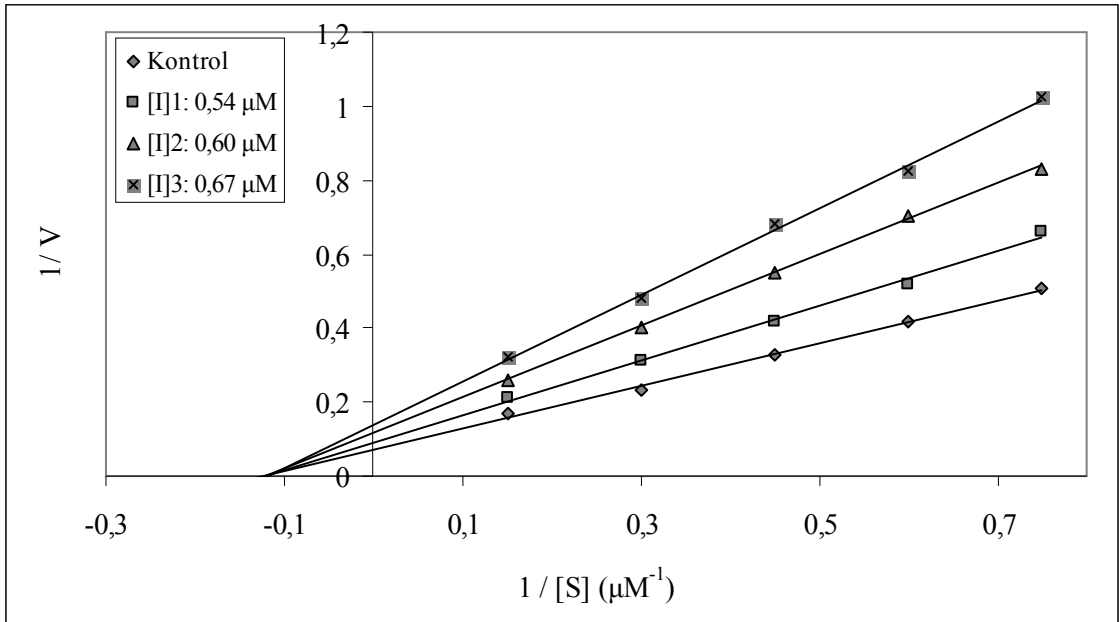
Şekil 4.37. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 5-sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin etkisi.



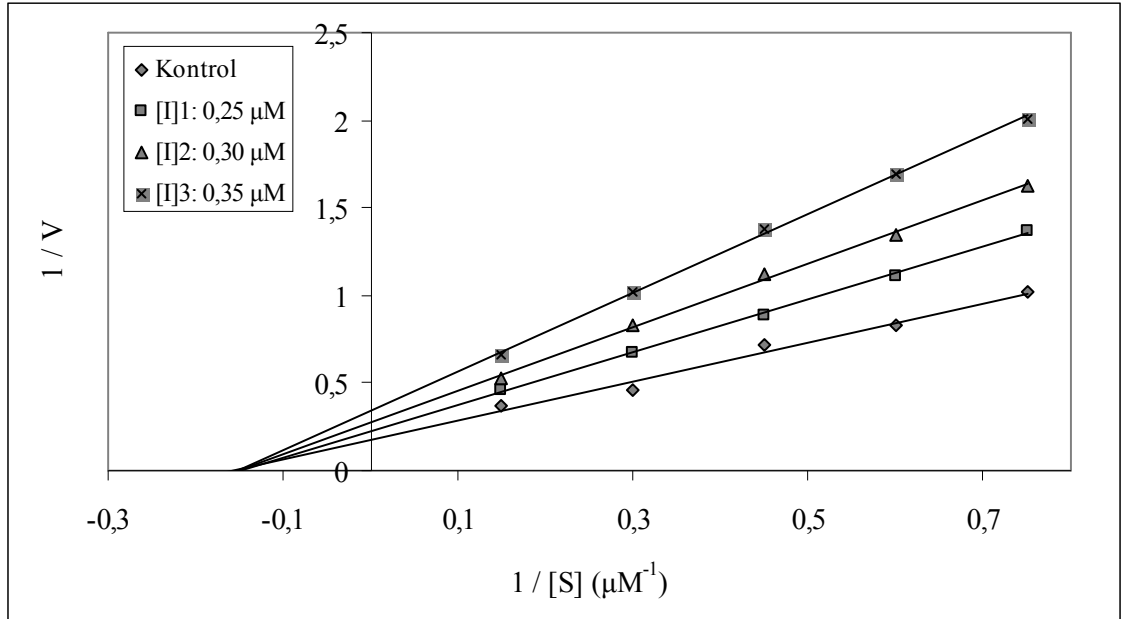
Şekil 4.38. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 4-sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin etkisi.



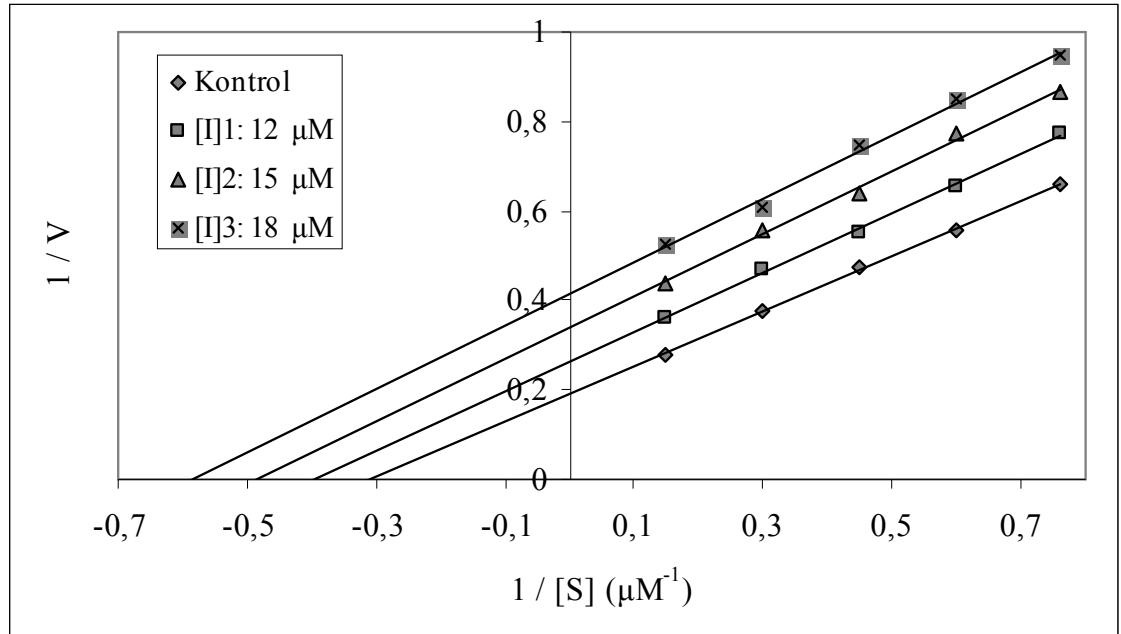
Şekil 4.39. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 4-sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin etkisi.



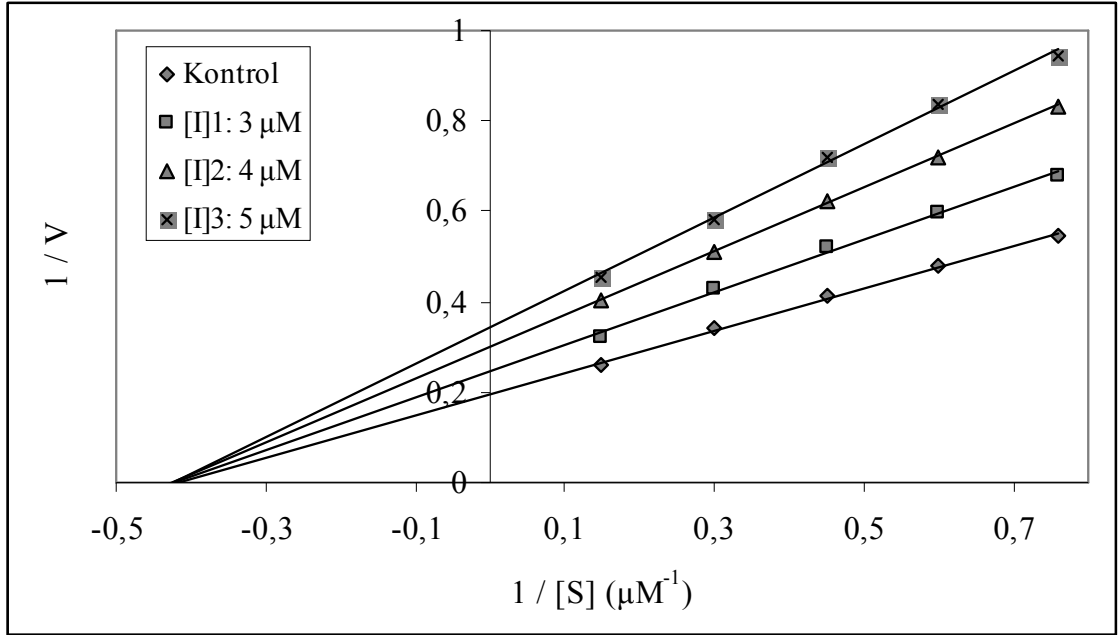
Şekil 4.40. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 1R(S), 2R(S)-2-hidroksisiklohekzil sülfamat'ın etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.



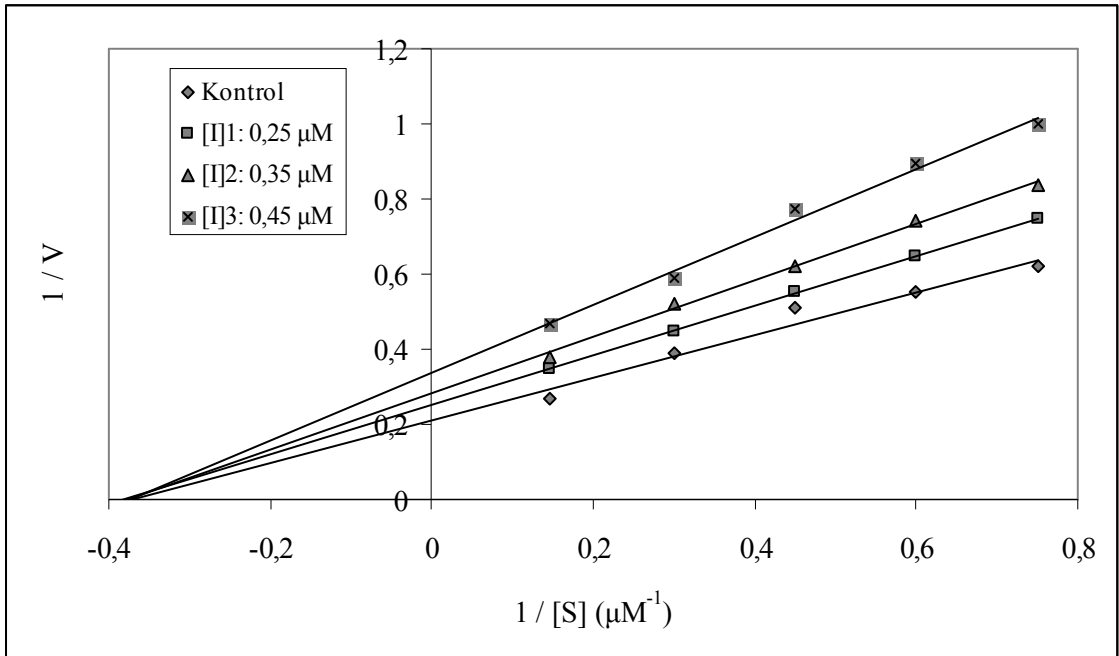
Şekil 4.41. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 1R(S), 2R(S)-2-hidroksisiklohekzil sülfamat'ın etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.



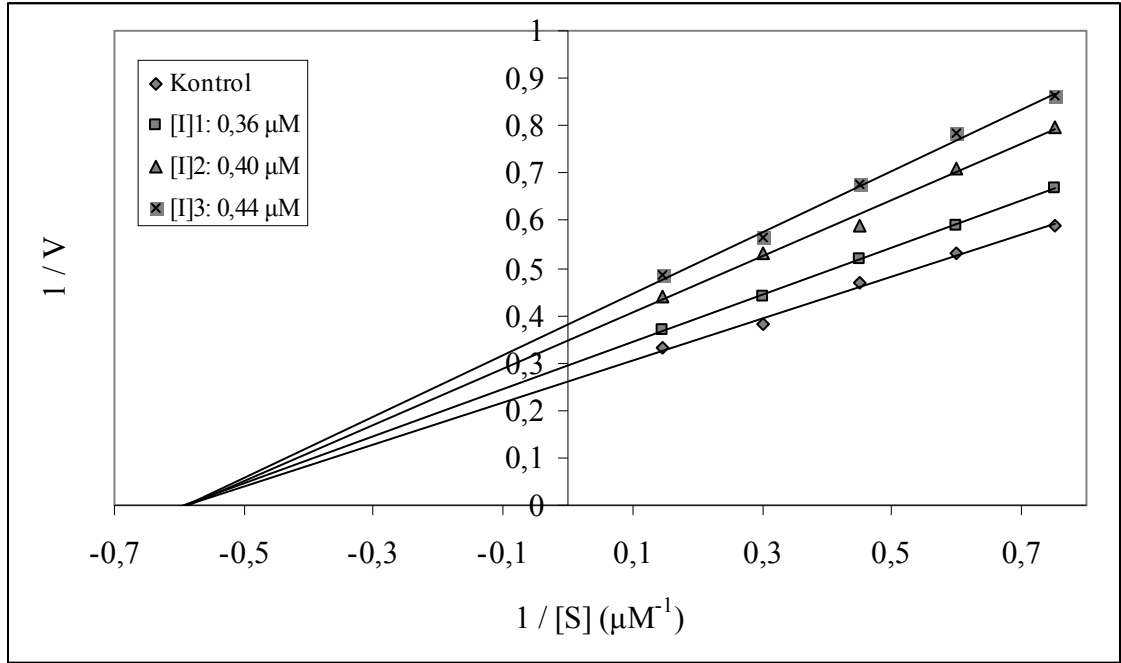
Şekil 4.42. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 2,2-difenilasetaldehitin etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.



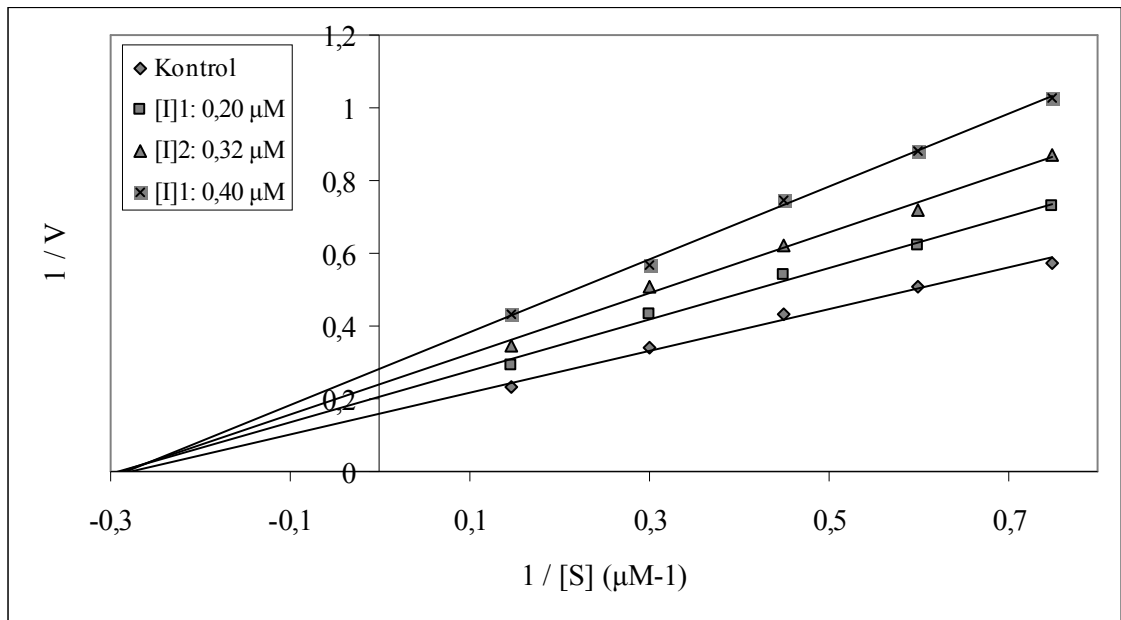
Şekil 4.43. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 2,2-difenilasetaldehitin etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.



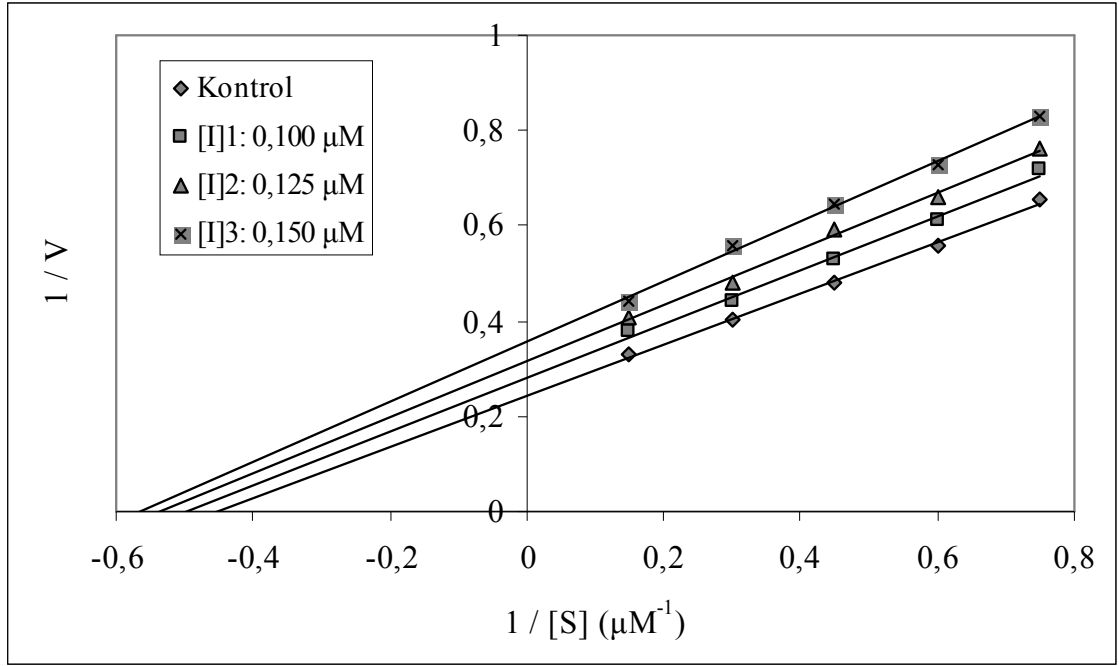
Şekil 4.44. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine salisilik asitin sülfamat esterinin etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.



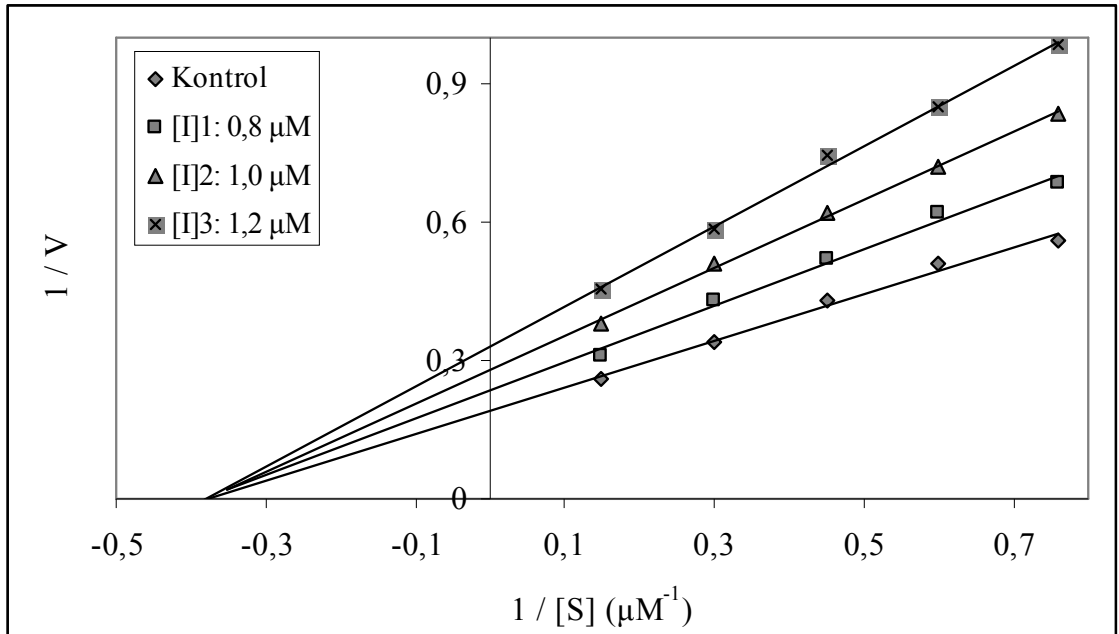
Şekil 4.45. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine salisilik asitin sülfamat esterinin etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.



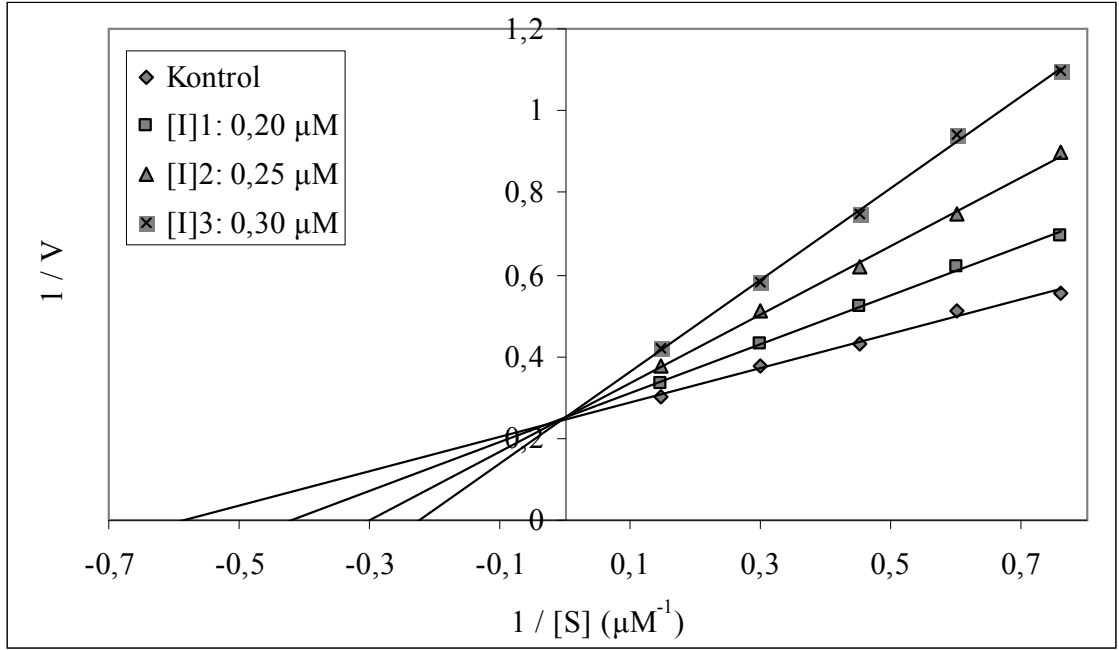
Şekil 4.46. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 5-sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.47. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 5-sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.



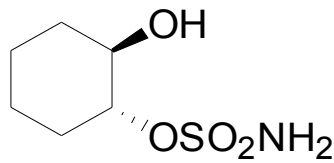
Şekil 4.48. İnsan eritrosit CA-I izoenzimi üzerine 4-sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.



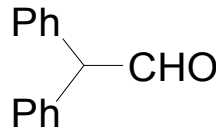
Şekil 4.49. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerine 4-sülfosalisilik asitin sülfamat esterinin etkisi ile ilgili elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

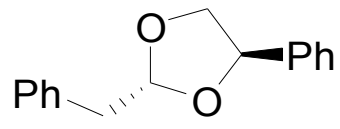
Çalışmamızda epoksit ve salisilik asitlerden sülfamat esterlerinin sentezi hedeflendi. Epoksitlerden sülfamat esteri elde etmek için sülfamik asit kullanıldı. Epoksitler çok yönlü organik bileşiklerdir. Örneğin epoksitlerin karbon- ve heteroatomik nükleofillerle halka açılma tepkimeleri β -süstitüe alkollerini vermektedir. Çalışmamızda test molekülü olarak sikloheksen epoksit molekülü seçildi ve sülfamik asit ile halka-açılma tepkimesi incelendi. Reaksiyonun sonucunda literatürde bilinmeyen β -hidroksi sülfamat türevi elde edildi. Bu reaksiyon ile hem yeni bir sülfamat türevi elde edildi, hem de sülfamik asitten sülfamat türevlerinin sentezinin gerçekleştirilebileceği gösterildi. Sülfamik asit ile yapılan bu çalışmadan elde edilen bulgu ve tecrübeler farklı epoksit yapılarına uygulanarak yeni β -hidroksi sülfamat türevlerinin sentezi üzerine çalışmalarımız halen yoğun bir şekilde devam etmektedir. Sülfamat ester sentezi için kullandığımız diğer bir yapıda salisilik asit ve türevleridir. Salisilik asitlerin sülfamat türevleri literatürde bilinen ancak salisilik asitlere uygulanmamış olan klorosülfonil izosiyanat (CSI)'nın kullanılmasıdır. Bu yöntemle literatürde uzun ve karmaşık bir yolla sentezlenen salisilik asitin sülfamat esteri elde edildi. Yine aynı yöntem kullanılarak 5-sülfosalisilik asitin ve 4-sülfosalisilik asidin sülfamat türevleri yüksek bir verimle sentezlendi:



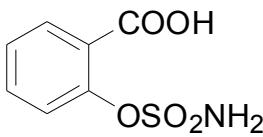
1R(S), 2R(S)-2-Hidroksisiklo
benzoik hekzil sülfamat



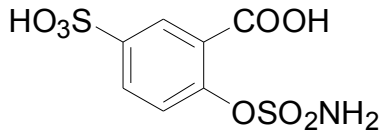
2,2-difenilasetaldehit



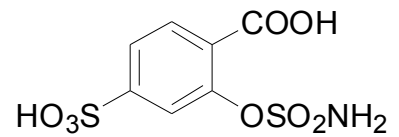
trans-(2S(R),4S(R))-2-
benzil-4-fenil-1,3-dioksolan



2-Sülfamoyiloksi benzoik
asit



2-Sülfamoyiloksi-5-sülfo asit



2-Sülfamoyiloksi-4-sülfo asit

Sentezlenen bileşikler için elde edilen IC_{50} değerleri ile K_i sabitleri Çizelge 5.2 ve 5.4’de verilmiştir. Aynı çalışma grubumuz tarafından salisilik asit, 5-sülfosalisilik asit ve 4-sülfosalisilik asit için kinetik çalışmalar yapılmış ve elde edilen değerler Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.3’de verilmiştir (Bayram *et al.* 2008)

Çizelge 5.1. Salisilik asit ve 5-sülfosalisilik asidin insan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için bulunan IC_{50} değerleri

İnhibitör	hCA-I IC_{50} değeri	hCA-II IC_{50} değeri
Salisilik asit	0,56 mM	0,68 mM
5-Sülfosalisilik asit	0,42 mM	0,29 mM
4-Sülfosalisilik asit	0,29 mM	0,72 mM

Çizelge 5.2. Siklohekzen epoksid, salisilik asit ve 5-sülfosalisilik asidin sülfamat türevlerinin İnsan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için bulunan IC_{50} değerleri

İnhibitör	hCA-I IC_{50} değeri	hCA-II IC_{50} değeri
1 <i>R</i> (<i>S</i>), 2 <i>R</i> (<i>S</i>)-2-Hidroksisiklohekzil sülfamat	0,630 μ M	0,272 μ M
2,2-difenilasetaldehit	12,40 μ M	3,090 μ M
2-Sülfamoyiloksi benzoik asit (Salisilik asit sülfamat esteri)	0,330 μ M	0,405 μ M
2-Sülfamoyiloksi-5-sülfo benzoik asit (5-sülfosalisilik asit sülfamat esteri)	0,266 μ M	0,123 μ M
2-Sülfamoyiloksi-4-sülfo benzoik asit (4-sülfosalisilik asit sülfamat esteri)	0,092 μ M	0,260 μ M

Çizelge 5.3. Salisilik asit ve 5-sülfosalisilik asidin insan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için bulunan K_i değerleri

İnhibitör	hCAI K_i değeri	İnhibisyon türü	hCAII K_i değeri	İnhibisyon türü
Salisilik asit	0,62 mM	Yarışmasız	0,74 mM	Yarışmasız
5-Sülfosalisilik asit	0,77 mM	Yarışmalı	1,92 mM	Yarışmasız
4-Sülfosalisilik asit	0,48 mM	Yarıyarışmalı	1,06 mM	Yarışmalı

Çizelge 5.4. İnsan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için bulunan K_i değerleri

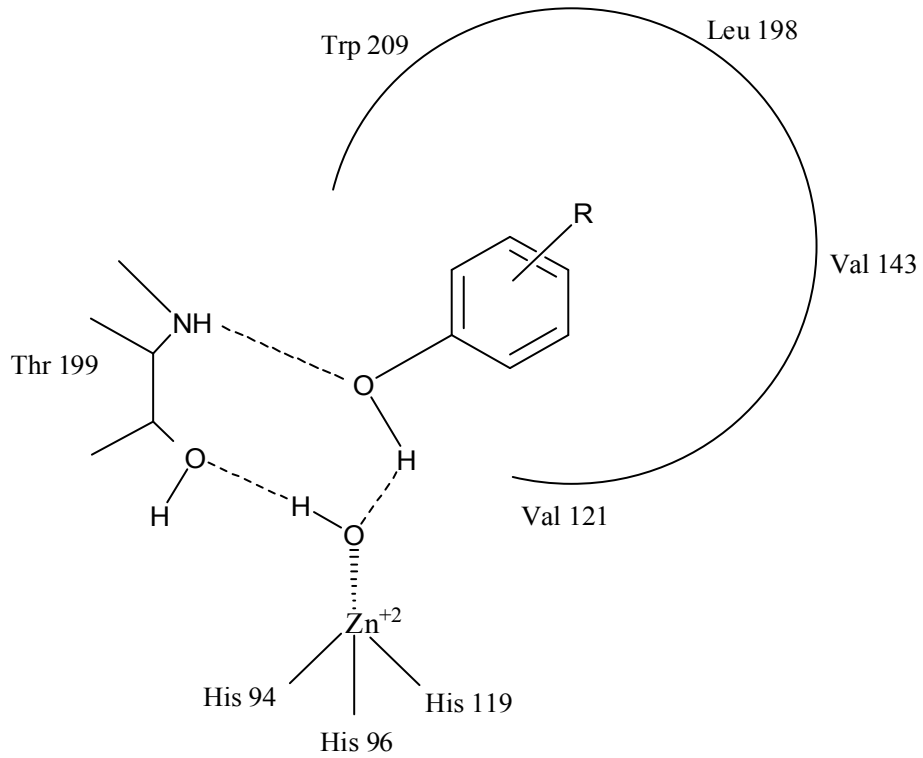
İnhibitör	hCAI K_i değeri	İnhibisyon türü	hCAII K_i değeri	İnhibisyon türü
1 <i>R</i> (<i>S</i>), 2 <i>R</i> (<i>S</i>)-2-Hidroksisikloheksil sülfamat	1,830 μ M	Yarışmasız	0,96 μ M	Yarışmasız
2,2-difenilasetaldehit	21,32 μ M	Yarıyarışmalı	5,56 μ M	Yarışmasız
2-Sülfamoyiloksi benzoik asit (Salisilik asit sülfamat esteri)	1,390 μ M	Yarışmasız	2,64 μ M	Yarışmasız
2-Sülfamoyiloksi-5-sülfo benzoik asit (5-sülfosalisilik asit sülfamat esteri)	0,936 μ M	Yarışmasız	0,59 μ M	Yarıyarışmalı
2-Sülfamoyiloksi-4-sülfo benzoik asit (4-sülfosalisilik asit sülfamat esteri)	0,305 μ M	Yarışmasız	1,25 μ M	Yarışmalı

Bu çizelgeler karşılaştırıldığında HCA-I için; salisilik asit ve 5-sülfosalisilik asit için IC_{50} değerleri sırasıyla 0,56 mM ve 0,42 mM iken, salisilik asit sülfamat esteri ve 5-sülfosalisilik asit sülfamat esteri için bu değerler 0,330 μ M ve 0,266 μ M'dir. HCA-II için ise, salisilik asit ve 5-sülfosalisilik asit için IC_{50} değerleri sırasıyla 0,68 mM ve 0,29 mM iken, salisilik asit sülfamat esteri ve 5-sülfosalisilik asit sülfamat esteri için bu değerler 0,405 μ M ve 0,123 μ M olarak bulunmuştur. Bu değerlere göre sülfamat esteri inhibisyon gücüne 1000-2000 kat arasında artırmaktadır. Nitekim Poulsen *et al.* (2008), bir sülfonamid ($-SO_2NH_2$) veya sülfamat ($-OSO_2NH_2$) fonksiyonel grubuna sahip olan,

bileşiklerin güçlü karbonik anhidraz inhibitörleri olarak bilindiklerini ifade etmektedirler.

Bilindiği gibi glukoma hastalığı tedavisinde HCA-II inhibitörleri kullanıldığı için HCA-II üzerine yoğun bir şekilde inhibisyon çalışmaları devam etmektedir. Christianson ve grubu tarafından son zamanlarda yapılan bir çalışmada HCA-II ile fenollerin etkileşimini gösteren X-ray kristal yapısı aydınlatılmıştır (1994). Fenollerin ve salisilik asit gibi fenolik asitlerin, CA inhibitörleri olarak araştırmanın temel nedeni, basit fenollerin (PhOH) CA'nın hedef izenzimi olan hCA-II'yi başta olmak üzere substrat olarak CO₂ ye karşı tek yarışmalı inhibitör olduğunun ispatlanmasından dolayıdır.

Bu çalışmada enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn²⁺ ile fenollerin fonksiyonel –OH gurubunun 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 –OH'ını enzim aktif bölgesinin çinko bağlı su/hidroksit iyonuna bağlayarak bu fenol bileşiklerinin CA ya bağlandığını ispatladılar (Senturk *et al.* 2009).



Şekil 5.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna inhibitörlerin bağlanma modeli (Bayram *et al.* 2008)

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması için daha önceki araştırmacıların sentezlediklerinden farklı afinite jellerinin hazırlanması amaçlanmıştır. Matriks olarak Sepharose 2B, 4B ve 6B; uzantı kolu olarak anilin ve ligand olarak sülfanilamid kullanılmıştır. Bu amaçla önce matriks olarak görev yapan Sepharose türevleri $KMnO_4$ ile yükseltgenmiş ve bunu takiben $SOCl_2$ ile aktifleştirilmiştir. Daha sonra aktifleştirilmiş jele uzantı kolu olarak anilin takılmış ve son olarak jele takılan anilin molekülünün para pozisyonuna ligand olarak diazolan sülfanilamid kenetlendirilmiştir.
2. Hazırlanan afinite jellerinin izoenzimleri saflaştırabilme kapasiteleri; farklı sıcaklık, pH ve iyonik şiddette belirlenmiştir. Böylece genel olarak bu tip afinite jellerinin hazırlanmasında kullanılan toksik siyanojen bromür yerine farklı ve ucuz bir yöntem kullanılmıştır.

3. Salisilik asit ve 5-sülfosalisilik asidin sülfamat türevleri ile siklohekzan epoksitin sülfamat türevleri sırayla amidasyon reaksiyonu ve epoksit açılma reaksiyonlarıyla sentezlenmiştir.

4. Sentezlenen yeni sülfamat türevlerinin, afinite jelleriyle 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/veya K_i sabitleri bulunarak inhibisyon tipleri tespit edilmiştir. Yeni sentezlenen sülfamat türevlerinin, başlangıç moleküllerine göre çok daha güçlü HCA-I ve HCA-II inhibitörleri olduğu görülmüştür.

Bu bulgulardan, yaptığımız çalışmaların literatüre önemli katkılarda bulunduğu, yeni sentezlenen ve yöntemi ve/veya modifikasyonu tamamen grubumuza ait olan salisilik asit, 5-sülfosalisilik asidin ve 4-sülfosalisilik asidin sülfamat türevleri ile siklohekzen epoksitin sülfamat türevleri hCA-I ve hCA-II inhibitörleri olarak kullanılabilir. Değişik hastalıklarda ilaç olarak kullanılabilirliği araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abbate, F., Supuran, C.T., Scozzafava, A., Orioli, P., Stubbs, M.T., Klebe, G., 2002. Nonaromatic sulfonamide group as an ideal anchor for potent human carbonic anhydrase inhibitors: Role of hydrogen-bonding networks in ligand binding and drug design. *J Med Chem.*, 45,3583–3587.
- Ahmed, S., James, K., Owen, C.P., Patel, C.K., Patel, M., 2001. Acid dissociation constant: A potential physicochemical factor in the inhibition of the enzyme estrone sulfatase (ES). *Bioorg Med Chem Lett.*, 11,899-902.
- Ahmed, S., James, K., Owen, C.P., Sampson, L., Patel, C.K., 2002. Review of estrone sulfatase and its inhibitors-an important new target against hormone dependent breast cancer. *Curr Med Chem.*, 9, 263-273.
- Antel, J., Hebebrand, J., Preuschoff, U., David, S., Sann, H., Weske, M., 2002. Method for locating compounds which are suitable for the treatment and/or prophylaxis of obesity. WO Patent 0207821.
- Antel, J., Weber, A., Sotriffer, C.A., Klebe, G., 2004. Multiple binding modes observed in X-ray structures of carbonic anhydrase-inhibitor complexes and elsewhere: Consequences for structure-based drug design. In: Supuran CT, Scozzafava A, Conway J, editors. *Carbonic anhydrase-Its inhibitors and activators*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp 45–66.
- Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Ozdemir, H. and Kufrevioglu O.I.,1996, A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turk J Med Sci.*, 26,163-166.
- Bayram, E., Şentürk, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T., 2008. *In vitro* inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isozymes I and II, *Bioorg Med Chem.*, 16, 9101-9105.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2002. Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Biol Pharm Bull.*, 25, 966-969.
- Bulbul, M., Saracoglu, N., Kufrevioglu, O.I., Ciftci, M., 2002. Bile acid derivatives of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and investigation of inhibition effects. *Bioorg Med Chem.*, 10, 2561-2567.
- Bulbul, M., Hisar, O., Beydemir, S., Ciftci, M., Kufrevioglu, 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.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-251.
- Briganti, F., Pierattelli, R., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 1996. Carbonic anhydrase inhibitors. Part 37. Novel classes of carbonic anhydrase inhibitors and their interaction with the native and cobalt-substituted enzyme: Kinetic and spectroscopic investigations. *Eur J Med Chem.*31,1001-1010.

- Cabiscol, E., Levine, R.L., 1996. The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 93, 4170-4174.
- Camarasa, M.J., Fernandez-Resa, P., Garcia-Lopez, M.T., De las Heras, F.G., Mendez-Castrillon, P.P., Alarcon, B., Carrasco, L., 1985. Uridine 5'-diphosphate glucose analogues. Inhibitors of protein glycosylation that show antiviral activity. *J Med Chem.*, 28,40-46.
- Casini, A., Antel, J., Abbate, F., Scozzafava, A., David, S., Waldeck, H., Schafer, S., Supuran, C.T., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II, and IV. *Bioorg Med Chem Lett.* 13,841-845.
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y., Carter, N., 2000. The Carbonic Anhydrases-New Horizons. *Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed., McGraw-Hill, Inc., NewYork. pp. 2165-2204,
- Christie, K.N., Thomson, C., Xue, L.Z., Lucocq, J.M., Hopwood, D., 1997. Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III, and IV are present in human esophageal epithelium *J Histochem Cytochem.*, 45, 35-40.
- Devlin, T. M., 2002. *Biochemistry with Clinical Correlations*. Kanada.
- Falkbring, S.O., Göthe, P.O., Nyman, L. and Porath, J., 1972, Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *FEBS. Letter*, 24,229.
- Feldstein, J.B., Silvarman D.N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *J. Biol. Chem.* 259, 5447-5453.
- Gordon, A., Price, H., 1999. Mood stabilization and weight loss with topiramate. *Am J Psychiatry.* 156, 968-969.
- Gözükara, E., 1989. Enzimler. *Biyokimya*. Ofset Repromat Ltd.Şti, 572-576 s, Ankara.
- Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W.S., LaNoue, K.F., Lynch, C.J., 1996. Differentiation-dependent expression of CA V and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *FASEB Journal*, 10, 481-490.
- Henry, R.P., Swenson, E.R., 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. *Respiration Physiology*, 121, 1-12.
- Hewett-Emmett, D., 2000. In the *Carbonic Anhydrase-New Horizons*. Birkhauser Verlag, Basel, 29-78.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-Anchored form of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, 392, 83-92, Part 1.
- Hunaiti, A.A., Soud, M., 2000. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroksidase in human blood. *Science Total Environ.*, 248, 45-50.
- Jennings, L.J., Macchia, M., Parkin, A., 1992. Synthesis of analogues of 5-iodo-2'-deoxyuridine-5'-diphosphate. *J Chem Soc Perkin Trans.*, 1, 2197-2202.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2008. *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, 91-95, 118 s, İstanbul.
- Keilin, D., Mann, T., 1944. Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature* 153, 107-108.

- Koolman, J., Klaus-Henrich, R. and Jürgen, W., 2003. Renkli Biyokimya Atlası, Çeviri Editörleri: Doç. Dr. Akın Yeşilkaya, Doç. Dr. Aslı Baykal, Dr Özgül Alper., Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti.
- Krungskrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. and Krungskrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in Plasmodium falciparum. International Journal of Parasitology, 31, 661-668.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature, 227, 680.
- Lakkis, M.M., Oshea, K.S., Tashian, R.E., 1997. Differential expression of the carbonic anhydrase genes for ca VII (Car7) and CA-RP VIII (Car8) in mouse brain. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 45 (5), 657-662.
- Lehninger, A.L., 2000. Principles of biochemistry. Newyork: Worth ,Publishers Inc.
- Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A.K., Saarnio, J., Kivela, A.J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, S., 2004. Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. J Biological Chem., 279, 2719-2727.
- Lönnerholm, G., Selking, Ö., Wistrand, P.J., 1985. Amount and distribution of carbonic anhydrases CA I and CA II in the gastrointestinal tract. Gastroenterology. 88,1151-61
- Maa, J.S., Rodriguez, J.F., Esteban, M., 1990. Structural and functional characterization of a cell surface binding protein of Vaccinia virus. Journal of Biological Chemistry, 265, 1569-1577.
- Malini, B., Purohit, A., Ganeshapillai, D., Woo, L.W., Potter, B.V., Reed, M.J., 2000. Inhibition of steroid sulphatase activity by tricyclic coumarin sulphamates. J Steroid Biochem Mol Biol. 75,253-258.
- 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., Conroy, C.W., Wynns, G.C., Godman, D.F., 1997. Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor. J Pharmacol Experimental Therapeutics 280, 98-104.
- Meldrum, N.N., Roughton, F.J.W., 1933. Carbonic anhydrase: its preparation and properties. Nature 80, 113-142.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Çeviri Editörü: Prof. Dr. Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık.
- Nishimori, I., 2004. Acatalytic CAs, Carbonic anhydrase related proteins, in *Carbonic Anhydrase, Its Inhibitors and Activators* (Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Conway, J., Eds.) pp 24-43, CRC Press, Boca Raton, FL
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusumoto, W., Zhu, X.L., Sly, W.S., 1995. Carbonic-anhydrase4. role of removal of c-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity. Archives Biochem Biophysics., 320, 315-322.
- 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.

- Poulsen, S.A., Wilkinson, B.L., Innocenti, A., Vullo, D., Supuran, C.T., 2008. Inhibition of human mitochondrial carbonic anhydrases VA and VB with para-(4-phenyltriazole-1-yl)-benzenesulfonamide derivatives, *Bioorg Med Chem.*, 18, 4624-4627.
- Pocker, Y., Sarkanen, S., 1979. Carbonic anhydrase: structure, catalytic versatility and inhibition, *advances in enzymology*. New York, p. 149-273.
- Raisanen, S.R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rahkila, P., Harkonen, P.L., Vaananen, H.K., 1999. Carbonic Anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Faseb Journal*, 13, 513-522.
- Ren, X.L., Lindskog, S., 1992. Buffer dependence of CO₂ hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I. *Biochimica Biophysica Acta*, 1120, 81-86.
- Renzi, G., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors: topical sulfonamide antiglaucoma agents incorporating secondary amine moieties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 673-676.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*, Inc, New York, p: 403.
- Senturk, M., Gulcin, I., Dastan A., Kufrevioglu, O.I., Supuran C.T., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 3207-3211.
- Schreiner, E.P., Wolff, B., Winiski, A.P., Billich, A., 2003. 6-(2-adamantan-2-ylidene-hydroxybenzoxazole)-O-sulfamate: A potent non-steroidal irreversible inhibitor of human steroid sulfatase. *Bioorg Med Chem Lett.*, 13, 4313-4316.
- Sjoblom, B., Elleby, B., Wallgren, K., Jonsson, B.H., Lindskog, S., 1996. Two point mutations convert a catalytically inactive carbonic anhydrase-related protein (CARP) to an active enzyme. *FEBS Letters*, 398, 322-325.
- Sly, W.S., Hu, P.Y., 1995. Human carbonic-anhydrases and carbonic-anhydrase deficiencies. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 375-401.
- Sugrue, M.F., 2000. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progress Retinal Eye Research.*, 19, 87-112.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors - Part 94. 1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents? *Eur J Med Chem.*, 35, 867-874.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Med Chem.*, 1, 61-97.
- Supuran, C.T., 2003. Indisulam: An anticancer sulfonamide in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*, 12, 283-287.
- Supuran, C.T., Innocenti, A., Mastrolorenzo, A., Scozzafava, A., 2004. Antiviral sulfonamide derivatives. *Mini Rev Med Chem.*, 4, 189-200.
- Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov.*, 7, 168-181.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrase. *J Biol Chem.*, 242, 4221-4229.
- Whitney, P.I., 1974. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Anal Biochem.*, 64, 267-276.
- Wilbur, K.M., Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J Biol Chemistry.*, 176, 147-154.

- Winum, J., Scozzafava, A., Montero, J., Supuran, C.T., 2005. Sulfamates and their therapeutic potential. *Medicinal Research Reviews*, 25, 186-228.
- Wistrand, P.J., Lindahl, S. and Wahlstrand, T., 1975, Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.*, 57, 189.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Kars’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kars’ın Selim ilçesinde bitirdikten sonra 1998 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2002 yılında mezun oldu. 2003 yılında yüksek lisans eğitime başlayarak 2006 yılında yüksek lisansını tamamladı. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalında doktora eğitime başladı ve 2009 yılında doktorasını tamamladı.